

Bewertung der Osseointegration von
Knochenersatzmaterialien im
"Jenaer Schädelmodell"
anhand histologischer Präparate und 3D-
μCT-Daten

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Stefan Kottke

geboren am 23.09.1992 in Schwedt/Oder

Gutachter:

- 1. PD Dr. Gerlind Schneider, Jena**
- 2. Prof. Dr. Dr. Bernd W. Sigusch, Jena**
- 3. apl. Prof. Dr. Andreas Müller, Gera**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.05.2022

Abkürzungsverzeichnis

AG Arbeitsgruppe

BIC bone-implant-contact

BV/TV bone volume/total volume

μCT micro-Computertomographie

BID bone-implant-distance

CAD Computer aided design

FKRZ Fremdkörperriesenzellen

GUI graphical user interface

ID Identifikation

MG Masson-Goldner-Färbung

NZWR New Zealand White Rabbits

o.g. oben genannte

PEEK Polyetheretherketon

PMMA Polymethylmethacrylat

ROI Region of interest

TCP Tricalciumphosphat

VOI Volume of interest

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	7
2. EINLEITUNG.....	8
2.2 Knochenersatzmaterialien im Schädelbereich.....	10
2.2.2 Einsatzbereiche und Indikationen.....	10
2.2.3 Anforderungen an das Implantat.....	11
2.2.4 Implantatmaterialien.....	11
3. ZIELSTELLUNG.....	16
4. MATERIAL UND METHODEN.....	17
4.1 Implantatmaterialien.....	19
4.1.1 Bioverit®.....	19
4.1.2 Titan.....	20
4.1.3 Polymer.....	20
4.1.4 Composit.....	20
4.2 Tierexperimentelle Studie.....	21
4.3 Probenpräparation.....	21
4.3.1 Implantation der Probekörper.....	21
4.3.2 Explantation.....	22
4.3.3 Probenpräparation.....	22
4.4 μCT.....	23
4.5 Histologie.....	23
4.6 Histomorphometrische Auswertung.....	25
4.6.1 Histomorphometrie-Software HistoGap.....	26
4.7 3D-Analyse im μCT.....	27
4.7.1 Entwicklung des Jahresring-Algorithmus.....	28
4.7.2 Anwendung und Funktionsweise des Jahresring-Algorithmus.....	29
4.8 Statistische Auswertung der Ergebnisse aus Histologie und μCT.....	33
5. ERGEBNISSE.....	34
5.1 Weiterentwicklung der 2D-Software HistoGap.....	34
5.1.1 Erfassung der Randbedingungen.....	34
5.1.2 Histomorphometrische Messung.....	35
5.1.3 Datenexport als Tabelle.....	36
5.2 Ergebnisse der Histomorphometrie der tierexperimentellen Studie.....	37
5.2.1 BIC und BID der verwendeten Implantatmaterialien.....	38
5.2.1.2 Titan.....	38
5.2.1.3 Composit.....	38

5.2.1.5 Vergleich von BID und BIC der Implantatmaterialien.....	39
5.2.2. Qualitative Auswertung der Histologie.....	42
5.3 Entwicklung der 3D-Methode: Jahresring-Algorithmus.....	49
5.3.1 Erfüllung der Soll-Anforderungen.....	49
5.3.2 Fertigstellung der Version 2.0 (Annuli Labels).....	51
5.4 Ergebnisse der μCT.....	52
5.4.1 BV/TV der Implantatmaterialien über die Gesamtdistanz.....	52
5.4.1.1 Bioverit®.....	54
5.4.1.2 Composit.....	55
5.4.1.4 Vergleich des BV/TV der Implantatmaterialien über die Gesamtdistanz.....	57
5.4.2 Ergebnisse unterteilt nach den virtuellen VOIs des Jahresring-Algorithmus.....	58
5.4.2.1 VOI 1: BIC.....	58
5.4.2.2 VOI 2: bindegewebige Einscheidung und neu gebildeter Knochen.....	59
5.4.2.3 VOI 3: neugebildeter/umgebauter Knochen.....	60
5.4.2.4 VOI 4: vorhandener Knochen.....	61
5.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des Jahresring-Algorithmus.....	63
6. DISKUSSION.....	65
6.1 Diskussion der Methodik.....	65
6.1.1 Versuchsaufbau.....	65
6.1.1.1 Tiermodell.....	65
6.1.1.2 Implantationsdauer.....	65
6.1.1.3 Untersuchungsmethoden/Bildgebung.....	66
6.2 Diskussion der Ergebnisse.....	66
6.2.1 Entwicklung der 3D-Auswertungsmethode.....	66
6.2.1.1 Einfluss der Scanbedingungen des μ CT auf die Segmentierung.....	66
6.2.1.2 Segmentierung der 3D-Daten.....	67
6.2.1.3 Entwicklung und Funktionsweise des Jahresring-Algorithmus.....	68
6.2.2 3D-Auswertung mittels μ CT.....	71
6.2.3 Osseointegration der untersuchten Materialien.....	71
6.2.4 Vergleich von μ CT und Histologie.....	75
7. SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	77
8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	79
9. ANHANG.....	88
9.1 Histologie.....	88
9.1.1 Hartgewebe-Histologie nach der Trenn-Dünnschliff-Technik von Donath.....	88
9.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	89
9.1.3 Modifizierte Masson-Goldner-Färbung.....	90
9.1.4 Referenzbilder für die qualitative Auswertung der Histologien.....	91
9.2 Histomorphometrische Auswertung.....	97
9.2.1 Auswertungsalgorithmus der Morphometrie-Software HistoGap.....	97
9.2.2 histomorphometrische Auswertung in HistoGap.....	98
9.3 3D-Analyse im μCT.....	100
9.3.1 Literaturrecherche zur Entwicklung des Jahresring-Algorithmus.....	100

9.3.2 materialspezifische Segmentierung.....	101
9.3.2.1 Segmentierung von Bioverit®.....	101
9.3.2.2 Segmentierung von Composit.....	107
9.3.2.3 Segmentierung von Polymer.....	111
9.3.3 Modul Annuli Labels.....	114
9.4 Weiterentwicklung HistoGap.....	115
9.4.1 Tastenkombinationen in HistoGap.....	115
9.5 Ergebnisse der Histomorphometrie der tierexperimentellen Studie.....	116
9.5.1 Test auf Normalverteilung der Histologie.....	116
9.6 Entwicklung der 3D-Methode: Jahresring-Algorithmus.....	117
9.6.1 Vergleich der Soll-Anforderungen mit Version 1.0.....	117
9.6.2 Vergleich der Versionen (1.0 und 2.0).....	120
9.7 Ergebnisse der μCT.....	123
9.7.1 Test auf Normalverteilung der 3D-Bilddaten.....	123
9.8 Abbildungsverzeichnis.....	124
9.9 Tabellenverzeichnis.....	128
9.10 Danksagung.....	130
9.11 Ehrenwörtliche Erklärung.....	131

1. Zusammenfassung

Obwohl weltweit seit Jahrzehnten an Biomaterialien geforscht wird, besteht immer noch Bedarf an neuen optimierten Implantatmaterialien. Das trifft auch auf das Implantatlager Schädelknochen zu, wo aufgrund der Physiologie sowie des hohen Anspruchs einer patientenspezifischen Formgebung die vorhandenen Materialien bzw. Herstellungstechnologien in vielen Fällen den gestellten Anforderungen nur eingeschränkt entsprechen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein tierexperimenteller Langzeitversuch ausgewertet, mit dem die Biokompatibilität eines neuartigen, auf einem 3D-Druckverfahren basierenden Composites aus Tricalciumphosphat und einem Methacrylat-Copolymer im Vergleich zu zwei etablierten Implantatmaterialien (Titan, Bioverit®) untersucht wurde.

Zur Evaluierung der Ergebnisse dieses tierexperimentellen Langzeitversuchs lagen 2D-Bilddaten aus der Hartgewebhistologie und 3D-Bilddaten aus der micro-Computertomographie (μ CT) vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden der Knochen-Implantat-Kontakt (bone implant contact, BIC) sowie weitere quantitative Parameter des Knochens in der Umgebung des Implantats analysiert. Um die Osseointegration der getesteten Implantatmaterialien anhand der vorliegenden 2D-Bilddaten aus der Hartgewebhistologie und 3D-Bilddaten aus der μ CT quantitativ zu bewerten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene morphometrische Verfahren entwickelt und angewendet.

Für die quantitativen Auswertungen der 2D-Bilddaten wurde eine in der AG Biomateriallabor entwickelte 2D-Histomorphometrie-Software evaluiert und eine neue Version mit verbesserter Funktionalität und Ergonomie implementiert, getestet und auf die vorliegenden Hartgewebhistologie-Bilddaten angewendet. Mit dieser Software wurden anhand der Histologie-Bilddaten der Knochen-Implantat-Abstand (bone implant distance, BID) sowie der direkt davon abgeleitete BIC ermittelt. Die vorliegenden 3D-Bilddaten aus μ CT-Scans wurden mit Avizo® (Thermo Fisher Scientific, USA) visualisiert und bearbeitet. Zur Auswertung wurde eine Vorgehensweise zur effizienten Quantifizierung der Knochen-Volumendichte (bone volume/total volume, BV/TV) in Abhängigkeit vom Abstand zur Implantat-Oberfläche entwickelt und angewendet (Jahresring-Algorithmus).

In der histomorphometrischen Auswertung wurde sowohl bei Implantaten aus dem neu entwickelten Composit-Material als auch bei Implantaten aus dessen Polymer-Komponente ein signifikant höherer BIC bzw. niedrigerer BID gemessen als bei den Implantaten aus den bereits in der klinischen Praxis bewährten Materialien (Bioverit[®], Titan). In der 3D-Auswertung mittels des Jahresring-Algorithmus wurde vor allem bei dem Composit eine deutlich höhere Knochendichte gemessen. Weiterhin wurde hierbei beim Material Polymer das größte Maximum der relativen Knochendichte in Implantatnähe gemessen.

Schlussfolgernd bestätigte sich, dass die neu entwickelten Implantatmaterialien (Polymer und Composit) im Langzeitversuch biokompatibel, stabil und für das Implantatlager Schädelknochen geeignet sind. Gegenüber den bereits in der klinischen Praxis bewährten Implantatmaterialien Bioverit[®] und Titan waren die neu entwickelten Materialien signifikant besser osseointegriert. Weiterhin konnte erfolgreich das 3D-Auswertungsverfahren Jahresring-Algorithmus auf eine größere Datenmenge angewendet werden. Durch die Kombination von 2D- und 3D-Bildgebung lassen sich deutlich validere Aussagen zur Osseointegration treffen.

2. Einleitung

2.1 Anatomie und Regeneration des Schädelknochens

Der humane Schädel setzt sich aus zwei Bestandteilen zusammen, dem Gesichtsbereich (Viscerocranium) und dem Teil, der das restliche Gehirn umfasst (Neurocranium). Weiterhin kann eine Einteilung nach der embryonalen Entwicklung vorgenommen werden. Der Schädel wird dann dementsprechend in das Chondrocranium (entstanden durch chondrale Osteogenese) und das Desmocranium (größter Teil des Knochens; entstanden durch desmale Osteogenese) unterteilt (Platzer und Shiozawa 2018, Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Im Besonderen soll hier die Calavaria oder Schädelkalotte erwähnt werden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Ort des Implantatlagers ist. Die Kalotte setzt sich makroskopisch größtenteils aus platten Schädelknochen zusammen (*Os frontale*, *Os parietale*, *Os occipitale*) und kann auch als unbelasteter Teil des Schädels bezeichnet werden (Schneider 2003, Voigt und Schneider 2009). Weiterhin weist dieser Knochen die höchste Mineraldichte auf (Kamal et al. 2018a).

Der platte Schädelknochen ist in drei Zonen unterteilt (Abb. 1). Extrakraniell, also auf der Außenseite des Schädels, ist die *Lamina externa* bzw. *Tabula externa* erkennbar. Es handelt sich hier um eine sehr kompakte, konvex verlaufende Knochenschicht. Hieran folgt die *Diploe*, die die spongiöse Zwischenschicht bezeichnet. Die hier zu findenden *Canales diploici* beinhalten Venen und sind somit auch für die Versorgung der *Lamina externa* und *interna* verantwortlich. Weiterhin stehen sie in Verbindung mit den Duravenen und dem venösen Sinus (Platzer und Shiozawa 2018). Die kompakte innen liegende *Lamina interna* bzw. *Tabula interna* ist konkav aufgebaut. Auch die Bezeichnung des Periosts ist hier anders als z.B. bei den langen Röhrenknochen. Das über der *Lamina externa* gelegene Periost wird als *Pericranium* bezeichnet. An der *Lamina interna* gelegen findet sich das *Endocranium*, das direkt mit der *Dura mater* verbunden ist.

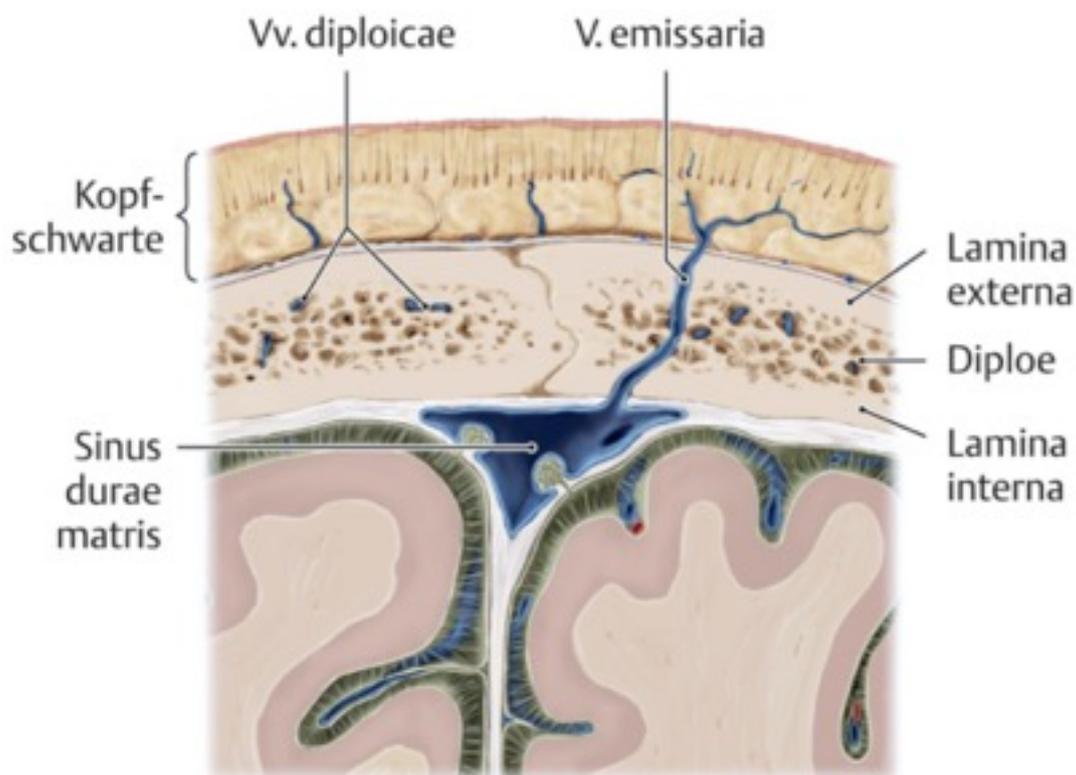


Abb. 1: anatomische Darstellung des strukturellen Aufbaus des humanen Schädelknochen (Aumüller und Wennemuth 2017)

Das Implantatlager Schädel hat sehr spezifische Eigenschaften in Bezug auf das Regenerations- und Einheilungsverhalten. Es wurde bis vor wenigen Jahren die Meinung vertreten, dass Defektheilung vor allem durch die einwandernden Stammzellen aus den *Vv. diploicae* sowie der *Dura mater* ausging. Aktuell gibt es diesbezüglich ein Umdenken, da es gelungen ist Stammzellen im Schädelknochen nachzuweisen (Zhao et al. 2015). So gilt

aktuell, dass ein großer Teil des Regenerationspotenzials hierbei von den mesenchymalen Stammzellen aus den Suturen stammt (Doro et al. 2017).

2.2 Knochenersatzmaterialien im Schädelbereich

2.2.1 Biokompatibilität und Osseointegration

Die Biokompatibilität beschreibt die Eigenschaft eines Materials, um bei einer spezifischen Applikation eine angemessene, akute wie auch chronische Reaktion des Organismus hervorzurufen (Williams 2008). Die Biokompatibilität wird mittels qualitativer (z.B. Score-System zur Beurteilung der Fremdkörperreaktion) oder quantitativer Parameter (z.B. Abstand zwischen Knochen und Implantat, Bone implant distance, BID) erfasst und beschrieben. Im Bereich des Schädelknochens wird die Biokompatibilität anhand der Osseointegration erfasst. Definiert ist dieser Begriff als strukturelle und funktionale Verbindung zwischen vitalem Knochen und der Implantatoberfläche (Adell et al. 1981). Merkmal einer guten Osseointegration ist hierbei, wenn keine Bewegungen mehr zwischen dem Implantatkörper und dem in Kontakt befindlichen Knochengewebe möglich sind (Mavrogenis et al. 2009). Als quantitative Parameter werden hier der BID und der Bone implant contact (BIC) genutzt. Der BIC ist hierbei ein berechneter Wert, der angibt, wieviel Prozent des Knochens direkten Kontakt (also einen BID = 0 μm) mit dem Implantatmaterial über die gesamte Messtrecke haben. Bei eher geringen BIC-Werten liegt somit eine eher niedrige Osseointegration vor. Aktuell gilt der BIC als Goldstandard zur Beschreibung der Osseointegration, jedoch sollte der BID in der endgültigen Bewertung der Osseointegration berücksichtigt werden. Denn trotz eines schlechten BIC-Wertes können die gemessenen BID-Werte noch als ausreichend osseointegriert gesehen werden, da der Unterschied zwischen einem direkten Implantat-Knochen-Kontakt (BID= 0 μm) und keinem (BID > 0 μm) teilweise nur wenige μm ausmachen kann und dann eher theoretischer als praktischer Natur ist.

2.2.2 Einsatzbereiche und Indikationen

Der Einsatzbereich für Implantate als Knochenersatz im Schädelbereich gestaltet sich sehr vielfältig aufgrund der heterogenen Implantatlager sowie der unterschiedlichen Anforderungen an ein Implantat. Ein häufiger Anwendungsanfall für Implantate im Schädelbereich ist die Cranioplastie. Als häufigste Indikation für eine solche gilt der Zustand nach einem traumatischen Ereignis (Leao et al. 2018). Es existieren jedoch auch nicht

traumatische Ursachen wie z.B. Aneurysmata, Hämorrhagien oder Infektionen, die einen solchen Eingriff nach sich ziehen (Zanotti et al. 2016).

Im Bereich der HNO-Heilkunde erfolgen knöcherne Rekonstruktionen im Bereich der Nasennebenhöhlen, des Mittelgesichtes und des Felsenbeines. Häufige Ursachen sind Tumore, postentzündliche und posttraumatische Veränderungen.

2.2.3 Anforderungen an das Implantat

Trotz der unterschiedlichen Einsatzgebiete werden für alle Implantate für den Schädelbereich folgende Eigenschaften gefordert:

Das zu verwendende Material sollte atoxisch, nicht karzinogen sein und ein inertes Implantationsverhalten bei gleichzeitig hoher Biokompatibilität aufweisen. Dies schließt ebenfalls eine Korrosionsstabilität mit ein (Zanotti et al. 2016, Martini et al. 2011).

Im Zusammenhang mit der geforderten Biokompatibilität muss insbesondere auch die jeweils erforderliche biomechanische Zuverlässigkeit des Implantats berücksichtigt werden. Vor allem sollte das verwendete Material den extrakraniellen Einflüssen wie z.B. Bewegungen, Stürzen oder Schlägen standhalten oder zumindest keine größeren sekundären Schäden verursachen. Weiterhin sollte das Material den intrakraniellen Drücken, die vor allem postoperativ auftreten können, standhalten (Posti et al. 2015, Piazza und Grady 2017).

Um individuelle anatomische Merkmale zu berücksichtigen, sollte das Material individuell anpassbar sein (Martini et al. 2011). Dies kann entweder präoperativ mittels rechnergestützter Konstruktion (computer-aided design; CAD) (Lethaus et al. 2011) bzw. im 3D-Druckverfahren (Kim et al. 2012) oder intraoperativ (z.B. mittels Fräsen) erfolgen (Lee et al. 2009).

2.2.4 Implantatmaterialien

Knochenersatzmaterialien werden eingeteilt in autogen, allogenen, xenogen und alloplastisch.

Autogener Knochen

Der autogene Knochen wird durch Explantation von körpereigenem Gewebe gewonnen (z.B. Beckenkamm, Rippen oder Schädel). Vor allem bei Craniektomien ist dies ein weit verbreitetes Verfahren, wobei hier vor allem Material aus dem Schädel oder dem *Os ilium* genutzt wird (Zanotti et al. 2016).

Vor allem bei pädiatrischen Patienten ist der autogene Knochen das bevorzugte Material (Goiato et al. 2009). Vorteilhaft hierbei ist, dass ein geringeres Risiko an Infektionen nach Reimplantation besteht sowie autogener Knochen meist die gleiche Stabilität wie der native Knochen aufweist (Zanotti et al. 2016). Nachteilig ist neben der höheren Morbidität am Entnahmeort, dass nicht immer ausreichend Material gewonnen werden kann, sowie dass aufgrund der geringen Anpassbarkeit in vielen Fällen nur ein nicht zufriedenstellendes ästhetisches Ergebnis erzielt werden kann (Beleites et al. 2001, Neovius und Engstrand 2010).

Allogener Knochen

Allogener Knochen beruht auf der Gewinnung von Knochenmaterialien von entsprechenden Spendern. Insgesamt werden 4 Gruppen unterschieden: frischer oder frisch gefrorener Knochen (Fresh frozen bone allograft, FFBA), mineralisierter, prozessierter, entzellularisierter gefriergetrockneter Knochen (Mineralized processed bone allograft/freeze-dried bone allograft, MPBA/FDBA), demineralisierter gefriergetrockneter Knochen (Demineralized freeze-dried allograft, DFDBA) und kryokonservierter Knochen (Cryopreserved bone allograft, CBA). Alle in Deutschland erhältlichen allogenen Knochenmaterialien sind hierbei dezellularisiert (Smeets et al. 2017) und fallen somit in die Gruppen der MPBA/FDBA oder DFDBA.

Beim FBBA sowie CBA bleiben die zellulären Bestandteile vollständig erhalten. Im ersten Schritt der Konservierung erfolgt eine Lagerung des zu transplantierenden Knochens bei circa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Im Anschluss erfolgte eine weitere Aufbereitung. Entweder mittels Bestrahlung (FBBA) oder durch Hinzugabe von Kryoprotektiva (CBA). Bei letzt genannten Verfahren erfolgte die weitere Lagerung bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Barbeck 2017).

Bei der Gewinnung von MPBA/FDBA sowie DFDBA erfolgt zuerst, nach Entfernung der groben Bestandteile (Blut/ Zell- und weitere Gewebebestandteilen), eine chemische Aufreinigung. Hierbei werden meist einfache Alkohole verwendet, um eine Denaturierung

nichtkollagener Proteine sowie die Inaktivierung von viralen Proteinen/Bakterien herbeizuführen. Im Anschluss hieran wird dann eine Gefriertrocknung (Lyophilisation) durchgeführt. Abschluss bildet hierbei eine Bestrahlung des Knochens mit gamma-Strahlen (Smeets et al. 2017). Nur beim DFDBA erfolgt noch ein weiterer Zwischenschritt zur Demineralisierung des Knochens mit dem Ziel hierbei verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. Bone Morphogenetic Proteins; BMP) und Kollagen freizulegen.

Vorteile dieser Materialien sind die Verfügbarkeit und eine Osteokonduktion (Lima et al. 2018), da das vorhandene Gerüst hervorragend als Leitstruktur genutzt wird. Jedoch ergeben sich je nach verwendeter Konservierungsmethode eine unterschiedliche osteogene Potenz (Garrel und Gotzen 1998).

Bei den allogenen Knochenersatzmaterialien ist ebenfalls eine Planung mittels CAD möglich. Jedoch werden diese als Blocktransplantate gefertigt und finden aktuell nur in der zahnmedizinischen Implantologie Anwendung (Smeets et al. 2018). Diese Implantatblöcke sind nicht vergleichbar mit einem Implantat aus einem alloplastischen Material aus einem 3D-Druck. Aufgrund der vorgegeben Strukturen ist keine ausreichende individuelle Anpassbarkeit gegeben und somit ist im sichtbaren Bereich mit ästhetischen Defiziten zu rechnen.

Nachteilig wirkt sich hier die Verwendung von körperfremden Materialien aus, die eine deutlich stärkere humorale Antwort des Empfängers auf den implantierten Knochen hervorrufen können (Brandt et al. 2010). Weiterhin weisen allogene Materialien eher schlechte osteogene Eigenschaften auf (Zhang et al. 2019). Eine weitere Hauptproblematik bleibt die mögliche Übertragung von Viren und Prionen (Smeets et al. 2017). Auch wenn es hier strenge staatliche Vorgaben für die Aufnahme als Spender und der weiteren Aufbereitung gibt, ist eine Infektion (z.B. Hepatitis B/C, HIV) durch die Transplantation nie sicher auszuschließen (Smeets et al. 2017)

Xenogene Knochenersatzmaterialien

Diese Materialgruppe basiert auf der Gewinnung von Kalziumphosphat aus der knöchernen Extrazellulärmatrix, die von nicht-humanen Spezies stammen. Xenotransplantatmaterialien werden von allem aus Rinder- oder Schweineknöcheln gewonnen (Bow et al. 2019). Sie durchlaufen ähnliche Aufarbeitungsprozesse wie die allogenen Knochenersatzmaterialien

(Gefriertrocknungs- und Demineralisierungsverfahren) (Bow et al. 2019). Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe lauten: MinerOss XP[®] (porcines Material; BioHorizons), BioOss[®] (bovines Material; Geistlich Biomaterials), InterOss[®](bovines Material; sigma graft), cerabone[®] (bovines Material; botiss biomaterials GmbH). Vor allem BioOss[®], MinerOss XP[®] und InterOss[®] weisen vor allem bei nicht stark gewichtsbelasteten Knochendefekten hohe Knochenneubildungsraten auf (Bow et al. 2019).

Vorteile dieser Gruppe sind der osteokonduktive Effekt und die Langzeitstabilität bei Anwendung im Schädelbereich (Gavazzoni et al. 2018). Weiterhin sind die Herstellungskosten geringer als beim allogenen Knochen, was auch an der guten Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials liegt. Nachteilig ist, dass bei Materialien tierischen Ursprungs ein Ausbreitungsrisiko für zoonotische Erkrankung besteht (Zhang et al. 2019). Verglichen mit den weiter unten aufgeführten alloplastischen Materialien sind die xenogenen Materialien hinsichtlich der Osteokonduktion wie auch der Langzeitstabilität auf einem ähnlichem Niveau. Dies spiegelt sich in den nicht signifikanten Unterschieden bezüglich der Knochenneubildungsrate zwischen den beiden Knochenersatzmaterialien wieder (A. Rokn 2012). Jedoch weisen sie nur eine geringe Osteoinduktion auf, da in der Matrix keine intakten Proteine als Leitstruktur vorhanden sind (Bow et al. 2019).

Alloplastische Knochenersatzmaterialien

Diese Materialgruppe umfasst ein breites Spektrum (z.B. Keramiken, Biogläser, Polymere, Tricalciumphosphat (TCP), Titan). Vorteile dieser Gruppe sind eine sehr gute Langzeitstabilität sowie eine geringe Komplikationsrate (Piitulainen et al. 2015, Montazerian und Dutra Zanotto 2016, Leao et al. 2018, van de Vijfeijken et al. 2018).

Die älteste und bisher am häufigsten verwendete Materialgruppe im Schädelbereich sind die Metalle und hier im Besonderen das Titan (Wiggins et al. 2013). Es bietet Vorteile bezüglich der Langzeitstabilität und weist niedrige Infektionsraten auf (Cabraja et al. 2009, Wiggins et al. 2013, Wind et al. 2013). Deshalb wird es vor allem in Bereichen mit chronischen Infektionen oder nach einer sekundären Defektfüllung verwendet (Wind et al. 2013). Nachteile des Titans sind die hohen Kosten (Cabraja et al. 2009, Wiggins et al. 2013) sowie die Leitfähigkeit des Titans von Hitze bzw. Kälte und der damit verbundenen Auswirkung auf das intrakranielle Gewebe (Zanotti et al. 2016). Weiterhin sind intraoperative

Anpassungen nur eingeschränkt möglich, so dass präoperativ meist ein CAD-Implantat erstellt wird (Zanotti et al. 2016).

Die Gruppe der bioaktiven Gläser bzw. Keramiken zeichnet sich durch ihre osteokonduktiven als auch -induktiven Eigenschaften aus (Rahaman et al. 2011, Miguez-Pacheco et al. 2015, Bains et al. 2016). Sie werden neben dem Titan schon sehr lange als Knochenersatzmaterial verwendet und weisen eine sehr gute Langzeitstabilität auf (Miguez-Pacheco et al. 2015, Bains et al. 2016).

Vor allem sind die Biokeramiken durch eine gute Anpassbarkeit gekennzeichnet (Schneider et al. 2010, Bains et al. 2016). Als Nachteile für einige Keramiken gilt die Bruchanfälligkeit aufgrund der starren Mikrostrukturen, weshalb die Materialien vor allem im Schädelbereich eingesetzt werden, da hier mit geringeren Dauerstoßbelastungen sowie maximalen Druckbelastungen zu rechnen ist (Montazerian und Dutra Zanotto 2016). Eine etablierte Biokeramiken für den Schädelbereich ist das in Jena entwickelte Bioverit® (Montazerian und Dutra Zanotto 2016, Beleites et al. 2001). Im Gegensatz zu anderen Keramiken kann dieses Material durch die spezielle Binnenstruktur aus gebogenen Kristallen intraoperativ angepasst werden und hat keine erhöhte Bruchanfälligkeit.

Polymethylmethacrylat (PMMA) ist ein biokompatibler, thermoplastischer und transparenter Kunststoff, der auch als Knochenzement bekannt und bei Anwendungen im Schädelbereich lange etabliert ist (Zanotti et al. 2016). Die Vorteile dieses Polymers sind seine kostengünstige und technisch wenig aufwendige Herstellung, sein ausgeprägtes inertes Implantationsverhalten und eine ausreichende Stabilität bei Temperaturschwankungen (Zanotti et al. 2016). Es weist weiterhin eine gute Anpassbarkeit an die entsprechenden Defekte auf. Nachteilig ist, dass bei der Polymerisation in vivo Temperaturen bis zu 70°C erreicht werden können, die eine Schädigung des umliegenden Gewebes hervorrufen. Weiterhin gibt es ein vergleichbares Infektionsrisiko wie bei allogenen Knochen (Goiato et al. 2009, Wind et al. 2013, Kim et al. 2012, Turgut et al.). Polyetheretherketon (PEEK) ist ein inertes Material (Punchak et al. 2017) und zeichnet sich durch eine geringe Komplikationsrate, einer Strahlendurchlässigkeit (bei CT und MRT) sowie einer Festigkeit bzw. Stabilität, die dem kortikalen Knochen entspricht aus (Zanotti et al. 2016). Weiterhin ist es nicht thermokonduktiv oder thermodynamischen Veränderungen unterworfen (Kim et al.

2012, Lethaus et al. 2012). Da PEEK ein inertes Material ist, kann eine vollständige Osseointegration nicht stattfinden (Khoury et al. 2019, Wiącek et al. 2016).

3. Zielstellung

Die Weiterentwicklung von Knochenersatzmaterialien, vor allem der alloplastischen Materialien, für den Einsatz im Schädelbereich ist nach wie vor erforderlich, da bisher kein Material zufriedenstellend alle erforderlichen Kriterien erfüllt (Zanotti et al. 2016). Insbesondere im Hinblick auf die Langzeitstabilität sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Deshalb wurde ein neu entwickeltes Composit-Material (Diebowski 2014) und dessen Polymer-Komponente einem tierexperimentellen Langzeitversuch (9 und 18 Monaten) im Vergleich mit zwei etablierten Implantat-Materialien (Bioverit[®], Titan) unterzogen.

Die Beurteilung der Biokompatibilität des Composit-Materials und seiner Polymer-Komponente erfolgte hierbei mittels der quantitativen Bewertung der Osseointegration in der 2D- und 3D-Bildgebung. Als bildgebende Verfahren wurden die Hartgewebhistologie (2D) und das μ CT (3D) genutzt. Für die Hartgewebhistologie wurde die in der AG Biomateriallabor entwickelte 2D-Histomorphometrie-Software HistoGap genutzt. Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt, um eine bessere Benutzerergonomie zu erreichen. Weiterhin wurde ein Auswertealgorithmus zur Beurteilung des Implantat-umgebenden Knochens anhand der 3D-Daten aus der μ CT als Lösungsansatz definiert und angewendet.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Hat sich das neu entwickelte Composit-Material gegenüber den etablierten Materialien im Langzeitversuch des Jenaer Schädelmodells bewährt?
2. Welche Funktionen in der Software HistoGap sind für die quantitative Bewertung der Osseointegration ausreichend und welche müssen weiterentwickelt werden?
3. Wie und womit erfolgt die Etablierung eines standardisierten 3D-Auswertungsverfahrens zur quantitativen Auswertung von μ CT-Bilddaten?
4. Sind signifikante Unterschiede zwischen der 2D- und 3D-Bildgebung nachweisbar?

4. Material und Methoden

Der Versuchsablauf der Arbeit unterteilt sich in verschiedene Abschnitte. Dieser beginnt mit der Herstellung der Probekörper. Im Anschluss erfolgt die tierexperimentelle Studie, die nach dem Jenaer Schädelmodell durchgeführt wurde. Nach der Implantation der hergestellten Probekörper und einer Verweildauer von 9 bzw. 18 Monaten wurden die Tiere euthanasiert und die Implantat-Probekörper zusammen mit dem umliegenden Knochengewebe explantiert (Abb. 2; Abschnitt 1, blau). Diese Explantate wurden fixiert, entwässert und in Kunstharz eingebettet. Im ersten Schritt der Bildgebung wurden die eingebetteten Implantate einem μ CT-Scan unterzogen. Anschließend wurden die Proben mittels Trenn-Dünnschlifftechnik (Hartgewebephistologie) aufgearbeitet, histologisch gefärbt und mittels Mikroskop und Digitalkamera fotografisch dokumentiert. Diese 2D-Hartgewebephistologie-Bilder wurden mit der im Biomateriallabor entwickelten Software HistoGap morphometrisch ausgewertet (Abb. 2; Abschnitt 2, grün).

Die 3D- μ CT-Bilddatensätze wurden in der 3D-Bildbearbeitungssoftware Avizo[®] (Version 9.4, FEI SAS, Thermo Fisher Scientific, USA) ausgerichtet und segmentiert. Für die nachfolgende quantitative Auswertung der Osseointegration wurde ein Softwaretool (Jahresring-Algorithmus) verwendet, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde (Abb. 2; Abschnitt 3, rot).

Die gewonnenen morphometrischen Daten aus den Abschnitten 2 und 3 wurden anschließend im Hinblick auf ihre quantitativen Parameter ausgewertet.

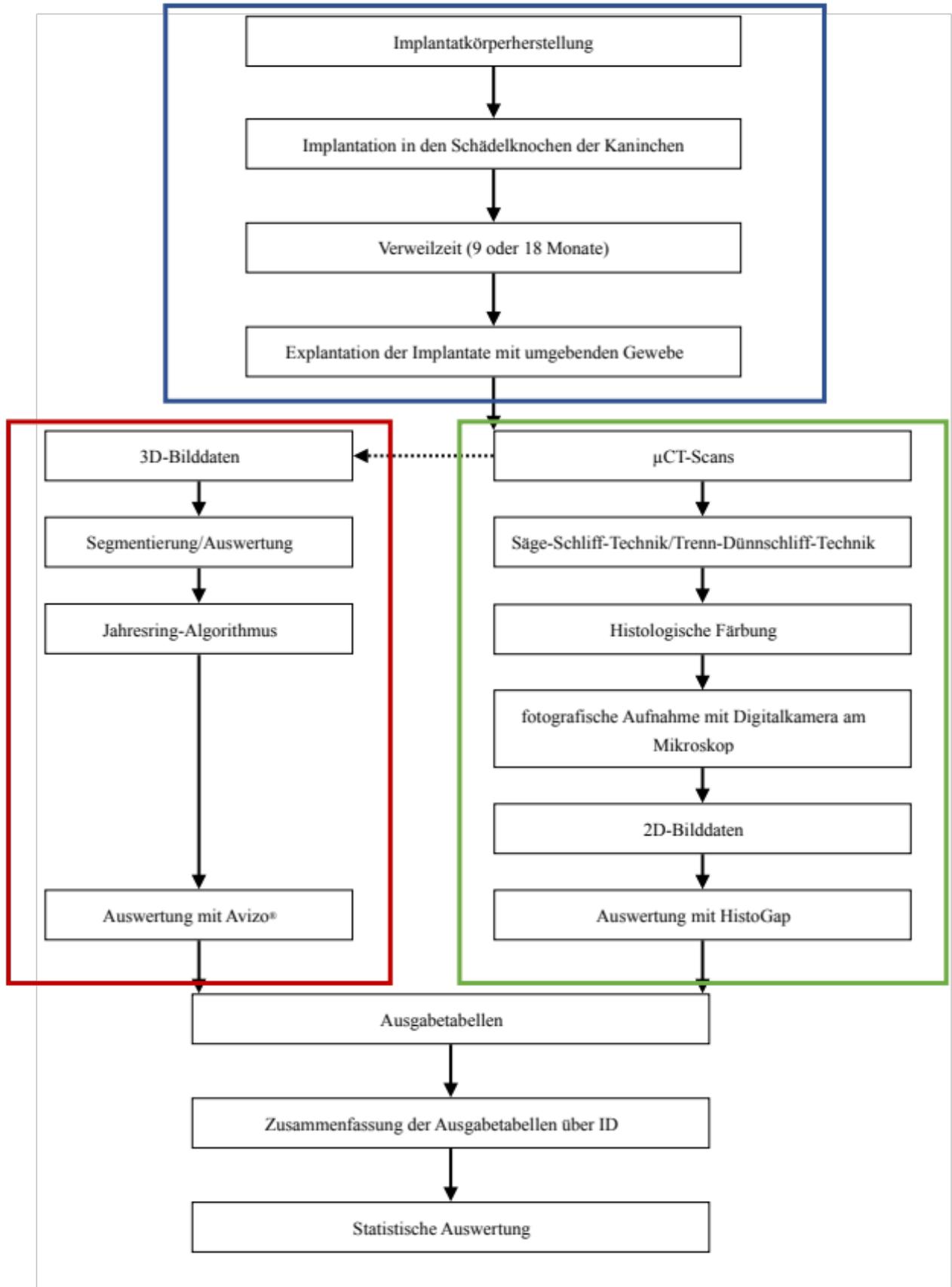


Abb. 2: Prozesskette zur Auswertung der 2D- und 3D-Bilddaten
 Abschnitt blau: siehe 4.1-4.3; Abschnitt grün: 4.4-4.6; Abschnitt rot: 4.7

4.1 Implantatmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Implantat-Probekörper wurden im Rahmen eines Forschungsprojektes (Titel: „Biologische Beurteilung und klinische Bewertung von patientenspezifischen Implantaten aus einem Tricalciumphosphat-Polymer-Kompositmaterial“, Förderkennzeichen KF2764601UL0, gefördert durch BMWi) hergestellt und getestet. Dieses Kooperationsprojekt wurde in den Jahren 2011-2013 von der Arbeitsgruppe Biomateriallabor der HNO-Forschungslabore des Universitätsklinikums Jena in Zusammenarbeit mit der 3di GmbH Jena und der INNOVENT e.V. Technologieentwicklung Jena durchgeführt.

Die Implantat-Probekörper hatten bei unterschiedlichen Herstellungsverfahren identische Vorgaben in Bezug auf Geometrie und Abmessung. Sie hatten die Form eines Zylinders, der konzentrisch mit einem ebenfalls zylindrischen Deckel verbunden war. Im 2D-Schnitt durch die Rotationsachse erschienen die Implantate als T-förmiges Objekt (Abb. 3). Alle Implantate wurden vor dem Einsatz im Tierversuch im Universitätsklinikum Jena autoklaviert (121°C, 20 min) und damit sterilisiert.

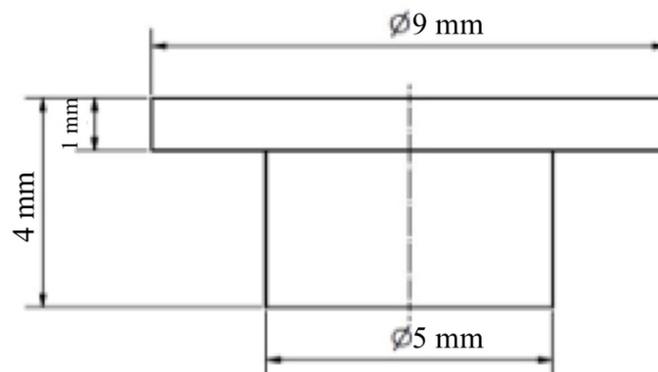


Abb. 3: schematische Darstellung eines Implantatkörpers im Längsschnitt mit den zugehörigen Abmessungen in mm

4.1.1 Bioverit[®]

Das am Institut für Glaschemie der FSU Jena entwickelte Bioverit[®] ist eine Glaskeramik des Systems $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-F}$. Als Materialbesonderheit sind hierbei die gekrümmten Phlogopitplättchen in der Keramik zu sehen, die durch eine spezielle Kristallisation im Bereich von 750-1000°C entstehen. Dadurch wird eine deutlich bessere Bearbeitbarkeit des Materials erreicht (Schneider 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die subtraktive Herstellung mittels CNC-Fräse aus einem Bioverit®-Block (VITRON Spezialwerkstoffe GmbH, Jena). Die Bioverit®-Implantate wurden in der vorliegenden Studie als Kontrollmaterial verwendet, da sie für das Implantatlager Schädel als etabliert galten und eine ausreichende Biokompatibilität wie auch Langzeitstabilität aufwiesen.

4.1.2 Titan

Die Implantate aus Ti-Al6-V4 (Titan-Legierung mit 6% Aluminium und 4% Vanadium) wurden ebenfalls mittels CNC-Fräse aus dem Block subtraktiv gefertigt. Die Implantate aus Ti-Al6-V4 (im weiteren Verlauf als Titan-Probekörper bezeichnet) wurden in der vorliegenden Studie als Kontrollmaterial verwendet, da hier die Studienlage sehr groß bezüglich der Langzeitanwendung im Schädelbereich war und ähnlich wie beim Bioverit® eine sehr gute Biokompatibilität besteht.

4.1.3 Polymer

Die flüssige Mischung aus Methacrylat-Monomeren und Urethandimethacrylat mit Dibenzoylperoxid als Initiator (Zusammensetzung: betriebsinterne Daten der 3di GmbH, Jena) wurde in eine Form aus Silikongummi gegossen und anschließend bei hoher Temperatur (Zielbereich: 100-120°C) auspolymerisiert. Das Polymer entsprach der Polymerkomponente des neu entwickelten Composit-Materials und sollte als eigenständiges Material untersucht werden.

4.1.4 Composit

Das neu entwickelte Composit-Implantatmaterial besteht aus zwei Komponenten: einem Tricalcium-Phosphat (β -TCP) und einem Methacrylat-Copolymer (Zusammensetzung: betriebsinterne Daten der 3di GmbH, Jena). Auf der Grundlage eines CAD-Datensatzes des Implantates wurde der TCP-Grundkörper mittels 3D-Pulverdruck (Binder-Jetting-Verfahren) aus TCP-Pulver hergestellt und danach im Hochtemperaturofen gesintert. Anschließend wurde der Grundkörper mit einer flüssigen Mischung aus Methacrylat-Monomeren und Dibenzoylperoxid infiltriert, die danach bei erhöhter Temperatur auspolymerisiert wurde.

4.2 Tierexperimentelle Studie

Die tierexperimentelle Studie wurde im Rahmen des oben genannten Projektes durchgeführt. Die Genehmigung für diesen Tierversuch wurde vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (Genehmigungsnummer 02-018/11, Bad Langensalza, Deutschland) erteilt.

Als Versuchstiere wurden 28 New Zealand White-Kaninchen (NZWR, Harlan Winkelmann GmbH, Borchon) verwendet. Das Alter der Kaninchen betrug zum Versuchsbeginn durchschnittlich 4 - 6 Monate bei einem Gewicht von 2,5 – 3,5 kg. Als Versorgung standen den Versuchstieren Raufutter, Pellets und Wasser *ad libitum* zur Verfügung (Ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest). Es erfolgte die Einzelhaltung der Kaninchen bei einem 12h Tag-Nacht-Rhythmus.

4.3 Probenpräparation

4.3.1 Implantation der Probekörper

Das in Narkose liegende Versuchstier wurde bauchwärts fixiert. Durch einen medianen Hautschnitt im frontalen Kopfbereich des Kaninchens wurde bis auf das Periost des Schädels präpariert. Das Periost wurde nach einem medianen Schnitt vom Knochen abgelöst und ebenfalls seitlich weggeklappt. Es wurden mithilfe eines Trepanbohrers (Durchmesser: 5,0 mm bzw. 4,9 mm bei Composit) insgesamt vier runde knöcherne Defekte in die frontale Kalotte des Tieres eingebracht. Im Anschluss erfolgten die Entfernung der *Dura mater* im Bereich dieser Trepanationsdefekte und das passgenaue Einsetzen der Implantate. Zur Fixierung wurde das Periost über dem Probekörper vernäht und der operative Eingriff durch die Hautnaht (in beiden Fällen resorbierbares Nahtmaterial, Marlin 4/0, Catgut GmbH) beendet. Die Implantate hatten Kontakt mit dem Knochen und umliegendem Bindegewebe sowie mit Gehirn und *Liquor cerebrospinalis*, um Aussagen zur Biokompatibilität im direkten Kontakt mit Gewebe innerhalb und außerhalb des knöchernen Implantatlagern zu erhalten (Abb. 4).

Postoperativ wurden die Wunden mit Pflasterspray versorgt und ein Antibiotikum appliziert.

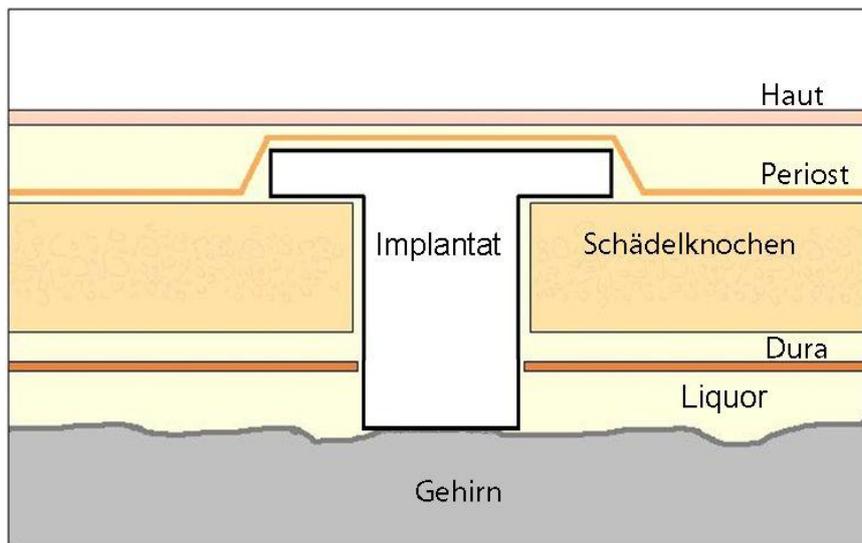


Abb. 4: schematische Darstellung des implantierten Probekörpers nach dem Jenaer Schädelmodell

4.3.2 Explantation

Nach Erreichen des individuellen Explantationszeitpunktes (9 bzw. 18 Monate) wurden die Versuchstiere mit Pentobarbital-Natrium euthanasiert. Anschließend wurde der Schädelknochen durch einen medianen Hautschnitt freigelegt und mittels eines Osteotoms die Implantate unter Mitnahme des umgebenden Knochens entnommen. Des Weiteren erfolgte die Entnahme von Proben des unter dem Defekt befindlichen Hirnparenchyms sowie der im Halsbereich liegenden Lymphknoten. Die gewonnenen Materialien wurden in einer 5%-Formalin-Lösung fixiert und für das weitere Analyseverfahren bei einer Temperatur von max. 4°C zwischengelagert.

4.3.3 Probenpräparation

Nach einer 14-tägigen Formalin-Fixierung wurden die entnommenen Implantate mit dem umgebenden Schädelknochen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zur Vorbereitung für die sich anschließenden bildgebenden Verfahren (Hartgewebephistologie, μ CT) wurden die Proben in Iod-dotiertes Methacrylat-Kunstharz (Technovit® 7200 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts.) eingebettet.

Die Iod-Dotierung führt zu einer graduellen Erhöhung der Röntgen-Attenuation des Einbettmediums, um die Visualisierung der Polymer-Implantate in der μ CT-Bildgebung zu verbessern. Die Iod-Dotierung erfolgte durch Zusatz von 2,16 Masse% eines Iod-Monomers, das von der INNOVENT e.V. Technologieentwicklung Jena entwickelt und dem Einbettmedium (Technovit[®]) zugefügt wurde.

4.4 μ CT

Die μ CT-Aufnahmen wurden an einem Nanofocus- μ CT-Scanner des Fraunhofer EZRT in Fürth durchgeführt. Pro Scan-Vorgang wurden zwei Implantate mit dem umgebenden Knochengewebe ausgewählt, so dass insgesamt 112 μ CT-Datensätze bei 56 Scans erstellt wurden. Die Auflösung betrug 7,5 μ m/Voxel. Materialabhängig wurden unterschiedliche Scan-Bedingungen verwendet (Tab. 1).

Tab. 1: Tabelle mit den Scanbedingungen des μ CT

	Bioverit[®]/ Polymer/Composit	Titan
Vorfilter	1mm Aluminium	1 mm Messing
Spannung	100 kV	120 kV
Stromstärke	30 bzw. 70 μ A	30 bzw. 34 μ A
Aufnahmedauer je Projektion	0,6 bzw. 1,0 s	0,6 s
Anzahl der Projektionen auf 360°	1200 bzw. 1600	1200

4.5 Histologie

Nach der Anfertigung der μ CT-Aufnahmen erfolgte die Durchführung der Hartgewebepathologie mittels Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath (Donath und Breuner 1982). Aus dem Polymerblock aus Implantat und Knochen wurden mithilfe des EXAKT-Trennschleifsystems (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) Dünnschliffe mit einer Dicke von ca. 400 μ m angefertigt, die anschließend mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) und diamantbeschichtetem Schleifpapier (mit Körnung von 320 bis 1200, Hermes WS flex 18b,

Hermes Schleifmittel GmbH & Co. KG, Hamburg) auf eine Dicke von ca. 20 µm gebracht wurden. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Schleifvorgang mit Polierpapier (Körnung 4000, Hermes Schleifmittel GmbH & Co. KG, Hamburg), um eine Schnittdicke von 5 bis 15 µm zu erreichen. Die so hergestellten dünnen Schliffpräparate wurden anschließend mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) oder modifizierter Masson-Goldner (MG) Färbung histologisch gefärbt. Die genauen Verfahrensschritte sind als Protokoll im Anhang zu finden (Anhang 1. Histologie).

Die fotografische Dokumentation der gefärbten histologischen Schnitte erfolgte mithilfe einer Kombination aus einem Leitz Diaplan[©] Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) und einer aufmontierten Spiegelreflex-Digitalkamera (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) in 30-facher Vergrößerung. Von jedem Präparat wurden jeweils die linke und die rechte Seite des Implantatkörpers aufgenommen.

Während dieses Arbeitsprozesses kam es zum Ausfall der ersten Kamera Canon EOS 500D, die durch eine Canon EOS 750D ersetzt werden musste. Zu diesem Zeitpunkt war die Hälfte der Hartgewebephistologien dokumentiert. Diese beiden Kameratypen enthalten Lichtsensoren mit unterschiedlicher Pixelzahl, deshalb hatten die mit diesen Kameras erstellten Fotos eine unterschiedliche Auflösung. Zur Korrektur wurde eine Anpassung des Skalierungsfaktors für die spätere histomorphometrische Auswertung mittels Objektmikrometer vorgenommen. Anschließend wurde anhand dessen berechnet, wie viel Pixel pro µm bei den entsprechenden Vergrößerungen vorlagen. Dies entsprach dem Skalierungsfaktor

Bei Erstellung der Bilddaten wurde parallel eine qualitative Betrachtung der Osseointegration durchgeführt. Die ROI zur qualitativen Beurteilung erstreckte sich von der *Lamina externa* bis zur *Lamina interna* des Knochens. Hierbei wurden die 30-fachen Vergrößerungen in der Lichtmikroskopie genutzt. Es wurden die Parameter Knochenneubildung, Bindegewebe und das Vorhandensein von Fremdkörper-Riesenzellen (FKRZ) anhand eines Score-Systems qualitativ bewertet (siehe Tab. 2, 3, 4.). Die Beurteilungsgerade mit dem jeweiligen lichtmikroskopischen Korrelat sind exemplarisch in Abbildungen im Anhang dargestellt (siehe Anhang 9.1.4).

Zuerst erfolgte die Einschätzung der Ausprägung des Bindegewebes in direkter Implantatnähe. Hieran schloss sich die Beurteilung des neugebildeten Knochens sowie von das Vorhandensein von Fremdkörperriesenzellen über den direkten Knochen-Implantat-

Bereich hinaus an. Letztere wurden nur in den HE-Färbungen beurteilt, bedingt durch die färbungsspezifische Darstellbarkeit der Zellkerne.

Anschließend wurden die Score-Werte pro Verweildauer und Material durch Bildung des Medians aufgrund der vorliegenden Ordinalskala zusammengefasst.

Tab. 2: Score-Werte zur Beurteilung des Bindegewebes (BGW-Schicht) in der Hartgewebephistologien

qualitative Beurteilung	Score-Werte
unauffällig, dünn (0- 30 μm)	0
moderate BGW-Schicht (31- 60 μm)	1
dickere BGW-Schicht (61- 100 μm)	2
sehr dicke BGW-Schicht (> 100 μm)	3

Tab. 3: Score-Werte zur Beurteilung der Knochenneubildung in den Hartgewebephistologien

qualitative Beurteilung	Score-Werte
Keine	1
Sehr wenig (0- 10 %)	2
Wenig (10- 25 %)	3
Teilweise (25- 50 %)	4
Viel (50- 75 %)	5
Sehr viel (75-100 %)	6

Tab. 4: quantitative Bewertung der Entzündungsreaktion anhand der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen

Entzündungsreaktion, Anzahl FKRZ	Score
0 FKRZ (keine Entzündungsreaktion)	1
1-10 FKRZ (geringe Entzündungsreaktion)	2
<10 FRKZ (starke Entzündungsreaktion)	3

4.6 Histomorphometrische Auswertung

Am Jenaer Schädelmodell orientiert, wurde im Biomateriallabor ein Algorithmus an der Morphometrie-Software HistoGap zur morphometrischen Bewertung der Implantatmaterialien anhand von 2D-Bilddaten angewendet (siehe im Anhang 2. Histomorphometrische Auswertung).

Mit HistoGap wurden in den Bildern der histologischen Schnitte jeweils innerhalb des Trepanationsdefekts die Kanten von Implantat und Knochen markiert und dadurch der Abstand zwischen Knochen und Implantat gemessen. Jeder Messvorgang in der Software HistoGap wurde in einer festgelegten Reihenfolge (Datenimport der Bilddatei, Angabe der experimentellen Randbedingungen, histomorphometrische Messung, automatisierter Datenexport als Tabelle) durchgeführt.

4.6.1 Histomorphometrie-Software HistoGap

Zu Beginn des Messvorganges mit HistoGap wurden die für die Auswertung relevanten experimentellen Randbedingungen (Benutzernummer, Anzahl der Messpunkte, Tiernummer, Polymerkomponente, Implantatmaterial, Schnittnummer, Verweildauer, Färbung) jedes Schnittes erfasst. Anschließend wurde der relevante Messbereich (Region of Interest; ROI) eingegrenzt (Abb. 5) und die Messung des Abstands zwischen Implantatoberfläche und dem Knochen begonnen.

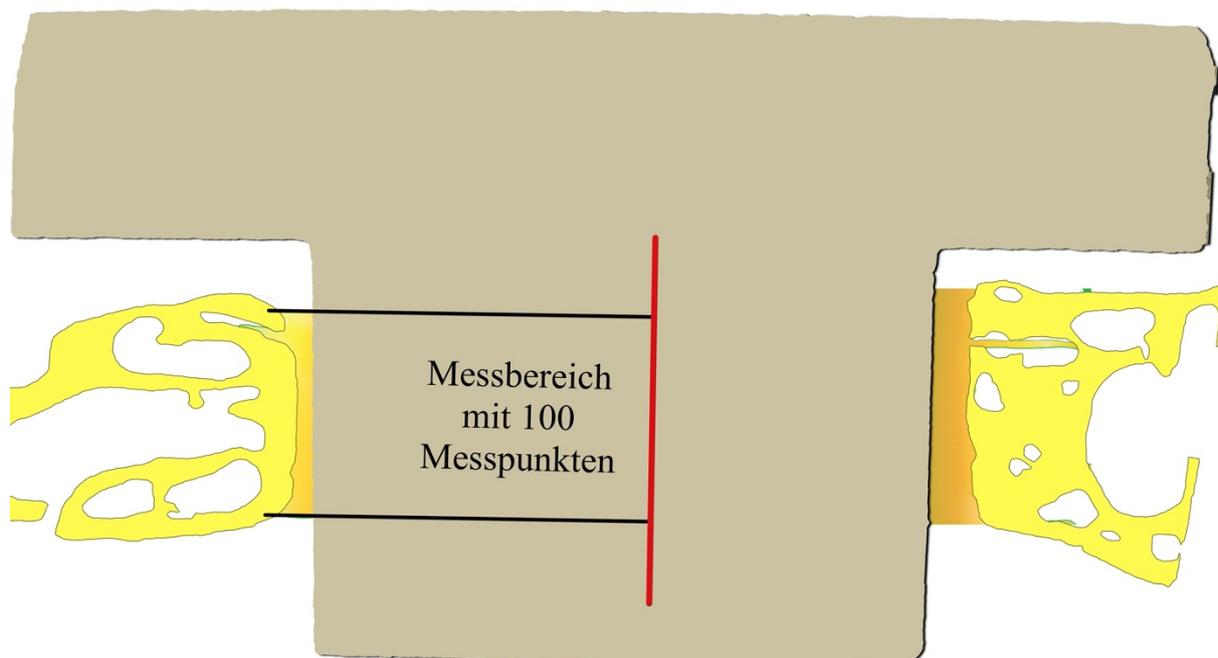


Abb. 5: schematische Darstellung zur histomorphometrischen Auswertung mit Begrenzung des Messbereiches (Region of Interest, ROI, schwarze Linien) und Darstellung des Abstands zwischen Knochen und Implantat in orange

Zur Begrenzung der Messstrecke wurden die individuellen, anatomischen Gegebenheiten jedes Schnittes berücksichtigt (Abb. 5). Als Startpunkt wurde die *Lamina* bzw. *Tabula externa* des gesetzten Operationsdefektes definiert. Endpunkt der Messstrecke war jeweils die *Tabula interna* (Innenseite des Schädelknochens), oder - falls das Implantat nicht den ganzen Trepanationsdefekt bis zur *Tabula interna* ausfüllte - die Unterkante des Implantats.

In diesem so definierten Abschnitt wurden nachfolgend die Begrenzungslinien des Implantats und des gegenüberliegenden Knochens manuell markiert. Die Abstände dieser Linien zueinander wurden von der Software nachfolgend als Abfolge von 100 in gleichmäßigem Abstand verteilten Messpunkten registriert. Anhand dieses Abstandes wurde der Knochen-Implantat-Abstand (Bone implant distance, BID) berechnet. Zu jeder Messung generierte die Software mehrere Dateien, die mit der gleichen eindeutigen Identifikationsnummer gekennzeichnet waren: (1.) eine csv-Tabelle mit den Daten der experimentellen Randbedingungen, (2.) eine csv-Tabelle mit den Messwerten, sowie (3.) eine Datei mit einem Screenshot des Bildes mit den Messlinien. Der detaillierte Ablauf einer Messung ist im Anhang 2.2 als Protokoll zu finden.

4.7 3D-Analyse im μ CT

Neben der Auswertung der 2D-Bilddaten wurde parallel ein Verfahren für das Berechnen von konzentrischen (= jahresringartigen) um das Implantat angeordneten ROIs angewendet (Abb. 6).



Abb. 6: schematische Darstellung der konzentrischen Regions of Interests (ROI, rote Linien) um das Implantat

4.7.1 Entwicklung des Jahresring-Algorithmus

Es erfolgte die Aufstellung eines allgemeinen Ablaufplanes für die Entwicklung des Jahresring-Algorithmus.

1. Anforderungsanalyse, Definition der Systemspezifikationen
2. Literaturrecherche und Testung der Funktionsweise ähnlicher Softwarelösungen
3. Evaluation und Testung der in vorhandenen Funktionen (Module) im Hinblick auf eine Verwendbarkeit für den Algorithmus
4. Entwicklung, Implementierung und kontinuierliche Überprüfung des Algorithmus anhand von Soll-Ist-Vergleichen innerhalb von Arbeitspaketen (*Input, Messwert-Generierung, Output*)
5. Weitere Evaluation des Jahresring-Algorithmus durch externe Tester mit anschließender Anpassung bzw. Korrekturen

Nach Definition der Soll-Anforderungen in den jeweiligen Arbeitspaketen wurde mit einer systematischen Literaturrecherche in PubMed mithilfe von Keywords und anhand von Querverweisen in den Publikationen bzw. auf PubMed mittels der Funktion „*Similar articles*“ begonnen.

Bei der Literaturrecherche konnten anhand der Suche mittels Keywords 96 relevante Publikationen gefunden werden (siehe Anhang 3.1.1). Nach Bewertung der Publikationen anhand vier festgelegter Hauptkriterien (siehe unten) wurden im Ergebnis 12 Veröffentlichungen in die weitere Analyse eingeschlossen:

(Alexander et al. 2018, Zeng et al. 2017, Neldam et al. 2017, Bissinger et al. 2017, Gramanzini et al. 2016, Parsa et al. 2015, Gabler et al. 2015, Vandeweghe et al. 2013, Stadlinger et al. 2013, Song et al. 2013, Bernhardt et al. 2012, Martini et al. 2012)

Das erste Hauptkriterium war, ob die Publikationen Ähnlichkeiten bezüglich des Tiermodells (Implantatlager, Art des Versuchstiers) sowie der verwendeten Materialien (Titan, Polymer,

Biokeramiken, Composit, Implantatform) aufwiesen und ob sie Informationen zur Segmentierung der Datensätze enthielten.

Das zweite Hauptkriterium beinhaltete den Versuchsaufbau sowie die verschiedenen bildgebenden Verfahren. Hierbei war essentiell, dass die μ CT die bildgebende Auswertungsmethode war. Weiterhin musste eine Kontrolle anhand der Histologie erfolgen (idealerweise Hartgewebepathologie).

Das dritte Hauptkriterium betrachtete die verwendeten Softwarelösungen. Hiernach wurde die Publikation beurteilt ob vorliegende Softwarelösungen oder Eigenentwicklungen genutzt wurden. Weiterhin erfolgte eine Betrachtung hinsichtlich der Benutzeroberfläche (GUI, graphical user interface) und der Anforderungen des Computers. Der letzte Punkt in diesem Kriterium betrachtete die Publikation hinsichtlich der Justierung der ROI (manuell, automatisch).

Das vierte Hauptkriterium beinhaltete die quantitative Auswertung und die genutzten Parameter. Hierbei ging es um den Ablauf der quantitativen Auswertung, ob diese innerhalb der 3D-Software oder mithilfe eines zusätzlichen Programmes (z.B. Excel[®], SPSS[©] Statistics, IBM[©]) erfolgte. Weiterhin wurde analysiert, ob eine Auswertung des BIC erfolgte, wie groß die maximale Distanz von der Implantatoberfläche war und wie die Einteilung/Anzahl der ROIs/VOIs zur Auswertung des periimplantären Knochens erfolgte.

Hieran schloss sich die Evaluation und Umsetzung des Jahresring-Algorithmus in der Software Avizo[®] an (siehe 5.3), in dessen Verlauf ein eigenständiges Modul implementiert wurde (*Annuli Label*). Den Abschluss der Entwicklung des Jahresring-Software-Tools bildete das Erstellen einer Anleitung (siehe Anhang 9.3.3) und Testung des Algorithmus durch mehrere Nutzer. Hierbei wurde nur das Modul *Annuli Label* genutzt, womit die Arbeitspakete Input sowie Output vorerst nicht für die Testung berücksichtigt wurden.

4.7.2 Anwendung und Funktionsweise des Jahresring-Algorithmus

Eine notwendige Voraussetzung zur Anwendung des Jahresring-Algorithmus ist die vorhergehende Segmentierung der 3D-Bilddaten. Dies wurde in dem Segmentierungsektor der 3D-Software Avizo[®] (Version 9.4) nach einem festgelegten Protokoll des Biomateriallabors materialspezifisch durchgeführt (siehe Anhang 3.2.1).

Diese Protokolle wurden durch den Autor dieser Arbeit anhand der Erfahrungen mit Avizo® entwickelt und im Rahmen der mit betreuten Bachelorarbeit von M. Becker validiert (Becker 2017).

Nach Einlesen des segmentierten 3D-Bilddatensatzes in Avizo® (Version 9.4) wurde das kartesische Koordinatensystem des Datensatzes so ausgerichtet, dass die Rotationsachse des Implantats in z-Richtung verläuft. Im Anschluss erfolgte in z-Richtung die Definition einer Zone, in dem sich Knochen und Implantat im Trepanationsdefekt direkt gegenüberlagen (analog zur Festlegung der Messstrecke in der 2D-Morphometriesoftware HistoGap). Danach erfolgte eine weitere Segmentierung, in deren Ergebnis allein der Implantatkörper dargestellt wurde (Abb. 7).

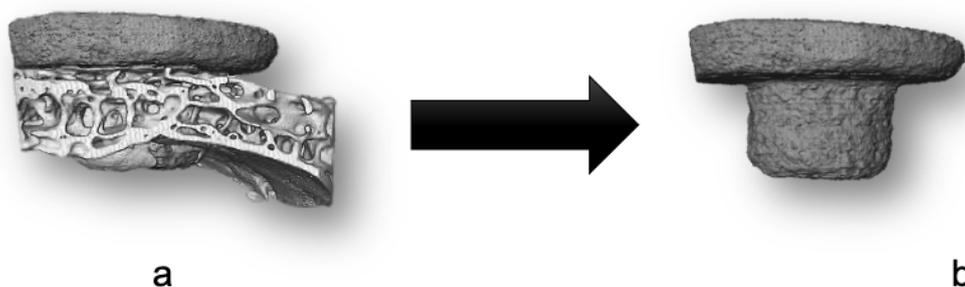


Abb. 7: segmentierter 3D-Datensatz mit dem umgebenden Knochenstrukturen (a) sowie nach erneuter Segmentierung des eingelesenen Datensatz zur alleinigen Darstellung des Implantatkörpers (b)

Dieser Schritt markierte die innerhalb des Messbereichs gelegene Oberfläche des Implantats als Anfangspunkt für die Erstellung der konzentrisch angeordneten Jahresringe. Der Ablauf einer Berechnung der Jahresringe besteht aus einem iterativen Zyklus mit zwei Komponenten (Dilatation und Subtraktion). Im ersten Schritt (Dilatation) erfolgte - ausgehend von der Mantelfläche des zylindrischen Implantats - eine radiale Erweiterung dieses Volumens mit definierter Schrittweite. Im Anschluss folgte eine Subtraktion des ursprünglichen Volumens von dem auf diese Weise erzeugten erweiterten Volumen. Das Ergebnis war eine ringförmige ROI. Die neu erstellte dilatierte ROI diente jeweils als Ausgangspunkt für den nächsten Berechnungszyklus. Über mehrere automatisch ablaufende Iterationszyklen wurde auf diese Weise eine Serie von ROIs in Form konzentrisch angeordneter Ringe generiert. Hieran schloss sich die Zuordnung der Knochenstrukturen des segmentierten Original-Datensatzes zu dem jeweiligen Jahresring-Segment an.

Bei der Generierung der ROIs für einen Implantatkörper wurden jeweils zwei Berechnungen durchgeführt. In der ersten Berechnung wurde für die ersten 3 Jahresring eine Schichtdicke von 1 Voxel gewählt, um in direkter Implantatnähe kleinere Veränderungen deutlicher zu erkennen. Bei der zweiten Berechnung wurden alle ROIs mit einer Schichtdicke von 2 Voxeln erstellt. Die genaue Vorgehensweise mit dem Modul *Annuli Labels* ist dem Anhang zu entnehmen (siehe Anhang 3.3)

Für die quantitative Auswertung wurde der jeweilige Volumenanteil des Knochens (Bone volume/Total volume, BV/TV) in den Jahresringen automatisch ermittelt und in Tabellenform im .csv-Format ausgegeben. Hierbei erfolgte auch das Zusammenfügen der Daten aus den Tabellen mit den Schichtdicken 1 Voxel bzw. 2 Voxel.

Der gesamte Ablauf des Jahresring-Algorithmus ist im folgenden Schema zusammenfassend dargestellt (Abb. 8).

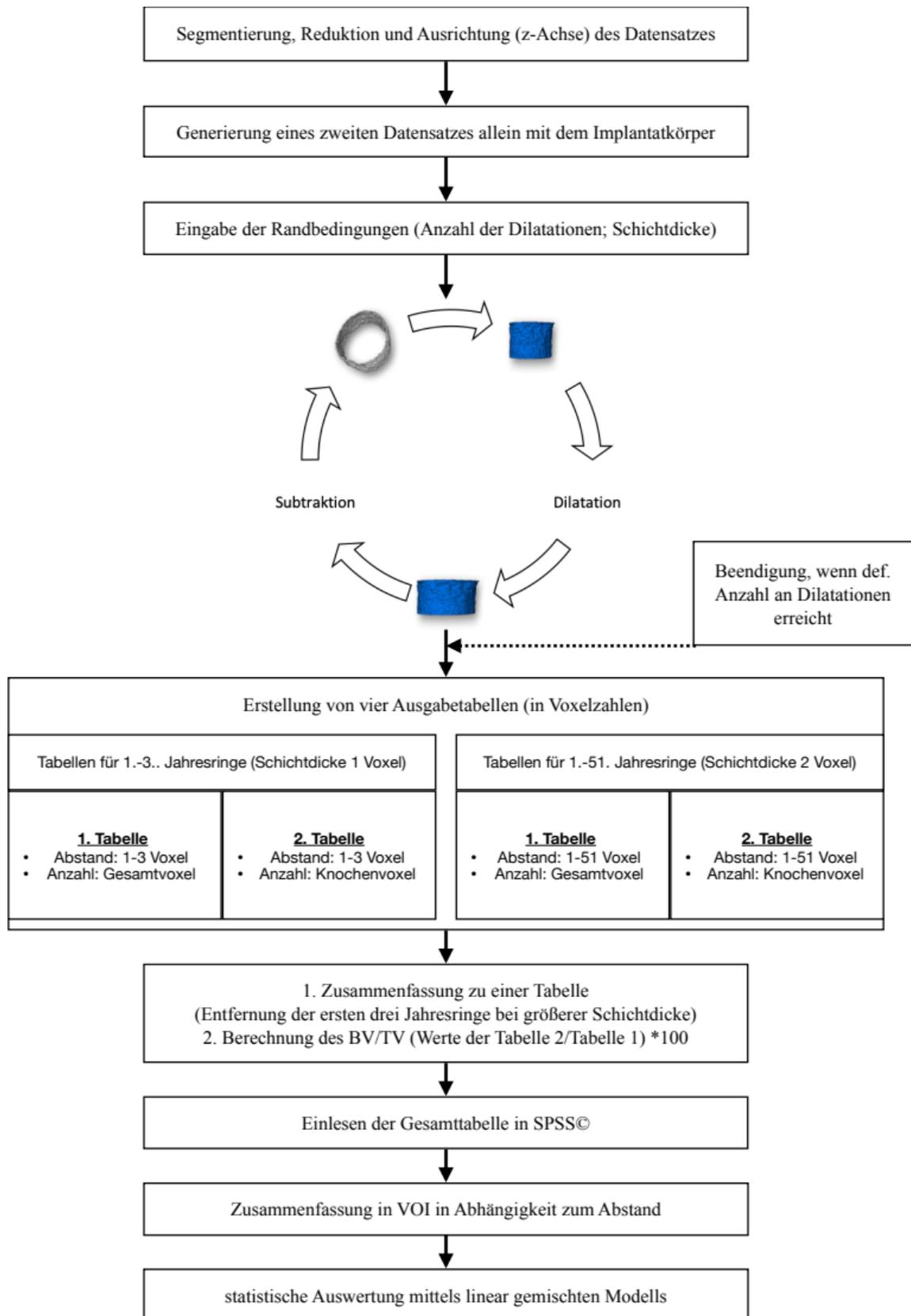


Abb. 8: schematische Darstellung des Gesamtablaufes des Jahresring-Algorithmus von der Segmentierung über die Berechnungszyklen in Avizo® bis zur quantitativen Auswertung

4.8 Statistische Auswertung der Ergebnisse aus Histologie und μ CT

Nach Durchführung der morphometrischen Auswertung der 2D-Hartgewebhistologie-Bilddaten mit der Histomorphometrie-Software HistoGap lagen vom jeweiligen histologischen Schnitt insgesamt vier Tabellen im .csv-Format vor: je zwei Ausgabetafeln pro Messung bei zwei Messungen pro Hartgewebhistologie-Schnitt (d.h. jeweils eine Messung ausgehend von der linken Seite des Implantats und eine Messung ausgehend von der rechten Seite des Implantats). Pro Messung wurde automatisch jeweils eine Tabelle generiert, die die experimentellen Randbedingungen enthielt (z.B. Tiernummer, Verweildauer, Material) und eine Tabelle, die die Messwerte in mm enthielt. Beide Tabellen waren mit einer eindeutigen Identifikationsnummer verknüpft, die vom Programm HistoGap pro Messvorgang automatisch erstellt wurde.

Die bei der Auswertung segmentierter 3D-Bilddaten mit dem Jahresring-Algorithmus generierten Tabellen zu den experimentellen Randbedingungen enthielten ebenfalls Tiernummer, Implantationsdauer, relatives Knochenvolumen mit dem korrespondierenden Jahresring und Material des Implantat-Probekörpers. Die Tabellen mit den Messdaten enthielten die Breite der Jahresring-VOIs und den jeweiligen Volumenanteil des Knochens (BV/TV).

Diese Tabellen beider bildgebender Verfahren wurden in SPSS[®] Statistics Version 25 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) importiert und statistisch ausgewertet.

Aufgrund der durch die begrenzte Anzahl der Versuchstiere limitierten Größe der Stichprobe, der hierarchischen Gruppierung der Daten, der wenigen Beobachtungen pro Versuchstier (die getesteten Materialien wurden pro Versuchstier jeweils einmal appliziert) sowie struktureller Gemeinsamkeiten mit Longitudinalstudien wurde in Absprache mit Herrn Dr. Thomas Lehmann (Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena) die Entscheidung für die statistische Auswertung mit dem linear gemischte Modell getroffen (Mclean et al. 1991, Lindstrom und Bates 1988, Laird und Ware 1982).

5. Ergebnisse

5.1 Weiterentwicklung der 2D-Software HistoGap

Im Rahmen einer Dissertation im Biomateriallabor entstand die Version 2.0 von HistoGap (Diebowski 2014). Als Programmiersprache wurde C++ unter Benutzung der C++-Bibliothek Qt verwendet. Diese Version von HistoGap zeichnete sich durch ein GUI sowie eine standardisierte Eingabe und Ausgabe der Daten aus.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sowie einer damit koordinierten Bachelorarbeit (Strecker 2016) wurde Version 3.0 von HistoGap erstellt.

Als methodische Herangehensweise wurde zuerst die vorliegende Version 2.0 getestet. Anschließend wurde mit C++ und Qt die Version 3.0 von HistoGap über mehrere Zwischenschritte mit Test-Versionen (sog. Alpha-Versionen) neu programmiert.

5.1.1 Erfassung der Randbedingungen

Die Eingabemaske für die Randbedingungen in der Software HistoGap wurde weiterentwickelt. Zu Beginn eines jeden Messvorganges mussten in der vorherigen Version die Randbedingungen (siehe 1. Spalte Abb. 9) erneut eingegeben werden, auch wenn sich keine Änderungen ergeben hatten. Als Lösung dieses Problems wurde eine semiautomatische Erfassung der vor dem aktuellen Messvorgang bereits definierten Randbedingungen implementiert.

Es wurden jetzt die Werte der jeweils vorhergehenden Messungen gespeichert bzw. im entsprechenden Feld angezeigt. Damit bestand erstmals die Möglichkeit diese Werte unverändert bzw. nach Änderung durch den Benutzer zu übernehmen.

Benutzername:	211	Project Num:	201113
Anzahl_Messpunkte:	100	Line 1:	Implantat_Knochen
Tiernummer:	19	Line 2:	Hello Line2
Polymerkomponente:	200	Pixel/mm:	1071
Position im Tier:	300		
Implantatmaterial:	404		
Schnittnummer:	501		
Verweildauer im Tier:	609		
Methode:	701		
Faerbung:	802		

-Don't Change- -Update-

Abb. 9: Eingabemaske der Randbedingungen (1. Spalte von links) in der weiter entwickelten Version 3.0 von HistoGap

5.1.2 Histomorphometrische Messung

Das Einzeichnen des Messbereiches wurde überarbeitet. Es war jetzt möglich, die senkrechte Referenzlinie als Achse zu nutzen. An dieser Achse konnten die beiden orthogonal dazu stehenden Linien zur Begrenzung des Messbereichs frei verschoben werden.

Weiterhin wurde ein Verlaufsprotokoll für das Einzeichnen der Messlinien in die Software implementiert. Es konnten damit Korrekturen der letzten Eingaben bzw. das Löschen des letzten eingezeichneten Messpunktes vorgenommen werden. Diese Funktionen konnten durch definierte Mausklicks bzw. Tastenkombination erreicht werden (siehe Anhang 4.1).

5.1.3 Datenexport als Tabelle

Die Datenexportfunktion von HistoGap wurde hinsichtlich der Identifikationsnummer (ID) überarbeitet. In der Vorgängerversion erfolgte keine eindeutige Vergabe der ID, da diese auf einer fortlaufenden Nummerierung basierte. Deshalb wurde jetzt für die Erstellung der ID neben dem Datum auch die Uhrzeit (bis auf den Sekundenbereich) herangezogen.

Insgesamt gliederte sich die ID der Messungen folgendermaßen: Datum-Uhrzeit-Dateityp-Dateiname-Tiernummer-Material-Färbung-Vergrößerung: z.B. 02.06.2016141517-val-T21-B-3-HE-2,5x. Der Bilddateiname beinhaltet hier schon die Tiernummer, Material, die Nummer des histologischen Schnittes und die entsprechende Färbung (z.B. T21-B-3-HE).

Weiterhin wurde eine automatische Screenshot-Erstellung am Ende der Messung in die Software integriert (Abb. 10). Auf diesem Screenshot war die gesamte GUI mit dem ausgewerteten Bild und den eingezeichneten Linien bzw. Messpunkten erkennbar. Dieser Screenshot diente als visuelles Protokoll der Messung und ermöglichte, die Messung nachträglich detailliert nachzuvollziehen und ggf. dabei aufgetretene Fehler bzw. Messabweichungen zu erkennen und zu korrigieren.



Abb. 10: automatisch erstellter Screenshot von HistoGap 3.0 nach erfolgreichem Abschluss eines Messvorganges der rechten Seite eines Polymer-Implantates (Hämatoxylin-Eosin-Färbung; 30-fache Vergrößerung)

5.2 Ergebnisse der Histomorphometrie der tierexperimentellen Studie

Insgesamt wurden 626 Messungen (für jede Seite (links/rechts) im histologischen Schnitt einzeln betrachtet) von insgesamt 28 Tieren mit jeweils vier eingesetzten Implantatmaterialien ausgewertet. 11 Kaninchen waren der Gruppe mit einer Verweildauer von 9 Monaten, 17 der Gruppe mit einer Verweildauer von 18 Monaten zugeordnet. Es konnten durchschnittlich 3 histologische Schnitte pro Implantat ausgewertet werden.

Zur Feststellung, in welcher Verteilung die Daten vorliegen, wurde die Häufigkeitsverteilung der Messpunkte graphisch dargestellt (Abb. 11,12) sowie ein statistischer Test (Kolmogorov-Smirnov) zur Überprüfung einer Normalverteilung durchgeführt (Anhang 5.1). Hierbei wurde festgestellt, dass die vorliegenden Daten der histomorphometrischen Messungen nicht normalverteilt waren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf der statistischen Auswertung das linear gemischte Modell verwendet, bei dem keine Normalverteilung vorausgesetzt wird. Aus diesem Grund wurde sich auch für die Darstellung des Medians mit den entsprechenden Perzentilen (25./75. Perzentile) anstelle des Mittelwertes mit der Standardabweichung entschieden.

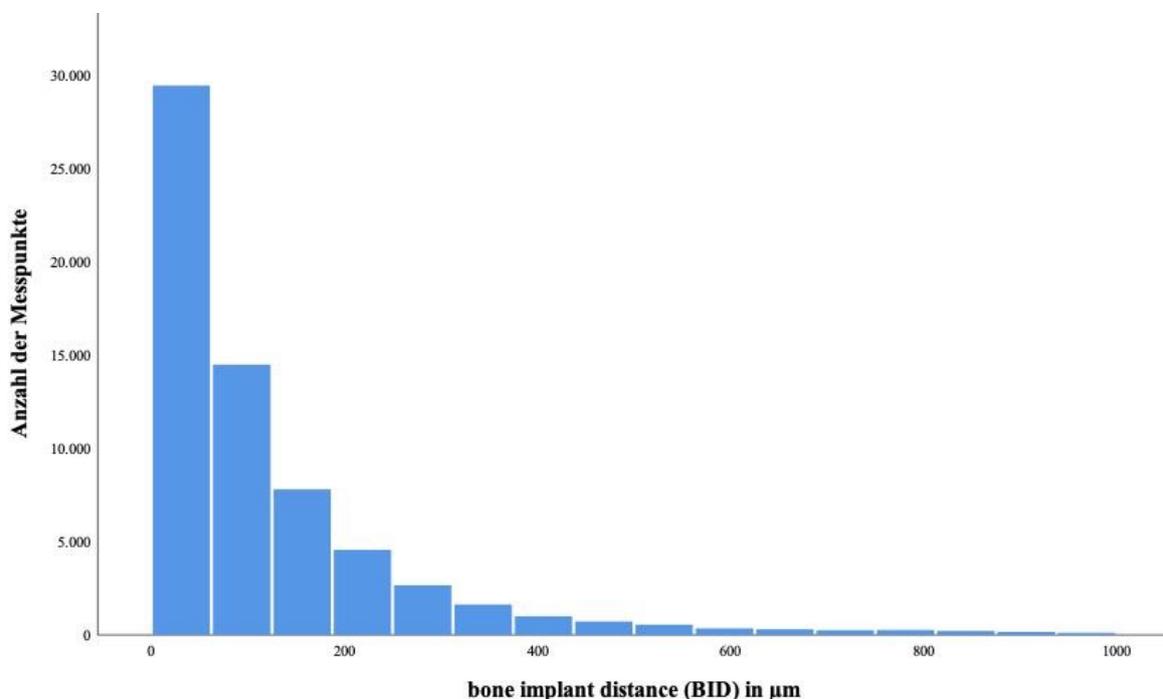


Abb. 11: Häufigkeitsverteilung aller Messpunkte der Histomorphometrie geordnet nach dem Abstand zwischen Knochen und Implantat (bone implant distance, BID)

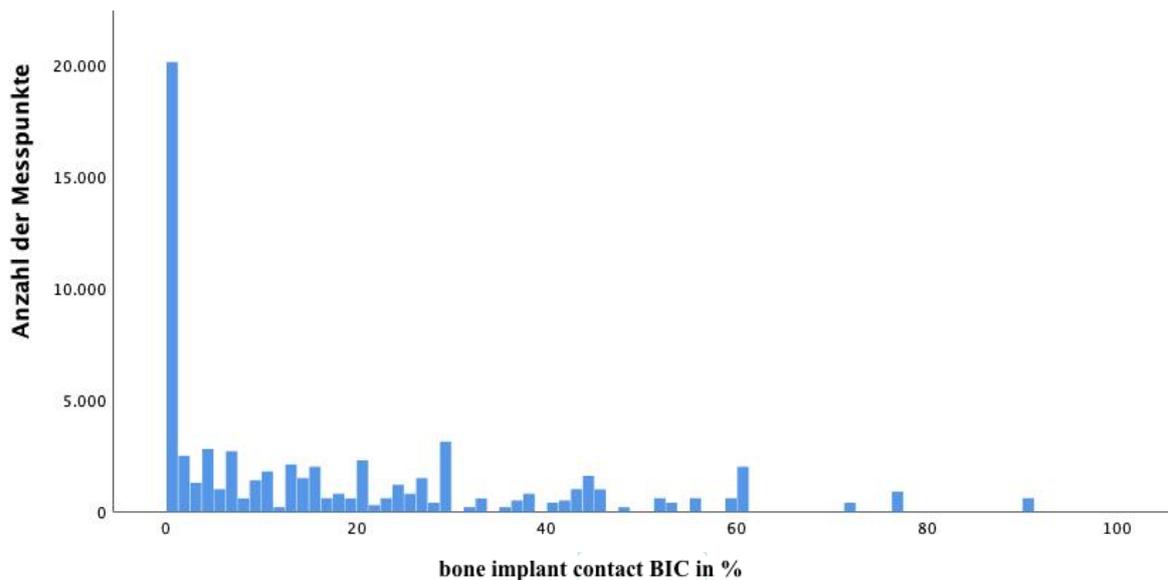


Abb. 12: Häufigkeitsverteilung aller Messpunkte der Histomorphometrie geordnet nach dem prozentualen Anteil des direkten Kontaktes von Knochen und Implantat (bone implant contact, BIC)

5.2.1 BIC und BID der verwendeten Implantatmaterialien

5.2.1.1 Bioverit®

Der BIC betrug nach 9 Monaten bei Bioverit® 3,67 % und nach 18 Monaten 0,79 % (Tab. 5). Der BID für Bioverit® nach 9 Monaten lag bei 85,73 µm und nach 18 Monaten bei 67,41 µm (Tab. 6).

5.2.1.2 Titan

Die Titanimplantate wiesen nach 9 Monaten einen BIC von 3,18 % und nach 18 Monaten von 0,79 % auf (Tab. 5). Der Median beim BID lag nach 9 Monaten bei 141,01 µm und nach 18 Monaten bei 141,66 µm (Tab. 6).

5.2.1.3 Composit

Das Composit wies nach 9 Monaten einen BIC von 10,79 % und nach 18 Monaten einen BIC von 22,7 % auf (Tab. 5). Der BID lag bei 94,8 µm nach 9 Monaten und 53,96 µm nach 18 Monaten (Tab. 6).

5.2.1.4 Polymer

Beim Polymer lag der BIC nach 9 Monaten bei 23,25 % und nach 18 Monaten bei 29,7 % (Tab. 5). Der BID betrug bei einer Verweildauer von 9 Monaten 48,91 µm und nach 18 Monaten 27,54 µm (Tab. 6).

Tab. 5: Bone implant contact (BIC) der Implantatmaterialien sortiert nach 9 und 18 Monaten

		BIC in %		
		Median	25. Perzentile	75. Perzentile
Bioverit®	<i>9 Monate</i>	3,67	0	9,16
	<i>18 Monate</i>	0,79	0	8,65
Titan	<i>9 Monate</i>	3,18	0	10,15
	<i>18 Monate</i>	0	0	3,24
Composit	<i>9 Monate</i>	10,79	1,25	38,37
	<i>18 Monate</i>	22,77	12,44	41,67
Polymer	<i>9 Monate</i>	23,26	15,41	44,68
	<i>18 Monate</i>	29,7	21,25	47,5

Tab. 6: Bone implant distance (BID) der Implantatmaterialien sortiert nach 9 und 18 Monaten

		BID in µm		
		Median	25. Perzentile	75. Perzentile
Bioverit®	<i>9 Monate</i>	85,73	42,1	139,32
	<i>18 Monate</i>	67,41	28,54	139,03
Titan	<i>9 Monate</i>	141,01	69,31	281,5
	<i>18 Monate</i>	141,66	68,46	253,83
Composit	<i>9 Monate</i>	94,8	1,87	200,38
	<i>18 Monate</i>	53,96	0	141,06
Polymer	<i>9 Monate</i>	48,91	0	107,97
	<i>18 Monate</i>	27,54	0	79,19

5.2.1.5 Vergleich von BID und BIC der Implantatmaterialien

Zwischen den verschiedenen Materialien zeigten die gemessenen quantitativen Parameter BIC und BID unterschiedliche Entwicklungen von 9 zu 18 Monaten Verweilzeit (Tab. 5, 6; Abb. 13,14).

Den höchsten prozentualen Anteil an direktem Kontakt zwischen Knochen und Implantat (BIC) wies das Polymer auf sowohl nach 9 als auch nach 18 Monaten (Tab. 5, Abb. 13). Der niedrigste BIC-Wert über beide Verweildauern war beim Titan nachweisbar. Insgesamt waren bei den etablierten Materialien Bioverit® und Titan über beide Verweildauern niedrigere BIC-Werte als bei den neu entwickelten Materialien Composit und Polymer nachweisbar. Weiterhin ist festzustellen, dass der BIC bei den etablierten Materialien von 9 zu 18 Monaten abnimmt (Bioverit® um 2,88 %, Titan um 3,18 %) während die neu entwickelten Materialien eine Zunahme aufwiesen (Composit um 11,98 %, Polymer um 6,44 %).

Den geringsten Abstand zwischen Knochen und Implantat (BID) wies das Polymer sowohl nach 9 als auch nach 18 Monaten auf (Tab. 6, Abb. 14). Der größte Abstand und damit höchste BID-Wert über beide Verweildauern war beim Titan nachweisbar. Die neu entwickelten Materialien zeigten insgesamt eine geringere Distanz zwischen Knochen und Implantat über die Verweilzeit von 18 Monaten im Vergleich zu den etablierten Materialien. Bei allen Materialien konnte eine Abnahme des BID über die Verweildauer von 18 Monaten gemessen werden: die Differenz bei Bioverit® betrug 18,32 µm, bei Titan 0,65 µm, bei Composit 43,84 µm und bei Polymer 21,73 µm.

Betrachtet man die Streubreite der Messungen, so wird deutlich, dass diese bei den Messungen des BID wesentlich höher war als bei den Messungen des BIC (Abb. 13,14). Diese unterschiedlichen Streubreiten basieren auf den unterschiedlichen Auswertungsmethodiken des BID und BIC. Die Berechnung des BIC erfolgt über einer definierten Länge (im vorliegenden Fall 100 Messpunkte) und es wird jeder Messpunkt hinsichtlich eines Knochenkontaktes zwischen dem Implantat und Knochen beurteilt (BID=0 entspricht BIC=100 %; BID >0 µm entspricht BIC= 0 %). Die Erstellung des BID erfolgt ebenfalls über die definierte Länge von 100 Messpunkten aber es erfolgt die Beurteilung des Messpunktes hinsichtlich des Abstands zwischen Knochen und Implantat. So wird pro Messpunkt ein Wert zwischen 0 µm und 742,5 µm gemessen. Aufgrund dieser großen Spannbreite an möglichen Werten, entstehen größere Streubreiten in der anschließenden quantitativen Auswertung.

Die oben genannten Ergebnisse bestätigen den BIC als Goldstandard in der quantitativen Histomorphometrie, da aufgrund der Unterscheidung BIC (ja/nein) Rückschlüsse auf die

Osseointegration eines Materials gezogen werden können. Aufgrund der größeren Datenmenge beim BID durch die Spannbreite der Werte von 0 μm bis 742,5 μm muss für eine bessere Beurteilung der Osseointegration eine Einteilung in Abschnitte, sortiert nach dem Knochen-Implantat-Abstand, erfolgen. Dies wurde im Rahmen des Jahresring-Algorithmus mittels der VOIs umgesetzt.

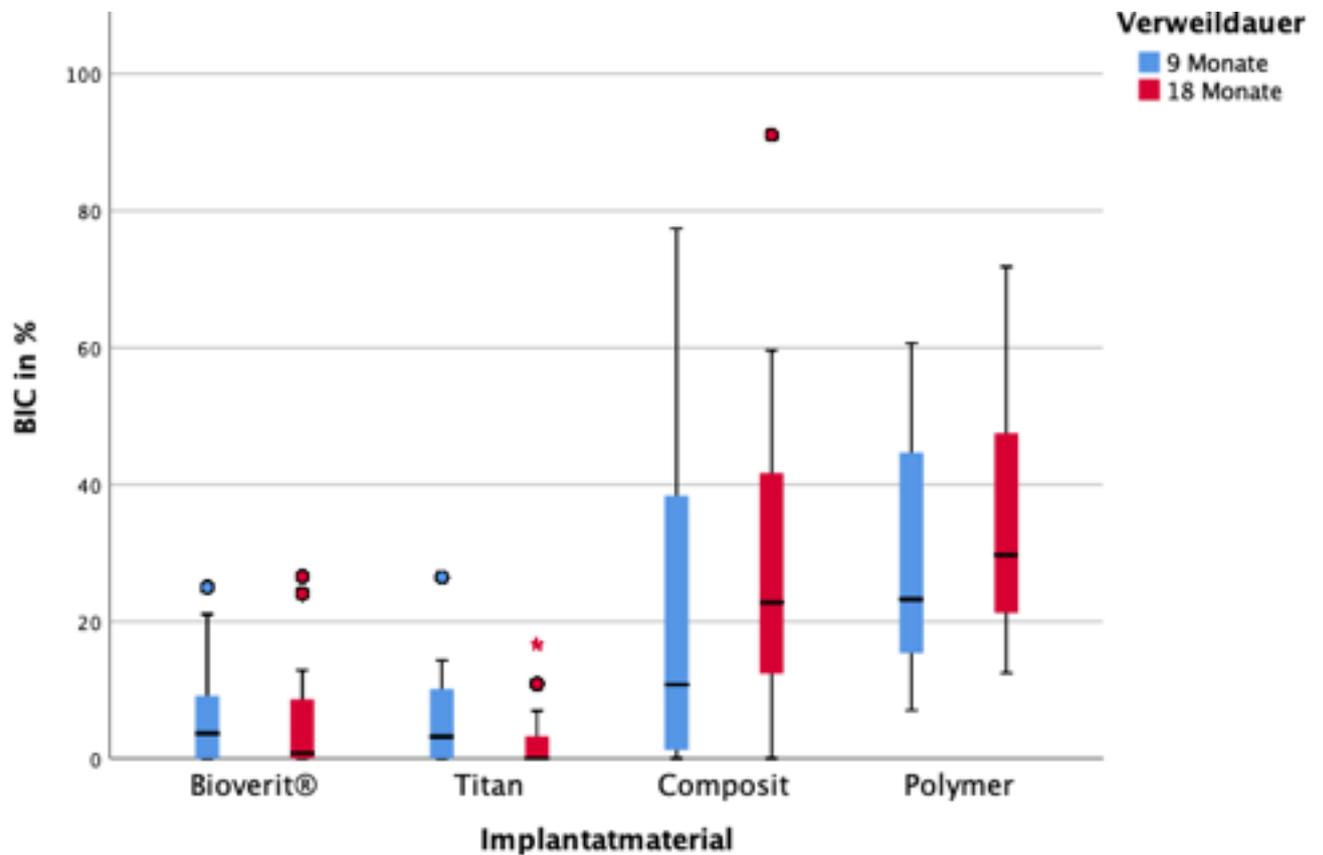


Abb. 13: BIC in Prozent der histologischen Schnitte

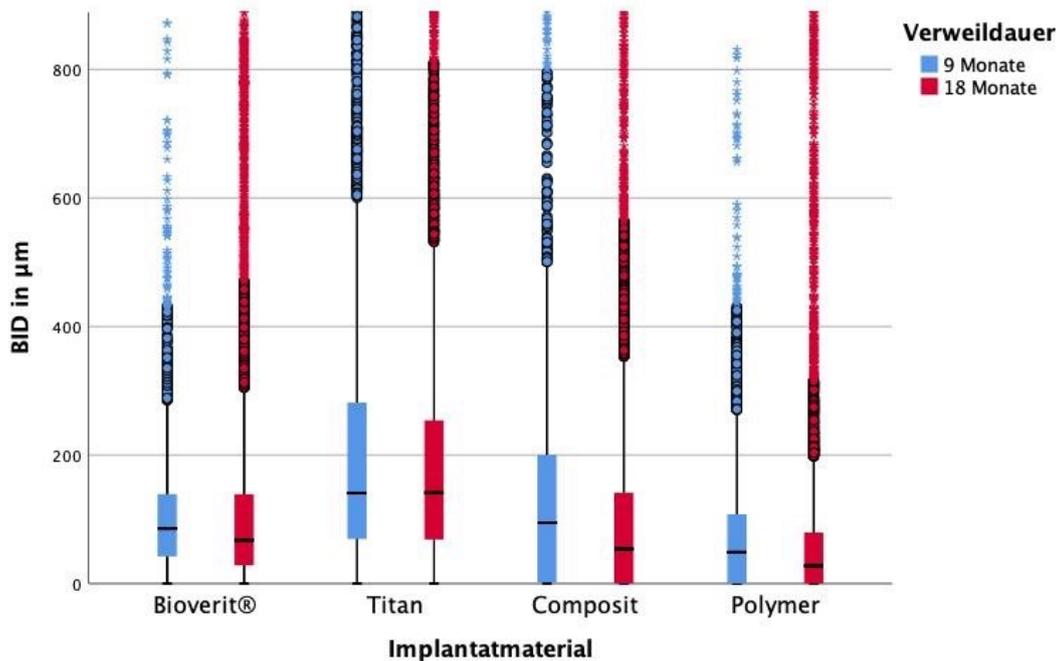


Abb. 14: BID in µm der histologischen Schnitte

5.2.2. Qualitative Auswertung der Histologie

Insgesamt wurden die histologischen Proben von 28 Tieren qualitativ beurteilt. Im Durchschnitt lagen ca. 3-4 histologische Schnitte pro Tier und Implantatmaterial vor. Hierbei war immer mindestens jeweils ein Schnitt mit der Hämatoxylin-Eosin- und einer mit der Masson-Goldner Färbung vorhanden. In der weiteren qualitativen Beurteilung wurden die einzelnen Schnitte pro Tier und Material zusammengefasst.

Da bei keinem der Schnitte Fremdkörperriesenzellen nachgewiesen werden konnten, wurden alle mit dem Score 0 bewertet und daher auf eine weitere tabellarische Darstellung im Vergleich der Materialien bzw. Verweildauern verzichtet.

Bioverit®

Bei einer Verweildauer von 9 Monaten fiel bei allen 11 Probekörpern eine geringe bindegewebige Einkapselung auf (Score: 0 Punkte; Tab. 7). Die Knochenneubildungsrate stellte sich insgesamt wenig ausgeprägt dar (Score: 3 Punkte; Tab. 7). Fremdkörperriesenzellen waren bei keiner der Proben erkennbar. Exemplarisch ist ein Bioverit®-Probekörper in Abb. 15 dargestellt.

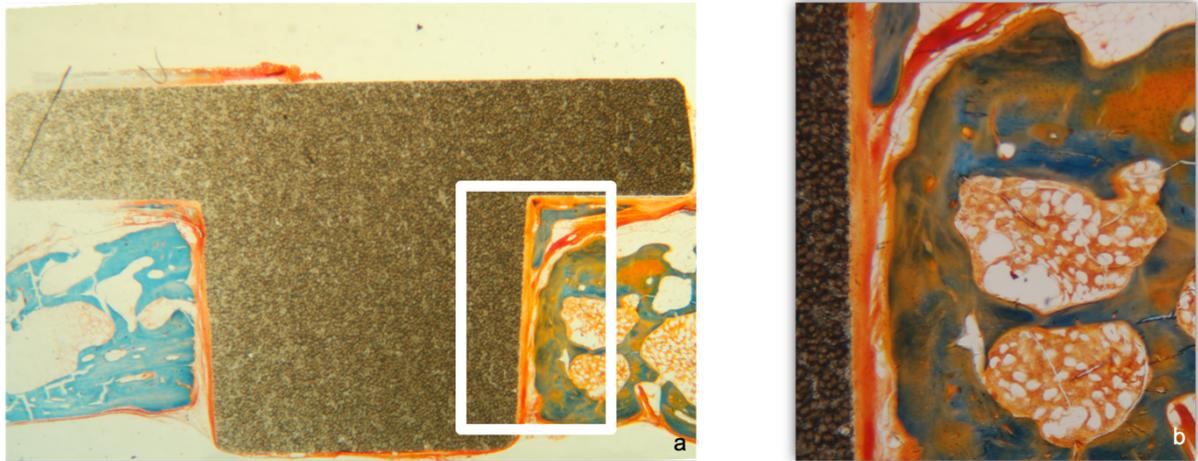


Abb. 15: Bioverit® mit der bindegewebigen Einkapselung an dem Implantatmaterial, nach 9 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung

Nach 18 Monaten war bei den 17 Bioverit®-Probekörpern eine gering ausgeprägte bindegewebige Einkapselung zu sehen (Score: 0 Punkte; Tab. 7). Es waren keine Fremdkörperriesenzellen in den Proben sichtbar. Die Knochenneubildungsrate stellte sich insgesamt wenig ausgeprägt dar (Score: 3 Punkte; Tab. 7)

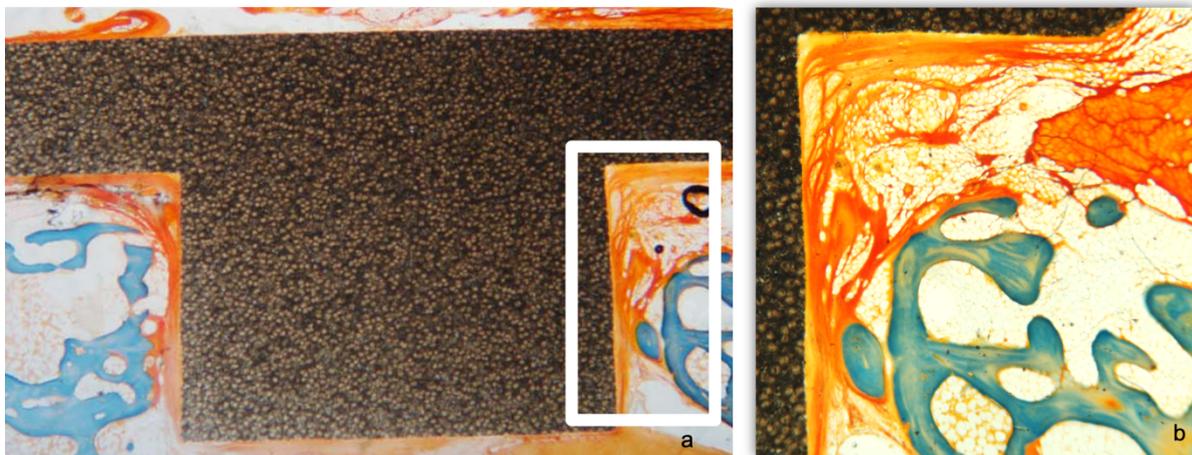


Abb. 16: Bioverit® mit der ausgeprägten, bindegewebigen Einkapselung an dem Implantatmaterial nach 18 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung

Tab. 7: Score-Werte zur qualitativen Beurteilung des Bioverit®s in der Hartgewebephistologie

	Score-Wert in Punkt	
	Bindegewebe	neugebildeter Knochen
9 Monate	0	3
18 Monate	0	3

Titan

Nach 9 Monaten war eine sehr geringe Bindegewebsschicht vorhanden (Score: 0 Punkt; Tab. 8). Anhand der histologischen Färbung war teilweise neu gebildeter Knochen erkennbar (Score: 4 Punkte; Tab. 8). Fremdkörperriesenzellen waren bei keinem Präparat sichtbar.

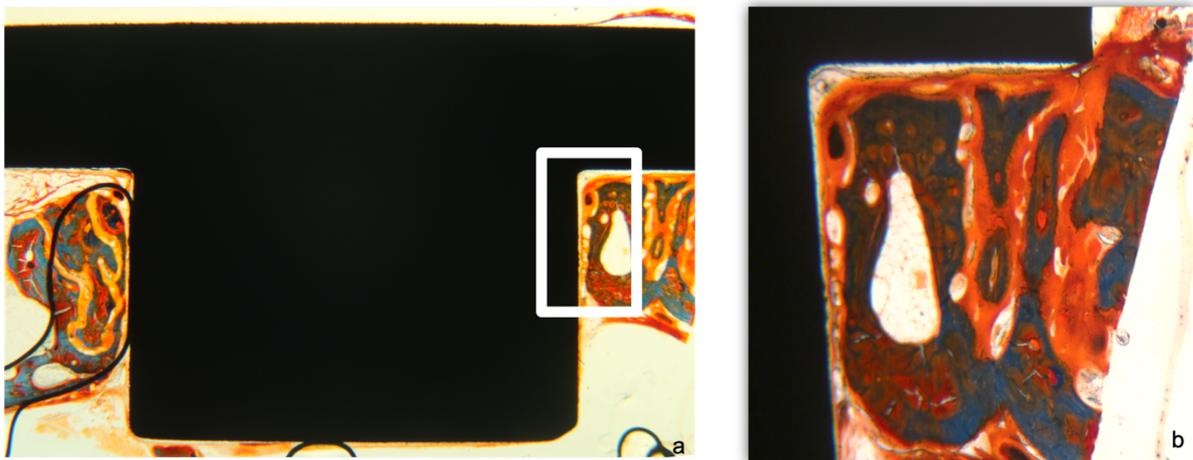


Abb. 17: Titan mit der bindegewebigen Einkapselung an dem Implantatmaterial, nach 9 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung

Bei einer Verweildauer von 18 Monaten wiesen die Präparate eine geringe bindegewebige Einkapselung auf (Score: 0 Punkte; Tab. 8). Neugebildeter Knochen war bei allen Proben wenig ausgeprägt vorhanden (Score: 3 Punkte; Tab. 8; Abb. 18).



Abb. 18: Titan mit der bindegewebigen Einkapselung an dem Implantatmaterial nach 18 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung

Tab. 8: Score-Werten zur qualitativen Beurteilung des Titans in der Hartgewebephistologie

	Score-Wert in Punkt	
	Bindegewebe	neugebildeter Knochen
9 Monate	0	4
18 Monate	0	3

Composit

Nach 9 Monaten war eine geringe bindegewebige Einkapselung erkennbar (Score: 0 Punkte; Tab. 9). Der Anteil an neugebildetem Knochen wurde viel bewertet (Score: 5 Punkte; Tab. 9). In keinem Präparat konnten Fremdkörperriesenzellen nachgewiesen werden. Exemplarisch für die o.g. Eigenschaften wird auf die Abb. 19 verwiesen.



Abb. 19: Composit mit einer bindegewebigen Einkapselung an dem Implantatmaterial, nach 9 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (schwarz), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung

Bei einer Verweildauer von 18 Monate waren wenig bis keine bindegewebigen Schichten um das Implantat bei allen Proben sichtbar (Score: 0 Punkt; Tab. 9). Der Anteil an neugebildetem Knochen war in allen Präparaten als hoch einzustufen (Score: 5 Punkte; Tab. 9). Fremdkörperriesenzellen wurden in keinem Schnitt darstellbar. Exemplarisch sind diese Eigenschaften in der Abb. 20 dargestellt.

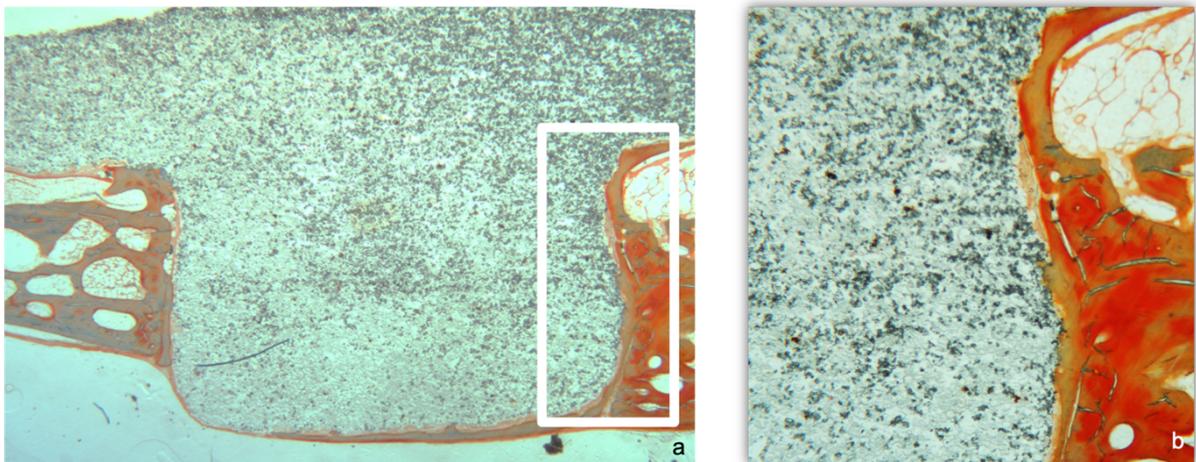


Abb. 20: Composit mit einer hohen Knochenneubildungsrate nach 18 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung

Tab. 9: Score-Werte zur qualitativen Beurteilung des Composites in der Hartgewebebehistologie

	Score-Wert in Punkt	
	Bindegewebe	neugebildeter Knochen
9 Monate	0	5
18 Monate	0	5

Polymer

Bei einer Verweildauer von 9 Monaten war bei allen Probekörpern eine unauffällige, dünne bindegewebige Einscheidung erkennbar (Score: 0 Punkt; Tab. 10). Der neugebildete Knochen war bei fast allen Präparaten deutlich ausgeprägt (Score: 5 Punkte; Tab. 10). Fremdkörperriesenzellen wurden bei keinem histologischen Schnitt gesehen. Exemplarisch ist dies in Abb. 21 dargestellt.



Abb. 21: Polymer mit einer dünnen bindegewebigen Einkapselung nach 9 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung

Nach 18 Monaten Implantationsdauer fiel bei fast allen Probekörpern auf, dass die Bindegewebsschicht nur sehr gering ausgeprägt war (Score: 0 Punkt; Tab. 10; Abb. 22). Der neugebildete Knochen war bei einem Großteil der Proben teilweise bis sehr viel vorhanden (Score: 5 Punkte; Tab. 10). Fremdkörperriesenzellen waren nicht sichtbar.

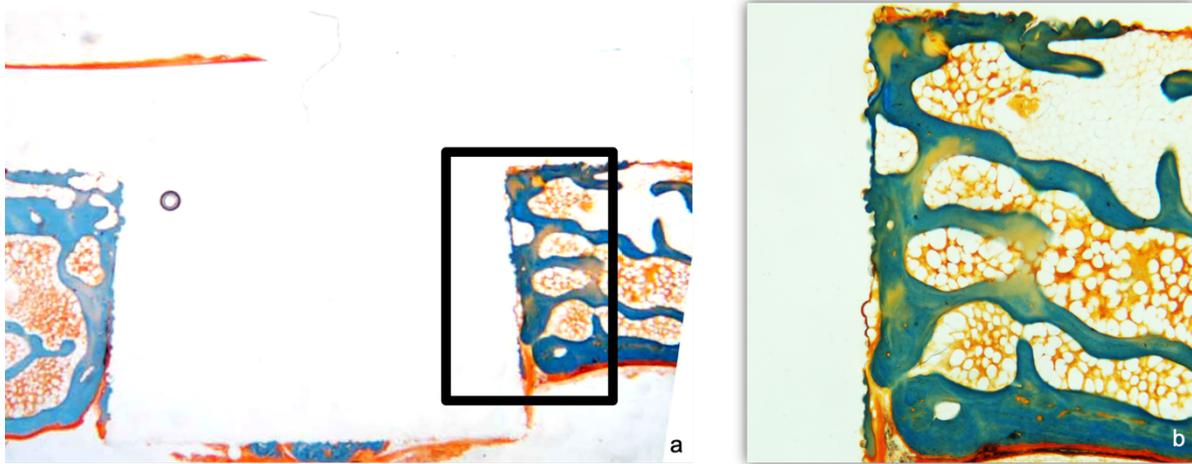


Abb. 22: Polymer mit einer ausgeprägten Knochenneubildungsrate nach 18 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (schwarz), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung

Tab. 10: Score-Werte zur qualitativen Beurteilung des Polymers in der Hartgewebephistologie

	Score-Wert in Punkt	
	Bindegewebe	neugebildeter Knochen
9 Monate	0	5
18 Monate	0	5

Die qualitative Auswertung der histologischen Schnitte zeigte sich ein gutes Einheilungsverhalten des Implantates ohne Entzündungsreaktionen (keine Fremdkörperriesenzellen o.ä.) oder Nekrosen bei allen untersuchten Implantatmaterialien.

Neu gebildeter Knochen war bei den Titan- und Bioverit[®]-Implantaten (außer bei 3 Proben des Bioverit[®]), eher gering vorhanden. Weiterhin war eine geringere Knochenneubildung beim Titan nach 18 Monaten erkennbar.

Bei den neu entwickelten Materialien Composit und Polymer zeigte sich eine höhere Knochenneubildungsrate. Die Bindegewebsschicht war bei den Composit- und Polymer-Präparaten gering ausgeprägt. Zwischen den Verweildauern waren keine größeren Auffälligkeiten erkennbar.

5.3 Entwicklung der 3D-Methode: Jahresring-Algorithmus

5.3.1 Erfüllung der Soll-Anforderungen

Input

Für die Auswertung der μ CT-Daten sollten diese bereits in einer (nach einheitlichen Vorgaben) segmentierten Form vorliegen, um insbesondere eine Anwendung des Auswertungsalgorithmus auf alle gescannten Implantatmaterialien zu ermöglichen. Dies konnte für alle Materialien mit Ausnahme des Titans umgesetzt werden. Die Segmentierung des Titans war zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit aufgrund materialbedingter Artefakte nicht möglich. Für die Segmentierung musste eine Ausrichtung des zylinderförmigen Implantats entlang der z-Achse vorgenommen werden. Diese Ausrichtung konnte für alle Probekörper umgesetzt werden.

Messwertgenerierung/ Jahresring-Algorithmus

Bei allen Probekörpern erfolgte die Messung ausgehend von der Implantatoberfläche. Als Längenparameter für die Abstandsmessung wurde sich in Avizo[®] für Voxel entschieden. Eine Umrechnung in den Zielparameter μm erfolgte im Rahmen der Berechnung in SPSS[®] Statistics.

Für alle segmentierten Proben konnte der Volumenanteil des Knochens in den einzelnen Jahresring-ROIs anhand der Voxel-Anzahl ermittelt und ausgegeben werden. Eine direkte Ausgabe des BV/TV in Prozent war, aufgrund der quantitativen Auswertungsmöglichkeiten in Avizo[®], nicht möglich.

Eine GUI wurde in der Version 1.0 noch nicht entwickelt, da die verwendete Vorlagenfunktion in Avizo[®] dies nicht anbot. Zur Entwicklung einer GUI waren Programmierkenntnisse erforderlich, weshalb eine Kontaktaufnahme zu Thermo Fisher Scientific erfolgte. Diese entwickelten neben einem Modul („*Annuli Labels*“) auch die entsprechende GUI in Avizo[®].

Output

Der quantitative Parameter relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen (BV/TV) wurde in Abhängigkeit zum Abstand vom Startpunkt (Implantatoberfläche) ausgehend von der Rotationsachse des Implantates (z-Achse) ausgegeben.

Die relevanten Volumina (Volume of interest; VOI) ausgehend von der Implantatoberfläche und entsprechend des morphologischen Kontexts wurden definiert (Abb. 23).

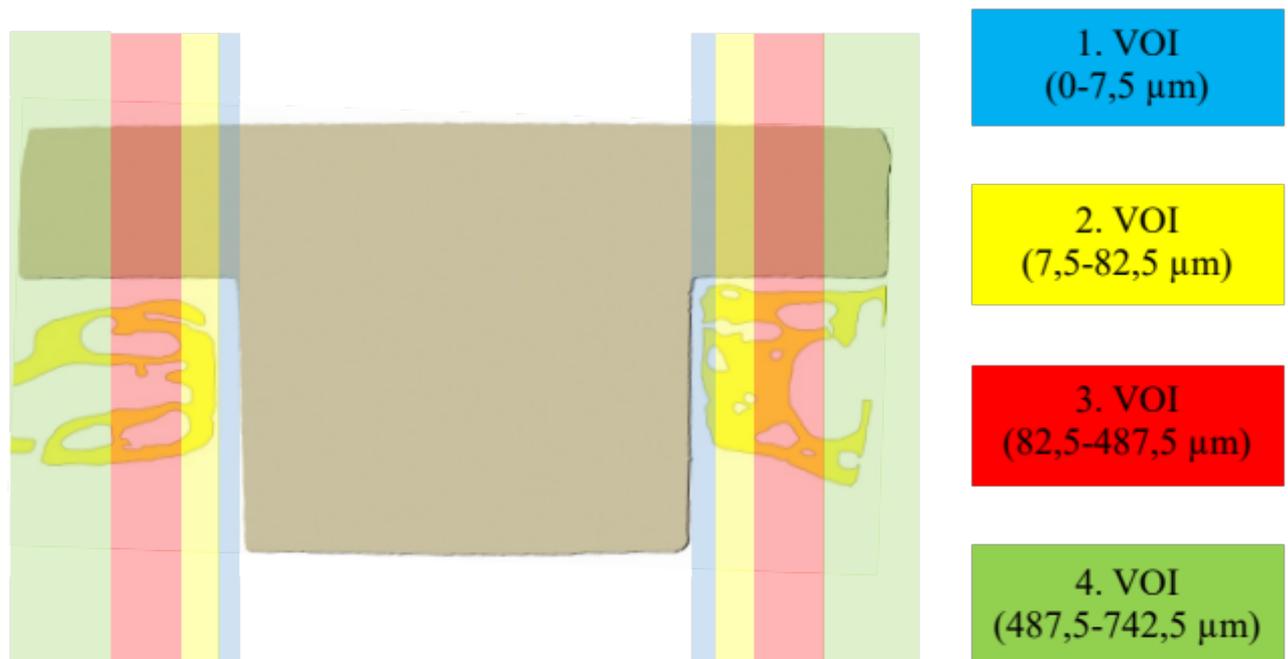


Abb. 23: schematische Darstellung der 4 Volume of interest (VOI) ausgehend von der Implantatoberfläche

Der erste Jahresring mit einer Breite von 1 Voxel (7,5 µm) wurde als VOI BIC definiert, der den direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat repräsentiert. Im Abstand von 7,5 bis 82,5 µm wurde das zweite VOI (*bindegewebige Einscheidung und neu gebildeter Knochen*) festgelegt. Die Bezeichnung beruhte auf der Schicht aus Bindegewebe und neugebildetem Knochen, die in der histomorphometrischen Auswertung dieser Arbeit und in einer vorhergehenden Promotionsarbeit im Biomateriallabor (Diebowski 2014) qualitativ und quantitativ charakterisiert wurde. Zwei weitere VOIs (*neugebildeter/umgebauter Knochen und vorhandener Knochen*) basierten auf dem bekannten Bohrdurchmesser (4,9/5,0 mm) des Trepanationsdefektes in der Schädelkalotte der Versuchstiere sowie der durchgeführten qualitativen Beurteilung der Hartgewebepathologie.

Der Bereich von 82,5 bis 487,5 μm (gemessen ab der Implantatoberfläche) wurde dem 3. VOI *neugebildeter/umgebauter Knochen zugeordnet*. Das 4. VOI $> 487,5\mu\text{m}$ wurde als *vorhandener Knochen* definiert.

Zur Berechnung des BV/TV wurden pro Berechnung zwei Tabellen exportiert. Die erste Tabelle beinhaltete die gesamte Anzahl an Voxeln im jeweiligen Jahresring. Die zweite umfasste solche, welche als Knochen identifiziert waren. Mithilfe der Software Excel (Microsoft®, Version 15.19.1) wurden die Werte der Tabellen durch Subtraktion und Berechnung des relativen Knochenanteils am Gesamtvolumen auf eine Ausgabetabelle reduziert, welche die Gesamtvoxel, als Knochen identifizierte Voxel sowie das BV/TV mit der entsprechenden Jahresring-Nummer beinhaltete (Abb. 24).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Volumen (Gesamt)	Fläche (Gesamt)	Volumen (Knochen)	Fläche (Gesamt)		BV/TV in %	index		
2	898169	1423050	3037	5431,54		0,33813236	1		
3	885720	1417070	2751	4950,69		0,31059477	2		
4	884443	1418990	2951	5359,31		0,33365632	3		
5	1784710	1479330	64061	72742,6		3,5894347	4		
6	1794300	1489290	149751	154912		8,34592877	5		
7	1804200	1499330	273162	263822		15,1403392	6		
8	1814280	1509410	388252	358276		21,3997839	7		

Abb. 24: zusammengefasste Ausgabetabelle des Jahresring-Algorithmus; bestehend aus den Werten der gesamten Voxel (rot), der als Knochen deklarierten Werte (grün), dem Ergebnis (blau) sowie der Nummer des Jahresringes (index)

Für alle untersuchten und gemessenen Proben konnte der Parameter BV/TV ermittelt werden. Die vorliegenden Werte wurden im Anschluss an die Messung in die Software SPSS® Statistics automatisch importiert. Hier erfolgte dann die quantitative Auswertung des BV/TV.

5.3.2 Fertigstellung der Version 2.0 (Annuli Labels)

In Zusammenarbeit mit der Firma Thermo Fisher Scientific wurde die aktuelle Version des Jahresring-Algorithmus in Avizo® (Version 9.4) als *Annuli Labels* implementiert. Neben Anpassungen hinsichtlich der Benutzerergonomie wurde eine Reduzierung der Berechnungsdauer (von 180 min auf ca. 30-60 min) erreicht. Weiterhin war ein Hauptmerkmal die Einführung einer GUI. In dieser GUI war es möglich, die Anzahl und Schichtdicke der Dilatationen vor der Berechnung einzugeben.

Eine Übersichtstabelle mit Vergleich der beiden Versionen hinsichtlich der Soll-Anforderungen ist dem Anhang zu entnehmen (siehe Anhang 6.2).

5.4 Ergebnisse der μ CT

Für die Auswertung der 3D- μ CT-Bilddaten mittels des neu entwickelten Jahresring-Algorithmus wurde als Kenngröße zur Bewertung der Osseointegration der Implantate der relative Volumenanteil des Knochens (BV/TV) in den konzentrisch angeordneten ROIs verwendet. Diese ROIs wurden anschließend sowohl detailliert ausgewertet als auch zu mehreren VOIs zusammengefasst.

Insgesamt wurden mithilfe des Jahresring-Algorithmus 84 segmentierte μ CT-Scans ausgewertet. Die Datensätze der μ CT-Scans der Titan-Implantate konnten wegen der deutlichen Materialartefakt nicht segmentiert und ausgewertet werden.

Im Kolmogorov-Smirnov-Test, der zu Prüfung der Datenverteilung durchgeführt wurde, konnte keine Normalverteilung nachgewiesen werden, weshalb für die statistische Auswertung das linear gemischte Modell mit der Darstellung des Medians und der dazugehörigen Perzentilen verwendet wurde. Die entsprechenden Tabellen sind im Anhang 7.1 aufgelistet.

5.4.1 BV/TV der Implantatmaterialien über die Gesamtdistanz

Die medianen Werte für den BV/TV eines jeden Implantatmaterials über die gesamte Distanz (von der Implantatoberfläche bis 742,5 μ m, VOI 1-4) wurden zusammengefasst und in Abhängigkeit zum Abstand von der Implantatoberfläche dargestellt (Tab. 11, Abb. 25, 26,27,28). Hierbei zeigten sich materialspezifische Kurvenverläufe. Aufgrund dieser wurden die Maxima der Verläufe nach Höhe sowie Abstand zur Implantatoberfläche berechnet (Tab. 12). Das Maximum war in diesem Fall der Ort mit der höchsten Knochendichte bzw. BV/TV.

Tab. 11: BV/TV der Implantatmaterialien nach 9 und 18 Monaten über die Gesamtdistanz (0-742,5 µm)

		BV/TV in %		
		Median	25. Perzentile	75. Perzentile
Bioverit®	<i>9 Monate</i>	52,47	37,89	65,76
	<i>18 Monate</i>	47,01	36,76	57,94
Composit	<i>9 Monate</i>	57,33	49,62	65,83
	<i>18 Monate</i>	57,6	47,68	66,75
Polymer	<i>9 Monate</i>	51,59	42,31	59,85
	<i>18 Monate</i>	43,3	32,95	58,81

Tab. 12: Maximaler BV/TV und Abstand von der Implantatoberfläche (jeweils in Prozent als BV/TV bzw. µm) der Implantatmaterialien nach 9 und 18 Monaten

		BV/TV in %	Abstand in µm
		Maximum	Abstand von der Implantatoberfläche
Bioverit®	<i>9 Monate</i>	74,59	127,5
	<i>18 Monate</i>	71,34	127,5
Composit	<i>9 Monate</i>	69,56	293
	<i>18 Monate</i>	69	203
Polymer	<i>9 Monate</i>	72,33	112,5
	<i>18 Monate</i>	67,7	97,5

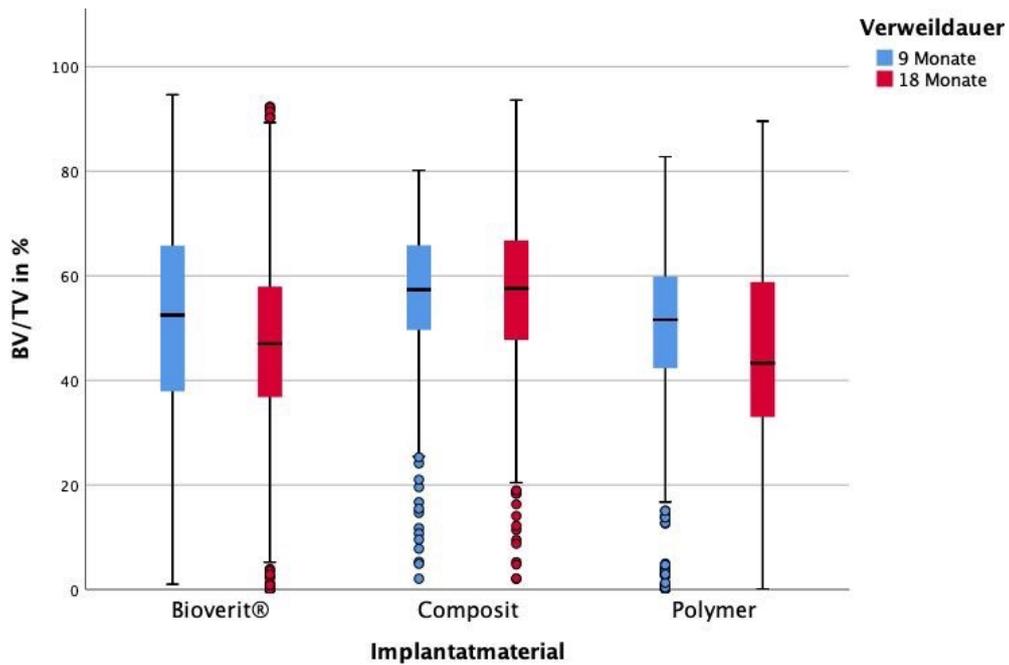


Abb. 25: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen (BV/TV, in %), Zusammenfassung aller Messwerte über die Gesamtdistanz (0-742,5 µm)

5.4.1.1 Bioverit®

Das BV/TV beim Bioverit® lag nach 9 Monaten bei 52,47 % und nach 18 Monaten bei 47,07 %. Es kam hierbei zu einer Abnahme des BV/TV von 9 zu 18 Monaten um 5,4 % (Abb. 25, Tab. 11). Das Maximum für Bioverit® lag nach 9 Monate bei 74,59 % und nach 18 Monaten bei 71,34 %. Der Abstand des Maximums zur Implantatoberfläche lag sowohl bei 9 Monaten als auch 18 Monaten bei 127,5 µm (Abb. 26, Tab. 12).

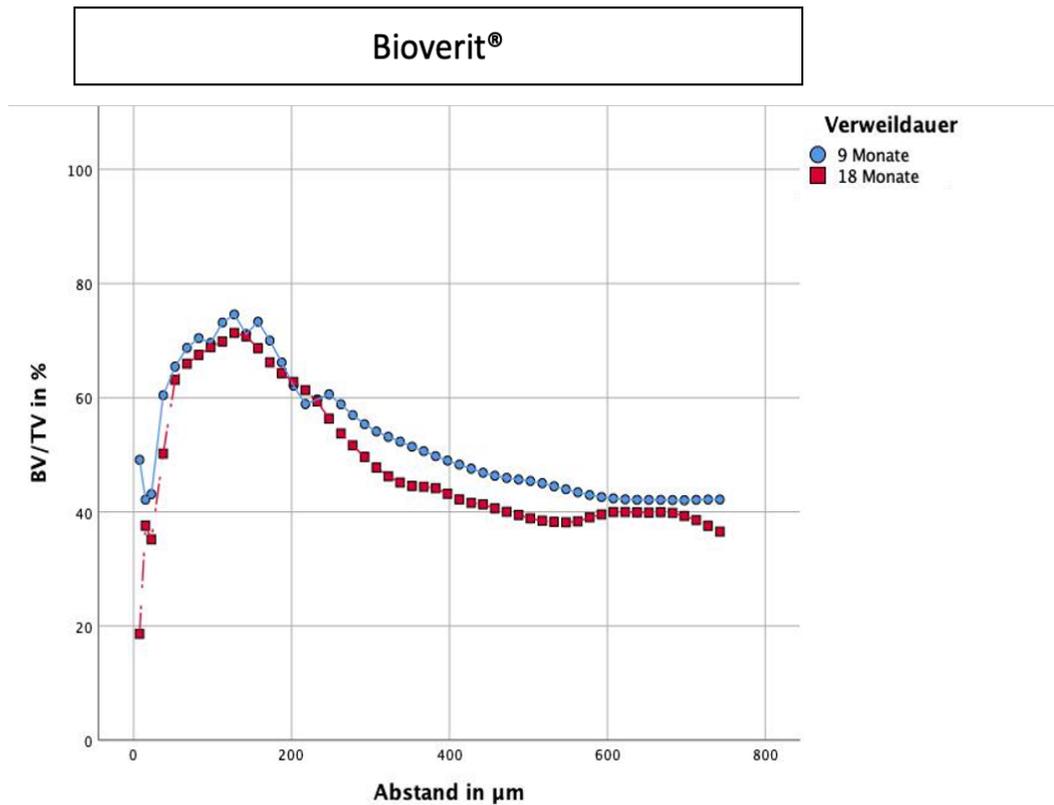


Abb. 26: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte des Bioverit®s über die Gesamtdistanz (0-742,5 µm)

5.4.1.2 Composit

Das Composit wies nach 9 Monaten ein BV/TV von 57,33 % und nach 18 Monaten von 57,60 % auf. Zwischen 9 und 18 Monaten wurde bei Composit eine Zunahme des BV/TV um 0,27 % gemessen (Abb. 25, Tab. 11). Für das Composit-Material war ein gleichbleibender Wert des Maximums von 69 % nach 9 und 18 Monaten messbar. Das Maximum war nach 9 Monaten bei 293 µm und nach 18 Monaten bei 203 µm messbar (Abb. 27, Tab. 12).

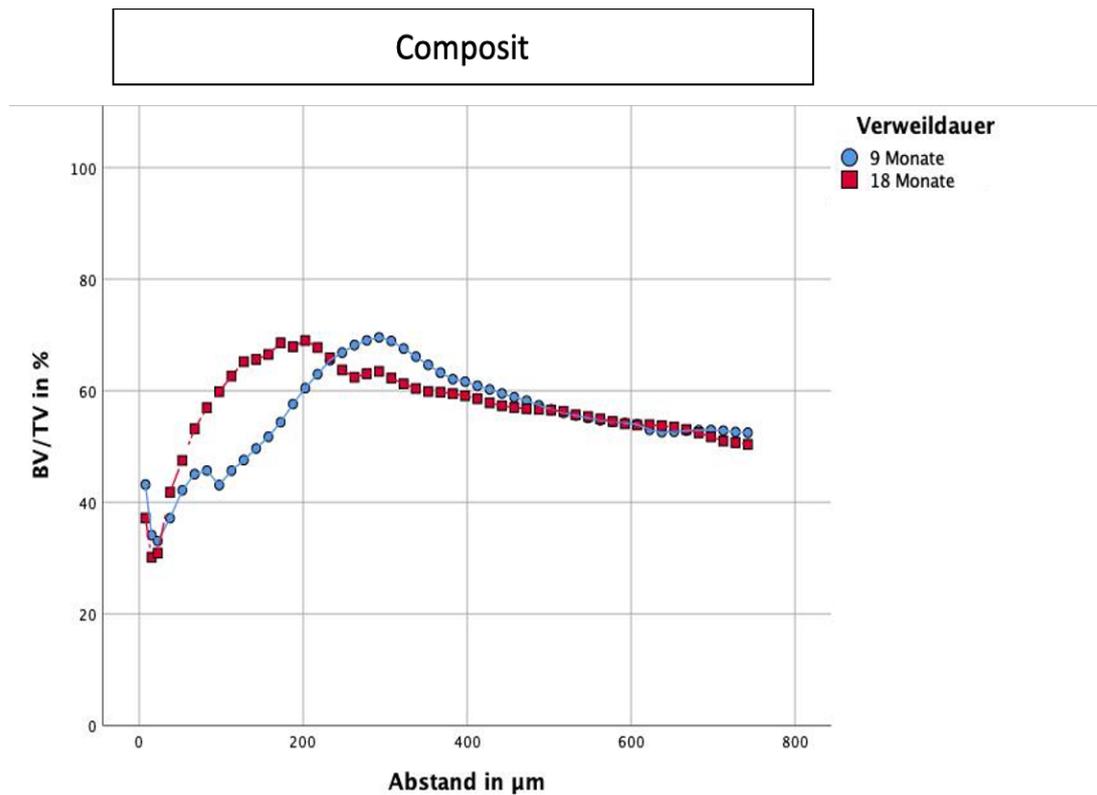


Abb. 27: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte des Composites über die Gesamtdistanz (0-742,5 μm)

5.4.1.3 Polymer

Beim Polymer lag der BV/TV-Wert nach 9 Monaten bei 51,59 % und nach 18 Monaten bei 43,3 %. Zwischen den Verweildauern von 9 und 18 Monaten war eine Abnahme um 8,29 % erkennbar (Abb. 25, Tab. 11). Das Polymer wies ein Maximum von 72,33 % nach 9 Monaten und von 67,7 % nach 18 Monaten auf. Der Abstand des Maximums zum Implantat lag nach 9 Monaten bei 112,5 μm und nach 18 Monaten bei 97,5 μm (Abb. 28, Tab. 12).

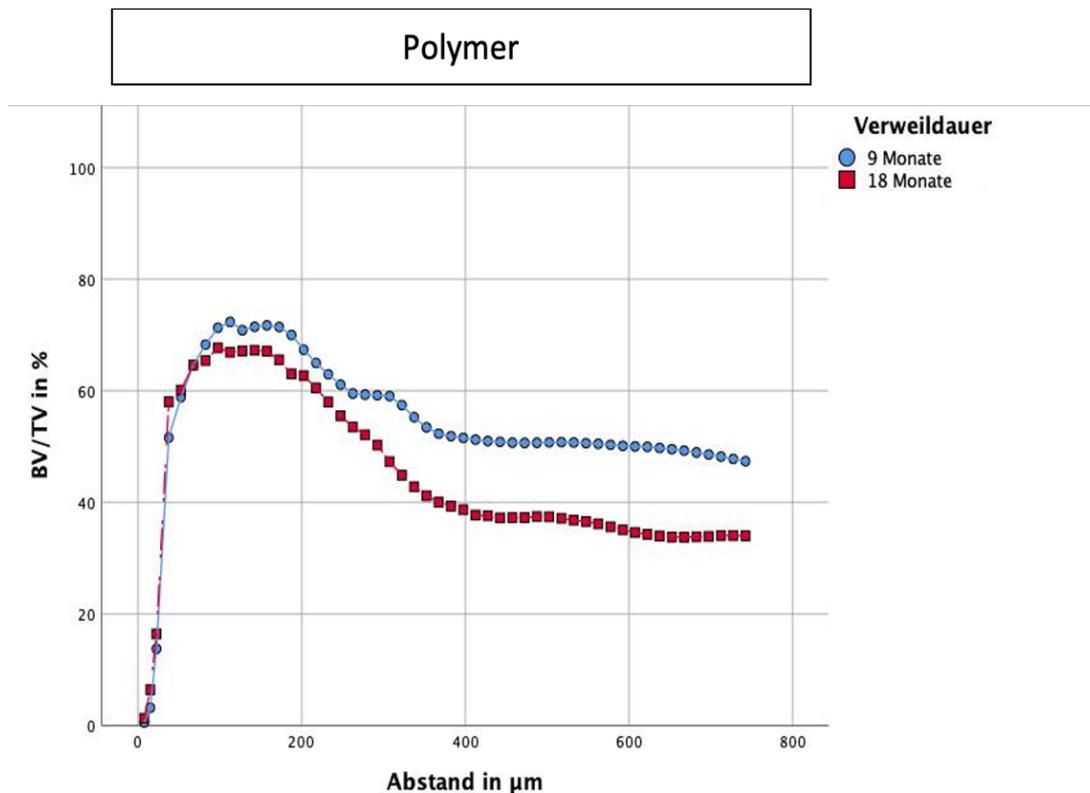


Abb. 28: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte des Polymer über die Gesamtdistanz (0-742,5 µm)

5.4.1.4 Vergleich des BV/TV der Implantatmaterialien über die Gesamtdistanz

Das Composit wies den höchsten BV/TV von allen Materialien über die Gesamtdistanz auf. Die niedrigsten Werte wurden beim Polymer gemessen. Zwischen den Verweildauern fiel der Differenzwert beim Polymer am größten aus. Insgesamt war bei den neu entwickelten Materialien bei einer Verweildauer von 9 Monaten eine geringere Streubreite der Werte nachweisbar.

Das höchste Maximum, also die höchste Knochendichte wurde bei Bioverit® und das geringste Maximum beim Polymer gemessen. Hier zeigte sich auch der geringste Abstand des Maximums zur Implantatoberfläche. Im Vergleich dazu wies das Composit den größten Wert mit gleichzeitig der höchsten Abnahme des Abstandes zur Implantatoberfläche zwischen 9 und 18 Monaten auf.

5.4.2 Ergebnisse unterteilt nach den virtuellen VOIs des Jahresring-Algorithmus

5.4.2.1 VOI 1: BIC

In der VOI BIC zeigte sich beim Bioverit® nach 9 Monaten ein BV/TV von 49,12 %. Nach 18 Monaten war hier ein Wert von 18,64 % messbar. Zwischen 9 und 18 Monaten kam es hierbei zu einer Abnahme des BV/TV um 30,48 % (Abb. 29).

Das Composit wies nach 9 Monaten einen BV/TV von 43,18 % und nach 18 Monaten von 37,17 % auf. Hierbei war ebenfalls eine geringe Abnahme des BV/TV von 6,01 % zwischen den Verweildauern messbar (Tab. 13).

Für das Polymer-Material zeigen sich sehr geringe Messwerte(nach 9 Monaten 0,53 %, nach 18 Monaten 1,27 %) im Bereich BIC.

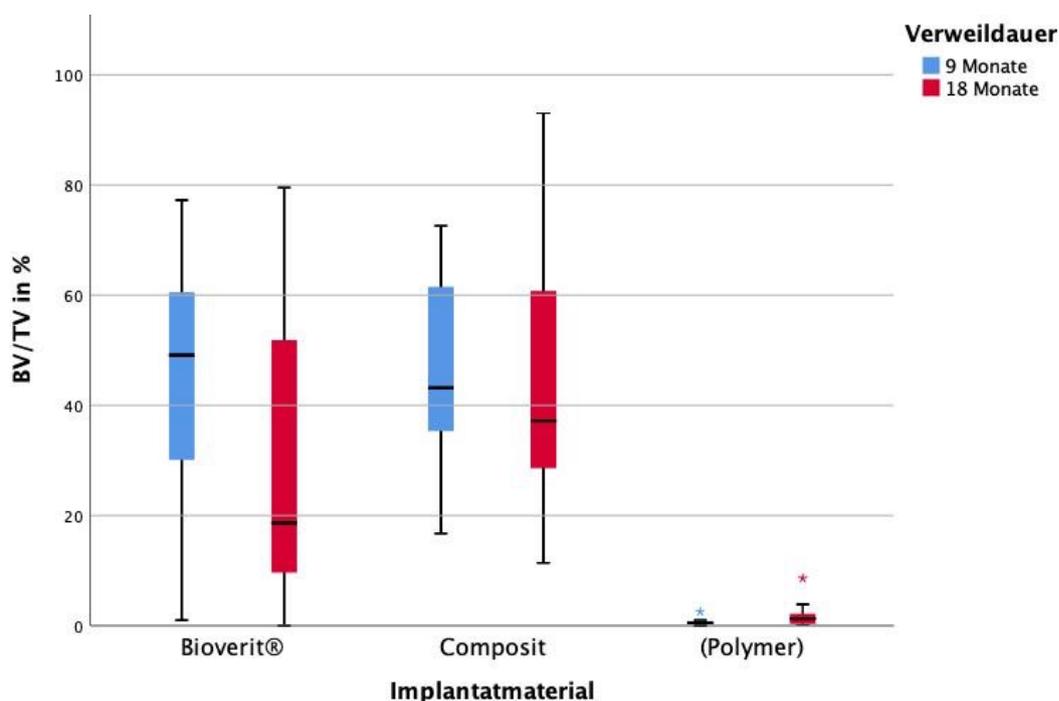


Abb. 29: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte über eine Distanz von 0-7,5 µm, entsprechend der VOI BIC

Tab. 13: Zusammenfassung der Werte aus dem Jahresring-Algorithmus aus der VOI BIC; * Werte sind aufgrund von Bildfehler nicht verwertbar und werden zur Veranschaulichung dargestellt.

		BV/TV in %		
		Median	25. Perzentile	75. Perzentile
Bioverit®	<i>9 Monate</i>	49,12	17,52	68,57
	<i>18 Monate</i>	18,64	9,63	51,85
Composit	<i>9 Monate</i>	43,18	32,85	63,12
	<i>18 Monate</i>	37,17	28,6	60,76
Polymer*	<i>9 Monate</i>	0,53	0,25*	0,93*
	<i>18 Monate</i>	1,27	0,34*	2,15*

5.4.2.2 VOI 2: bindegewebige Einscheidung und neu gebildeter Knochen

In der quantitativen Auswertung des BV/TV bei Bioverit® betrug der Wert nach 9 Monaten 59,64 % und nach 18 Monaten 53,38 % (Abb. 30, Tab. 14). Zwischen den Verweildauern war im Verlauf eine Abnahme des BV/TV um 6,26 % messbar.

Beim Composit wurde nach 9 Monaten ein BV/TV-Wert von 39,81 % und nach 18 Monaten von 47,57 % gemessen (Abb. 30, Tab. 14). Zwischen den Verweildauern wurde eine Zunahme um 7,76 % gemessen.

Das Polymer wies nach 9 Monaten einen Wert von 42,96 % und nach 18 Monaten von 53,71 % auf (Abb. 30, Tab. 14). Hierbei betrug die Zunahme des BV/TV von 9 zu 18 Monaten 10,75 %.

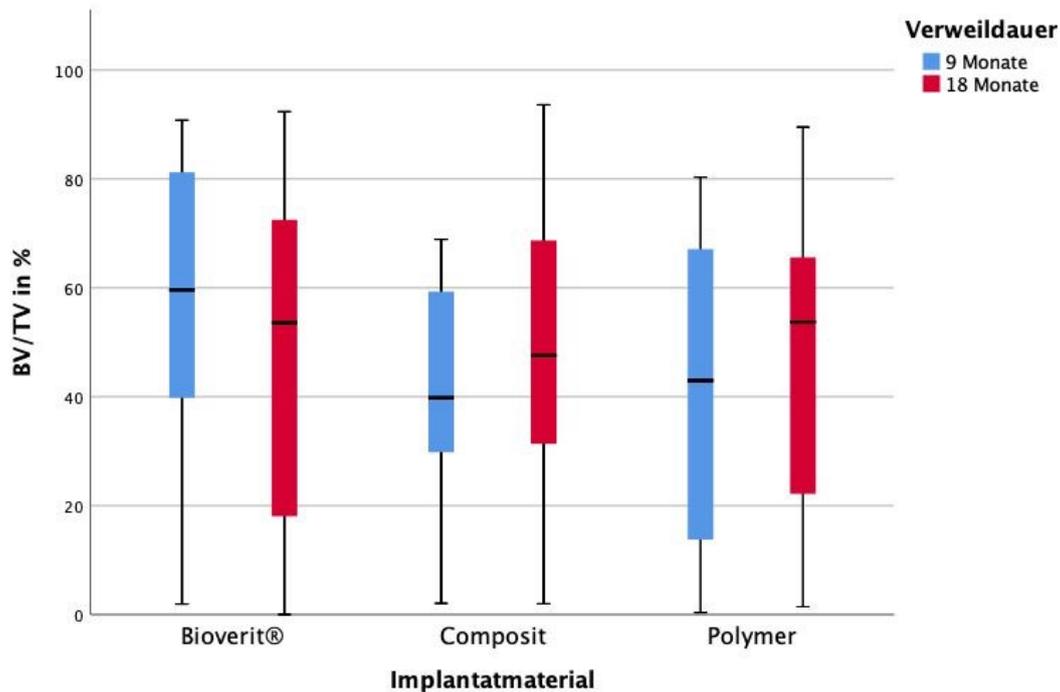


Abb. 30: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte über eine Distanz von 7,5-82,5 μm); entsprechend der VOI *bindegewebige Einscheidung und neu gebildeter Knochen*

Tab. 14: Zusammenfassung der Werte aus dem Jahresring-Algorithmus aus der VOI *bindegewebige Einscheidung und neu gebildeter Knochen*

		BV/TV in %		
		Median	25. Perzentile	75. Perzentile
Bioverit®	<i>9 Monate</i>	59,64	39,79	81,22
	<i>18 Monate</i>	53,58	18,05	72,5
Composit	<i>9 Monate</i>	39,81	29,8	59,34
	<i>18 Monate</i>	47,57	31,37	68,7
Polymer	<i>9 Monate</i>	42,96	13,77	67,12
	<i>18 Monate</i>	53,71	22,19	65,59

5.4.2.3 VOI 3: neugebildeter/umgebauter Knochen

Bioverit® zeigte einen BV/TV von 58,88 % nach 9 Monaten und von 50,49 % nach 18 Monaten (Abb. 31, Tab. 15). Die Abnahme des BV/TV von 9 zu 18 Monaten betrug 8,39 %.

Das Composit wies in diesem Bereich einen BV/TV-Werten von 62,23 % nach 9 Monaten bzw. 62,79 % nach 18 Monaten auf (Abb. 31, Tab. 15). Hier kam es zu einer geringen Zunahme um 0,56 %.

Das Polymer wies einen BV/TV von 57,69 % nach 9 Monaten und von 51,84 % nach 18 Monaten auf (Abb. 31, Tab. 15). Die Abnahme betrug 5,85 %.

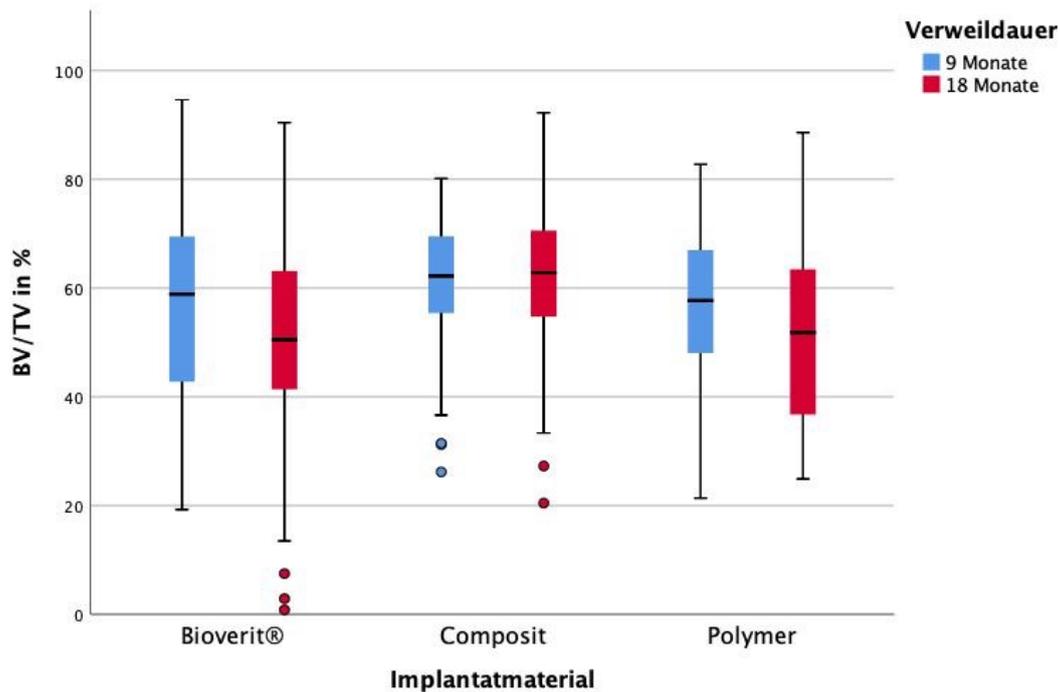


Abb. 31: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte über eine Distanz von 82,5-487,5 µm, entsprechend der VOI neugebildeter/umgebauter Knochen

Tab. 15: Zusammenfassung der Werte aus dem Jahresring-Algorithmus aus der VOI neugebildeter/umgebauter Knochen

		BV/TV in %		
		Median	25. Perzentile	75. Perzentile
Bioverit®	<i>9 Monate</i>	58,88	42,76	69,49
	<i>18 Monate</i>	50,49	41,37	63,13
Composit	<i>9 Monate</i>	62,23	55,41	69,53
	<i>18 Monate</i>	62,79	54,74	70,57
Polymer	<i>9 Monate</i>	57,69	48,04	66,99
	<i>18 Monate</i>	51,84	36,73	63,46

5.4.2.4 VOI 4: vorhandener Knochen

Für Bioverit® war nach 9 Monaten ein Wert von 42,18 % und nach 18 Monaten von 39,0 % messbar (Abb. 32, Tab. 16). Es zeigte sich eine Abnahme des BV/TV zwischen den Verweildauern um 3,18 %.

Das Composit wies nach 9 Monaten eine BV/TV von 53,31 % und nach 18 Monaten von 53,68 % auf (Abb. 32, Tab. 16). Hier wurde eine geringe Zunahme zwischen den Verweildauern um 0,37 % gemessen.

Für das Polymer betrug der BV/TV 49,52 % nach 9 Monaten und 35,02 % nach 18 Monaten (Abb. 32, Tab. 16). Hierbei war eine Abnahme des BV/TV um 14,5 % nachweisbar.

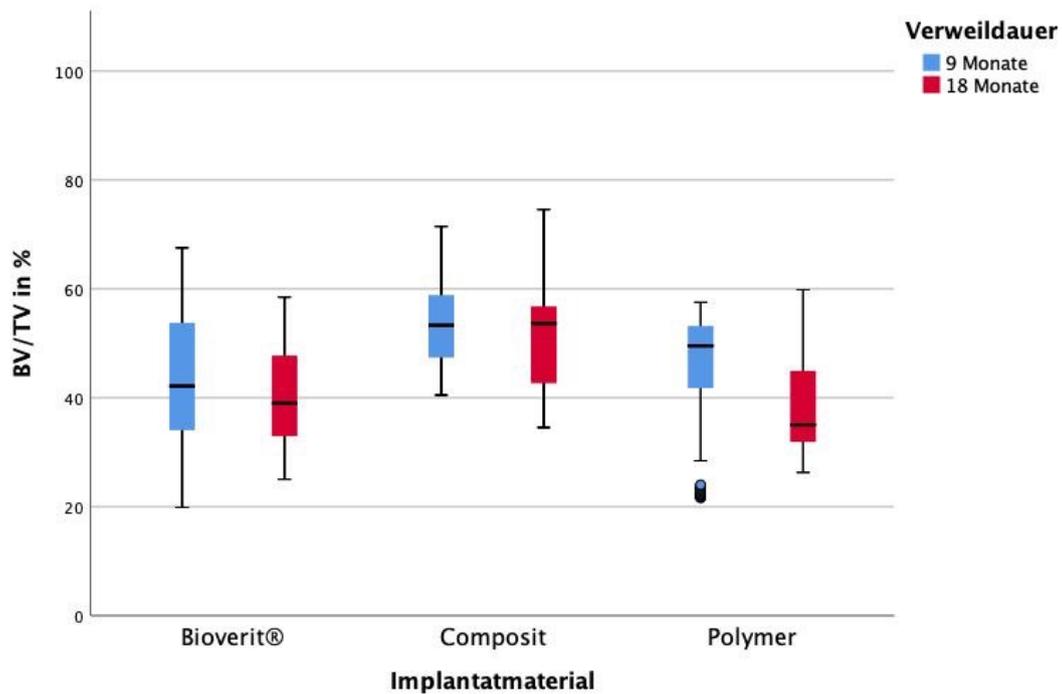


Abb. 32: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte über eine Distanz von 487,5-742,5 µm; entsprechend der VOI vorhandener Knochen

Tab. 16: Zusammenfassung der Werte aus dem Jahresring-Algorithmus aus der VOI vorhandener Knochen

		BV/TV in %		
		Median	25. Perzentile	75. Perzentile
Bioverit®	<i>9 Monate</i>	42,18	34,05	53,77
	<i>18 Monate</i>	39	32,95	47,75
Composit	<i>9 Monate</i>	53,31	47,39	58,86
	<i>18 Monate</i>	53,68	42,69	56,8
Polymer	<i>9 Monate</i>	49,52	41,77	53,19
	<i>18 Monate</i>	35,02	31,91	44,95

5.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des Jahresring-Algorithmus

In Anbetracht aller Ergebnisse, die sich aus dem 3D-Verfahren Jahresring-Algorithmus ergeben haben, wurde beim Composit der höchste Knochenanteil über die Gesamtdistanz gemessen. Diese hohen Werte wurden vor allem in den Bereichen *neugebildeter/umgebauter Knochen* und *vorhandener Knochen* festgestellt.

Das Bioverit® zeigte den zweithöchsten Knochenanteil über die Gesamtdistanz, vor allem in den Bereichen *BIC* sowie *bindegewebige Einscheidung und neu gebildeter Knochen*. Weiterhin wurde bei diesem Material die höchste maximale Knochendichte gemessen.

Das Polymer wies in den von der Implantatoberfläche weiter entfernten Bereichen (*neugebildeter/vorhandener Knochen*) die höchsten Anteile an Knochen am Gesamtvolumen auf. Der Knochenanteil über der Gesamtdistanz fiel hierbei am dritthöchsten aus. Weiterhin war bei den Implantaten aus Polymer das BV/TV-Maximum mit dem geringsten Abstand zum Implantat messbar.

Weiterhin zeigte die quantitative Auswertung des BIC bei dem Material Polymer eine Diskrepanz zwischen den Werten der Hartgewebehistologie und der μ CT. Das Polymer wies in der histologischen Auswertung deutlich höhere Werte des BIC im Vergleich zur μ CT auf. Ursächlich hierfür waren die nicht optimalen Scanbedingungen (Abb. 33 b), wodurch keine Darstellung von dünnen Knochensäumen in der Nähe des Polymerkörpers (Abb. 33 a, c) möglich war. In der Folge konnte dieser Knochen nicht segmentiert bzw. erkannt werden und der BIC wurde deshalb mit deutlich geringeren Werten gemessen. Deshalb wurden die μ CT-Scans des Polymers für die Auswertung des BIC nicht berücksichtigt. Später erfolgte Scans unter optimalen Bedingungen wurden nur für einige Proben exemplarisch durchgeführt (Abb. 33 a).

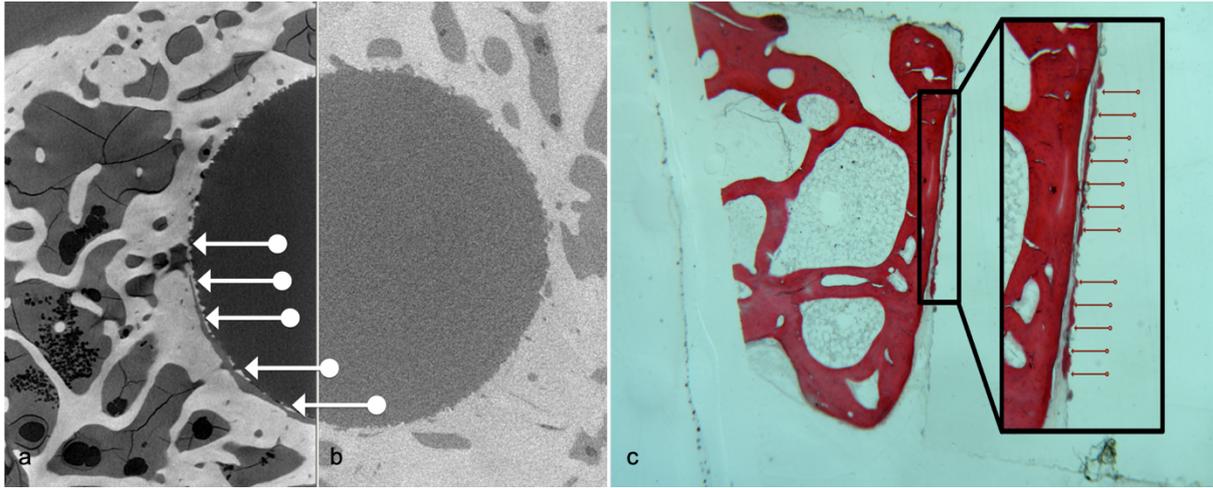


Abb. 33: gegenüberstellende Darstellung einer Histologie und eines 3D- μ CT-Scans des Materials Polymer; (a) μ CT-Schnitt mit optimalen Scanbedingungen; (b) zur Auswertung genutzte Scanbedingungen; (c) korrespondierende Hartgewebekhistologie (30-fache Vergrößerung, HE); In Abbildung (a) Darstellung der Knochensäume mit weißen Pfeilen; In Abbildung (c) Darstellung der dünnen Knochensäume mit roten Pfeilen.

6. Diskussion

6.1 Diskussion der Methodik

6.1.1 Versuchsaufbau

6.1.1.1 Tiermodell

Als Besonderheit des Jenaer Schädelmodells gilt, dass das Implantatmaterial direkten Kontakt zum *Liquor cerebrospinalis* des Versuchstieres hat und somit eine Beurteilung der Auswirkung auf das Hirnparenchym sowie Aussagen zur Gewebeverträglichkeit und Biokompatibilität der untersuchten Materialien möglich wird. In der Literatur wird die Eröffnung der Dura mit Kontakt zum Liquor eher selten durchgeführt (Sohn et al. 2010, Takauti et al. 2014, Bucchi et al. 2016). Es wird befürchtet, dass hierbei das Einheilungsverhalten deutlich negativ beeinflusst werde (Spicer et al. 2012). Im Rahmen dieser und vorhergehender Studien (Diebowski 2014) bestätigten sich diese Befürchtungen nicht.

Die Auswahl des Versuchstiers Kaninchen für die Evaluation von Knochenersatzmaterialien im Schädelknochen wird in verschiedenen Studien beschrieben (Schneider et al. 2010, Dumas et al. , Chen et al. , Cho et al. 2013, Wancket 2015, Delgado-Ruiz et al. 2015, Alenezi et al. 2018). Vorteile der Kaninchen sind, neben den geringen Kosten für Haltung und Anschaffung, die Ähnlichkeit des anatomischen Aufbaus und der Knochenzusammensetzung der Schädelkalotte zu denen des Menschen (Sohn et al. 2010) sowie der ausreichende Platz für die vier Probekörper.

6.1.1.2 Implantationsdauer

Die Implantationsdauer von 9 und 18 Monaten wurde aus klinischen Gesichtspunkten gewählt. In der klinischen Anwendung von Knochenersatzmaterialien im Schädelbereich werden in der Literatur verschiedene Spätkomplikationen wie z.B. eine Knochenresorption (Honeybul et al. 2018), aseptische Knochennekrosen (Wermirzowsky 2016) oder eine unzureichende Heilung des Weichgewebes (Yeap et al. 2019) im Zeitraum von 10 bis 18 Monaten nach Implantation genannt. Diese Komplikationen konnten im vorliegenden Versuch nicht beobachtet werden.

6.1.1.3 Untersuchungsmethoden/Bildgebung

In der vorliegenden Arbeit erfolgte beim verwendeten Versuchsaufbau die Kombination unterschiedlicher Bildgebungsverfahren (2D: Hartgewebehistologie; 3D: μ CT). Durch die Kombination der beiden Verfahren konnten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Materialeigenschaften sowie zur Klärung unklarer Ergebnisse der Hartgewebehistologie gewonnen werden (Linde D. 2011). In der Literatur wird häufig eine solche Kombination beschrieben und angewendet (de Oliveira et al. 2015, Dall'Oca et al. 2017, Pae et al. 2018, Pihlman et al. 2018, Biguetti et al. 2018). Jedoch stellt die Histologie nach wie vor den Goldstandard dar und ist die am häufigsten angewendete Bildgebung zur Evaluation der Osseointegration im Schädelbereich (Delgado-Ruiz et al. 2015). Die im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Verfahren erwiesen sich als suffizient und komplementierten sich zueinander. Weiterhin wurden durch die Verknüpfung der Bildgebungen mehr quantitative Parameter (BV/TV, KIA und BIC) erfasst als bei den jeweils einzelnen Methoden.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Entwicklung der 3D-Auswertungsmethode

6.2.1.1 Einfluss der Scanbedingungen des μ CT auf die Segmentierung

Die Segmentierung war bei allen Materialien erschwert bzw. bei Titan nicht durchführbar. Ursächlich für die erschwerte Segmentierung war die eingeschränkte Bildqualität durch Artefakte, welche durch die Scanbedingungen des μ CT bedingt sind. Zu ähnlichen Schwierigkeiten hinsichtlich der Scanbedingungen aufgrund von Bildartefakten wird in der Literatur im prä- wie auch klinischen Anwendungsbereich berichtet (Buckwalter et al. 2011, Vandeweghe et al. 2013, Li et al. 2014, Choi et al. 2018).

Zur Lösung der o.g. Problematik existieren verschiedene Ansätze, die vor dem eigentlichen Scan (Scanbedingungen) und danach (Korrekturalgorithmen) ansetzen. Bezüglich der Scanbedingungen wurde zur Re-Evaluierung der Bildqualität der 3D-Datensätze deshalb mit angepassten Scanbedingungen gearbeitet. Hierbei fielen eine deutlich höhere örtliche Auflösung, bessere Kontraste sowie eine detaillierte Struktur des Knochens bzw. des Implantatkörpers bei allen untersuchten Materialien auf. Ursachen für die schlechteren

Bildqualitäten der Aufnahmen von 2013/2014 waren eine Herabsetzung der Scandauer für jede Schnittebene mit einer gleichzeitigen Reduktion der Gesamtanzahl. Zur Lösung hätte, wie in den neueren Scans erfolgt, eine längere Scandauer mit gleichzeitiger Erhöhung der Anzahl an Schnittebenen vorgenommen werden sollen. Ähnliche Scan-Einstellungen bei der Untersuchung von Titan-Implantaten nutzten auch (Narra N Fau - Antalainen et al. 2015, Choi et al. 2018).

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Bildqualität mittels Anpassung der Scanbedingungen ist die genauere Kalibrierung des Scanners bzw. dessen Einstellungen. Die Probekörper hätten vorher allein gescannt werden sollen (Li et al. 2014). Somit wäre eine materialspezifische Quantifizierung von Artefakten mittels Subtraktion erreicht worden (Li et al. 2014) und es hätten entsprechende Änderungen der Scan-Einstellungen vorgenommen werden können. Weiterhin kann durch die Art des Scanvorganges (spiralförmig anstatt radial) (Choi et al. 2018) oder Ausrichtung des zu scannenden Objektes in der Längsachse parallel zum Strahlengang (Li et al. 2014) eine Minimierung der Artefakte erreicht werden. Als eine kostenintensivere Variante zur Steigerung einer höchst möglichen Bildqualität wäre die Verwendung eines Synchrotron- μ CTs möglich (Bernhardt et al. 2012, Sarve et al. 2013).

Abgesehen von den Veränderungen der Scanbedingungen zur Steigerung der Bildqualität gibt es die Möglichkeit der Anwendung von mathematischen Algorithmen nach Abschluss des Scans. Diese finden Anwendung zur Reduktion der Artefakte, die durch Strahlaufhärtung, den Partialvolumeneffekt oder Overranging verursacht wurden (Choi et al. 2018). Diese artefaktminimierenden Algorithmen scheinen die subjektive und objektive Bildqualität zu verbessern ohne das quantitative Ergebnisse (negativ wie auch positiv) zu beeinflussen (Willemink et al. 2013, Queiroz et al. 2017b). Essentiell bei diesen Algorithmen ist, dass die μ CT-Scans als Rohdaten vorliegen. Bei Erstellung dieser Arbeit lagen die Rohversionen der μ CT-Scans nicht vor, daher konnten die in der Literatur beschriebenen Korrekturalgorithmen nicht für die Scans der vorliegenden Arbeit evaluiert werden.

6.2.1.2 Segmentierung der 3D-Daten

Die Schwierigkeiten einer automatisierten Segmentierung, beispielsweise aufgrund einer unzureichenden Scanqualität oder ähnlichen Grauwerten von Implantat und Knochen, wurden

in verschiedenen Publikationen beschrieben (Kang et al. 2015, Bissinger et al. 2017, Queiroz et al. 2017a, Irie et al. 2018, Pae et al. 2018).

Da diese Schwierigkeiten auch in der vorliegenden Arbeit auftraten, wurden in Zusammenarbeit mit Becker semiautomatische materialspezifische Segmentierungsalgorithmen entwickelt (Becker 2017). In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten zur semiautomatischen Segmentierung genannt. Einerseits erfolgt diese anhand der vorliegenden Texturen (Zhu und Wang 2012, Buch et al. 2015) oder indem die umgebenden Voxel mit ähnlichen Grauwerten in Zusammenhang gebracht und Cluster gebildet werden (Kang et al. 2015). Andererseits gibt es Verfahren, die auf vordefinierten Eigenschaften des Untersuchungsobjektes beruhen (z.B. morphologiebasiert, atlasbasiert) (Cabezas et al. 2011, Ghose et al. 2012, Kamal et al. 2018b). Diese beschriebenen Verfahren werden in dieser Arbeit nicht genutzt, da diese meist für eine spezielle Fragestellung entwickelt und an hohe Soft- und Hardwareanforderungen gebunden sind. Daher wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit die Entscheidung getroffen, die Segmentierung manuell, aber mit größtmöglicher technischer Unterstützung durchzuführen. Weiterhin war beim Composit und teilweise beim Polymer im mm- bzw. μm -Bereich eine starke Divergenz in der Form erkennbar, so dass hier keine automatische Formerkennung (z.B. Kreis, Zylinder) respektive morphologiebasierte Segmentierung angewendet werden konnte.

6.2.1.3 Entwicklung und Funktionsweise des Jahresring-Algorithmus

Eine Hauptproblematik für die Entwicklung des Algorithmus war die fehlende Funktion zur automatischen Erstellung von periimplantären ROIs in der vorliegenden Software Avizo[®] 9.4. Diese ROIs sollen den periimplantären Knochen in einzelne Jahresringe mit definierter Schichtdicke von der Implantatoberfläche bis zur maximalen Distanz einteilen. Andere Hersteller (z.B. VGSTUDIO MAX[®], Volume Graphics GmbH, Heidelberg; CTAN[®], Bruker microCT, Belgien) haben Möglichkeiten für dieses Auswertungsverfahren bereits implementiert. Deshalb wurde begonnen, dieses Verfahren mit den vorhandenen Tools in Avizo[®] zu entwickeln.

In der Literatur werden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen für die Erstellung von Jahresring-ähnlichen ROIs beschrieben (semiautomatisch und automatisch). Beim semiautomatischen Vorgehen (Bernhardt et al. 2012, Zeng et al. 2017, Maenz et al. 2017,

Bissinger et al. 2017, Offermanns et al. 2018) werden fest definierte konzentrische ROIs im jeweiligen Datensatz manuell angeordnet. Vorteilhaft ist hierbei die einheitliche Größe der ROI und dass keine Segmentierung notwendig ist.

Nachteilig ist die manuelle Ausrichtung der ROI im Datensatz. Hierbei besteht eine hohe Fehlerwahrscheinlichkeit. Weiterhin kann bei einer manuellen Ausrichtung z.B. keine exakte Trennung zwischen Implantat und Knochen vorgenommen werden. Bei Song et al. und Stadlinger et al. werden automatisch anhand der Abstände zwischen Implantat und Knochen sowie eines definierten Startpunktes (meistens der Implantatkörper) die entsprechenden ROIs erstellt und ausgewertet (Song et al. 2013, Stadlinger et al. 2013). Dies bietet den Vorteil einer guten Übersichtlichkeit der Daten. Gleichzeitig verringert sich durch diese Zusammenfassung die Abtastrate in der jeweiligen ROI. Dies kann dazu führen, dass möglicherweise signifikante Veränderungen nicht erfasst werden. In der vorliegenden Arbeit wurde sich für die automatische Vorgehensweise entschieden, da der feste Startpunkt und die Erstellung der ROI anhand der Implantatkontur als wichtige Faktoren angesehen wurden. Bezüglich des o.g. Nachteils einer zu geringen Abtastrate beim automatischen Lösungsansatz wurde sich am Nyquist-Theorem orientiert (Nyquist 1928). Dieses besagt, dass die Abtastrate mindestens das Doppelte der höchsten Frequenzkomponente betragen sollte. Im vorliegenden Fall bedeutet dies, dass die Schichtdicke einer ROI halbiert werden musste, damit signifikante Unterschiede hervortreten. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnis wurde für die ROI 1-3 eine Schichtdicke von 7,5 μm und ab der ROI 4 eine Schichtdicke von 15 μm gewählt.

Es wurde sich bei der weiteren Entwicklung des Jahresring-Algorithmus für eine maximale Entfernung von 742,5 μm entschieden. Eine identische Distanz verwendeten auch Song et al. und erreichten valide Ergebnisse (Song et al. 2013). Der Wert wurde gewählt, da sich aufgrund der Würfelform der Voxel mit zunehmender Entfernung zum Implantat die ROI von einer Ringform hin zu einem Rechteck bzw. Quadrat entwickeln. Dieses Phänomen basiert auf der Tatsache, dass nur die jeweilige Kontur des Implantates genutzt wird bzw. der würfelförmige Voxel soweit vergrößert wird, bis die Rundungen verschwinden und deutliche Kanten hervortreten. Im Rahmen dieser Arbeit trat dieses Phänomen bei einer Entfernung von ca. 1-1,5 mm von der Implantatoberfläche auf.

Nach Abschluss der Entwicklungsarbeit zur automatischen Erstellung der ROIs erfolgte die Definition der VOIs. Die entsprechende VOI sollte die einzelnen Jahresring-ROIs umfassen. In den oben genannten Arbeiten zur Erstellung von periimplantären ROIs (Bernhardt et al. 2012, Song et al. 2013, Stadlinger et al. 2013, Zeng et al. 2017, Maenz et al. 2017, Bissinger et al. 2017, Offermanns et al. 2018) wird die Erstellung der VOIs nach der jeweiligen Fragestellung direkt innerhalb des 3D-Visualisierungsprogrammes vorgenommen. Beim Jahresring-Algorithmus erfolgte die Erstellung der ROIs in Avizo® und die Zusammenfassung der VOIs erst in der statistischen Auswertung in SPSS, wodurch die VOIs je nach Fragestellung innerhalb der quantitativen Auswertungen, unabhängig von einem 3D-Visualisierungsprogramm und der entsprechenden Workstation angepasst werden konnten.

Die weitere Definition der VOI, d.h. die Schichtdicke, wurde anhand der Histologie festgelegt. In der Literatur sind Einteilungen bezüglich weiterer Parameter zu finden, bspw. nach anatomischen Aspekten (z.B. Meta- oder Diaphyse) (Alexander et al. 2018) anhand des Durchmessers des Defektes (Maenz et al. 2017) oder sie beziehen sich rein auf das degradierte Material (Martini et al. 2012). Da diese Aspekte im Rahmen der Arbeit nicht Bestandteil der Fragestellung waren, erfolgte die Definition anhand der Ergebnisse der Hartgewebhistologie.

Eine hervorzuhebende VOI ist hierbei die *VOI 2: bindegewebige Einscheidung und neu gebildeter Knochen*. Im Ergebnis der morphometrischen Auswertung histologischer Präparate aus vorhergehenden Implantationsversuchen nach dem Jenaer Schädelmodell wird in einer Entfernung von 7,5-82,5 µm weniger Knochen als in der davorliegenden und nachfolgenden Entfernung gemessen (Diebowski 2014). Deshalb sollte geprüft werden, ob sich in diesem Bereich auch bei den vorliegenden Implantationsexperimenten im Langzeitversuch Unterschiede zwischen den Implantationszeiträumen, den Implantatmaterialien und zu anderen VOIs zeigen. Diese Vorgehensweise wird bisher in keiner anderen Publikation beschrieben und sollte hier genutzt werden, um die Erkenntnisse der 2D-Bildgebung (z.B. bindegewebige Einscheidung) möglicherweise in der 3D-Bildgebung zu bestätigen. Hierbei weisen die BV/TV-Werte in der VOI 2 von allen Materialien wie auch über beide Verweildauern einen Anstieg auf, so dass die eingangs genannte Theorie eines knöchernen Umbaus bestätigt werden kann.

Ein Problem bei Einteilung der VOIs ist die Auswertung des BIC, da in Implantatnähe eine Über- oder Unterschätzung des BIC auftreten kann. Bernhardt et al. und Song et al. empfehlen deshalb, den BIC nicht mit dem ersten Voxel zu messen, sondern in einem definierten Abstand (z.B. 5 Voxel) zu beginnen (Bernhardt et al. 2012, Song et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der BIC direkt mit dem ersten Voxel gemessen, weil dies der Definition des BIC entspricht (Dempster et al. 2013). Die Definition der ersten drei Jahresringe mit einer Schichtdicke von jeweils 1 Voxel anzugeben, erwies sich in der weiteren Auswertung als vorteilhaft.

Dadurch konnte aufgrund der Differenzen der Werte zwischen μ CT und Hartgewebepathologie eine genauere Analyse durchgeführt werden. Bei der statistischen Untersuchung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen ersten drei Jahresringen, so dass die VOI *BIC* mit einem Voxel Schichtdicke beibehalten werden konnte.

6.2.2 3D-Auswertung mittels μ CT

Bei allen Implantatmaterialien sind in der Auswertung mittels Jahresring-Algorithmus materialspezifische Kurvenverläufe aufgefallen, die sich hinsichtlich der Höhe der Maxima und der Distanz zur Implantatoberfläche unterscheiden. Diese Kurven beschreiben den BV/TV in Abhängigkeit vom Abstand zur Implantatoberfläche und weisen in Implantatnähe einen steilen Anstieg auf, der sich nach dem Maximum um einen konstanten Wert stabilisiert. Diese Möglichkeit zur Quantifizierung des Knochens über den periimplantären Bereich hinaus beschreiben auch Wiskott et al. und Neldam et al. (Wiskott et al. 2008, Neldam et al. 2015). Zhou et al. wie auch de Oliveira et al. beschreiben ebenfalls unterschiedliche Kurvenverläufe bei der Darstellung des BV/TV für verschiedene Titanimplantate. Sie werten dies als Einfluss der modifizierten Implantatmaterialien mehrere Mikrometer über den direkten Knochen-Implantat-Kontakt hinaus (Zhou et al. 2019, de Oliveira et al. 2021). Da sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls unterschiedliche Werte und Kurvenverläufe in der 3D-Auswertung zwischen den verwendeten Materialien zeigten, ist ein ähnlicher Einfluss des Implantates über den direkten Knochen-Implantat-Kontakt hinaus denkbar.

6.2.3 Osseointegration der untersuchten Materialien

Das Composit (bestehend aus beta-TCP und dem Polymer Urethandimethacrylat (UDMA)) wies in beiden Untersuchungsmethoden den zweithöchsten BIC auf und zeigte in der 3D-Auswertung den höchsten BV/TV-Wert über die Gesamtdistanz. Diese Werte lagen wie bei Diebowski deutlich höher als bei den etablierten Materialien (Diebowski 2014). Tebyanian et al. sowie Pihlman et al. konnten ebenfalls höhere Knochenregenerationsraten bei aus beta-TCP und einem Polymer zusammengesetzten Compositen im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen nachweisen, (Pihlman et al. 2018, Tebyanian 2019). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene sehr gute Osseointegration des Composites im Schädelknochen wird im Folgenden anhand der zwei verschiedenen Komponenten beta-TCP und Polymer diskutiert.

Aus der Literatur ist eine sehr gute osteokonduktive Eigenschaft von beta-TCP bekannt (Ishack et al. 2017, Guillaume 2017, Dall'Oca et al. 2017, Böhner et al. 2020). Diese Eigenschaft beruht laut Böhner et al. darauf, dass das TCP, anders als z.B. Biokeramiken, keine Hydroxyapatitschicht zwischen Knochen und Material ausbildet und somit eine höhere Knochenanhaftung bzw. Osseointegration möglich ist. Weiterhin wird durch die Freisetzung von Calciumionen eine verstärkte Osteoklasten-vermittelte Resorption erreicht, welche die Ausprägung einer trabekulären Struktur erzielt (Böhner et al. 2020). Durch die unregelmäßige Oberflächenstruktur des beta-TCP mit der entsprechenden Mikrostruktur kommt es gleichzeitig zu einer guten Kontaktbildung des Knochens zum beta-TCP (Bacakova et al. 2011, Diebowski 2014, Ballo et al. 2014, Dall'Oca et al. 2017, Böhner et al. 2020).

Untersuchungen des Polymers UDMA allein zeigen den höchsten BIC in der Hartgewebepathologie. Somit ist das verwendete Polymer das am besten osseointegrierte Material in dieser Studie. Weiterhin war hierbei in Implantatnähe ein deutlicher Knochensaum erkennbar, welcher ebenfalls in der VOI 2 der 3D-Auswertung quantitativ messbar war. UDMA ist vergleichbar mit Methacrylat-Polymeren, da es sich um ein modifiziertes PMMA handelt. Entscheidend für die höheren BIC-Werte gegenüber dem Composit ist die herabgesetzte Hydrophobizität des Polymers gegenüber dem Composit. Diese beeinträchtigt die weitere Einheilung, da die Einwanderung knochenmorphogener Proteine (BMP) durch eine niedrigere Hydrophobizität erleichtert wird (Bacakova et al. 2011, Pae et al. 2018). Weiterhin findet laut Klopffleisch et al. mit

steigender Hydrophobizität und stärker strukturierter Oberfläche eine vermehrte Komplementaktivierung mit verstärkter Fibrose statt (Klopfleisch und Jung 2017). Dies könnte sich, wie in dieser Arbeit gezeigt, in einer reduzierten Osseointegration des Composites im Vergleich zum Polymer äußern. Weiterhin beschrieben Bohner et al., dass beim Autoklavieren von beta-TCP, wie es auch in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde, dies strukturell so verändert wird, dass eine Hydroxyapatitschicht ausgebildet wird. Diese sorgt für eine Reduktion der Knochenadsorption bzw. Osseointegration (Bohner et al. 2020).

Dall'Oca et al. beschrieben bei Polymeren aus PMMA sowie auch bei Compositen aus TCP und PMMA einen Umbauprozess der bindegewebigen, fibrotischen Kapsel hin zu Osteoiden (Dall'Oca et al. 2017). Das Polymer PMMA weist hierbei eine Ähnlichkeit mit dem in dieser Arbeit verwendeten Polymer aus Methacrylat-Monomeren auf. In den vorliegenden Ergebnissen ist dieser Umbauprozess in der Hartgewebepathologie anhand des, im Vergleich zum Composit, dünneren Knochensaums um das Polymer herum wie auch der 3D-Auswertung erkennbar und deckt sich so mit den Erkenntnissen von Dall'Oca et al.

Im Vergleich der beiden Bildgebungen sind beim Polymer niedrigere BIC-Werte in der 3D-Auswertung im Vergleich zur Histologie nachweisbar. Das kann an einer unzureichenden Segmentierung liegen, da aufgrund der Bilddatenqualität feinere Knochensäume durch den Segmentierungsalgorithmus nicht erfasst werden (Choi et al. 2018). Diese vor allem in Implantatnähe auftretenden dünnen Knochenstrukturen sind vermehrt in der qualitativen Auswertung der Hartgewebepathologie des Implantatmaterials Polymer feststellbar. Ähnliche Ergebnisse mit solch feinen Knochenstrukturen konnten Neldam et al. nachweisen. Auch hier zeigten sich die Knochensäume in der Histologie, nicht jedoch in der 3D-Auswertung, wodurch es bei letzterer auch hier zu einer Unterschätzung des BIC kam (Neldam et al. 2015).

Bioverit® als etabliertes Implantatmaterial zeigte geringere BIC-Werte in der 2D- und 3D-Auswertung als die neu entwickelten Materialien. Dies liegt an der tendenziellen Ausprägung einer Hydroxyapatitschicht bei Glaskeramiken wie Bioverit® (Smeets et al. 2018), die eine reduzierte Osseointegration verursacht (Bohner et al. 2020). In den Ergebnissen des Jahresring-Algorithmus war beim Material Bioverit® über der gesamten Distanz ein Abfall des BV/TV von 9 zu 18 Monaten messbar. Ähnliche Werte waren auch bei Offermanns et al. mit entsprechender Abnahme des BV/TV bei Titanimplantaten nach 3 Monaten erkennbar

(Offermanns et al. 2018). Da sich in der Histologie keine Zeichen einer Osteolyse fanden und die Werte zwischen der vorliegenden Arbeit und Offermanns et al. Ergebnissen sehr ähnlich sind, scheint diese Abnahme über eine längere Implantationsdauer physiologisch und beeinflusst nicht die Stabilität der Osseointegration. Beim Material Bioverit® wurde das höchste BV/TV-Maximum gemessen. Dies könnte ein Beleg für die sehr gute Langzeitstabilität des Bioverit® sein, welche auch in der Literatur beschrieben wird (Beleites et al. 2001, Siebert et al. 2006, Petridis et al. 2009). Aktuell gibt es keine direkten 3D-Auswertungen des Maximums bei Glaskeramiken, die zum Vergleich herangezogen werden könnten.

Titan wies ebenfalls geringere BIC-Werte gegenüber dem Composit bzw. Polymer und somit eine reduzierte Osseointegration auf. Laut Feller et. al sind schon kleinere Veränderungen an der Oberflächenstruktur (Mikrostrukturen, Oberflächenenergie usw.) ausschlaggebend für eine hohe Osseointegration bei Titanimplantaten (Feller et al. 2015). Klopffleisch et. al erwähnen zum Beispiel, dass eine glattere Oberfläche mit höherer Wahrscheinlichkeit eine Fremdkörperreaktion auslösen kann (Klopffleisch und Jung 2017). Weiterhin sollte die Mikrostruktur moderat grob strukturiert sein (Feller et al. 2015), um eine erhöhte Proteinadsorption zu ermöglichen (Klopffleisch und Jung 2017).

Zusammenfassend sind die Oberflächeneigenschaften des verwendeten Titans (glatte Oberflächenstruktur mit geringer Oberflächenenergie) eher nachteilig für eine vergleichsweise bessere Osseointegration wie beim Composit oder Polymer. Die 3D-Analyse mittels Jahresring-Algorithmus war aufgrund der eingeschränkten Bildqualität nicht möglich.

Weiterhin konnten zwischen Bioverit® und Titan signifikante Unterschiede des BIC in der Hartgewebepathologie nachgewiesen werden. Bioverit® schnitt um ca. 3-4% besser ab als Titan. Deutlich höhere quantitative Werte der Osseointegration wiesen Chaudhari et al (Chaudhari et al. 2011) sowie Chan et al (Chan et al. 2018) bei Biokeramiken (chemisch ähnlich dem Bioverit®) gegenüber Titan nach. Diese signifikanten Unterschiede lassen vermuten, dass Bioverit® eine bessere Osseointegration aufweist und daher für das Implantatlager Schädel geeigneter ist als Titan. Vergleicht man die Werte mit Messungen des BIC am Implantatlager Femur bzw. Tibia, so liegen die Werte für Titan und eine verwendete Glaskeramik deutlich höher (Munhoz et al. 2012, Palmquist et al. 2013 10, Sabareeswaran et al. 2013, de Molon et al. 2017). Ursächlich hierfür könnte die unterschiedliche Knochenumbaurate zwischen Schädelkalotte und Röhrenknochen sein. Li et al wiesen unterschiedliche Knochenregenerationsraten zwischen trabekulärem wie auch kompakten Knochen nach (Li et al. 2017). Sogar innerhalb des kompakten Schädelknochens waren laut Bigueti et al unterschiedlich Regenerationsraten zwischen dem *Os parietale* und der *Maxilla* nachweisbar (Bigueti et al. 2019).

Wie bereits bei den untersuchten Materialien Composit und Bioverit® beschrieben, unterscheiden sich die BIC-Werte von 2D- und 3D-Auswertung. Auch bei Gabler et al. und Sarve et al. zeigte sich ein höherer BIC in der 3D-Auswertung verglichen mit den 2D Ergebnissen aus der Histologie (Gabler et al. 2015, Sarve et al. 2013). Die Autoren sehen den Grund der Überschätzung des BIC in einer geringeren Auflösung der 3D-Bildgebung im Vergleich zur Histologie. Im Rahmen dieser Arbeit kann eine geringe Überschätzung des BIC durch die teils manuelle Segmentierung der o.g. Implantate aufgetreten sein, die aufgrund ähnlicher Grauwerte des umgebenden Knochen sowie der unregelmäßigen Kantenstrukturen erschwert war.

Auch wenn Bissinger und de Maria et al. statistisch keine Unterschiede in den Ergebnissen zwischen der 2D- und der 3D-Auswertung feststellen konnten und Bernhardt bzw. Vandeweghe et al. eine starke Korrelation der beiden bildgebenden Verfahren nachwiesen, sollte nach wie vor die Histologie als Goldstandard in der Implantologie und insbesondere im Schädelbereich erhalten bleiben (Bernhardt et al. 2012, Vandeweghe et al. 2013, Bissinger et al. 2017, de Faria Vasconcelos et al. 2017), da die Auswertung mittels 3D-Analyse noch systematische Fehlerquellen enthält. Beide bildgebenden Verfahren sollten als Ergänzung zueinander gesehen werden, so wie es auch in der Literatur beschrieben wird (Yeom et al. 2008, Draenert et al. 2012, de Oliveira et al. 2015). Die entsprechenden Vor- und Nachteile mit den entsprechenden Konsequenzen konnten im Rahmen dieser Arbeit erneut bestätigt werden und unterstützen die Kombination von zwei verschiedenen bildgebenden Verfahren zur besseren Auswertung der Osseointegration von Implantatmaterialien.

6.2.4 Vergleich von μ CT und Histologie

Bei Bioverit® als auch bei Composit zeigte die 2D-Messung mit HistoGap einen niedrigeren BIC als die 3D-Auswertung mit dem Jahresring-Algorithmus. Auch bei Gabler et al. Und Sarve et al. zeigte sich ein höherer BIC in der 3D-Auswertung verglichen mit den 2D Ergebnissen aus der Histologie (Gabler et al. 2015, Sarve et al. 2013). Die Autoren sehen den Grund der Überschätzung des BIC in einer geringeren Auflösung der 3D-Bildgebung im Vergleich zur Histologie. Im Rahmen dieser Arbeit kann eine geringe Überschätzung des BIC durch die teils manuelle Segmentierung der o.g. Implantate aufgetreten sein, die

aufgrund ähnlicher Grauwerte mit dem umgebenden Knochen sowie der unregelmäßigen Kantenstrukturen erschwert war.

Jedoch zeigten die beiden bildgebenden Verfahren annähernd gleichhohe Werte, so dass hier von keiner Überschätzung des BIC in der 3D-Auswertung ausgegangen wird.

Beim Polymer zeigte sich das umgekehrte Bild – hier lagen niedrigere BIC-Werte in der 3D-Auswertung im Vergleich zur Histologie vor. Das kann an einer unzureichenden Segmentierung liegen, da aufgrund der Bilddatenqualität feinere Knochensäume durch den Segmentierungseditor nicht erfasst werden (Choi et al. 2018). Diese vor allem in Implantatnähe auftretenden dünnen Knochenstrukturen sind vermehrt in der qualitativen Auswertung der Hartgewebepathologie des Implantatmaterials Polymer feststellbar. Ähnliche Ergebnisse mit solch feinen Knochenstrukturen konnten Neldam et al. nachweisen. Auch hier zeigten sich die Knochensäume in der Histologie, nicht jedoch in der 3D-Auswertung, wodurch es bei letzterer auch hier zu einer Unterschätzung des BIC kam (Neldam et al. 2015).

Auch wenn Bissinger und de Maria et al. statistisch keine Unterschiede in den Ergebnissen zwischen der 2D- und der 3D-Auswertung feststellen konnten und Bernhardt bzw. Vandeweghe et al. eine starke Korrelation der beiden bildgebenden Verfahren nachwiesen, sollte nach wie vor die Histologie als Goldstandard in der Implantologie und insbesondere im Schädelbereich erhalten bleiben (Bernhardt et al. 2012, Vandeweghe et al. 2013, Bissinger et al. 2017, de Faria Vasconcelos et al. 2017), da die Auswertung mittels 3D-Analyse noch systematische Fehlerquellen enthält. Beide bildgebenden Verfahren sollten als Ergänzung zueinander gesehen werden, so wie es auch in der Literatur beschrieben wird (Yeom et al. 2008, Draenert et al. 2012, de Oliveira et al. 2015). Die entsprechenden Vor- und Nachteile mit den entsprechenden Konsequenzen konnten im Rahmen dieser Arbeit erneut bestätigt werden und unterstützen die Kombination von zwei verschiedenen bildgebenden Verfahren zur besseren Auswertung der Osseointegration von Implantatmaterialien.

7. Schlussfolgerungen

In Zusammenschau der Ergebnisse bestätigte sich, dass die neuen Implantatmaterialien (Polymer und Composit) im Langzeitversuch biokompatibel, stabil und für das Implantatlager Schädelknochen geeignet sind. Gegenüber den bereits in der klinischen Praxis bewährten Implantatmaterialien (Bioverit[®], Titan) waren die neu entwickelten Materialien signifikant besser osseointegriert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Kombination von 2D-Bildgebung (Hartgewebephistologie) und 3D-Bildgebung (μ CT-Scans) nach wie vor unerlässlich ist. Wie in den Ergebnissen erkennbar war, weisen beide Methoden jeweils komplementäre Vor- und Nachteile auf. Durch Kombination der Ergebnisse der Bildgebungen in der Auswertung können die jeweiligen Nachteile ausgeglichen bzw. Messfehler erkannt werden. Deshalb sollte zur Beurteilung der Osseointegration möglichst die Anwendung beider bildgebenden Verfahren genutzt werden.

Die in der AG Biomateriallabor entwickelte histomorphometrische Software HistoGap konnte erfolgreich weiterentwickelt werden. Es wurde eine komplette Neu-Implementierung der Algorithmen realisiert, wodurch unter anderem entscheidende Verbesserungen hinsichtlich der Benutzerergonomie sowie der Konsistenz, Modalität und allgemeinen Stabilität der Software erreicht wurden. Somit kann diese Software auch außerhalb der vorliegenden Fragestellung für morphometrische Auswertungen genutzt werden. Weiterhin wurden damit die Voraussetzungen für die aktuelle Weiterentwicklung der Software vorangetrieben. Der Schwerpunkt liegt hier bei der Implementierung alternativer Mess-Modalitäten und eines Algorithmus zur automatischen Korrektur geometrischer Fehler bei Bildebenen, die in Bezug auf die Rotationsachse des zylindrischen Implantats verschoben bzw. gekippt sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin mit dem sogenannten Jahresring-Algorithmus erfolgreich ein neues Verfahren zur morphometrischen Auswertung von 3D- μ CT-Bilddaten entwickelt und als Software-Tool implementiert werden. Dieses liefert im Rahmen der Analyse der Knochenstruktur in der Umgebung des Implantats quantitative Aussagen zur Osseointegration über den BIC hinaus. Wesentlich dabei ist die Analyse des Partialvolumens des periimplantären Knochens in Abhängigkeit vom Abstand zur

Implantatoberfläche. Anhand des so normierten Parameters konnten auf übersichtliche Art vergleichbare quantitative Aussagen hinsichtlich verschiedener Fragestellungen, insbesondere zur Osseointegration gewonnen werden. Eine besondere Erkenntnis war, dass ein Einfluss des Implantatmaterials auf die Osseointegration auch über den direkten Knochen-Implantat-Kontakt hinaus nachweisbar war.

Potenziell limitierend für den Jahresring-Algorithmus ist die Qualität der segmentierten 3D-Bilddaten. Für die präzise, originalgetreue Segmentierung der 3D-Bilddaten ist wiederum eine adäquate Qualität der zugrundeliegenden μ CT-Scans eine unabdingbare Voraussetzung. Um hierbei ein optimales Ergebnis zu erhalten, sollten sowohl die Qualität der μ CT-Volumendatensätze (insbesondere hinsichtlich Ortsauflösung, Kontrast und Artefakte) als auch die Qualität der daraus erstellten segmentierten 3D-Daten kritisch geprüft werden. Bei diesen Kontrollen der Bildqualität ist empfehlenswert, durch Vergleiche mit korrespondierenden 2D-Histologie-Bildern den Bezug zum Goldstandard Hartgewebepathologie herzustellen.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- A. Rokn NM, B. Eslami, H. K. Abadi, M. Paknejad. 2012. Histologic Evaluation of Bone Healing Following Application of Anorganic Bovine Bone and β -tricalcium Phosphate in Rabbit Calvaria. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 9:35–40.
- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. 1981. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *International journal of oral surgery*, 10 (6):387-416.
- Alenezi A, Naito Y, Terukina T, Prananingrum W, Jinno Y, Tagami T, Ozeki T, Galli S, Jimbo R. 2018. Controlled release of clarithromycin from PLGA microspheres enhances bone regeneration in rabbit calvaria defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 106 (1):201-208.
- Alexander JJ, Sankaran JS, Seldeen KL, Thiyagarajan R, Jacob A, Quigg RJ, Troen BR, Judex S. 2018. Absence of complement factor H alters bone architecture and dynamics. *Immunobiology*, 223 (12):761-771.
- Aumüller G, Wennemuth G. 2017. Schädel (Cranium). In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzingler LJ, Zilch H-G, Hrsg. *Duale Reihe Anatomie. 4., aktualisierte Auflage* Aufl: Georg Thieme Verlag.
- Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol Adv*, 29 (6):739-767.
- Baino F, Novajra G, Miguez-Pacheco V, Boccaccini AR, Vitale-Brovarone C. 2016. Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 432:15-30.
- Ballo AM, Cekic-Nagas I, Ergun G, Lassila L, Palmquist A, Borchardt P, Lausmaa J, Thomsen P, Vallittu PK, Narhi TO. 2014. Osseointegration of fiber-reinforced composite implants: histological and ultrastructural observations. *Dent Mater*, 30 (12):e384-395.
- Barbeck M. 2017. Update: Allogene Knochenersatzmaterialien. *Zeitschrift für Implantologie, Parodontologie und Prothetik*, 7/8 2017.
- Becker M. 2017. Optimierung der Segmentierungsalgorithmen von präklinischen μ CT-Datensätzen unterschiedlicher Implantatmaterialien im Knochen: Ernst-Abbe-Hochschule Jena.
- Beleites E, Schneider G, Fried W, Schumann D, Linss W. 2001. 3-D-Referenzimplantate für den Gesichts- und Hirnschädel. *Deutsches Ärzteblatt*, 98 (5):244-248.
- Bernhardt R, Kuhlisch E, Schulz MC, Eckelt U, Stadlinger B. 2012. Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-histological sections and 3D-SRmicroCT slices. *Eur Cell Mater*, 23:237-247; discussion 247-238.
- Bigueti CC, Cavalla F, Tim CR, Saraiva PP, Orcini W, De Andrade Holgado L, Renno ACM, Matsumoto MA. 2019. Bioactive glass-ceramic bone repair associated or not with autogenous bone: a study of organic bone matrix organization in a rabbit critical-sized calvarial model. *Clin Oral Investig*, 23 (1):413-421.
- Bigueti CC, Cavalla F, Silveira EM, Fonseca AC, Vieira AE, Tabanez AP, Rodrigues DC, Trombone APF, Garlet GP. 2018. Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization. *J Appl Oral Sci*, 26:e20170601.

- Bissinger O, Probst FA, Wolff KD, Jeschke A, Weitz J, Deppe H, Kolk A. 2017. Comparative 3D micro-CT and 2D histomorphometry analysis of dental implant osseointegration in the maxilla of minipigs. *J Clin Periodontol*, 44 (4):418-427.
- Bohner M, Santoni BLG, Dobelin N. 2020. beta-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater*, 113:23-41.
- Bow A, Anderson DE, Dhar M. 2019. Commercially available bone graft substitutes: the impact of origin and processing on graft functionality. *Drug Metab Rev*, 51 (4):533-544.
- Brandt J, Henning S, Michler G, Hein W, Bernstein A, Schulz M. 2010. Nanocrystalline hydroxyapatite for bone repair: an animal study. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 21 (1):283-294.
- Bucchi C, Borie E, Arias A, Dias FJ, Fuentes R. 2016. Radiopacity of alloplastic bone grafts measured with cone beam computed tomography: An analysis in rabbit calvaria. *Bosn J Basic Med Sci*, 17 (1):61-66.
- Buch K, Fujita A, Li B, Kawashima Y, Qureshi MM, Sakai O. 2015. Using Texture Analysis to Determine Human Papillomavirus Status of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas on CT. *AJNR Am J Neuroradiol*, 36 (7):1343-1348.
- Buckwalter KA, Lin C, Ford JM. 2011. Managing postoperative artifacts on computed tomography and magnetic resonance imaging. *Semin Musculoskelet Radiol*, 15 (4):309-319.
- Cabezas M, Oliver A, Llado X, Freixenet J, Bach Cuadra M. 2011. A review of atlas-based segmentation for magnetic resonance brain images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 104 (3):e158-177.
- Cabraja M, Klein M, Lehmann TN. 2009. Long-term results following titanium cranioplasty of large skull defects. *Neurosurg Focus*, 26 (6):E10.
- Chan YH, Lew WZ, Lu E, Loretz T, Lu L, Lin CT, Feng SW. 2018. An evaluation of the biocompatibility and osseointegration of novel glass fiber reinforced composite implants: In vitro and in vivo studies. *Dent Mater*, 34 (3):470-485.
- Chaudhari A, Braem A, Vleugels J, Martens JA, Naert I, Cardoso MV, Duyck J. 2011. Bone tissue response to porous and functionalized titanium and silica based coatings. *PLoS One*, 6 (9):e24186.
- Chen H, Chevrier A Fau - Hoemann CD, Hoemann Cd Fau - Sun J, Sun J Fau - Picard G, Picard G Fau - Buschmann MD, Buschmann MD. Bone marrow stimulation of the medial femoral condyle produces inferior cartilage and bone repair compared to the trochlea in a rabbit surgical model. (1554-527X (Electronic)).
- Cho SY, Chae Sw Fau - Choi KW, Choi Kw Fau - Seok HK, Seok Hk Fau - Kim YC, Kim Yc Fau - Jung JY, Jung Jy Fau - Yang SJ, Yang Sj Fau - Kwon GJ, Kwon Gj Fau - Kim JT, Kim Jt Fau - Assad M, Assad M. 2013. Biocompatibility and strength retention of biodegradable Mg-Ca-Zn alloy bone implants. (1552-4981 (Electronic)).
- Choi JCA-Ohoo, Choi CAA-Ohoo, Yeo ILA-Ohoo. 2018. Spiral scanning imaging and quantitative calculation of the 3-dimensional screw-shaped bone-implant interface on micro-computed tomography. (2093-2278 (Print)).
- Dall'Oca C, Maluta T, Micheloni GM, Cengarle M, Morbioli G, Bernardi P, Sbarbati A, Degl'Innocenti D, Lavini F, Magnan B. 2017. The biocompatibility of bone cements: progress in methodological approach. *Eur J Histochem*, 61 (2):2673.
- de Faria Vasconcelos K, Dos Santos Corpas L, da Silveira BM, Laperre K, Padovan LE, Jacobs R, de Freitas PH, Lambrichts I, Boscolo FN. 2017. MicroCT assessment of bone microarchitecture in implant sites reconstructed with autogenous and xenogenous grafts: a pilot study. *Clin Oral Implants Res*, 28 (3):308-313.

- de Molon RS, Sakakura CE, Faeda RS, Sartori R, Palhares D, Margonar R, Marcantonio E, Jr. 2017. Effect of the long-term administration of Cyclosporine A on bone healing around osseointegrated titanium implants: A histomorphometric study in the rabbit tibia. *Microsc Res Tech*, 80 (9):1000-1008.
- de Oliveira KMH, da Silva RAB, Küchler EC, de Queiroz AM, Nelson Filho P, da Silva LAB. 2015. Correlation Between Histomorphometric and Micro-computed Tomography Analysis of Periapical Lesions in Mice Model. *Ultrastructural pathology*, 39 (3):187-191.
- de Oliveira P, de Melo Soares MS, Silveira ESAMM, Taba M, Jr., Palioto DB, Messoria MR, Ghiraldini B, Nunes FAS, de Souza SLS. 2021. Influence of nano-hydroxyapatite coating implants on gene expression of osteogenic markers and micro-CT parameters. An in vivo study in diabetic rats. *J Biomed Mater Res A*, 109 (5):682-694.
- Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. 2015. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res*, 26 (8):915-930.
- Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. 2013. Standardized Nomenclature, Symbols, and Units for Bone Histomorphometry: A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 28 (1):2-17.
- Diebowski S. 2014. Kombination von μ CT und Hartgewebeshistologie bei der Auswertung von in-vivo Untersuchungen an Knochenersatzmaterialien für den Schädelbereich [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Donath K, Breuner G. 1982. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 11 (4):318-326.
- Doro DH, Grigoriadis AE, Liu KJ. 2017. Calvarial Suture-Derived Stem Cells and Their Contribution to Cranial Bone Repair. *Front Physiol*, 8:956.
- Draenert ME, Draenert AI, Forriol F, Erler M, Kunzelmann KH, Hickel R, Draenert K. 2012. Value and limits of μ -CT for nondemineralized bone tissue processing. *Microscopy Research and Technique*, 75 (4):416-424.
- Dumas JE, Davis T Fau - Holt GE, Holt Ge Fau - Yoshii T, Yoshii T Fau - Perrien DS, Perrien Ds Fau - Nyman JS, Nyman Js Fau - Boyce T, Boyce T Fau - Guelcher SA, Guelcher SA. Synthesis, characterization, and remodeling of weight-bearing allograft bone/polyurethane composites in the rabbit. (1878-7568 (Electronic)).
- Feller L, Jadwat Y, Khammissa RA, Meyerov R, Schechter I, Lemmer J. 2015. Cellular responses evoked by different surface characteristics of intraosseous titanium implants. *Biomed Res Int*, 2015:171945.
- Gabler C, Zietz C, Bieck R, Gohler R, Lindner T, Haenle M, Finke BA-O, Meichsner J, Testrich H, Nowotnick M, Frerich B, Bader RA-O. 2015. Quantification of osseointegration of plasma-polymer coated titanium alloyed implants by means of microcomputed tomography versus histomorphometry. (2314-6141 (Electronic)).
- Garrel T, Gotzen L. 1998. Allogene Knochen- transplantation und Knochenbanking. *Unfallchirurg*, 101.
- Gavazzoni A, Filho LI, Hernandez L. 2018. Analysis of bone formation and membrane resorption in guided bone regeneration using deproteinized bovine bone mineral versus calcium sulfate. *J Mater Sci Mater Med*, 29 (11):167.
- Ghose S, Oliver A, Marti R, Llado X, Vilanova JC, Freixenet J, Mitra J, Sidibe D, Meriaudeau F. 2012. A survey of prostate segmentation methodologies in ultrasound, magnetic resonance and computed tomography images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 108 (1):262-287.

- Goiato MC, Anchieta RB, Pita MS, dos Santos DM. 2009. Reconstruction of Skull Defects: Currently Available Materials. *Journal of Craniofacial Surgery*, 20 (5):1512-1518.
- Gramanzini M, Gargiulo S, Zarone F, Megna R, Apicella A, Aversa R, Salvatore M, Mancini M, Sorrentino R, Brunetti A. 2016. Combined microcomputed tomography, biomechanical and histomorphometric analysis of the peri-implant bone: a pilot study in minipig model. *Dent Mater*, 32 (6):794-806.
- Guillaume B. 2017. Filling bone defects with beta-TCP in maxillofacial surgery: A review. *Morphologie*, 101 (334):113-119.
- Honeybul S, Morrison DA, Ho KM, Lind CRP, Geelhoed E. 2018. A randomised controlled trial comparing autologous cranioplasty with custom-made titanium cranioplasty: long-term follow-up. *Acta Neurochir (Wien)*, 160 (5):885-891.
- Irie MS, Rabelo GD, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges JS, Soares PBF. 2018. Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. *Brazilian Dental Journal*, 29 (3):227-238.
- Ishack S, Mediero A, Wilder T, Ricci JL, Cronstein BN. 2017. Bone regeneration in critical bone defects using three-dimensionally printed beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffolds is enhanced by coating scaffolds with either dipyrindamole or BMP-2. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105 (2):366-375.
- Kamal M, Gremse F, Rosenhain S, Bartella AK, Holzle F, Kessler P, Lethaus B. 2018a. Comparison of Bone Grafts From Various Donor Sites in Human Bone Specimens. *J Craniofac Surg*, 29 (6):1661-1665.
- Kamal M, Andersson L, Al-Asfour A, Bartella AK, Gremse F, Rosenhain S, Gabato S, Holzle F, Kessler P, Lethaus B. 2018b. Bone regeneration in rabbit calvarial critical-sized defects filled with composite in situ formed xenogenic dentin and biphasic tricalcium phosphate/hydroxyapatite mixture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.
- Kang SW, Lee WJ, Choi SC, Lee SS, Heo MS, Huh KH, Kim TI, Yi WJ. 2015. Volumetric quantification of bone-implant contact using micro-computed tomography analysis based on region-based segmentation. *Imaging Sci Dent*, 45 (1):7-13.
- Khoury J, Selezneva I, Pestov S, Tarassov V, Ermakov A, Mikheev A, Lazov M, Kirkpatrick SR, Shashkov D, Smolkov A. 2019. Surface bioactivation of PEEK by neutral atom beam technology. *Bioact Mater*, 4:132-141.
- Kim BJ, Hong KS, Park KJ, Park DH, Chung YG, Kang SH. 2012. Customized cranioplasty implants using three-dimensional printers and polymethyl-methacrylate casting. *J Korean Neurosurg Soc*, 52 (6):541-546.
- Kloppfleisch R, Jung F. 2017. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *J Biomed Mater Res A*, 105 (3):927-940.
- Laird NM, Ware JH. 1982. Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics*, 38 (4):963-974.
- Leao RS, Maior JRS, Lemos CAA, Vasconcelos B, Montes M, Pellizzer EP, Moraes SLD. 2018. Complications with PMMA compared with other materials used in cranioplasty: a systematic review and meta-analysis. *Braz Oral Res*, 32:e31.
- Lee SC, Wu CT, Lee ST, Chen PJ. 2009. Cranioplasty using polymethyl methacrylate prostheses. *J Clin Neurosci*, 16 (1):56-63.
- Lethaus B, ter Laak MP, Laeven P, Beerens M, Koper D, Poukens J, Kessler P. 2011. A treatment algorithm for patients with large skull bone defects and first results. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 39 (6):435-440.
- Lethaus B, Safi Y Fau - ter Laak-Poort M, ter Laak-Poort M Fau - Kloss-Brandstätter A, Kloss-Brandstätter A Fau - Banki F, Banki F Fau - Robbenmenke C, Robbenmenke C Fau - Steinseifer U, Steinseifer U Fau - Kessler P, Kessler P. 2012. Cranioplasty with

- customized titanium and PEEK implants in a mechanical stress model. (1557-9042 (Electronic)).
- Li J, Yin X, Huang L, Mouraret S, Brunski JB, Cordova L, Salmon B, Helms JA. 2017. Relationships among Bone Quality, Implant Osseointegration, and Wnt Signaling. *J Dent Res*, 96 (7):822-831.
- Li JY, Pow EH, Zheng LW, Ma L, Kwong DL, Cheung LK. 2014. Quantitative analysis of titanium-induced artifacts and correlated factors during micro-CT scanning. *Clin Oral Implants Res*, 25 (4):506-510.
- Lima JLO, Sendyk DI, Sendyk WR, Polo CI, Correa L, Deboni MCZ. 2018. Growth Dynamic of Allogeneic and Autogenous Bone Grafts in a Vertical Model. *Braz Dent J*, 29 (4):325-334.
- Linde D. SG. 2011. Evaluierung von Implantatmaterialien mit dem "Jenaer Schädelmodell": Mikro-CT und Hartgewebephistologie [Poster]. Gießen: BioNanoMaterials (2011) 12(1-4).
- Lindstrom MJ, Bates DM. 1988. Newton-Raphson and Em Algorithms for Linear Mixed-Effects Models for Repeated-Measures Data. *Journal of the American Statistical Association*, 83 (404):1014-1022.
- Lüllmann-Rauch R, Asan E. 2019. Knochenentwicklung. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, Hrsg. Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage Aufl: Georg Thieme Verlag.
- Maenz S, Brinkmann O, Kunisch E, Horbert V, Gunnella F, Bischoff S, Schubert H, Sachse A, Xin L, Gunster J, Illerhaus B, Jandt KD, Bossert J, Kinne RW, Bungartz M. 2017. Enhanced bone formation in sheep vertebral bodies after minimally invasive treatment with a novel, PLGA fiber-reinforced brushite cement. *Spine J*, 17 (5):709-719.
- Martini L, Staffa G, Giavaresi G, Salamanna F, Parrilli A, Serchi E, Pressato D, Arcangeli E, Fini M. 2011. Long-Term Results following Cranial Hydroxyapatite Prosthesis Implantation in a Large Skull Defect Model. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 129 (4):625-635.
- Martini L, Staffa G, Giavaresi G, Salamanna F, Parrilli A, Serchi E, Pressato D, Arcangeli E, Fini M. 2012. Long-term results following cranial hydroxyapatite prosthesis implantation in a large skull defect model. *Plast Reconstr Surg*, 129 (4):625e-635e.
- Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. 2009. Biology of implant osseointegration. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 9 (2):61-71.
- Mclean RA, Sanders WL, Stroup WW. 1991. A Unified Approach to Mixed Linear-Models. *American Statistician*, 45 (1):54-64.
- Miguez-Pacheco V, Hench LL, Boccaccini AR. 2015. Bioactive glasses beyond bone and teeth: emerging applications in contact with soft tissues. *Acta Biomater*, 13:1-15.
- Montazerian M, Dutra Zanotto E. 2016. History and trends of bioactive glass-ceramics. *J Biomed Mater Res A*, 104 (5):1231-1249.
- Munhoz EA, Bodanezi A, Cestari TM, Taga R, de Carvalho PS, Ferreira O, Jr. 2012. Long-term rabbits bone response to titanium implants in the presence of inorganic bovine-derived graft. *J Biomater Appl*, 27 (1):91-98.
- Narra N Fau - Antalainen A-K, Antalainen Ak Fau - Zipprich H, Zipprich H Fau - Sándor GK, Sándor Gk Fau - Wolff J, Wolff J. 2015. Microcomputed tomography-based assessment of retrieved dental implants. (1942-4434 (Electronic)).
- Neldam CA, Lauridsen T, Rack A, Lefolii TT, Jorgensen NR, Feidenhans'l R, Pinholt EM. 2015. Application of high resolution synchrotron micro-CT radiation in dental implant osseointegration. *J Craniomaxillofac Surg*, 43 (5):682-687.

- Neldam CA, Sporning J, Rack A, Lauridsen T, Hauge EM, Jorgensen HL, Jorgensen NR, Feidenhansl R, Pinholt EM. 2017. Synchrotron radiation muCT and histology evaluation of bone-to-implant contact. *J Craniomaxillofac Surg*, 45 (9):1448-1457.
- Neovius E, Engstrand T. 2010. Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 63 (10):1615-1623.
- Nyquist H. 1928. Certain Topics in Telegraph Transmission Theory. *Transactions of the American Institute of Electrical Engineers*, 47 (2):617-644.
- Offermanns V, Andersen OZ, Riede G, Sillassen M, Jeppesen CS, Almtoft KP, Talasz H, Ohman-Magi C, Lethaus B, Tolba R, Kloss F, Foss M. 2018. Effect of strontium surface-functionalized implants on early and late osseointegration: A histological, spectrometric and tomographic evaluation. *Acta Biomater*, 69:385-394.
- Pae HC, Kang JH, Cha JK, Lee JS, Paik JW, Jung UW, Kim BH, Choi SH. 2018. 3D-printed polycaprolactone scaffold mixed with beta-tricalcium phosphate as a bone regenerative material in rabbit calvarial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*.
- Palmquist A, Snis A, Emanuelsson L, Browne M, Thomsen P. 2013. Long-term biocompatibility and osseointegration of electron beam melted, free-form-fabricated solid and porous titanium alloy: Experimental studies in sheep. *Journal of Biomaterials Applications*, 27 (8):1003-1016.
- Parsa A, Ibrahim N Fau - Hassan B, Hassan B Fau - van der Stelt P, van der Stelt P Fau - Wismeijer D, Wismeijer D. 2015. Bone quality evaluation at dental implant site using multislice CT, micro-CT, and cone beam CT. (1600-0501 (Electronic)).
- Petridis AK, Barth H, Doukas A, Mehdorn HM. 2009. Broken bioceramic used in a computer-assisted reconstruction of the frontal skull bone. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16 (8):1089-1090.
- Piazza M, Grady MS. 2017. Cranioplasty. *Neurosurg Clin N Am*, 28 (2):257-265.
- Pihlman H, Keranen P, Paakinaho K, Linden J, Hannula M, Manninen IK, Hyttinen J, Manninen M, Laitinen-Vapaavuori O. 2018. Novel osteoconductive beta-tricalcium phosphate/poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) scaffold for bone regeneration: a study in a rabbit calvarial defect. *J Mater Sci Mater Med*, 29 (10):156.
- Piitulainen JM, Kauko T, Aitasalo KMJ, Vuorinen V, Vallittu PK, Posti JP. 2015. Outcomes of Cranioplasty with Synthetic Materials and Autologous Bone Grafts. *World Neurosurgery*, 83 (5):708-714.
- Platzer W, Shiozawa T. 2018. Schädel. In: Platzer W, Shiozawa T, Hrsg. *Taschenatlas Anatomie, Band 1: Bewegungsapparat. 12., aktualisierte Auflage Aufl: Georg Thieme Verlag*.
- Posti JP, Piitulainen JM, Hupa L, Fagerlund S, Frantzen J, Aitasalo KMJ, Vuorinen V, Serlo W, Syrjanen S, Vallittu PK. 2015. A glass fiber-reinforced composite - bioactive glass cranioplasty implant: A case study of an early development stage implant removed due to a late infection. *J Mech Behav Biomed Mater*, 55:191-200.
- Punchak M, Chung LK, Lagman C, Bui TT, Lazareff J, Rezzadeh K, Jarrahy R, Yang I. 2017. Outcomes following polyetheretherketone (PEEK) cranioplasty: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Neurosci*, 41:30-35.
- Queiroz PM, Rovaris K, Santaella GM, Haiter-Neto F, Freitas DQ. 2017a. Comparison of automatic and visual methods used for image segmentation in Endodontics: a microCT study. *Journal of Applied Oral Science*, 25 (6):674-679.
- Queiroz PM, Rovaris K, Gaeta-Araujo H, Bueno SMD, Freitas DQ, Groppo FC, Haiter-Neto F. 2017b. Influence of Artifact Reduction Tools in Micro-computed Tomography Images for Endodontic Research. *Journal of Endodontics*, 43 (12):2108-2111.

- Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, Tomsia AP. 2011. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater*, 7 (6):2355-2373.
- Sabareeswaran A, Basu B, Shenoy SJ, Jaffer Z, Saha N, Stamboulis A. 2013. Early osseointegration of a strontium containing glass ceramic in a rabbit model. *Biomaterials*, 34 (37):9278-9286.
- Sarve H, Friberg B Fau - Borgefors G, Borgefors G Fau - Johansson CB, Johansson CB. 2013. Introducing a novel analysis technique for osseointegrated dental implants retrieved 29 years postsurgery. (1708-8208 (Electronic)).
- Schneider G. 1998. Zur Osteoinduktion und Korrosion bei Implantation der Glaskeramik Bioverit - eine tierexperimentelle Studie Jena: Friedrich Schiller Universität.
- Schneider G. 2003. Bioimplantate - Eigenschaften und Anwendungshinweise. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 82 (12):839-852.
- Schneider G, Blechschmidt K, Linde D, Litschko P, Körbs T, Beleites E. 2010. Bone regeneration with glass ceramic implants and calcium phosphate cements in a rabbit cranial defect model. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 21 (10):2853-2859.
- Siebert H, Schleier P, Beinemann J, Fried W, Zenk W, Schumann D. 2006. Evaluierung individueller, in der CAD/CAM-Technik gefertigter Bioverit-Keramik-Implantate zur Wiederherstellung mehrdimensionaler kraniofazialer Defekte am menschlichen Schädel. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 10 (3):185-191.
- Smeets R, Henningsen A, Grubeanu D, Sikken S, Gaudin R. 2017. Allogene Knochenersatzmaterialien. *Der Freie Zahnarzt*, 61 (9):74-82.
- Smeets R, Arnhold S, Henningsen A, Jung O, Barbeck M, Schnettler R, Wenisch S. 2018. Knochenersatzmaterialien. *wissen kompakt*, 12 (2):55-64.
- Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Choi SH. 2010. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci*, 40 (4):180-187.
- Song JW, Cha JY, Bechtold TE, Park YC. 2013. Influence of peri-implant artifacts on bone morphometric analysis with micro-computed tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 28 (2):519-525.
- Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. 2012. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*, 7 (10):1918-1929.
- Stadlinger B, Korn P, Tödtmann N, Eckelt U, Range U, Bürki A, Ferguson SJ, Kramer I, Kautz A, Schnabelrauch M, Kneissel M, Schlottig F. 2013. Osseointegration of biochemically modified implants in an osteoporosis rodent model. *Eur Cell Mater*, 25:326-340; discussion 339-340.
- Strecker A. 2016. Morphometrische Bewertung von 2D-Bilddaten: Hartgewebeshistologien aus in-vivo Experimenten zur präklinischen Bewertung von Knochenersatzmaterialien: Ernst-Abbe-Hochschule Jena.
- Takauti CA, Futema F, Brito Junior RB, Abrahao AC, Costa C, Queiroz CS. 2014. Assessment of bone healing in rabbit calvaria grafted with three different biomaterials. *Braz Dent J*, 25 (5):379-384.
- Tebyanian H, Norahan, M. H., Eyni, H., Movahedin, M., Mortazavi, S. J., Karami, A., Nourani, M. R., & Baheiraei, N. 2019. Effects of collagen/ β -tricalcium phosphate bone graft to regenerate bone in critically sized rabbit calvarial defects. *Journal of applied biomaterials & functional materials*, 17(1).
- Turgut G, Özkaya Ö Fau - Kayali MU, Kayali MU. 2010. Computer-aided design and manufacture and rapid prototyped polymethylmethacrylate reconstruction. (1536-3732 (Electronic)).

- van de Vijfeijken S, Munker T, Spijker R, Karssemakers LHE, Vandertop WP, Becking AG, Ubbink DT, CranioSafe G. 2018. Autologous Bone Is Inferior to Alloplastic Cranioplasties: Safety of Autograft and Allograft Materials for Cranioplasties, a Systematic Review. *World Neurosurg*, 117:443-452 e448.
- Vandeweghe S, Coelho PG, Vanhove C, Wennerberg A, Jimbo R. 2013. Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: a comparison with histomorphometry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 101 (7):1259-1266.
- Voigt S, Schneider G. 2009. Das Jenaer Schädelmodell. *Biomaterialien*, 10 (3/4):151.
- Wancket LM. 2015. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Vet Pathol*, 52 (5):842-850.
- Wierzmirzowsky K. 2016. Schädeldachplastiken: Vergleich zwischen freihand-modellierten PMMA- und computergestützt hergestellten Titan-Implantaten.
- Wiącek AE, Terpiłowski K, Jurak M, Worzakowska M. 2016. Effect of low-temperature plasma on chitosan-coated PEEK polymer characteristics. *European Polymer Journal*, 78:1-13.
- Wiggins A, Austerberry R, Morrison D, Ho KM, Honeybul S. 2013. Cranioplasty with custom-made titanium plates--14 years experience. *Neurosurgery*, 72 (2):248-256; discussion 256.
- Willeminck MJ, Leiner T, de Jong PA, Heer LM, Nievelstein RAJ, Schilham AMR, Budde RPJ. 2013. Iterative reconstruction techniques for computed tomography part 2: initial results in dose reduction and image quality. *European Radiology*, 23 (6):1632-1642.
- Williams DF. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29 (20):2941-2953.
- Wind JJ, Ohaegbulam C, Iwamoto FM, Black PM, Park JK. 2013. Immediate titanium mesh cranioplasty for treatment of posteraniotomy infections. *World Neurosurg*, 79 (1):207 e211-203.
- Wiskott HW, Cugnani J, Scherrer SS, Ammann P, Botsis J, Belser UC. 2008. Bone reactions to controlled loading of endosseous implants: a pilot study. *Clin Oral Implants Res*, 19 (11):1093-1102.
- Yeap MC, Tu PH, Liu ZH, Hsieh PC, Liu YT, Lee CY, Lai HY, Chen CT, Huang YC, Wei KC, Wu CT, Chen CC. 2019. Long-Term Complications of Cranioplasty Using Stored Autologous Bone Graft, Three-Dimensional Polymethyl Methacrylate, or Titanium Mesh After Decompressive Craniectomy: A Single-Center Experience After 596 Procedures. *World Neurosurg*, 128:e841-e850.
- Yeom H, Blanchard S, Kim S, Zunt S, Chu TMG. 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.
- Zanotti B, Zingaretti N, Verlicchi A, Robiony M, Alfieri A, Parodi PC. 2016. Cranioplasty: Review of Materials. *J Craniofac Surg*, 27 (8):2061-2072.
- Zeng N, van Leeuwen AC, Grijpma DW, Bos RR, Kuijer R. 2017. Poly(trimethylene carbonate)-based composite materials for reconstruction of critical-sized cranial bone defects in sheep. *J Craniomaxillofac Surg*, 45 (2):338-346.
- Zhang Q, Wu W, Qian C, Xiao W, Zhu H, Guo J, Meng Z, Zhu J, Ge Z, Cui W. 2019. Advanced biomaterials for repairing and reconstruction of mandibular defects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 103:109858.
- Zhao H, Feng J, Ho TV, Grimes W, Urata M, Chai Y. 2015. The suture provides a niche for mesenchymal stem cells of craniofacial bones. *Nat Cell Biol*, 17 (4):386-396.
- Zhou W, Tangl S, Reich KM, Kirchweiger F, Liu Z, Zechner W, Ulm C, Rausch-Fan X. 2019. The Influence of Type 2 Diabetes Mellitus on the Osseointegration of Titanium

Implants With Different Surface Modifications-A Histomorphometric Study in High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Treated Rats. *Implant Dent*, 28 (1):11-19.

Zhu CR, Wang RS. 2012. Local multiple patterns based multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification. *Information Sciences*, 187:93-108.

9. Anhang

9.1 Histologie

9.1.1 Hartgewebe-Histologie nach der Trenn-Dünnschliff-Technik von Donath

1. Proben mindestens 7-14Tage in 5% Formaldehyd einlegen
2. Entwässerung der Proben in der aufsteigenden Alkoholreihe je nach Größe jeweils 2 bis 3 Tage in 50 %, 70 %, 80 %, 96 % und zweimal für 2 Tage in 100 % Ethanol
3. Infiltration der Proben in lichtundurchlässigen Gefäßen für 2-3 Tage mit Ethanol- Technovit[®] -7200-Gemisch 1:1 und anschließend 3 Tage mit Technovit 7200
4. Einbetten in Technovit[®] 7200 und Polymerisation mit dem EXAKT 520-Lichtpolymerisationsgerät (jeweils 4 Stunden bei niedriger Lichtintensität (gelbes Licht) und anschließend 6 Stunden bei hoher Lichtintensität (blaues Licht))
5. die ausgehärteten Technovit[®] -Blöcke mit der Probe auf einen Objektträger unter einer EXAKT 402-Präzisionsklebepresse für 15 min mit Druck und Blaulicht kleben
6. Block mit dem EXAKT 300-Diamantbandsäge an der gewünschten Schnittstelle absägen
7. Schnittflächen mit EXAKT 400 CS-Tellerschleifgerät (Mikroschleifsystem) planschleifen
8. die Schichtdicke des Präparats messen und einen neuen Objektträger mit Technovit[®] 7210 aufkleben
9. die Schichtdicke des Klebers ermitteln und anschließend erfolgt die Herstellung eines

neuen Schliff mit der EXAKT-Diamantbandsäge mit einer Schichtdicke von 200 - 300 µm

10. die Herstellung des Dünnschliffs erfolgt mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem stufenweise mit Schleifpapier unterschiedlicher Körnungen (320, 500, 800, 1000, 1200)
11. Polieren der Dünnschliffe auf eine Schichtdicke zwischen 5 - 15 µm mit Polierpapier (4000)
12. Färbung der Schliffpräparate mit Hämatoxylin-Eosin oder modifizierter Masson-Goldner nach Protokoll

9.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

1. Schliffe mit 1:1 Aceton/Ethanol-Gemisch abwischen, Proben in Hämatoxylin für 20 - 30 min einlegen
2. Proben in Hämatoxylin für 35 min einlegen
3. Spülen in Aqua dest. für 1 min
4. Spülen unter fließendem Leitungswasser für 15 min
5. Spülen mit Aqua dest. für 1 min
6. Färben in 0,5%iger Eosin-G-Lösung für 7 min
7. Kurzes Spülen mit Leitungswasser
8. Entwässern über die aufsteigende Alkoholreihe (80-96-100%) jeweils für 1 - 2 min
9. kurz in Roti -Histol[®] schwenken
10. Eindeckeln des Dünnschliffs mit Roti -Histokitt[®]

9.1.3 Modifizierte Masson-Goldner-Färbung

1. Schliffe mit 1:1 Aceton/Ethanol-Gemisch abwischen
2. In Hämatoxylin für 35min einlegen
3. Spülen in Aqua dest. für 1 min
4. In Ponceau-Säurefuchsin für 20 min einlegen
5. Kurz in Aqua dest. einlegen
6. In 1%ige Essigsäure für 1min einlegen
7. In Phosphorwolframsäure-Orange-G für 20min einlegen
8. Kurz in Aqua dest. einlegen
9. In 1%ige Essigsäure für 1 min einlegen
10. In Anilinblau-Orange-Eisessig für 8min einlegen
11. in Aqua dest. spülen
12. Entwässern über die aufsteigende Alkoholreihe (80-96-100%) jeweils für 1-2 min
13. kurz in Roti -Histol[®] schwenken
14. Eindeckeln des Dünnschliffs mit Roti -Histokitt[®]

9.1.4 Referenzbilder für die qualitative Auswertung der Histologien

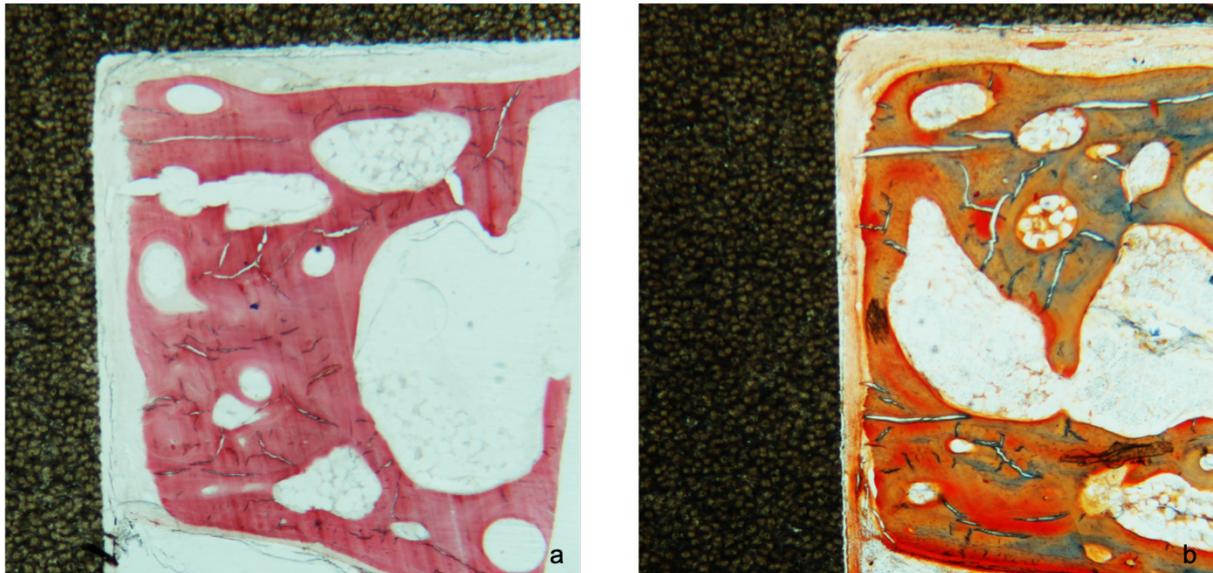


Abb. 34: Hartgewebehistologie des Implantatkörpers aus Bioverit® mit Score-Werten von 1 beim BIC, dem neugebildeten Knochen sowie dem Bindegewebe, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

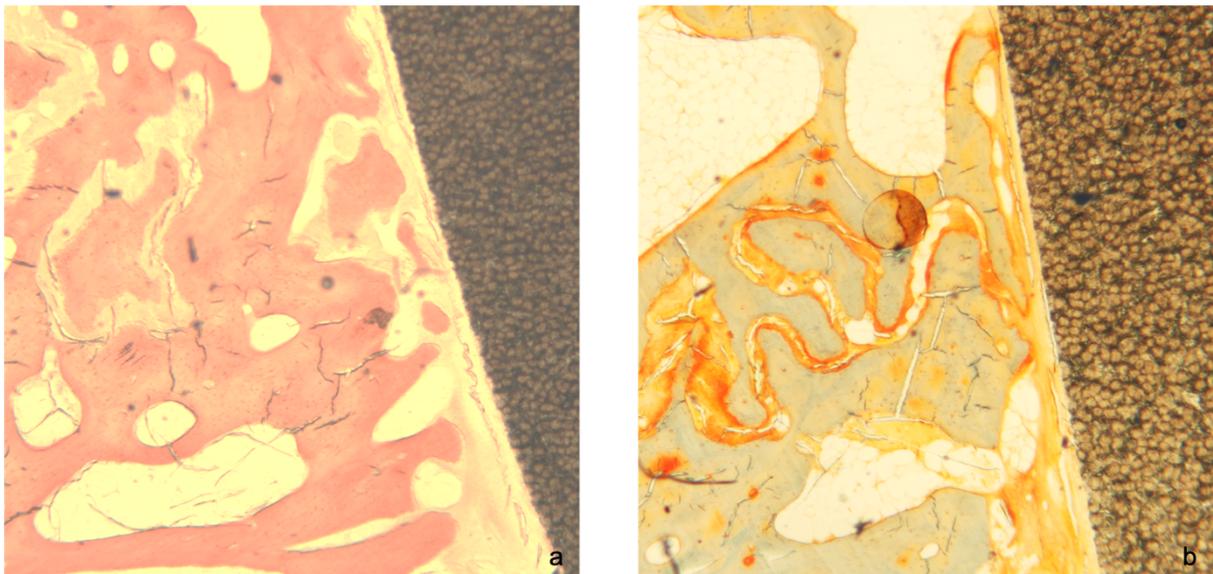


Abb. 35: Hartgewebehistologie des Implantatkörpers aus Bioverit® mit Score-Werten von 2 beim BIC sowie dem neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

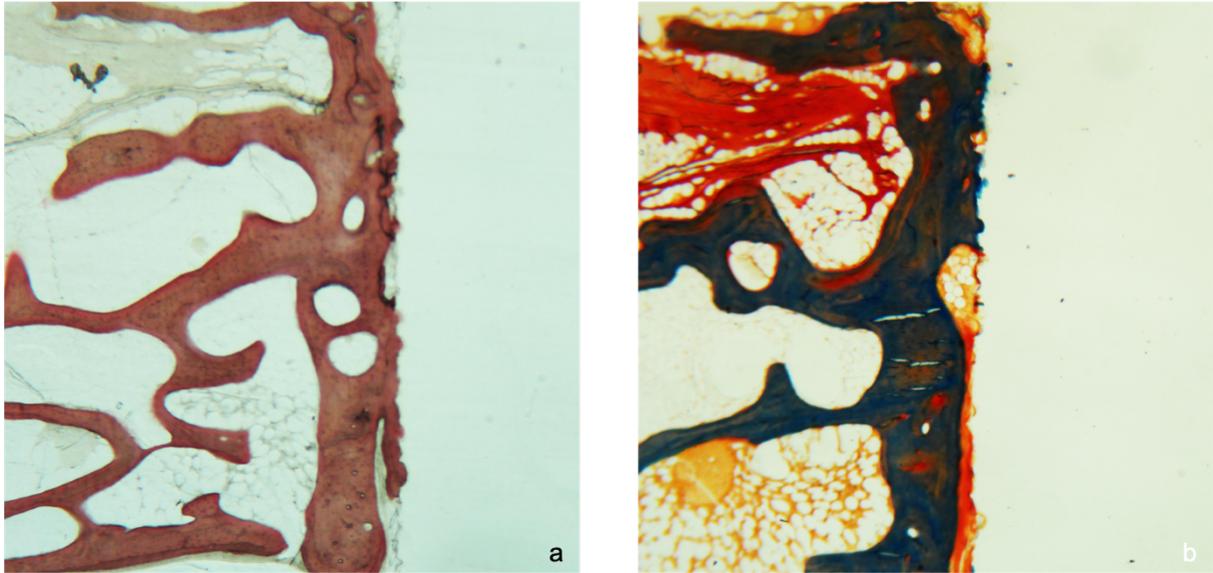


Abb. 36: Hartgewebehistologie des Implantatkörpers aus Bioverit® mit Score-Werten von 2 beim Bindegewebe, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

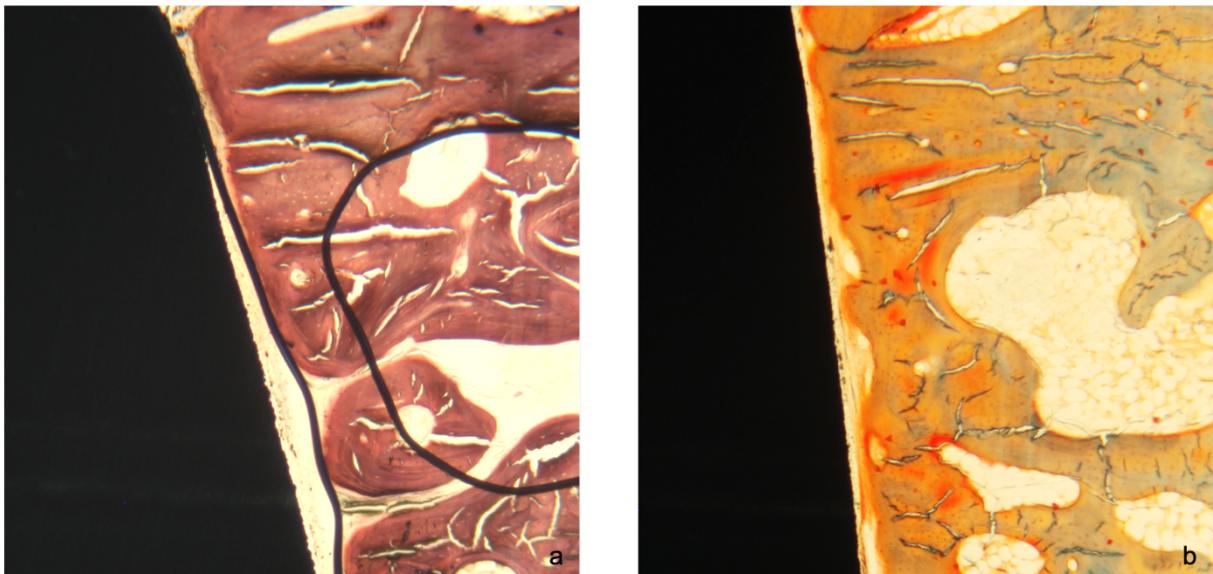


Abb. 37: Hartgewebehistologie des Implantatkörpers aus Titan mit Score-Werten von 3 beim BIC und neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

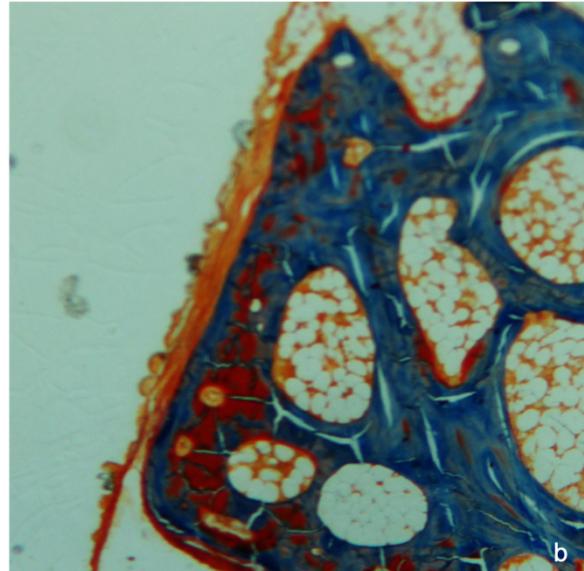
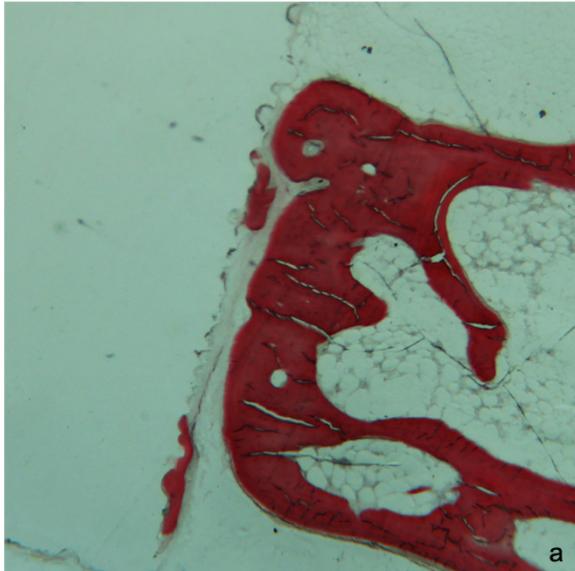


Abb. 38: Hartgewebephistologie des Implantatkörpers aus Polymer mit Score-Werten von 3 beim Bindegewebe, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

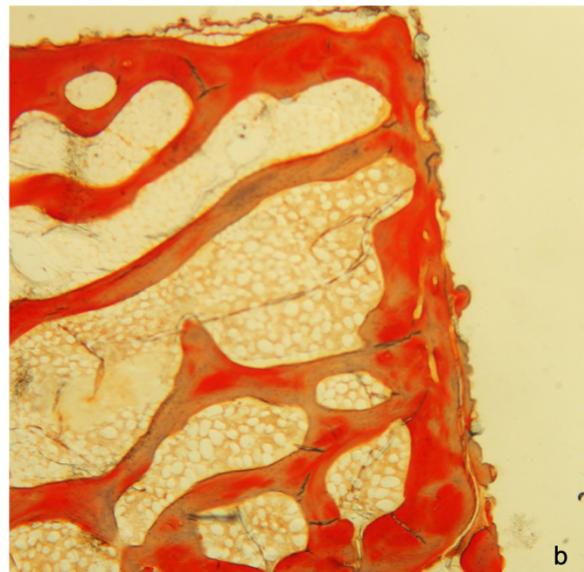
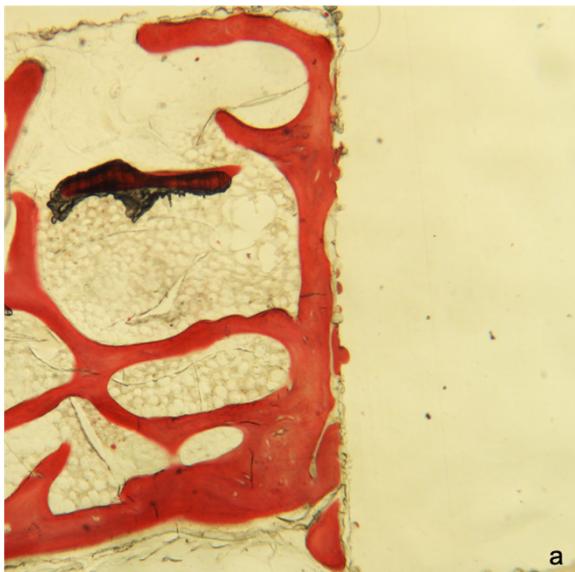


Abb. 39: Hartgewebephistologie des Implantatkörpers aus Polymer mit Score-Werten von 4 beim BIC, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

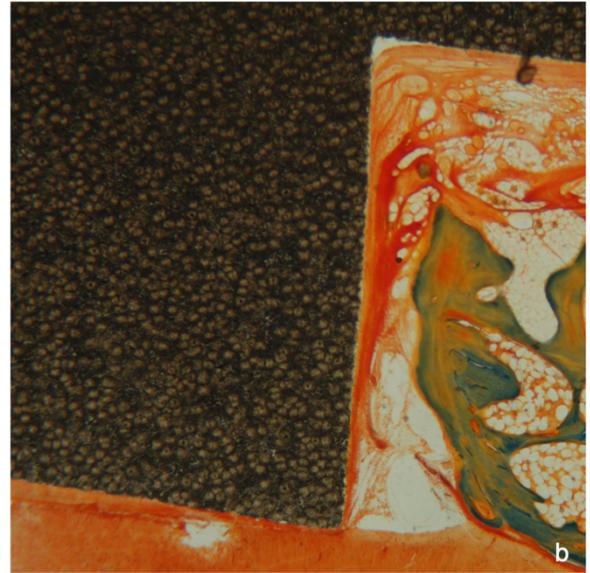
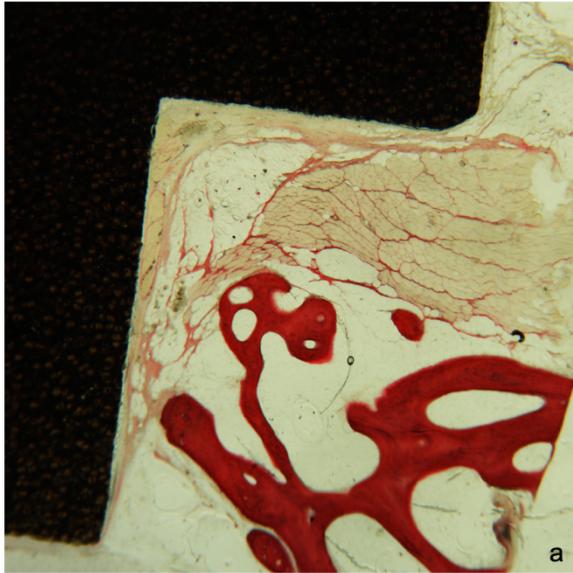


Abb. 40: Hartgewebehistologie des Implantatkörpers aus Bioverit® mit Score-Werten von 4 beim Bindegewebe, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

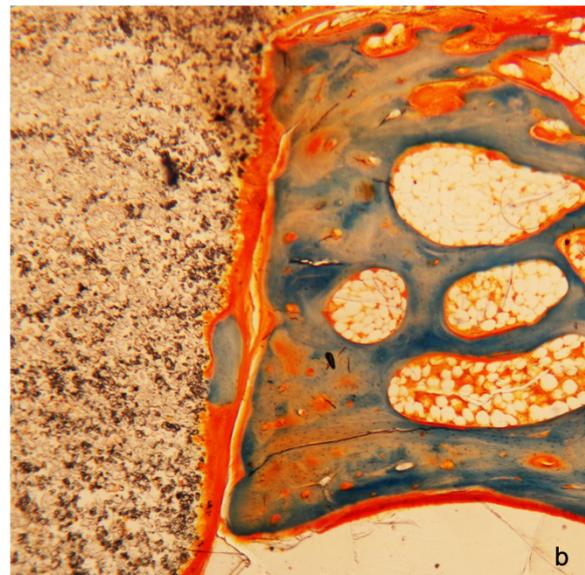
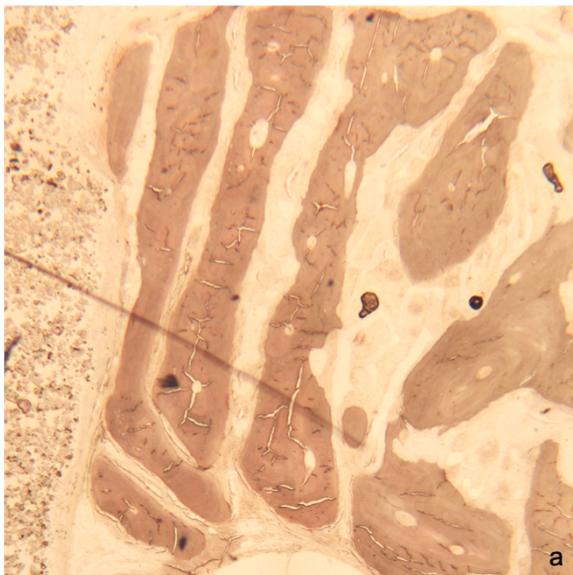


Abb. 41: Hartgewebehistologie des Implantatkörpers aus Composit mit Score-Werten von 4 beim neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

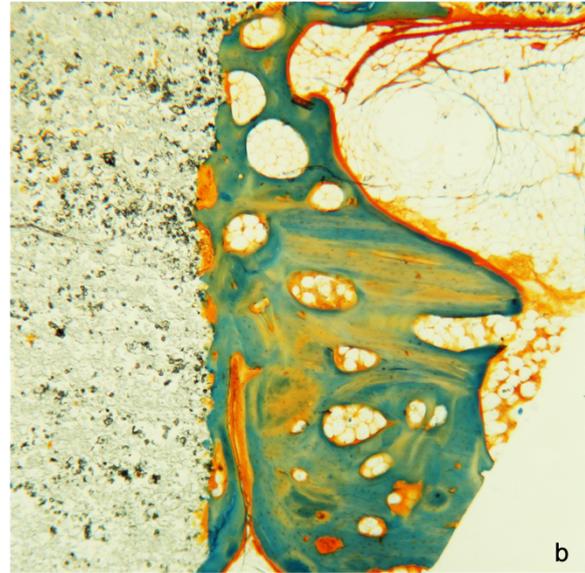
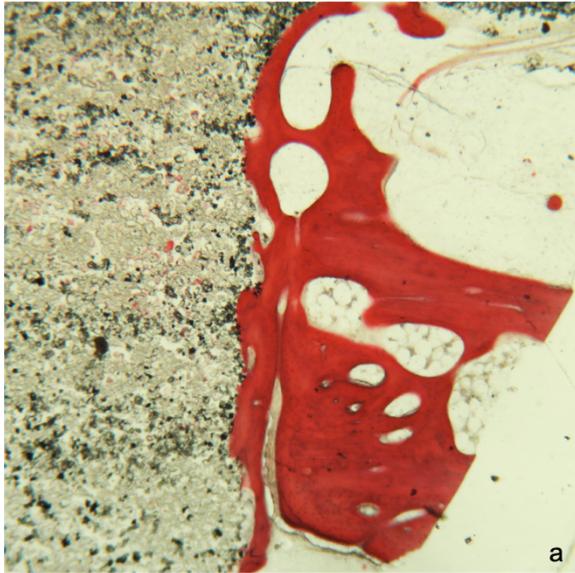


Abb. 42: Hartgewebehistologie des Implantatkörpers aus Composit mit Score-Werten von 5 beim BIC, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

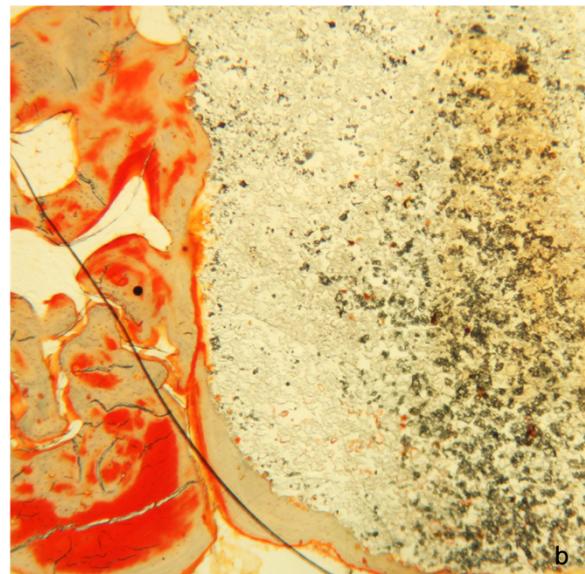
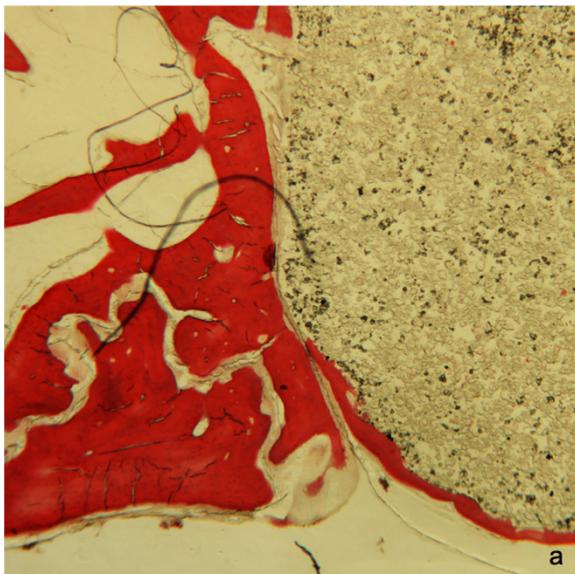


Abb. 43: Hartgewebehistologie des Implantatkörpers aus Composit mit Score-Werten von 6 beim BIC und 5 beim neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

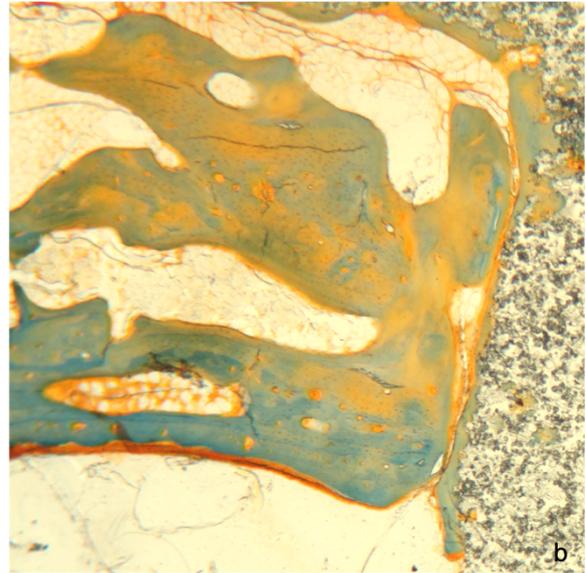
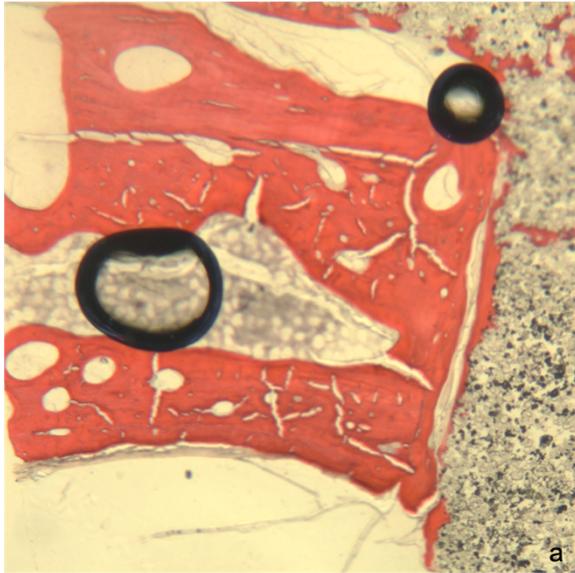


Abb. 44: Hartgewebehistologie des Implantatkörpers aus Composit mit Score-Werten von 6 beim neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b)

9.2 Histomorphometrische Auswertung

9.2.1 Auswertungsalgorithmus der Morphometrie-Software HistoGap

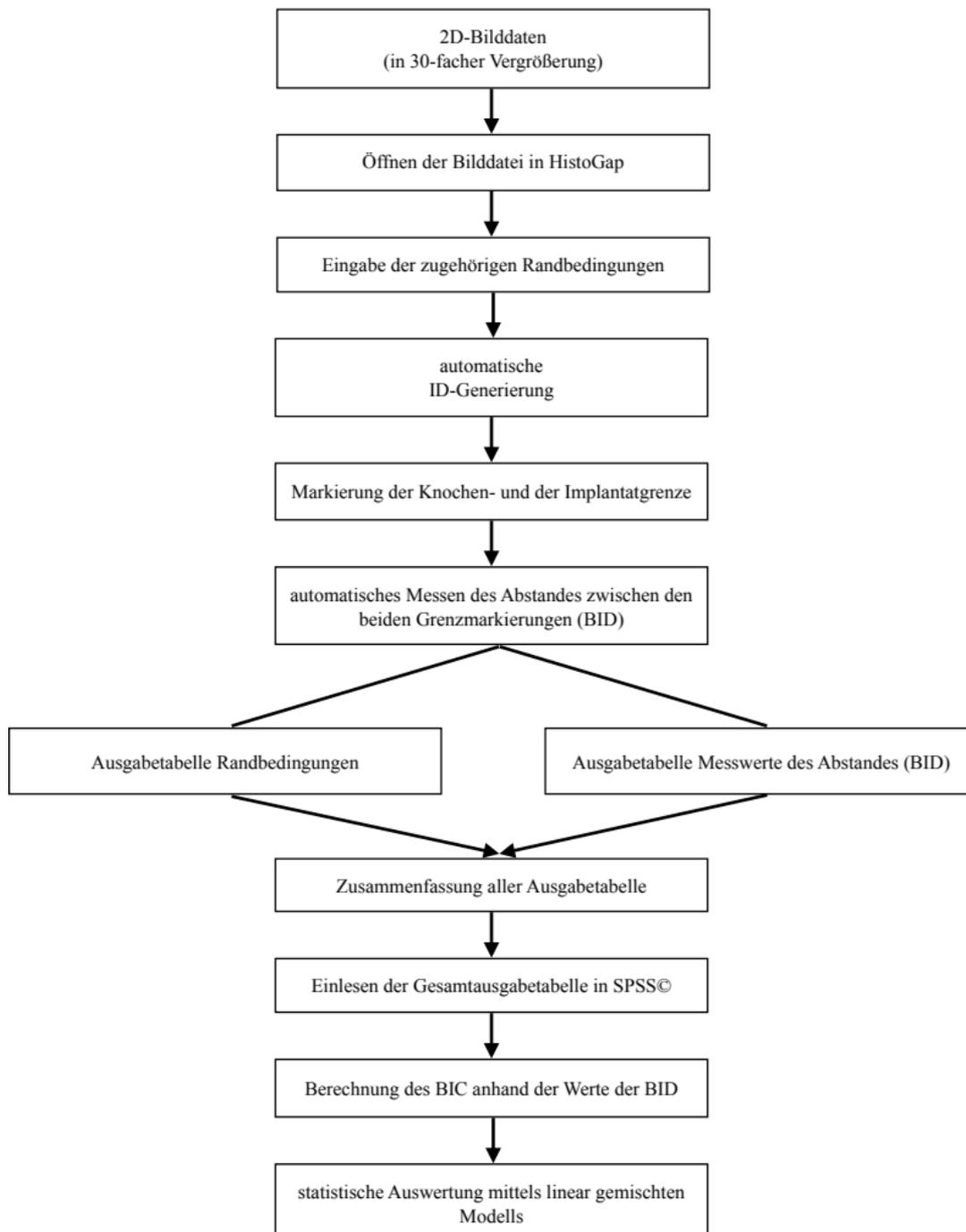


Abb. 45: schematischer Ablauf der histomorphometrischen Auswertung in der Software HistoGap

9.2.2 histomorphometrische Auswertung in HistoGap

1. Überprüfung der Daten

Daten der letzten Messung werden angezeigt. Zwei Optionen:

- Wenn keine Änderung erforderlich Button **Don't Change** klicken
- Wenn Änderung erforderlich Button **Update** klicken

2. Richtung der Messung

Für Messung auf linker Seite **Left** drücken Für Messung auf rechter Seite **Right** drücken

3. Definition der Länge

Optionaler Schritt: Wenn kein Definieren der Länge erforderlich ist, weiter mit Schritt 5.

- Button **Define Length** klicken oder Tastenkombination
- Farbänderung der Schrift in Rot.
- Rechter Mausklick auf Bild und zum Ziehen der Linie Maus gedrückt halten.
- Nach Beendigung der Linie erneut **Define Length** klicken.
Ein kleines Fenster erscheint. Zwei Optionen:
 - Länge der gezeichneten Linie in mm eintragen und **Define** klicken.
 - Linie erneut zeichnen. Dazu **Try Again!** klicken und Linie nochmal zeichnen.

4. Einzeichnen der Referenzlinien

Button **Reference Lines** klicken oder Tastenkombination

- Linie (rot) von unten nach oben zeichnen. (Richtung ist essentiell)
- Linker Mausklick auf Bild und zum Ziehen der Linie Maus gedrückt halten.
Am Ende der Linie erscheint in der ausgewählten Richtung eine orthogonale Linie (schwarz). Dies ist die obere Grenzlinie.

- Danach die untere Grenzlinie zeichnen, welche unterhalb der schwarzen Linie sein sollte und ebenfalls orthogonal ist.
- Ist die Messrichtung rechts, die Linie von rechts nach links zeichnen. Dazu mit relativ langsamer Geschwindigkeit die Linie bis zur roten Linie ziehen. Die Linie endet, wenn sie die rote Linie schneidet.

5. Linien einzeichnen

Button **Draw Lines** klicken oder Tastenkombination.

Um die Linie zu beginnen, linker Doppelklick oberhalb der schwarzen Grenzlinie. Für den nächsten Punkt der Linie neben den Startpunkt einfach klicken. Die Linie wird mit einem Doppelklick unterhalb der blauen Grenzlinie beendet. Für weitere Linien, diesen Schritt wiederholen.
Achtung: Die Linien müssen außerhalb der Referenzlinie beginnen und enden.

6. Linien löschen

Button **Remove Recent Line** klicken oder Tastenkombination.

Damit wird der letzte Punkt der Linie gelöscht. Um weitere Punkte zu löschen, diesen Vorgang wiederholen oder die Tastenkombination gedrückt halten.

7. Verbinden von Linien

Nach Einzeichnen aller gewünschten Linien, den Button **Connect Lines** klicken oder die Tastenkombination.

Bei diesem Schritt wird der Screenshot erstellt.

Beachten: Je höher die Anzahl der Messpunkte gewählt wurde, desto länger dauert dieser Schritt.

8. Datenerstellung

Nach Verbindung der Linien, was durch das Erscheinen der Messlinien deutlich wird, den Button **Finish** klicken oder die Tastenkombination.

Ein Fenster erscheint, indem steht: **Data has been stored**

Damit werden die zwei Ausgabetafeln erstellt.

9.3 3D-Analyse im μ CT

9.3.1 Literaturrecherche zur Entwicklung des Jahresring-Algorithmus

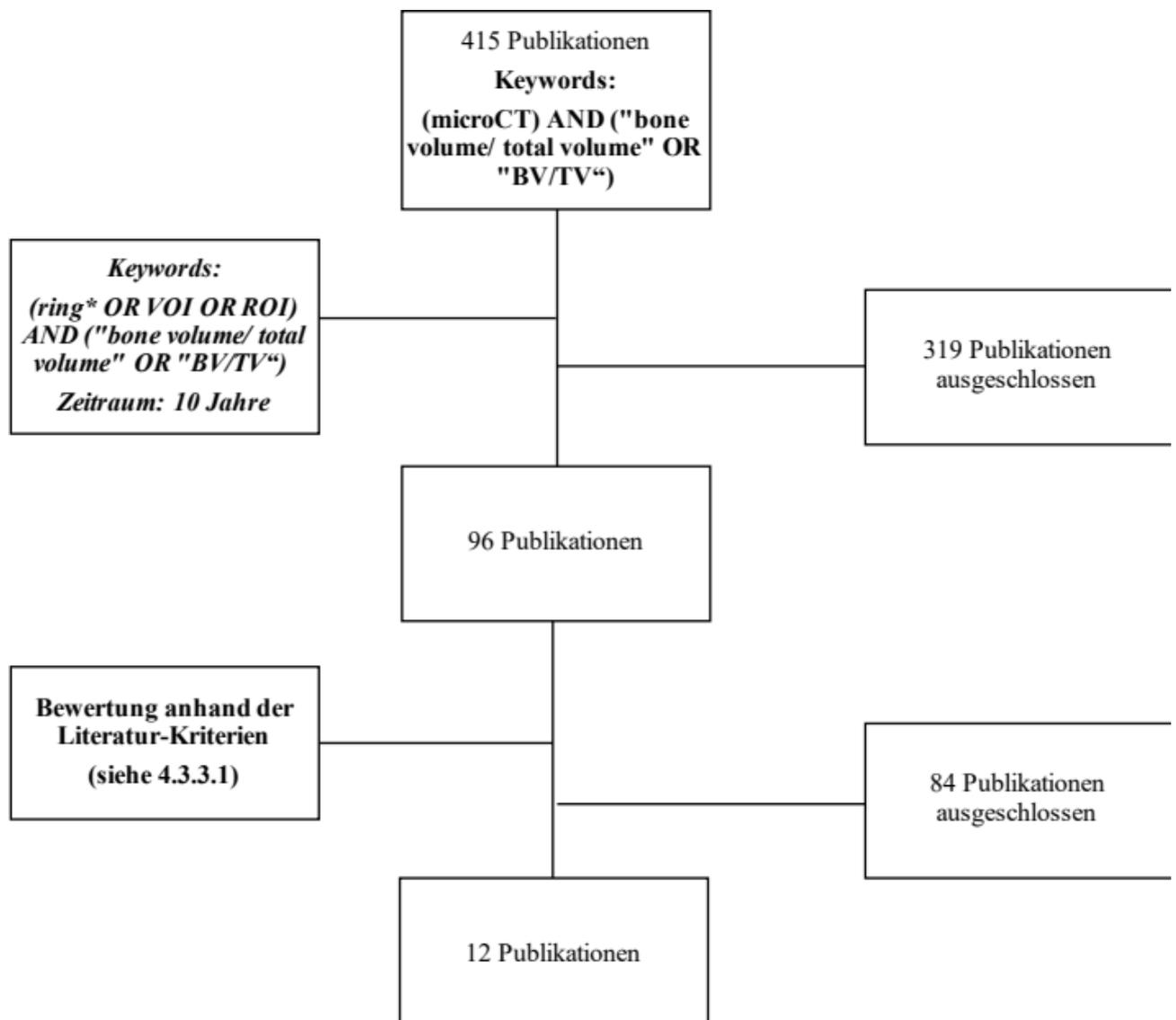


Abb. 46: Darstellung des Ablaufes der Literaturrecherche für die Entwicklung des Jahresring-Algorithmus

9.3.2 materialspezifische Segmentierung

9.3.2.1 Segmentierung von Bioverit®

1. Auswahl der Ansicht in x- und y-Ebene (Abb. 47)

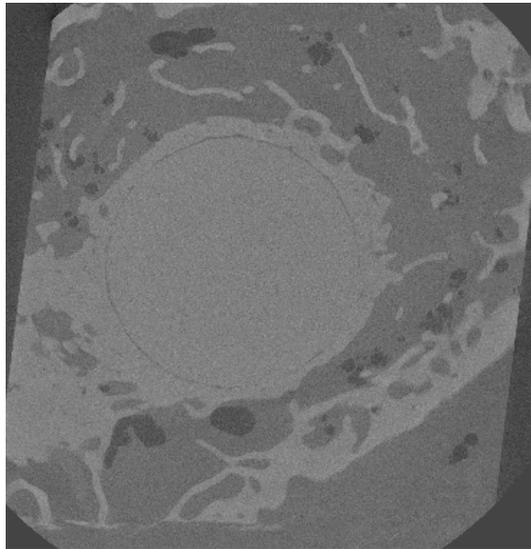


Abb. 47 µCT-Scan Bioverit®: Ansicht der x- und y-Ebene eines Bildes vom Bioverit®-Datensatz

2. zum ersten Bild des Bilderstapels scrollen, auf dem vereinzelte Pixel des Grundkörpers vom Implantat zum ersten Mal zu sehen sind (Abb. 48).

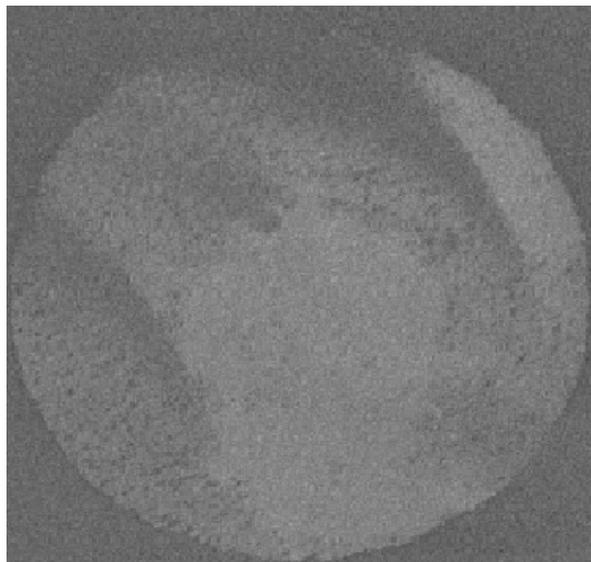


Abb 48: µCT-Scan Bioverit®: erste sichtbare Pixel vom Grundkörper des Implantats

3. manuelle Bereichsauswahl mittels **brush**- Tool bis der Grundkörper komplett sichtbar ist (Abb. 49)

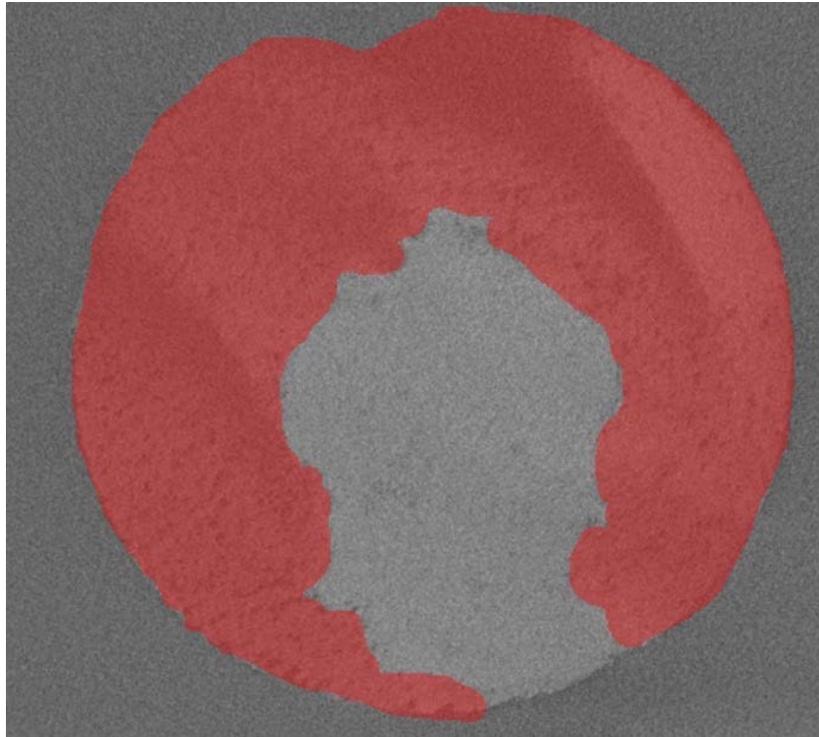


Abb. 49: μ CT-Scan Bioverit[®]: manuelle Bereichsauswahl (rot dargestellt) mit Hilfe des brush Tools

4. zum ersten Bild scrollen, auf dem der Grundkörper des Implantats zum ersten Mal vollständig im Bild zu erkennen ist
5. Bereich in der Größe des Grundkörpers ziehen mittels **lasso** und der Funktion **freehand** bei Aktivierung der Häkchen **auto trace** und **trace edges** (Abb. 50)

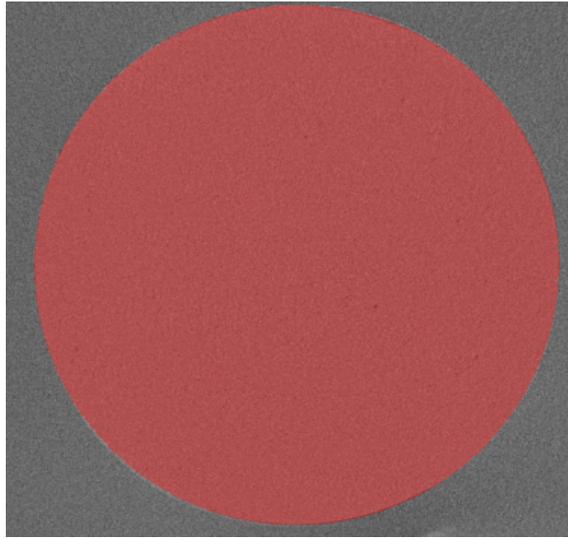


Abb. 50: μ CT-Scan Bioverit[®]: komplett sichtbarer Grundkörper im Bild und der Bereichsauswahl mit lasso- Tool

6. fünf Bilder weiterscrollen
7. Punkt 5 und 6 vier Mal wiederholen
8. ein Bild weiter scrollen und Punkt 5 nochmals anwenden
9. unter **selection/grow/current slice** auswählen und drei Mal wiederholen (Abb. 51)

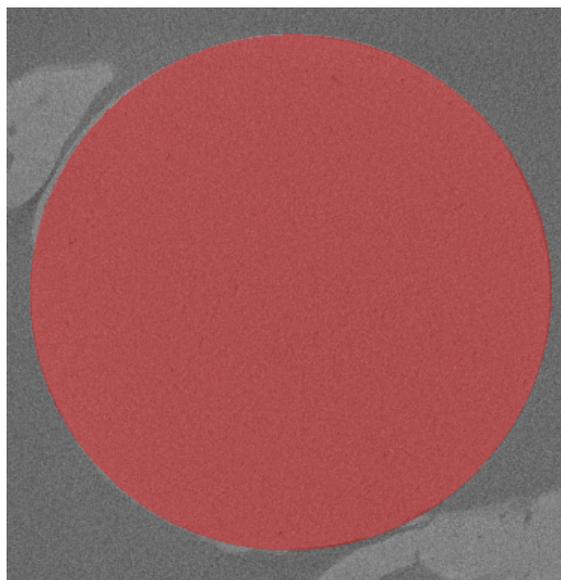


Abb. 51: μ CT-Scan Bioverit[®]: komplett ausgewählter Bereich vom Grundkörper des Implantats mit grow- Funktion (Regionenwachstum)

10. zum letzten Bild scrollen, auf dem der Grundkörper des Implantats vollständig zu sehen ist
11. Punkt 5 anwenden (gegebenenfalls mit **brush** Tool)
12. Punkt 9 anwenden
13. bei dem Übergang vom Grundkörper zum Deckel (es sind vereinzelte Pixel des Deckels zu erkennen, aber der Grundkörper ist noch teilweise im Bild zu erkennen) händisch mittels **brush** Tool den Bereich auswählen, bis Deckel vollständig sichtbar ist (Abb. 52)

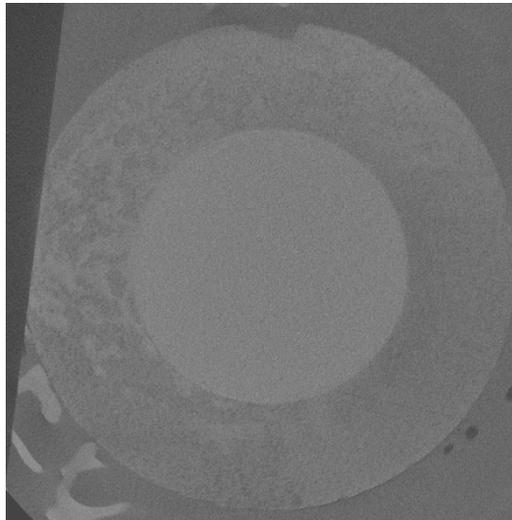


Abb. 52: µCT-Scan Bioverit®: Übergang vom Grundkörper zum Deckel des Implantats

13. Bereich in der Größe des Deckels ziehen mittels **lasso** Tool mit Hilfe der Funktion **freehand** bei Aktivierung der Häkchen bei **auto trace** und **trace edges** (Abb.53)

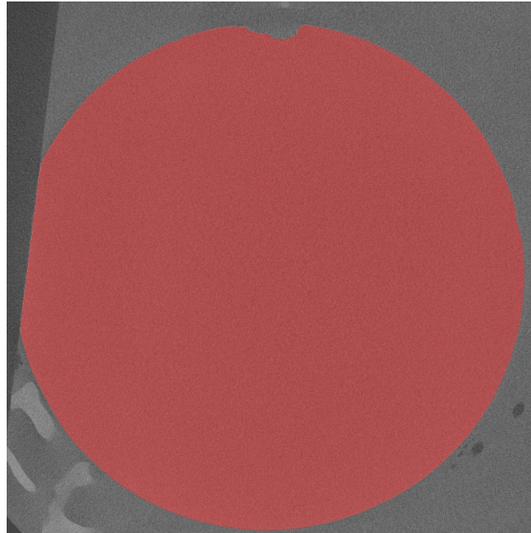


Abb. 53: µCT-Scan Bioverit®: komplett ausgewählter Bereich des Deckels mit lasso- Tool

14. zehn Bilder weiterscrollen und Punkt 15 wiederholen
15. Punkt 14 und 15 wiederholen, bis der Deckel vollständig zu sehen ist (wurde bei manchen Bildern nicht vollständig gescannt) bzw. sich die Größe des Deckels nicht verändert. (Abb. 54)

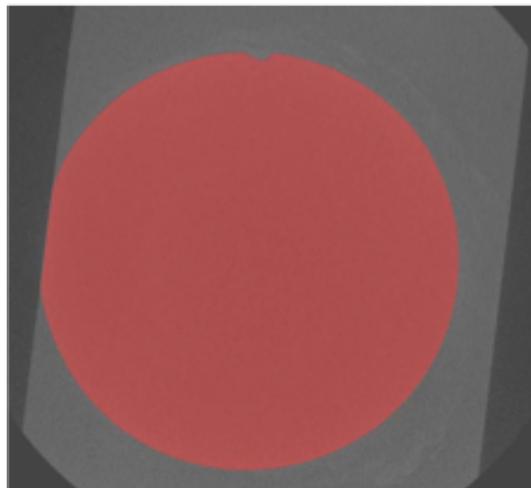


Abb. 54: µCT-Scan Bioverit®: vollständig gescannter Deckel, bei dem sich die Größe nicht mehr ändert

16. bei erneuter Änderung der Größe des Deckels erneut mit Punkt 15 bearbeiten (Abb. 55)

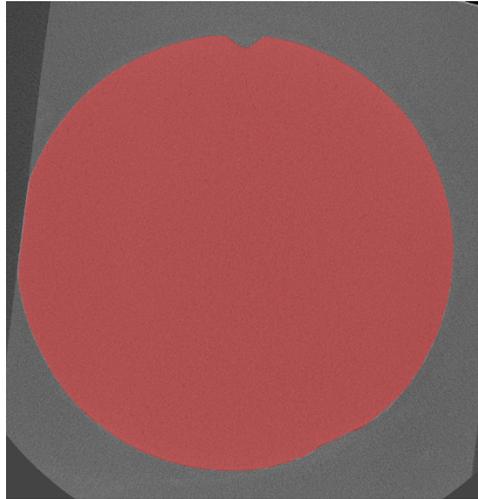


Abb. 55: μ CT-Scan Bioverit[®]: Deckel des Implantats bei erneuter Größenveränderung

17. Übergänge zwischen Deckel und Hintergrund (vereinzelt Pixel des Deckels sind nur noch zu erkennen) händisch mittels **brush**- Tool bearbeiten (Abb. 56)

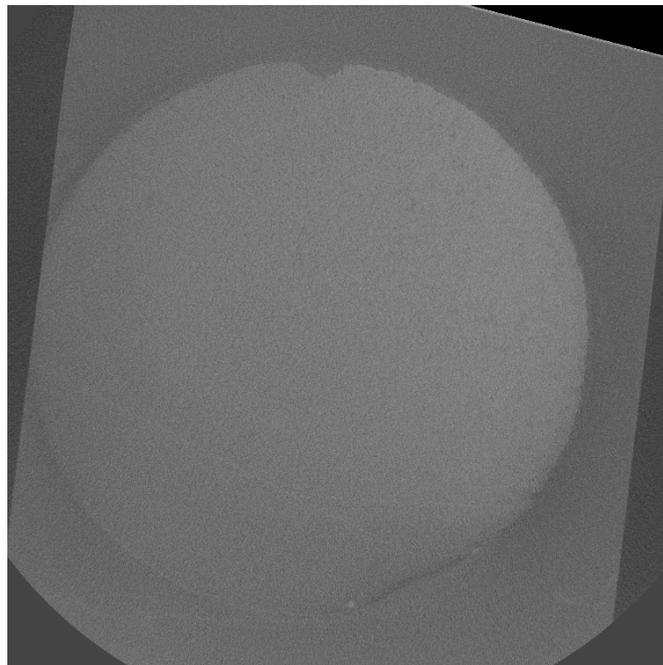


Abb. 56: μ CT-Scan Bioverit[®]: Übergang zwischen Deckel und Hintergrund

18. unter **selection/interpolieren** auswählen
19. gegebenenfalls händische Verbesserungen

- ausgewählte Bereiche beim **Segmentation editor** unter **selection/add** zum Implantat zuordnen (Abb. 57)

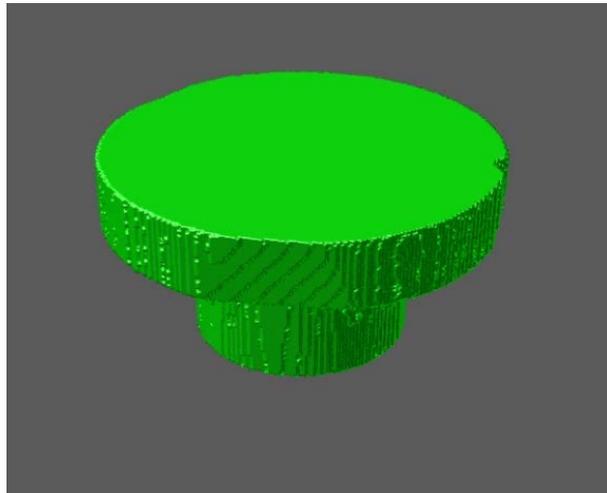


Abb. 57: μ CT-Scan Bioverit[®]: 3D-Visualisierung des vollständig segmentierten Implantats

9.3.2.2 Segmentierung von Composit

- Auswahl der Ansicht in x- und z-Ebene (Abb. 58)

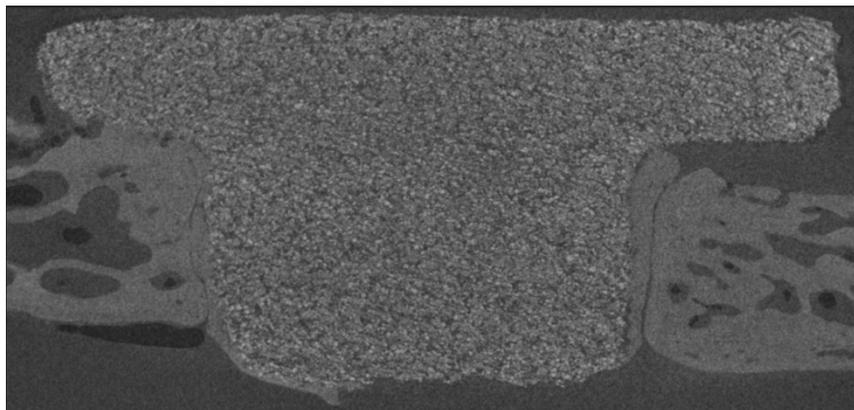


Abb. 58: μ CT-Scan Composit: Ansicht der x- und z-Ebene eines Bildes vom Composit-Datensatz

- zum ersten Bild des Bilderstapels scrollen, auf dem vereinzelte Pixel des Implantats zu sehen sind (Abb. 59)

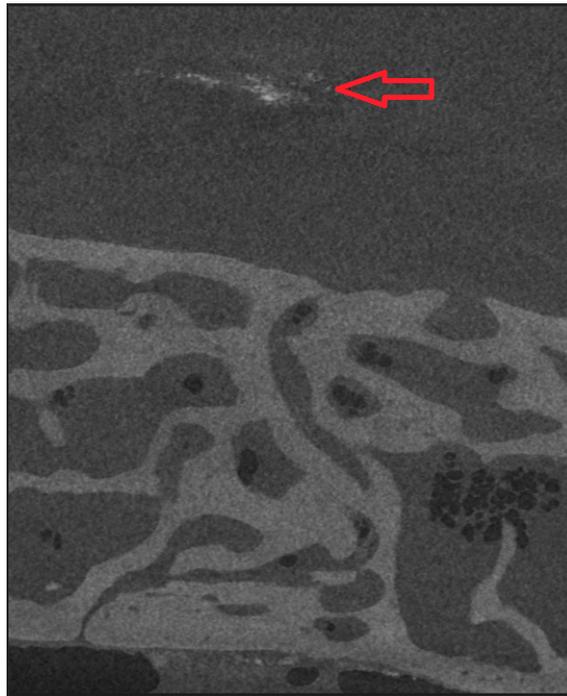


Abb. 59 : µCT-Scan Composit: erste erkennbare Pixel des Implantats (roter Pfeil)

3. **magic wand** auswählen und Einstellung für **masking** Bereich aufheben
4. die Funktion **draw limit line** auswählen und Implantat vom umliegenden Knochen abgrenzen (Abb. 60)

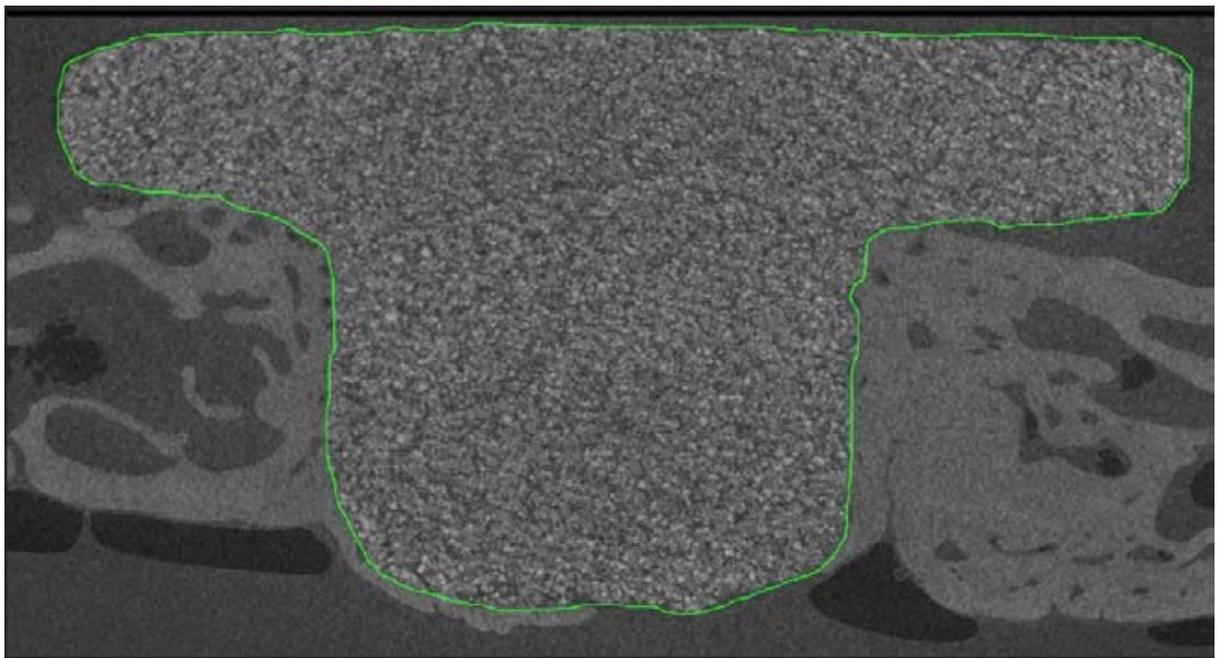


Abb. 60 µCT-Scan Composit: Beispielbild zur Abgrenzung des Implantats mit der Funktion draw limit line (grüne Linie) vom Knochen

5. fünf Bilder weiter scrollen bei großen Veränderungen der Bildinhalte bzw. zehn Bilder weiter scrollen bei kleinen Veränderungen der Bildinhalte
6. Punkt 4 und Punkt 5 immer wiederholen, bis zum letzten Bild, auf dem das Implantat noch zu sehen ist. Dieses wird mit Punkt 4 nochmals bearbeitet
zum ersten Bild scrollen
8. den **masking**-Bereich bei der **magic wand** so einstellen (blau), dass der Knochen und die hellen Pixel/Voxel des Implantats markiert werden können (Abb. 61)

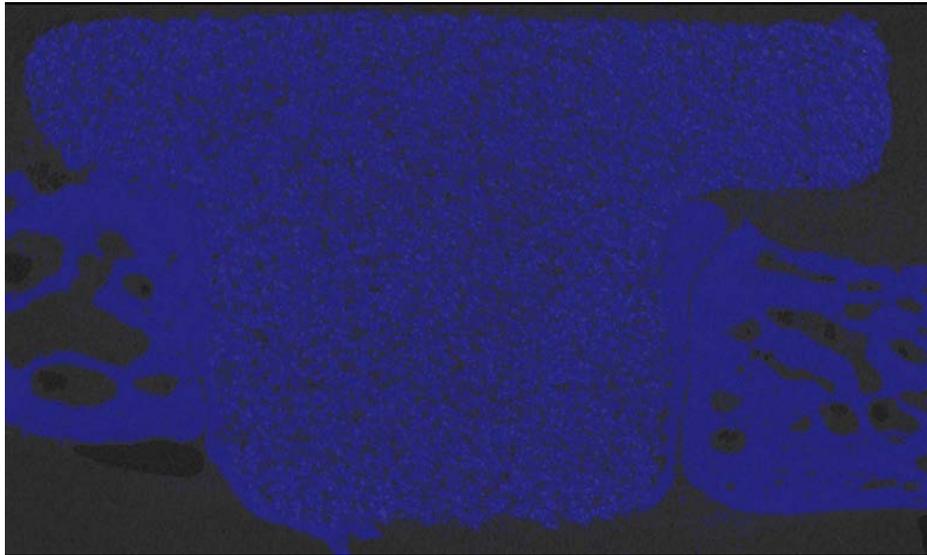


Abb. 61: μ CT-Scan Composit: eingestellter masking-Bereich (blauer Bereich) der magic wand

9. Häkchen bei **fill interior** setzen
10. überall wo **limit line** gezogen wurde, das Implantat auswählen (Abb. 62)

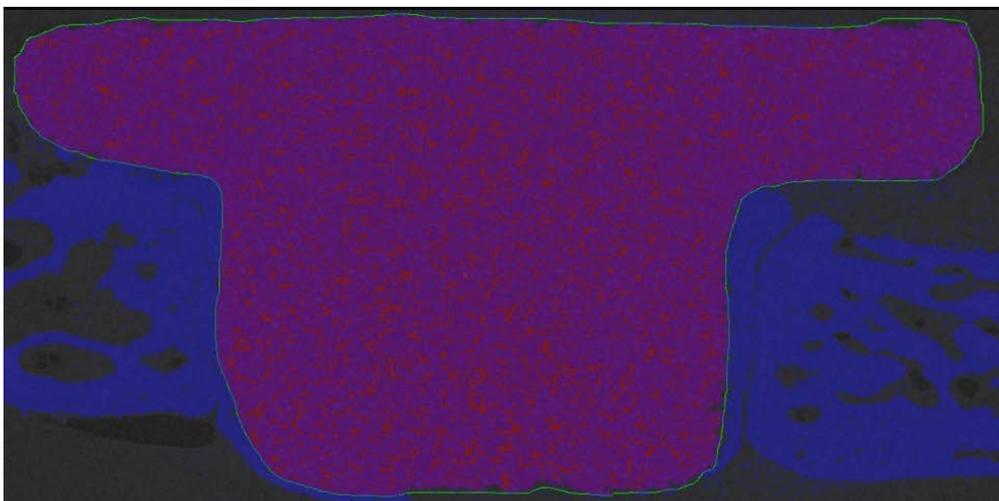


Abb. 62: μ CT-Scan Composit: Bereichsauswahl (rot/violett) des Implantats unter der Verwendung der limit line (grüne Linie) und fill interior

11. gegebenenfalls mit **limit line** oder händisch mit **brush** nachbessern

12. Interpolieren

13. ausgewählten Bereich dem Material zuordnen (Abb. 63)

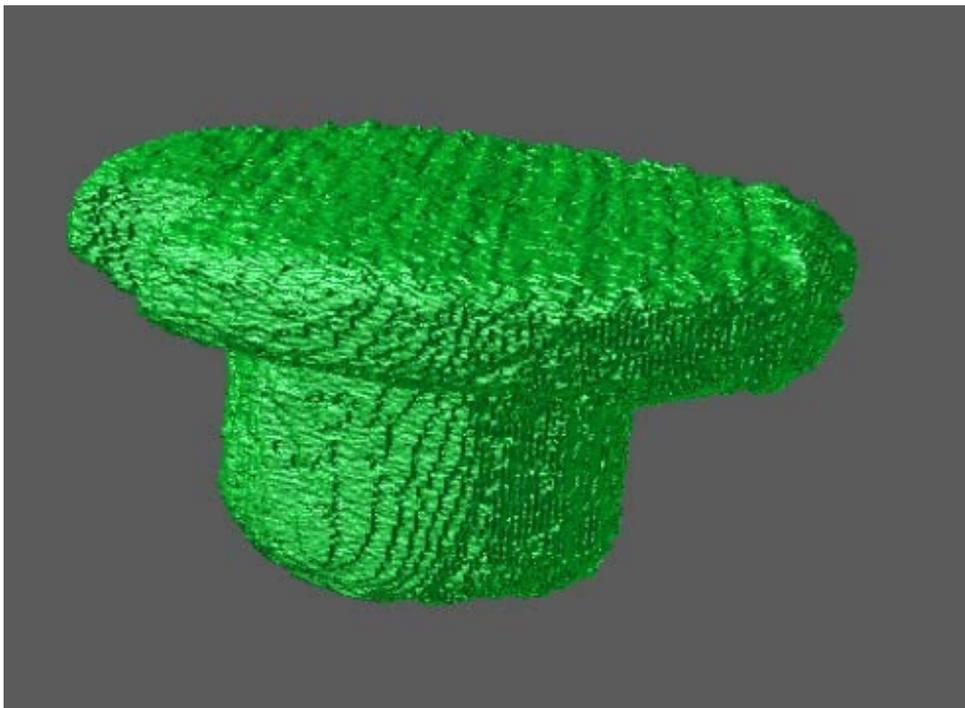


Abb. 63: μ CT-Scan Composit: 3D-Visualisierung des vollständig segmentierten Implantats

9.3.2.3 Segmentierung von Polymer

1. Auswahl der Ansicht in x- und z-Ebene (Abb. 64)

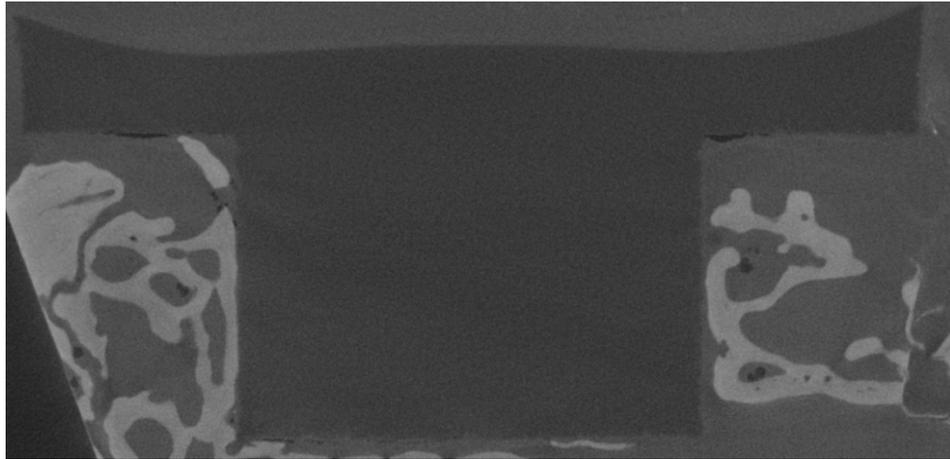


Abb. 64: μ CT-Scan Polymer: Ansicht der x- und z-Ebene eines Bildes vom Polymerdatensatz

2. zum ersten Bild des Bilderstapels scrollen, auf dem vereinzelte Pixel des Implantats zu sehen sind (Abb. 65)

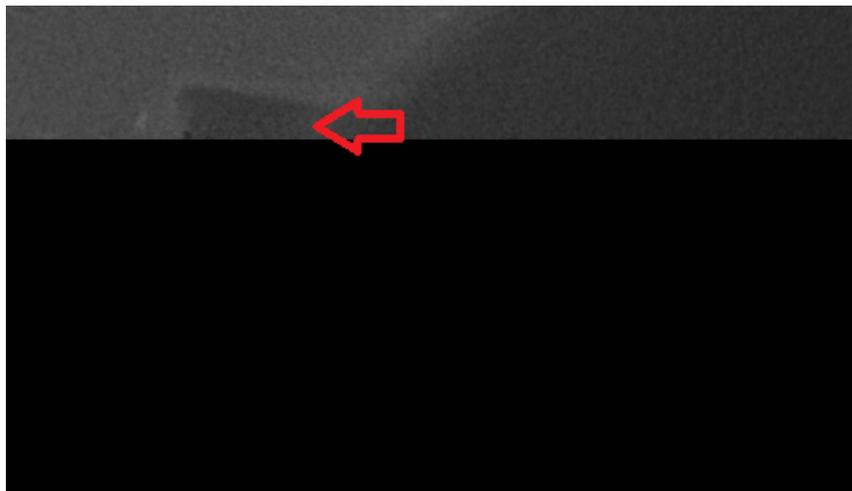


Abb. 65: μ CT-Scan Polymer: erste erkennbare Pixel des Implantats (roter Pfeil)

3. **magic wand** auswählen und Einstellung für **masking** Bereich aufheben

5. die Funktion **draw limit line** auswählen und Implantat vom umliegenden Hintergrund abgrenzen (Abb. 66)

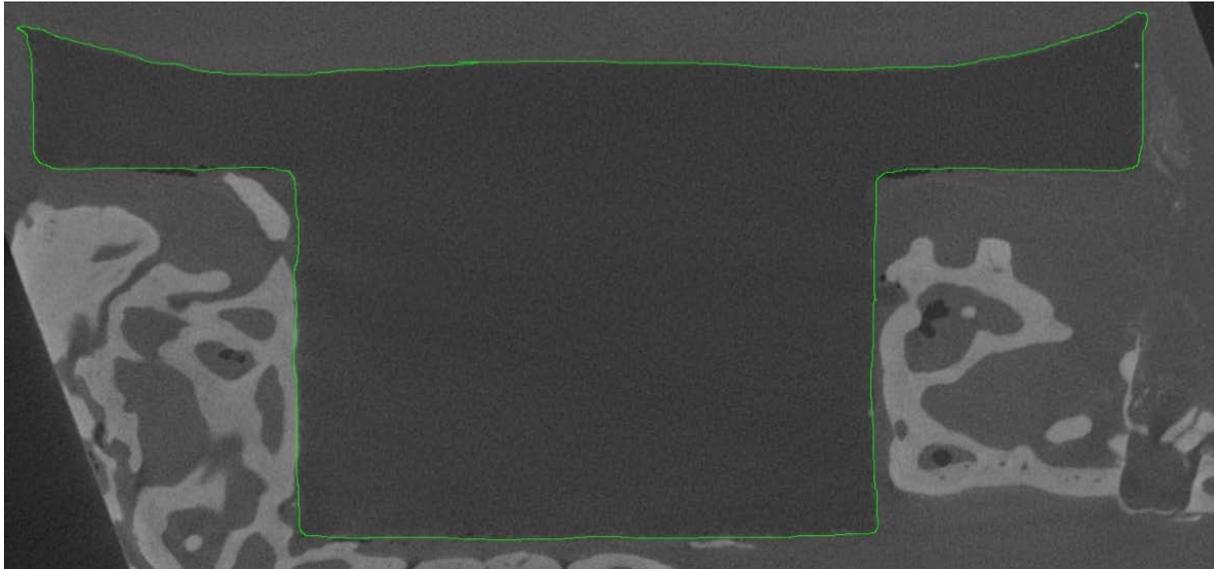


Abb. 66: μ CT-Scan Polymer: Beispielbild zur Abgrenzung des Implantats mit der Funktion draw limit line (grüne Linie) vom Hintergrund

6. fünf Bilder weiter scrollen bei großen Veränderungen der Bildinhalte bzw. zehn Bilder weiter scrollen bei kleinen Veränderungen der Bildinhalte
7. Punkt 4 und Punkt 5 immer wiederholen, bis zum letzten Bild, auf dem das Implantat noch zu sehen ist. Dieses wird mit Punkt 4 nochmals bearbeitet.
8. zum ersten Bild scrollen
9. den **masking**-Bereich bei der **magic wand** so einstellen, dass nur die dunklen Stellen im Hintergrund und die Pixel/Voxel des Implantats markiert werden können (Abb. 67)

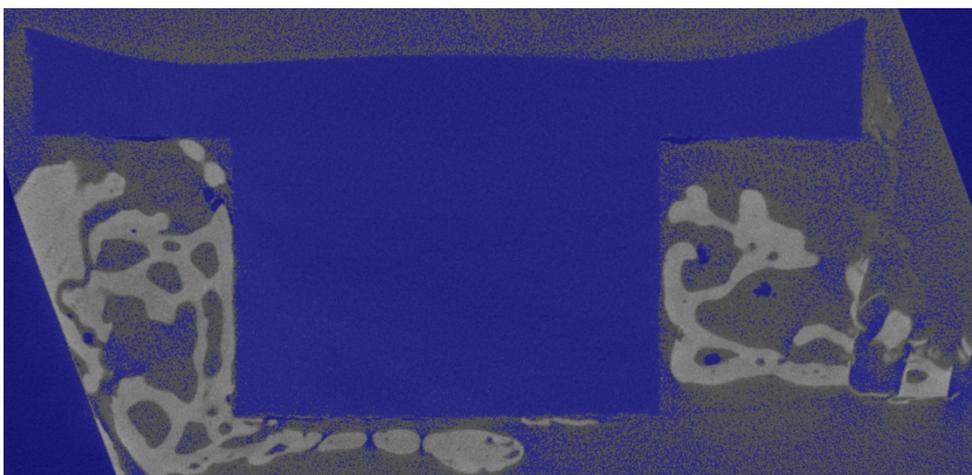


Abb. 67: μ CT-Scan Polymer: eingestellter masking-Bereich (blau) der magic wand

9. Häkchen bei „fill interior“ setzen
10. überall wo **limit line** gezogen wurde, das Implantat auswählen (Abb. 68)

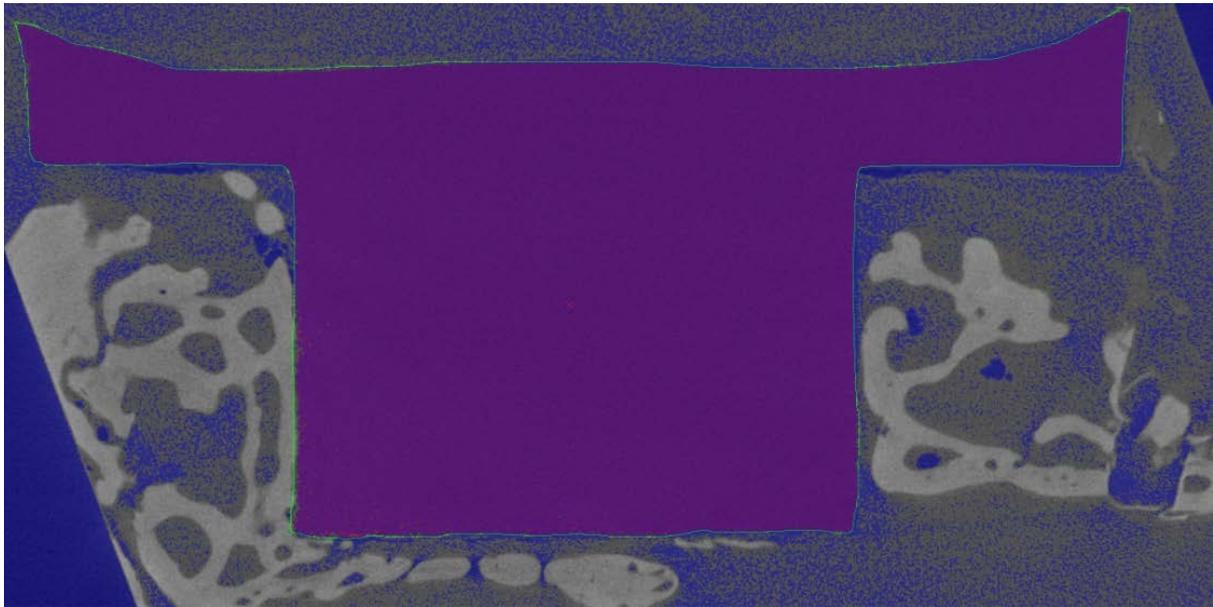


Abb. 68: μ CT-Scan Polymer: Bereichsauswahl (rot/violett) des Implantats unter der Verwendung der limit line (grüne Linie) und fill interior

11. gegebenenfalls mit **limit line** oder händisch mit **brush** nachbessern
12. Interpolieren
13. ausgewählten Bereich dem Material zuordnen (Abb. 69)

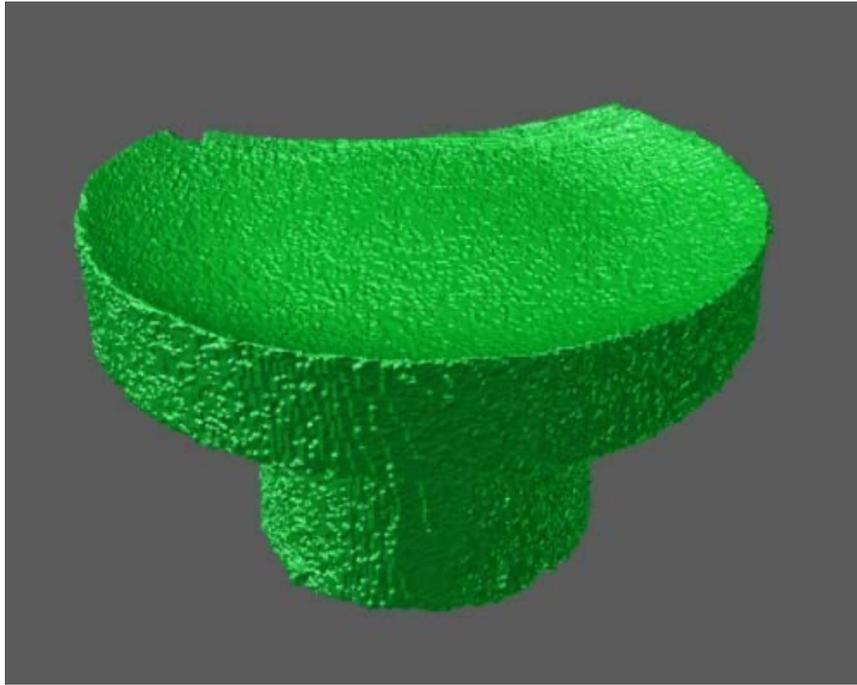


Abb. 69: μ CT-Scan Polymer: 3D- Visualisierung des vollständig segmentierten Implantats

9.3.3 Modul Annuli Labels

1. Definieren des Auswahlbereiches entlang der z-Achse mithilfe des **Crop Editor**. Darauf achten, die Region of Interest (ROI) genau zu treffen. Das heißt nur den Bereich in dem Implantat und Knochen sich direkt gegenüber liegen.
2. Starten des Tools **Interactive Thresholding** und einstellen auf die Werte des Implantats.
3. In dem entstandenen Implantat werden die inneren Löcher mit **Fill Holes** auf den XY-Ebenen geschlossen.
4. In diesem Schritt findet die Erweiterung des Implantates statt. Dazu dient das Tool **Dilation**, bei dem der Wert (in px) nach Zielstellung angegeben werden kann. Als Vorgabe sollte man die Interpretation an der XY-Ebene und den Typen als Scheibe/Disc angeben.
5. Die beiden Volumensätze (xxx.thresholded, xxx.dilated) lässt man durch den logischen Operator **Substract Images** voneinander abziehen.

6. Das entstandene Volumen stellt den Jahresring. Um diesen in den Originaldatensatz einzulesen (also die Voxel des Originals nur in dem Bereich zu definieren) wird das Modul **Arithmetic** angewendet.

7. In dem Fenster muss man folgende Einstellungen vornehmen.

Input A = Originaldatensatz

Input B = Jahresring

Expr. = A*B

9.4 Weiterentwicklung HistoGap

9.4.1 Tastenkombinationen in HistoGap

- Öffnen einer neuen Datei Ctrl+o
- Definition der Länge Ctrl+Schift+d
- Aufrufen der Einstellungen Referenzlinie Ctrl+r
- Linien zeichnen Ctrl+d
- Linien löschen Ctrl+backspace
- Verbinden von Linien Ctrl+c
- Beenden des Messvorganges Ctrl+f

9.5 Ergebnisse der Histomorphometrie der tierexperimentellen Studie

9.5.1 Test auf Normalverteilung der Histologie

Tab. 17 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der Histologie (hier: BIC, Implantatmaterial), Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor

Kolmogorov-Smirnov^a			
	Statistik	Anzahl der Fälle	Signifikanz
Bioverit®	0,264	17678	0
Composit	0,144	16278	0
Polymer	0,144	15995	0
Titan	0,269	15467	0

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tab. 18 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der Histologie (hier: BID, Implantatmaterial), Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor

Kolmogorov-Smirnov^a			
	Statistik	Anzahl der Fälle	Signifikanz
Bioverit®	0,311	17678	0
Composit	0,315	16278	0
Polymer	0,469	15995	0
Titan	0,26	15467	0

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tab. 19 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der Histologie (hier: BIC, Verweildauer), Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor

Kolmogorov-Smirnov^a			
	Statistik	Anzahl der Fälle	Signifikanz
9 Monate	0,209	22508	0
18 Monate	0,189	42910	0

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tab. 20 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der Histologie (hier: BID, Verweildauer), Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor

Kolmogorov-Smirnov^a			
	Statistik	Anzahl der Fälle	Signifikanz
9 Monate	0,31	22508	0
18 Monate	0,419	42910	0

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

9.6 Entwicklung der 3D-Methode: Jahresring-Algorithmus

9.6.1 Vergleich der Soll-Anforderungen mit Version 1.0

Tab. 21: Gegenüberstellung der ersten Version des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Input

Soll-Anforderungen vor Beginn der Entwicklung		Ist-Zustand Version 1.0	Kommentare
Funktion/Aufgabe	Teilaufgaben	✓ erfüllt ✗ nicht erfüllt	
Input 3D-Datensatz des μ CT des Tierversuches nach dem Jenaer Schädelmodell	(semi)-automatische Segmentierung der 3D-Datensätze in Avizo3D	✓	Vorgehen nach def. Workflow (Segmentierung von Implantat und Knochen)
	Ausrichtung des Datensatzes analog zur Histologie (Tabula ext. oben)	✓	Ausrichtung erfolgt manuell vor der Segmentierung
	Festlegung der Rotationsachse (Idealfall: z-Achse)	✓	z-Achse ist durch die Ausrichtung automatische Rotationsachse
	Anwendung an allen Implantatmaterialien	✗	keine Segmentierung von Titan möglich
Erfassung der exp. Randbedingungen	Tiernummer, Implantatmaterial, Verweildauer	✓	im erstellten Dateinamen verschlüsselt (Tiernummer-Material)

Tab. 22: Gegenüberstellung der ersten Version des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Messwertgenerierung

Soll-Anforderungen vor Beginn der Entwicklung		Ist-Zustand Version 1.0	Kommentare
Funktion/Aufgabe	Teilaufgaben	✓ erfüllt ✗ nicht erfüllt	
automatische Erstellung konzentrischer ROIs um den Implantatkörper	Startpunkt ist die Implantatoberfläche bzw.	✓	anhand des segmentieren Implantatkörpers
	Determination der Anzahl und Schichtdicke der Jahresringe	✓	für jeden einzelnen Jahresring neue Eingabe im Modul
	Definierung eines Zielbereiches anhand Voxeln in Entfernung zum Startpunkt	✓	Eingabe direkt in der Funktion <i>Dilation</i> der Software
Messwert-Generierung GUI	Starten der Berechnung ohne weitere Eingaben seitens des Benutzers	✗	manuelles Aufrufen und Starten der verwendeten Funktionen notwendig
	Ausgabe einer Wertetabelle mit zugehörigen 3D-Darstellungen	✗	aktuell noch nicht evaluiert (Schwerpunkt auf der Methodenentwicklung)
	Eingabe der Zielparameter mittels numerischer Werte in eine Eingabemaske oder durch manuelles Markieren des Zielbereiches im Datensatz	✗/✓	Eingabe erfolgte in den einzelnen Modulen der Software (<i>Dilation</i> , <i>Arithmetic</i>)
	Eindeutige, selbsterklärende Bezeichnung der Funktionen	✗	durch Anleitung eines erfahrenen Nutzers anwendbar
	Keine weiteren Einstellung seitens des Benutzers vornehmbar	✗	siehe Start der Berechnung
	Optisches Feedback in Form einer Vorschau vor Start der Berechnung	✗	keine Vorschaufunktion implementiert

Tab. 23: Gegenüberstellung der ersten Version des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Output

Soll-Anforderungen vor Beginn der Entwicklung		Ist-Zustand Version 1.0	Kommentare
<i>Funktion/Aufgabe</i>	<i>Teilaufgaben</i>	✓ erfüllt ✗ nicht erfüllt	
Output Auswertung mit automatisch berechneten quantitativen Parametern (hier: BV/TV)	Einteilung des BV/TV nach Richtung (in Grad) in Abhängigkeit zum Abstand möglich	✗	die Auswertungsmodalitäten wurden in der Version 0.1 noch nicht evaluiert
	Definieren der Bereichen anhand der Jahresringe	✗	
	Verifizierung der Ergebnisse durch Vergleich mit einem def. Goldstandard (Hartgewebeschistologie)	✗	
	Verwendung des BIC im möglichst geringen Abstand zur Implantatoberfläche	✗	
Eindeutige Bezeichnung des Jahresring-Datensatz mit Nachvollziehbarkeit der festgelegten Randparameter	Angabe Anzahl der Jahresringe, Schichtdicke eines Jahresringes, erfasste quantitative Parameter	✗	
Zusätzlich Exportmöglichkeit der quantitativen Parameter in ein Statistikprogramm	z.B. SPSS© Statistics (IBM ©)	✗	

9.6.2 Vergleich der Versionen (1.0 und 2.0)

Tab. 24: Gegenüberstellung der ersten Versionen (1.0) und der aktuellen (Version 2.0) des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Input

Soll-Anforderungen vor Beginn der Entwicklung		Ist-Zustand Version 1.0	Ist-Zustand Version 2.0
<i>Funktion/Aufgabe</i>	<i>Teilaufgaben</i>	✓ erfüllt ✗ nicht erfüllt	✓ erfüllt ✗ nicht erfüllt
Input 3D-Datensatz des μ CT des Tierversuches nach dem Jenaer Schädelmodell	(semi)-automatische Segmentierung der 3D- Datensätze in Avizo®	✓	✓
	Ausrichtung des Datensatzes analog zur Histologie (Tabula ext. oben)	✓	✓
	Festlegung der Rotationsachse (Idealfall: z-Achse)	✓	✓
	Anwendung an allen Implantatmaterialien	✗	✗
Erfassung der experimentellen Randbedingungen	Tiernummer, Implantatmaterial, Verweildauer	✓	✓

Tab. 25: Gegenüberstellung der ersten Versionen (hier 1.0) und der aktuellen (hier 2.0) des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Messwertgenerierung

Soll-Anforderungen vor Beginn der Entwicklung		Ist-Zustand Version 1.0	Ist-Zustand Version 2.0	
<i>Funktion/Aufgabe</i>	<i>Teilaufgaben</i>	✓ erfüllt ✗ nicht erfüllt	✓ erfüllt ✗ nicht erfüllt	
Messwert-Generierung	Startpunkt ist die Implantatoberfläche bzw. die Kontur des Versuchsobjektes	✓	✓	
	Automatische Erstellung konzentrischer ROIs um den Implantatkörper			
	Determination der Anzahl und Schichtdicke der Jahresringe	✓	✓	
	Definierung eines Zielbereiches anhand Voxeln in Entfernung zum Startpunkt	✓	✓	
	Auslastung des Arbeitsspeichers (RAM)	> 90 %	50-60 %	
	Auslastung des Prozessors (CPU)	max. 95 %	max. 70 %	
	Berechnungsdauer eines Datensatzes (1936(x) x 1936 (y) x 1313 (z) Px	90- 120 min	45-60 min	
	GUI	Starten der Berechnung ohne weitere Eingaben seitens des Benutzers	✗	✓
		Ausgabe einer Wertetabelle mit zugehörigen 3D-Darstellungen	✗	✗/✓
		Eingabe der Zielparameter mittels numerischer Werte in eine Eingabemaske oder durch manuelles Markieren des Zielbereiches im Datensatz	✗/✓	✓
		Eindeutige, selbsterklärende Bezeichnung der Funktionen	✗	✓
		Keine weiteren Einstellung seitens des Benutzers vornehmbar	✗	✓
Optisches Feedback in Form einer Vorschau vor Start der Berechnung		✗	✗	

Tab. 26: Gegenüberstellung der ersten Version (hier 1.0) und der aktuellen (hier 2.0) des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Output

Soll-Anforderungen vor Beginn der Entwicklung		Ist-Zustand Version 1.0	Ist-Zustand Version 2.0
<i>Funktion/Aufgabe</i>	<i>Teilaufgaben</i>	✓ erfüllt ✗ nicht erfüllt	✓ erfüllt ✗ nicht erfüllt
Output	Einteilung des BV/TV nach Richtung (in Grad) in Abhängigkeit zum Abstand möglich	✗	✗
	Definieren der Bereichen anhand der Jahresringe	✗	✓
	Verifizierung der Ergebnisse durch Vergleich mit einem def. Goldstandard (Hartgewebesthistologie)	✗	✓
	Verwendung des BIC im möglichst geringen Abstand zur Implantatoberfläche	✗	✓
Eindeutige Bezeichnung des Jahresring-Datensatz mit Nachvollziehbarkeit der festgelegten Randparameter	Angabe Anzahl der Jahresringe, Schichtdicke eines Jahresringes, erfasste quantitative Parameter	✗	✓
Zusätzlich Exportmöglichkeit der quantitativen Parameter in ein Statistikprogramm	z.B. SPSS© Statistics (IBM ©)	✗	✓

9.7 Ergebnisse der μ CT

9.7.1 Test auf Normalverteilung der 3D-Bilddaten

Tab. 27 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der μ CT/Jahresring-Algorithmus, Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor

Kolmogorov-Smirnov^a			
	Statistik	Anzahl der Fälle	Signifikanz
Bioverit®	0,043	1428	0
Composit	0,065	1428	0
Polymer	0,047	1428	0

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tab. 28 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der μ CT/Jahresring-Algorithmus, Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor

Kolmogorov-Smirnov^a			
	Statistik	Anzahl der Fälle	Signifikanz
9 Monate	0,062	1683	0
18 Monate	0,042	2601	0

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

9.8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: anatomische Darstellung des strukturellen Aufbaus des humanen Schädelknochen (Aumüller und Wennemuth 2017).....	9
Abb. 2: Prozesskette zur Auswertung der 2D- und 3D-Bilddaten.....	18
Abschnitt blau: siehe 4.1-4.3; Abschnitt grün: 4.4-4.6; Abschnitt rot: 4.7.....	18
Abb. 3: schematische Darstellung eines Implantatkörpers im Längsschnitt mit den zugehörigen Abmessungen in mm.....	19
Abb. 4: schematische Darstellung des implantierten Probekörpers nach dem Jenaer Schädelmodell.....	22
Abb. 5: schematische Darstellung zur histomorphometrischen Auswertung mit Begrenzung des Messbereiches (Region of Interest, ROI, schwarze Linien) und Darstellung des Abstands zwischen Knochen und Implantat in orange.....	26
Abb. 6: schematische Darstellung der konzentrischen Regions of Interests (ROI, rote Linien) um das Implantat.....	27
Abb. 7: segmentierter 3D-Datensatz mit dem umgebenden Knochenstrukturen (a) sowie nach erneuter Segmentierung des eingelesenen Datensatz zur alleinigen Darstellung des Implantatkörpers (b).....	30
Abb. 8: schematische Darstellung des Gesamtablaufes des Jahresring-Algorithmus von der Segmentierung über die Berechnungszyklen in Avizo® bis zur quantitativen Auswertung....	32
Abb. 9: Eingabemaske der Randbedingungen (1. Spalte von links) in der weiter entwickelten Version 3.0 von HistoGap.....	35
Abb. 10: automatisch erstellter Screenshot von HistoGap 3.0 nach erfolgreichem Abschluss eines Messvorganges der rechten Seite eines Polymer-Implantates (Hämatoxylin-Eosin-Färbung; 30-fache Vergrößerung).....	36
Abb. 11: Häufigkeitsverteilung aller Messpunkte der Histomorphometrie geordnet nach dem Abstand zwischen Knochen und Implantat (bone implant distance, BID).....	37
Abb. 12: Häufigkeitsverteilung aller Messpunkte der Histomorphometrie geordnet nach dem prozentualen Anteil des direkten Kontaktes von Knochen und Implantat (bone implant contact, BIC).....	38
Abb. 13: BIC in Prozent der histologischen Schnitte.....	41
Abb. 14: BID in µm der histologischen Schnitte.....	42
Abb. 15: Bioverit® mit der bindegewebigen Einkapselung an dem Implantatmaterial, nach 9 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung.....	43
Abb. 17: Titan mit der bindegewebigen Einkapselung an dem Implantatmaterial, nach 9 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung.....	44
Abb. 18: Titan mit der bindegewebigen Einkapselung an dem Implantatmaterial nach 18 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß),	

30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung.....	45
Abb. 19: Composit mit einer bindegewebigen Einkapselung an dem Implantatmaterial, nach 9 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (schwarz), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung.....	46
Abb. 20: Composit mit einer hohen Knochenneubildungsrate nach 18 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung.....	46
Abb. 21: Polymer mit einer dünnen bindegewebigen Einkapselung nach 9 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (weiß), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung.....	47
Abb. 22: Polymer mit einer ausgeprägten Knochenneubildungsrate nach 18 Monaten Implantationsdauer; 1,6x-Vergrößerung (a) mit zu vergrößerndem Bereich (schwarz), 30x-Vergrößerung (b); Bindegewebe rot; Knochen blau; histologischer Schnitt mit modifizierter Masson-Goldner Färbung.....	48
Abb. 23: schematische Darstellung der 4 Volume of interest (VOI) ausgehend von der Implantatoberfläche.....	50
Abb. 24: zusammengefasste Ausgabetabelle des Jahresring-Algorithmus; bestehend aus den Werten der gesamten Voxel (rot), der als Knochen deklarierten Werte (grün), dem Ergebnis (blau) sowie der Nummer des Jahresringes (<i>index</i>).....	51
Abb. 25: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen (BV/TV, in %), Zusammenfassung aller Messwerte über die Gesamtdistanz (0-742,5 µm).....	54
Abb. 27: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte des Composites über die Gesamtdistanz (0-742,5 µm).....	56
Abb. 29: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte über eine Distanz von 0-7,5 µm, entsprechend der VOI BIC.....	58
Abb. 30: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte über eine Distanz von 7,5-82,5 µm); entsprechend der VOI <i>bindegewebige Einscheidung und neu gebildeter Knochen</i>	60
Abb. 31: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte über eine Distanz von 82,5-487,5 µm, entsprechend der VOI <i>neugebildeter/umgebauter Knochen</i>	61

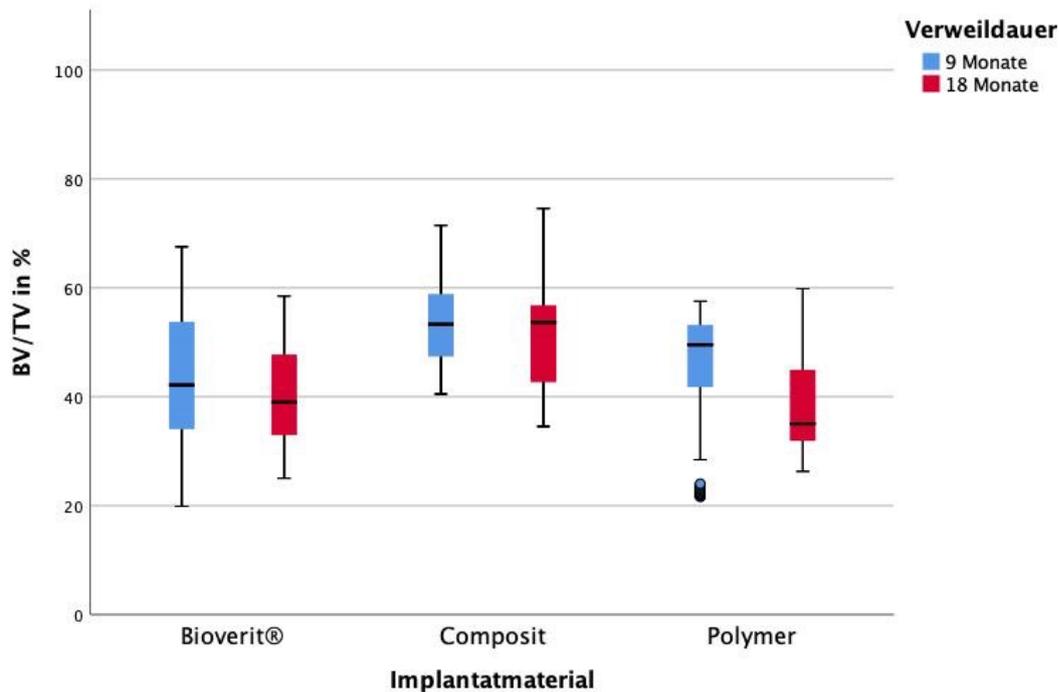


Abb. 32: relativer Knochenanteil am Gesamtvolumen in Prozent, Zusammenfassung der Messwerte über eine Distanz von 487,5-742,5 µm; entsprechend der VOI vorhandener Knochen.....62

Abb. 33: gegenüberstellende Darstellung einer Histologie und eines 3D-µCT-Scans des Materials Polymer; (a) µCT-Schnitt mit optimalen Scanbedingungen; (b) zur Auswertung genutzte Scanbedingungen; (c) korrespondierende Hartgewebesthistologie (30-fache Vergrößerung, HE); In Abbildung (a) Darstellung der Knochensäume mit weißen Pfeilen; In Abbildung (c) Darstellung der dünnen Knochensäume mit roten Pfeilen.....64

Abb. 34: Hartgewebesthistologie des Implantatkörpers aus Bioverit® mit Score-Werten von 1 beim BIC, dem neugebildeten Knochen sowie dem Bindegewebe, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....91

Abb. 35: Hartgewebesthistologie des Implantatkörpers aus Bioverit® mit Score-Werten von 2 beim BIC sowie dem neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....91

Abb. 36: Hartgewebesthistologie des Implantatkörpers aus Bioverit® mit Score-Werten von 2 beim Bindegewebe, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....92

Abb. 37: Hartgewebesthistologie des Implantatkörpers aus Titan mit Score-Werten von 3 beim BIC und neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....92

Abb. 38: Hartgewebesthistologie des Implantatkörpers aus Polymer mit Score-Werten von 3 beim Bindegewebe, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....93

Abb. 39: Hartgewebesthistologie des Implantatkörpers aus Polymer mit Score-Werten von 4 beim BIC, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....93

Abb. 40: Hartgewebepathologie des Implantatkörpers aus Bioverit® mit Score-Werten von 4 beim Bindegewebe, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....	94
Abb. 41: Hartgewebepathologie des Implantatkörpers aus Composit mit Score-Werten von 4 beim neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....	94
Abb. 42: Hartgewebepathologie des Implantatkörpers aus Composit mit Score-Werten von 5 beim BIC, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....	95
Abb. 43: Hartgewebepathologie des Implantatkörpers aus Composit mit Score-Werten von 6 beim BIC und 5 beim neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....	95
Abb. 44: Hartgewebepathologie des Implantatkörpers aus Composit mit Score-Werten von 6 beim neugebildeten Knochen, 30-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a), modifizierter Masson-Goldner Färbung (b).....	96
Abb. 45: schematischer Ablauf der histomorphometrischen Auswertung in der Software HistoGap.....	97
Abb. 46: Darstellung des Ablaufes der Literaturrecherche für die Entwicklung des Jahresring-Algorithmus.....	100
Abb. 47 μ CT-Scan Bioverit®: Ansicht der x- und y-Ebene eines Bildes vom Bioverit®-Datensatz.....	101
Abb. 48: μ CT-Scan Bioverit®: erste sichtbare Pixel vom Grundkörper des Implantats.....	101
Abb. 49: μ CT-Scan Bioverit®: manuelle Bereichsauswahl (rot dargestellt) mit Hilfe des brush Tools.....	102
Abb. 50: μ CT-Scan Bioverit®: komplett sichtbarer Grundkörper im Bild und der Bereichsauswahl mit lasso- Tool.....	103
Abb. 51: μ CT-Scan Bioverit®: komplett ausgewählter Bereich vom Grundkörper des Implantats mit grow- Funktion (Regionenwachstum).....	103
Abb. 52: μ CT-Scan Bioverit®: Übergang vom Grundkörper zum Deckel des Implantats....	104
Abb. 53: μ CT-Scan Bioverit®: komplett ausgewählter Bereich des Deckels mit lasso- Tool.....	105
Abb. 54: μ CT-Scan Bioverit®: vollständig gescannter Deckel, bei dem sich die Größe nicht mehr ändert.....	105
Abb. 55: μ CT-Scan Bioverit®: Deckel des Implantats bei erneuter Größenveränderung.....	106
Abb. 56: μ CT-Scan Bioverit®: Übergang zwischen Deckel und Hintergrund.....	106
Abb. 57: μ CT-Scan Bioverit®: 3D-Visualisierung des vollständig segmentierten Implantats.....	107
Abb. 58: μ CT-Scan Composit: Ansicht der x- und z-Ebene eines Bildes vom Composit-Datensatz.....	107
Abb. 59 : μ CT-Scan Composit: erste erkennbare Pixel des Implantats (roter Pfeil).....	108

Abb. 60 μ CT-Scan Composit: Beispielbild zur Abgrenzung des Implantats mit der Funktion draw limit line (grüne Linie) vom Knochen.....	108
Abb. 61: μ CT-Scan Composit: eingestellter masking-Bereich (blauer Bereich) der magic wand.....	109
Abb. 62: μ CT-Scan Composit: Bereichsauswahl (rot/violett) des Implantats unter der Verwendung der limit line (grüne Linie) und fill interior.....	110
Abb. 63: μ CT-Scan Composit: 3D-Visualisierung des vollständig segmentierten Implantats	110
Abb. 64: μ CT-Scan Polymer: Ansicht der x- und z-Ebene eines Bildes vom Polymerdatensatz	111
Abb. 65: μ CT-Scan Polymer: erste erkennbare Pixel des Implantats (roter Pfeil).....	111
Abb. 66: μ CT-Scan Polymer: Beispielbild zur Abgrenzung des Implantats mit der Funktion draw limit line (grüne Linie) vom Hintergrund.....	112
Abb. 67: μ CT-Scan Polymer: eingestellter masking-Bereich (blau) der magic wand.....	112
Abb. 68: μ CT-Scan Polymer: Bereichsauswahl (rot/violett) des Implantats unter der Verwendung der limit line (grüne Linie) und fill interior.....	113
Abb. 69: μ CT-Scan Polymer: 3D- Visualisierung des vollständig segmentierten Implantats	114

9.9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Tabelle mit den Scanbedingungen des μ CT.....	23
Tab. 2: Score-Werte zur Beurteilung des Bindegewebes (BGW-Schicht) in der Hartgewebephistologien.....	25
Tab. 3: Score-Werte zur Beurteilung der Knochenneubildung in den Hartgewebephistologien.....	25
Tab. 4: quantitative Bewertung der Entzündungsreaktion anhand der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen.....	25
Tab. 5: Bone implant contact (BIC) der Implantatmaterialien sortiert nach 9 und 18 Monaten.....	39
Tab. 6: Bone implant distance (BID) der Implantatmaterialien sortiert nach 9 und 18 Monaten.....	39
Tab. 7: Score-Werte zur qualitativen Beurteilung des Bioverit [®] s in der Hartgewebephistologie.....	44
Tab. 8: Score-Werten zur qualitativen Beurteilung des Titans in der Hartgewebephistologie.....	45
Tab. 9: Score-Werte zur qualitativen Beurteilung des Composites in der Hartgewebephistologie.....	46
Tab. 10: Score-Werte zur qualitativen Beurteilung des Polymers in der Hartgewebephistologie.....	48
Tab. 11: BV/TV der Implantatmaterialien nach 9 und 18 Monaten über die Gesamtdistanz (0-742,5 μ m).....	53
Tab. 12: Maximaler BV/TV und Abstand von der Implantatoberfläche (jeweils in Prozent als BV/TV bzw. μ m) der Implantatmaterialien nach 9 und 18 Monaten.....	53
Tab. 13: Zusammenfassung der Werte aus dem Jahresring-Algorithmus aus der VOI BIC; * Werte sind aufgrund von Bildfehler nicht verwertbar und werden zur Veranschaulichung dargestellt.....	59
Tab. 14: Zusammenfassung der Werte aus dem Jahresring-Algorithmus aus der VOI <i>bindegewebige Einscheidung und neu gebildeter Knochen</i>	60
Tab. 15: Zusammenfassung der Werte aus dem Jahresring-Algorithmus aus der VOI <i>neugebildeter/umgebauter Knochen</i>	61
Tab. 16: Zusammenfassung der Werte aus dem Jahresring-Algorithmus aus der VOI <i>vorhandener Knochen</i>	62
Tab. 17 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der Histologie (hier: BIC, Implantatmaterial), Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor.....	116
Tab. 18 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der Histologie (hier: BID, Implantatmaterial), Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor.....	116
Tab. 19 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der Histologie (hier: BIC, Verweildauer), Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor.....	116

Tab. 20 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der Histologie (hier: BID, Verweildauer), Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor.....	116
Tab. 21: Gegenüberstellung der ersten Version des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Input.....	117
Tab. 22: Gegenüberstellung der ersten Version des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Messwertgenerierung.....	118
Tab. 23: Gegenüberstellung der ersten Version des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Output.....	119
Tab. 24: Gegenüberstellung der ersten Versionen (1.0) und der aktuellen (Version 2.0) des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Input.....	120
Tab. 25: Gegenüberstellung der ersten Versionen (hier 1.0) und der aktuellen (hier 2.0) des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Messwertgenerierung.....	121
Tab. 26: Gegenüberstellung der ersten Version (hier 1.0) und der aktuellen (hier 2.0) des Jahresring-Algorithmus anhand der Soll-Anforderungen; hier Arbeitspaket Output.....	122
Tab. 27 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der μ CT/Jahresring-Algorithmus, Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor.....	123
Tab. 28 : Kolmogorov-Smirnov – Test auf Normalverteilung in Bezug auf die Daten der μ CT/Jahresring-Algorithmus, Signifikanz entspricht hierbei dem p. Bei $p < 0,05$ liegt keine Normalverteilung vor.....	123

9.10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung und Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Frau PD Dr.med. G.Schneider für die ausgezeichnete Betreuung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr bei allen Mitarbeitern des Biomateriallabors der HNO-Klinik Jena: Herrn D. Linde, Frau Dr.rer.nat. A. Enkelmann sowie Frau S. Voigt. In vielen Stunden produktiver Gespräche erhielt ich entscheidende Anregungen, die wichtige Grundlagen dieser Arbeit sind. Daher vielen Dank für diese großartige Unterstützung, die Hilfsbereitschaft und das Engagement.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr.rer.nat Lehmann vom Institut für Medizinische Statistik in Jena für die Unterstützung in Bezug auf die statistische Fragestellungen bedanken.

Vielen Dank auch an Herrn P. Westenberger, der durch seine intensive Mitarbeit an der Software Avizo[®] die Etablierung des Jahresring-Algorithmus als entsprechendes Modul ermöglicht hat.

Meiner Frau, meinem Sohn sowie meinen Eltern danke ich für ihre Geduld sowie die tatkräftige moralische Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation.

9.11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD. G. Schneider, Dr. A. Enkelmann, Dr. T. Lehmann, D. Linde, S. Voigt , M.Becker, A. Strecker.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Apen, 20.10.2021

Stefan Kottke