

## EVALUĂRI SEM ȘI EDX PRIVIND BIOMINERALIZAREA ȚESUTULUI OSOS NOU-FORMAT SEM AND EDX EVALUATIONS ON THE BIOMINERALIZATION OF NEWLY-FORMED BONE TISSUE

**SORINA STROE, VLAD VASILESCU, CLAUDIU CĂLIN, ION PĂTRAȘCU\***

*Universitatea de Medicina și Farmacie „Carol Davila”, București, Str. Bulevardul Eroii Sanitari, Nr. 8, 050474, București, România*

*Ipozeza de lucru privind interacțiunea biomateriale de adiție - țesutul osos periimplantar a stat la baza ideii că biomaterialele de adiție actuale pe bază de ceramici și/sau collagen formează la interfață os de novo, sunt biocompatibile și biointegrabile. Din acest punct de vedere a fost analizat care din produsele evaluate are rata de succes clinică cea mai mare și se apropie de standardul de aur - osul autogen. Caracteristicile cantitative și calitative, determinabile din punct de vedere histologic ale procesului de regenerare osoasă, secundar aplicării unui transplant autogen, respectiv a diferitelor tipuri de biomateriale de adiție, sunt reflectate de reactivitatea biologică a fiecărui implant în parte și de reactivitatea organismului. Rezultatele investigațiilor osteoscintigrafice, necesare expunerii dinamicii procesului de osteogeneză, sunt utile atunci când se corelează cu rezultatele histologice, respectiv cu integrarea implantului și cu formarea de țesut osos nou. Procesul de „osteostimulare” apare atunci când o substanță implantată influențează procesul de osteoreparație, inducând astfel formarea de țesut osos la nivelul defectului parodontal osos. Astfel, a fost realizat un studiu experimental prin care a fost testată capacitatea unor biomateriale de adiție de a induce formarea de os de novo, utilizând ca metodă de analiză a osteointegrării microscopul electronic de baleiaj și spectroscopia EDS.*

*The working hypothesis on the interaction between the addition biomaterial – peri implant bone is based on the idea that current addition biomaterials based on ceramic and / or collagen form de novo bone interface, are biocompatible and biointegrable. It was evaluated which of the products has the highest clinical success rate and is approaching the gold standard - autogenous bone. Quantitative and qualitative characteristics, determined from histological regeneration of bone, secondary to the application of an autogenous transplantation, namely the addition of different types of biomaterials are reflected by biological reactivity of each implant and systemic reactivity. Results of the osteoscintigrafical investigations necessary for the exposure of the osteogenesis process dynamics are useful when correlated with histological results also with the integration of the implant and new bone formation. The process of "osteostimulation" occurs when an implanted substance influences the osteoreparation, inducing the formation of bone tissue in the periodontal bone defect. So, an experimental study was conducted to test the capacity of some addition biomaterials to induce new bone growth, using the electronic sweeping microscope and EDS spectroscopy as methods to analyze the process of osteointegration.*

**Keywords:** EDX, biomineralization, osteointegration, bone de novo.

### 1. Introducere

Regenerarea ligamentelor parodontale, a inserției epiteliale și a osului alveolar din jurul dintelui cu afectare parodontală constituie obiective importante terapeutice în medicina dentară. În încercarea de a realiza regenerarea, epiteliul gingival înlocuiește epiteliul șanțului gingival, responsabil de inserția epitelială pe dinte. Ca urmare a debridării și a chiuretajului pungilor parodontale, epiteliul gingival proliferază mai rapid decât viteza cu care fibrele ligamentelor parodontale se pot reatașa cimentului nou format. Deși reinsertația în osul alveolar pare a se realiza în totalitate, orientarea inițială a fibrelor la suprafața dintelui pare să fie foarte dificil de atins. Aceasta conduce la punși parodontale subgingivale

căptușite cu epitelii în spațiul dintre osul alveolar și suprafața dintelui. Când procesul avansează are loc exfolierea dintelui. Cercetătorii fac eforturi pentru a limita evoluția spre apex a epiteliului, pentru a crește reimplantarea ligamentelor parodontale la suprafața dentară și osoasă prin metode chimice și chirurgicale și pentru a utiliza materiale de implantare care să mărească fixarea celulelor țesuturilor epiteliale și conjunctiv limitând astfel migrarea apicală a celulelor epiteliale [1].

Pentru substituția osoasă se folosesc materiale diferite din punct de vedere chimic și structural care au la bază mecanisme specifice distincte. Până în acest moment s-au efectuat multe experimente legate de dinamica temporală a proceselor biologice după implantarea materialelor de substituție; în acest scop, au fost efectuate

\* Autor corespondent/Corresponding author,  
E-mail: dr.ipatrascu@gmail.com

metode de investigație din domeniul medicinei nucleare precum scintigrafia scheletală și osteodensiometria [2]. Aceste metode permit, comparativ cu altele, controlul derulării proceselor de reparație osoasă în vivo. Se cercetează capacitatea acestor metode de a expune diferit dezvoltarea schimburilor de substanță osoasă după implantarea diferitelor materiale de substituție osoasă precum osul autogen într-o comparație intra- și interindividuală, și controlul rezultatelor prin studiu histologic la încheierea stadiului experimental pe animale de laborator. Spre deosebire de transplantul autogen, materialele de substituție osoasă cu acțiune osteoinductivă și osteoconductivă (îndeosebi ceramici) produc o reconstituire incompletă a defectului osos. Se presupune că materialul de substituție osoasă nu generează sau dezvoltă insuficiente influențe la nivelul țesutului de legătură, pentru a declanșa osteogeneza în centrul defectului (un efect pur osteoconductiv) punând astfel la dispoziție producția de degradare necesari declanșării biosintezei matricei osoase. Resorbția substanțelor de substituție degradabile este mai puternică decât neo-osteogeneza dar cu persistența unor fracțiuni de țesut osos sau moale încorporate a materialului implantat.

Pornind de la ipoteza că diferite materiale de adiție osoasă (os autogen, biomateriale ceramice sau colagenice) se comportă diferit atunci când sunt introduse într-o cavitate osoasă nou-formată din interiorul unui organism viu, a fost efectuat un studiu experimental prin care a fost evaluată capacitatea acestor biomateriale de a produce regenerare osoasă în defectul nou-format, utilizând ca metode de analiză: microscopul electronic de baleiaj și spectroscopia EDS.

## 2. Materiale și metode

Cercetarea a fost realizată pe animal de laborator, in vivo, creându-se prin frezaj defecte osoase femurale (vezi. fig. 1). Au fost utilizate experimental următoarele biomateriale de adiție; Cerasorb® (Deutschland), Osteobiol® (Tecnos), NanoBone® (Artoss GmbH) versus os autogen. Vârful de gamă al biomaterialelor de adiție au fost reprezentate de Cerasorb (denumire comercială) din clasa biomateriale ceramice și Osteobiol (denumire comercială) din clasa biomateriale colagenice. Este foarte important ca materialele de adiție să urmărească fazele fiziologice ale regenerării osoase fără să interfere în vreun fel cu acest proces. În acest sens **materialul autogen (osul uman prelevat)** este ideal, dar frecvent o a doua intervenție chirurgicală este necesară și dificilă dacă nu imposibilă, când osul prelevat este într-o cantitate insuficientă. În studiul nostru experimental SEM, am utilizat osul autogen versus ceramicile bioactive și produsele pe bază de colagen.

### *Biomaterialul ceramic – CERASORB (Deutschland)*

Spre deosebire de vechile ceramici, Cerasorb® prezintă o fază pură de  $\beta$  tricalciu-fosfat în compoziția sa, fiind conceput pentru a urmări fazele fiziologice ale regenerării osoase. Într-o primă etapă, Cerasorb® asigură o matrice multiporoasă care favorizează dezvoltarea celulelor osoase, dar cu o resorbție neuniformă, completă care merge în paralel cu sinteza de os endogen [3]. Pe măsură ce osul este format, granulele de Cerasorb® se resorb, ceea ce conduce la "restitutio ad integrum" respectiv revenirea la forma inițială.

Cerasorb® permite cercetătorilor monitorizarea continuă a procesului de regenerare osoasă prin examen radiologic [4]. Aceasta este posibilă datorită radioopacității produsului Curasan®. Urmele de  $\beta$ -TCP vizibile radiologic, anterior inserării unui implant nu semnifică obligatoriu instabilitate sau vindecare osoasă deficitară. Frecvent cantitatea reală de  $\beta$ -TCP implantată este mai redusă decât cea presupusă cu doar o cantitate mică de granule persistente, în condițiile în care radiologic cantitatea este mai mare. Pentru chirurg, după ce a implantat și monitorizat evoluția materialului Cerasorb®, imaginea radioopacă reprezintă un important mijloc de evaluare a procesului de vindecare. Asemănător, prezența unor învelișuri granulare într-o zonă descoperită pentru razele X demonstrează resorbția și creșterea osoasă fiziologică. Ceramicile  $\beta$ -tricalciufosfat prezintă o capacitate redusă de biodegradare. Conținutul crescut de Ca și P (bifazic) se poate dizlova ușor în apă și poate afecta ușor disoluția  $\beta$ -TCP. Rata de dizolvare a  $\text{Ca}^{2+}$  și  $\text{PO}_4^-$  este superioară ceramicii  $\beta$ -TCP [5]. Testele efectuate pe animale demonstrează fagocitarea graduală a implantului astfel încât volumul acestuia se reduce cu până la 30%. Cantitatea de Ca, P se apropie de cea a osului matur. Aceasta demonstrează că degradarea evoluează paralel cu depunerea de os nou. Studiile SEM confirmă afinitatea dintre implant și os [6]. La patru (4) săptămâni se identifică osul. Iar la 24 săptămâni se descrie osteointegrarea la interfață. Particulele de material se micșorează. Se descriu două etape ale biodegradării:

- Solubilizarea implantului este crescută, în fluidele organismului aceasta aparând sub formă de ioni sau molecule.
- Solubilizarea implantului este redusă, structura sa fiind dispersată sub formă de particule fine în fluidele organismului, fiind în cele din urmă fagocitate de macrofage.

### *Biomaterialul colagenic – OSTEOBIOL (Tecnos)*

Produsul Osteobiol Gen-Os® este un material de substituție osoasă pe bază de

colagen. Colagenul, în săptămâna 1, acționează asupra fibrinei accelerând formarea cheagului primar iar în săptămâna a 2-a substituie funcționarea fibrinei [7]; colagenul își exprimă funcția chemotactică prin: atragerea precursorilor de osteoblaste din măduva osoasă, mărește viteza de deplasare a osteoblastelor de 2-3 ori; stimulează proliferarea osteoblastelor; susține activarea și aglutinarea trombocitelor și facilitează interrelația osteoblaste – osteoclaste – trombocite [8].

Prin urmare biomaterialele colagenate favorizează procesul fiziologic de regenerare și reparare osoasă cu obținerea de rezultate optime în timp scurt. Osteobiol Gen – Os<sup>®</sup> este un amestec de os cortical – spongios colagenat, care prezintă o structură și o porozitate asemănătoare osului natural autolog și prin urmare prezintă acțiune osteoconductivă. Materialul este biocompatibil și biodegradabil. Proprietățile sale higroscopice asigură funcția de carier pentru substanțe medicamentoase. Materialul se resoarbe în totalitate [9]. Țesutul osos nou format reface masa osoasă datorită proprietăților sale osteoconductive, iar colagenul din structura sa favorizează formarea cheagului și invazia acestuia de către celulele regeneratoare și reparatoare.

#### Fazele biomineralizării grefei osoase

Asemănător fracturilor, procesul de vindecare al țesutului osos la nivelul zonei de grefare este reprezentat de secționarea traumatică a vaselor de sânge cu sângerare abundentă consecutivă și formarea unui hematom. Hematomul este responsabil de activarea cascadei de coagulare și formarea cheagului de fibrină. Răspunsul inflamator acut local, va fi reprezentat în următoarele zile de numeroase neutrofile, limfocite și plasmocite. De regulă, la o săptămână după procedura de grefare, la periferia grefei se formează din cheagul rezultat anterior, un țesut de *granulație fibros* care va reprezenta puntea de legătură dintre grefa transplantată și osul de vecinătate. Prezența acestui țesut de granulație va conduce la chemotactismul macrofagelor și osteoclastelor pentru a fagocita osul nevascularizat; consecutiv se inițiază proliferarea vaselor sanguine *de novo*. Biomaterialele de adiție spongioase prezintă o viteză de revascularizare mult crescută, putând fi parțial străbătute de vase sanguine la câteva ore de la transplantare, fapt datorat multiplelor anastomoze dintre vasele sanguine ale patului receptor și cele din materialul de grefare; este precizat în literatură că întreaga revascularizare a biomaterialului de grefare spongios este complet după aproximativ 2 săptămâni.

### 3. Metoda de lucru experimentală

Evaluarea experimentală a fost realizată pe animal de laborator cod 7-40, rasa Chinchilla, 3,5 kg.

#### Pregătirea probelor

Au fost realizate probe ptr. protocolul operator în vederea examinării stadiului de osteointegrare la 30, 60, 90 de zile în defectul osos creat; acesta a fost realizat prin frezare în femurul animalului de laborator, efectuându-se patru osteotomii în care s-au aplicat biomaterialele experimentale conform schemei: 1. Grefa autogena, 2. Cerasorb, 3. Osteobiol, 4. Nanobone (vezi fig. 1)

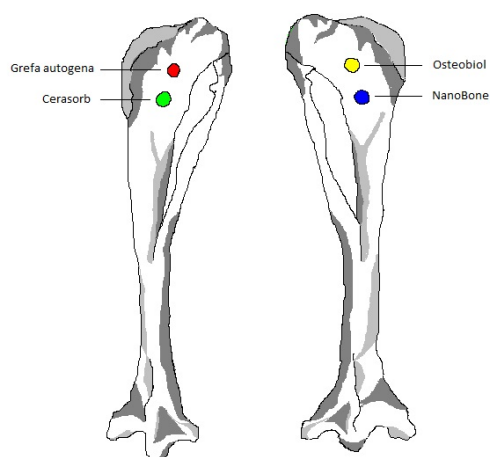


Fig. 1- Osteotomii (4) femurale pentru inserția biomaterialelor de adiție: grefa autogenă, Cerasorb, Osteobiol, Nanobone .



Fig. 2 - Imagine clinică a două defecte osoase femurale stângi.



Fig. 3 - Incizia și decolarea la nivelul capului femural.



Fig. 4 - Crearea defectelor osoase femurale cu freza Lindemann și răcire cu ser fiziologic.



Fig. 5- Recoltare de sânge cu seringă din osteotomie.



Fig. 6 - Recoltare de os autogen pentru augmentarea defectului osos.



Fig. 7- Prepararea biomaterialului de adiție cu sânge.

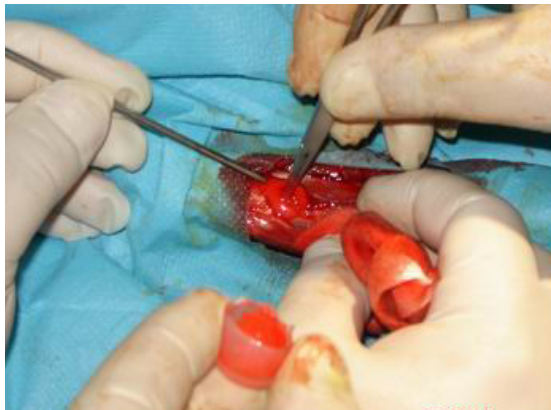


Fig. 8 -Aplicarea biomaterialului în defectul osos.

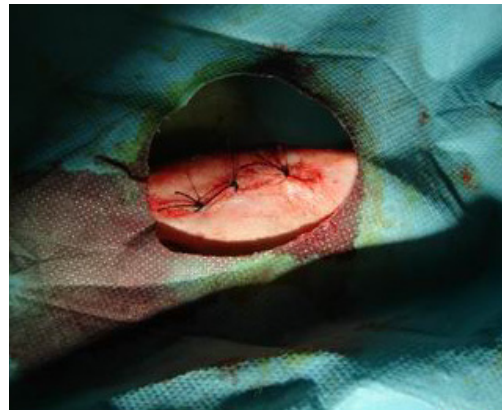


Fig. 9 - Sutura plăgii cu fire separate.

#### 4. Examinarea ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscope*)

După obținerea probelor biologice experimentale, acestea au fost examinate prin microscopie electronică de baleiaj cu ajutorul unui microscop tip XL -30 ESEM TMP, fiind utilizată o tensiune de accelerare a fasciculului de electroni de 10kV, obținând un curent în probă de 30μA, un diametru al fasciculului de electroni la interacția cu suprafața probelor corespunzătoare unui spot patru și o distanță între piesa polară a microscopului și suprafața probei cuprinsă între 10 și 13mm; s-a constatat că la 30 de zile proba experimentală cea

mai evidentă în care se conturează formarea structurii osoase incipiente se află în defectul tratat cu os autogen (vezi fig. 10). S-a considerat că cel mai reprezentativ stadiu de evaluare ESEM este la 60 și respectiv 90 de zile. În acest interval structura osoasă este evidentă sub forma unei unități osteonice (pe grefa de os autogen) dar și pe biomaterialele de adiție (ceramice, colagenice). Imaginile ESEM privind stadiul osteointegrării biomaterialelor de adiție demonstrează apariția structurii osoase *de novo* în defectul osos.



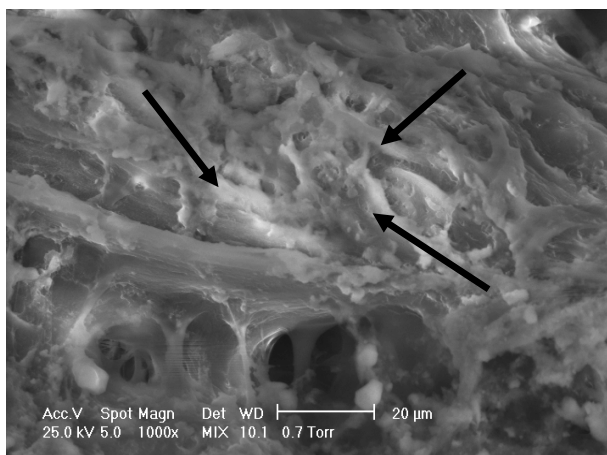


Fig. 10 - Imaginea ESEM a implantului de os autogen după 30 zile (x1000); se poate observa intensa neovascularizație care cuprinde interiorul grefei în totalitate (săgeți negre).

### Stadiul osteointegrării la 60 de zile

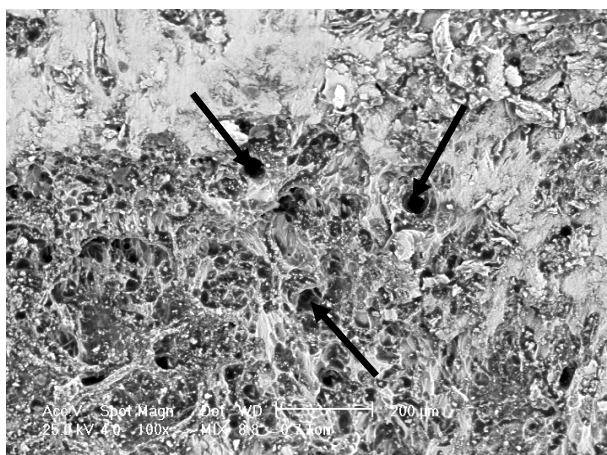


Fig. 11- Imagine ESEM a implantului de os autogen după 60 zile (x100); se poate observa apariția structurii osoase cu centre osteonice și structura haversiană a osului de novo (săgeți negre).

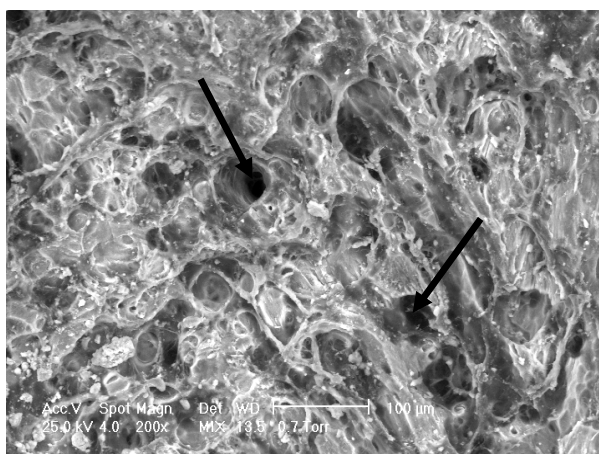


Fig. 12 - Imagine ESEM a implantului de os cortical – spongios colagenat (OSTEOBIOL®) după 60 zile (x200); se observă structurarea grefei asemănătoare structurii țesutului osos, cu prezența centrelor osteonice și structura haversiană (săgeți negre).

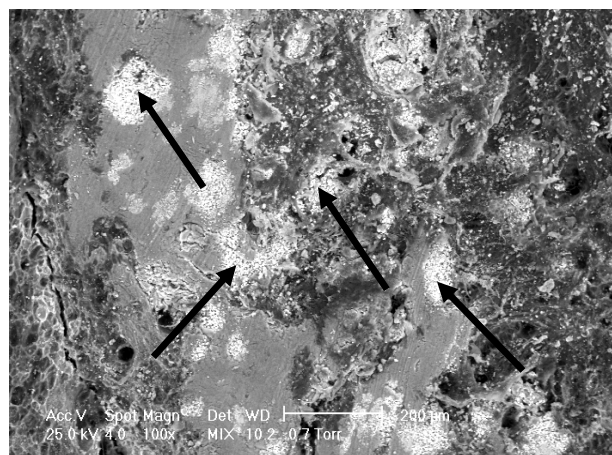


Fig. 13 - Imagine ESEM a implantului de ceramică pe bază de  $\beta$ -tricalciufosfat (CERASORB®) după 60 zile (x100); se observă gradul de resorbție mai lent al grefei cu urme de ceramică (săgeți negre).

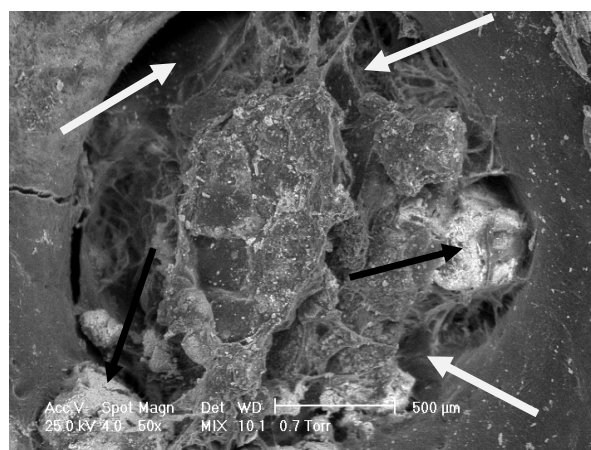


Fig. 14 - Imagine ESEM a implantului de ceramică hidroxiapatitică (NANOBONE®) după 60 zile (x5); se constată integrarea grefei sub forma de manșon de țesut fibros (sageți albe) și resorbția incompletă a materialului de adiție persistând sub forma de granule (săgeți negre).

### 5. Evaluarea EDX (Energy Dispersive X-Ray Microanalysis) a compoziției chimice cantitative și calitative a țesutului osos nou-format

A fost efectuată analiza EDX utilizând un spectrometru EDS – EDX cu o rezoluție de 128 eV. Această analiză permite detecția razelor X emise de un element, ca rezultat a de-excitării nucleului de electroni creată de o undă electronică cu energie înaltă. Datorită cuantificării nivelurilor de energie electronică, energiile razelor X emise caracteristic pentru fiecare element în parte vor fi diferite cu numai câteva imagini spectrale suprapuse. Probele cu osteointegrare la 60 de zile și 90 de zile au fost considerate cele mai adecvate pentru evaluare. În cazul biomaterialelor de adiție ceramic tip Cerasorb și colagenice tip Osteobiol s-a constatat o osteointegrare cu elemente

componente de bază identice cu ale țesutului osos natural. În evaluarea biomaterialelor pe bază de hidroxiapatită tip Nanobone, s-a constatat că elementele fundamentale fosfo-calcice nu sunt în aceeași proporție ca în țesutul osos natural [10]; totodată nu prezintă o osteointegrare prin legături chimice, aceasta realizându-se prin țesut fibros [11].

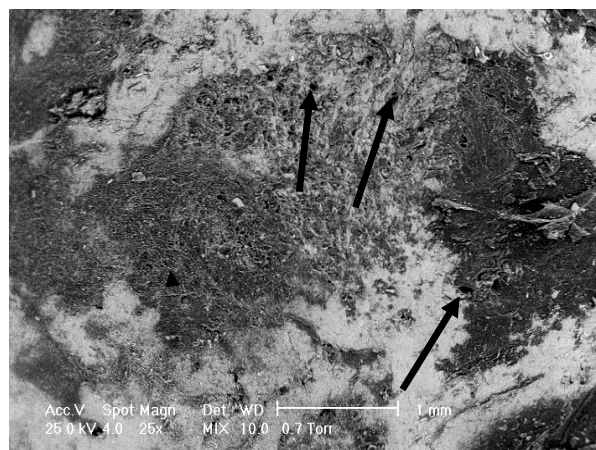
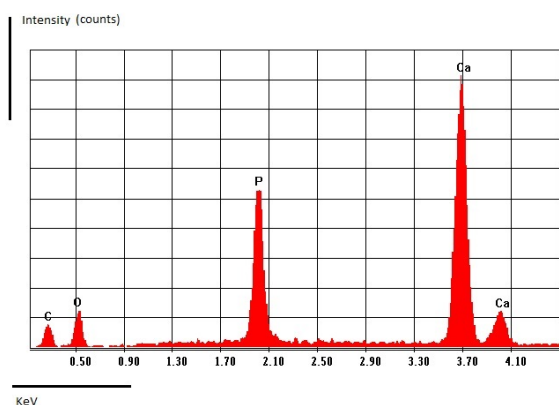


Fig. 15 - Proba 1 /Os autogen- EDX - 60 zile; Structura osoasă formată datorită grefei autogene; se observă prezența canalelor haversiene (săgeți negre) și structura spongioasă a osului de-novo.

Label A: Os normal



Label A: Os nou

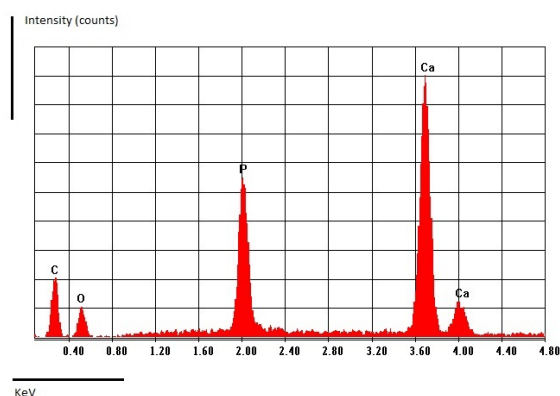


Fig. 16 - Analiza EDX evidențiază similaritatea elementelor fundamentale ale structurii osoase (Ca/P).

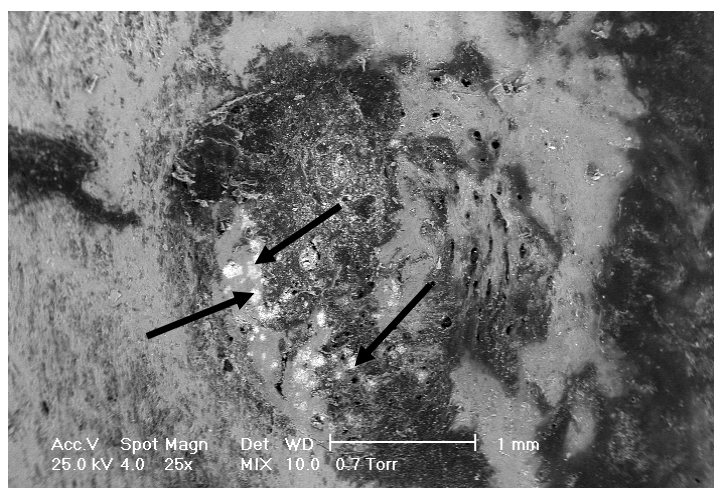
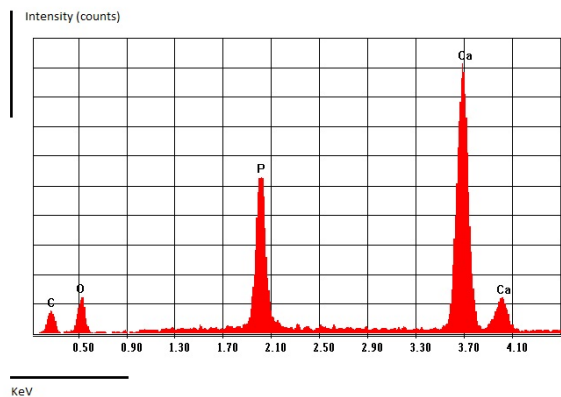


Fig 17 - Proba a II-a - Os normal-Cerasorb-EDX - 60 zile; prin grefarea osteotomiei cu biomaterial pe bază de ceramică (Cerasorb®) se observă formarea structurii osoase dar și remanentă unor zone de biomaterial neresorbit (săgeți negre).

Label A: Os normal



Label A: Os nou

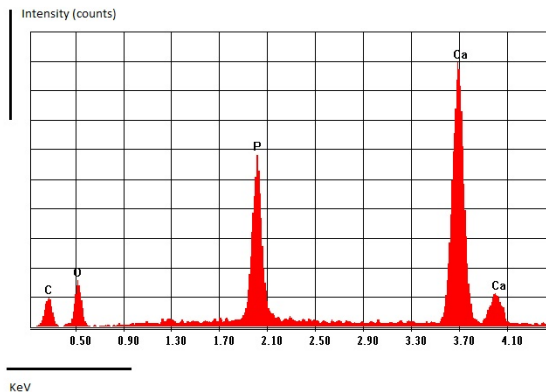


Fig. 18 - Analiza EDX a interfeței grefa-țesut osos demonstrează aceeași compoziție elementală fosfo-calcică.

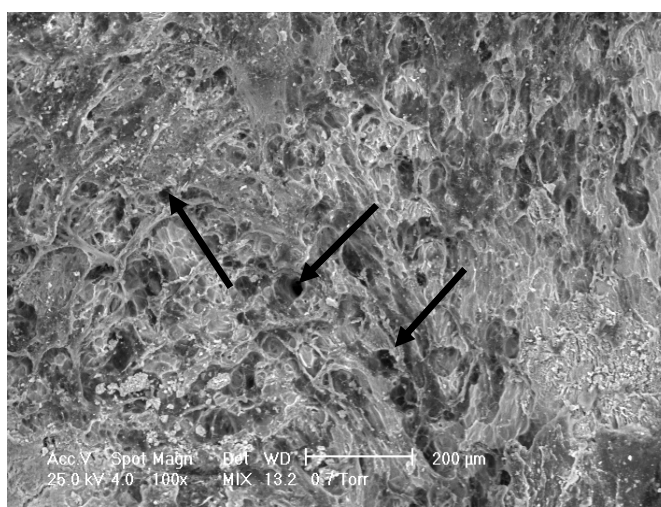
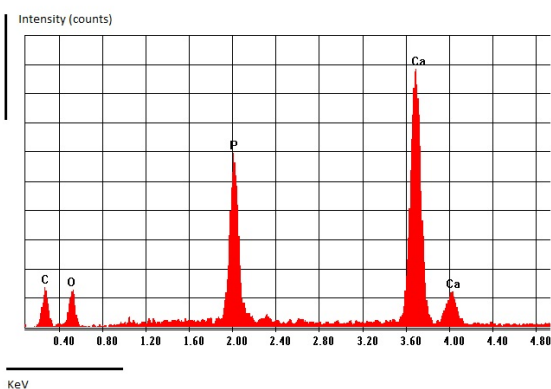


Fig. 19 - Proba 1 - Os normal – OsteoBiol – EDX - 60zile; structura osoasa a grefei de OsteoBiol® cu numeroși centrii activi osteonici bine delimitați (săgeți negre) și asemănători structurii osoase din vecinătate.

Label A: Os normal



Label A: Os nou

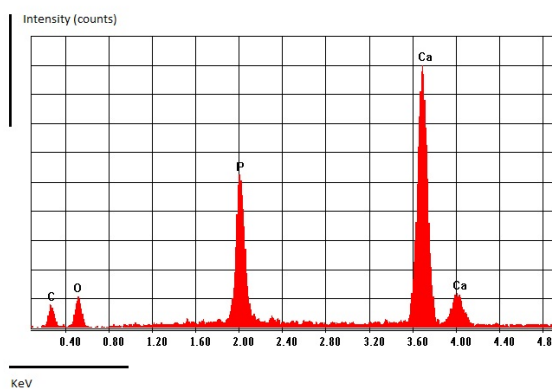


Fig. 20 - Analiza EDX confirmă prin elementele componente principale similaritatea rezultatelor celor 2 produse (os autogen, OsteoBiol)



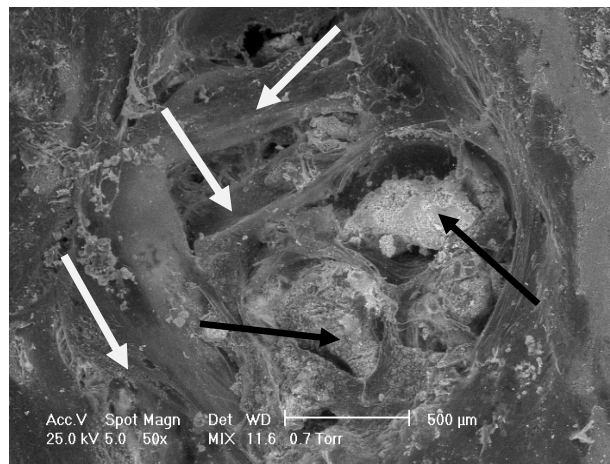
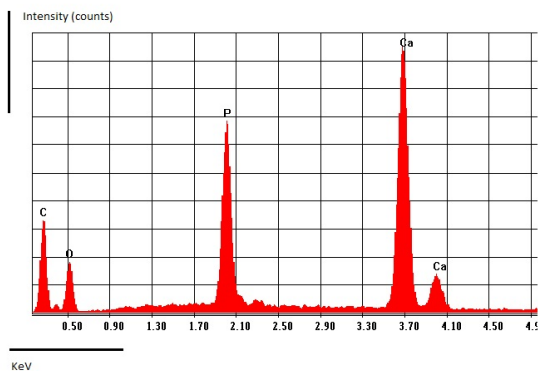


Fig. 21. - Proba a II-a - Os normal – NanoBone – EDX - 90zile; Biomaterialele pe bază de hidroxiapatită tip NanoBone® nu sunt osteointegrate din cauza ritmului foarte lent al osteoconducției; astfel la interfața cu țesutul osos se poate observa organizarea sub formă de calus fibros al biomaterialului de adiție (săgeți albe) și prezența unor zone de biomaterial neresorbit sub formă de particule (săgeți negre).

Label A: Os normal



Label A: Material de adiție

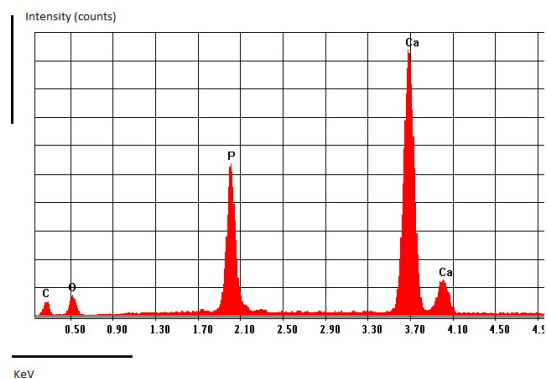


Fig. 22 - EDX demonstrează că deși elementul principal (Ca) prezintă valori similare atât în cazul osului autogen cât și în cel al materialului de adiție de tip NanoBone, elementul principal secundar (P) și oligo-elementele (C/O2) sunt reduse cantitativ față de țesutul osos adiacent.

## 6. Discuții

În mod evident din materialul de substituție osoasă implantat nu s-au declanșat suficiente impulsuri care să acționeze asupra țesutului de legătură format pentru a stimula osteogeneza în centrul defectului osos prin:

- inducția proceselor de diferențiere mezenchimală;
- un efect pur osteoconductiv;
- punerea la dispoziție a produșilor de degradare pentru biosinteza matricei osoase.

Posibilele cauze ale eșecului materialului de substituție osoasă în raport cu scopurile propuse și restabilirea continuității defectelor osoase sunt multiple:

- Țesutul de legătură format restrânge după dobândirea unui anumit grad de maturitate, ca menținător de spațiu nedorit, extinderea ulterioară a țesutului osos regenerat. Datorită maturizării continue a țesutului de

legătură, a scăderii numărului de celule și a reducerii capilarelor în condițiile creșterii densității fibrelor, chemotactismul celulelor osteogenetice, pluripotente este îngreunat dacă nu imposibil. Este posibil ca la nivelul țesutului de legătură imatur, celulele pluripotente să fi fost prezente într-un număr corespunzător doar într-un moment inițial. Acestea sub acțiunea unei excitații specifice conduc în final la osteogeneza.

Substanțele inductoare, respectiv extractele matriceale, nu conțin toate proteinele necesare diferențierii celulare și mediatorii, sau acestea nu se află într-o concentrație sau într-o fază solubilă corespunzătoare, pentru a permite obținerea unui substitut osos fiziologic valoros. Substanțele implantate reduc procesele de vindecare fiziologice, aceasta însemnând că fie sunt bioinerte ori bioactive. Resorbția lor îndelungată, autocronometrabilă prin celule fagocitare, conduce prin sinteza de mediatori proinflamatori la o inflamație sterilă, răspunzătoare de reducerea dezvoltării țesutului osteogenetic, inducția și – sau



stimularea celulelor progenitoare osteogenetice, respectiv a osteoblaștilor.

- Este posibil ca timpul acordat studiului să fi fost insuficient. Probabil că într-un moment mai îndepărtat s-ar fi umplut și centrul defectului cu os vital. Această concluzie este contestată de rezultatele clinice și histologice ale testării ceramicii calciu-carbonat ca și material de substituție, care nu au pus în evidență, chiar și într-un moment de studiu mai îndepărtat, osteogeneza declanșată în ceramica implantată.

Limitele acestui studiu experimental au fost reprezentate de utilizarea unui singur animal de laborator (rasa Chinchilla) și lipsa evaluării pe termen lung a grefelor osoase, pentru a evalua rata de resorbție a acestora la minim 1 an de la implantare.

## 7. Concluzii

Având în vedere limitele acestui studiu experimental, se pot concluziona următoarele:

- Este demonstrată importanța folosirii materialelor de adiție ceramice sau colagenice ca substituenți de os autogen în defecte osoase, deoarece acestea (Cerasorb® respectiv Osteobiol®) prezintă o rată de osteointegrare asemănătoare osului autogen, formându-se o structură osoasă cu numeroși centri osteonici bine delimitați; singura mențiune care trebuie amintită în cazul materialului ceramic Cerasorb® este că în zona grefată rămân zone de biomaterial neresorbit.

- Biomaterialele pe bază de hidroxiapatita tip Nanobone® nu sunt osteointegrate din cauza ritmului foarte lent al osteoconducției și lipsa oricărui stimul osteoinductiv la nivelul defectului osos; pe de altă parte, așa cum am demonstrat, la interfața cu țesutul osos se poate observa organizarea sub formă de calus fibros al biomaterialului de adiție.

- Este nevoie de studii clinice pe subiecți umani prin care să se evalueze eficacitatea pe termen lung a biomaterialelor de adiție în sensul analizării ratei de resorbție a acestora post-implantare; de asemenea este încă neclar care anume biomateriale de adiție sunt capabile de osteoconducție și/sau osteoinducție la nivelul defectului osos.

## BIBLIOGRAFIE

1. Robert G. Craig, Restorative Dental Materials, 11 edition, Mosby publishing, 2001 (In Romanian – Editura All Educational, 2001 pg. 176-179, 186-188, 217, 558-556).
2. S. Ersanli, V. Olgac, and B. Leblebicioglu, Histologic analysis of alveolar bone following GTR, J Periodontol 2004, **75**, 750.
3. R.Z.LeGeros, Calcium Phosphate biomaterials in medical applications, Chem. Rev. 2008, **108**, 4742.
4. P.Ducheyne, and E.Schepers, Bone bioactive material surface changes and bone cell function are related, Department of Bioengineering, School of Engineering and Applied Sciences, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.
5. H.H. Horch, R. Sader, C. Pautke, A. Neff, H. Deppe, and A. Holk, Synthetic, pure-phase  $\beta$ -TCP ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws, Int J Oral Maxillofac Surg 2006, **35**, 708.
6. M. Lindner, C. Bergmann, R. Telle, and H. Fischer, Calcium phosphate scaffolds mimicking the gradient architecture of native long bones. J Biomed Mater Res A. 2013 Nov, **26**, 1.
7. J.L. Calvo Guirado, M.P. Ramírez Fernández, B. Negri, R.A. Delgado Ruiz, J.E. Maté Sánchez de-Val, and G. Gómez-Moreno, Experimental model of bone response to collagenized xenografts of porcine origin (OsteoBiol® mp3): a radiological and histomorphometric study. Clin Implant Dent Relat Res. 2013 Feb, **15**(1),143.
8. M. Ramírez-Fernández, J.L. Calvo-Guirado, R.A. Delgado-Ruiz, J.E. Maté-Sánchez del Val, V. Vicente-Ortega, and L. Meseguer-Olmos, Bone response to hydroxyapatites with open porosity of animal origin (porcine [OsteoBiol mp3] and bovine [Endobon]): a radiological and histomorphometric study. Clin Oral Implants Res. 2011 Jul, **22**(7),767.
9. M. Figueiredo, J. Henriques, G. Martins, F. Guerra, F. Judas, and H. Figueiredo, Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes - comparison with human bone. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Feb; **92**(2),409, doi: 10.1002/jbm.b.31529.
10. S. Dietze, T. Bayerlein, P. Proff, A. Hoffmann, and T. Gedrange, The ultrastructure and processing properties of Straumann Bone Ceramic and NanoBone. Folia Morphol (Warsz). 2006 Feb, **65**(1),63.
11. E. Kauschke, E. Rumpel, J. Fanghänel, T. Bayerlein, T. Gedrange, and P. Proff, The in vitro viability and growth of fibroblasts cultured in the presence of different bone grafting materials (NanoBone and Straumann Bone Ceramic). Folia Morphol (Warsz). 2006 Feb, **65**(1),37.

\*\*\*\*\*