

مقایسه تأثیر مواد جایگزین استخوان Totudent و Bio-oss بر مورفولوژی سلول‌های شبه استخوانی SaOS-2 توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی

دکتر طاهره فروتن^{۱*}، دکتر نادر ایوبیان^۲، مایسا ملاحی^۳

۱. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم

۲. استادیار، گروه پرودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۳. دانشجو، گروه پرودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

چکیده

سابقه و هدف: تاکنون گزارشات مختلفی در مورد کاربرد کلینیکی انواع مختلف مواد جایگزین استخوان Bone Substitute Material (BSM) در دندانپزشکی منتشر شده است که نشان‌دهنده موفقیت کاربرد آنها می‌باشد. عامل مهم تعیین کننده در موفقیت BSM رفتار بیولوژیک و ایمنوئیهیستولوژیک این مواد می‌باشد که به صورتهای مختلف از جمله مورفولوژی سلول‌های استخوانی، میزان بقا و تکثیر، میزان بیان آنزیم‌های اختصاصی این سلول‌ها و غیره ارزیابی می‌شود. هدف از این تحقیق تعیین تأثیر این مواد بر روی مورفولوژی سلول‌های شبه استخوانی SaOS-2 توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) Scanning Electron Microscopy می‌باشد.

مواد و روشها: مطالعه به روش تجربی روی دو نوع ماده پیوند استخوان به نامهای Totudent و Bio-oss انجام پذیرفت. مورفولوژی سلول‌های SaOS-2 که به مدت ۲۱ روز در معرض این مواد بودند توسط SEM در بزرگنماییهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** دو ماده جایگزین استخوان مورد استفاده در این پژوهش اشکال متفاوتی از مورفولوژی سلولی مانند کروی، دوکی و پهن و گسترده همراه با زوائد فراوان سلولی را از خود ارائه نمودند که اختلافات مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار بود. همچنین میزان اتصالات و چسبندگیهای سلولی در گروههای مختلف متفاوت بود.

نتیجه‌گیری: ماده پیوند استخوان Totudent نتایج بهتری در تغییرات مورفولوژیک سلول‌های SaOS-2 در محیط کشت در مقایسه با Bio-oss از خود نشان می‌دهد و از خواص بیولوژیکی مناسبتری برخوردار است.

واژگان کلیدی: مواد جایگزین استخوان، سلول‌های SaOS-2، مورفولوژی سلولی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Foroutan T, Ayubian N, Mallahi M. Scanning Electron Microscopy study on morphology of totudent and bio-oss bone grafts on SaOS-2 cells. *Pejouhandeh* 2011;16(2):66-72.

مقدمه

دهنده و از کار انداختن عضو پیوند شده اتوزن، استفاده از این روش را با محدودیتهایی مواجه می‌کند (۱). گزارشات مختلفی در مورد کاربرد کلینیکی انواع مواد جایگزین استخوان منتشر شده است که نشان‌دهنده موفقیت کاربرد کلینیکی این مواد در علم دندانپزشکی می‌باشد (۲-۴). این مواد می‌تواند مشتق از انسان، گاو، گیاهان (بیولوژیک) و یا مواد کاملاً سنتتیک باشد (۲، ۳، ۵ و ۶). موفقیت در کاربرد مواد جایگزین استخوان بستگی به خواص فیزیکی و شیمیایی این مواد دارد که به صورت مورفولوژی و تکثیر سلول‌های استئوژنیک ارزیابی می‌شود (۱ و ۷-۱۰).

پیوندهای استخوانی به طور معمول در جراحیهای ارتوپدیک، دهانی و فکی - صورتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در دهه اخیر استفاده از استخوان اسفنجی و کورتیکال به صورت پیوند اتوزن به عنوان موادی با بیشترین سازگاری بافتی در جراحیهای کلینیکی، قابل قبول بوده است. گرچه پیوندهای استخوانی اتوزن به لحاظ خصوصیات استئوژنی ایده‌آل‌ترین حالت محسوب می‌گردند، اما مشکلاتی مثل مرگ و میر سایت

* نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر طاهره فروتن؛ تهران، خ مفتح، دانشگاه تربیت

معلم، گروه بیولوژی. پست الکترونیکی: tataforoutan@gmail.com

دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه شهید بهشتی و دانشگاه تربیت معلم انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه به روش تجربی انجام شد. سلول‌های شبه استئوبلاستی انسانی ردهٔ SaOS-2 در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ در محیط کشتی که شامل Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO®)، 10% FBS (Fetal Bovine Serum) و Penicillin/Streptomycin 100 U/ml بود، اینکوبه شدند. محیط کشت ۳ بار در هفته تعویض گردید. پس از آن سلول‌های پاساژ سوم SaOS-2 که از انستیتو پاستور تهیه گردیده بود توسط Trypsin-EDTA ۲/۵٪ از کف فلاسک جدا و با دانسیته cell/well 2×10^4 در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شد و پس از ۷۲ ساعت در معرض ۳۰ میلی‌گرم از هریک از مواد جامد جایگزین استخوان (bio-oss (SIGMA-Lot num: totudent و Lab 06H070632, SIGMA-Aldrich®, USA) (Anthos 2020 ver1.8, Anthos Tec Instruments®, Austria) قرار گرفتند. گروه کنترل شامل سلول‌های SaOS-2 بود که تحت هیچ یک از مواد جایگزین استخوان قرار نگرفته بود. تعداد تکرار نمونه‌ها برای آنالیز آماری پنج بار بود.

در روز ۲۱ انکوباسیون، مورفولوژی سلول‌های شبه استئوبلاست انسانی SaOS-2 بوسیله SEM مورد بررسی قرار گرفت. برای فیکساسیون نمونه‌ها از گلوآلدئید ۲/۵٪ به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق استفاده شد. پس از ۳ بار شستشو با PBS با مولاریته ۰/۱ توسط اسمیم تترواکساید یک درصد به مدت دو ساعت فیکساسیون ثانویه صورت پذیرفت. مجدداً بوسیله PBS با مولاریته ۰/۱ شستشوی نمونه‌ها انجام شد. سپس در درجات مختلف اتانول (۵۰، ۷۰، ۸۵ و ۱۰۰) به مدت ۳۰ دقیقه نمونه‌ها آگیری شدند. در نهایت در الکل ۱۰۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روند آگیری تکمیل شد. نمونه‌ها بر روی آلومینیوم توسط چسب نقره سوار شدند (Monting) و بوسیله فیلم باریک پالادیوم طلا (AU-PD) روکش شده و در ۲۰ KV مورد بررسی جهت SEM (Vega-TEScan, Tescan USA Inc, SEM (USA) قرار گرفتند. سپس در بزرگنمایی‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ عکسبرداری از سلول‌ها صورت پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری داده از آزمون One-Way ANOVA و Post Hoc از نوع Tamhane با سطح معنی‌داری به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.01$ استفاده گردید.

مواد جایگزین استخوان از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی به خوبی توصیف شده‌اند ولی به لحاظ رشد سلول‌های استخوانی در هنگام مواجهه با آنها، سازگاری زیستی و همچنین مقایسه مواد مختلف با هم کمتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تاکنون مطالعات مختلف محیطی در رابطه با رفتار بیولوژیکی انواع مواد جایگزین استخوان صورت پذیرفته و نتایج بعضاً متفاوتی هم گزارش شده است (۱۱-۷).

Osseointegration مواد جایگزین استخوان بستگی به فعالیت سلول‌های پیرامونی آنها دارد. به طور کلی مهاجرت و پرولیفراسیون سلول‌های زنده استخوانی به طور اساسی تحت تأثیر روابط متقابل بین سلول‌های فوق و Bone Substitute Material (BSM) می‌باشد (۷).

امروزه انواع مواد جایگزین استخوان که مشتق از انسان، گاو، گیاهان و یا مواد کاملاً سنتتیک می‌باشند، معرفی شده‌اند (۱، ۲، ۴ و ۵). Bio-oss و Totudent از جمله این مواد هستند که از استخوان اسفنجی گاو تشکیل شده‌اند. هیدروکسی آپاتیت‌های بیولوژیک را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد. انواعی که در حرارت پایین (کمتر از ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد) تولید می‌شوند مانند Bio-oss و آنهایی که در حرارت بالای ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد تولید می‌شوند مانند PepGen. هیدروکسی آپاتیتی که در حرارت پایین از استخوان گاو تولید می‌شود، امکان تخلخل بیشتر و گرانول‌هایی بزرگتر را برای اتصال بهتر استئوبلاست‌ها و حفظ ساختمانهای پروتئینی فراهم می‌کند و ماتریکس مناسبی را برای ساخت استخوان ایجاد می‌کند (۷). اختلاف نظرهای متعددی در مقالات در مورد باقی‌مانده پروتئین‌ها و رفتار بیولوژیکی، وجود دارد. بعضی از تحقیقات نشان می‌دهند که پروتئین‌های باقی‌مانده در هیدروکسی آپاتیت خصوصیات Osteo inductive دارند ولی عنوان شده که می‌توانند سبب انتقال احتمالی بیماری شوند. هیدروکسی آپاتیت‌هایی که در حرارت بالا تولید می‌شوند تخلخل کمتری دارند ولی به لحاظ اینکه فاقد پروتئین‌های باقی‌مانده هستند، فاقد احتمال انتقال بیماری هستند. عیب کم بودن پروژیتی این نوع از هیدروکسی آپاتیت تا حدودی با کوچکتر بودن اندازه گرانول‌ها جبران می‌شود (۷).

از آنجا که مقایسه دو ماده Bio-oss و Totudent به لحاظ مورفولوژی و نحوه واکنش سلول‌های استئوبلاست در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی چندانی قرار نگرفته است، این تحقیق در سال ۱۳۸۸ با هدف مقایسه تأثیر مواد Totudent و Bio-oss بر مورفولوژی و نحوه چسبندگی سلول‌های شبه استئوبلاستی SaOS-2 بصورت همکاری بین سه مرکز

یافته‌ها

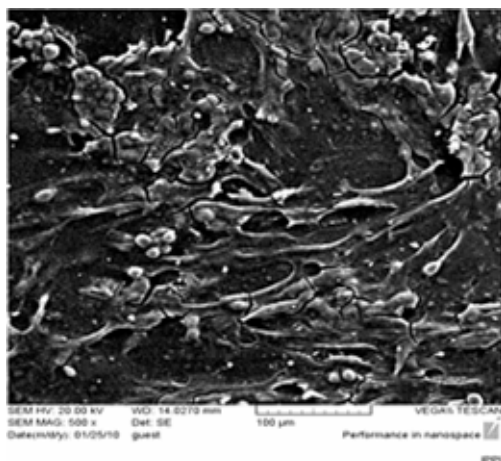
بررسی میکروسکوپی سلول‌ها توسط میکروسکوپ فاز کنتراست و میکروسکپ الکترونی روبشی نشان داد که مورفولوژی‌های متفاوت سلولی شامل اشکال کروی، دوکی و گسترده با پروسس‌های فراوان که از ویژگیهای سلول‌های بالغ استخوانی می‌باشد به وفور در انواع گروههای تجربی و کنترل مشاهده می‌گردد. از آنجا که علاوه بر ویژگیهای سلولی - مولکولی، خصوصیات ظاهری سلول‌ها نیز تعریف کننده نوع سلول می‌باشد، لذا در این پروژه میزان تأثیر پذیری سلول‌های SaOS-2 که در مجاورت مواد جایگزین استخوان

Osteon و Cerasorb قرار گرفتند از نظر شکل سلولی مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که نتایج مولکولی اثر مواد فوق بر روی این سلول‌ها در حال بررسی در دیگر مجلات برای چاپ می‌باشد.

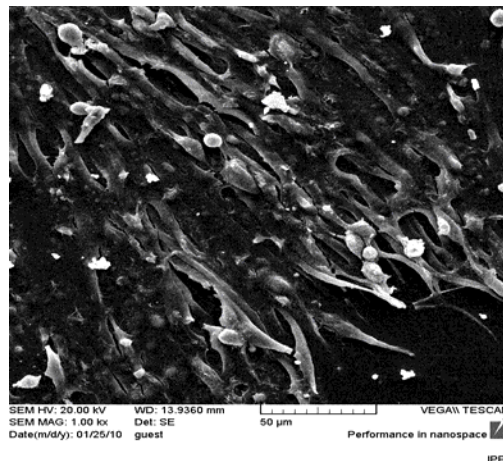
با توجه به جداول، نمودار و شکلها، از لحاظ مورفولوژی کروی، بیشترین تعداد مربوط به گروه Cerasorb بود ($13/80 \pm 7/50$). گروه Osteon و گروه کنترل به ترتیب در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند. اختلاف بین گروه Cerasorb با دو گروه دیگر از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0/05$)، ولی اختلاف بین گروه کنترل و Osteon معنی‌دار نبود ($p > 0/05$).

جدول ۱- توزیع نمونه‌های مورد بررسی بر حسب مورفولوژی سلولی به تفکیک گروههای مورد بررسی

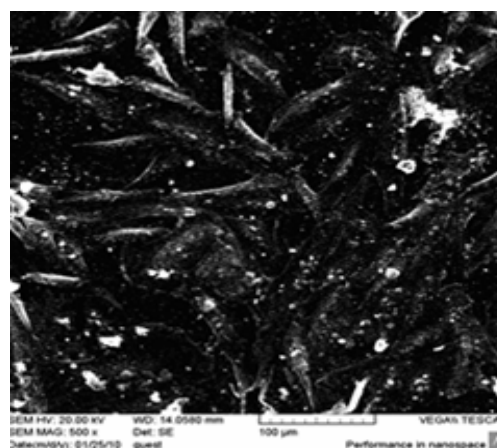
مورفولوژی سلولی مورد بررسی	مورفولوژی کروی (انحراف معیار \pm میانگین)	مورفولوژی دوکی (انحراف معیار \pm میانگین)	مورفولوژی گسترش یافته (انحراف معیار \pm میانگین)	تعداد کل	نتیجه آزمون داخل گروهها ANOVA
Osteon	9/72 \pm 5/21	33/91 \pm 15/05	1/88 \pm 1/46	45/52	p < 0/05
Cerasorb	13/8 \pm 7/5	11/72 \pm 6/58	2/25 \pm 1/62	27/77	p < 0/05
Control	8/91 \pm 3/23	24/33 \pm 7/61	1/50 \pm 1/31	11/58	p < 0/05



(ب)



(الف)



(ج)

شکل ۱- تصاویر SEM از سلول‌های رشد یافته در معرض مواد Osteon (الف)، Cerasorb (ب) و گروه کنترل (ج) با بزرگنمایی ۵۰۰. در شکل (الف) فراوانی سلول‌های دوکی در مقایسه با شکل ب بیشتر بوده، سلول‌ها چسبندگی بیشتری از خود نشان داده‌اند. در شکل (ب) سلول‌های پهن و گسترش یافته با وضوح بیشتری خود را نشان می‌دهند. بزرگنمایی الف: ۱۰۰۰ و ب و ج: ۵۰۰.

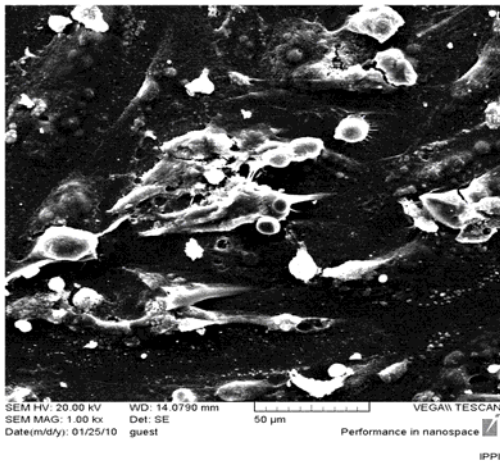
بیشترین موارد سلول‌های کشیده و پهن با پروسس‌های سلولی فراوان به ترتیب در گروه‌های Cerasorb ($2/25 \pm 1/62$)، Osteon ($1/88 \pm 1/46$) و سپس گروه کنترل ($1/5 \pm 1/31$) بود. اختلاف آماری معنی‌داری بین هیچ کدام از گروه‌های مورد بررسی از لحاظ این مورفولوژی، وجود نداشت ($p > 0/05$).

به دلیل اینکه پراکندگی داده‌ها در گروه‌های مختلف با هم اختلاف معنی‌داری داشت آزمون Post Hoc از نوع Tamhane انجام شد که نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. نمودار ۱ نیز نشان‌دهنده نرخ بقای سلولی گروه‌های کنترل، Osteon و Cerasorb می‌باشد.

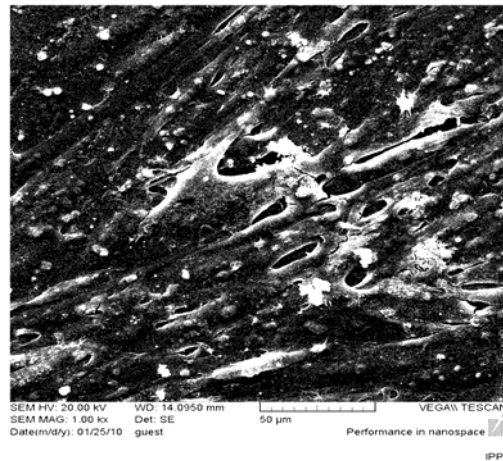
بیشترین تعداد مورفولوژی دوکی مربوط به گروه Osteon ($33/91 \pm 15/05$) بود. گروه کنترل ($24/33 \pm 7/61$) از این نظر در مرتبه بعدی قرار داشت و گروه Cerasorb ($11/72 \pm 6/58$) پایینترین میزان را به خود اختصاص داد. اختلاف بین گروه‌های فوق از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0/05$). در گروه Osteon میزان سلول‌های با مورفولوژی دوکی شکل به طور معنی‌داری بالاتر از دو گروه کنترل ($p < 0/05$) و گروه Cerasorb بود ($p < 0/001$) میزان سلول‌های دوکی شکل در گروه Cerasorb به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0/05$).

جدول ۲- نتایج آزمون Post hoc بین نمونه‌های مورد بررسی بر حسب مورفولوژی سلولی به تفکیک گروه‌های تجربی و کنترل

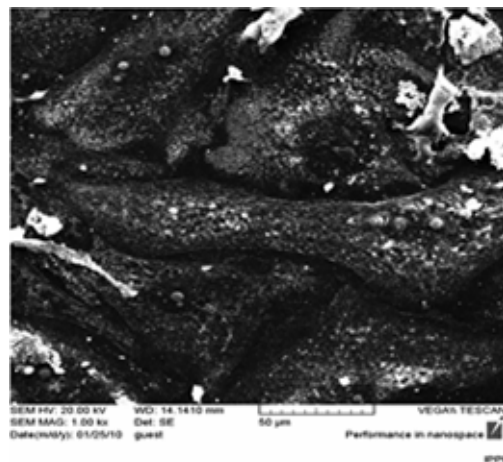
مورفولوژی سلولی مقایسه گروه‌ها	مورفولوژی کروی (نتیجه آزمون بین گروه‌ها)	مورفولوژی دوکی (نتیجه آزمون بین گروه‌ها)	مورفولوژی گسترده (نتیجه آزمون بین گروه‌ها)
Osteon	۰/۹۱۸	۰/۰۳۱	۰/۷۲
Cerasorb	۰/۰۴۹	۰/۰۰۳	۰/۳۰
Control	۰/۰۱۶	< ۰/۰۰۱	۰/۵۷



(ب)

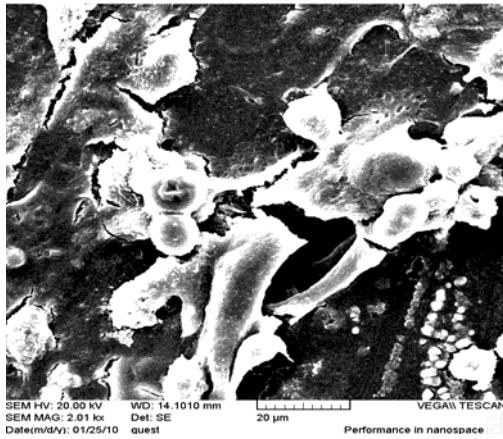


(الف)

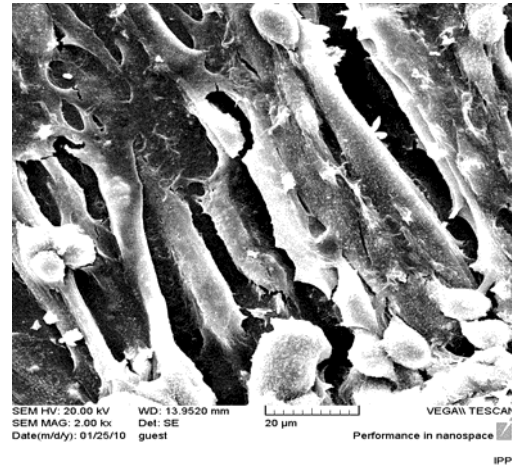


(ج)

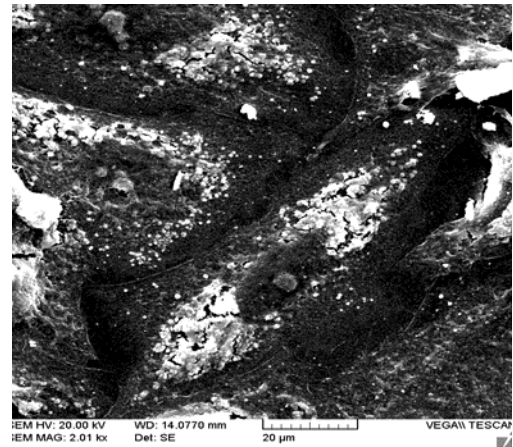
شکل ۲- تصاویر SEM از هر سه گروه Osteon (الف)، Cerasorb و گروه کنترل (ج) با بزرگنمایی ۱۰۰۰. فراوانی سلول‌های پهن با زوائد گسترده و همچنین سلول‌های کروی در گروه Cerasorb بخوبی دیده می‌شود.



(ب)

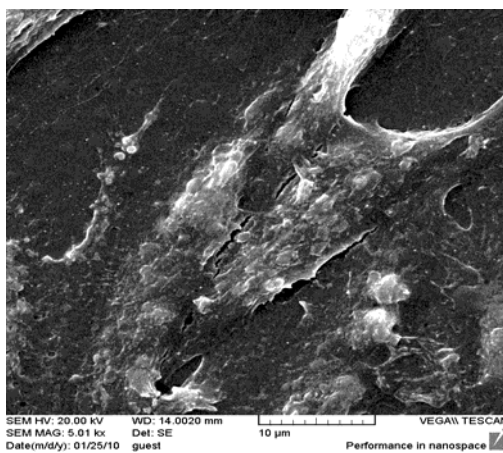


(الف)

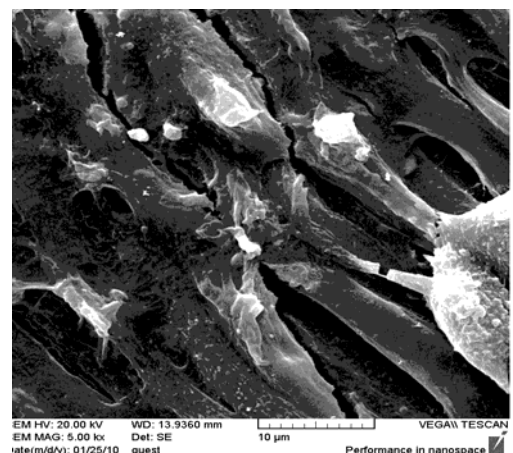


(ج)

شکل ۳- تصاویر SEM با بزرگنمایی ۲۰۰۰ از هر سه گروه Osteon (الف)، Cerasorb (ب) و کنترل (ج). در گروه Cerasorb سلول‌های کروی که بنظر می‌رسد روند دژنره شدن و مرگ را می‌گذرانند بخوبی با این بزرگنمایی دیده می‌شوند.

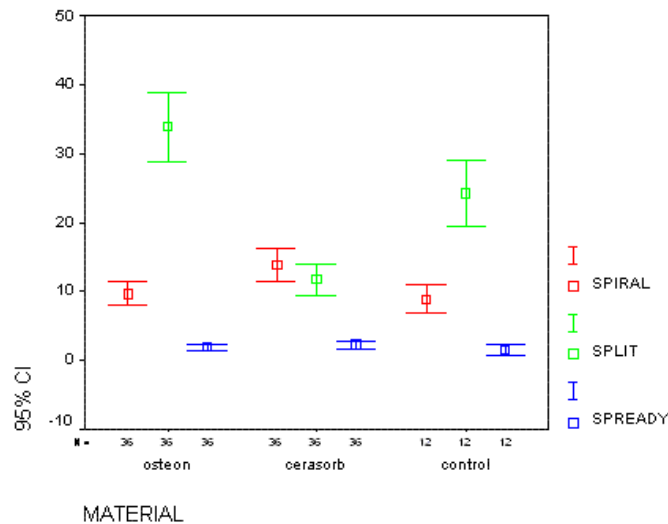


(ب)



(الف)

شکل ۴- تصاویر SEM با بزرگنمایی ۵۰۰۰ از Osteon (الف) و Cerasorb (ب). تفاوت مورفولوژی سلولی غالب در این دو گروه بخوبی قابل تشخیص است. سلول‌های غالباً دوکی در گروه اول و سلول‌های گسترده و پهن با پروسس‌های مشخص در گروه دوم دیده می‌شود.



نمودار ۱: توزیع نمونه‌های مورد بررسی بر حسب مورفولوژی سلولی به تفکیک گروه‌های مورد و شاهد

بحث

Schmitt و همکاران (۱) نشان دادند که در بررسی تصاویر SEM نمونه‌های حاوی Bio-oss، سلول‌های شبه استئوبلاست بصورت پراکنده روی مواد پیوندی چسبیده بودند. سلول‌ها مسطح و دارای زوائد بودند و گسترش کمی داشتند. تعدادی سلول کروی هم مشاهده شد. تحقیقات Kübler و همکاران (۸) نیز نشان داد که در بین مواد پیوندی استفاده شده در محیط کشت سلول‌های استئوبلاست اپلیک انسانی، نمونه‌های حاوی Bio-oss ضعیف‌ترین پرولیفراسیون را داشتند، در حالیکه در مورد نمونه‌های حاوی PepGen لایه مولتی سلولار در اطراف گرانول‌های گرفت مشاهده شدند و سلول‌ها حالت کشیدگی بیشتری داشتند. یافته‌های آنها در مورد مورفولوژی سلول‌های SaOS-2 در محیط کشت حاوی (Totudent) Solvent Dehydrate Bone مشابه یافته‌های تحقیق حاضر است. آنها عنوان کردند که سلول‌ها مسطح بوده و حالت گستردگی (Spread) در کشت سلولی مشاهده می‌شود و در سطوح صاف، نمای یک سلول گسترش یافته و پهن مشابه مورفولوژی استئوبلاستیک دیده می‌شود.

هر دو ماده بکار رفته در این تحقیق، نتایج خوبی در تعداد زیادی از تحقیقات کلینیکی داشته‌اند، خصوصاً Bio-oss که یک BSM شناخته شده است (۱۶-۱۴). یک توضیح احتمالی برای نتایج ضعیف Bio-oss می‌تواند تغییر خصوصیات HA هنگام تماس با پروتئین‌های خون و اجزای ماتریکس خارج سلولی باشد (۱۶). تحقیقات و بررسی‌های آزمایشگاهی محدودیت‌های خاص خود را دارند، خصوصاً اینکه فاقد تأثیرگذاری بافت‌های اطراف و پیچیدگی فاکتورها و نیروهای مکانیکی هستند.

در این مطالعه از مدل کشت سلولی سلول‌های SaOS-2 بصورت آزمایشگاهی به منظور تحقیقات علمی پایه‌ای و جهت کاربرد کلینیکی استفاده شد. مورفولوژی سلول‌های SaOS-2 در محیط‌های کشت در مجاورت دو بیومتریال نسبت به گروه کنترل، تفاوت داشت، بطوریکه مطالعه SEM نشان داد که سلول‌ها در مجاورت Totudent چسبندگی بیشتری نسبت به گروه کنترل و Bio-oss داشتند. سلول‌ها در مجاورت Totudent بیشتر کشیده بودند و تعداد سلول‌های دوکی بطور معنی‌داری از مورفولوژی کروی بیشتر بود، در صورتی که سلول‌ها در مجاورت Bio-oss از پراکندگی کمتری برخوردار بودند. ضمن اینکه تعداد سلول‌های کروی به طور معنی‌داری بالاتر از سلول‌های دوکی بود. نتایج این تحقیق، یافته‌های Schmitt و همکاران (۱) را تأیید می‌کند. بیشترین تعداد سلول‌های دوکی در گروه Totudent و سپس به ترتیب در گروه کنترل و Bio-oss مشاهده شد. از لحاظ مورفولوژی دوکی بین هر سه گروه اختلاف معنی‌دار بود. بیشترین میزان سلول‌های کروی در Bio-oss و پس از آن به ترتیب در گروه کنترل و Totudent مشاهده شد که این اختلاف بین هر سه گروه معنی‌دار بود. تعداد سلول‌های کشیده با استتاله‌های سلولی، در گروه Totudent بطور معنی‌داری از دو گروه دیگر بیشتر بود که نشان‌دهنده این است که در حضور گرانول‌های Totudent شرایط برای دیفرانسیون سلولی درست سلول‌های استئوبلاست فراهم‌تر بوده است. وجود گرانول‌های Bio-oss تأثیری در دیفرانسیون سلول‌های SaOS-2 بصورت سلول‌های کشیده با زوائد سلولی نداشت که مشابه گروه کنترل بود و اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد.

نتیجه گیری

۱. سلول‌های SaOS-2 در محیط کشت در مجاورت هر دو نوع ماده پیوندی Bio-oss و Totudent نتایج قابل قبولی را از لحاظ ریخت‌شناسی سلولی و مورفولوژی نشان دادند.

۲. سلول‌های SaOS-2 در مجاورت ماده پیوندی Totudent تغییرات مورفولوژیک بهتری را نسبت به ماده جایگزین استخوان Bio-oss از خود نشان دادند.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم از جناب آقای دکتر احمد حسینی که امکانات مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی را در اختیار محققین این پروژه قرار دادند نهایت تشکر را بعمل آوریم.

REFERENCES

- Schmitt SC, Wiedmann-Al-Ahmad M, Kuschnierz J, Al-Ahmad A, Huebner U, Schmelzeisen R, et al. Comparative in vitro study of the proliferation and growth of ovine osteoblast-like cells on various alloplastic biomaterials manufactured for augmentation and reconstruction of tissue or bone defects. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(3):1441-50.
- Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H, et al. localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993;13(1):29-45.
- Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, Rohrer MD, Cho SC. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: a clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis--Part 2 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18(6):528-43.
- Fugazzotto PA, Shanaman R, Manos T, Shectman R. Guided bone regeneration around titanium implants: report of the treatment of 1,503 sites with clinical reentries. *Int J Periodontics Restore Dent* 1997;17(3):292-9.
- Callan DP, Salkeld SL, Scarborough N. Histologic analysis of implant sites after grafting with demineralized bone matrix putty and sheets. *Implant Dent* 2000;9(1):36-44.
- Watzinger F, Luksch J, Millesi W, Schopper C, Neugebauer J, Moser D, et al. Guided bone regeneration with titanium membranes: a clinical study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000;38(4):312-5.
- Herten M, Rothamel D, Schwarz F, Friesen K, Koegler G, Becker J. Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. *Cline Oral Investig* 2009;13(2):149-55.
- Kübler A, Neugebauer J, Oh JH, Scheer M, Zöller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. *Implant Dent* 2004;13(2):171-9.
- Mayr-Wohlfart U, Fiedler J, Günther KP, Puhl W, Kessler S. Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in contact with different bone substitute materials. *J Biomed Mater Res* 2001;57(1):132-9.
- Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sánchez-Salcedo S, Vallet-Regí M, Portolés MT. Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. *Biomaterials* 2008;30(1):45-51.
- Trentz OA, Hoerstrup SP, Sun LK, Bestmann L, Platz A, Trentz OL. Osteoblasts response to allogenic and xenogenic solvent dehydrated cancellous bone in vitro. *Biomaterials* 2003;24(20):3417-26.
- Açil Y, Springer IN, Broek V, Terheyden H, Jepsen S. Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials *J Cell Biochem* 2002;86(1):90-8.
- Schwartz Z, Weesner T, van Dijk S, Cochran DL, Mellonig JT, Lohmann CH, et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol* 2000;71(8):1258-69.
- Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001;22(12):1599-606.
- Fleckenstein KB, Cuenin MF, Peacock ME, Billman MA, Swiec GD, Buxton TB, et al. Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. *J Periodontol* 2006;77(1):39-45.
- Wang HL, Greenwell H, Fiorellini J, Giannobile W, Offenbacher S, Salkin L, et al. Periodontal regeneration. *J Periodontol* 2005;76(9):1601-22.