

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. Norbert Kübler

Molybdän als potenziell resorbierbares Osteosynthesematerial in
der Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie -
Biokompatibilität und Degradationsverhalten in
In-Vitro- und *In-Vivo*-Untersuchungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dr. med. André Toschka 2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöckner

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Majeed Rana

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Sajjad Muhammad

Gewidmet meinen Eltern und Lou.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Toschka, A.; Pöhle, G.; Quadbeck, P.; Suschek, C.V.; Strauß, A.; Redlich, C.; Rana, M. *Molybdenum as a Potential Biocompatible and Resorbable Material for Osteosynthesis in Craniomaxillofacial Surgery—An In Vitro Study*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15710. (1)

Toschka, A.; Möllmann, H.; Hoppe, D.; Poehle, G.; van Meenen, L.; Seidl, M.; Karnatz, N.; Rana, M. *How Does the Biocompatibility of Molybdenum Compare to the Gold Standard Titanium?—An In Vivo Rat Model*. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 6312. (2)

Zusammenfassung

Titan wird aufgrund seiner hohen Stabilität und hervorragenden Biokompatibilität als Goldstandard der Osteosynthesematerialien angesehen. Ein wesentlicher Nachteil ist jedoch die häufig notwendige zweite Operation zur Entfernung des zuvor eingebrachten Materials. Dies kann besonders in der pädiatrischen Chirurgie zu erheblichem physischen und psychischen Stress führen. Resorbierbare Systeme aus Polymeren oder Magnesium weisen oft Fremdkörperreaktionen oder unbefriedigendes Abbauverhalten auf.

Das Ziel dieser experimentellen Arbeiten war daher, Molybdän als potenziell bioresorbierbares Metall für die Osteosynthese in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie zu untersuchen.

Um Molybdän genauer zu charakterisieren, wurden *In-vitro*-Versuche gemäß der ISO-Norm 10993-5 durchgeführt. In verschiedenen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass Molybdän keine Zytotoxizität verursacht. Zusätzlich wurde das Degradationsverhalten von Molybdän durch Langzeittauchversuche mit Molybdänblechen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Molybdän unter simulierten physiologischen Bedingungen über mindestens sechs Monate hinweg ausreichende mechanische Stabilität aufweist und einer sehr gleichmäßigen Degradation unterliegt.

Des Weiteren wurde die Biokompatibilität und Degradation von Molybdän im Vergleich zum Goldstandard Titan an insgesamt 96 Ratten untersucht. Hierbei wurde jedem Tier je ein Plättchen aus einem der beiden Materialien in die Nackenfalte implantiert. Die Tiere wurden bis zu einem Jahr lang täglich klinisch untersucht. Nach der Euthanasie wurden umfangreiche histopathologische Proben entnommen und ausgewertet.

Sowohl klinisch als auch histopathologisch konnten für Molybdän im Vergleich zu Titan keine signifikanten Entzündungszeichen festgestellt werden. Molybdän zeigte sich demnach biokompatibel. Überraschenderweise war die Degradation des Molybdäns *in vivo* deutlich geringer als in den *In-vitro*-Versuchen. Dies sollte in weiteren Experimenten genauer eruiert werden.

Abstract

Because of its exceptional biocompatibility and great stability, titanium is widely used in osteosynthesis and is considered the gold standard in this field. The main disadvantage of titanium is that it frequently requires a second operation to remove the implanted material. This is especially problematic in pediatric surgery, as young patients may experience severe physical and psychological stress following a second procedure. While resorbable systems made of polymers or magnesium are available, they often lead to foreign body reactions or exhibit unsatisfactory degradation behavior.

Therefore, the purpose of this work was to describe molybdenum as a possible novel biodegradable metal for use in Oral-, Maxillo- and Plastic Facial Surgery.

To evaluate molybdenum's biocompatibility, various in-vitro tests were performed in accordance with ISO standard 10993-5. Various test series demonstrated that molybdenum does not cause cytotoxicity. Additionally, long-term immersion tests with molybdenum sheets were conducted to investigate degradation behavior. Results indicated that molybdenum maintains sufficient mechanical stability for at least six months and degrades uniformly.

Further, the biocompatibility and degradation of molybdenum compared to titanium were tested in vivo using 96 rats. Each animal had a platelet of either molybdenum or titanium implanted into the neck fold. The rats were clinically examined daily for up to one year. Following euthanasia, extensive histopathological samples were collected and analyzed.

Clinically and histopathologically, no significant signs of inflammation were observed in comparison to titanium, confirming molybdenum's biocompatibility. However, the in vivo degradation rates of molybdenum were significantly lower than those observed in vitro, necessitating further investigation in follow-up studies.

Abkürzungsverzeichnis

CAD	<i>Computer-aided design</i>
CAM	<i>Computer-aided manufacturing</i>
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
E-Modul	Elastizitäts-Modul
GPa	Gigapascal
IFAM	Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung (Dresden, Deutschland)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
mPa	Millipascal
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Levels</i>
PSI	<i>patient specific implant</i>
PGA	<i>poly- (glycolic acid)</i>
PLA	<i>poly- (lactic acid)</i>
PLGA	Co-Polymere aus PGA und PLA
PLLA	L-Isomer von PLA
PDLLA	<i>poly- (DL-lactide)</i>
SLM	<i>Selective Laser Melting</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf, Deutschland)
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Osteosynthese in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie	1
1.2 Osteosynthesematerialien	3
1.2.1 Titan	4
1.2.2 Resorbierbare Osteosynthesematerialien	6
Polymere	6
Metallische resorbierbare Osteosynthesematerialien.....	7
Magnesium	7
Eisen und Zink.....	9
Wolfram.....	9
Molybdän	10
1.3 Biokompatibilität	12
1.4 Tierversuchsantrag	13
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	14
 2. Molybdenum as a Potential Biocompatible and Resorbable Material for Osteosynthesis in Craniomaxillofacial Surgery—An In Vitro Study, Toshka, A.; Pöhle, G.; Quadbeck, P.; Suschek, C.V.; Strauß, A.; Redlich, C.; Rana., International Journal of Molecular Sciences, 2022. 23(24): p. 1571	 16
 3. How Does the Biocompatibility of Molybdenum Compare to the Gold Standard Titanium?—An In Vivo Rat Model, Toshka, A.; Möllmann, H.; Hoppe, D.; Poehle, G.; van Meenen, L.; Seidl, M.; Karnatz, N.; Rana, M., Applied Sciences, 2023. 13(101): p. 6312.	 17
 4. Diskussion	 18
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der In-vitro-Versuche	18
4.2 Diskussion der In-vitro-Versuche	19
4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der In-vivo-Versuche.....	21
4.4 Diskussion der In-vivo-Versuche	22
4.5 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick	23
4.6 Schlussfolgerung.....	27
 5. Literaturverzeichnis	 28

1. Einleitung

1.1 Die Osteosynthese in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie

Das Prinzip der Osteosynthese hat in der modernen Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie eine enorme Bedeutung. Zum einen spielt diese Art der Frakturversorgung in der operativen Therapie von Mittelgesichts- und Unterkieferfrakturen eine große Rolle (3). Darüber hinaus sind moderne Osteosyntheseverfahren die Grundlage dafür, dass Eingriffe wie Umstellungsosteotomien des Ober- und Unterkiefers sowie die operative Korrektur von Kraniosynostosen in der heutigen Form durchgeführt werden können (4). Des Weiteren ermöglichen Osteosynthesysteme komplexe knöcherne Rekonstruktionen im Rahmen von Tumoroperationen (5).

Im Wesentlichen geht es bei der Osteosynthese um die Verwendung verschiedener Kraftträger wie Schrauben, Platten, Nägel, Drähten oder externen Fixateuren, um gebrochene Knochenfragmente zu repositionieren und zu fixieren, damit diese in der richtigen anatomischen Position heilen können (6). Dabei ist das übergeordnete Ziel, reponierte Knochenfragmente direkt aufeinander stehend unter Kompression zu fixieren, um die Voraussetzung für eine primäre Knochenheilung zu ermöglichen (3).

Die vier Grundprinzipien sind dabei die anatomische Knochenreposition, die stabile Fixierung der Fragmente, der Erhalt der Durchblutung und die Sicherstellung einer frühen Funktion (7). Diese Grundprinzipien haben sich in den letzten Jahren wenig verändert. Dennoch konnte über die letzten Jahrzehnte eine kontinuierliche Weiterentwicklung in Bezug auf die Art der Osteosynthesysteme, die verwendeten Materialien und die operativen Techniken beobachtet werden.

Die Frakturversorgung im Bereich des Gesichtsschädels hat eine weitreichende Historie. Die Ursprünge der ersten konservativen Frakturbehandlungen des Gesichtsschädels lassen sich dabei bis zu *Hippokrates* in der Wende vom 5. zum 4. Jahrhundert v. Chr. zurückverfolgen. Damals wurden avulsierte Zähne nach

Repositionierung mittels Golddrahtligaturen an den noch feststehenden Zähnen fixiert (8).

Über viele Jahrhunderte wurden Frakturen, vor allem im Bereich des Unterkiefers konservativ mittels verschiedener Arten von temporären maxillo-mandibulären Schienungen mit Splinten und/oder Drahtligaturen versorgt (9). Hierbei wurden lange Zeit vor allem Zahnärztinnen und Zahnärzte tätig, weil diese in der Handhabung mit den gängigen Materialien, wie beispielsweise Kautschuk, die größte Expertise aufwiesen (8).

Revolutioniert wurde die Frakturversorgung schließlich durch die Erfindung und Anwendung von Plattenosteosynthesen. Hier gilt Carl Hansmann als Erfinder der Plattenosteosynthese, welche er erstmals 1886 vorstellte (10). Aufgrund hoher Komplikationsraten konnte sich dieses System im Bereich der Frakturversorgung der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie jedoch zunächst nicht durchsetzen. Luhr nahm das durch Danis (11) entworfene Konzept der axialen Kompression auf und entwickelte 1968 eine selbstspannende Kompressionsplatte (12). Dadurch wurde das Prinzip der axialen Kompression durch Osteosynthese auch im Bereich der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie anatomisch sinnvoller umsetzbar. Neben der Kompressionsosteosynthese entwickelte sich in den 1970er Jahren ebenfalls das Verfahren der Osteosynthese bei Unterkieferfrakturen mit Miniplatten und monokortikalen Schrauben, welches vor allem durch Michelet *et al.* sowie Champy *et al.* vorangetrieben wurde (13,14) und so noch heute zur Versorgung von Unterkieferfrakturen verwendet wird. 1976 publizierte Härle seine Arbeiten zur Miniplattenosteosynthese am Jochbein (15). Ebenfalls in den 1970er- und 1980er-Jahren publizierten zahlreiche Chirurgen ihre Erfolge mit Plattenosteosynthesen im Bereich der Versorgung von zentralen Mittelgesichtsfrakturen und im Bereich der Orthognathen Chirurgie (16-19).

Auch im Bereich der sogenannten kraniofazialen Chirurgie, welche sich auf die Operation von Anomalien des Gesichts und Schädels bezieht, markierte die Einführung der Plattenosteosynthese einen neuen Meilenstein, indem sie die zuvor üblichen Techniken mit Drähten ersetzte und komplexere dreidimensionale Rekonstruktionen ermöglichte. So berichtete Luhr 1986 über die Korrektur des

Schädeldachs mittels autologen Knochentransplantaten und Miniplattensystemen (20). Im Verlaufe wurden ebenfalls durch Luhr die Mikroplattensysteme eingeführt und weiterentwickelt (21,22), womit er den Grundstein für die heutige operative Versorgung von Kraniosynostosen legen konnte.

Neben der stetigen Weiterentwicklung des Designs der Osteosynthesysteme konnte in den letzten Jahren zunehmend die sogenannte computerassistierte Chirurgie, im Englischen als *Computer-aided design (CAD) und Computer-aided manufacturing (CAM)* bezeichnet, etabliert werden (23). Vor allem im Bereich komplexer Rekonstruktionen kommen heute vermehrt digital geplante und individuell hergestellte, sogenannte patientenspezifische Implantate (PSI) zum Einsatz. So zeigten Rana *et al.*, dass komplexe Frakturen der Orbita routinemäßig mit einem hohen Maß an Genauigkeit durch den Einsatz von PSI versorgt werden können (24). Auch im Bereich der komplexen Rekonstruktion von kraniofazialen Fehlbildungen konnte sich die digitale Planung in den letzten Jahren zunehmend etablieren (25-27).

Neben den zahlreichen oben genannten Innovationen im Bereich der Planung und des Designs der Osteosynthesysteme spielt vor allem die Erforschung und Entwicklung geeigneter Materialien eine entscheidende Rolle (28).

1.2 Osteosynthesematerialien

In der modernen Traumatologie werden verschiedene Materialien für die Osteosynthese verwendet (29). Generell wird zwischen den klassischen, nicht resorbierbaren und den resorbierbaren Osteosynthesematerialien unterschieden (30). Titan stellt dabei das klassische nicht resorbierbare Material als Grundlage für Osteosynthesysteme dar und ist im Allgemeinen als der Goldstandard bekannt (29). Materialien aus Polymeren und Magnesium hingegen gelten als zwei Vertreter der bioresorbierbaren Materialien (30).

Die Anforderungen an diese Osteosynthesematerialien im Allgemeinen und vor allem auch im Bereich des Fachgebietes der Mund-, Kiefer- und plastischen

Gesichtschirurgie sind dabei hoch und komplex. Neben hervorragenden mechanischen Eigenschaften mit ausreichender Stabilität müssen diese Materialien eine ausreichende Biokompatibilität sowie eine adäquate intraoperative Handhabung aufweisen (6,30). Dabei sollten die operativen Eingriffe möglichst minimalinvasiv, die Fixierung der Reposition dauerhaft stabil und das Risiko von Komplikationen gering sein.

Während bei klassischen Osteosynthesematerialien die Stabilität und Biokompatibilität die entscheidenden Faktoren darstellen, müssen bioresorbierbare Materialien zusätzlich zu den oben genannten Eigenschaften auch noch eine gleichmäßige und dem Heilungsprozess des Knochens angepasste Resorption aufweisen (31).

Ein biologisch abbaubares Osteosynthesesystem sollte hauptsächlich zwei Kriterien erfüllen, um als ein solches System verwendet werden zu können. Das Biomaterial sollte mit dem Wirtsgewebe biokompatibel sein und die mechanischen Eigenschaften sollten für eine stabile Fixierung von Fraktur- oder Osteotomiesegmenten während des chirurgischen Eingriffs und während des Abbaus des Biomaterials ausreichen. Dabei sollte die Belastung allmählich auf den heilenden Knochen übertragen werden (31).

Die zentralen Herausforderungen bei der Entwicklung der resorbierbaren Osteosynthesematerialien bestehen weiterhin in den kritischen Defiziten hinsichtlich Biokompatibilität und Stabilität (30).

1.2.1 Titan

Titan und seine Legierungen gelten im Fachgebiet der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie als der Goldstandard für Osteosynthesematerialien zur Versorgung von Unterkiefer- und Mittelgesichtsfrakturen (29). Darüber hinaus werden Systeme aus Titan auch im Bereich der Orthognathen Chirurgie und in der operativen Korrektur von Kraniosynostosen verwendet (4).

Titan weist eine ausreichende Biokompatibilität und hervorragende mechanische Eigenschaften mit hohem Widerstand gegen Korrosion auf (32). Die häufig verwendeten Kombinationen aus Titanplatten und -schrauben verfügen über hervorragende mechanische, sowie Handhabungseigenschaften und bieten eine angemessene Knochenstabilität mit klinisch akzeptablen Platten- und Schraubendimensionen (30). Aufgrund der großen Fortschritte der letzten Jahrzehnte ist mit den heutigen modernen Plattensystemen aus Titan nach Versorgung von Unterkieferfrakturen in der Regel keine starre maxillo-mandibuläre Fixierung mehr erforderlich (33,34).

Obwohl Titan, wie oben beschrieben, ausgezeichnete biomechanische Eigenschaften sowie eine allgemein sehr gute Biokompatibilität aufweist, werden in der Literatur immer wieder auch unerwünschte Ereignisse beschrieben. Dazu zählen beispielsweise allergische Reaktionen und Immunreaktionen (35-37). Zudem verursachen Titanimplantate häufig ausgeprägte Störartefakte bei der Untersuchung mit den üblichen bildgebenden Verfahren in Form des sogenannten „*Starburst-Phänomens*“ (38). Dies erschwert die radiologische Tumornachsorge bei zuvor operierten Patienten mit eingebrachten Implantaten teils erheblich. Weitere in der Literatur beschriebene Nachteile von Titansystemen sind die Temperaturempfindlichkeit (39), das taktile Empfinden von Platten und Schrauben (40) und mögliche ossäre Wachstumseinschränkungen im Kindesalter (41,42). Dies erschwert die Festlegung des idealen Zeitpunkts der Metallentfernung bei Kindern und Jugendlichen. Einige Untersuchungen konnten außerdem das Vorhandensein von Titanpartikeln im umliegenden Gewebe nachweisen (43-45).

Aus all diesen genannten Gründen ist häufig eine zweite Operation zur Entfernung des zuvor eingebrachten Osteosynthesematerials notwendig (30,46). Deren Durchführung wird meist in einem Zeitraum von sechs bis neun Monaten nach der ersten Operation empfohlen. Insbesondere im Bereich der pädiatrischen Chirurgie ist die notwendige Entfernung des Osteosynthesematerials als großer Nachteil zu sehen (47,48). Neben dem Risiko allgemeiner intra- und postoperativer Komplikationen wie Infektionen und einer zweiten Vollnarkose stellt ein zweiter operativer Eingriff gerade für sehr junge Patienten eine physische und auch psychische Belastung dar (49). Darüber

hinaus belastet eine zweite notwendige Operation zur Metallentfernung die Kapazitäten der Krankenhäuser und bedeutet einen wirtschaftlichen Mehraufwand für das Gesundheitssystem.

Daher besteht insbesondere für junge Patienten in der physischen und psychischen Entwicklungsphase ein hoher Bedarf an bioresorbierbaren Materialien für Osteosynthesen.

1.2.2 Resorbierbare Osteosynthesematerialien

Generell kann man zwischen den zwei großen Gruppen der metallischen resorbierbaren und nichtmetallischen resorbierbaren Materialien für die Herstellung von Osteosynthesematerialien unterscheiden.

Polymere

Die meisten der offiziell zugelassenen nicht metallischen bioresorbierbaren Implantate bestehen aus synthetischen Polymeren, welche aus zuckerhaltigen Derivaten aufgebaut sind (50). Die Implantate aus Polymeren sind grundsätzlich so konzipiert, dass sie *in vivo* durch Hydrolyse abgebaut werden. Die ersten dieser Systeme für Osteosynthesen in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie sind seit den späten 1980er Jahren erhältlich (51). Die große Herausforderung in der Konzeption dieser Materialien liegt in der Balance zwischen der Geschwindigkeit des Abbaus und der Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität (52).

Platten und Schrauben aus dem L-Isomer von PLA (PLLA) besitzen aufgrund ihrer hydrophoben, kristallinen Beschaffenheit eine hohe Festigkeit und Haltbarkeit, die einer Degradation widerstehen (53). Allerdings neigt PLLA zu Fremdkörperreaktionen, einschließlich der Bildung steriler Abszesse. Dies erfordert letztendlich nicht selten die Entfernung des eingebrachten Materials (54). Polyglykol-Copolymere (PGA) hingegen weisen deutlich hydrophilere Eigenschaften auf, neigen aber dazu, sich relativ schnell und häufig zu zeitig abzubauen. Daher verfügen sie in der Regel nicht über die entsprechende

Festigkeit, um die Knochenheilung zu unterstützen, selbst in weniger stark belasteten ossären Bereichen wie dem kraniofazialen Skelett (30). Aus diesem Grund versuchen die meisten aktuellen Platten- und Schraubensysteme, die positiven Eigenschaften beider Materialien zu kombinieren. Diese sogenannten Co-Polymere aus PGA und PLA (PLGA) wie zum Beispiel RapidSorb® (DePuy Synthes CMF, West Chester, PA, USA), LactoSorb® (Biomet Inc., Jacksonville, FL, USA) oder Resorb-X® (KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland) (PDLLA) werden bisher vor allem in der kraniofazialen Chirurgie eingesetzt (52).

Obwohl diese oben genannten resorbierbaren Osteosynthesysteme aus Polymeren mittlerweile verwendet werden, werden auch immer wieder Komplikationen wie beispielsweise Fremdkörperreaktionen beschrieben (55). Außerdem weisen diese Osteosynthesysteme im Vergleich zu denen aus Titan eine deutlich geringere Stabilität auf (56). So zeigen verschiedene Veröffentlichungen, dass Polymerimplantate ein niedrigeres Elastizitätsmodul (E-Modul) und eine geringere mechanische Festigkeit als kortikaler Knochen aufweisen (57,58). Daher ist ihre Anwendung eher auf weniger lasttragende Knochenbereiche begrenzt (59).

Metallische resorbierbare Osteosynthesematerialien

Bisher wurden vorwiegend vier Metalle als potenzielle resorbierbare Materialien für Osteosynthesysteme und andere medizinische Anwendungen untersucht: Magnesium, Eisen, Zink und Wolfram.

Magnesium

Magnesium ist bereits seit Jahrzehnten als potenziell resorbierbares Metall für die Anwendung von Osteosynthesematerialien bekannt (60,61). Aufgrund ihrer in der Theorie ausgezeichneten Biokompatibilität und vollständigen Resorbierbarkeit wurden Implantate aus Magnesium in zahlreichen Studien untersucht (62). Die rasche Korrosion von reinem Magnesium in einer

physiologischen Umgebung kann jedoch dazu führen, dass die mechanische Integrität des Implantats beeinträchtigt wird, noch bevor das Knochengewebe vollständig verheilt ist (62). Infolgedessen können die Anforderungen, die mit der Implantation im Bereich des Knochens verbunden sind, nicht vollständig erfüllt werden. Um die Eigenschaften des reinen Magnesiums zu verbessern, wurden zahlreiche Studien zu verschiedenen Legierungen durchgeführt. So untersuchten Zheng *et al.* und Ding *et al.* intensiv verschiedene Legierungen und Fertigungsverfahren zur Verbesserung der Zersetzungseigenschaften von Magnesium (63,64).

Die ersten zugelassenen resorbierbaren Metallimplantate wurden schließlich aus Magnesium-Legierungen hergestellt, wie z.B. die Magnezix®-Knochennägel und -schrauben (65,66) (Syntellix AG, Hannover, Deutschland) oder das Magmaris®-Stent-System (67) (Biotronik AG, Bülach, Schweiz). Jedoch konnten auch bereits zugelassene Produkte noch keine vollends zufriedenstellenden Ergebnisse liefern (46). Die schnelle und vergleichsweise ungleichmäßige Korrosion, welche mit einer Wasserstoffgasentwicklung einhergeht, sowie die geringe mechanische Festigkeit und das niedrige E-Modul schränken eine breite Verwendung von Magnesium-Legierungen immer noch ein (62). Insbesondere die Lochfraßkorrosion führt häufig zu unerwünschten Ergebnissen (63). Dies erschwert die Vorhersage der Zeit bis zum Versagen eines Implantats unter erheblicher mechanischer Belastung. Die deutlich geringere mechanische Festigkeit von Magnesiumlegierungen im Vergleich zu Edelstahl oder Titan führt auch zu größeren Abmessungen der Implantate. Dies schränkt die Verwendung im Fachgebiet der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie ein (46). Darüber hinaus sind Osteosynthesysteme auf Magnesiumbasis in der röntgenbasierten medizinischen Bildgebung wegen der niedrigen Ordnungszahl und Dichte von Magnesium schwer zu erkennen. Dies erschwert die Beurteilung der postoperativen Röntgenkontrollen nach Frakturversorgung.

Eisen und Zink

Eisenlegierungen zeigen beeindruckende Merkmale in Bezug auf erhöhte Belastbarkeit, kombiniert mit hoher Zähigkeit und potenziell geringen Zersetzungsraten. Dennoch wird die klinische Anwendung hochfester, resorbierbarer Eisenmaterialien durch die äußerst langsame *In-vivo*-Degradation aufgrund der Bildung unlöslicher Korrosionsprodukte beeinträchtigt (68). Verschiedene Versuche des Legierens, alternativer Herstellungsverfahren, der Gefügemodifikation oder der Zugabe von korrosionsfördernden Werkstoffen zeigen teils sehr positive Ansätze. So gibt es einige vielversprechende Ergebnisse für polymerbeschichtete und nitrierte Eisenstents mit verbesserter Abbaugeschwindigkeit und Zersetzung der Korrosionsprodukte (69,70). Eine klinische Translation konnte bisher jedoch noch nicht vollends gelingen.

Zink als vergleichsweise neues potenzielles bioresorbierbares Material zeigt moderate Korrosionsraten und hervorragende mechanische Eigenschaften. Grob gesagt gliedert sich Zink mit seinen Eigenschaften zwischen denen von Magnesium und Eisen ein (71). Diese Kombination macht Zink zu einem sehr interessanten Material für die Herstellung von bioresorbierbaren Implantaten, vor allem im Bereich der internen Fixierung von Frakturen an besonders belasteten Stellen des menschlichen Körpers (72,73). Bis zur vollständigen Translation in den klinischen Alltag müssen trotz vieler sehr positiver Ansätze jedoch vermutlich noch viele weitere Forschungsarbeiten durchgeführt werden. (73).

Wolfram

Ein weiteres potenziell resorbierbares Material stellt Wolfram dar. Bereits in den 1990er Jahren wurden Spulen aus reinem Wolframdraht zur Behandlung intrakranieller Aneurysmen verwendet. Beginnend mit einem Artikel von Weill *et al.* im Jahr 1998 wurden jedoch Beobachtungen über den Verlust der Röntgensichtbarkeit von implantierten Wolframspulen über ein bis drei Jahre veröffentlicht (74-76). Kampmann *et al.* zeigten, dass bei 60 Prozent der implantierten Wolfram-Coils innerhalb von drei Jahren ein vollständiger Verlust

der Röntgensichtbarkeit eintritt. Dies deutet gleichzeitig auf eine vollständige Degradation hin (77). Nachfolgende Studien zeigten eine deutliche Degradation und Rissbildung von Wolframspiralen in einem Kaninchenmodell in einem Zeitraum von vier Monaten (78). Unmittelbare negative Auswirkungen von gelöstem Wolfram im Blutserum, wie z. B. eine systemische Toxizität, wurden weder bei Patienten noch in Tierstudien beobachtet. Die *In-vitro*-Zytotoxizität wurde als gering eingestuft (79), was die Möglichkeit der Verwendung von Wolfram für biologisch abbaubare Implantate nahelegte. Wolfram kommt im menschlichen Körper jedoch nicht physiologisch vor. Dies lässt Bedenken hinsichtlich der langfristigen Biokompatibilität aufkommen. Ein stetiger Anstieg des Wolframspiegels im Blutserum in den Studien deutet auf eine langsame physiologische Regulierung des Wolframspiegels hin. Hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften schränkt die geringe Duktilität von reinem Wolfram die Möglichkeiten der Herstellung und die Verwendung für Implantate mit hoher Belastung ein (80,81).

Molybdän

Am Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung (IFAM) in Dresden wurden in den letzten Jahren zahlreiche Werkstoffe auf ihre Tauglichkeit als potenziell resorbierbares Osteosynthesematerial getestet. Dabei wurde Molybdän als besonders geeigneter Werkstoffkandidat identifiziert (82).

Das Element Molybdän wurde Ende des 18. Jahrhunderts von dem schwedischen Chemiker Carl Wilhelm Scheele entdeckt (83). Der Name Molybdän leitet sich von dem griechischen Wort „*molybdos*“ ab, welches übersetzt „Blei“ bedeutet. Es handelt sich bei Molybdän um ein silbrig-weißes Metall, welches aufgrund seiner Eigenschaften in verschiedenen Industriezweigen und in biologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Als Übergangsmetall ist es aufgrund seiner hohen Schmelztemperatur von 2.623 Grad Celsius (4.753 Grad Fahrenheit) in der Lage, extremen Temperaturen standzuhalten, was es z.B. für mechanische Hochtemperaturanwendungen besonders geeignet macht (84). Darüber hinaus ist Molybdän ein Spurenmetall,

das an zahlreichen enzymatischen Prozessen im menschlichen Körper beteiligt ist und für diese benötigt wird (85). In ersten wissenschaftlichen Veröffentlichungen wird Molybdän als bioresorbierbares Material mit hoher Festigkeit und geeigneten mechanischen Eigenschaften beschrieben (82). Molybdän zeigt eine beeindruckende Zugfestigkeit von nahezu 1400 MPa und besitzt ein E-Modul von ca. 320 GPa. Im Vergleich dazu weist beispielsweise 316L-Edelstahl eine Zugfestigkeit von 340 MPa und ein Elastizitätsmodul von 193 GPa und damit eine deutlich geringere mechanische Festigkeit auf (86). Diese Materialeigenschaften, gepaart mit einer ausgezeichneten Bruchdehnung sowie einem hervorragenden Ermüdungsverhalten machen Molybdän äußerst interessant für Anwendungen mit lasttragenden Implantaten (87).

Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur Gruppe VI des Periodensystems der Elemente weisen Molybdän und Wolfram eine gemeinsame Valenzelektronenkonfiguration auf und sind daher chemisch ähnlich strukturiert. Dementsprechend konnte nachgewiesen werden, dass Molybdän sich in verschiedenen physiologischen Salzlösungen *in vitro* ebenfalls auflöst. Die Abbaugeschwindigkeit variierte dabei je nach Art der verwendeten Lösung und der Form der untersuchten Proben im Bereich von 0,6 bis 18 μm pro Jahr. Interessanterweise trat in diesen Untersuchungen keine Lochfraßkorrosion auf (88).

Hinsichtlich der Verwendung als abbaubares Biomaterial hat Molybdän jedoch zwei Vorteile gegenüber Wolfram. Erstens ist Molybdän ein homöostatisch reguliertes, essenzielles Element des menschlichen Körpers (85). Dabei beträgt die Gesamtmenge an Molybdän im menschlichen Körper ca. 10-15 mg. Der Molybdänspiegel wird durch die Ausscheidung über die Nieren reguliert. Eine erhöhte Molybdän-Aufnahme führt zu einer erhöhten renalen Ausscheidung (89). Auf der Grundlage eines *No Observed Adverse Effect Levels (NOAEL)* von 0,9 mg/d pro kg Körpergewicht wurde für den Menschen eine empfohlene obere Zufuhrmenge von 0,6-2 mg/d festgelegt (90). In bisherigen Studien zeigte sich, dass Molybdän weder mutagen, kanzerogen oder teratogen ist (91,92). *In vitro* erwiesen sich die Thrombogenität und die Entzündungsreaktion als ähnlich wie bei 316L-Edelstahl, während die Toxizität für Koronararterien-Endothelzellen und glatte Koronararterien-Muskelzellen als gering eingestuft wurde (93). Es ist daher

zu erwarten, dass die langfristige Biokompatibilität eines abbaubaren Molybdänimplantats besser wäre als die von Wolfram.

Darüber hinaus ist reines Molybdän mit einem feinkörnigen Gefüge wesentlich duktiler als Wolfram. Als Maß für die Duktilität kann die Bruchdehnung 40 bis 50 Prozent betragen (87). Die Kontrolle von Verunreinigungen im Material ist dabei entscheidend für gute mechanische Eigenschaften (94). Ein sprödes Versagen eines Implantats aus Molybdän bei hohen Belastungen ist daher weniger zu befürchten.

In vorherigen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass Molybdän eine suffiziente Radioopazität aufweist und in der Computertomographie ausreichend darstellbar ist (95). Außerdem sind Implantate aus Molybdän durch das SLM (*Selective Laser Melting*) -Verfahren zu produzieren. Damit liegen die Voraussetzungen für eine digitale patientenindividuelle Planung und Herstellung von patientenspezifischen Implantaten aus Molybdän vor.

1.3 Biokompatibilität

Der Begriff der Biokompatibilität wurde erstmals 1970 von Hegyeli und Homsy etabliert (96). Im Laufe der Jahre kursierten verschiedenste Definitionen. Die letztendlich am häufigsten zitierte Definition wurde auf der Konsenskonferenz über Biomaterialien 1986 in Chester festgelegt. Hier wurde Biokompatibilität als „die Fähigkeit eines Materials, in einer bestimmten Anwendung mit einer angemessenen Reaktion des Wirts zurechtzukommen“, definiert (97).

Diese Definition zeigte sich jedoch als eher unpräzise und in der Medizin als nicht besonders hilfreich. Daher definierte Williams den Begriff 2008 erneut. Danach bezieht die Biokompatibilität sich auf die „Fähigkeit eines Biomaterials, die gewünschte Funktion im Zusammenhang mit einer medizinischen Therapie zu erfüllen, ohne unerwünschte lokale oder systemische Wirkungen beim Empfänger dieser Therapie hervorzurufen, sondern die geeignetste positive Zell- oder Gewebereaktion in dieser spezifischen Situation zu erzeugen und die klinisch relevante Leistung dieser Therapie zu optimieren“ (98).

Die Messungen zur Validierung dessen, was wir üblicherweise als Biokompatibilität bezeichnen, lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Nämlich in die Bewertung der Substanzen, die aus dem Biomaterial oder der Vorrichtung austreten und in die ihrer Auswirkungen auf lebende Zellen oder Organismen sowie die Messung der biologischen Reaktion auf das Biomaterial bei der Implantation in einen lebenden Organismus (99).

Implantierte Materialien verursachen eine initiale Antwort des Wirts in Form von Entzündungsreaktion, Zellvermehrung und Geweberemodellation (100). Im speziellen Fall der bioresorbierbaren Materialien muss der Effekt der Abbauprodukte auf das umliegende Gewebe ebenfalls beachtet werden (31). Die Wirtsreaktion des Organismus wird sowohl durch das angeborene als auch durch das adaptive Immunsystem vermittelt. Insbesondere Makrophagen spielen bei der initialen Immunantwort auf die wichtigsten angeborenen Immunzellen während der Wirtsreaktion eine Rolle.

Subkutane, intramuskuläre und andere Implantationstests befassen sich mit dieser lokalen *In-vivo*-Reaktion auf Implantate. Solche Tests werden in DIN EN ISO 10993-6:2017-09 und in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (99). Implantate werden nach der Implantation (in der Regel bei Mäusen, Ratten oder Kaninchen) in einen dünnen, avaskulären, azellulären, nicht anhaftenden Kollagenbeutel eingekapselt (100). Die Implantationsstelle sollte sich makroskopisch zum Nachweis der Biokompatibilität also nur geringfügig verändert zeigen. Die klassischen Entzündungszeichen, sowie Abszesse oder andere Lokalreaktionen sollten nur sehr milde und temporär ausgeprägt sein. Mikroskopisch sollten nur wenige Makrophagen und Riesenzellen erkennbar sein. Unter Beachtung dieser Punkte kann ein Implantat nach gängigen Kriterien als biokompatibel bezeichnet werden (99).

1.4 Tierversuchsantrag

Alle beschriebenen Tierversuche wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-

Heine-Universität (Düsseldorf, Deutschland) unter der Aufsicht des Tierschutzbeauftragten Professor Dr. Martin Sager durchgeführt.

Alle Versuchsinhalte wurden vorab vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen **81-02.04.2021.A029**) genehmigt.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Während sich die grundlegenden Prinzipien der Osteosynthese seit Jahrzehnten wenig verändert haben, gab es durch die stetige Weiterentwicklung im Bereich der Osteosynthesysteme und der Osteosynthesematerialien deutliche Verbesserungen im Bereich der Frakturversorgung (3). Dabei etablierten sich Titan und dessen Legierungen als der absolute Goldstandard für Osteosynthesematerialien. Darüber hinaus zeigten sich zunehmend neue Erkenntnisse und Entwicklungen im Bereich der resorbierbaren Osteosynthesematerialien. Aktuell werden vor allem auf Polymeren basierende Systeme und Materialien aus Magnesium für resorbierbare Osteosynthesen verwendet (29).

Da auch diese Materialien immer noch teils gravierende Nachteile aufweisen, besteht nach wie vor ein großer Bedarf der Erforschung neuer, resorbierbarer Osteosynthesematerialien. Dabei wurde unsere Arbeitsgruppe gemeinsam mit dem Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und angewandte Materialforschung (IFAM) in Dresden auf das potenziell resorbierbare Metall Molybdän aufmerksam.

Mit den hier dargestellten Versuchsreihen sollte der erste Schritt für eine detailliertere Charakterisierung von Molybdän als potenziell resorbierbares Material für die Osteosynthese in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie erfolgen.

Das Ziel der durchgeführten Arbeiten war es daher, die *In-vitro*-Biokompatibilität von Molybdän mit verschiedenen Zelltypen in Übereinstimmung mit der DIN EN

ISO 10993-5:2009-10 (101) nachzuweisen. Dazu sollten verschiedene Assays mit Mäusefibroblasten, humanen Fibro- und Osteoblasten durchgeführt werden. Darüber hinaus sollten in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und angewandte Materialforschung (IFAM) *In-vitro*-Langzeitexperimente durchgeführt werden, um die mechanische Stabilität, sowie die Abbaugeschwindigkeit von Molybdänblechen in Zeiträumen von bis zu sechs Monaten zu simulieren und auszuwerten.

Ein weiteres Ziel der Experimente war der Nachweis der Biokompatibilität und Analyse des Degradationsverhaltens von Molybdän in einem komplexen Organismus eines Säugetiers. Dazu sollten Metallplättchen aus reinem Molybdän in die Nackenfalten von Wistar-Ratten implantiert werden. Als Kontrollmaterial zu Molybdän sollte hier der Goldstandard Titan dienen. Dabei sollte das Hauptaugenmerk auf die klinische und histopathologische Entzündungsreaktion gelegt werden, um die Biokompatibilität nach den oben genannten Kriterien im Vergleich zu Titan nachweisen zu können. Außerdem sollten Nieren, Lebern und Milz der Tiere histopathologisch auf relevante pathologische Veränderungen und/oder Molybdänablagerungen untersucht werden. In metallographischen Analysen sollte die genaue Degradationsgeschwindigkeit des Molybdäns bestimmt werden.

Zusammengefasst sollten also folgende **Hypothesen** untersucht werden:

1. Molybdän zeigt in *In-vitro*-Versuchen nach DIN EN ISO 10993-5:2009-10 keine signifikante Zytotoxizität.
2. Molybdänbleche zeigen unter simulierten physiologischen Bedingungen eine gleichmäßige Degradation mit relevantem Stabilitätsverlust nach ca. 6 Monaten.
3. Molybdän zeigt im Vergleich zum Goldstandard Titan keine signifikante lokale oder systemische Entzündungsreaktion im komplexen Organismus des Säugetiers.
4. Molybdän zeigt *in vivo* eine gleichmäßige Degradation mit relevantem Stabilitätsverlust nach ca. 6 bis 9 Monaten.

2. Molybdenum as a Potential Biocompatible and Resorbable Material for Osteosynthesis in Craniomaxillofacial Surgery—An In Vitro Study, Toschka, A.; Pöhle, G.; Quadbeck, P.; Suschek, C.V.; Strauß, A.; Redlich, C.; Rana., International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(24): p. 1571



Article

Molybdenum as a Potential Biocompatible and Resorbable Material for Osteosynthesis in Craniomaxillofacial Surgery—An In Vitro Study

André Toschka ^{1,*}, Georg Pöhle ², Peter Quadbeck ³, Christoph V. Suschek ⁴, Alexander Strauß ², Christian Redlich ² and Majeed Rana ¹

¹ Department of Oral-, Maxillofacial and Facial Plastic Surgery, University Hospital Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

² Fraunhofer Institute for Manufacturing Technology and Advanced Materials IFAM, Branch Lab Dresden, 01277 Dresden, Germany

³ Department of Electrical Engineering, Medical Engineering and Computer Science (EMI), Offenburg University, 77652 Offenburg, Germany

⁴ Department for Orthopedics and Trauma Surgery, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

* Correspondence: andre.toschka@med.uni-duesseldorf.de



Citation: Toschka, A.; Pöhle, G.; Quadbeck, P.; Suschek, C.V.; Strauß, A.; Redlich, C.; Rana, M. Molybdenum as a Potential Biocompatible and Resorbable Material for Osteosynthesis in Craniomaxillofacial Surgery—An In Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15710. <https://doi.org/10.3390/ijms232415710>

Academic Editor: Lia Rimondini

Received: 24 October 2022

Accepted: 6 December 2022

Published: 11 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Titanium and stainless steel are commonly known as osteosynthesis materials with high strength and good biocompatibility. However, they have the big disadvantage that a second operation for hardware removal is necessary. Although resorbable systems made of polymers or magnesium are increasingly used, they show some severe adverse foreign body reactions or unsatisfying degradation behavior. Therefore, we started to investigate molybdenum as a potential new biodegradable material for osteosynthesis in craniomaxillofacial surgery. To characterize molybdenum as a biocompatible material, we performed in vitro assays in accordance with ISO Norm 10993-5. In four different experimental setups, we showed that pure molybdenum and molybdenum rhenium alloys do not lead to cytotoxicity in human and mouse fibroblasts. We also examined the degradation behavior of molybdenum by carrying out long-term immersion tests (up to 6 months) with molybdenum sheet metal. We showed that molybdenum has sufficient mechanical stability over at least 6 months for implants on the one hand and is subject to very uniform degradation on the other. The results of our experiments are very promising for the development of new resorbable osteosynthesis materials for craniomaxillofacial surgery based on molybdenum.

Keywords: biomaterials; craniomaxillofacial surgery; osteosynthesis; biodegradable implants; molybdenum

1. Introduction

Despite the development of various non-resorbable and resorbable materials for osteosynthesis, there remains high interest and the requirement for new bioresorbable materials with high strength and excellent biocompatibility.

Osteosynthesis materials made from non-resorbable metal alloys demonstrate sufficient biocompatibility and great stability. Titanium implants are considered as the gold standard in osteosynthesis materials. Although titanium is generally highly biocompatible, some severe adverse reactions such as allergies and immune reactions were described [1,2]. Especially in pediatric surgery, these non-resorbable materials have the big disadvantage of the necessity of a second operation for hardware removal, which is usually recommended 6–12 month after first operation. This second operation is associated with high physical and psychological stress for the young patients. Beside the risk of general complications such as infection and a second general anesthetic, hardware removal can also lead to growth arrest.

Especially for young patients such as children in development, there is a high need to implement bioresorbable materials for osteosynthesis. Various resorbable materials

are increasingly used with high success [3]. Today, there are the two big groups, namely magnesium-based implants, and polymer-based implants.

Magnesium-based bioresorbable implants have been known for several decades now. Although the material is now used in orthopedics and cardiology, the uneven corrosion of magnesium is a persistent problem. In particular, pitting corrosion frequently leads to undesirable results [4]. In addition, magnesium has a rather low mechanical strength, which must be compensated for in the design of implants by sufficient component thickness. In many cases, such a thickness is no longer appropriate for the corresponding implant.

Most polymer-based implants are made of polylactic acids [5], and they are designed to degrade in vivo via hydrolysis. The first of these systems for facial bone surgery have been available since the late 1980s [6]. The big challenge and limitation lie in the balance between rate and speed of degradation and maintenance of (mechanical) stability. Plates made of the L-isomer of PLA (PLLA) possess high strength and durability because of its hydrophobic, crystalline nature, which increases resistance to degradation [7]. However, PLLA has a propensity to induce foreign body reactions, including sterile abscess formation, which often makes hardware removal necessary [8].

On the other hand, polyglycolic copolymers (PGA), which are more hydrophilic, tend to degrade too quickly and lack the appropriate strength to support bone healing, even in non-load-bearing areas such as the craniofacial skeleton. Therefore, most current plating systems attempt to combine the positive qualities of both materials and are copolymers of PGA and PLA (PLGA) such as RapidSorb® (DePuy Synthes CMF, West Chester, PA, USA), LactoSorb® (Biomet Inc., Jacksonville, FL, USA) or Resorb-X® (KLS Martin, Tuttlingen, Germany) (PDLLA), which are frequently used in craniofacial surgery [9]. Although these resorbable systems for osteosynthesis are increasingly used, foreign body reactions are consistently described [10]. Furthermore, these osteosynthesis systems lack stability in comparison to titanium [11].

These facts suggest that there is still a need for new bioresorbable materials with high biocompatibility and high mechanical stability.

One potentially interesting material is tungsten. Before the late 1990s, coils made of pure tungsten wire were used to treat intracranial aneurysms. However, starting with an article by Weill et al. in 1998, observations on the loss of radiopacity of implanted tungsten coils over 1–3 years were published [12–14]. Kampmann et al. showed a total loss of radiographic visibility, indicating total degradation, within 3 years for 60% of implanted tungsten coils [15]. Consequently, aneurysm coils made of tungsten were withdrawn from the market. Subsequent studies showed marked degradation and cracking of tungsten coils in a rabbit model within 4 months [16]. Immediate negative effects of dissolved tungsten in the blood serum, such as systemic toxicity, were not observed in patients or animal studies. The in vitro cytotoxicity was established to be low over the short term [16,17], raising the possibility of using tungsten for biodegradable implants. However, tungsten does not occur physiologically in the human body, raising concerns about long-term biocompatibility. A steady increase in the tungsten level in the blood serum in the studies points towards slow physiological regulation of the tungsten level. Regarding mechanical properties, the low ductility of pure tungsten [18,19] limits options for implant manufacture and use for implants under high loads.

Molybdenum is a trace metal which is involved in and required for multiple enzymatic processes in the human body [20,21]. In recent publications, it is described as a bioresorbable material with high strength and exceptional mechanical properties [5,22].

Since molybdenum and tungsten are Group VI elements with the same valence electron configuration, they are chemically similar. Consequently, molybdenum was also shown to dissolve in various physiological salt solutions in vitro, with a degradation rate of 0.6–18 µm/y depending on the solution used and the form of the investigated samples [23,24]. In these studies, no pitting corrosion occurred. However, regarding use as a degradable biomaterial, molybdenum has two advantages over tungsten. First, molybdenum is a homeostatically regulated essential element in the human body [20]. The

total amount of molybdenum in the human body is 10–15 mg. Molybdenum levels are regulated by renal excretion. Increased molybdenum uptake leads to increased renal clearance [25]. Based on a No Observed Adverse Effect Level of 0.9 mg/d per kg body weight, a recommended dietary Upper Intake Level of 0.6–2 mg/d was defined for humans [26]. Molybdenum was shown to be neither mutagenic, cancerogenic or teratogenic [27,28]. In vitro, thrombogenicity and inflammatory response (THP-1 monocytes) were shown to be similar to 316 L stainless steel, while toxicity to coronary artery endothelial cells and coronary artery smooth muscle cells was shown to be low [29]. It is therefore expected that the long-term biocompatibility of a degradable molybdenum implant is better than in the case of tungsten. Second, pure molybdenum with a fine-grained microstructure is much more ductile than tungsten. As a measure of ductility, the elongation to failure can reach 40–50%. The control of impurities in the material such as oxygen is essential for good mechanical properties [30]. There is thus lower concern about brittle failure of a molybdenum implant under high loads.

In vitro and in vivo studies have shown that the degradation products consist of molybdenum oxides and calcium phosphates. When molybdenum comes into contact with simulated body fluid or body fluid, it undergoes a cascade of reactions that lead to the dissolvable oxide MoO_3 . This oxide dissolves in the form of molybdate ions MoO_4^{2-} which can be excreted renally [31,32]. While complete absorption has not yet been demonstrated in vivo, in vitro experiments indicate that molybdenum will dissolve completely in a physiological environment [29,33].

Based on these insights, we considered molybdenum as a promising material for osteosynthesis.

The aim of our experiments was to show the in vitro biocompatibility of pure molybdenum and its alloys with different types of cells in accordance with ISO-Norm 10993-5. Furthermore, we performed long time in vitro experiments to evaluate the mechanical performance and the degradation rate up to 6 months. With our study, we want to take the first step towards a more detailed characterization of this potential new resorbable material for osteosynthesis.

2. Results

In a total of four different assays, we repeatedly showed that molybdenum and molybdenum rhenium alloys do not cause significant cytotoxicity in either human or mouse skin fibroblasts nor human osteoblasts. Addition of rhenium increases the ductility [30]. Because of that fact, we also decided to test molybdenum-rhenium alloys, which is an alloy already commercially available. However, rhenium is very expensive and not easily available, which makes its clinical use seem rather unlikely and served more for comparison purposes here.

We seeded primary human skin fibroblasts and primary human osteoblasts at a density of 2×10^5 cells on a cast molybdenum crucible with an internal diameter of 4.4 cm and compared their growth and vitality after 24 h in comparison to corresponding cell cultures maintained on a plastic cell culture plate under otherwise identical conditions.

As can be seen from Figure 1A, both human cell types do not show any statistically significant differences in terms of growth and vitality compared to the cells cultivated in the plastic cell culture plates. In Figure 1B, we show that fluoresceine diacetate (DFA) stained, i.e., living human osteoblasts can grow on the molybdenum plate and show the morphology typical of osteoblast cultures.

We then performed the Cell titer blue assay with L929 mouse fibroblast cells. Two different charges (SRTP080718 and PDMPB1350) of pure molybdenum powder with high purity (>99.5% purity) and molybdenum rhenium alloys with 48% and 41% of rhenium (Mo48Re and Mo41Re) did not lower the cell viability in comparison to the control. The positive control with H_2O_2 showed the functionality of the attempt (Figure 2). A *p*-value of <0.05 as compared to the non-treated control was considered significant.

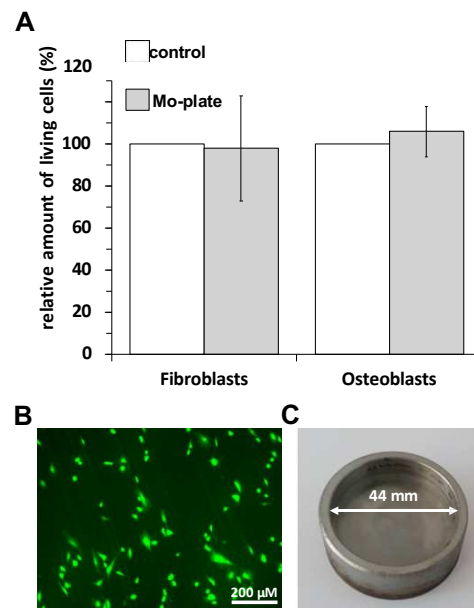


Figure 1. (A) Vitality of human skin fibroblasts and osteoblasts seeded on a molybdenum crucible in comparison to a Petri dish (control). (B) Positive fluorescein diacetate (FDA) staining of living adherent osteoblasts on the molybdenum crucible. (C) Representation of the size of the molybdenum crucible used.

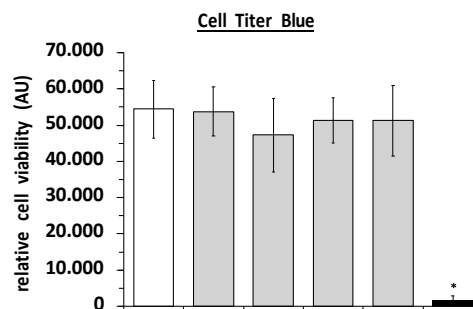


Figure 2. Cell titer blue assay with L929 mouse fibroblast cells *, $p < 0.05$ as compared to the control (paired two-tailed Student's t -test).

In Figure 3, the results of the MTT assay are shown. We used the same materials as in the cell titer blue assay and measured the cell viability of L929 mouse fibroblasts via MTT assay. We did not observe any significant differences in rates of cell viability. As a positive control, we again used H_2O_2 and saw a statistically significant reduction in cell viability as compared to the non-treated control cultures.

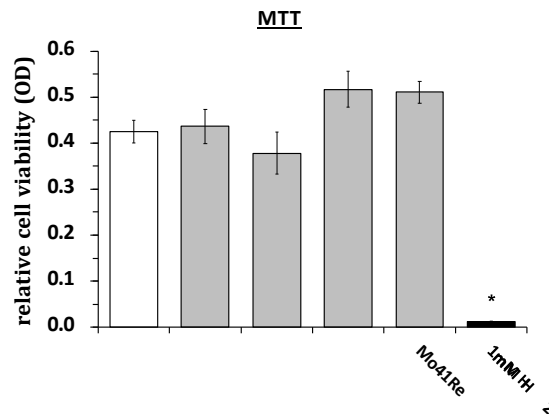


Figure 3. MTT assay with L929 mouse fibroblasts. *, $p < 0.05$ as compared to the control (paired two-tailed Student's t -test).

We measured the cell viability with the same compounds in the neutral red assay as well (Figure 4). The same positive and negative controls were used. In the neutral red assay, no significant difference in the amount of living cells was observed compared to the negative control. In contrast, maintaining the cultures in the presence of H₂O₂ showed a statistically significant reduction in the neutral red signal as compared to the non-treated controls.

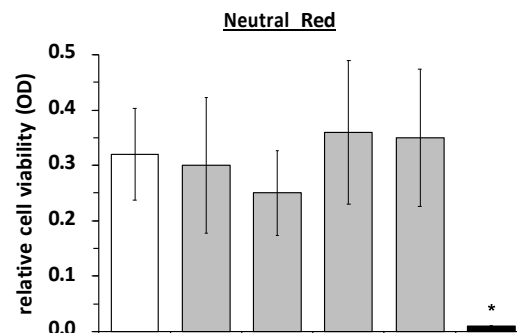
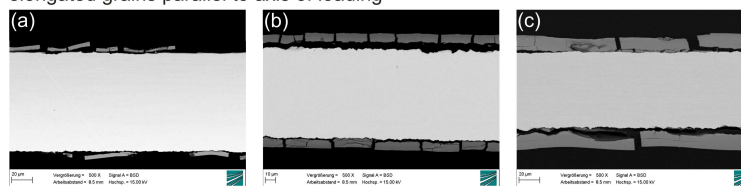


Figure 4. Neutral red assay with L929 mouse fibroblasts. *, $p < 0.05$ as compared to the control (paired two-tailed Student's t -test).

Figure 5 shows SEM (scanning electron microscope) images of metallographic cross-sections of molybdenum sheet metal after 2, 4 and 6 months (from left to right, for both grain orientations) of immersion in Kokubo's SBF (simulated body fluid). For a detailed description of the grain structure, please see Section 4. The growth of a degradation product layer with uniform thickness on the surface of the metallic sheet is observed, confirming the

behavior described in earlier reports. No significant difference in layer thickness is observed in sheets of either parallel or perpendicular grain orientation. Cracks in the degradation product layer and a gap between the layer and the metallic surface are apparent. However, the close fit of the fractured parts and the fact that no new degradation product layer has formed beneath the monolithic layer shows that the cracks do not form in situ, but after removal of the samples from the immersion medium and drying. The cracking of the degradation product layer during drying has been illustrated in the Supplementary Information of Schauer et al. [33].

elongated grains parallel to axis of loading



elongated grains perpendicular to axis of loading

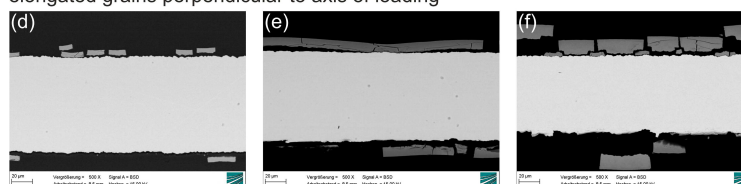


Figure 5. SEM images of molybdenum sheet metal after immersion for 2–6 months in Kokubo's SBF. Images (a–c) show the sheet metal samples with elongated grains parallel to the axis of loading in tensile testing. Images (d–f) show the sheet metal samples with elongated grains perpendicular to the axis of loading (see Figure 11 in Section 4).

EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy) analysis (Figure 6, left image and table) and EDS mapping (Figure 6, right column) show that the metallic sheet is unchanged and consists of pure molybdenum. The degradation product layer consists mostly of molybdenum, oxygen, calcium, and phosphorus. Minor quantities of magnesium, sodium and potassium are also present. This is consistent with earlier publications which reported degradation product layers consisting of molybdenum oxide and calcium phosphate. Based on this observation, calculating the loss of molybdenum from the molybdenum sheet by comparing the weight before and after immersion is not expedient. It is more useful to calculate total molybdenum dissolution based on ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectrometry) data of the molybdenum concentration in used immersion medium.

Area-specific molybdenum mass loss, calculated based on the ICP-OES data, is shown in Table 1. Approximately 20% of the original mass of the Mo sheet is lost by dissolution over 6 months. No significant difference in mass loss was observed for parallel and perpendicular grain orientation.

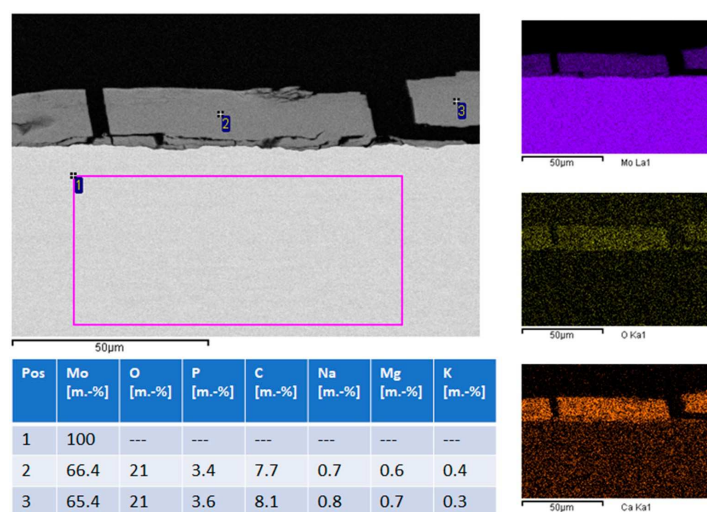


Figure 6. EDS (Energy dispersive X-ray spectroscopy) point analysis and mapping. The numbers 1, 2 and 3 indicate the position of the measurements. Results are given in the table. The right column of images shows the results of the EDX mapping for the elements Mo, O and Ca.

Table 1. Total mass loss and area-specific mass loss of molybdenum sheet metal samples in 2–6 months of immersion in Kokubo's SBF.

Grain Orientation	Duration of Immersion (Months)	Total Mass Loss (%)	Area Specific Mass Loss (mg/cm ²)
perpendicular	2	7.6	3.8
perpendicular	4	13.0	6.4
perpendicular	6	19.8	9.6
parallel	2	6.0	3.0
parallel	4	12.2	6.0
parallel	6	19.3	9.5

Therefore, the average of all values was calculated and plotted over immersion time (Figure 7). Mass loss over time can be approximated by the fit function $Dm = 0.034t + 0.0001t^2$. The total dissolution rate after 6 months calculated from the mass loss is ca. 25 $\mu\text{m}/\text{year}$.

Figure 8 shows the change in thickness of the metallic portion of the sheet over time (left). The thickness of the metallic portion declines by around 25 μm over 6 months (25 $\mu\text{m}/\text{year}$ over 6 months for the two exposed large surfaces, with the much smaller surfaces of the edges neglected). However, the total thickness of the samples is not reduced by 25 μm since the degradation layer forms on the sample and takes up some of the volume of the original material. The degradation product layer grows in a roughly linear way, as shown in Figure 8 (right), while the reduction of the metallic part can be approximated by an exponential function. Based on these observations, it is predicted that the metallic part of the molybdenum sheet would disappear after approx. 10 months, while the total thickness is expected to decrease more slowly. The degradation products will persist for some time after all of the metal is dissolved or degraded.

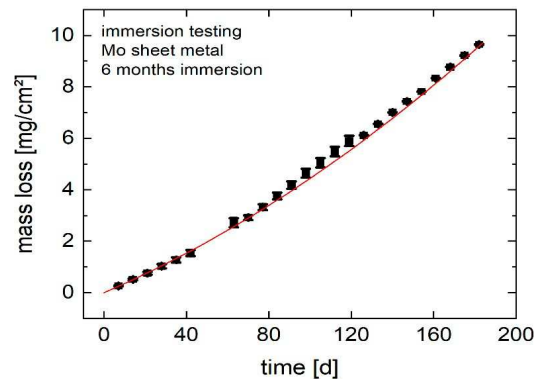


Figure 7. Mass loss of molybdenum sheet metal over 6 months of immersion, derived from ICP-OES measurements.

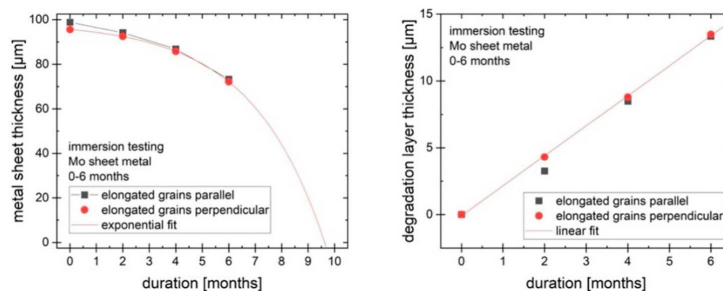


Figure 8. Metallic and degradation product layer thickness.

Figure 9 (left) shows the tensile strength R_m of the samples as received and after immersion for 2, 4 and 6 months. Note that the values of the tensile strength in MPa are calculated based on the original cross-section, not the cross-section after immersion, to demonstrate how the strength of an implant would change over time. There is no significant difference between the strength of samples with different grain orientation. Over 6 months, the tensile strength of the material is reduced by approx. 50%. Following the exponential decrease in metallic thickness, the loss of tensile strength can be approximated by an exponential function, just like the decrease in metallic thickness. However, due to the high mechanical strength of molybdenum, a tensile strength of more than 400 MPa relative to original cross section remains after 6 months, fulfilling the requirements for most load-bearing orthopedic implant applications. Based on the decrease in the thickness of the metallic portion of the sample, a total loss of mechanical strength is expected after 7.5–9 months. For this estimate, a negligible mechanical strength of the degradation product layer is assumed. The plot of the yield strength $R_{p0.2}$ over time in Figure 9 (right) follows a similar progression, with a reduction of around 50% in 6 months and an expected total loss of yield strength within the same timeframe as for R_m .

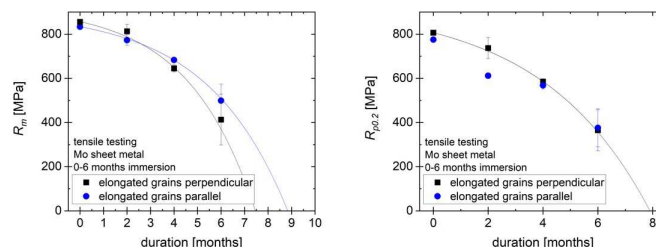


Figure 9. Tensile strength and yield strength of molybdenum sheet metal.

3. Discussion

Overall, our results are in agreement with recent published results of Redlich et al. and Sikora-Jasinska et al., which showed that the degradation behavior and biocompatibility of molybdenum is promising for future cardiovascular stents [5,29].

Naturally, the requirements for cardiac stents and osteosynthesis materials differ in many respects. In particular, the dimensions and forms required are very different—plates and wires in osteosynthesis compared to the stents with fine strut networks in cardiovascular applications. However, as this work shows, molybdenum has great potential for osteosynthesis material in addition to the potential for cardiovascular stents.

Uniform degradation of pure molybdenum sheet metal under simulated physiological conditions (Kokubo's SBF, pH 7.4, 37 °C) was demonstrated. Over 6 months, a mass loss of molybdenum of approx. 20%, corresponding to a decrease in metal sheet thickness of approx. 25 µm, was observed. This rate of degradation shows that there is a reasonable expectation that a molybdenum-based implant will degrade within a clinically relevant timeframe, e.g., 1–2 years. At the observed mass loss rates, the metallic portion of a 95 µm molybdenum sheet is expected to last for around 10 months. The degradation products are expected to persist for a longer time than the metal. Mechanical testing shows the high potential for use of molybdenum in load-bearing orthopedic implants, with tensile strength and yield strength exceeding 350 MPa after 6 months of degradation. This is still higher than the requirements for most orthopedic applications. For example, for wires used in sternal closure, a yield strength of >300 MPa is a common benchmark.

In addition to the promising degradation measurements, we were able to demonstrate that pure molybdenum and alloys with 48% and 41% rhenium have no significant effects on the viability of mouse and human fibroblasts, as well as on human osteoblasts, which is the basic requirement for further in vivo experiments. Our experiments were conducted as described in ISO standard 10993-5, which is also used for the approval of medical devices according to the Medical Device Regulation (Regulation (EU) 2017/745), especially implants.

In the next steps, the in vivo biocompatibility and the exact degradation rates in complex organisms must be investigated. While Sikora-Jasinska et al. showed the biocompatibility and degradation behavior in a flowing system [5] and Schauer et al. demonstrated degradation in the abdominal aorta of rats [33], the behavior as an osteosynthesis system should be investigated separately. In particular, the degradation and dissolution behavior of molybdenum sheet metal should be investigated under in vivo conditions consistent with implant applications in craniomaxillofacial surgery.

In further in vivo experiments, the main questions will be how the degradation behaves for molybdenum samples of adequate dimensions, how the in vivo environment (e.g., oxygen partial pressure in tissues and fluid exchange rates) changes the degradation behavior and how the degradation products affect complex organisms. The main aspects of this will be the exact degradation rates and the gradual reduction in mechanical stability. Furthermore, it is essential to know in which form the mammalian organism can renally excrete the resulting degradation products and what consequences, if any, occur renally.

or in other organs. Sikora-Jasinska et al. reported a qualitatively pathological remodeling of kidney Bowman's capsule and glomeruli, which could be related to Mo toxicity [5]. However, renal function in those animals is also known to degrade naturally with age. Biological consequences such as these need to be examined, especially for implants of larger dimensions, such as those required in craniomaxillofacial surgery.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

If not otherwise indicated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). Cell culture materials were obtained from Greiner (Erlangen, Germany).

4.1.1. Molybdenum Samples

1. Mo-PDMPB 1350 powder; obtained from H.C. Starck (Goslar, Germany)
2. Mo-RSTP080718 powder; obtained from H.C. Starck (Goslar, Germany)
3. Mo-48Re powder; obtained from H.C. Starck (Goslar, Germany)
4. Mo-41Re powder; obtained from H.C. Starck (Goslar, Germany)
5. Cast molybdenum crucible obtained from KLS Martin (Tuttlingen, Germany)

4.1.2. Composition and Particle Size of Molybdenum Powder

1. Mo-PDMPB 1350:
99.5% purity;
99% of particles smaller than 44 µm.
2. Mo-RSTP080718:
99.95% purity except C and O; C and O each max. 1.1%.
Particle size: max. 10% smaller than 44 µm, min. 87.5% 44–150 µm, max. 2.5% larger than 150 µm.
3. Mo-48Re
High-purity molybdenum powder was mixed with a 48% proportion of rhenium.
4. Mo-41Re
High-purity molybdenum powder was mixed with a 41% proportion of rhenium.
5. Cast molybdenum crucibles. The molybdenum crucibles were made from high purity molybdenum powder (Mo-RSTP080718) in a selective laser melting process and had an inner diameter of 44 mm (Figure 1).

4.1.3. Cells, Fibroblast and Osteoblast Isolation and Cell Culture For

our experiments, we used cells from the NCTC clone 929 (L-929) that we purchased from LGC Standards GmbH (Wesel, Germany) and primary human skin fibroblasts (hsFB), as well as osteoblasts (hOB).

Human fibroblast cell culture: Human skin fibroblasts were isolated from human skin specimens obtained with patients' consent from twelve female and male patients aged between 20 and 65 years who underwent plastic breast or abdominal surgery, respectively. The experimental protocol and the use of human material have been approved by the local Ethics committee of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University in Düsseldorf (study number: 3634) and are in accordance with the Declaration of Helsinki.

Fibroblast cultures were prepared, cultivated and cryoconserved exactly as described elsewhere [34]. For experiments cryoconserved stocks of L929 cell or fibroblasts were thawed and further cultured (5% CO₂, 37 °C) with cell culture media (DMEM/10% foetal bovine serum—FBS/PEN/STREP) in T 75 flasks (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany).

For seeding, the cells were detached by two rinses with balanced phosphate buffer (PBS, pH 7.4) and incubated with 0.05% trypsin/0.02% EDTA/0.9% NaCl solution for 3 to 5 min. After cells had become detached, the trypsin activity was inactivated by addition of 10 mL culture media supplement with 10% FBS and samples were subsequently

centrifuged for 5 min at 300 $\times$ g. Then, cells were resuspended and counted by using a Neubauer counting chamber and seeded with the cell density indicated in the respective multi-well cell culture plates one day prior starting the experimental procedure.

Human osteoblast cell culture: To establish and culture primary human osteoblast cultures, we used a method as previously described [35,36]. Briefly, cancellous bone chips were taken from the iliac crest of patients who underwent osteosynthesis with bone grafting. The three preparations used in our experiment came from two female and one male patient aged 58 ± 6 years. Exclusion criteria were known osteoporosis, corticosteroid therapy, diabetes mellitus, immunosuppression, rheumatoid arthritis, previous heparin therapy and underlying bone diseases. The minced bone fragments were cleaned after collection and transferred to a Petri dish and cultured α -MEM medium containing 10% FCS, 60 μ g/mL penicillin, streptomycin, amphotericin B and 60 μ g/mL ascorbic acid and cultivated in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C. The first and second passages of confluent osteoblasts were used for testing. The experiments were performed in duplicate five times.

To test a direct effect of molybdenum on the vitality behavior of primary human skin fibroblasts (hsFB) or osteoblasts (hOB), we have cultivated these cells on appropriate molybdenum crucibles. For this purpose, we used molybdenum crucibles, which were previously manufactured from high-purity molybdenum powder (SRTPO80718) in a selective laser melting process and had an inside diameter of 44 mm (Figure 1). HsFB or hOB were seeded with a cell density of 3×10^4 cells/cm². Experiments using hsFB were performed with cells in passage 2–4. Using hOB, experiments were performed with cells in passage 1–2.

4.1.4. Preparation of Molybdenum Extracts

To produce molybdenum extracts, we mixed 20 g of the respective molybdenum powder preparations mentioned in Section 4.1.1 with 20 mL of the growth medium in a 50 mL Falcon tube and incubated the samples for 24 h at 37 °C on a roller mixer. After centrifugation of the samples at 150 $\times$ g for 10 min the extracts (supernatants) were used in the subsequent in vitro toxicity assays.

4.2. Evaluation of In Vitro Cytotoxicity

The cytotoxic effects of the extracts were tested using three recognized tests: Cell-Titer-Blue (CTB) test, Neutral Red [37] test, and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) test. The last two tests mentioned were carried out in accordance with EN-ISO 10993-5: 2009 (Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity).

Briefly, in preparation for the tests, 10,000 cells per well of a 96-well cell culture plate were plated out and overlaid with growth medium (200 μ L/well). The cells were allowed to adhere overnight. The supernatants were then discarded and the cells were incubated for 24 h with the prepared molybdenum extracts (200 μ L/well) or, as positive control, with medium containing 1 mM H₂O₂ instead of the extracts. The tests were then carried out.

4.3. CTB-Assay

The *CellTiterBlue* assay (CellTiterBlue, Promega, Madison, WI, USA) allows to determine the relative cell numbers indirectly by quantifying the metabolic activity (complex 1 of the respiratory chain) of the respective cell cultures in the form of the ability to metabolize resazurin to resorufin. The assay was performed in accordance with the manufacturer's protocols at time points indicated. Briefly, L929 cell samples of the test plate were incubated for 1 h with the CellTiterBlue reagent (1:20 with medium; 200 μ L) and 2 $\times$ 100 μ L of supernatants were taken for direct measurement at room temperature by using a fluorescence spectrometer (VICTOR II Plate Reader, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) at an excitation wavelength of 540 nm, and an emission wavelength of 590 nm (Figure 3).

4.4. MTT-Assay

The MTT assay, an index of cell viability and cell growth, is based on the ability of viable cells to reduce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) from a yellow, water-soluble dye to a dark blue, insoluble formazan product. Other sample plates were incubated with 200 μ L MTT solution (5 g/L in PBS) for an additional 4 h, then the media were removed and 200 μ L DMSO was added to each well for the following assays. The plates were shaken for 10 min or incubated at 37 °C for 15 min to obtain a sufficient extraction of the MTT products, then optical density [7] at 490 nm was detected with a 96-well microplate reader (Figure 4).

4.5. Neutral Red-Assay

Alternatively, the relative number of living ECs was detected by neutral red staining. Neutral red solution in phosphate-buffered saline (Sigma, Deisenhofen, Germany) was added to each well to give a final concentration of 0.03% and incubated for 90 min at 37 °C in the dark. Medium was removed, and cells were washed two times with phosphate-buffered saline and dried. After dissolving in 100 μ L isopropanol plus 1% 1 M HCl, the absorption of the probes was measured at 530 nm in an enzyme linked immunosorbent assay microplate reader (Multiskan Plus MK 2, Helsinki, Finland) (Figure 5).

4.6. Statistical Analysis

The statistical evaluation was carried out using the Graph Pad Prism 5 and 8 software (San Diego, CA, USA). We used the paired two-tailed Student's *t*-test or ANOVA followed by a post hoc multiple comparison test (Tukey). With a *p*-value < 0.05, the statistical differences were classified as statistically significant.

4.7. Immersion and Mechanical Testing of Molybdenum Sheet Metal

Pure molybdenum sheet metal of 95 μ m thickness was procured from H.C. Starck (Goslar, Germany). The sheet metal was produced by rolling, followed by stress relief heat treatment. Samples for tensile testing with a total surface area of approx. 54 cm² were cut from the sheet metal by electrical discharge machining (EDM). The shape of the tensile testing samples is shown in Figure 10.

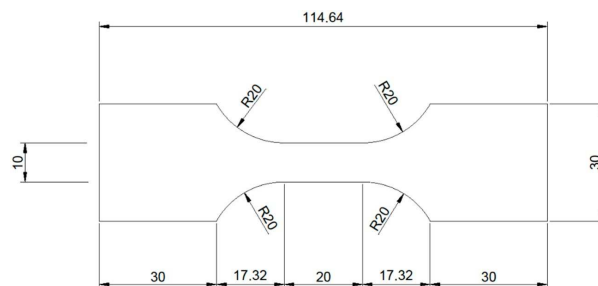


Figure 10. Shape and dimensions of the tensile testing samples.

Samples with two grain orientations (Figure 11) were produced by EDM: Samples with the elongated grains from rolling parallel to the axis of loading in tensile testing (left) and elongated grains perpendicular to the axis of loading (right). The grain structure of the samples was made visible by Murakami etching after metallographic preparation by grinding and polishing with alumina and diamond suspension. The left image in Figure 11 shows the microstructure parallel to the direction of rolling during manufacturing of the molybdenum sheet metal. Hot rolling, i.e., strong plastic deformation of the material at elevated temperature, induces recrystallization and leads to the formation of an anisotropic

grain structure. The left image shows that hot rolling results in grains with a width of several micrometers (perpendicular to the surface) and a length of several tens of micrometers in the direction of rolling. The right image in Figure 11 shows the microstructure perpendicular to the direction of rolling. In this plane, grain sizes are small due to the preferred direction of grain growth along the direction of rolling.

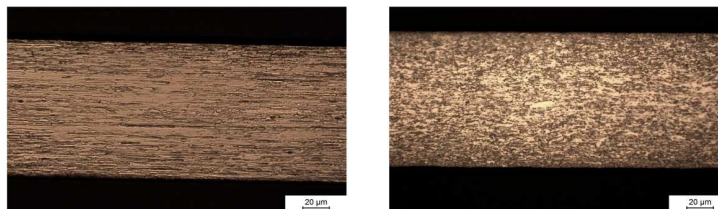


Figure 11. Mo sheet microstructure. Cross sections in parallel to the direction of hot rolling (left image) and perpendicular to the direction of hot rolling (right image).

Additionally, smaller samples made of the same sheet metal with a surface area of 4 cm^2 and the same grain orientations were produced by EDM.

For immersion testing, three tensile testing samples and one smaller sample of the same grain orientation each were stored in $160 \rightarrow 50 \rightarrow 60 \text{ mm}^3$ containers made of polypropylene. For each grain orientation, three sets of tensile testing and smaller samples were used, for periods of 2, 4 and 6 months of immersion. Sample holders were used to make sure that all surfaces of the samples were accessible to the immersion fluid. Before immersion, the samples were cleaned with 30% H_2O_2 to remove surface contamination and oxides formed during EDM. After cleaning, the samples were weighed on a precision scale.

The Immersion medium was Kokubo's SBF with a pH of 7.4 and a TRIS/HCl buffer system. The ion concentrations in Kokubo's SBF are modelled after human blood serum, except for an increased concentration of Ca^{2+} ions. For the immersion experiments in this study, the Ca^{2+} ion concentration was adjusted to the level present in human blood serum. A ratio of 2.4 mL of medium per cm^2 of sample surface was chosen. During immersion, the sample containers were stored at 37°C . The medium was aerated during immersion testing. The medium was changed weekly over a period of up to 6 months. Medium samples were taken during medium change. The concentration of dissolved Mo ions in used medium was measured by ICP-OES. The fluid loss due to evaporation was calculated each week by weighing the medium remaining after 7 days. This loss is taken into account when the dissolution rate of molybdenum is calculated from the ICP-OES data.

After 2, 4 and 6 months, one set each of the samples with parallel or perpendicular grain orientation was removed from the immersion fluid, dried in air and weighed on a precision scale. Cross-sections of the smaller samples were prepared for metallographic analysis by SEM and EDS. The tensile strength R_m and the yield strength at 0.2% of plastic deformation $R_{p0.2}$ of the tensile testing samples were measured on a Zwick-Roell tensile testing machine. The mechanical properties of the original molybdenum sheet metal were measured by the same method to serve as a reference.

5. Conclusions

In our study, we showed that pure molybdenum and molybdenum rhenium alloys do not show significant cytotoxicity in tests according to ISO standard 10993-5. The 6-month tests of the degradation of molybdenum sheets showed uniform degradation. After 6 months, there was a loss of mechanical strength of about 50%. A complete loss of mechanical strength is expected after 7.5–9 months based on these data. This would represent an optimal period for the use of an osteosynthesis material, which in most cases is removed after 6–8 months.

Author Contributions: Conceptualization, A.T., P.Q. and G.P.; methodology, A.T., G.P., C.V.S., C.R. and A.S.; validation, A.T., G.P., M.R. and P.Q.; data curation, A.T., G.P., C.R. and P.Q.; writing—original draft preparation, A.T., G.P. and P.Q.; writing—review and editing, G.P., C.V.S. and A.T.; visualization, A.T. and G.P.; supervision, M.R. and P.Q.; project administration, A.T. and M.R.; funding acquisition, M.R. and P.Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Germany; Verbundprojekt: Resorbierbare patientenindividuelle Implantate für die pädiatrische Chirurgie (ResorbM); funding code: 13GW0303D.

Institutional Review Board Statement: The usage of human material was approved by the local ethics committee of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf (study number 3634) and conducted in compliance with the Declaration of Helsinki Principles.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: For further information, please contact the corresponding author.

Acknowledgments: We thank Christa Maria Wilkens, Samira Seghrouchni, and Jutta Schneider for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Comino-Garayoa, R.; Cortés-Bretón Brinkmann, J.; Peláez, J.; López-Suárez, C.; Martínez-González, J.M.; Suárez, M.J. Allergies to Titanium Dental Implants: What Do We Really Know about Them? A Scoping Review. *Biology* **2020**, *9*, 404. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Case, C.; Langkamer, V.; James, C.; Palmer, A.; Kemp, A.; Heap, P.; Solomon, L. Widespread dissemination of metal debris from implants. *J. Bone Jt. Surg. Br. Vol.* **1994**, *76-B*, 701–712. [\[CrossRef\]](#)
- Xin, X.; Zhao, Y.; Cheng, G.; Diarra, D.; Li, Z.B.; Li, Z. Treatment of Sagittal Fracture of the Mandibular Condyle Using Resorbable-Screw Osteosynthesis. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2022**, *80*, 1207–1214. [\[CrossRef\]](#)
- Zheng, Y.F.; Gu, X.N.; Witte, F. Biodegradable metals. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2014**, *77*, 1–34. [\[CrossRef\]](#)
- Sikora-Jasinska, M.; Morath, L.M.; Kwesiga, M.P.; Plank, M.E.; Nelson, A.L.; Oliver, A.A.; Bocks, M.L.; Guillory, R.J.; Goldman, J. In-vivo evaluation of molybdenum as bioabsorbable stent candidate. *Bioact. Mater.* **2022**, *14*, 262–271. [\[CrossRef\]](#)
- Bos, R.R.; Boering, G.; Rozema, F.R.; Leenslag, J.W. Resorbable poly(L-lactide) plates and screws for the fixation of zygomatic fractures. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1987**, *45*, 751–753. [\[CrossRef\]](#)
- Wood, R.J.; Petronio, J.A.; Graupman, P.C.; Shell, C.D.; Gear, A.J. New resorbable plate and screw system in pediatric craniofacial surgery. *J. Craniofac. Surg.* **2012**, *23*, 845–849. [\[CrossRef\]](#)
- Eppley, B.L. Zygomaticomaxillary fracture repair with resorbable plates and screws. *J. Craniofac. Surg.* **2000**, *11*, 377–385. [\[CrossRef\]](#)
- Eppley, B.L.; Morales, L.; Wood, R.; Pensler, J.; Goldstein, J.; Havlik, R.J.; Habal, M.; Losken, A.; Williams, J.K.; Burstein, F.; et al. Resorbable PLLA-PGA plate and screw fixation in pediatric craniofacial surgery: Clinical experience in 1883 patients. *Plast. Reconstr. Surg.* **2004**, *114*, 850–856; discussion 857. [\[CrossRef\]](#)
- Matsuda, Y.; Karino, M.; Okui, T.; Kanno, T. Complications of Poly-L-Lactic Acid and Polyglycolic Acid (PLLA/PGA) Osteosynthesis Systems for Maxillofacial Surgery: A Retrospective Clinical Investigation. *Polymers* **2021**, *13*, 889. [\[CrossRef\]](#)
- Schneider, M.; Eckelt, U.; Reitemeier, B.; Meissner, H.; Richter, G.; Loukota, R.; Stadlinger, B. Stability of fixation of diacapitular fractures of the mandibular condylar process by ultrasound-aided resorbable pins (SonicWeld Rx® System) in pigs. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2011**, *49*, 297–301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Weill, A.; Ducros, V.; Cognard, C.; Pötin, M.; Moret, J. Letter. “Corrosion” of tungsten spirals. A disturbing finding. *Interv. Neuroradiol.* **1998**, *4*, 337–340. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Barrett, J.; Wells, L.; Riordan, R.; Roobottom, C. Endovascular embolization of varicocoeles: Resorption of tungsten coils in the spermatic vein. *Cardiovasc. Intervent Radiol.* **2000**, *23*, 457–459. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Butler, T.J.; Jackson, R.W.; Robson, J.Y.; Owen, R.J.; Delves, H.T.; Sieniawska, C.E.; Rose, J.D. In vivo degradation of tungsten embolisation coils. *Br. J. Radiol.* **2000**, *73*, 601–603. [\[CrossRef\]](#)
- Kampmann, C.; Brzezinska, R.; Abidini, M.; Wenzel, A.; Wippermann, C.F.; Habermehl, P.; Knuf, M.; Schumacher, R. Biodegradation of tungsten embolisation coils used in children. *Pediatr. Radiol.* **2002**, *32*, 839–843. [\[CrossRef\]](#)
- Peuster, M.; Fink, C.; Wohlsein, P.; Bruegmann, M.; Günther, A.; Kaese, V.; Niemeyer, M.; Haferkamp, H.; Schnakenburg, C. Degradation of tungsten coils implanted into the subclavian artery of New Zealand white rabbits is not associated with local or systemic toxicity. *Biomaterials* **2003**, *24*, 393–399. [\[CrossRef\]](#)
- Peuster, M.; Fink, C.; von Schnakenburg, C. Biocompatibility of corroding tungsten coils: In vitro assessment of degradation kinetics and cytotoxicity on human cells. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4057–4061. [\[CrossRef\]](#)
- Raffo, P.L. Yielding and fracture in tungsten and tungsten-rhenium alloys. *J. Less Common Met.* **1969**, *17*, 133–149. [\[CrossRef\]](#)
- Leonhardt, T. Properties of tungsten-rhenium and tungsten-rhenium with hafnium carbide. *JOM* **2009**, *61*, 68–71. [\[CrossRef\]](#)

20. Schwarz, G.; Mendel, R.R.; Ribbe, M.W. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **2009**, *460*, 839–847. [\[CrossRef\]](#)
21. Mendel, R.R. The molybdenum cofactor. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 13165–13172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Redlich, C.; Quadbeck, P.; Thieme, M.; Kieback, B. Molybdenum—A biodegradable implant material for structural applications? *Acta Biomater.* **2020**, *104*, 241–251. [\[CrossRef\]](#)
23. Yin, L.; Cheng, H.; Mao, S.; Haasch, R.; Liu, Y.; Xie, X.; Hwang, S.-W.; Jain, H.; Kang, S.-K.; Su, Y.; et al. Dissolvable Metals for Transient Electronics. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 645–658. [\[CrossRef\]](#)
24. Mörsdorf, A.; Odneval Wallinder, I.; Hedberg, Y. Bioaccessibility of micron-sized powder particles of molybdenum metal, iron metal, molybdenum oxides and ferromolybdenum—Importance of surface oxides. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *72*, 447–457. [\[CrossRef\]](#)
25. Turnlund, J.R.; Weaver, C.M.; Kim, S.K.; Keyes, W.R.; Gizaw, Y.; Thompson, K.H.; Peiffer, G.L. Molybdenum absorption and utilization in humans from soy and kale intrinsically labeled with stable isotopes of molybdenum. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *69*, 1217–1223. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Vyskocil, A.; Viau, C. Assessment of molybdenum toxicity in humans. *J. Appl. Toxicol.* **1999**, *19*, 185–192. [\[CrossRef\]](#)
27. Caicedo, M.; Jacobs, J.J.; Reddy, A.; Hallab, N.J. Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni^{2+} and V^{3+} are more toxic than other metals: Al^{3+} , Be^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mo^{5+} , Nb^{5+} , Zr^{2+} . *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *86*, 905–913. [\[CrossRef\]](#)
28. Daley, B.; Doherty, A.T.; Fairman, B.; Case, C.P. Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. *J. Bone Joint. Surg. Br.* **2004**, *86*, 598–606. [\[CrossRef\]](#)
29. Redlich, C.; Schauer, A.; Scheibler, J.; Poehle, G.; Barthel, P.; Maennel, A.; Adams, V.; Weissgaerber, T.; Linke, A.; Quadbeck, P. In Vitro Degradation Behavior and Biocompatibility of Bioresorbable Molybdenum. *Metals* **2021**, *11*, 761. [\[CrossRef\]](#)
30. Leichtfried, G.; Schneibel, J.; Heilmaier, M. Ductility and impact resistance of powder-metallurgical molybdenum-rhenium alloys. *Metall. Mater. Trans. A* **2006**, *37*, 2955–2961. [\[CrossRef\]](#)
31. Bojinov, M.; Betova, I.; Raicheff, R. A model for the transpassivity of molybdenum in acidic sulphate solutions based on ac impedance measurements. *Electrochim. Acta* **1996**, *41*, 1173–1179. [\[CrossRef\]](#)
32. Petrova, M.; Bojinov, M.; Zanna, S.; Marcus, P. Mechanism of anodic oxidation of molybdenum in nearly-neutral electrolytes studied by electrochemical impedance spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 7899–7906. [\[CrossRef\]](#)
33. Schauer, A.; Redlich, C.; Scheibler, J.; Poehle, G.; Barthel, P.; Maennel, A.; Adams, V.; Weissgaerber, T.; Linke, A.; Quadbeck, P. Biocompatibility and Degradation Behavior of Molybdenum in an In Vivo Rat Model. *Materials* **2021**, *14*, 7776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Krassovka, J.M.; Suschek, C.V.; Prost, M.; Grotheer, V.; Schiefer, J.L.; Demir, E.; Fuchs, P.C.; Windolf, J.; Stürmer, E.K.; Opländer, C. The impact of non-toxic blue light (453 nm) on cellular antioxidative capacity, TGF- β 1 signaling, and myofibroblastogenesis of human skin fibroblasts. *J. Photochem. Photobiol. B* **2020**, *209*, 111952. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Trentz, O.A.; Hoerstrup, S.P.; Sun, L.K.; Bestmann, L.; Platz, A.; Trentz, O.L. Osteoblasts response to allogenic and xenogenic solvent dehydrated cancellous bone in vitro. *Biomaterials* **2003**, *24*, 3417–3426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Handschin, A.E.; Trentz, O.A.; Hoerstrup, S.P.; Kock, H.J.; Wanner, G.A.; Trentz, O. Effect of low molecular weight heparin (dalteparin) and fondaparinux (Arixtra) on human osteoblasts in vitro. *Br. J. Surg.* **2005**, *92*, 177–183. [\[CrossRef\]](#)
37. Schroeder, H.A.; Mitchener, M. Toxic Effects of Trace Elements on the Reproduction of Mice and Rats. *Arch. Environ. Health Int. J.* **1971**, *23*, 102–106. [\[CrossRef\]](#)

3. *How Does the Biocompatibility of Molybdenum Compare to the Gold Standard Titanium?—An In Vivo Rat Model*, Toschka, A.; Möllmann, H.; Hoppe, D.; Poehle, G.; van Meenen, L.; Seidl, M.; Karnatz, N.; Rana, M., *Applied Sciences*, 2023, 13(101): p. 6312.

Article

How Does the Biocompatibility of Molybdenum Compare to the Gold Standard Titanium?—An In Vivo Rat Model

André Toschka ^{1,*}, Henriette Möllmann ¹, Dominik Hoppe ¹, Georg Poehle ², Lutz van Meenen ³, Maximilian Seidl ⁴, Nadia Karnatz ¹ and Majeed Rana ¹

¹ Department of Oral-, Maxillofacial and Facial Plastic Surgery, University Hospital Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany; henriette.louise.moellmann@med.uni-duesseldorf.de (H.M.); dominik.hoppe@med.uni-duesseldorf.de (D.H.); nadia.karnatz@med.uni-duesseldorf.de (N.K.); rana@med.uni-duesseldorf.de (M.R.)

² Fraunhofer Institute for Manufacturing Technology and Advanced Materials IFAM, Branch Lab Dresden, 01277 Dresden, Germany; georg.poehle@ifam-dd.fraunhofer.de

³ Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co. KG, 78570 Mühlheim, Germany; lutz.vanmeenen@klsmartin.com

⁴ Institute of Pathology, Heinrich Heine University and University Hospital Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany; maximilian.seidl@med.uni-duesseldorf.de

* Correspondence: andre.toschka@med.uni-duesseldorf.de

Abstract: Molybdenum is an essential trace element, considered in recent work to be a promising 3D-printable biodegradable material for medical applications. Specifically, in our recent in vitro work, we were able to show that molybdenum is a material of high biocompatibility, sufficient stability, and uniform degradation. Thus, it seems to fulfill the optimal requirements for a resorbable osteosynthesis material. To confirm these results in a complex organism, we tested molybdenum against the gold standard titanium. For this purpose, we implanted either molybdenum or titanium implants into the nuchal folds of 48 Wistar rats. We examined all animals daily for clinical inflammatory parameters and euthanized one-third of the cohort after 12, 24, and 52 weeks, respectively. Subsequently, the tissues surrounding the samples, as well as the spleens, livers, and kidneys of all animals, were pathologically processed and examined. Subsequently, selected samples were examined metallographically. No significant increased inflammatory reaction of the material molybdenum versus titanium could be detected, either clinically or pathologically. The animals did not show any significant differences regarding their general condition or weight development. However, the introduced molybdenum platelets showed significantly less degradation than previously in the in vitro model. This is most likely due to the capsule formation, which has already been described for other implants.

Keywords: biomaterials; osteosynthesis; 3D-printable; selective laser melting; molybdenum; biocompatibility; oral and maxillofacial surgery



Citation: Toschka, A.; Möllmann, H.; Hoppe, D.; Poehle, G.; van Meenen, L.; Seidl, M.; Karnatz, N.; Rana, M. How Does the Biocompatibility of Molybdenum Compare to the Gold Standard Titanium?—An In Vivo Rat Model. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 6312. <https://doi.org/10.3390/app13106312>

Academic Editor: Vittorio Checchi

Received: 21 April 2023

Revised: 13 May 2023

Accepted: 19 May 2023

Published: 22 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In oral and maxillofacial surgery, osteosynthesis materials are used for a wide variety of indications. Various plates, screws, and wires are mainly used for the treatment of midface and mandibular fractures or reconstructions, as well as in orthognathic surgery [1]. In addition, osteosynthesis systems are required for open cranial bone remodeling in craniosynostosis [2,3].

Modern osteosynthesis materials are subject to high standards of reliability and safety. In addition to excellent biocompatibility, sufficient long-term mechanical stability in relatively large dimensions is required, especially for plate and screw systems. The average mechanical forces acting on various osteosynthesis implants and the utility of titanium as a clinical gold standard are summarized in [4].

Titanium and stainless steel have been established and extensively tested for osteosynthesis systems for many decades [5]. For the most part, they demonstrate very good

biocompatibility, high and sustained mechanical strength, and low release of metal ions into the organism, even in large-dimension systems.

Although they are generally considered the gold standard for osteosynthesis, various disadvantages, such as allergies, corrosion degradation, interference with imaging modalities, and immune reactions, have also been described for these systems [6,7]. Other problems with titanium implants are the temperature sensitivity and tactile sensation of plates and screws [8,9]. As a result of these and other problems, metal removal is often recommended or even necessary. In the case of a second necessary operation for metal removal, general anesthetic complications can occur in addition to local complications, such as bleeding or nerve damage. For these reasons, bioresorbable implants have been the subject of research for many decades. The aim is to use biocompatible implants that can be degraded once they have fulfilled their function and do not unnecessarily burden or hinder the patient in the long term. Various resorbable osteosynthesis materials have been developed over the past decades, and are now used for several indications in different specialties [10]. Two major groups of materials can be distinguished: metallic and non-metallic materials. Magnesium and different magnesium alloys are well-studied and well-established resorbable metallic materials as potential bases for osteosynthesis [11–13]. For example, the MAGNEZIX® CS screw (Syntellix AG, Hannover, Germany) made of magnesium alloy (MgYREZr) has been used in the field of orthopedics since 2013, and its successful use has already been described in several studies [14–17]. Magnesium alloys show excellent biocompatibility and good integration into bone tissue. Despite its successful use, however, the uneven degradation of magnesium due to pitting corrosion has also been repeatedly described [18]. This makes prediction of the time to failure of an implant under significant mechanical loads difficult, and creates uncertainty for clinical users. The much lower mechanical strength of magnesium alloys compared to stainless steel or titanium also leads to larger implant dimensions, restricting applications in, e.g., maxillofacial surgery. Magnesium-based implants are also difficult to distinguish in X-ray-based medical imaging because of the low atomic number and density of magnesium.

Another large group of bioresorbable implants are polymers made of polylactic acids and polyglycolic acid (PGA), as well as combinations of these. Plates, screws, and pins based on polymers have already been used for several years in the field of oral and maxillofacial surgery [19]. Their clinical applications were reported as early as the 1980s [20]. For example, the Resorb-X® system (KLS Martin, Tuttlingen, Germany) is an established osteosynthesis material for the surgical treatment in pediatric craniofacial surgery [21].

However, the systems developed so far based on polylactic acids have not provided completely satisfactory results. Due to the low mechanical strength, biodegradable polymers are unsuitable for implants that are subjected to high mechanical loads [4]. The use of polymers for such applications would lead to unacceptably large dimensions and introduce a high amount of degradable material into the body. In addition, possible foreign body reactions and long-term inflammation due to persistent degradation products have been described in various studies [22,23]. Radiopacity and consequently visibility in X-ray based imaging for biodegradable polymers is even lower than for magnesium implants.

Thus, despite the constant further development and increasing experience of surgeons with these osteosynthesis systems, disadvantages are still evident, even when using established systems. For these reasons, scientists continue to search for suitable materials that provide the required stability and biocompatibility for optimal bioresorbable osteosynthesis materials. In this context, molybdenum has proven to be a promising alternative. In the human body, it is found as a trace element and co-substrate of some specific enzymes [24]. The degradation products can be excreted renally [25]. In initial publications, molybdenum showed sufficient mechanical properties as a material for osteosynthesis [26,27].

In our latest work on molybdenum, we were able to show that, in addition to being a potential material for cardiac stents [27], it is also a very promising biocompatible material for osteosyntheses [28]. We were able to show that molybdenum has the necessary biocompatibility and excellent mechanical properties for use as an osteosynthesis material, even

in the larger dimensions which are required. Specifically, we were able to demonstrate that molybdenum shows a very uniform degradation *in vitro*, with a complete loss of stability expected after 8–9 months. Furthermore, molybdenum of high purity showed no significant cytotoxicity in mouse or human fibroblasts, nor in human osteoblasts. Despite these positive results, testing the material in a complex organism is an imperative next step. Adverse effects such as renal damage, which has already been described due to overly high amounts of molybdenum intake [29,30], must be excluded.

The aim of our experiments was, therefore, to investigate the influence of molybdenum on the organism of a mammal—in this case, the rat. We investigated whether molybdenum samples produced by the selective laser melting process (SLM), also called laser powder bed fusion (LPBF), behave in a complex biological organism in a similarly biocompatible way as the gold standard titanium. We placed particular focus on ensuring that both titanium and molybdenum were manufactured in such a way that they could potentially serve as computer-aided and computer-manufactured (CAD-CAM) patient-specific implants (PSI).

For this purpose, a total of 96 rats were implanted with test specimens made of molybdenum and titanium subcutaneously (s.c.) in the fold of the neck. Local inflammation parameters, as described in Section 4, were recorded daily. Then, 12, 24, and 52 weeks later, the specimens from one-third of the total number of animals, respectively, were explanted, and the surrounding tissues were pathologically processed. The spleens, livers, and kidneys were also explanted and microscopically examined. To measure the degradation of the molybdenum samples, metallographic cross-sections of the samples were prepared and analyzed.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

2.1.1. Animal Model

A total of 96 male Wistar rats were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and included in the experiment at 16 weeks of age. All of the rats were housed under standard conditions and maintained on normal rat chow. Only male rats were used for the experiments in order to exclude gender-specific influences as a confounding factor. The animals were kept exclusively in individual cages postoperatively. This was to prevent mutual manipulation of the wound surfaces.

All of the procedures were licensed and carried out according to the institutional animal care guidelines as regulated by the German federal law governing animal welfare (Recklinghausen, Germany; Aktenzeichen 81.02.04.2021).

2.1.2. Implants

Molybdenum Implants

The molybdenum implants were manufactured by KLS Martin (Tuttlingen, Germany) using the selective laser melting process, and had an overall size of $10 \rightarrow 10 \rightarrow 2$ mm. Molybdenum powder, Mo-PDMPB, with a molybdenum content of >99.5% and a particle size smaller than $44 \mu\text{m}$ (obtained from H.C.—Starck, Goslar, Germany), was used. As a final step, the processed specimens were plasma-polished for 7 min using a nontoxic electrolyte developed and applied by H&E (Moritzburg, Germany) to obtain a surface roughness of $R_{z\text{max}} < 30 \mu\text{m}$. The surface roughness of a molybdenum surface may influence the degradation rate, with rougher surfaces leading to higher degradation due to the larger real surface area. The polished state was chosen for the purpose of better comparison with earlier *in vivo* studies in which polished molybdenum wires were used.

Selective Laser Melting

Selective laser melting is an established process to generate additive manufactured geometries. For this purpose, a powder layer is applied to a building platform in a thin-film process, which is sintered, i.e., fused, by means of a laser. The platform is then lowered, and a new layer of material is applied and fused. This repeated process builds up the

required design geometry layer by layer. When processing metallic materials with this technique, it is important that support structures are also built up, which then must be removed manually.

Titanium Implants

The titanium implants were produced by KLS Martin (Tuttlingen, Germany), also using the selective laser melting process, with dimensions of 10 → 10 → 2 mm. The processed powder, with a particle size of less than 63 µm, was Ti-6Al-4V (according to ASTM F136), which is the gold standard for the manufacturing of solid implant materials. The specimens were micro-glass pearl blasted and trovalized to gain a surface roughness of $R_{zmax} < 30 \mu m$ (standard process).

The specimens for both materials were produced on SLM 125 machines identical in build with the same vertical build-up strategy before being Gamma-sterilized at high doses (25 kGy) for the surgical application.

2.2. Methods

2.2.1. Study Design

A total of 96 animals were randomly divided into 2 approximately equal cohorts: 49 animals (51.0%) received a molybdenum implant and 47 (49.0%) a titanium implant (Figure 1). Postoperative blinded examinations were performed daily based on a previously prepared examination form. A third of the total cohort was examined at 12, 24, and 52 weeks, and then euthanized. The platelets were explanted, and histopathological tissue samples were taken for further processing.

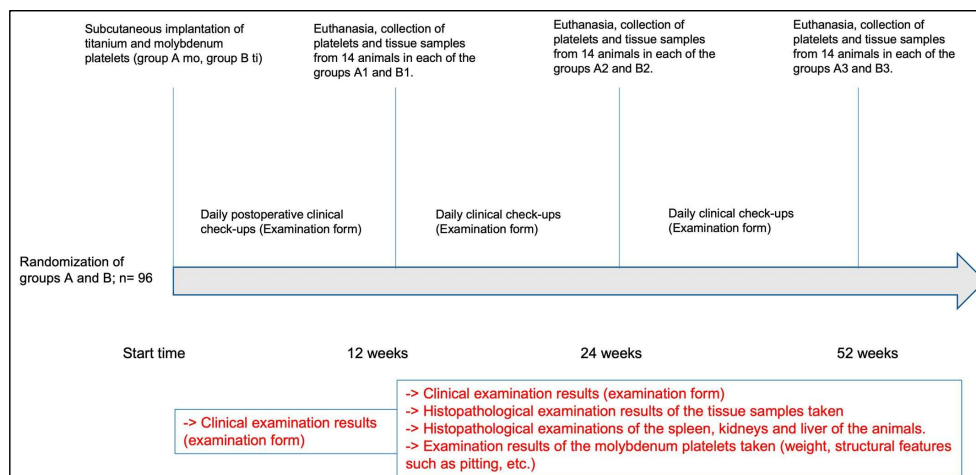


Figure 1. Time course of the in vivo test series.

2.2.2. Surgical Implantation of the Molybdenum and Titanium Platelets

We operated on 96 male rats under general anesthesia. The animals were injected intraperitoneally with ketamine (Ketaset® Zoetis, NJ, USA), 100 mg/kg (individual weight-adapted administration), and xylazine (Rompun® Bayer AG, Leverkusen, Germany), 5 mg/kg (individual weight-adapted administration). This was followed by preoperative preparation. An eye ointment containing dexpanthenol (Bepanthen®) Bayer AG, Leverkusen, Germany) was applied to protect the eyes, and the surgical area (median skin incision in the area of the shoulder blades, skin incision approx. 1.0–1.5 cm long) was shorn

with a mechanical shaver, “Favorita II” (Aesculap, Tuttlingen, Germany). The animals were then brought into the operating room, placed in prone position on a warming mat, and connected to the intraoperative monitoring system. The surgical field was cleaned and disinfected with an alcoholic iodine solution. In addition, meloxicam (Metacam® Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland), 1 mg/kg (individual weight-adapted administration), was injected s.c. preoperatively for analgesia. Before the start of surgery, a reflex test of the interphalangeal reflex was performed again for clinical control of the anesthesia. For the implantation of the molybdenum and titanium implants, first, a median skin incision (approx. 1.5 cm length) was made between the shoulder blades (Figure 2b). Then, a pocket was prepared in the area of the subcutaneous fat tissue using dissecting scissors and forceps (Figure 2c). Care was taken to ensure sufficient distance from the skin incision. The respective implant was inserted into the resulting subcutaneous pocket (Figure 2d).

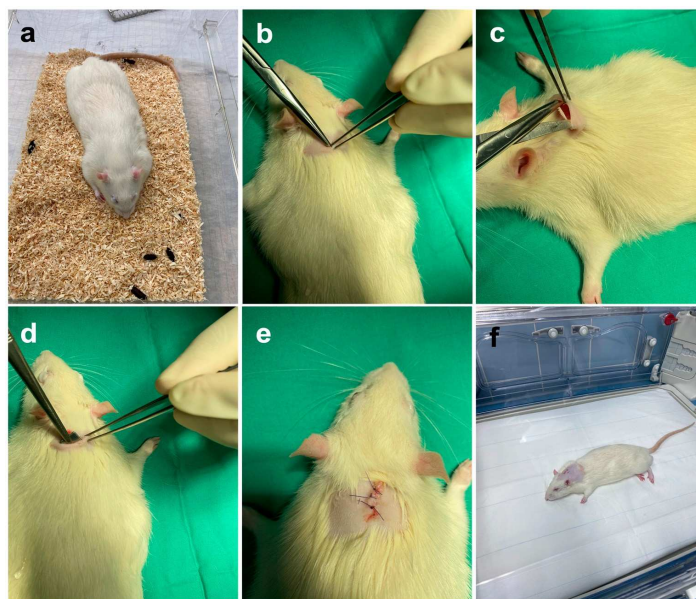


Figure 2. Illustration of the perioperative procedure. (a) Wistar rats were anesthetized and treated with eye ointment. Until the onset of deep anesthesia, the rats were kept in the cage. (b) Skin incision; (c) preparation of the subcutaneous pocket; (d) insertion of the implant; (e) suture closure with absorbable suture material; (f) postoperative recovery phase in the incubator.

The implants, made of titanium (control group or molybdenum (comparison group)), were each $10 \times 10 \times 2$ mm in size, and had rounded edges on all sides so that the peri-implant tissue was sufficiently protected. The sizes of the implants resulted from the limitations of the selective laser melting process. Thus, we used the smallest possible implants which could be manufactured from molybdenum in this way. For comparison purposes, the titanium implants had dimensions of the same size. After the implantation, the previously prepared skin pockets were closed with Vicryl™ 5-0 (Ethicon, NJ, USA) after checking the position of the implant again. Finally, the skin was sutured using single-button sutures (Figure 2e) with Vicryl™ 4-0 (Ethicon, NJ, USA) so that no suture removal was necessary in the later course. In total, we required an incision–suture time of between

10 and 15 min for the entire surgical procedure. At the end of the surgical procedure, the surgical wounds were disinfected and cleaned again. Finally, a spray dressing was applied. The animals were then placed in the prone position in incubators for the recovery phase (Figure 2f). After fully awakening from anesthesia, the animals were individually transferred to the cages and then to the animal rooms.

2.2.3. Postoperative Management

Animals were clinically assessed daily from the first examination, including documentation. A pre-determined scoring system decided whether clinical inflammation parameters were considered inflammation or not. If redness, swelling, purulent secretion, or hyperthermia were present together, or at least 2 of these 3 symptoms, it was considered a clinical inflammatory reaction. In this case, veterinarians were consulted daily for further co-management. The same applied to general abnormalities of the animals. In addition, the animals were weighed daily for the first seven days and then once a week to check their general condition. For postoperative analgesic therapy, the rats received meloxicam s.c. (Metacam® Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany) (1 mg/kg body weight, individual body weight-adjusted administration) once daily for the first three days after surgery.

2.2.4. Euthanasia and Removal of Implants and Organs

After the implantation of the platelets, 12 (group A1 and B1), 24 (group A2 and B2), and 52 weeks (group A3 and B3) passed before the animals underwent a final clinical examination and were subsequently sacrificed, in each case, by an intraperitoneal overdose of pentobarbital (Narcoren®) of 500 mg/kg body weight (28 animals in each case). The platelets were explanted (Figure 3) and examined metallographically for their weight and material composition.

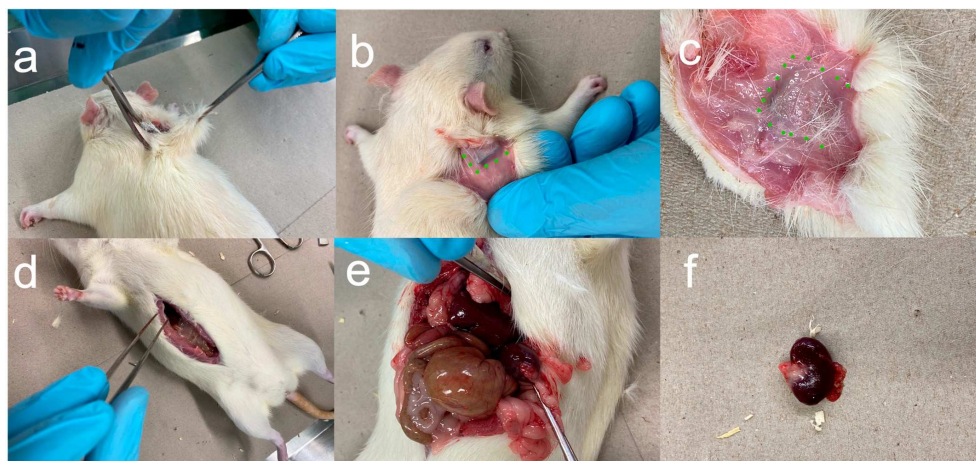


Figure 3. Presentation of the procedure after euthanasia. (a) Skin incision for removal of the tissue, including platelets; (b) representation of the platelet with surrounding capsule; (c) tissue preparation with contained platelet (dotted green), where the capsule was left in place (dotted green); (d) medial abdominal incision for organ removal; (e) presentation of the situs before organ removal; (f) kidney removed.

2.2.5. Histopathological Processing and Examination

With the removal of the platelets, surrounding circulatory tissue was also obtained, which was subsequently processed and examined in cooperation with the histopathological institute of The University Clinic Düsseldorf (Düsseldorf, Germany).

For histological examinations, formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) samples were cut in sections 1.5 µm in thickness and stained with H&E. Slides were then digitized for further analysis (Aperio slide scanner, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) using a 40× objective lens and a resolution of 0.2529 µm per pixel. Measurements, analyses, and picture captures for publication were carried out using the QuPath software (PMID: 29203879), version 0.4.1.

In particular, the features that indicated a chronic inflammatory reaction were examined. The focus was primarily on the infiltration of lymphocytic cells, increased angiogenesis, cell proliferation, and/or signs of fibrosis. To quantify and better compare the capsule formation around the implants and the inflammatory reactions, we used the synovitis score according to Krenn [31]. The spleens, livers, and kidneys of the animals were also processed and examined pathologically. The main aim was to compare these organs with the corresponding organs of the control group. Furthermore, we investigated whether deposits of molybdenum could be found in the corresponding organs.

2.2.6. Analysis of the Metallographic Cross Sections

We prepared samples from the 3-, 6-, and 12-month cohorts and compared them with each other. A sample that was not implanted also served as a control. The explanted molybdenum samples were cut by electrical discharge machining (EDM). The grain structures of the samples were made visible by metallographic preparation by grinding and polishing with alumina and diamond suspension. The surfaces of the samples were imaged by means of optical microscopy (Zeiss AxioCam 208 color, Oberkochen, Germany).

2.2.7. Statistics

The values obtained from the measurements and the clinical data were analyzed using Jamovi (version 1.6.9, (Computer Software). Retrieved from <https://www.jamovi.org>, accessed on 19 March 2022, Sydney, Australia). A *p*-value of 0.05 was set for the hypothesis test [32,33]. The Shapiro–Wilk test was performed to test the data for normal distribution, and the Mann–Whitney U test and Student's *t*-test were used to compare the means of the two groups. A contingency table was constructed for the categorical variables. To test correlations between the categorical variables, the chi-square test was used. The weight progressions were calculated using Excel Microsoft 365 (2021).

3. Results

We enrolled 96 Wistar rats in the study and operated on them. The 96 animals were divided into 2 approximately equal cohorts: 49 animals (51.0%) received a molybdenum implant and 47 (49.0%) a titanium implant, as shown in Figure 4a. Both implant types were produced by the selective laser melting process. For the exact compositions of the plates, see Section 2.

As shown in Figure 4b, 10 animals (10.4%) died immediately postoperatively (6 animals (60.0%) with molybdenum and 4 animals (40.0%) with titanium implants due to unspecific complications. Dissections of the animals performed immediately after death by a veterinarian did not reveal any pathological abnormalities. Another animal (with a titanium implant) died three days postoperatively from acute kidney failure. In the necropsy of the animal, the veterinarian could not establish a connection to the inserted titanium implant. The acute kidney failure was most likely a complication of the general anesthesia.

Figure 5 shows the clinical inflammatory reactions in the period immediately postoperatively and up to a maximum of postoperative week 12 (T1).

If an inflammatory reaction occurred in one of the animals during this time window, it was immediately recorded, and the animal was marked as positive for inflammation.

Postoperative infections were present in 11 of 85 animals (12.9%). Within this subset, a molybdenum implant was implanted in 4 animals (36.4%) and a titanium implant in 7 animals (63.6%). No statistically significant dependence of the implanted material on the inflammatory response could be demonstrated ($\chi^2(1) = 0.861$, $p = 0.354$, Cramer's $V = 0.101$).

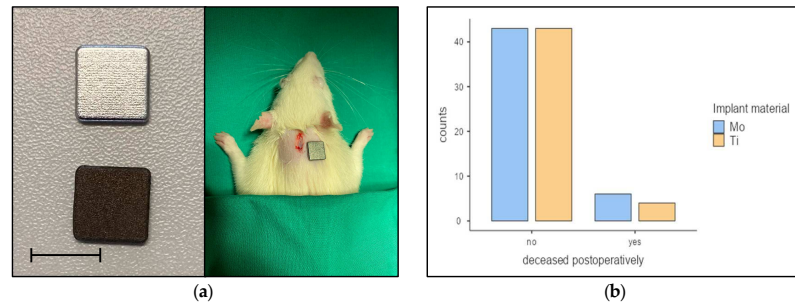


Figure 4. (a) Wistar rats were implanted with either a molybdenum (above) or titanium implant (below); scale bar represents 10 mm; (b) 10 animals (10.4%) died immediately postoperatively (6 animals (60.0%) with molybdenum and 4 animals (40.0%) with titanium implants).

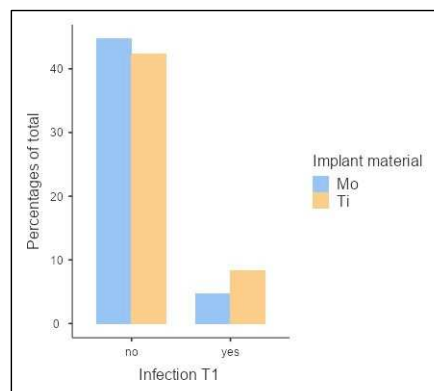


Figure 5. Clinical inflammatory response within the first 12 weeks postoperatively (T1).

According to clinical assessment, all local inflammatory reactions were scratch marks in response to the shaved area. One animal had to be euthanized for welfare reasons after the seventh postoperative week due to an excessively large sore area. This animal had been implanted with a titanium specimen.

Thus, from week 8 onwards, a total of 84 animals were included in the trial. Consequently, 28 animals were euthanized after 12 weeks (T2), 24 weeks (T3), or 52 weeks (T4).

After 12 weeks (T2), infection occurred in 4 of 84 animals (4.8%) (Figure 6). A molybdenum implant was used in 25.0% ($n = 1$) and a titanium implant in 75.0% ($n = 3$). With $p = 0.329$, no significant dependence of the implant choice on the inflammatory response was demonstrated ($\chi^2(1) = 0.953$, $p = 0.329$, Cramer's $V = 0.107$).

No infections occurred from week 13 onward. At T3, the total collective consisted of a total of 55 animals, 45.5% ($n = 25$) of which had received molybdenum and 54.5% ($n = 30$) of which had received titanium implants. At T3, after 52 weeks, the distribution was as follows in $n = 27$ animals: 40.7% ($n = 11$) molybdenum and 59.3% ($n = 16$) titanium implants.

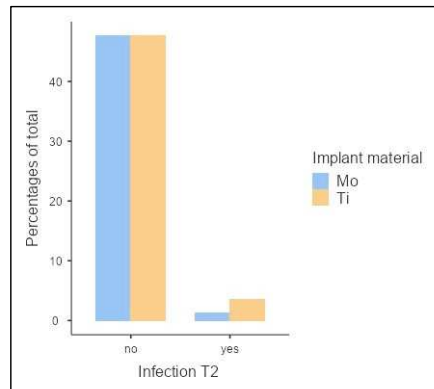


Figure 6. Clinical inflammatory response 12 weeks postoperatively (T2).

In summary, the molybdenum samples did not induce a significant inflammatory response at any time compared to titanium. Irrespective of the materials used, the infections that could be clinically detected were identified as scratch marks resulting from shaving and the reactions of the animals to the shaved areas (Supplementary Figure S1).

The animals had an average body weight at T1 of 457 ± 38.4 g (molybdenum implants) and 454 ± 39.2 g (titanium implants). During the course, the average weight was 554 ± 57.7 vs. 544 ± 55.0 (T2), 605 ± 40.7 vs. 604 ± 69.9 (T3), and 656 ± 51.6 vs. 689 ± 74.0 (T4). The differences between the two groups were not significant at any of the time points. Comparing the relative weight gain, there were no significant differences between the two groups nor between the different time points (Figure 7).

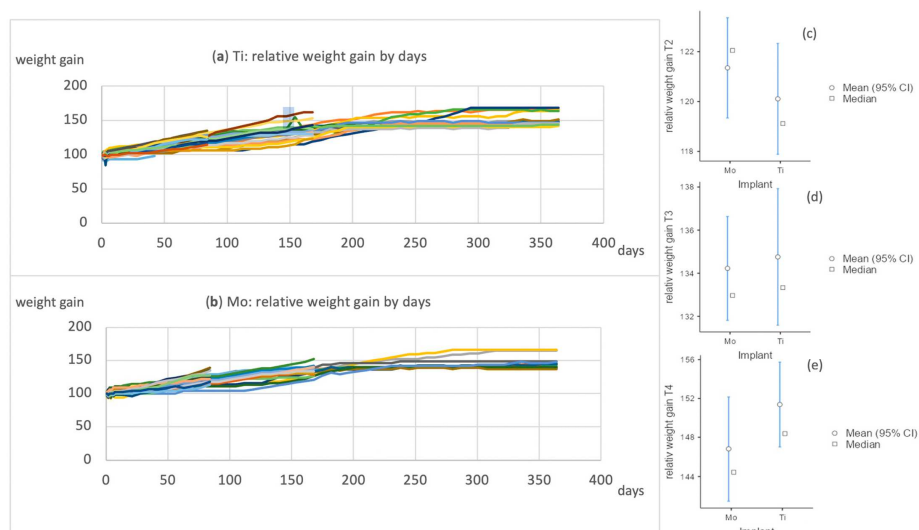


Figure 7. The relative weight gain, by days, of the rats with either titanium implants (a) or molybdenum implants (b) is presented. (c–e) show the comparison of the weight development of the two groups, titanium and molybdenum, at the different time points (T2, T3, and T4).

After euthanasia, cutaneous, subcutaneous, and muscular tissue, including previously inserted samples, was collected and pathologically processed. We compared all preparations with those of the titanium platelets. There were moderate to mild inflammatory reactions around the platelets in each case, but no differences between the tissue around the molybdenum or titanium platelets. Tissue capsules were found to have formed around both types of implants (Figure 8). Within the capsules and in the adjacent tissue outside, slight metallic abrasion was seen in both groups. There was no difference regarding the implanted materials.

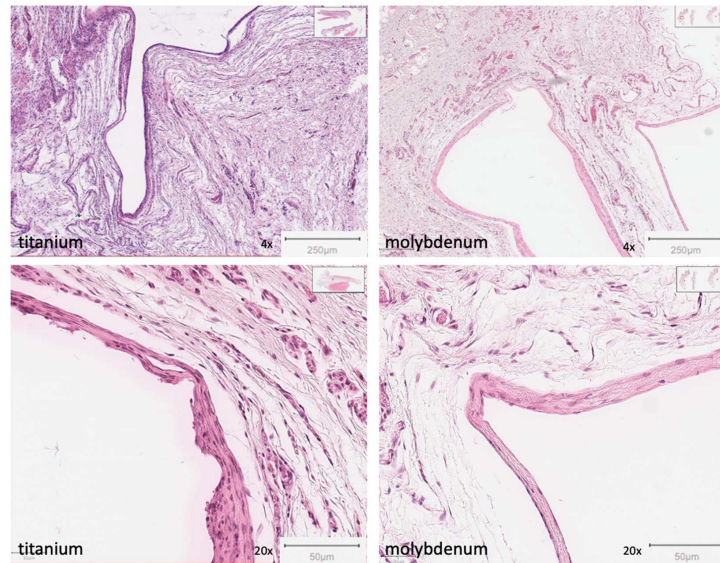


Figure 8. Representative histological imaging of the tissue surrounding the platelet (left side: titanium at magnifications of 4 $\times$ and 20 $\times$; right side: molybdenum at magnifications of 4 $\times$ and 20 $\times$). The formation of the capsules is shown. H&E staining was performed.

To quantitatively characterize the capsule formation and the associated histopathological inflammatory reaction, we used the Krenn score as a guide. In the evaluation of the capsules according to Krenn et al., a sum score was formed from the individual scores of the synovial covering cell layer, the cell density of the synovial stroma, and the leucocytic infiltrates [31]. The score was used to describe either no synovitis, low-grade synovitis, or high-grade synovitis [31]. The capsules of 30 animals were evaluated, 17 titanium and 13 molybdenum (Table 1). The 30 pathological preparations showed scores of 0 ($n = 2$, 6.6%), 1 ($n = 13$, 43.3%), 2 ($n = 9$, 30.0%), and 3 ($n = 6$, 20.0%) for synovial covering of cell visibility. The cell density of the synovial stroma can be described with the following scores: 0 ($n = 8$, 26.7%), 1 ($n = 17$, 56.7%), 2 ($n = 4$, 13.3%), 3 ($n = 1$, 3.3%). Leukocytic infiltrates were calculated with a score of 0 ($n = 3$, 10.0%), 1 ($n = 19$, 63.3%), or 2 ($n = 8$, 26.7%).

In the capsule evaluation, according to Krenn, 3 cases (10.0%) showed no synovitis, 20 cases (66.7%) showed low-grade synovitis, and 7 cases (23.3%) showed high-grade synovitis.

Of the 30 evaluated specimens, 2 animals (6.7%) also showed an inflammatory reaction in the clinical assessment at time T1. One had received a titanium and the other a molybdenum implant. At the time of euthanasia at time T2, 1 animal had no synovitis

($n = 1$, 11.1%), 7 others had low-grade synovitis ($n = 7$, 77.7%), and 1 ($n = 1$, 11.1%) had high-grade synovitis. For time point T3 ($n = 11$), distributions of 0 ($n = 2$, 18.2%), 1 ($n = 7$, 63.6%), and 2 ($n = 2$, 18.2%) were found, and for T4 ($n = 10$), distributions of 1 ($n = 6$, 60.0%) and 2 ($n = 4$, 40.0%) were found.

Table 1. Overview of the evaluation of the capsules according to Krenn et al. (synovial covering of the cell layer and the cell density of the synovial stroma and the leucocytic infiltrates).

Score	Total ($n = 30$)		Ti ($n = 17$)		Mo ($n = 13$)	
Synovial covering of the cell layer	n	%	n	%	n	%
0	2	6.57	0	0.0	2	15.4
1	13	43.3	7	41.2	6	46.2
2	9	30.0	7	41.2	2	15.4
3	6	20.0	3	17.6	3	23.1
Cell density of the synovial stroma	n	%	n	%	n	%
0	8	26.7	4	23.5	4	30.8
1	17	56.7	11	64.7	6	46.2
2	4	13.3	1	5.9	3	23.1
3	1	3.3	1	5.9	0	0.0
Leukocytic infiltrate	n	%	n	%	n	%
0	3	10.0	1	5.9	2	15.4
1	19	63.3	14	82.4	5	38.5
2	8	26.7	2	11.8	6	46.2
Krenn score	n	%	n	%	n	%
0	3	10.0	1	5.9	2	15.4
1	20	66.7	13	76.5	7	53.8
2	7	23.3	3	17.6	4	30.8

No statistically significant correlation between capsular evaluation according to Krenn and the choice of implant could be demonstrated with $\chi^2(2) = 1.77$, $p = 0.412$, Cramer's $V = 0.243$.

Regarding the duration of implantation in relation to the occurrence of synovitis, there was no statistically significant correlation with $r_s = 0.294$ or $p = 0.115$ (Figure 9).

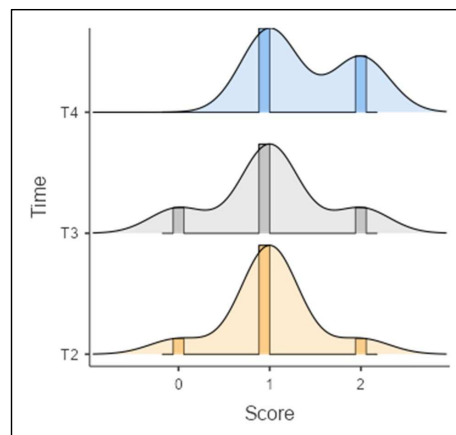


Figure 9. Synovitis assessment according to Krenn at the time points of T2, T3, and T4.

We examined the spleens, kidneys, and livers of all 84 animals.

Two of the eighty-four kidneys showed slight abnormalities in the form of infarcted areas. One animal was from the titanium cohort and the other from the cohort with molybdenum, and both were euthanized after 52 weeks.

Otherwise, the kidneys were inconspicuous, and no deposits of molybdenum or titanium were found.

Neither the spleen nor the liver showed any organic changes, but 7 of 84 organs showed capsular necrosis, which, according to an investigation at the Institute of Pathology of the University clinic Düsseldorf, Germany, occurred post mortem due to cardiac arrest. For all explanted molybdenum samples, surface colorations varying from yellow/golden to blue/violet were observed (Figure 10). Various colors were observed among the samples from each cohort, with no clear tendency towards a specific coloration within any of the cohorts. For molybdenum, the surface coloration was a first indication of the thickness of the degradation product layer on the surface. Yellow/golden coloration roughly corresponded to a thickness of around 50 nm, while blue/violet colorations corresponded to a thickness above 50 nm and below 100 nm. For a thickness higher than 0.8–1.0 µm, the degraded surface appeared black. The colorations of the explanted samples thus indicate that only a very thin layer of degradation products formed over 3–12 months. Correspondingly, only a very small amount of molybdenum would have dissolved, since the soluble product of the oxidation cascade of molybdenum, MoO_3 , was formed within the degradation layer and then was transferred into a solution in the form of MoO_4^{2-} (molybdate ion).

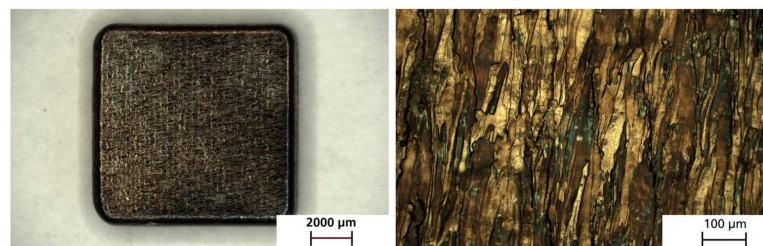


Figure 10. Exemplary representation of the coloration of the specimens in plain view and in enlargement. Here, a sample of the 6-month cohort is shown.

The analysis of the metallographic cross-sections (Figure 11) of the explanted molybdenum samples confirmed that there were only miniscule degradation product layers, irrespective of the total duration of implantation. Due to the thickness of the degradation layers, far below 1 µm and likely in the range of 50–100 nm, it was not possible to distinguish the implanted samples from the samples in the as-manufactured state. The thin dark “layer” at the interface of Mo and the embedding resin was not the degradation product layer, but a small fissure that formed during embedding. This is supported by the fact that this fissure also appeared in the as-manufactured state. Five samples from each cohort were analyzed, with no marked differences either within a cohort or between cohorts.

The cross-sections of all the as-manufactured samples and the samples explanted after 3 or 6 months showed internal cracks and pores. Since these defects were already observed in the as-manufactured samples, they were determined not to be related to exposure to the biological environment. Cracking and pore formation are known problems with SLM manufacturing of pure molybdenum [34]. Because of the highly uniform degradation of molybdenum, its release from a sample is directly proportional to the exposed surface area. However, since most cracks and pores are purely internal and not connected to the outer surface (see images with higher magnification in Figure 11), the additional internal surfaces are not exposed to body fluids and, therefore, do not contribute to the degradation of molybdenum or its release into the biological environment. In the samples implanted

for 12 months, the regions close to the surface were mostly free from cracks and pores. However, in some regions of the surface, a “wave-like” roughness pattern appeared.

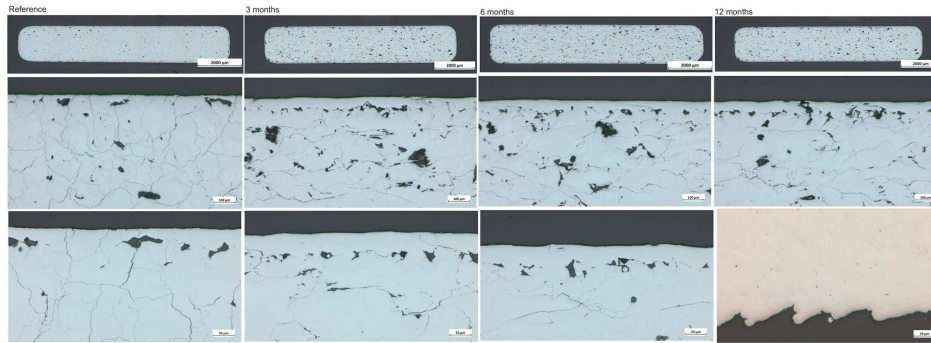


Figure 11. Metallographic cross-sections of molybdenum samples. The analyses of the samples are shown from left to right in ascending order, from the reference to the 12-month sample. The upper line shows the cut sample, the middle line the 100 $\times$ magnification, and the lower line the 200 $\times$ magnification. Optical microscopy images are shown.

4. Discussion

The results must be considered from two different points of view—biocompatibility and degradation rates.

The overall aim of our experiment was to demonstrate the biocompatibility of molybdenum compared to the gold standard titanium in a complex organism.

We were able to clearly demonstrate, in a statistically sufficiently large cohort, that molybdenum plates do not cause a significant inflammatory reaction after insertion into the nuchal fold when compared with the gold standard titanium. This is based on evidence from daily clinical routine examination as well as histopathological diagnostics. Using the established Krenn histopathological synovitis score, we were able to quantify our observations of reactive capsule formation and compare both cohorts. There were no significant differences between the animals with either molybdenum or titanium implants. Furthermore, in addition to the inflammatory response, the general welfare of the animals was also examined daily. Both cohorts showed normal absolute weight, as well as adequate weight gain, without significant differences between the groups. These *in vivo* biocompatibility results are, therefore, in line with our previously conducted experiments, in which we were already able to demonstrate the biocompatibility of molybdenum *in vitro* [28].

The kidneys, livers, and spleens of the rats showed no macroscopic or pathological anomalies, and especially no differences in comparison between the examined cohorts. There were no measurable deposits of molybdenum. This is particularly noteworthy for the kidneys, because the excretion of molybdenum has, so far, mainly been described renally [35]. In addition, higher doses of molybdenum intake have been described as harmful to the kidneys of rats [29]. Bompert et al. showed that doses of 80 mg/kg/d lead to dysfunction of the tubules and glomeruli [30]. Sikora-Jasinska et al. also reported a qualitative pathological remodeling of Bowman’s capsule and glomeruli of the kidney, which could be related to Mo toxicity [27].

However, we must point out that, according to metallographic examination, very little Mo was dissolved, so it is not surprising that there were no changes. However, this is not evidence that Mo cannot theoretically cause damage.

So far, our biocompatibility results agree with those of Sikora-Jasinska et al. and Schaub et al. who also reported on the biocompatibility of molybdenum regarding the question of whether molybdenum is a potentially bioresorbable material for cardiac stents [27,36].

The very low degradation of the explanted molybdenum samples in this study is in marked contrast to the degradation rates observed in earlier *in vivo* studies of pure molybdenum. In the studies of molybdenum wires implanted into the aortic walls of Wistar rats [36] or mice [27], degradation product layers of more than 10 µm formed on the surfaces when the wires were integrated into the aortic wall. For the samples in the present study, the thickness of the degradation product layer was much lower than 1 µm. The thickness of the degradation product layer is a good indication of the total amount of dissolved molybdenum in a sample. Molybdenum does not dissolve from the metallic state, but undergoes several oxidation steps along a reaction cascade, leading to soluble-form MoO_3 and, finally, dissolved-form MoO_4^{2-} (molybdate) [37]. The rate-limiting step is the reaction of Mo_2O_5 (s) + H_2O (l) $\rightarrow$ $\text{Mo}_2\text{O}_5\text{OH}$ (s) + H^+ [38] + e^- [39]. Therefore, the degradation proceeds by the formation of an oxide layer, the molybdenum content of which is reduced over time by the release of molybdate ions. The absence of an appreciable degradation product layer thus indicates minimal dissolution. The most likely explanation for the low degradation rate is the anatomical environment to which the samples are exposed. As described previously, the molybdenum samples in the fold of the neck were enclosed in tissue capsules, which was not observed in the studies of molybdenum wires implanted into the aortic wall. The capsule restricts the exchange of fluid with the rest of the body. Within the capsule, both the degradation of molybdenum (overall reaction equation: $\text{Mo} + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MoO}_4^{2-} + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^-$) and the observed low-level inflammation may lead to more acidic conditions. Acidic conditions are known to slow the degradation of molybdenum [40]. The formation of the capsule may also inhibit the integration of the samples into the surrounding tissue. Based on results from earlier studies, tissue integration seems to be an important factor in determining the degradation rate, with less integrated samples degrading more slowly. For example, the degradation product layer thickness for a less integrated sample was reported to be only one-fifth of the layer thickness for a well-integrated sample in [34].

Bone healing, e.g., after a fracture, involves complex remodeling processes and depends, above all, on the body region. Complete ossification is usually observed after 6 weeks. Complete stability is normally assumed after about six months, especially in the field of maxillofacial surgery. A good guideline is that the implant should bear load for 3–6 months and then have fulfilled its function.

In our previous *in vitro* experiments, we were able to show that molybdenum sheets under physiological conditions exhibited a mass loss of approx. 20% after 6 months [28]. Thus, a relevant loss of stability occurred, which, in theory, would fit well with the time needed for bone stability to be regained. Furthermore, this rate of degradation indicates that there is a reasonable expectation that a molybdenum-based implant will degrade within a clinically relevant time frame, e.g., 1–2 years.

However, the degradation rates for encapsulated molybdenum are so low ($<1 \mu\text{m}/\text{year}$) that degradation will not occur in humanly achievable time. Animal studies in other tissues (aortic wall) have shown degradation rates corresponding to a few tens of $\mu\text{m}/\text{year}$ at most. Unless future experiments with other tissues show significantly higher rates, molybdenum implants should, therefore, not exceed structural sizes of 100 µm, or a maximum of 150 µm, to allow for degradation within a few years. The significant strength and stiffness of molybdenum are advantageous here, allowing for much thinner structure sizes than those of magnesium implants, for example.

The suitability of molybdenum as a resorbable biomaterial for osteosynthesis implants may, therefore, depend on the tissue reaction at the location of implantation. Direct contact with bone tissue in osteosynthesis would most likely lead to different degradation behavior. The degradation behavior in various tissues must be studied in more detail to determine the factors influencing the degradation. This may also result in strategies (such as surface functionalization) leading to the desired level of tissue integration and favorable conditions for moderate, uniform degradation in the range of several tens of μm per year.

5. Conclusions

Compared to the gold standard titanium, we did not detect any significant differences in inflammatory reactions associated with the implanted specimens or other influences on the health of the animals. This speaks to an excellent local biocompatibility of the molybdenum material.

The extensive histopathological studies showed capsule formation in the nuchal fold, which greatly slowed degradation compared to previous in vivo studies. Even after 12 months, degradation was minimal. Therefore, the deposition of molybdenum in the organs cannot be adequately and conclusively assessed.

The influence of tissue environment, tissue reaction, and tissue integration of the implants on molybdenum degradation needs to be investigated in more detail in further studies. If necessary, strategies should be developed to modify the implants in order to achieve more favorable degradation conditions. For this purpose, tests on larger animals in direct bone contact will be the touchstone for suitability as osteosynthesis materials.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app13106312/s1>, Figure S1: Scratch marks in response to the shaved area.

Author Contributions: Conceptualization, A.T.; methodology, A.T., N.K., D.H., M.S., G.P., L.v.M. and H.M.; validation, A.T., H.M. and G.P.; data curation, A.T., H.M. and D.H.; writing—original draft preparation, A.T., H.M. and D.H.; writing—review and editing, A.T. and G.P.; visualization, A.T., H.M., G.P. and D.H.; supervision, M.R.; project administration, A.T. and M.R.; funding acquisition, M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Germany; Verbundprojekt: Resorbierbare patientenindividuelle Implantate für die pädiatrische Chirurgie (ResorbM); funding code: 13GW0303D.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board of Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Germany (LANUV) (Aktenzeichen 81.02.04.2021, approved on 7 June 2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: For further information, please contact the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Haerle, F.; Champy, M. *Atlas of Craniomaxillofacial Osteosynthesis: Microplates, Miniplates, and Screws*; Thieme: New York, NY, USA, 2011.
- Yan, H.; Abel, T.J.; Alotaibi, N.M.; Anderson, M.; Niazi, T.N.; Weil, A.G.; Fallah, A.; Phillips, J.H.; Forrest, C.R.; Kulkarni, A.V.; et al. A systematic review and meta-analysis of endoscopic versus open treatment of craniosynostosis. Part 1: The sagittal suture. *J. Neurosurg. Pediatr.* **2018**, *22*, 352–360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yan, H.; Abel, T.J.; Alotaibi, N.M.; Anderson, M.; Niazi, T.N.; Weil, A.G.; Fallah, A.; Phillips, J.H.; Forrest, C.R.; Kulkarni, A.V.; et al. A systematic review of endoscopic versus open treatment of craniosynostosis. Part 2: The nonsagittal single sutures. *J. Neurosurg. Pediatr.* **2018**, *22*, 361–368. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gareb, B.; Roossien, C.C.; van Bakelen, N.B.; Verkerke, G.J.; Vissink, A.; Bos, R.R.; van Minnen, B. Comparison of the mechanical properties of biodegradable and titanium osteosynthesis systems used in oral and maxillofacial surgery. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 18143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Barber, C.C.; Burnham, M.; Ojameruaye, O.; McKee, M.D. A systematic review of the use of titanium versus stainless steel implants for fracture fixation. *OTA Int.* **2021**, *4*, e138. [\[CrossRef\]](#)
- Comino-Garayoa, R.; Cortés-Bretón Brinkmann, J.; Peláez, J.; López-Suárez, C.; Martínez-González, J.M.; Suárez, M.J. Allergies to Titanium Dental Implants: What Do We Really Know about Them? A Scoping Review. *Biology* **2020**, *9*, 404. [\[CrossRef\]](#)
- Case, C.; Langkamer, V.; James, C.; Palmer, A.; Kemp, A.; Heap, P.; Solomon, L. Widespread dissemination of metal debris from implants. *J. Bone Jt. Surg.* **1994**, *76-B*, 701–712. [\[CrossRef\]](#)
- Buijs, G.J.; Stegenga, B.; Bos, R. Efficacy and safety of biodegradable osteofixation devices in oral and maxillofacial surgery: A systematic review. *J. Dent. Res.* **2006**, *85*, 980–989. [\[CrossRef\]](#)

9. Gareb, B.; Van Bakelen, N.; Buijs, G.; Jansma, J.; De Visscher, J.; Hoppenreijns, T.J.; Bergsma, J.; van Minnen, B.; Stegenga, B.; Bos, R. Comparison of the long-term clinical performance of a biodegradable and a titanium fixation system in maxillofacial surgery: A multicenter randomized controlled trial. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177152. [\[CrossRef\]](#)
10. Kanno, T.; Sukegawa, S.; Furuki, Y.; Nariai, Y.; Sekine, J. Overview of innovative advances in bioresorbable plate systems for oral and maxillofacial surgery. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **2018**, *54*, 127–138. [\[CrossRef\]](#)
11. Erdmann, N.; Bondarenko, A.; Hewicker-Trautwein, M.; Angrisani, N.; Reifenrath, J.; Lucas, A.; Meyer-Lindenberg, A. Evaluation of the soft tissue biocompatibility of MgCa0.8 and surgical steel 316L in vivo: A comparative study in rabbits. *Biomed. Eng. Online* **2010**, *9*, 63. [\[CrossRef\]](#)
12. Waizy, H.; Diekmann, J.; Weizbauer, A.; Reifenrath, J.; Bartsch, I.; Neubert, V.; Schavan, R.; Windhagen, H. In vivo study of a biodegradable orthopedic screw (MgYREZr-alloy) in a rabbit model for up to 12 months. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *28*, 667–675. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Erdmann, N.; Angrisani, N.; Reifenrath, J.; Lucas, A.; Thorey, F.; Bormann, D.; Meyer-Lindenberg, A. Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: A comparative in vivo study in rabbits. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1421–1428. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. May, H.; Alper Kati, Y.; Gumussuyu, G.; Yunus Emre, T.; Unal, M.; Kose, O. Bioabsorbable magnesium screw versus conventional titanium screw fixation for medial malleolar fractures. *J. Orthop. Traumatol.* **2020**, *21*, 9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Biber, R.; Pauser, J.; Brem, M.; Bail, H.J. Bioabsorbable metal screws in traumatology: A promising innovation. *Trauma Case Rep.* **2017**, *8*, 11–15. [\[CrossRef\]](#)
16. Waizy, H.; Seitz, J.-M.; Reifenrath, J.; Weizbauer, A.; Bach, F.-W.; Meyer-Lindenberg, A.; Denkena, B.; Windhagen, H. Biodegradable magnesium implants for orthopedic applications. *J. Mater. Sci.* **2013**, *48*, 39–50. [\[CrossRef\]](#)
17. Plaass, C.; Ettinger, S.; Sonnow, L.; Koenneker, S.; Noll, Y.; Weizbauer, A.; Reifenrath, J.; Claassen, L.; Daniilidis, K.; Stukenborg-Colsman, C.; et al. Early results using a biodegradable magnesium screw for modified chevron osteotomies. *J. Orthop. Res.* **2016**, *34*, 2207–2214. [\[CrossRef\]](#)
18. Zheng, Y.F.; Gu, X.N.; Witte, F. Biodegradable metals. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2014**, *77*, 1–34. [\[CrossRef\]](#)
19. Eppley, B.L.; Morales, L.; Wood, R.; Pensler, J.; Goldstein, J.; Havlik, R.J.; Habal, M.; Losken, A.; Williams, J.K.; Burstein, F.; et al. Resorbable PLLA-PGA plate and screw fixation in pediatric craniofacial surgery: Clinical experience in 1883 patients. *Plast. Reconstr. Surg.* **2004**, *114*, 850–856; discussion 857. [\[CrossRef\]](#)
20. Bos, R.R.; Boering, G.; Rozema, F.R.; Leenslag, J.W. Resorbable poly(L-lactide) plates and screws for the fixation of zygomatic fractures. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1987**, *45*, 751–753. [\[CrossRef\]](#)
21. Wood, R.J.; Petronio, J.A.; Graupman, P.C.; Shell, C.D.; Gear, A.J.L. New Resorbable Plate and Screw System in Pediatric Craniofacial Surgery. *J. Craniofacial Surg.* **2012**, *23*, 845–849. [\[CrossRef\]](#)
22. Eppley, B.L. Zygomaticomaxillary fracture repair with resorbable plates and screws. *J. Craniofacial Surg.* **2000**, *11*, 377–385. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Bergsma, J.E.; De Bruijn, W.; Rozema, F.; Bos, R.; Boering, G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* **1995**, *16*, 25–31. [\[CrossRef\]](#)
24. Schwarz, G.; Mendel, R.R.; Ribbe, M.W. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **2009**, *460*, 839–847. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Bojinov, M.; Betova, I.; Raicheff, R. A model for the transpassivity of molybdenum in acidic sulphate solutions based on ac impedance measurements. *Electrochim. Acta* **1996**, *41*, 1173–1179. [\[CrossRef\]](#)
26. Redlich, C.; Quadbeck, P.; Thieme, M.; Kieback, B. Molybdenum—A biodegradable implant material for structural applications? *Acta Biomater.* **2020**, *104*, 241–251. [\[CrossRef\]](#)
27. Sikora-Jasinska, M.; Morath, L.M.; Kwesiga, M.P.; Plank, M.E.; Nelson, A.L.; Oliver, A.A.; Bocks, M.L.; Guillory, R.J.; Goldman, J. In-vivo evaluation of molybdenum as bioabsorbable stent candidate. *Bioact. Mater.* **2022**, *14*, 262–271. [\[CrossRef\]](#)
28. Toschka, A.; Pöhle, G.; Quadbeck, P.; Suschek, C.V.; Strauß, A.; Redlich, C.; Rana, M. Molybdenum as a Potential Biocompatible and Resorbable Material for Osteosynthesis in Craniomaxillofacial Surgery—An In Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15710. [\[CrossRef\]](#)
29. Murray, F.J.; Sullivan, F.M.; Tiwary, A.K.; Carey, S. 90-Day subchronic toxicity study of sodium molybdate dihydrate in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *70*, 579–588. [\[CrossRef\]](#)
30. Bompert, G.; Pécher, C.; Prévot, D.; Girolami, J.P. Mild renal failure induced by subchronic exposure to molybdenum: Urinary kallikrein excretion as a marker of distal tubular effect. *Toxicol. Lett.* **1990**, *52*, 293–300. [\[CrossRef\]](#)
31. Krenn, V.; Morawietz, L.; Burmester, G.R.; Kinne, R.W.; Mueller-Ladner, U.; Müller, B.; Haupt, T. Synovitis score: Discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology* **2006**, *49*, 358–364. [\[CrossRef\]](#)
32. Goodman, S. A dirty dozen: Twelve p-value misconceptions. *Semin. Hematol.* **2008**, *45*, 135–140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Greenland, S.; Senn, S.J.; Rothman, K.J.; Carlin, J.B.; Poole, C.; Goodman, S.N.; Altman, D.G. Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: A guide to misinterpretations. *Eur. J. Epidemiol.* **2016**, *31*, 337–350. [\[CrossRef\]](#)
34. Braun, J.; Kaserer, L.; Stajkovic, J.; Leitz, K.H.; Tabernig, B.; Singer, P.; Leibenguth, P.; Gspan, C.; Kestler, H.; Leichtfried, G. Molybdenum and tungsten manufactured by selective laser melting: Analysis of defect structure and solidification mechanisms. *Int. J. Refract. Met. Hard Mater.* **2019**, *84*, 104999. [\[CrossRef\]](#)

35. Turnlund, J.R.; Weaver, C.M.; Kim, S.K.; Keyes, W.R.; Gizaw, Y.; Thompson, K.H.; Peiffer, G.L. Molybdenum absorption and utilization in humans from soy and kale intrinsically labeled with stable isotopes of molybdenum. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *69*, 1217–1223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Schauer, A.; Redlich, C.; Scheibler, J.; Poehle, G.; Barthel, P.; Maennel, A.; Adams, V.; Weissgaerber, T.; Linke, A.; Quadbeck, P. Biocompatibility and Degradation Behavior of Molybdenum in an In Vivo Rat Model. *Materials* **2021**, *14*, 7776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Petrova, M.; Bojinov, M.; Zanna, S.; Marcus, P. Mechanism of anodic oxidation of molybdenum in nearly-neutral electrolytes studied by electrochemical impedance spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 7899–7906. [[CrossRef](#)]
38. Jin, Z.; Hu, J.; Ma, D. Postoperative delirium: Perioperative assessment, risk reduction, and management. *Br. J. Anaesth.* **2020**, *125*, 492–504. [[CrossRef](#)]
39. Johnson, J.W.; Chi, C.H.; Chen, C.K.; James, W.J. The Anodic Dissolution of Molybdenum. *Corrosion* **2013**, *26*, 338–342. [[CrossRef](#)]
40. Pourbaix, M. Applications of electrochemistry in corrosion science and in practice. *Corros. Sci.* **1974**, *14*, 25–82. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4. Diskussion

Mit der hier dargestellten experimentellen Grundlagenforschung sollte der erste Schritt zur Charakterisierung des Metalls Molybdän als potenziell resorbierbares Osteosynthesematerial in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie erfolgen.

Die Untersuchungen umfassten dazu insgesamt zwei aufeinander aufbauende Versuchsreihen. Zunächst wurden verschiedene *In-vitro*-Versuche durchgeführt, um dann nach erfolgreicher Auswertung umfangreiche *In-vivo*-Versuche anschließen zu können. Daher muss man die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sicherlich zunächst einzeln und dann im Zusammenhang bewerten.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der *In-vitro*-Versuche

Als erster Schritt der Untersuchungen wurden *In-vitro*-Versuchsreihen durchgeführt, deren Ziele es waren, das Degradationsverhalten von Molybdän zu untersuchen, sowie die *In-vitro*-Zytotoxizität auszuschließen.

Die Experimente zur Degradation von Molybdänblechen in einer simulierten physiologischen Umgebung zeigten einen sehr gleichmäßigen Abbau des Materials. Nach sechs Monaten war ein Verlust der mechanischen Festigkeit von 50 Prozent zu verzeichnen. Die Zugfestigkeit und die Dehngrenze überstiegen dabei nach sechsmonatiger Degradation noch 350MPa. Dies ist immer noch ein höherer Wert, als ihn die meisten orthopädischen Anwendungen benötigen. Auf Grundlage dieser Daten würde ein vollständiger Verlust der mechanischen Festigkeit des Molybdäns nach 7,5 – 9 Monaten erwartet. Dies wäre ein optimaler Zeitraum für die Verwendung eines Osteosynthesematerials.

Unter simulierten physiologischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass sowohl reines Molybdän als auch Molybdän-Rhenium-Legierungen in *In-vitro*-Versuchen gemäß DIN EN ISO 10993-5:2009-10 keine signifikante Zytotoxizität verursachen. Es zeigten sich keine signifikanten Auswirkungen auf die Vitalität

von Mäuse- und menschlichen Fibroblasten sowie auf menschliche Osteoblasten.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der hier dargestellten *In-vitro*-Versuche also zum einen eine sehr gleichmäßige Degradation bei hoher mechanischer Festigkeit, sowie eine ausreichende Biokompatibilität unter simulierten physiologischen Bedingungen.

4.2 Diskussion der *In-vitro*-Versuche

Die beschriebenen Versuche wurden gemäß der DIN EN ISO 10993-5:2009-10 (101) durchgeführt, welche die *In-vitro*-Zytotoxizitätsprüfung regelt und für die Zulassung von Medizinprodukten gemäß der Medizinprodukteverordnung (Verordnung (EU) 2017/745), insbesondere von Implantaten, gilt. Hierbei wurden also etablierte Versuche mit hohen Vergleichsstandards durchgeführt. Obwohl die beschriebenen *In-vitro*-Versuche nach der oben genannten ISO-Norm und damit mit absolut standardisierten Testverfahren durchgeführt wurden, sind die daraus resultierenden Ergebnisse mit einer gewissen Skepsis zu betrachten.

In-vitro-Versuche sind experimentelle Untersuchungen, welche außerhalb eines lebenden Organismus in einem kontrollierten Laborumfeld durchgeführt werden (102). Der Begriff „*in vitro*“ stammt aus dem Lateinischen und bedeutet wörtlich übersetzt „im Glas“. *In-vitro*-Experimente bieten einerseits zahlreiche Vorteile. Dazu zählen standardisierte und kontrollierte Versuchsbedingungen, hohe Kosteneffizienz und Sicherheit (102). Dies macht sie zu wertvollen Instrumenten für die wissenschaftliche Forschung (102,103). Sie haben jedoch auch relevante Einschränkungen, wie den vereinfachten biologischen Kontext und die begrenzte Vorhersagekraft, die bei der Interpretation ihrer Ergebnisse berücksichtigt werden müssen (102). Untersuchungen zeigen teils eine überraschend schlechte Korrelation zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuchen (104). Dabei scheinen *In-vitro*-Tests vor allem Schwierigkeiten bei der Erfassung von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen aufzuweisen (105). Bei Testung neuer Osteosynthesematerialien spielt jedoch vor allem die Reaktion einzelner

Zelltypen sowie auch deren Kombination hinsichtlich verschiedener Abbauprodukte eine große Rolle (106). So ist dies unter Berücksichtigung der hier durchgeführten Versuchsreihen als klarer Nachteil unserer *In-vitro*-Versuche zu nennen. Darüber hinaus zeigen verschiedene Untersuchungen, dass sich isolierte und kultivierte Primärzellen in der Regel stark von dem entsprechenden Zelltyp in einem Organismus unterscheiden. Wenn beispielsweise primäre Hepatozyten aus ihrer normalen physiologischen Umgebung isoliert werden, werden Hunderte von Genen hoch- oder herunterreguliert (107). Ähnliches ist sicherlich auch für andere Zelltypen zu erwarten und bei der Beurteilung von *In-vitro*-Versuchen zu bedenken. So kommen auch andere Autoren zu der Meinung, dass es sicherlich ausschließlich unter *In-vitro*-Bedingungen nicht möglich ist, die komplexe Wechselwirkung zwischen den vielen Zelltypen zu beurteilen, welche am Knochenregenerationsprozess beteiligt sind (103).

Aus diesen genannten und weiteren Gründen werden bei ähnlichen wissenschaftlichen Fragestellungen häufig Kombinationen aus *In-vitro*- und *In-vivo*-Experimenten verwendet. So beschränken sich die meisten Wissenschaftler auf die Verwendung zellulärer Modelle für die Bewertung der Zytotoxizität und der Zellproliferation, um dann mit *In-vivo*-Untersuchungen mit Hilfe von Tiermodellen fortzufahren (103). Dadurch ist es möglich, ein umfassenderes Verständnis komplexer biologischer Phänomene zu erlangen und die Lücke zwischen kontrollierten Laborbedingungen und realen biologischen Systemen weiter zu schließen.

Die Ergebnisse der dargestellten *In-vitro*-Versuche stellten daher die Grundlage für die Planung und Genehmigung der *In-vivo*-Versuchsreihen dar.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der *In-vivo*-Versuche

Das Ziel der hier dargestellten *In-vivo*-Versuche war es, das potenzielle Osteosynthesematerial Molybdän in einem komplexen Organismus auf dessen Biokompatibilität zu testen. Dazu wurden insgesamt 96 Wistar-Ratten entweder jeweils ein Molybdän- oder ein Titanplättchen subkutan in die Nackenfalte implantiert. Anschließend wurden die Tiere hinsichtlich akuter und chronischer Entzündungsreaktionen miteinander verglichen. Als Orientierung und Marker dienten dazu die klassischen klinischen und histopathologischen Entzündungszeichen. Darüber hinaus wurden die Tiere hinsichtlich organischer Veränderungen an Milz, Leber und Nieren untersucht. Die Tiere wurden täglich anhand standardisierter Untersuchungsbögen klinisch untersucht. Nach jeweils drei, sechs und zwölf Monaten wurde jeweils ein Drittel der Tiere beider Kohorten euthanasiert und anschließend aufwändige histopathologische Auswertungen in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die Auswertung dieser Versuche zeigte, dass die Molybdän-Plättchen im Vergleich zum Goldstandard Titan nach dem Einsetzen in die Nackenfalte keine signifikante lokale oder systemische Entzündungsreaktion hervorrufen. Histopathologisch zeigten sich um beide Arten von Metallen eine bindegewebige Kapsel, welche von einer geringen Anzahl von Entzündungszellen umgeben war. Milz, Leber und Nieren der Tiere wiesen keine pathologischen Veränderungen auf. Molybdänablagerungen konnten nicht detektiert werden. Alle getesteten Tiere zeigten eine normale Gewichtsentwicklung. Das Material Molybdän zeigte sich also in einem lebenden Organismus als absolut biokompatibel.

Die Degradation der eingebrachten Molybdänplättchen fiel jedoch deutlich geringer aus, als es die *In-vitro*-Ergebnisse erwarten ließen. Am ehesten ist dies auf die bindegewebige Kapselbildung in der Subkutis um die Implantate zurückzuführen, welche in den histopathologischen Auswertungen sowohl bei Molybdän- als auch bei den Titanplättchen beobachtet werden konnte.

4.4 Diskussion der *In-vivo*-Versuche

Die Ergebnisse der durchgeführten *In-vivo*-Versuche müssen unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet werden: Biokompatibilität und Abbaugeschwindigkeit.

Das übergeordnete Ziel der Experimente war der Nachweis der Biokompatibilität von Molybdän im Vergleich zum Goldstandard Titan in einem komplexen biologischen Organismus eines Säugetiers. Als Versuchstier diente die Wistar-Ratte. Bereits seit dem 19. Jahrhundert stellt die Ratte ein etabliertes Tiermodell in der humanmedizinischen Forschung dar (108). Gemäß den Empfehlungen der Norm DIN EN ISO 10993-6:2017-09 (109) wird die Ratte häufig als Tiermodell für die Bewertung der Biokompatibilität nach der Implantation von Biomaterialien verwendet (110).

Nach einer *a priori* durchgeführten Power-Analyse wurde eine ausreichend große Kohorte von insgesamt 96 Tieren gewählt, um anschließend signifikante Untersuchungsergebnisse erzielen zu können. So konnte nachgewiesen werden, dass Plättchen aus Molybdän im Vergleich zu dimensionsgleichen Plättchen aus Titan nach dem Einsetzen in eine subkutane Tasche im Bereich des Nackens keine signifikante Entzündungsreaktion hervorrufen. Dies ergab sich sowohl aus der täglichen klinischen Routineuntersuchung als auch aus der histopathologischen Diagnostik. Die Implantation der zu testenden Implantate im Bereich einer subkutanen Tasche des Nackens stellt dabei einen etablierten Versuchsaufbau dar (110,111). Die täglichen klinischen Kontrollen erfolgten stets durch ärztliches Personal und die Dokumentation erfolgte mit einem vorher entworfenen Fragebogen. So konnte ein hoher Untersuchungsstandard gewährleistet werden. Alle histopathologischen Auswertungen erfolgten in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Uniklinik Düsseldorf und damit mit erfahrenen pathologischen Diagnostikern. Zur Besserung der Quantifizierung wurden die Schnitte digitalisiert und anschließend analysiert.

Um die eingebrachten Implantate konnte eine deutliche bindegewebige Kapselbildung detektiert werden. Dies zeigte sich sowohl bei den Molybdän- als auch bei den Titanplättchen. Mit Hilfe des etablierten histopathologischen Synovitis-Scores nach Krenn (112) konnten die Kontroll- und Testkohorten

miteinander verglichen und die Beobachtungen zu dieser reaktiven Kapselbildung quantifiziert werden. Somit konnte ein bereits etablierter Score zur Quantifizierung der Beobachtungen genutzt und ein statistisch signifikantes Ergebnis errechnet werden.

4.5 Einordnung der Ergebnisse und Ausblick

Molybdän wurde bislang in nur wenigen Studien als potenziell resorbierbares Material untersucht. Erste Untersuchungen des Fraunhofer Institutes zeigten das Potential von Molybdän als potenziell biokompatibles resorbierbares Metall mit ausgezeichneten mechanischen Eigenschaften (82,93). Schauer *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass Molybdän als potenzielles Material für resorbierbare kardiale Stents geeignete *In-vitro*- und *In-vivo*-Eigenschaften aufweist (95). Sikora-Jasinska *et al.* präsentierten ähnliche Ergebnisse (50). Beide Studien arbeiteten in ihren *In-vivo*-Versuchsreihen ebenfalls mit dem Versuchstier der Ratte (95) bzw. mit der Maus (50), welche wie oben beschrieben, häufig genutzte Tiermodelle für die Testung der Biokompatibilität neuer Materialien darstellen. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Abbauverhalten und die Biokompatibilität von Molybdän für die Entwicklung von bioresorbierbaren kardiovaskulären Stents einen vielversprechenden Ansatz darstellen (50). Die hier präsentierten Ergebnisse stimmen also besonders im Hinblick auf die Biokompatibilität mit bereits veröffentlichten Ergebnissen von Schauer *et al.* und Sikora-Jasinska *et al.* überein.

Die Anforderungen an kardiale Stents und Osteosynthesematerialien unterscheiden sich jedoch in vielerlei Hinsicht. So sind insbesondere die erforderlichen Dimensionen und Formen der Implantate sowie auch der Ort der Implantation sehr unterschiedlich. Während im Bereich der Osteosynthesematerialien vor allem Platten, Drähte und Schrauben genutzt werden, bestehen kardiale Stents im Gegensatz dazu aus sehr feinen Strebennetzwerken.

Die geringen Degradationsraten der explantierten Molybdänplättchen in dieser Studie stehen im Widerspruch zu früheren *In-vivo*-Untersuchungen mit reinem Molybdän. Bei diesen konnten deutlich höhere Degradationsraten beobachtet werden. In den Studien mit Molybdändrähten, die in die Aortenwand von Wistar-Ratten (95) oder Mäusen (50) implantiert wurden, bildeten sich bei der Integration der Drähte in die Aortenwand auf den Oberflächen Degradationsproduktschichten, welche insgesamt dicker als 10 µm waren. Die Dicke der Abbauproduktschicht, ein Indikator für die Menge des gelösten Molybdäns, zeigte sich in der hier dargestellten Studie mit Werten unter 1µm deutlich geringer.

Molybdän löst sich nicht aus dem metallischen Zustand, sondern durchläuft mehrere Oxidationsschritte entlang einer Reaktionskaskade, die zu der löslichen Form MoO_3 und schließlich zur gelösten Form Mo_4^{-2} (Molybdat) führen (113). Der ratenbegrenzende Schritt ist die Reaktion $\text{Mo}_2\text{O}_5 (\text{s}) + \text{H}_2\text{O} (\text{l}) \leftrightarrow \text{Mo}_2\text{O}_5\text{OH} (\text{s}) + \text{H}^+ + \text{e}^-$ (114). Der Abbau erfolgt also durch Bildung einer Oxidschicht, deren Molybdängehalt im Laufe der Zeit durch Freisetzung von Molybdationen reduziert wird. Das Fehlen einer nennenswerten Schicht von Abbauprodukten deutet somit in diesem Fall auf eine nur sehr geringe, langsam ablaufende Degradation hin.

Die wahrscheinlichste Ursache für diese geringe Abbaugeschwindigkeit liegt vermutlich in der anatomischen Umgebung, in welcher die Proben platziert wurden. Die umgebende Gewebekapsel, die bei allen explantierten Proben beobachtet werden konnte, scheint den Flüssigkeitsaustausch einzuschränken, was zu saureren Bedingungen führen kann. Diese saureren Bedingungen könnten den Abbau von Molybdän verlangsamen. Dies konnte bei den Untersuchungen der in die Aortenwand implantierten Molybdändrähte nicht beobachtet werden. Die bindegewebigen Kapseln scheinen den Flüssigkeitsaustausch also einzuschränken. Innerhalb der Kapsel können sowohl die Degradation von Molybdän als auch die beobachtete geringfügige Entzündung zu saureren Bedingungen führen. Dabei ist es bekannt, dass saure Bedingungen den Abbau von Molybdän verlangsamen (115). Die Bildung der Bindegewebekapsel könnte auch die Integration der Proben in das umgebende Gewebe hemmen. Ausgehend von den Ergebnissen früherer Studien scheint die Gewebsintegration ein wichtiger Faktor bei der Degradierung der

Abbaugeschwindigkeit zu sein, wobei weniger integrierte Proben langsamer abgebaut werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Schichtdicke der Abbauprodukte bei einer weniger integrierten Probe nur ein Fünftel der Schichtdicke einer besser integrierten Probe beträgt (116).

Die Knochenheilung, z.B. nach einer Fraktur, unterliegt komplexen Umbauprozessen und hängt vor allem von der Körperregion ab (117). Eine vollständige Verknöcherung ist in der Regel nach sechs Wochen zu beobachten. Von einer vollständigen Stabilität wird in der Regel nach etwa sechs Monaten ausgegangen (117). Ein geeigneter Richtwert ist, dass ein eingebrachtes Osteosynthesematerial sechs Monate lang belastbar sein und anschließend seine Funktion erfüllt haben sollte. Es tritt also bereits ein relevanter Stabilitätsverlust auf, was theoretisch gut zu der Zeit passen würde, die benötigt wird, um die Knochenstabilität wiederherzustellen. Darüber hinaus deutet diese Degradationsrate darauf hin, dass eine begründete Erwartung besteht, dass ein Implantat auf Molybdänbasis innerhalb eines klinisch relevanten Zeitrahmens, d.h. ein bis zwei Jahre, vollständig abgebaut wird. Die Abbauraten für eingekapseltes Molybdän zeigten sich jedoch in diesen *In-vivo*-Versuchen als so gering, dass der Abbau nicht in einer für den Menschen erreichbaren Zeit erfolgen würde. Sofern künftige Experimente in anderen Geweben nicht deutlich höhere Raten zeigen, sollten Molybdänimplantate daher eine Strukturgröße von 100 μm , maximal 150 μm , nicht überschreiten, um eine Degradation innerhalb weniger Jahre zu ermöglichen. Die hohe Festigkeit und Steifigkeit von Molybdän ist hier vorteilhaft und erlaubt viel dünnere Strukturgrößen als z.B. bei Magnesiumimplantaten. Die Eignung von Molybdän als resorbierbares Biomaterial für Osteosyntheseimplantate kann daher von der Gewebereaktion an der Implantationsstelle abhängen. Ein direkter Kontakt mit Knochengewebe in der Osteosynthese würde höchstwahrscheinlich zu einem differenten Abbauverhalten führen. Das Abbauverhalten in verschiedenen Geweben muss daher zwingend genauer untersucht werden, um die Faktoren zu bestimmen, welche den Abbau beeinflussen. Daraus könnten sich auch Strategien wie beispielsweise zur Oberflächenfunktionalisierung ergeben, die zum gewünschten Grad der Gewebeintegration und zu günstigen Bedingungen für eine moderate, gleichmäßige Degradation im Bereich von einigen 10 μm pro Jahr führen.

In weiteren *In-vivo*-Experimenten sollte daher vor allem untersucht werden, wie sich der Abbau bei Molybdänproben geeigneter Größe verhält, wie die *In-vivo*-Umgebung das Abbauverhalten verändert und wie sich die Abbauprodukte auf komplexe Organismen auswirken. Hierzu zählen beispielsweise der Sauerstoffpartialdruck in den Geweben und die Flüssigkeitsaustauschraten. Die wichtigsten Aspekte werden dabei die genauen Abbauraten und die allmähliche Abnahme der mechanischen Stabilität sein. Darüber hinaus wird es wichtig sein, herauszufinden, in welcher Form der Säugetierorganismus die entstehenden Abbauprodukte renal ausscheiden kann und welche Folgen, wenn überhaupt, renal oder in anderen Organen auftreten. So berichten Sikora-Jasinska *et al.* über einen qualitativ pathologischen Umbau der Bowman-Kapsel und der Glomeruli der Niere, der mit der Toxizität des Molybdäns in Zusammenhang stehen könnte (50). Es ist jedoch auch bekannt, dass sich die Nierenfunktion bei diesen Tieren mit zunehmendem Alter auf natürliche Weise verschlechtert. Biologische Folgen wie diese müssen untersucht werden, insbesondere bei Implantaten mit größeren Abmessungen, wie sie in der Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie benötigt werden.

Daher wird es in zukünftigen Untersuchungen entscheidend sein, die genauen Abbauraten, den mechanischen Stabilitätsverlust und potenzielle biologische Auswirkungen *in vivo* weiter zu verstehen. Zukünftige Projekte sollten sich auf die Optimierung von Molybdänimplantaten konzentrieren, indem Faktoren wie die Gewebsintegration und Oberflächenfunktionalisierung berücksichtigt werden.

4.6 Schlussfolgerung

Das Metall Molybdän zeigt in erster experimenteller Grundlagenforschung großes Potenzial als interessante bioresorbierbare Alternative zu bisherigen Osteosynthesematerialien.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, dass Molybdän in *In-vitro*-Versuchen gemäß DIN EN ISO 10993-5:2009-10 keine signifikante Zytotoxizität auslöst. Die Experimente zur Degradation von Molybdänblechen in einer simulierten physiologischen Umgebung zeigen einen sehr gleichmäßigen Abbau bei außerordentlicher mechanischer Festigkeit.

Im Vergleich zum Goldstandard Titan konnten in umfangreichen tierexperimentellen Untersuchungen mit Ratten keine signifikanten Unterschiede in lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen im Zusammenhang mit den implantierten Molybdänplättchen festgestellt werden. Die histopathologischen Untersuchungen zeigten eine lokale Kapselbildung um das implantierte Material mit geringgradiger Entzündungsreaktion. Dies entspricht der Definition der Biokompatibilität.

Im Vergleich zu vorherigen *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien zeigte sich jedoch ein verlangsamter Abbau des Molybdäns. Dies wiederum könnte auf die Kapselbildung zurückzuführen sein.

Um den Molybdänabbau in klinisch relevanten Dimensionen zukünftig genauer zu verstehen, sind weitere Untersuchungen zu Einflüssen wie der Gewebeumgebung, der Gewebereaktion und -integration der Implantate erforderlich. Neue Erkenntnisse könnten die Entwicklung von Strategien zur Modifizierung der Implantate fördern, um günstigere Bedingungen zur Degradation zu schaffen.

Hierbei werden zukünftig Versuchsreihen an größeren Tieren mit digital geplanten und durch das SLM-Verfahren hergestellten Molybdänimplantaten im direkten Knochenkontakt eine entscheidende Prüfung für die Eignung als Osteosynthesematerial darstellen.

5. Literaturverzeichnis

1. Toschka, A., et al., *Molybdenum as a Potential Biocompatible and Resorbable Material for Osteosynthesis in Craniomaxillofacial Surgery - An In Vitro Study*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(24): p. 15710.
2. Toschka, A., et al., *How Does the Biocompatibility of Molybdenum Compare to the Gold Standard Titanium?—An In Vivo Rat Model*. Applied Sciences, 2023. **13**(10): p. 6312.
3. Wiltfang, J., *Osteosynthesesysteme in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie*. HNO, 2002. **50**(9): p. 800-811.
4. García-Mato, D., et al., *Craniosynostosis surgery: workflow based on virtual surgical planning, intraoperative navigation and 3D printed patient-specific guides and templates*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 17691.
5. Wilde, F., C.P. Cornelius, and A. Schramm, *Computer-Assisted Mandibular Reconstruction using a Patient-Specific Reconstruction Plate Fabricated with Computer-Aided Design and Manufacturing Techniques*. Craniomaxillofac Trauma Reconstr, 2014. **7**(2): p. 158-66.
6. Haerle, F. and M. Champy, *Atlas of craniomaxillofacial osteosynthesis: microplates, miniplates, and screws*. 2011: Thieme.
7. Wilde, F. and A. Schramm, *[Principals of Osteosynthesis in the Facial Skeleton]*. Laryngorhinootologie, 2022. **101**(9): p. 713-728.
8. Hoffmann-Axthelm, W., *Die geschichtliche Entwicklung der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. 1976: Quintessenz-Verlags GmbH.
9. Uglesić, V., et al., *Evaluation of mandibular fracture treatment*. J Craniomaxillofac Surg, 1993. **21**(6): p. 251-7.
10. HANSMANN, C., *Eine neue Methode der Fixierung der Fragmente bei complicierten Frakturen*. Verh Dtsch Ges Chir, 1886. **158**.
11. Danis, R., *Théorie et pratique de l'ostéosynthèse*. 1949: Masson & Cie, Éditeurs, Libraires de l'Académie de Médecine.
12. HG, L., *Zur stabilen osteosynthese bei unterkieferfrakturen*. Dtsch Zahnärztl, 1968. **23**: p. 754.
13. Champy, M., A. Wilk, and S. JM, *Die Behandlung der Mandibularfrakturen mittels Osteosynthese ohne intermaxilläre Ruhigstellung nach der Technik von FX Michelet*. 1975.
14. Michelet, F. and A. Moll, *Traitements chirurgicaux des fractures du corps mandibulaire sans blocage, par plaques vissées miniatures insérées par voie endobuccale*. Rev Odontostomatol, 1971. **29**(2): p. 87-105.
15. Härle, F. and J. Düker, *Miniplattenosteosynthese am Jochbein*. Dtsch Zahnärztl Z, 1976. **31**: p. 97.
16. Härle, F., *Le Fort I ostectomy (using miniplates) for correction of the long face*. International Journal of Oral Surgery, 1980. **9**(6): p. 427-432.

17. Hörster, W., *Experience with functionally stable plate osteosynthesis after forward displacement of the upper jaw*. Journal of maxillofacial surgery, 1980. **8**: p. 176-181.
18. Steinäuser, E.W., *Bone screws and plates in orthognathic surgery*. International Journal of Oral Surgery, 1982. **11**(4): p. 209-216.
19. Rosen, H.M., *Miniplate fixation of Le Fort I osteotomies*. Plastic and reconstructive surgery, 1986. **78**(6): p. 748-754.
20. Luhr, H. and O. Spoerri, *Autologe und homologe Kalottentransplantate zur Schädeldachrekonstruktion*. Das Transplantat in der plastischen Chirurgie, 1987. **24**.
21. Luhr, H.G., *A micro-system for cranio-maxillofacial skeletal fixation. Preliminary report*. J Craniomaxillofac Surg, 1988. **16**(7): p. 312-4.
22. Luhr, H.G., *Indications for use of a microsystem for internal fixation in craniofacial surgery*. J Craniofac Surg, 1990. **1**(1): p. 35-52.
23. Velarde, K., et al., *Virtual surgical planning in craniomaxillofacial surgery: a structured review*. Comput Assist Surg (Abingdon), 2023. **28**(1): p. 2271160.
24. Rana, M., et al., *Primary Orbital Reconstruction with Selective Laser Melting (SLM) of Patient-Specific Implants (PSIs): An Overview of 96 Surgically Treated Patients*. J Clin Med, 2022. **11**(12).
25. Steinbacher, D.M., *Three-Dimensional Analysis and Surgical Planning in Craniomaxillofacial Surgery*. J Oral Maxillofac Surg, 2015. **73**(12 Suppl): p. S40-56.
26. Vyas, K., W. Gibreel, and S. Mardini, *Virtual Surgical Planning (VSP) in Craniomaxillofacial Reconstruction*. Facial Plast Surg Clin North Am, 2022. **30**(2): p. 239-253.
27. Julie, C.P., et al., *Is computer-assisted design and manufacturing technology useful in the surgical management of trigonocephaly?* J Craniomaxillofac Surg, 2021. **49**(11): p. 993-999.
28. Kanno, T., et al., *Overview of innovative advances in bioresorbable plate systems for oral and maxillofacial surgery*. Japanese Dental Science Review, 2018. **54**(3): p. 127-138.
29. Gareb, B., et al., *Titanium or Biodegradable Osteosynthesis in Maxillofacial Surgery? In Vitro and In Vivo Performances*. Polymers (Basel), 2022. **14**(14).
30. Gareb, B., et al., *Comparison of the mechanical properties of biodegradable and titanium osteosynthesis systems used in oral and maxillofacial surgery*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 18143.
31. Li, C., et al., *Design of biodegradable, implantable devices towards clinical translation*. Nature Reviews Materials, 2020. **5**(1): p. 61-81.
32. Kim, T.I., et al., *New titanium alloys for biomaterials: a study of mechanical and corrosion properties and cytotoxicity*. Biomed Mater Eng, 1997. **7**(4): p. 253-63.

33. Champy, M., et al., *Mandibular osteosynthesis by miniature screwed plates via a buccal approach*. J Maxillofac Surg, 1978. **6**(1): p. 14-21.
34. Steffen, C., et al., *Biomechanical comparison of titanium miniplates versus a variety of CAD/CAM plates in mandibular reconstruction*. J Mech Behav Biomed Mater, 2020. **111**: p. 104007.
35. Comino-Garayoa, R., et al., *Allergies to Titanium Dental Implants: What Do We Really Know about Them? A Scoping Review*. Biology, 2020. **9**(11): p. 404.
36. Case, CP., et al., *Widespread dissemination of metal debris from implants*. The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume, 1994. **76-B**(5): p. 701-712.
37. Thomas, P., et al., *Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation*. Allergy, 2009. **64**(8): p. 1157-65.
38. Zannoni, C., et al., *Analysis of titanium induced CT artifacts in the development of biomechanical finite element models*. Med Eng Phys, 1998. **20**(9): p. 653-9.
39. Buijs, G.J., B. Stegenga, and R.R. Bos, *Efficacy and safety of biodegradable osteofixation devices in oral and maxillofacial surgery: a systematic review*. J Dent Res, 2006. **85**(11): p. 980-9.
40. Gareb, B., et al., *Comparison of the long-term clinical performance of a biodegradable and a titanium fixation system in maxillofacial surgery: A multicenter randomized controlled trial*. PLOS ONE, 2017. **12**(5): p. e0177152.
41. Yaremchuk, M.J. and J.C. Posnick, *Resolving Controversies Related to Plate and Screw Fixation in the Growing Craniofacial Skeleton*. Journal of Craniofacial Surgery, 1995. **6**(6).
42. Yerit, K.C., et al., *Biodegradable fixation of mandibular fractures in children: stability and early results*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005. **100**(1): p. 17-24.
43. Jorgenson, D.S., et al., *Detection of Titanium in Human Tissues after Craniofacial Surgery*. Plastic and Reconstructive Surgery, 1997. **99**(4).
44. Opris, H., et al., *Titanium Periimplant Tissue Alterations: A Prospective Cohort Plate Retrieval Study*. Applied Sciences, 2021. **11**(14): p. 6315.
45. Armencea, G., et al., *Histological Change in Soft Tissue Surrounding Titanium Plates after Jaw Surgery*. Materials, 2019. **12**(19): p. 3205.
46. Wang, J.L., et al., *Biodegradable Magnesium-Based Implants in Orthopedics-A General Review and Perspectives*. Adv Sci (Weinh), 2020. **7**(8): p. 1902443.
47. Gorter, E.A., et al., *Implant removal associated complications in children with limb fractures due to trauma*. Eur J Trauma Emerg Surg, 2011. **37**(6): p. 623-7.
48. Sun, X.S., et al., *[Complications of 2 133 cases of pediatric long bone fracture undergoing elastic stable intramedullary nailing in a single medical center]*. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2018. **56**(9): p. 670-676.

49. Turgoose, D.P., et al., *Prevalence of traumatic psychological stress reactions in children and parents following paediatric surgery: a systematic review and meta-analysis*. BMJ Paediatrics Open, 2021. **5**(1): p. e001147.
50. Sikora-Jasinska, M., et al., *In-vivo evaluation of molybdenum as bioabsorbable stent candidate*. Bioactive Materials, 2022. **14**: p. 262-271.
51. Bos, R.R., et al., *Resorbable poly(L-lactide) plates and screws for the fixation of zygomatic fractures*. J Oral Maxillofac Surg, 1987. **45**(9): p. 751-3.
52. Eppley, B.L., et al., *Resorbable PLLA-PGA plate and screw fixation in pediatric craniofacial surgery: clinical experience in 1883 patients*. Plast Reconstr Surg, 2004. **114**(4): p. 850-6; discussion 857.
53. Wood, R.J., et al., *New resorbable plate and screw system in pediatric craniofacial surgery*. J Craniofac Surg, 2012. **23**(3): p. 845-9.
54. Eppley, B.L., *Zygomaticomaxillary fracture repair with resorbable plates and screws*. J Craniofac Surg, 2000. **11**(4): p. 377-85.
55. Bergsma, J.E., et al., *Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws*. Biomaterials, 1995. **16**(1): p. 25-31.
56. Gareb, B., et al., *Comparison of the mechanical properties of biodegradable and titanium osteosynthesis systems used in oral and maxillofacial surgery*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 18143.
57. Zhao, D., et al., *Current status on clinical applications of magnesium-based orthopaedic implants: A review from clinical translational perspective*. Biomaterials, 2017. **112**: p. 287-302.
58. Luthringer, B.J., F. Feyerabend, and R. Willumeit-Römer, *Magnesium-based implants: a mini-review*. Magnes Res, 2014. **27**(4): p. 142-54.
59. Grün, N.G., et al., *Resorbierbare Implantate in der Unfallchirurgie*. Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen, 2018. **25**(3): p. 82-89.
60. He, M., et al., *Review on magnesium and magnesium-based alloys as biomaterials for bone immobilization*. Journal of Materials Research and Technology, 2023. **23**: p. 4396-4419.
61. Schumann, P., et al., *Perspectives on Resorbable Osteosynthesis Materials in Craniomaxillofacial Surgery*. Pathobiology, 2013. **80**(4): p. 211-217.
62. Herber, V., et al., *Bioresorbable Magnesium-Based Alloys as Novel Biomaterials in Oral Bone Regeneration: General Review and Clinical Perspectives*. J Clin Med, 2021. **10**(9).
63. Zheng, Y.F., X.N. Gu, and F. Witte, *Biodegradable metals*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2014. **77**: p. 1-34.
64. Ding, Y., et al., *Effects of alloying elements on the corrosion behavior and biocompatibility of biodegradable magnesium alloys: a review*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(14): p. 1912-1933.
65. Biber, R., et al., *Bioabsorbable metal screws in traumatology: A promising innovation*. Trauma Case Reports, 2017. **8**: p. 11-15.

66. May, H., et al., *Bioabsorbable magnesium screw versus conventional titanium screw fixation for medial malleolar fractures*. J Orthop Traumatol, 2020. **21**(1): p. 9.
67. Verheye, S., et al., *BIOSOLVE-IV-registry: Safety and performance of the Magmaris scaffold: 12-month outcomes of the first cohort of 1,075 patients*. Catheter Cardiovasc Interv, 2021. **98**(1): p. E1-e8.
68. Liu, B. and Y.F. Zheng, *Effects of alloying elements (Mn, Co, Al, W, Sn, B, C and S) on biodegradability and in vitro biocompatibility of pure iron*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(3): p. 1407-1420.
69. Li, X., et al., *Long-Term Efficacy of Biodegradable Metal–Polymer Composite Stents After the First and the Second Implantations into Porcine Coronary Arteries*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020. **12**(13): p. 15703-15715.
70. Qi, Y., et al., *Strategy of Metal–Polymer Composite Stent To Accelerate Biodegradation of Iron-Based Biomaterials*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018. **10**(1): p. 182-192.
71. Bowen, P.K., J. Drelich, and J. Goldman, *Zinc exhibits ideal physiological corrosion behavior for bioabsorbable stents*. Adv Mater, 2013. **25**(18): p. 2577-82.
72. Li, G., et al., *Challenges in the use of zinc and its alloys as biodegradable metals: Perspective from biomechanical compatibility*. Acta Biomater, 2019. **97**: p. 23-45.
73. Li, H.F., Z.Z. Shi, and L.N. Wang, *Opportunities and challenges of biodegradable Zn-based alloys*. Journal of Materials Science & Technology, 2020. **46**: p. 136-138.
74. Weill, A., et al., *Letter. "Corrosion" of tungsten spirals. A disturbing finding*. Interv Neuroradiol, 1998. **4**(4): p. 337-40.
75. Barrett, J., et al., *Endovascular embolization of varicoceles: resorption of tungsten coils in the spermatic vein*. Cardiovasc Intervent Radiol, 2000. **23**(6): p. 457-9.
76. Butler, T.J., et al., *In vivo degradation of tungsten embolisation coils*. The British Journal of Radiology, 2000. **73**(870): p. 601-603.
77. Kampmann, C., et al., *Biodegradation of tungsten embolisation coils used in children*. Pediatr Radiol, 2002. **32**(12): p. 839-43.
78. Peuster, M., et al., *Degradation of tungsten coils implanted into the subclavian artery of New Zealand white rabbits is not associated with local or systemic toxicity*. Biomaterials, 2003. **24**(3): p. 393-9.
79. Peuster, M., C. Fink, and C. von Schnakenburg, *Biocompatibility of corroding tungsten coils: in vitro assessment of degradation kinetics and cytotoxicity on human cells*. Biomaterials, 2003. **24**(22): p. 4057-61.
80. Raffo, P.L., *Yielding and fracture in tungsten and tungsten-rhenium alloys*. Journal of the Less Common Metals, 1969. **17**(2): p. 133-149.
81. Leonhardt, T., *Properties of tungsten-rhenium and tungsten-rhenium with hafnium carbide*. JOM, 2009. **61**(7): p. 68-71.

82. Redlich, C., et al., *Molybdenum – A biodegradable implant material for structural applications?* Acta Biomaterialia, 2020. **104**: p. 241-251.
83. Novotny, J.A. and C.A. Peterson, *Molybdenum*. Adv Nutr, 2018. **9**(3): p. 272-273.
84. Vasudévan, A.K. and J.J. Petrovic, *A comparative overview of molybdenum disilicide composites*. Materials Science and Engineering: A, 1992. **155**(1): p. 1-17.
85. Schwarz, G., R.R. Mendel, and M.W. Ribbe, *Molybdenum cofactors, enzymes and pathways*. Nature, 2009. **460**(7257): p. 839-847.
86. Gerlich, D. and S. Hart, *Pressure dependence of the elastic moduli of three austenitic stainless steels*. Journal of applied physics, 1984. **55**(4): p. 880-884.
87. Zheng, S. and S. Wang, *First-Principles Design of Refractory High Entropy Alloy VMoNbTaW*. Entropy, 2018. **20**(12): p. 965.
88. Mörsdorf, A., I. Odnevall Wallinder, and Y. Hedberg, *Bioaccessibility of micron-sized powder particles of molybdenum metal, iron metal, molybdenum oxides and ferromolybdenum – Importance of surface oxides*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2015. **72**(3): p. 447-457.
89. Turnlund, J.R., et al., *Molybdenum absorption and utilization in humans from soy and kale intrinsically labeled with stable isotopes of molybdenum*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(6): p. 1217-23.
90. Vyskocil, A. and C. Viau, *Assessment of molybdenum toxicity in humans*. J Appl Toxicol, 1999. **19**(3): p. 185-92.
91. Caicedo, M., et al., *Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni²⁺ and V³⁺ are more toxic than other metals: Al³⁺, Be²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mo⁵⁺, Nb⁵⁺, Zr²⁺*. J Biomed Mater Res A, 2008. **86**(4): p. 905-13.
92. Daley, B., et al., *Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture*. J Bone Joint Surg Br, 2004. **86**(4): p. 598-606.
93. Redlich, C., et al., *In Vitro Degradation Behavior and Biocompatibility of Bioresorbable Molybdenum*. Metals, 2021. **11**(5): p. 761.
94. Leichtfried, G., J. Schneibel, and M. Heilmaier, *Ductility and impact resistance of powder-metallurgical molybdenum-rhenium alloys*. Metallurgical and Materials Transactions A, 2006. **37**.
95. Schauer, A., et al., *Biocompatibility and Degradation Behavior of Molybdenum in an In Vivo Rat Model*. Materials (Basel), 2021. **14**(24).
96. Homsy, C.A., *Bio-Compatibility in selection of materials for implantation*. Journal of Biomedical Materials Research, 1970. **4**(3): p. 341-356.
97. Williams, D.F., *Definitions in biomaterials: progress in biomedical engineering*. Biomaterials, 1987. **10**: p. 216-238.
98. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 2941-2953.

99. Ratner, B.D., *The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2011. **4**(5): p. 523-527.
100. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang. *Foreign body reaction to biomaterials*. in *Seminars in immunology*. 2008. Elsevier.
101. DIN EN ISO 10993-5:2009-10: *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009)*.
102. Ghallab, A., *In vitro test systems and their limitations*. Excli j, 2013. **12**: p. 1024-6.
103. Przekora, A., *The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications*. Materials Science and Engineering: C, 2019. **97**: p. 1036-1051.
104. Hulsart-Billström, G., et al., *A surprisingly poor correlation between in vitro and in vivo testing of biomaterials for bone regeneration: results of a multicentre analysis*. Eur Cell Mater, 2016. **31**: p. 312-22.
105. Bolt, H.M., *Developmental neurotoxicity testing with human embryonic stem cell-derived in vitro systems: the novel FP7 ESNATS tests are available*. Archives of Toxicology, 2013. **87**(1): p. 5-6.
106. Fini, M. and R. Giardino, *In vitro and in vivo tests for the biological evaluation of candidate orthopedic materials: Benefits and limits*. J Appl Biomater Biomech, 2003. **1**(3): p. 155-63.
107. Zellmer, S., et al., *Transcription factors ETF, E2F, and SP-1 are involved in cytokine-independent proliferation of murine hepatocytes*. Hepatology, 2010. **52**(6): p. 2127-36.
108. Abbott, A., *Laboratory animals: the Renaissance rat*. Nature, 2004. **428**(6982): p. 464-6.
109. DIN EN ISO 10993-6:2017-09: *Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation (ISO 10993-6:2016)*.
110. Patino, M.G., et al., *Cellular inflammatory response to porcine collagen membranes*. J Periodontal Res, 2003. **38**(5): p. 458-64.
111. An, Y.H., S.K. Woolf, and R.J. Friedman, *Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2635-2652.
112. Krenn, V., et al., *Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis*. Histopathology, 2006. **49**(4): p. 358-64.
113. Petrova, M., et al., *Mechanism of anodic oxidation of molybdenum in nearly-neutral electrolytes studied by electrochemical impedance spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy*. Electrochimica Acta - ELECTROCHIM ACTA, 2011. **56**: p. 7899-7906.
114. JOHNSON, J.W., et al., *The Anodic Dissolution of Molybdenum*. Corrosion, 2013. **26**(8): p. 338-342.
115. Pourbaix, M., *Applications of electrochemistry in corrosion science and in practice*. Corrosion Science, 1974. **14**(1): p. 25-82.

116. Braun, J., et al., *Molybdenum and tungsten manufactured by selective laser melting: Analysis of defect structure and solidification mechanisms*. International Journal of Refractory Metals and Hard Materials, 2019. **84**: p. 104999.
117. Salhotra, A., et al., *Mechanisms of bone development and repair*. Nature reviews Molecular cell biology, 2020. **21**(11): p. 696-711.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Dr. Majeed Rana bedanken, welcher mir das Thema und die Arbeiten dieser Dissertation überließ und mir die Umsetzung der Projekte anvertraute. Zudem war er als stellvertretender Klinikdirektor und leitender Oberarzt stetiger Unterstützer sowohl meiner wissenschaftlichen als auch der klinischen Weiterbildung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Norbert Kübler, welcher als Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie stets das gesamte Projekt und all die damit verbundenen Bemühungen unterstützte.

Außerdem bedanke mich bei Frau Dr. Dr. Nadia Karnatz und Herrn Dominik Hoppe, welche mich insbesondere bei der Durchführung der Tierversuche stets tatkräftig unterstützten.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Dr. Henriette Möllmann, welche mir vor allem hinsichtlich der Publikationen eine große Hilfe und Unterstützung war.

Ein besonderer Dank gilt außerdem dem IFAM in Dresden, namentlich vor allem in Person von Herrn Dr. Georg Pöhle, mit welchem die metallographischen Untersuchungen in Kooperation durchgeführt werden konnten.