مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ٤: از ۱۳-۱۹
زمستان ۱۳۸۹

بررسی نرخ بقای سلولی و فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های saos-2 در تماس با مواد پیوندی استئون و سرازورب در محیط آزمایشگاهی

نادر ایوبیان[۱]، طاهره فروتن[۲*]، آذین جمشیدی‌فر[۳]، نریمان مصفّا[٤]

۱- استادیار، گروه پریودنتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، ایران
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم، تهران، ایران
۳- دانشجوی دندانپزشکی، گروه پریودنتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، ایران
۴- استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۵/۲۳ پذیرش مقاله:۸۹/۱۰/۰۶

چکیده

هدف: استئون به‌عنوان یک ماده جانشین استخوان با ترکیب فسفات کلسیم دوفازی در دندانپزشکی کاربرد دارد. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر این ماده بر تکثیر، نرخ بقا و تمایز سلول‌های شبه استخوانی saos-2 در محیط آزمایشگاهی و همچنین مقایسه آن با ماده سرازورب بود.

مواد و روش‌ها: سلول‌های saos-2 در مجاورت دو نوع ماده پیوند استخوان استئون و سرازورب کشت داده شدند. گروه کنترل شامل هیچ ماده پیوندی نبود. در روز ۱۵ انکوباسیون در هر یک از نمونه‌ها برای تعیین نرخ بقای سلولی از آزمون MTT و برای تعیین میزان تمایز به استخوان از آزمون آلکالین فسفاتاز و آلیزارین قرمز استفاده شد.

نتایج: در گروه‌های استئون و سرازورب فعالیت آلکالین فسفاتاز به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. نرخ بقای سلولی به‌طور معنی‌داری در هر دو گروه تجربی از گروه کنترل پایین‌تر بود. در بین دو گروه استئون و سرازورب میزان تکثیر سلولی گروه استئون بالاتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی در محیط آزمایشگاهی نشان داد که هر دو نوع ماده پیوندی استئون و سرازورب امکان رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های saos-2 را در محیط کشت فراهم می‌کند. ماده پیوند استخوان سنتتیک استئون در مقایسه با سرازورب به لحاظ برخی خواص زیست‌شناختی واکنش‌های مناسب‌تری از خود نشان داد.

کلیدواژگان: مواد جایگزین استخوان، رده سلولی saos-2 ، نرخ بقا، ریخت‌شناسی

۱- مقدمه

در جراحی‌های دندانپزشکی اغلب برای پرکردن محل نقایص استخوانی نیاز به مواد شبه استخوانی داریم. گرچه پیوندهای استخوانی خودی به لحاظ خصوصیات استخوانی ایده‌آل‌ترین حالت محسوب می‌شود، اما وجود مواردی مانند آشکال مرضی محل دهنده پیوند، درد ناشی از برداشت آن‌ها از محل و همچنین هزینه‌های سنگین جراحی، استفاده از این روش را با محدودیت‌هایی مواجه می‌کند. امروزه گزارش‌های مختلفی در مورد کاربرد بالینی انواع مواد جایگزین استخوان منتشر شده است که نشان دهنده موفقیت کاربرد بالینی این مواد در علم دندانپزشکی است [۱-۳]. این مواد می‌توانند مشتق از

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، کدپستی: ۱۵۷۱۹۱٤۹۱۱
Email: Taherforoutan546@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

انسان، گاو، گیاهان یا مواد کاملاً مصنوعی باشد [۱، ۲، ٤، ٥]. یک عامل تعیین کننده مهم در موفقیت کاربرد مواد جایگزین استخوان رفتار فیزیولوژیک و هیستولوژیک این مواد و نحوه واکنش سلول‌های استخوانی میزبان در مواجهه با آن‌ها است که به اشکال مختلف ریخت‌شناسی ، نرخ بقا، میزان تکثیر، فعالیت آنزیم‌های مربوط به بافت استخوان و موارد دیگر خود را نشان می‌دهد [٦-۱۰]. یکپارچگی مواد جایگزین استخوان یا به‌عبارت بهترمواد پیوندی با بافت استخوان اطراف پس از کاشت دندان بستگی به فعالیت سلول‌های محیطی استخوان دارد و مهاجرت و تکثیر سلول‌های زنده استخوانی به‌طور اساسی تحت تأثیر روابط متقابل بین سلول‌های فوق و مواد پیوندی است [۸-۱۱]. مواد پیوندی استخوان گرچه از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی به‌خوبی توصیف شده ولی به لحاظ سازگاری زیستی آن‌ها و همچنین مقایسه مواد پیوندی مختلف با هم کمتر مورد بررسی قرار گرفته است.

استئون (Osteon) و سرازورب (Cerasorb) از جمله مواد پیوندی مصنوعی است که اخیراً به بازار معرفی شده است. استئون ترکیبی از بتا تری کلسیم فسفات (Beta Ticalcium Phosphate: B-TCP) و هیدروکسی آپاتیت (Hydroxyapatite: HA) است. فسفات کلسیم به‌صورت لایه‌هایی سطح گرانول‌های هیدروکسی آپاتیت را پوشانده است. سلول‌های استخوانی در هنگام مواجهه و تماس با این ماده به لحاظ نرخ بقا، ریخت‌شناسی و تأثیر آن در تمایز سلولی مورد بررسی چندانی قرار نگرفته است. بنابراین این تحقیق با هدف بررسی تأثیر ماده استئون بر سازگاری زیستی سلول‌های شبه استخوانی saos-2 و همچنین مقایسه آن با ماده پیوندی سرازورب طراحی شد. پاسخ این سؤال می‌تواند به پیشگیری از برخی از مشکلاتی که در اثر عدم موفقیت به‌کارگیری پیوندهای استخوانی نامناسب در کاشت دندان پیش می‌آید، کمک نماید. در مطالعه حاضر برای نیل به اهداف ذکر شده از روش‌های کشت سلولی، MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)، آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase: ALP)، آلیزارین قرمز (Alizarin Red) استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

مطالعه به روش تجربی (Experimental) انجام شد.

۲-۱- کشت سلولی

سلول‌های شبه استئوبلاستی انسانی (Human Osteoblast-Like Cells) ردهٔ saos-2 در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ٥ درصد CO_2 در محیط کشت شامل (Dulbecco's Modified DMEM Eagle Medium) (Gibco) FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco) ۱۰ درصد، پنی‌سیلین/ استرپتومایسین ۱۰۰ واحد در هر میلی لیتر (Gibco) انکوبه شدند. محیط کشت ۳ بار در هفته تعویض شد. سلول‌های پاساژ ۳ توسط تریپسین-EDTA (Gibco) (Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) از کف فلاسک جدا و با چگالی ۲×۱۰^{٤} سلول در هر چاهک در پلیت‌های ٢٤ خانه در معرض ۳۰ میلی‌گرم از مواد پیوندی استئون (Osteon®, Dentium, Republic of Korea) و سرازورب (Cerasorb®, Curasan AG, Germany) به‌مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. گروه کنترل شامل سلول‌های saos-2 بود که تحت هیچ‌یک از مواد پیوندی در پلیت‌ها قرار نگرفته بودند.

۲-۲- تعیین تکثیر سلولی و نرخ بقا

برای این سنجش از آزمون MTT استفاده شد. آزمون MTT برای سنجش میزان یا نسبت تکثیر سلولی کاربرد دارد و براساس روش رنگ‌سنجی بر پایه احیا و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ فورمازان (Formazan) انجام می‌شود که حساسیت این روش بالای ۹۸ درصد است. پس از اتمام انکوباسیون، در روز ۱۵ آزمون MTT به شرح زیر انجام شد:

پس از خارج کردن محیط کشت رویی پلیت‌ها و شستشو با PBS (Phosphate Buffer Saline) ۱۰۰ میکرولیتر MTT بر روی سلول‌های هر خانه اضافه شد و به‌مدت ٤ ساعت در

Archive of SID
www.SID.ir

انکوباتور حاوی CO_2 در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. طی انکوباسیون، MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه آنزیمی موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ و غیرمحلول فورمازان در داخل سیتوپلاسم سلولی می‌شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص است. بعد از ٤ ساعت مایع رویی هر خانه برداشته شده و با ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسید ۰/٤ درصد جایگزین شد. انکوباسیون در حرارت اتاق و دور از نور به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکل باعث لیز سیتوپلاسم سلولی شده و خروج فورمازان غیرمحلول از سیتوپلاسم سلول را سبب می‌شود و اقدام به محلول نمودن رنگ تشکیل شده می‌نماید که باعث رنگی شدن محیط می‌شود. در نهایت جذب نوری (Optical Density: OD) محلول به‌دست آمده در ٦۲۰ نانومتر به‌عنوان طول موج مرجع (Reference) و ٤۹۲ نانومتر به‌عنوان طول موج اندازه‌گیری (Measurement) در دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA-Reader) ثبت شد.

۲-۳- آزمون آلکالین فسفاتاز

فعالیت آلکالین فسفاتاز به‌عنوان یک پارامتر برای فعالیت استئوبلاستی مطرح است. برای این منظور از کیت سنجش آلکالین فسفاتاز (Product No.85 Sigma–Aldrich) استفاده شد. در این روش سلول‌ها ابتدا به‌وسیلهٔ محلول تثبیت کننده سیترات- استن به مدت ۳۰ ثانیه تثبیت شده و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض محلول نمک دیازونیوم (Diazonium) قرار گرفت. سپس سلول‌ها دو بار با آب مقطر شسته و به‌مدت ۳ دقیقه با محلول هماتوکسیلین (Haematoxylin) رنگ شد. سرانجام سلول‌ها به‌وسیلهٔ میکروسکوپ Phase Contrast بررسی شدند و شمارش به‌وسیلهٔ نرم‌افزار J Image انجام شد. میانگین نتایج با یکدیگر به‌وسیلهٔ آزمون T- test مقایسه شد.

۲-٤ -آزمون آلیزارین قرمز

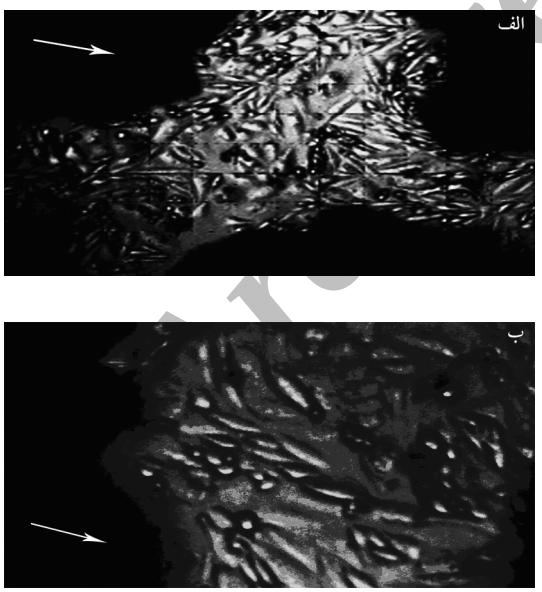
سلول‌ها با پارافرمالدئید ۱ درصد به‌مدت ده دقیقه تثبیت شدند. سپس سلول‌ها با محلول آلیزارین قرمز ۲ درصد به‌مدت ٤۵ دقیقه در pH=٤/۱ رنگ شدند. در پایان سلول‌ها با کلرید سدیم ۰/۹ درصد دو بار شستشو شدند.

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۵/۵) انجام شد. مقایسه آماری بین سه گروه توسط آنووای یک سویه (One-way ANOVA) انجام شد. از آزمون post hoc (Tamhane) برای ارزیابی اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد. P<۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌دار بودن از لحاظ آماری در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

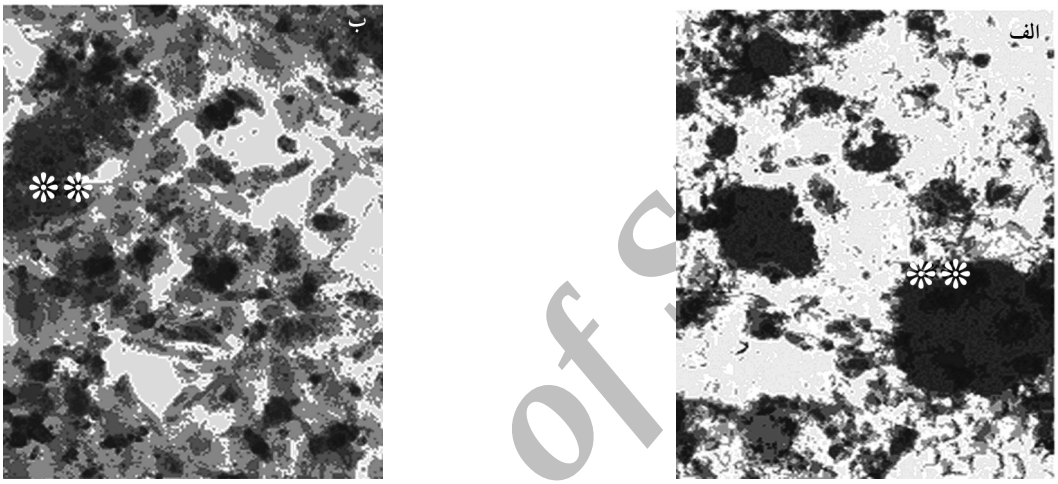
سلول‌های کشت شده شبه استخوانی saos-2 در هر سه گروه کنترل و تجربی ریخت‌شناسی فیبروبلاست شکل را از خود نشان دادند (شکل ۱).



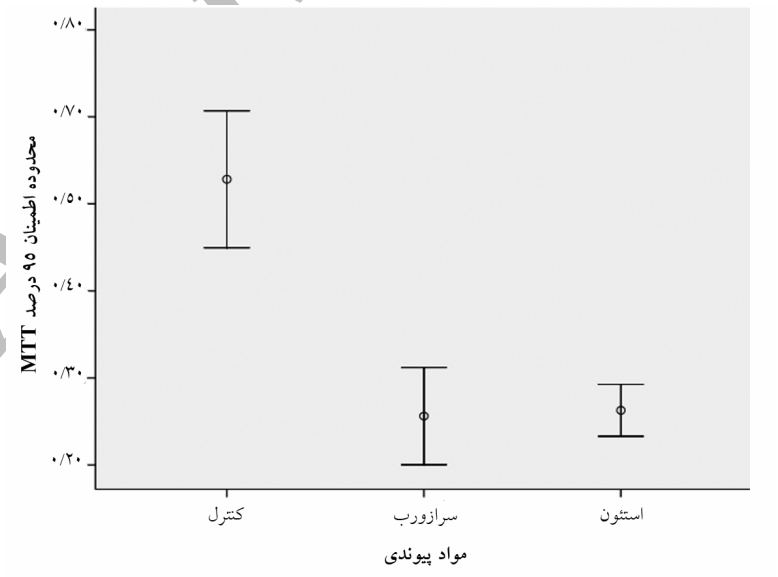
شکل ۱ سلول‌های شبه استخوانی رده saos-2 که سه روز پس از کشت؛ ماده پیوندی سرازورب **(الف)** یا استئون **(ب)** به آن افزوده شده است. سلول‌ها ریخت‌شناسی دوکی از خود نشان دادند. ماده جایگزین استخوان به رنگ تیره دیده می‌شود (فلش). (بزرگنمایی: × ۲۵)

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز و آلیزارین قرمز به‌عنوان آزمون‌های معرف فرآیند استخوان‌سازی نشان داد که در برخی مناطق کشت توده‌های ارغوانی مایل به قرمز مشاهده شد که بیانگر واکنش مثبت سلول‌های شبه استخوان نسبت به آنزیم‌های فوق بود (شکل ۲). این توده‌ها در هر سه گروه مشاهده شد که در نمودار ۱ گروه‌ها با یکدیگر مقایسه شده است. نمودار نشان می‌دهد که مناطق فوق در گروه استئون نسبت به هر دو گروه سرازورب و کنترل افزایش معنی‌داری از خود نشان می‌دهد. ضمن این‌که افزایش فعالیت آنزیم‌های فوق در گروه استئون در مقایسه با گروه سرازورب به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود.



شکل ۲ مقایسه دو گروه استئون **(الف)** و سرازورب **(ب)** به لحاظ واکنش سلول‌های saos-2 به رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز توده‌های قرمز رنگ (*) که نشان دهنده واکنش مثبت به این رنگ اختصاصی است در گروه استئون بیشتر است. (بزرگنمایی: × ۱۰۰)



نمودار ۱ نتایج آزمون Post hoc بین نمونه‌های مورد بررسی برحسب فعالیت میتوکندری به تفکیک گروه‌های تجربی و کنترل

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های کشت شده saos-2 که در معرض مواد پیوندی استئون و سرازورب قرار گرفتند پس از گذشت ۱۵ روز برای بررسی MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱). جدول ۱ چگونگی توزیع MTT را به تفکیک گروه‌های تجربی و کنترل با استفاده از آزمون آنووای یک سویه نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱).

جدول ۱ توزیع نمونه‌های مورد بررسی برحسب فعالیت میتوکندری به تفکیک گروه‌های تجربی و کنترل؛ کاهش فعالیت فوق در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل ملاحظه می‌شود.

گروه‌های مورد بررسی	تجزیه و تحلیل MTT				
	تعداد	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر	نتیجه آزمون آنووا
سرازورب	۱۲	۰/۲۵۶	۰/۰۸۷	۰/۱٤	۰/۳٦	
استئون	۱۲	۰/۲٦۲	۰/۰٤٦	۰/۱۷	۰/۳٤	P<۰/۰۰۱
کنترل	۱۲	۰/۵۲۸	۰/۰٤۹	۰/٤۹	۰/٦۰	

براساس آزمون صورت گرفته تفاوت بین گروه‌های تجربی و کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). بیشترین میزان نرخ بقای سلولی مربوط به نمونه‌های کنترل بود (۰/۰٤۹±۰/۵۲۸). پس از آن گروه‌های استئون (۰/۰٤٦±۰/۲٦۲) و سرازورب (۰/۰۸۷±۰/۲۵٦) قرار داشت. در گروه‌های استئون و سرازورب میزان نرخ بقا در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود (P<۰/۰۵). بین دو گروه استئون و سرازورب اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ نرخ بقای سلولی وجود نداشت (P>۰/۰۵).

٤- بحث

در مطالعه حاضر سازگاری زیستی سلول‌های saos-2 در مجاورت مواد پیوندی استئون و سرازورب در محیط آزمایشگاهی (In vitro) بررسی شد.

مواد مورد استفاده در پیوندهای استخوانی می‌توانند تشکیل استخوان جدید را ازطریق فرایندهای استخوان‌سازی و همچنین القای تمایز تحریک نمایند [۱۲، ۱۳]. یافته‌ها نشان داد که نرخ بقای سلولی در گروه‌های استئون و سرازورب در مقایسه با گروه کنترل کاهش پیدا می‌کند. همچنین بیشترین فعالیت آلکالین فسفاتاز در گروه سرازورب بود و بعد به‌ترتیب در گروه استئون و کنترل مشاهده شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که مواد استئون و سرازورب اگر چه نرخ بقای سلولی پایین‌تری نسبت به کنترل داشتند ولی به‌واسطه نتایج حاصل از فعالیت ALP امکان تمایز سلول‌های saos-2 را در محیط کشت فراهم کردند. یافته‌های فوق موافق با یافته‌های آلساید (Alcaide) و همکارانش است [۱۰]. آن‌ها گزارش کردند که ترکیب HA/β-TCP در محیط کشت امکان چسبندگی و تکثیر سلول‌های استئوبلاست را فراهم می‌کند، گرچه واکنش سلول‌های فوق با ماده پیوندی افزایش مرگ سلولی را القا کرد. به‌عبارت دیگر با وجود کاهش نرخ بقای سلولی، ترکیب HA/β-TCP از سازگاری زیستی خوبی برخوردار است.

هرتن (Herten) و همکارانش در مقایسه رشد سلولی روی HA، TCP دریافتند که ترکیبات حاوی TCP از جمله سرازورب (β-TCP) و بایو-آس (Bio oss) (α-TCP) افزایش نرخ بقای سلولی را در مقایسه با HA نشان می‌دهد [۹]. آن‌ها همچنین گزارش کردند که بیشترین میزان فعالیت ALP مربوط به گروه توتودنت (Totudent) و سپس سرازورب است. در همین راستا آیبار (Aybar) و همکاران [۱٤] دریافتند که سلول‌های استئوبلاست اولیه همانند گروه کنترل رشد معادلی بر ماده سرازورب دارند [۱٤].

ساختار شیمیایی ماده پیوند استخوان از لحاظ تغییر در غلظت یون کلسیم در محیط می‌تواند بر تمایز سلولی و تشکیل استخوان اثر بگذارد. مواد پیوندی استخوان که سبب تأمین

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت یون کلسیم شود، می‌تواند از تمایز سلولی و تشکیل استخوان جلوگیری کند. ترکیبات β-TCP در فراساختار خود کمبود کلسیم ندارد، بنابراین تمایل کمی برای رشد کریستال‌های آپاتیت جدید دارد. بنابراین باعث اختلال در بروز خصوصیات استئوبلاستی در سلول‌ها نمی‌شود [۱۰].

نشان داده شده است که نه تنها ترکیب شیمیایی ماده پیوندی، بلکه میزان تخلخل (Prosity) و اندازه خلل و فرج موجود در مواد پیوندی بر رفتار سلول‌های saos-2 در محیط کشت مؤثر است [۱۵، ۱۶]. مواد پیوندی که دارای تخلل مناسب در ساختار خود هستند امکان تکثیر و تمایز بهتر سلولی را در محیط کشت فراهم می‌کنند.

نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو نوع ماده پیوند استخوان استئون و سرازورب قادر به ایجاد رشد و تکثیر تمایز سلول‌های saos-2 است و از میان آن‌ها استئون به لحاظ برخی خصوصیات زیستی واکنش بهتری را نشان می‌دهد.

۵- تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم از جناب آقای دکتر احمد حسینی ریاست محترم مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی که امکان استفاده از تسهیلات آن مرکز را برای انجام این پروژه فراهم نمودند نهایت قدردانی و سپاسگزاری را به‌عمل آوریم.

٦- منابع

[1] Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. Int J Periodontics Restorative Dent 1993; 13(1): 29-45.

[2] 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 histomorpho-metric analysis--Part 2 of an ongoing prospective study. Int J Periodontics Restorative Dent 1998; 18(6): 528-43.

[3] 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 Restorative Dent 1997; 17(3): 292-9.

[4] 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.

[5] Watzinger F, Luksch J, Millesi W, Schopper C, Neugebauer J, Moser D, Ewers R. Guided bone regeneration with titanium membranes: a clinical study. Br J Oral Maxillofac Surg 2000; 38(4): 312-5.

[6] Schmitt SC, Wiedmann-Al-Ahmad M, Kuschnierz J, Al-Ahmad A, Huebner U, Schmelzeisen R, Gutwald R. 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.

[7] 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. Clin Oral Investig 2009; 13(2): 149-55.

[8] Kübler A, Neugebauer J, Oh JH, Scheer M,

Archive of SID
www.SID.ir

Zöller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. Implant Dent 2004; 13(2): 171-9.

[9] Mayr-Wohlfart U, Fiedler J, Gunther 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.

[10] Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sanchez-Salcedo S, Vallet-Regi M, Portoles MT. Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. Biomaterials 2009; 30(1): 45-51.

[11] Wang X, Fan H, Xiao Y, Zhang X. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate ceramics by microwave sintering. Mater Lett 2006; 60(4): 455-8.

[12] Fleckenstein KB, Cuenin MF, Peacock ME, Billman MA, Swiec GD, Buxton TB, Singh BB, McPherson JC 3rd. Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. J Periodontol 2006; 77(1): 39-45.

[13] Knabe C, Gildenhaar R, Berger G, Ostapowicz W, Fitzner R, Radlanski RJ, Gross U. Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. Biomaterials 1997; 18(20): 1339-47.

[14] Aybar B, Bilir A, Akçakaya H, Ceyhan T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. Clin Oral Implants Res 2004; 15(1): 119-25.

[15] Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. Ann Periodontol 2003; 8(1): 227-65.

[16] Lumbikanonda N, Sammons R. Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. Int J Oral Maxillofac Implants 2001; 16(5): 627-36.

Archive of SID

www.SID.ir