

M. O. Klein<sup>1</sup>, H. Götz<sup>2</sup>, H. Duschner<sup>2</sup>, W. Wagner<sup>1</sup>

# Knöcherner Integration eines alloplastischen Knochenersatzmaterials (NanoBone) im Sinuslift –

Möglichkeiten der ultrastrukturellen und histomorphometrischen Analyse\*

## *Bony integration of an alloplastic bone substitute material (NanoBone) after maxillary sinus augmentation –*

*Potential of ultrastructural and histomorphometric analysis\**

■ Moderne Knochenersatzmaterialien (KEM) müssen zahlreichen strukturellen und biologischen Anforderungen gerecht werden. Entsprechend groß ist der Stellenwert morphologischer *in vitro* Analysen und histomorphometrischer *ex vivo* Untersuchungen zur Abschätzung der Biokompatibilität. Ziel der Untersuchung war die entsprechende Beurteilung eines modernen alloplastischen KEM (NanoBone).

Die strukturelle *in vitro* Analyse des nativen Knochenersatzmaterials erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskopie und Mikrocomputertomographie ( $\mu$ -CT) unter besonderer Berücksichtigung der Porosität. 14 Monate nach erfolgter Sinuslift-Operation mit NanoBone und aufgefangenen autologen Bohrspänen bei einem einzelnen Patientenfall wurde eine repräsentative Trepanbiopsie des Augmentates gewonnen und histomorphometrisch durch konventionelle Dünnschliffhistologie sowie durch  $\mu$ -CT untersucht. Über eine Analyse der 2D-Phasenverteilung der Dichte konnten die Volumenanteile neugebildeten Knochens und residueller KEM-Partikel bestimmt werden.

Das *in vitro* untersuchte Knochenersatzmaterial zeigte eine kantige Makrostruktur mit einer Gesamtporosität von > 65 % sowie einem hohen Anteil großvolumiger Poren > 250  $\mu$ m, welche sich fast ausschließlich interpartikulär befanden. Die histomorphometrische Analyse des gewonnenen Knochenzylinders bot eine gute knöcherner Integration des Knochenersatzmaterials mit Zeichen der Resorption mit Ersatz durch vitales Knochengewebe nach 14 Monaten. Der Volumenanteil neugebildeten Knochens betrug 37 %.

Die hier vorgestellten Methodiken zur präklinischen und klinischen Beurteilung moderner Knochenersatzmaterialien ergänzen sich sinnvoll.

*Schlüsselwörter: Knochenersatzmaterial, ultrastrukturelle Analyse, Histomorphometrie, Mikrocomputertomographie, Sinuslift*

Modern bone substitute materials (BSM) have to meet numerous structural and biological requirements. Accordingly, morphological *in vitro* analysis and histomorphometric *ex vivo* investigations are of great significance to estimate BSM biocompatibility. Aim of the study was a respective evaluation of a modern alloplastic BSM (NanoBone).

Structural *in vitro* analysis of the native BSM was carried out by electron microscopy and microcomputed tomography ( $\mu$ -CT) with special regard to porosity. 14 months after maxillary sinus augmentation with NanoBone and collected autologous bone particles in one individual patient case, a representative trephine biopsy out of the augmentation volume was histomorphometrically analysed employing conventional histology and  $\mu$ -CT. Volume ratios of newly formed bone and remaining BSM particles were calculated via assessment of 2D-phase distribution of tissue density.

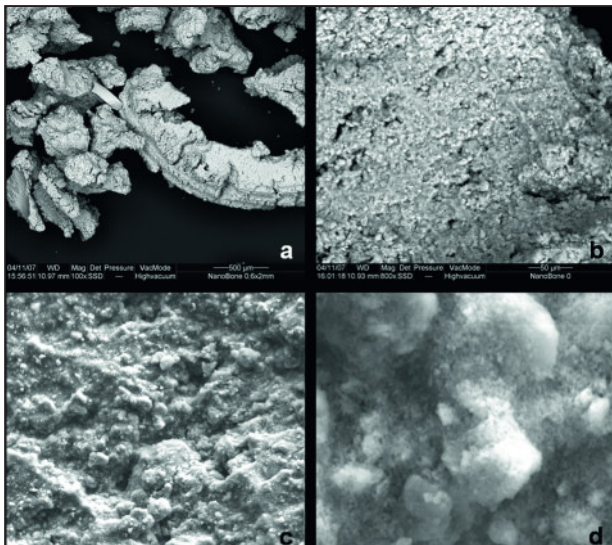
*In vitro* investigation of the BSM showed a chiselled macrostructure with a total porosity of > 65 % as well as a high ratio of pores > 250  $\mu$ m, which were almost exclusively localized interparticulary. Histomorphometric analysis of the trephine biopsy revealed a good bony integration of the BSM with evidence of BSM resorption and replacement by vital bone tissue after 14 months. The volume ratio of newly formed bone was 37 %.

The presented methods for pre-clinical and clinical evaluation of modern BSM complement one another in a reasonable manner.

*Keywords: bone substitute material, ultrastructural analysis, histomorphometry, microcomputed tomography, maxillary sinus augmentation*

<sup>1</sup> Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Augustusplatz 2, 55131 Mainz  
<sup>2</sup> Angewandte Struktur- und Mikroanalytik, Obere Zahlbacher Str. 63, 55131 Mainz  
 \* Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Willi Schulte, Ehrenmitglied der Academy of Osseointegration und Ehrendoktor der Universitätsmedizin Mainz, posthum zu seinem 80. Geburtstag gewidmet.

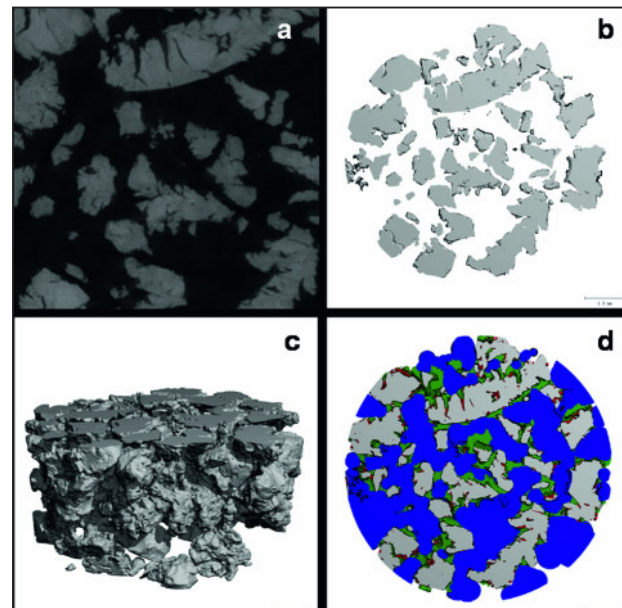
<sup>1</sup> Department of oral and maxillofacial surgery, Augustusplatz 2, 55131 Mainz  
<sup>2</sup> Applied Structure- and Microanalysis, Obere Zahlbacher Str. 63, 55131 Mainz  
 \* Dedicated posthumously to Professor Dr. Dr. h.c. Willi Schulte, honorary member of the Academy of Osseointegration and honorary doctor of University Medicine Mainz, on his 80th birthday.



**Abbildungen 1a–1d** Elektronenmikroskopische Darstellung von NanoBone-Partikeln im high vacuum mode. **1a** 100fache, **1b** 800fache, **1c** 3000fache, **1d** 24000fache Originalvergrößerung.

**Figure 1a–1d** Electron microscopical visualisation of NanoBone particles employing high vacuum mode. **1a** 100fold, **1b** 800fold, **1c** 3000fold, **1d** 24.000fold original magnification.

Abb. 1-7: Arbeitsgruppe Klein et al.



**Abbildungen 2a–2d** Mikro-Computertomographie nativer NanoBone-Partikel. **2a**: Primärbild, **2b** und **2c** 2D- bzw. 3D-Rekonstruktion, **2d** Farbliche Kodierung der Porengrößen (rot: Poren < 60 µm, grün: Poren 60–250µm, blau: Poren > 250µm).

**Figure 2a–2d** Microcomputed tomographic analysis of native NanoBone particles. **2a** Primary output image, **2b** and **2c** 2D- and 3D-reconstruction, **2d**: Color-encoded pore dimensions (red: pores < 60 µm, green: pores 60–250µm, blue: pores > 250 µm).

## Einleitung

Die Indikationen für alloplastische Knochenersatzmaterialien reichen im Kieferbereich von der Füllung kleiner parodontaler Läsionen bis hin zu umfangreichen Rekonstruktionen großer Kieferdefekte. In der Implantologie haben sie sich sowohl bei der Augmentation vor der Insertion dentaler endossaler Implantate sowie beim einzeitigen Vorgehen zur Optimierung des Implantatlagers bewährt. Gerade bei Sinuslift-Operationen lässt sich meist durch die Verwendung von geeigneten Knochenersatzmaterialien zur Augmentation des Kieferhöhlenbodens die Entnahme von körpereigenem Knochen mit assoziierter Entnahmemorbidität umgehen. Für diese Indikation des Sinuslifts untermauern zahlreiche Studien und auch systematische Reviews die Gleichwertigkeit alloplastischer Substitution [27, 6, 7].

Auf der anderen Seite bewirkt der „Fremdkörper“-Charakter der Knochenersatzmaterialien heute noch sowohl bei Patienten als auch bei Behandlern Vorbehalte bezüglich der uneingeschränkten (obgleich wissenschaftlich fundierten) Verwendung, so dass hier vielfach noch körpereigener Knochen als Substitutionsmaterial der ersten Wahl angesehen wird. Insbesondere finden xenogene bovine Knochenersatzmaterialien wegen des befürchteten Risikos einer Infektion mit *boviner spongioser Enzephalopathie* (BSE) nicht immer uneingeschränkte Patientenakzeptanz, obwohl solch eine Infektion bis dato noch nicht nachgewiesen wurde und das Risiko entsprechend als extrem gering eingestuft wird [22].

Moderne Knochenersatzmaterialien müssen zahlreichen Anforderungen gerecht werden. Neben (temporärer) Platzhal-

## Introduction

The indications for alloplastic bone substitute materials in the jaw region extend from the filling of small periodontal lesions to extensive reconstruction of large jaw defects. In implantology, they have proven useful both in augmentation prior to insertion of endosseous dental implants and to optimize the implant site in single-stage procedures. Particularly in sinus lift operations, use of suitable bone substitute materials to augment the sinus floor usually allows avoidance of autologous bone harvesting with its associated morbidity. Numerous studies and also systematic reviews underpin the equivalence of alloplastic substitutes for this indication of maxillary sinus augmentation [27, 6, 7].

On the other hand, because of the “foreign body” character of the bone substitute materials, both patients and clinicians have reservations regarding their unrestricted, though scientifically well-founded use, so that autologous bone is still often regarded as the substitute material of first choice. Xenogene bovine bone substitutes in particular are still not universally accepted by patients because of the feared risk of infection with bovine spongiform encephalopathy (BSE), although such an infection has not been found to date and the risk can accordingly be classified as extremely small [22].

Modern bone substitute materials have to meet numerous requirements. Along with their (temporary) spacer function and stabilization of blood clot, biocompatibility and at least circumscribed biodegradability are obligatory preconditions for vascular ingrowth, osteoconduction and thus functional

Alloplastisches Knochenersatzmaterial NanoBone®: Herstellerangaben NanoBone® alloplastic bone substitute material: manufacturer's data	
Ursprung Origin	vollsynthetisch all-synthetic
Herstellungsprozess Manufacturing process	Sol-Gel-Verfahren: in eine SiO <sub>2</sub> -Xerogelmatrix eingebettete Hydroxylapatit-Nanokristallite Sol-gel method: hydroxyapatite nanocrystallites embedded in a SiO <sub>2</sub> xerogel matrix
Partikelgröße Particle size	1.0 x 2.0 mm
Porosität Porosity	„hochporöse“ Kieselgelmatrix "highly porous" silica gel matrix
innere Oberfläche Internal surface	84 m <sup>2</sup> /g
chemische Zusammensetzung Chemical composition	76 %: Hydroxylapatit, 24 %: Kieselgel (SiO <sub>2</sub> ) 76 %: hydroxyapatite, 24 %: silica gel (SiO <sub>2</sub> )

**Tabelle 1** Herstellerangaben zu dem verwendeten Knochenersatzmaterial.

**Table 1** Manufacturer's data for the employed bone substitute material.

terfunktion und Stabilisierung des Blutkoagulums sind Biokompatibilität und eine zumindest umschriebene Biodegradabilität obligate Voraussetzungen für vaskuläre Erschließung, Osteokonduktion und somit funktioneller Einheilung. Den relativ einheitlich formulierten Anforderungen an die Substitute steht eine enorme Vielfalt kommerzieller Produkte mit höchst unterschiedlichen chemischen und strukturellen Eigenschaften gegenüber. Deren chemische Zusammensetzung beeinflusst maßgeblich die Resorption des Augmentates und reicht von biologischen Apatiten über synthetische monophasige Kalziumphosphatverbindungen ( $\alpha$ -,  $\beta$ -Trikalziumphosphate, Hydroxylapatite) [23] und Silikate bis hin zu mehrphasigen Mischkeramiken. Unter strukturellen Eigenschaften der Knochenersatzmaterialien versteht man Partikelgröße und -geometrie sowie intra- und interpartikuläre Porendimensionen; diese reichen von kleinpartikulären ( $\approx 50 \mu\text{m}$ ), runden und soliden Partikeln bis hin zu großpartikulären ( $> 2 \text{ mm}$ ), komplex strukturierten und hochporösen Materialien [18].

Es existieren zahlreiche Methoden zur Darstellung und strukturellen Beschreibung von Knochenersatzmaterialien und deren Interaktion mit Knochengewebe. *In vitro* sind Methoden basierend auf der Elektronenmikroskopie (EM) weit verbreitet [3, 19]. Die hohe Auflösung im Nanometerbereich erlaubt Aussagen über die Mikroporosität einzelner Partikel. Standardverfahren zur Dokumentation der knöchernen Integration alloplastischer Knochenersatzmaterialien stellen histologische Untersuchungen, z. B. basierend auf der Trenn-Dünnschliff-Technik dar. Die klinisch relevanten dreidimensionalen Lagebeziehungen multipler Partikel können mittels EM und histologischen Methoden jedoch nur eingeschränkt beurteilt werden.

Die Mikro-Computertomographie ( $\mu$ -CT) eignet sich als direkte und gewebeschonende Methodik zur strukturellen Analyse von biologischen Hartgeweben wie Knochen [21, 15, 2]. Daneben können sowohl native alloplastische Knochenersatzmaterialien als auch nach Augmentation gewonnene Proben zur Beurteilung des Einheilverhaltens (knöcherne Integration) untersucht werden [8, 20, 16, 18].

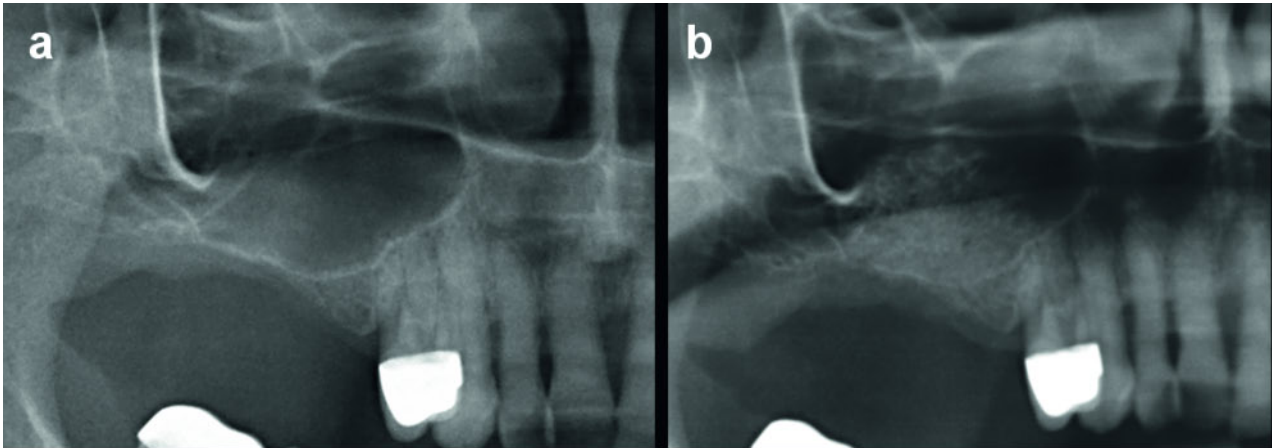
In der vorliegenden Arbeit sollen die oben beschriebenen Untersuchungsmethoden exemplarisch für ein neuartiges synthetisches mehrphasiges Knochenersatzmaterial (NanoBone) sowohl nativ als auch nach erfolgter Sinusbodenaugmentation durch Gewinnung einer repräsentativen Trepanbiopsie vorgestellt werden.

healing. The relatively uniform requirements of the substitutes are in contrast with the enormous variety of commercial products with extremely varied chemical and structural characteristics. Their chemical composition has a critical influence on the resorption of the augmentation material; it ranges from biological apatites through synthetic monophasic calcium phosphate compounds ( $\alpha$ -,  $\beta$ -tricalcium phosphate, hydroxyapatite) [23] and silicates to multiphase mixed ceramics. By structural characteristics is meant the particle size and geometry together with the intra- and inter-particle pore dimensions; these range from small ( $\approx 50 \mu\text{m}$ ), round and solid particles to large particles ( $> 2 \text{ mm}$ ), highly porous materials with a complex structure [18].

There are numerous methods for imaging and providing a structural description of bone substitutes and their interaction with bone tissue. *In vitro*, methods based on electron microscopy (EM) are used widely [3, 19]. The high resolution in the nanometer range allows conclusions about the micro-porosity of individual particles. Histological examination, e. g. based on the cutting and grinding technique, is a standard method for documenting the bony integration of alloplastic bone substitutes. However, assessment of the clinically relevant three-dimensional positional relationships of multiple particles using EM and histological methods is limited.

Microcomputed tomography ( $\mu$ -CT) is a suitable direct and tissue-sparing method for the structural analysis of hard biological tissues such as bone [21, 15, 2]. Moreover, both native alloplastic bone substitutes and biopsies obtained after augmentation can be examined to assess the healing behavior (bony integration) [8, 20, 16, 18].

In this article, the examination methods described above are presented using the example of an innovative synthetic multiphase bone substitute material (NanoBone) both native and following sinus floor augmentation by obtaining a representative trephine biopsy.



**Abbildung 3a** Präoperative Situation, **Abbildung 3b** Nach erfolgtem Sinuslift mit NanoBone.  
**Figure 3a** Pre-surgical situation, **Figure 3b** After maxillary sinus augmentation with NanoBone.

## Verwendetes Material, Falldarstellung und Analysemethoden

### 1. Knochenersatzmaterial, Elektronenmikroskopie

Eingesetzt wurde das alloplastische, vollsynthetische Knochenersatzmaterial NanoBone (Artoss GmbH, Rostock). Tabelle 1 gewährleistet einen Überblick über die Herstellerangaben zu dem Material. Die Darstellung der einzelnen Partikel mittels Elektronenmikroskopie erfolgte im high vacuum mode (Quanta 200 FEG, FEI company, Eindhoven, Niederlande, Abb. 1).

### 2. Falldarstellung

Eine 55-jährige, aus allgemeinmedizinischer Sicht gesunde Patientin stellte sich vor zur kaufunktionellen Rehabilitation einer Freisituation des rechten stark atrophierten zahnlosen Seitenzahnggebietes. Es wurde die Indikation zur implantatgestützten Versorgung gestellt. Die Restknochenhöhe in den betreffenden regionen 15–16 bot keine Primärstabilität (Abb. 3a), so dass eine primäre Sinusbodenaugmentation mit sekundärer Implantation indiziert war. Der Eingriff wurde in Lokalanästhesie durchgeführt; nach Anlage eines osteoklastischen Fensters und Anheben der Schneiderschen Membran erfolgte die Applikation von 1,2 ml NanoBone, welches zuvor mit Eigenblut sowie mit aufgefangenen Bohrspänen (BoneTrap; AstraTech GmbH, Elz) vermengt wurde. Abbildung 3b zeigt die postoperative Röntgenkontrolle. Durch persönliche Umstände der Patientin bedingt, konnte die Versorgung mit Implantaten (jeweils 4,0 x 11,0 mm; Osseotite certain, Biomet 3i, Karlsruhe) erst 14 Monate nach der Augmentation erfolgen. Bei der Lagerpräparation des Implantates region 16 konnte ein Knochenfräszylinder entnommen werden.

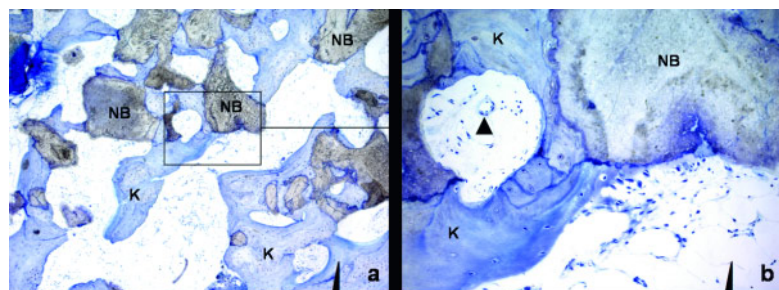
## Material employed, case description and analysis methods

### 1. Bone substitute material, electron microscopy

The alloplastic, all-synthetic bone substitute NanoBone (Artoss GmbH, Rostock) was used. Table 1 provides an overview of the manufacturer's data on the material. Imaging of the individual particles with electron microscopy was performed in high vacuum mode (Quanta 200 FEG, FEI, Eindhoven, Netherlands, Fig. 1).

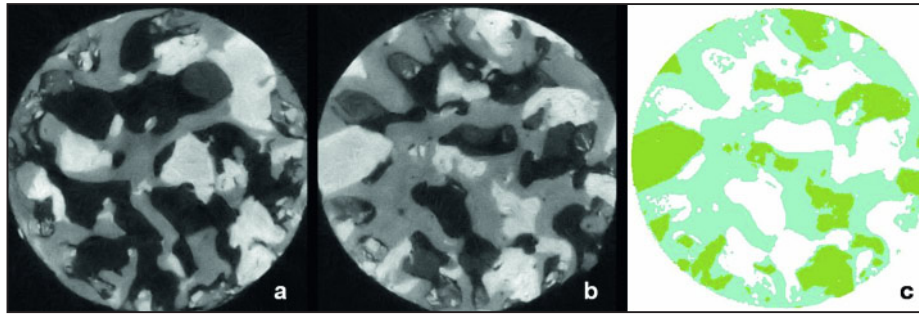
### 2. Case description

A 55-year old and generally healthy patient presented for rehabilitation of a free-end situation of the right, highly atrophic edentulous posterior tooth region. An implant-supported restoration was indicated. The residual bone height in regions 15–16 did not provide any primary stability (Fig. 3a), so that primary sinus floor augmentation with secondary implantation was indicated. The pro-



**Abbildungen 4a und 4b** Histologische Untersuchung der Trepanbiopsie. Die verbliebenen NanoBone-Partikel (als „NB“ gekennzeichnet) erscheinen grau-braun, der neugebildete Knochen (als „K“ gekennzeichnet) bläulich. Die Pfeilspitze zeigt ein Gefäß (**4a** Originalvergrößerung 10fach; **4b** Originalvergrößerung 40fach).

**Figure 4a and 4b** Histological examination of the trephine biopsy. Remaining NanoBone particles (marked as „NB“) appear grey-brown, new formed bone (marked as „K“) appears blue. The arrowhead indicates a vessel (**4a** 10fold original magnification, **4b** 40fold original magnification).



**Abbildungen 5a–5c** Mikrocomputertomographie der Trepanbiopsie. **5a** und **5b** Repräsentative Primärabbildungen. **5c** 2D-Rekonstruktion mit farblicher Kodierung von nicht mineralisiertem Gewebe (weiß), neugebildetem Knochen (hellblau) und NanoBone-Resten (hellgrün).

**Figure 5a–5c** Microcomputed tomography of the trephine biopsy. **5a** and **5b** Representative primary output images. **5c** 2D-reconstruction with color-encoded non-mineralized tissue (white), new formed bone (light blue) and remaining NanoBone particles (light green).

### 3. Einbettung und histologische Aufarbeitung

Der gewonnene Knochenfräszyylinder (Trepanbiopsie) wurde nach Fixierung und Dehydrierung durch einen Ethanol-Gradienten sowie Entfettung in Xylen gemäß den Herstellerangaben unentkalkt in Methakrylat (Technovit 9100 New, Heraeus Kulzer, Hanau) eingebettet. Nach entsprechendem Einkürzen konnte der unbehandelte Block der Mikrocomputertomographie zugeführt werden (siehe unten). Anschließend erfolgte durch Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath und Breuner [4] die Herstellung von ca. 80 µm dicken Präparaten, welche konventionell mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt wurden.

### 4. Mikrocomputertomographie

Die Untersuchung der nativen Proben sowie der in Methakrylat eingebetteten Trepanbiopsie (siehe oben) erfolgte mittels hochauflösender Mikrocomputertomographie (µ-CT40 Scanco Medical AG, Bassersdorf, Schweiz), ausgestattet mit einer „microfocus X-Ray-source“ (70 kV, 114 µA). Die laterale Auflösung betrug 6 µm.

Für die Untersuchung des Knochenersatzmaterials *in vitro* wurden Plexiglaszylinder (Durchmesser 5 mm) locker und ohne axialen Druck mit NanoBone-Partikeln gefüllt.

Nach Definition des Scanbereichs wurden Schichten im Abstand von 6 µm aufgenommen. Zunächst wurden Einzelbilder im Primärstrahlenkegel aufgenommen (0,18 Grad; 2000 Einstellungen/360°). Zur Signaloptimierung wurden jeweils zehn Scans pro Einstellung gemittelt (Integrationszeit 300 µs). Die Datenerhebung erfolgte vollautomatisch mit einer Scanzeit von ca. 24 h/20 mm Trepanhöhe.

Die so gewonnenen Rohdaten (Abb. 2a) wurden der weiteren strukturellen Darstellung und statistischen Auswertung zugeführt. So erlaubte die entsprechende 2D-Rekonstruktion von ca. 80 µm dicken Schnitten eine Darstellung analog der konventionellen Dünnschlifftechnik (Abb. 2b). Die 3D-Rekonstruktion bot die plastische Visualisierung multipler Partikel (Abb. 2c). Für die native *in vitro* Probe erfolgte über Algorithmen, basierend auf direkten Distanztransformationen [14], eine nähere Untersuchung der Porosität. Hierzu erfolgte die Ka-

cedure was performed under local anesthesia; creation of an osteoclastic window and elevation of the Schneiderian membrane were followed by application of 1.2 ml NanoBone, which was previously mixed with autologous blood and trapped bone chips (BoneTrap, AstraTech GmbH, Elz). Figure 3b shows the postoperative radiograph. Due to the patient's personal circumstances, treatment with dental implants (each 4.0 x 11.0 mm; Osseotite certain, Biomet 3i, Karlsruhe) could only take place 14 months after the augmentation. A trephine biopsy was taken during preparation of the implant site in region 16.

### 3. Embedding and histological preparation

The trephine biopsy obtained was fixed and dehydrated through an ethanol gradient and defatted in xylene and was then embedded without decalcification in methacrylate (Technovit 9100 New, Heraeus Kulzer, Hanau) according to the manufacturer's instructions. After appropriate trimming, the untreated block underwent microcomputed tomography (see below). Sections approx. 80 µm thick were then made using the Donath and Breuner cutting and grinding technique [4], which were stained conventionally with hematoxylin-eosin (HE).

### 4. Microcomputed tomography

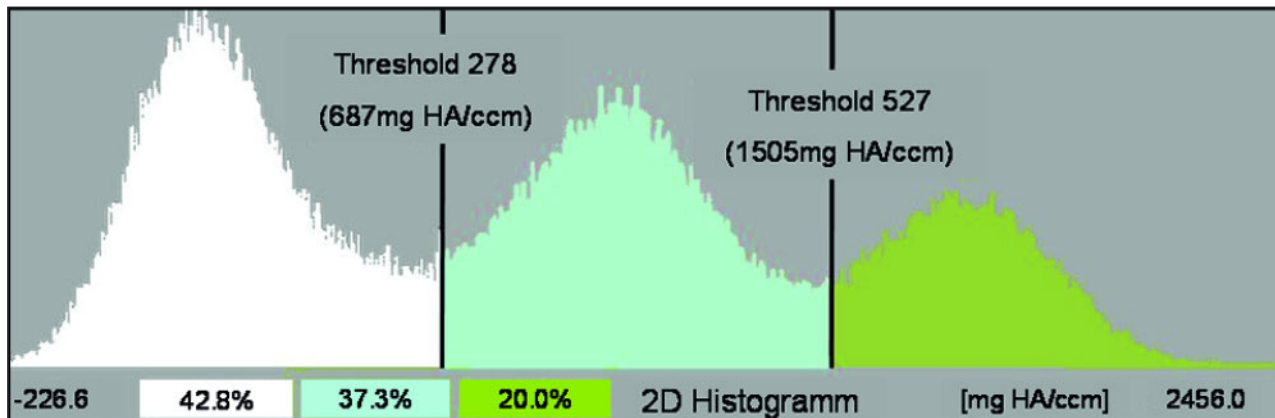
The native samples and the trephine biopsy embedded in methacrylate (see above) were examined by means of high-resolution microcomputed tomography (µ-CT40 Scanco Medical AG, Bassersdorf, Switzerland), equipped with a microfocus X-ray source (70 kV, 114 µA). The lateral resolution was 6 µm.

To examine the bone substitute material *in vitro* Plexiglas cylinders (diameter 5 mm) were filled with NanoBone particles loosely and without axial pressure.

After definition of the scan region, layers were scanned at intervals of 6 µm. Individual images were first recorded in the primary beam cone (0.18 degrees; 2000 settings/360°). For signal optimization, ten scans per setting were averaged (integration time 300 µs). The data were recorded fully automatically with a scan time of approximately 24 h/20 mm trephine height.

The raw data obtained in this way (Fig. 2a) underwent further structural processing and statistical analysis. The corresponding 2-D reconstruction of sections approx. 80 µm thick allowed demonstration similar to the conventional thin section technique (Fig. 2b). The 3D-reconstruction provided plastic visualization of multiple particles (Fig. 2c). A closer examination of the porosity of the native *in vitro* sample was performed via algorithms based on direct distance transformations [14]. The (macro-) pore dimensions were categorized and color coded into three groups:

- red: small pores < 60 µm,
- green: medium pores 60–250 µm and



**Abbildung 6** Phasenverteilung der Trepanbiopsie (weiß: nicht mineralisiertes Gewebe, hellblau: neugebildeter Knochen, hellgrün: NanoBone).

**Figure 6** Phase distribution of the trephine biopsy (white: non non-mineralized tissue, light blue: new formed bone, light green: remaining Nano-Bone particles).

tegorisierung und farbliche Kodierung der (Makro-) Porendimensionen in drei Gruppen:

- rot: kleine Poren < 60  $\mu\text{m}$ ,
- grün: mittlere Poren 60–250  $\mu\text{m}$  sowie
- blau: große Poren > 250  $\mu\text{m}$  (Abb. 2d).

Der jeweilige Anteil wurde quantitativ bestimmt.

Bei der Untersuchung des Knochenzylinders *ex vivo* konnten über Analyse der 2D-Phasenverteilung der Dichte ( $\text{mg HA/cm}^3$ ) die Volumenanteile folgender Kompartimente quantitativ bestimmt werden. Gleiche Dichtebereiche wurden folgendermaßen farblich kodiert:

- weiß: nicht mineralisiertes Weichgewebe bzw. Knochenzwischenräume oder Poren (< 687  $\text{mg HA/cm}^3$ ),
- hellblau: neugebildeter (mineralisierter) Knochen (687–1505  $\text{mg HA/cm}^3$ ) sowie
- hellgrün: (verbliebenes) alloplastisches Knochenersatzmaterial (> 1505  $\text{mg HA/cm}^3$ ).

## Ergebnisse

### 1. Analyse des Knochenersatzmaterials in vitro

Sowohl elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen solitärer Knochenersatzmaterial-Partikel als auch  $\mu\text{-CT}$  Aufnahmen multipler Partikel in lockerer Schüttung (ohne axialen Druck) zeigen die charakteristische kantige, vom Hersteller als „tannenzapfenähnlich“ bezeichnete Makrostruktur von NanoBone (Abb. 1a, 2a und 2b). Höhere EM-Vergrößerungen zeigen eine gleichmäßig raue Oberflächenstrukturierung. In den durchgeführten Aufnahmen zeigen sich keine Hinweise auf Mikroporen (Abb. 1b–1d).

Im Gegensatz zu den EM-Aufnahmen gewährleistet die Mikro-Computertomographie eine räumliche Darstellung und Analyse multipler Knochenersatzmaterial-Partikel.

Die farblich kodierte Porenverteilung von NanoBone (Abb. 2d) zeigt einen überwiegenden Anteil (81 %) großvolumiger Poren > 250  $\mu\text{m}$ . Diese befinden sich fast ausschließlich interpartikulär. Poren mittlerer Größe (60–250  $\mu\text{m}$ ) nehmen einen

- blue: large pores > 250  $\mu\text{m}$  (Fig. 2d).

The respective percentages were determined quantitatively.

When the *ex vivo* trephine biopsy was examined, the volume ratios of the following compartments could be determined quantitatively through analysis of the 2D-phase distribution of the density ( $\text{mg HA/cm}^3$ ). The same density ranges were color coded as follows:

- white: non-mineralized soft tissue or bone interstices or pores (< 687  $\text{mg HA/cm}^3$ ),
- light blue: newly formed (mineralized) bone (687–1505  $\text{mg HA/cm}^3$ ) and
- light green: (persistent) alloplastic bone substitute material (> 1505  $\text{mg HA/cm}^3$ ).

## Results

### 1. Analysis of the bone substitute material in vitro

Both electron microscopic (EM) images of solitary bone substitute particles and  $\mu\text{-CT}$  scans of loosely packed multiple particles (without axial pressure) show the characteristic chiseled macrostructure of NanoBone, described by the manufacturer as “pine cone-like” (Fig. 1a, 2a and 2b). Higher EM magnifications show a uniformly rough surface structure. In the scans taken there is no evidence of micropores (Fig. 1b–1d).

In contrast to the EM images, microcomputed tomography guarantees spatial imaging and analysis of multiple bone substitute particles.

The color coded pore distribution of NanoBone (Fig. 2d) shows a great preponderance (81 %) of large pores > 250  $\mu\text{m}$ . These are almost exclusively in interparticle location. Medium-sized pores (60–250  $\mu\text{m}$ ) account for 17 % and are both interparticle and intraparticle. Small pores (< 60  $\mu\text{m}$ ), accounting for 2 %, are above all intraparticle. The overall porosity of multiple NanoBone particles is 65.3 volume % and the percentage of remaining solid is 34.7 %.

2. Postoperative radiographs and (histo-)morphometric description of the *ex vivo* trephine biopsy

Anteil von 17 % ein und befinden sich sowohl inter- als auch intrapartikulär. Kleine Poren (< 60 µm) mit einem Anteil von 2 % finden sich vor allem intrapartikulär. Die Gesamtporosität multipler NanoBone-Partikel beträgt 65,3 Volumen%, bzw. der Anteil des Restfestkörpers 34,7 %.

## 2. Postoperative Röntgenkontrollen und (histo-)morphometrische Beschreibung der Trepanbiopsie ex vivo

Die postoperative Panoramaschichtaufnahme zeigt ein stabiles Augmentationsergebnis (Abb. 3b).

Das histologische Präparat 14 Monate nach Augmentation zeigt eine gute knöcherne Integration des Knochenersatzmaterials. Bedingt durch die zur Bild Darstellung verwendeten Objektive unterschiedlicher Vergrößerung kommen insbesondere die NanoBone-Partikel mit unterschiedlicher Transparenz zur Darstellung (Abb. 4a und 4b). Es findet sich gerichteter, lamellärer Knochen in engem Kontakt zu den NanoBone-Partikeln, welche an Resorptionslakunen erinnernde Strukturen aufweisen und insgesamt biodegradiert erscheinen. Die *in vitro* beschriebene kantige Struktur des Knochenersatzmaterials ist nicht mehr vorhanden. Das Augmentat zeigt sich gut vaskularisiert (Abb. 4a und 4b).

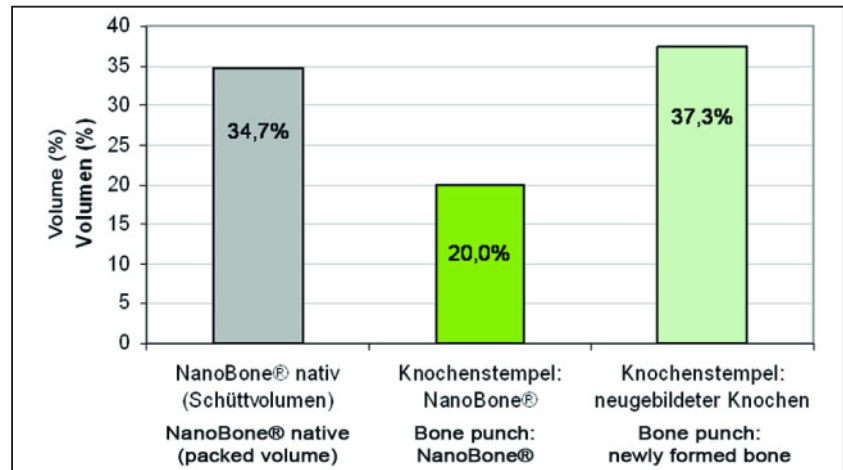
Die µ-CT-Untersuchung zeigt ebenfalls eine gute knöcherne Inkorporation des Knochenersatzmaterials. In der Darstellung imponiert verbliebenes Knochenersatzmaterial am dichtesten, gefolgt von Knochen und Weichgewebe (Abb. 6a und 6b), so dass über 2D-Phasenverteilung folgende Kompartimente farblich kodiert und quantitativ erfasst werden konnten (Abb. 6c und 7):

- weiß: nicht mineralisiertes Weichgewebe: 43 %,
- hellblau: neugebildeter Knochen: 37 % und
- hellgrün: verbliebenes NanoBone: 20 %.

Der Vergleich mit dem Festkörperanteil der nativen NanoBone-Probe (34,7 %) erlaubt Rückschlüsse über das Resorptionsverhalten über 14 Monate *in vivo* (Abb. 8).

## Diskussion

Neben der chemischen Zusammensetzung beeinflussen vor allem Makro- und Mikrostrukturierung der Knochenersatzmaterialien die Interaktion mit dem Empfängergewebe, d. h. Integration, Osteokonduktivität (ggf. sogar Osteoinduktivität) und Resorptionskinetik. Hierbei nehmen Porendimensionen und -verteilung eine herausragende Stellung ein. Für die erfolgreiche Regeneration kritischer Defektgrößen um die 10 mm, wie z. B. bei Sinuslift-Operationen, fordert die einschlägige Literatur (interkonnektierende) Makroporen von ca. 200–400 µm, um eine suffiziente Neovaskularisation und Osteokonduktion zu gewährleisten [26, 1, 5, 17]. Auf der anderen Seite dienen Mikrostrukturen (< 10 µm) der Protein- bzw. Zytokinadsorption sowie dem Attachment und der Dif-



**Abbildung 7** Vergleich der Hartgewebsanteile: natives NanoBone *in vitro* vs. NanoBone und neugebildeter Knochen *ex vivo* nach 14 Monaten.

**Figure 7** Comparison of hard tissue phases: native NanoBone *in vitro* vs. NanoBone and newly formed bone *ex vivo* after 14 months.

The postoperative panoramic slice scan shows a stable augmentation outcome (Fig. 3b).

The histological preparation 14 months after augmentation shows good bony integration of the bone substitute. Due to the objectives of different magnification used for imaging, NanoBone particles of different transparency are shown in particular (Fig. 4a and 4b). Aligned lamellar bone is found in close contact with the NanoBone particles, which show sites reminiscent of resorption lacunae and appear biodegraded overall. The chiseled structure of the bone substitute described *in vitro* is no longer present. The augmentation material appears well vascularized (Fig. 4a and 4b).

The µ-CT scan likewise shows good bony incorporation of the bone substitute material. In the scan, residual bone substitute material appears densest, followed by bone and soft tissue (Fig. 6a and 6b), so that the following compartments could be color coded and recorded quantitatively through the 2D-phase distribution (Fig. 6c and 7):

- white: non-mineralized soft tissue: 43 %,
- light blue: newly formed bone: 37 % and
- light green: residual NanoBone: 20 %.

Comparison with the proportion of solid in the native NanoBone sample (34.7 %) allows conclusions about the resorption behavior over 14 months *in vivo* (Fig. 8).

## Discussion

Along with the chemical composition, the macro- and microstructure of the bone substitute materials in particular influence the interaction with the recipient tissue, i.e. integration, osteoconductivity (and possibly even osteoinductivity) and absorption kinetics. The pore dimensions and distribution occupy a leading position in this. For the successful regeneration of critical defect sizes around 10mm, for instance in sinus lift operations, the relevant literature requires (interconnecting) macropores of about 200–400 µm in order to guarantee sufficient neovascularization

ferenzierung potenter osteoblastärer Zellen [28, 11, 25]. Die in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten Methodiken der Elektronenmikroskopie (EM) und Mikro-Computertomographie ( $\mu$ -CT) eignen sich hierbei zur entsprechenden präklinischen *in vitro* Strukturanalyse alloplastischer Knochenersatzmaterialien und ergänzen sich sinnvoll. Während sich EM-Untersuchungen insbesondere zur ultrastrukturellen Analyse einzelner Knochenersatzmaterialpartikel mit Beurteilung der Mikroporosität eignen, bieten  $\mu$ -CT gestützte Analysemethoden die Möglichkeit, komplexe dreidimensionale strukturelle Aspekte multipler Partikel zu analysieren [18]. Neben klassischen histomorphometrischen Auswertungen eignet sich die Mikro-Computertomographie ebenfalls zur Beurteilung der knöchernen Einheilung alloplastischer Biomaterialien. In einer ähnlichen Studie konnten Trisi et al. bereits eine gute Übereinstimmung zwischen  $\mu$ -CT-Berechnungen und konventionellen histomorphometrischen Auswertungen feststellen [24].

Bei dem in dieser Studie untersuchten vollsynthetischen Knochenersatzmaterial NanoBone wurde nanokristallines Hydroxylapatit (HA) in eine hochporöse Kieselgelmatrix ( $\text{SiO}_2$ ) eingebettet [9]. Die resultierende große innere Oberfläche von  $84 \text{ m}^2/\text{g}$  (siehe auch Tab. 1) soll sowohl Proteinadsorption, Knochenneubildung als auch Resorptionskinetik positiv beeinflussen, was sowohl Tiermodelle als auch humane Biopsien zeigen konnten [12, 13, 10]. Unsere Ergebnisse für multiple NanoBone-Partikel zeigen eine hohe Gesamtporosität von 65,3 % mit einem hohen Anteil (81 %) an interpartikulären Makroporen  $> 250 \mu\text{m}$ , was durch die kantige, tannenzapfenähnliche Struktur der einzelnen Partikel erklärt wird und die Gewebeategration fördert. Tatsächlich zeigen sowohl die histologische als auch die  $\mu$ -CT-gestützte Analyse der gewonnenen Trepanbiopsie aus dem Sinuslift eine gute knöcherne Integration des Knochenersatzmaterials mit innigem Kontakt zu neugebildetem vitalem lamellärem Knochen. Die bei der Augmentation beigemischten autologen Bohrspäne waren sehr klein dimensioniert mit einer zu erwartenden sehr zügigen Resorption, dass sie in der ultrastrukturellen und histomorphometrischen Analyse der Trepanbiopsie nicht mehr dargestellt werden können. Inwieweit die Knochenregeneration im Sinuslift durch die beigemengten Knochen-späne beeinflusst wurde, lässt sich in dem vorliegenden Beispiel nicht eruieren. Basierend auf den in dieser Studie festgelegten Grenzwerten der Dichtebereiche beträgt der Hartgewebsanteil der Biopsie insgesamt ca. 57 %, wobei 37 % auf neugebildeten Knochen und 20 % auf NanoBone-Restpartikel entfallen. Nimmt man den Hartgewebsanteil der nativen NanoBone-Probe (34,7 %) als Ausgangswert, so kam es folglich zu einer Resorption des Knochenersatzmaterials um ca. 42 % in 14 Monaten. Da bei der klinischen Applikation im Sinuslift die NanoBone-Partikel tendenziell dichter als in unserem *in vitro*-Ansatz komprimiert wurden, liegt die Resorptionsrate vermutlich noch höher.

## Schlussfolgerung

Die präklinische *in vitro*-Testung alloplastischer Knochenersatzmaterialien erlaubt erste Aussagen über eine zu erwartende Gewebekompatibilität. Humane Langzeitbiopsien bieten

and osteoconduction [26, 1, 5, 17]. On the other hand, microstructures ( $< 10 \mu\text{m}$ ) serve for protein and cytokine adsorption and for the attachment and differentiation of potent osteogenic cells [28, 11, 25]. The methods of electron microscopy (EM) and microcomputed tomography ( $\mu$ -CT) employed in this study are suitable for the corresponding preclinical *in vitro* structural analysis of alloplastic bone substitute materials and complement one another effectively. While EM studies are suitable especially for the ultrastructural analysis of individual bone substitute particles with assessment of microporosity,  $\mu$ -CT-based analysis methods enable analysis of the complex three-dimensional structural aspects of multiple particles [18]. Besides classical histomorphometric analysis, microcomputed tomography is likewise suitable for assessing the bony healing of alloplastic biomaterials. In a similar study, Trisi et al. found good agreement between  $\mu$ -CT calculations and conventional histomorphometric evaluation [24].

In the case of the all-synthetic bone substitute material, NanoBone, investigated in this study, nanocrystalline hydroxyapatite (HA) was embedded in a highly porous silica gel matrix ( $\text{SiO}_2$ ) [9]. The resulting large internal surface of  $84 \text{ m}^2/\text{g}$  (see also Table 1) is believed to have a positive influence on protein adsorption, new bone formation and absorption kinetics, which was shown by both animal models and human biopsies [12, 13, 10]. Our results for multiple NanoBone particles show a high total porosity of 65.3 % with a high proportion (81 %) of interparticle macropores  $> 250 \mu\text{m}$ , which is explained by the chiseled, pine cone-like structure of the individual particles and which promotes tissue integration. In fact, both the histological and the  $\mu$ -CT-supported analysis of the trephine biopsy obtained from the sinus lift show good bony integration of the bone substitute material, with intimate contact with newly formed vital lamellar bone. The autologous bone chips mixed in during the augmentation were very small in size so that very prompt resorption could be expected and they could no longer be seen on ultrastructural and histomorphometric analysis of the trephine biopsy. The extent to which bone regeneration in sinus augmentation is influenced by the added bone chips cannot be determined in the present example. Based on the thresholds for the density ranges established in this study, the hard tissue percentage of the biopsy is approximately 57 %, with newly formed bone accounting for 37 % and residual NanoBone particles for 20 %. If the hard tissue percentage of the native NanoBone sample (34.7 %) is taken as the baseline, there is consequently resorption of the bone substitute material of approximately 42 % in 14 months. Since the NanoBone particles tend to be compressed more densely when used clinically for sinus augmentation than in our *in vitro* test, the absorption rate is probably even higher.

## Conclusion

Preclinical *in vitro* testing of alloplastic bone substitute materials allows initial conclusions about the tissue compatibility that can be expected. Human long-term biopsies offer the rare opportunity of investigating the long-term behavior of biomaterials *in vivo*. In the case presented here, the all-synthetic multiphasic bone substitute material NanoBone® shows good functional integration with obvious absorption and replacement by vital bone tissue after 14 months.



die seltene Gelegenheit, das langfristige Verhalten von Biomaterialien *in vivo* zu untersuchen. In dem hier vorgestellten Fall zeigt das vollsynthetische, mehrphasige Knochenersatzmaterial NanoBone eine gute und funktionelle Integration mit deutlicher Resorption und Ersatz durch vitales Knochengewebe nach 14 Monaten.

Die hier vorgestellten Methodiken zur präklinischen und klinischen Beurteilung moderner Knochenersatzmaterialien ergänzen sich hierbei sinnvoll.

The methods presented here for the preclinical and clinical assessment of modern bone substitute materials complement one another effectively.

#### Korrespondenzadresse

Dr. Dr. Marcus O. Klein  
Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Operationen, Universitätsmedizin Mainz  
Augustusplatz 2; 55131 Mainz  
E-Mail: klein@mkg.klinik.uni-mainz.de

## Literatur

- Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, et al.: Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 2000;21:1291–1298
- Cooper DM, Matyas JR, Katzenberg MA, Hallgrímsson B: Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcif Tissue Int* 2004;74:437–447
- Cyster LA, Grant DM, Howdle SM, Rose FR, Irvine DJ, Freeman D, et al.: The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26:697–702
- Donath K, Breuner G: A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The "Säge-Schliff" (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11:318–326
- Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T: Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 2002;23:4493–4502
- Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV: The efficiency of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21:696–710
- Esposito M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P: Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;16:CD003607
- Filmon R, Retailleau-Gaborit N, Grizon F, Galloyer M, Cincu C, Basle MF, et al.: Non-connected versus interconnected macroporosity in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) polymers. An X-ray microtomographic and histomorphometric study. *J Biomater Sci Polym Ed* 2002;13:1105–1117
- Gerike W, Bienengraber V, Henkel K-O, Bayerlein T, Proff P, Gedrange T, et al.: The manufacture of synthetic non-sintered and degradable bone grafting substitutes. *Folia Morphol (Warsz)* 2006;65:54–55
- Götz W, Gerber T, Michel B, Lossdörfer S, Henkel K-O, Heinemann F: Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (Nanobone®) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clin Oral Impl Res* 2008;19:1016–1026
- Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K: 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 2005;26:3565–3575
- Henkel K-O, Gerber T, Dörfling P, Gundlach KKH, Bienengraber V: Repair of bone defects by applying biomaterials with and without autologous osteoblasts. *J Cranio Maxillofac Surg* 2005;33:45–49
- Henkel K-O, Gerber T, Lenz S, Gundlach KKH, Bienengraber V: Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 2006;606–613
- Hildebrand T, Rueggeger P: A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microscop Oxford* 1997;185:67–75
- Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Rueggeger P: Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 1999;14:1167–1174
- Jones AC, Milthorpe B, Averdunk H, Limaye A, Senden TJ, Sakellariou A, et al.: Analysis of 3D bone ingrowth into polymer scaffolds via micro-computed tomography imaging. *Biomaterials* 2004;25:4947–4954
- Karageorgiou V, Kaplan D: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474–5491
- Klein MO, Goetz H, Pazen S, Al-Nawas B, Wagner W, Duschner H: Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. *Clin Oral Impl Res* 2009;20:67–74
- Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al.: Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 2006;27:3230–3237
- Muller B, Beckmann F, Huser M, Maspero F, Szekely G, Ruffieux K, et al.: Non-destructive three-dimensional evaluation of a polymer sponge by micro-tomography using synchrotron radiation. *Biomol Eng* 2002;19:73–78
- Rueggeger P, Koller B, Muller R: A microtomographic system for the non-destructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 1996;58:24–29
- Sogal A, Tofe AJ: Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol* 1999;70:1053–1063
- Tadic D, Epple M: A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitute materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 2004;25:987–994
- Trisi P, Rao W, Rebaudi A, Fiore P: Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23:69–77
- Tsay RC, Vo J, Burke A, Eisig SB, Lu HH, Landesberg R: Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:521–528
- Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y: Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997;121:317–324
- Wallace SS, Froum SJ: Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:328–343
- Yuan H, Kurashina K, de Bruijn JD, Li Y, de Groot K, Zhang X: A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1999;20:1799–1806