



Cranio-maxillofacial

# Implant Directions®

Vol.5 N° III September 2010



CASE REPORT»

EFFECTS OF HYDROXYL-APATITE PARTICLE ON HUMAN FIBROBLASTS IN VITRO.

ISSN 1864-1199 / e-ISSN 1864-1237

## Editorial board

### Editor-in-chief

Dr. Werner Mander, Austria  
werner.mander@implantfoundation.org

### Managing editor

Dr. Sigmar Kopp, Germany  
sigmar.kopp@implantfoundation.org

### Coordinating editor

N. N., Switzerland

### Editorial board (in alphabetic order)

Prof. Dr. Volker Bienengräber, Germany  
Henri Diederich med.dent, Luxemburg  
Dr. Yassen Dimitrov, Bulgaria  
Za. Stephan Haas, Germany  
Prof. Dr. Vitomir S. Konstantinovic, Serbia  
Carlos Mendez, Spain  
Dr. Richard Musicer, USA  
Dr. Gerald Schillig, Germany  
Dr. Katrin Tost, Greece

### Evidence reports and Critical Appraisals IF Research & Evidence Dept.

### Single Issue Price

Euro 30

### Annual Subscription

Euro 120

### Copyright

Copyright ©2008 by  
International Implant Foundation  
DE- 80802 Munich / Germany  
www.implantfoundation.org

### Contact

publishing@implantfoundation.org

### CMF.Impl.dir.

ISSN 1864-1199  
e-ISSN 1864-1237

### Disclaimer

#### Hazards

Great care has been taken to maintain the accuracy of the information contained in this publication. However, the publisher and/or the distributor and/or the editors and/or the authors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of the information contained in this publication. The statements or opinions contained in editorials and articles in this publication are solely those of the authors thereof and not of the publisher, and/or the distributor, and/or the IIF.

The products, procedures and therapies described in this work are hazardous and are therefore only to be applied by certified and trained medical professionals in environment specially designed for such procedures. No suggested test or procedure should be carried out unless, in the user's professional judgment, its risk is justified. Whoever applies products, procedures and therapies shown or described in this publication will do this at their own risk. Because of rapid advances in the medical science, IF recommends that independent verification of diagnosis, therapies, drugs, dosages and operation methods should be made before any action is taken.

Although all advertising material which may be inserted into the work is expected to conform to ethical (medical) standards, inclusion in this publication does not constitute a guarantee or endorsement by the publisher regarding quality or value of such product or of the claims made of it by its manufacturer.

#### Legal restrictions

This work was produced by IF Publishing, Munich, Germany. All rights reserved by IF Publishing. This publication including all parts thereof, is legally protected by copyright. Any use, exploitation or commercialization outside the narrow limits set forth by copyright legislation and the restrictions on use laid out below, without the publisher's consent, is illegal and liable to prosecution. This applies in particular to photostat reproduction, copying, scanning or duplication of any kind, translation, preparation of microfilms, electronic data processing, and storage such as making this publication available on Intranet or Internet.

Some of the products, names, instruments, treatments, logos, designs, etc. referred to in this publication are also protected by patents and trademarks or by other intellectual property protection laws (eg. «IF», «IIF» and the IF-Logo) are registered trademarks even though specific reference to this fact is not always made in the text.

Therefore, the appearance of a name, instrument, etc. without designation as proprietary is not to be construed as a representation by publisher that it is in the public domain.

Institutions' subscriptions allow to reproduce tables of content or prepare lists of Articles including abstracts for internal circulation within the institutions concerned. Permission of the publisher is required for all other derivative works, including compilations and translations. Permission of the publisher is required to store or use electronically any material contained in this journal, including any article or part of an article. For inquiries contact the publisher at the address indicated.

## Typical contents in ID

- **Evidence Reports** summarize the latest «Hot Topics» from relevant journals putting similar studies «side-by-side». This unique presentation of studies allows you to compare and contrast the patient populations, the treatment interventions, and the quality of the scientific methods. The «evidence-based bottom line» is presented with an overall summary statement at the beginning. Clinical notes by implantologists with special expertise on the topic complete the Evidence Report by providing their expert clinical opinion. **ID** is an implantology publication that provides attention to detail in balancing science with clinical opinion in such a clear, concise, and visually-friendly presentation.
- **Literature Analyses** provide you with an in-depth look at the research on a given topic. A «Literature Analysis» is a critical review of the literature on the epidemiology, treatment methods, and prognosis for implant-related topics or conditions. Literature Analyses are broader than «Evidence Reports» and are written to serve as a reference tool for implantologists to help them make decisions regarding how to manage patients, to assist them in evaluating needs for future research, and to use the material for future presentations.
- **Critical Appraisals** summarize the findings from important papers used for clinical decision making or marketing by implant companies. In addition to the summary, the study's methods and clinical conclusions are critically reviewed in an effort to challenge the implantology community into not accepting everything that is published, while fostering alternative explanations and ideas.
- **Case reports** give implantologists the opportunity to publish on unique patients using innovative or alternative methods for treating challenging patient conditions.
- **Research in Context** is a helpful «what is» section to consult if you've ever read a study and asked «what is a p-value» or any other research method question. It assists clinicians with the critical evaluation of the literature by briefly describing relevant aspects of research methods and statistical analysis that may bias results and lead to erroneous conclusions.

**Исследование влияния остеотропных материалов на основе гидроксиапатита на функциональную активность животных клеток in vitro**

**Авторы:**

Русак А.А., Никольская А.А., Пинчук С.В.  
ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь

**Effects of hydroxyl-apatite particle on human fibroblasts in vitro.**

**Authors:**

Rusak A.A., Nikolskaya V.P., Pinchuk S.V.  
The Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya Street, Minsk BY-220072, Republic of Belarus

E-mail: dr.rusak@mail.ru

**Abstract**

The aim of this study was to investigate the effects of bone substitute materials on fibroblast cell lines in vitro. The materials included hydroxyl-apatite in different chemical compositions.

Cellular responses for particulate hydroxyl-apatite (HA) have been determined by MTT-test and by cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide cell number. Differentiation properties of fibroblasts had been studied.

It was found that there is no significant decrease in cell population after adding HA nanoparticles to the fibroblast cell line.

**Ключевые слова:** БЕТА-ТРИ КАЛЬЦИЙ ФОСФАТ, ГИДРОКСИАПАТИТ, ФИБРОБЛАСТЫ, ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

Для заполнения костных дефектов в челюстно-лицевой хирургии, дентальной имплантологии и периодонтологии широко применяются остеотропные материалы [4,6,7,11].

Актуальным способом совершенствования современной стоматологической помощи является проведение экспериментального исследования материалов, применяемых в данной области, на клеточных культурах для обоснования использования их в клинической практике [10,11,13,19]. Данное изучение основано на том, что если то или иное вещество оказывает повреждающее действие в нескольких линиях культивируемых клеток, то следует ожидать неблагоприятного эффекта и при введении этого вещества целому организму, хотя и результаты, полученные на клеточных культурах, нельзя экстраполировать на целый организм [1,2,3].

Целью данной работы явилось клинико-экспериментальное обоснование выбора оптимальных остеозамещающих материалов в клинике дентальной имплантологии на основе оценки их влияния на пролиферацию фибробластов человека.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Изучалась реакция культуры клеток фибробластов человека на различные виды синтетического гидроксиапатита, при этом исследовалось время удвоения культуры клеток, использовался МТТ метод и проточная цитофлуориметрия.

### 1. Культура эмбриональных фибробластов человека

Для приготовления культур клеток использовали кожно-мышечную ткань 8 – 12-недельных эмбрионов человека. Измельченную ножницами ткань дезагрегировали 0,25%-ным раствором трипсина при 37°С в течение 30 мин. После удаления трипсина с помощью шприца осадок суспендировали в ростовой среде, включающей 90% среды ДМЕМ и 10 % эмбриональной сыворотки телят (ЭТС) с добавлением антибиотиков. Суспензию пропускали через капроновый фильтр (ячейка 0,3 x 0,3 мм). Концентрацию единичных фибробластов подсчитывали в камере Горяева. Агрегаты клеток и клетки, отличающиеся от фибробластов, при подсчете не учитывали. После подсчета в камере Горяева клетки высевали в пластиковые культуральные флаконы при посевной плотности 300 тысяч на 1 см<sup>2</sup> ростовой поверхности и культивировали в ростовой среде 5 – 7 дней при температуре 37 0С в условиях насыщающей влажности в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После образования монослоя клетки снимали смесью растворов 0,25% трипсина и 0,02% ЭДТА в отношении 1:1, суспендировали в ростовой среде ДМЕМ с добавлением 10 % ЭТС. Подсчитывали количество клеток и проводили тестирование влияния материалов на основе гидроксиапатита на состояние культивируемых in vitro фибробластов человека.

### 2. Материалы на основе гидроксиапатита

В эксперименте были использованы синтетические резорбируемые материалы для заполнения и реконструкции костных дефектов на основе фосфатов кальция: Nanos (Dr.lhde Dental AG (Швейцария)), NanoBone (Artoss GmbH (Германия)), BoneMedik-DM (Meta Biomed Co., Ltd (Корея)). В состав этих материалов входит нано-кристаллический гидроксиапатит находящийся в матрице из силикагеля (Таблица 1).

Название	Производитель	Распространитель	Примечания	Состав	Размеры гранул
NanoBone	Bego Implant Systems			76% гидроксиапатит(основа фосфата кальция),24% силикагеля(SiO <sub>2</sub> )	0.6*2, 1*2мм
Nanos	Dr.lhde Dental AG	Dr.lhde Dental AG		87% - нанокристаллическ фосфат кальция (60%ГА; 40% β-ТКФ), силикагель(SiO <sub>2</sub> )	NanoRG-0.6*4мм, Nanos FG-0.6*0.3мм
BoneMedik-DM	Meta Biomed Co.,Ltd	META BIOMED CO.LTD	из экзоскелета морских кораллов	60%- содержащий силикон гидроксиапатит и 40 % бета трикальций фосфат	1 мм - 4,0 мм

Таблица 1 – Материалы на основе синтетического гидроксиапатита

### 3. Оценка влияния гранул гидроксиапатита на состояние культуры фибробластов человека при визуальном наблюдении и подсчете пролиферативной активности фибробластов человека

Тестирование проводили в пластиковых культуральных чашках Sarsted (Германия). Опыты осуществляли методом прямого контакта, в стерильных условиях. В культуральные чашки высевали фибробласты и одновременно помещали исследуемый материал (45 мг на чашку), обильно смоченный средой DMEM + 10 % ЭТС. Контролем служили чашки Петри с культурой фибробластов в полной ростовой среде, но без тестируемого материала. Клетки в присутствии исследуемого материала культивировали в течение 3-х суток. С помощью инвертированного микроскопа ежедневно проводили визуальные наблюдения, фотографирование и оценивали морфологию исследуемых образцов: целостность монослоя, форму и размеры клеток.

Пролиферативную активность фибробластов человека оценивали по времени удвоения популяции – TD, которое рассчитывалось с использованием следующего уравнения:

$$TD = tp \cdot \log 2 / (\log Nt - \log N0),$$

где N0 – количество клеток в инокуляте (посеянных) во флакон, Nt – количество клеток, которое собрано и tp – время, в течение которого фибробласты культивировались [10].

### 4. Определение активности дегидрогеназ в фибробластах человека (МТТ-тест)

Для выявления цитотоксичности исследуемых материалов применялся МТТ-тест. Этот метод

позволяет с большой точностью и в короткие сроки определять количество жизнеспособных клеток. МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид) восстанавливается в митохондриях живых клеток под действием сукценатдегидрогеназы до водонерастворимого темноокрашенного формазана. Формазан может быть элюирован из клеток с помощью органических растворителей (изопропанол, ДМСО, ДМФА и т. д.). Показано, что оптическая плотность элюатов при длине волны 570 нм (максимум поглощения формазана) пропорциональна количеству жизнеспособных клеток в образце. Таким образом, этот метод позволяет по оптической плотности солюбилизованного красителя оценивать количество жизнеспособных клеток в исследуемом образце [5, 14, 16].

Активность дегидрогеназ определяли по модифицированному методу Хольст-Хансена [14, 16]. К 0,5 мл клеточной суспензии в ростовой среде DMEM вносили 0,1 мл раствора 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) в концентрации 10 мг/мл и инкубировали при 37°C в условиях насыщающей влажности в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 4-х часов. После инкубации суспензию центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, после чего культуральную среду удаляли и клетки однократно промывали раствором PBS, осадок ресуспендировали в 1,2 мл диметилсульфоксида и измеряли через 30-60 мин оптическую плотность D при длинах волн 570 и 630 нм на спектрофотометре SOLAR (РБ).

### 5. Прижизненное окрашивание клеток флуоресцеиндиацетатом и бромистым этидием

Влияние различных гидроксиапатитов

на жизнеспособность фибробластов человека анализировали методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре "FACSCanto II" (Becton Dickson, США) с использованием флуоресцеин диацетата (FDA) и пропидиум иодида (PI). Использование FDA и PI позволило охарактеризовать популяцию клеток по количеству жизнеспособных клеток, претерпевающих апоптоз и находящихся в состоянии некротической гибели [12,17].

Данный метод основан на том, что гидрофобный и нефлуоресцирующий FDA проникает в жизнеспособные клетки, где подвергается гидролизу с образованием обладающего интенсивной флуоресценцией флуоресцеина (клетки с высокой интенсивностью флуоресценции FDA относят к жизнеспособным), PI флуорохромирует ДНК клеток с нарушенной проницаемостью клеточных мембран и не проникает внутрь жизнеспособных клеток (клетки с высокой интенсивностью флуоресценции PI относят к некротическим). Клетки, демонстрирующие низкую интенсивность флуоресценции как FDA, так и PI, находятся в состоянии апоптоза.

Перед измерением клетки переводили в суспензию, отфильтровывали от гранул через капроновый фильтр с ячейкой 0,3 x 0,3 мм и инкубировали в течение 15 мин в присутствии 1 мкг/мл, флуоресцеин диацетата в темноте при 37 0С. Флуоресценцию регистрировали в канале FITC (530/30 нм, возбуждение 488 нм).

Пропидиум иодид (10 мкг/мл) добавляли в суспензии клеток за 3 минуты до измерения, флуоресценцию клеток регистрировали в канале PerCP-Cy5-5-A (675/30 нм, возбуждение 488 нм). Для определения негативного контроля вначале измеряли интенсивность флуоресценции в каналах

FITC и PerCP-Cy5-5-A клеток без красителей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Определение пролиферативной активности фибробластов человека

Опыты осуществляли методом прямого контакта: в стерильных условиях. В культуральные чашки высевали фибробласты и одновременно помещали исследуемый материал (45 мг на чашку), обильно смоченный средой ДМЕМ + 10 % ЭТС. Через сутки монослой как в контроле, так и в опыте был целостным и равномерным, фибробласты сохраняли обычную форму и размеры (рисунок 1,2,3,4,5). Наблюдение показало, что клетки обладали хорошей адгезией ко дну культуральной чашки. Вблизи глыбок исследуемого вещества направление роста и плотности монослоя клеток визуально не изменялось (Таблица 2).

### 6. Таблица 2- определение пролиферативной активности фибробластов человека

Название материала	3-й день, кл/мл	Время удвоения, ч
Контроль	5.4*10 <sup>5</sup>	52.8
Nanos	5.2*10 <sup>5</sup>	55.5
NanoBone	5.2*10 <sup>5</sup>	55.5
BoneMedik-DM	5.7*10 <sup>5</sup>	57



Рисунок 1 – Фибробласты контрольной группы, 1 день после посева

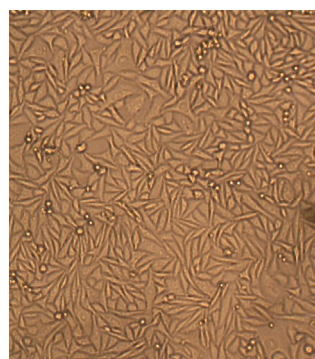


Рисунок 2 – Фибробласты контрольной группы, 3 день после посева



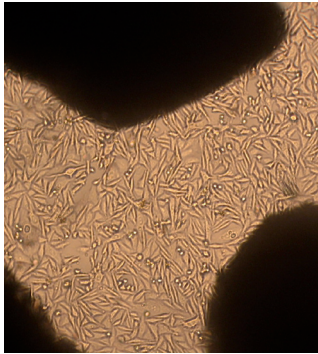


Рисунок 3 – Пролиферация фибробластов в присутствии остеотропного материала Nanos, 3 день после посева

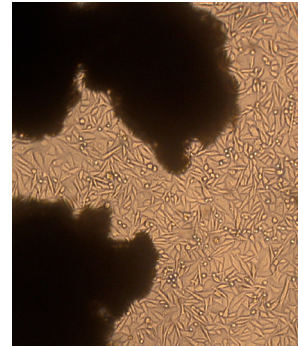


Рисунок 4 – Восстановление плотности монослоя в присутствии остеотропного материала NanoBone, 3 день после посева

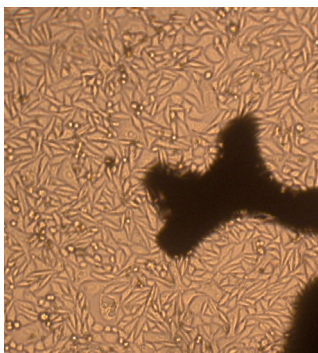


Рисунок 5 – Восстановление плотности монослоя в присутствии остеотропного материала BoneMedik-DM, 3 день после посева

При анализе визуальных и количественных характеристик, подсчете времени удвоения культуры фибробластов при исследовании остеопластических материалов на основе синтетического гидроксиапатита не регистрировалось повреждающего действия на клетки, не было стимуляции пролиферации (рисунок 2,3,4,5,6).

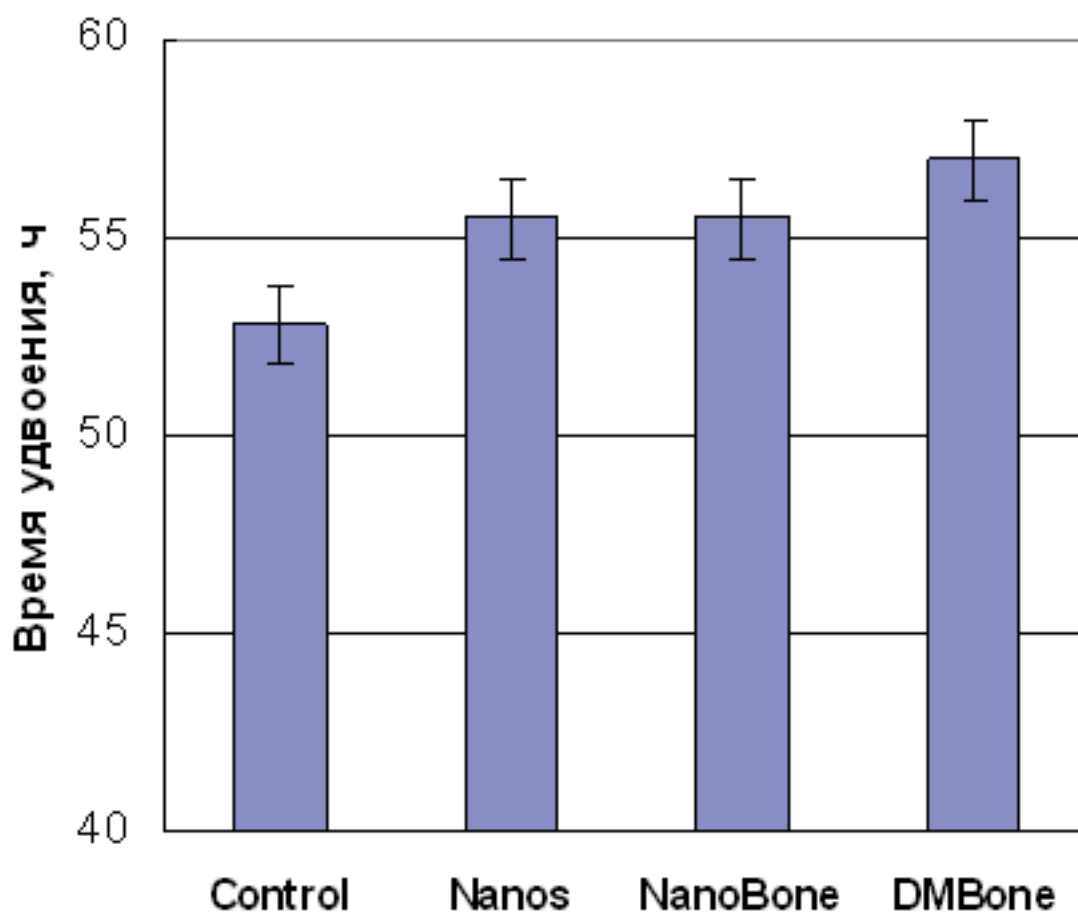


Рисунок 6 – Время удвоения популяции фибробластов

## 2. Оценка цитотоксичности образцов с помощью МТТ-теста

На основании calorиметрического определения активности в клетках митохондриальной сукцинат дегидрогеназы (которая расщепляет желтую соль тетразолия с образованием пурпурных кристаллов формазана) были получены количественные данные о их жизнеспособности и пролиферации.

Для сопоставления экспериментальных значений оптической плотности с количеством клеток на образцах была построена калибровочная кривая. На основании проведения результатов МТТ-теста был построен график зависимости количества клеток от оптической плотности элюата (рисунок 7,8).

Из рисунка 7 видно, что данные о жизнеспособности и пролиферации образцов 1,2 (Nanos, NanoBone) максимально приближены к данным, полученным в контроле. Изучаемые материалы не обладают острой цитотоксичностью, не препятствуют пролиферации фибробластов.

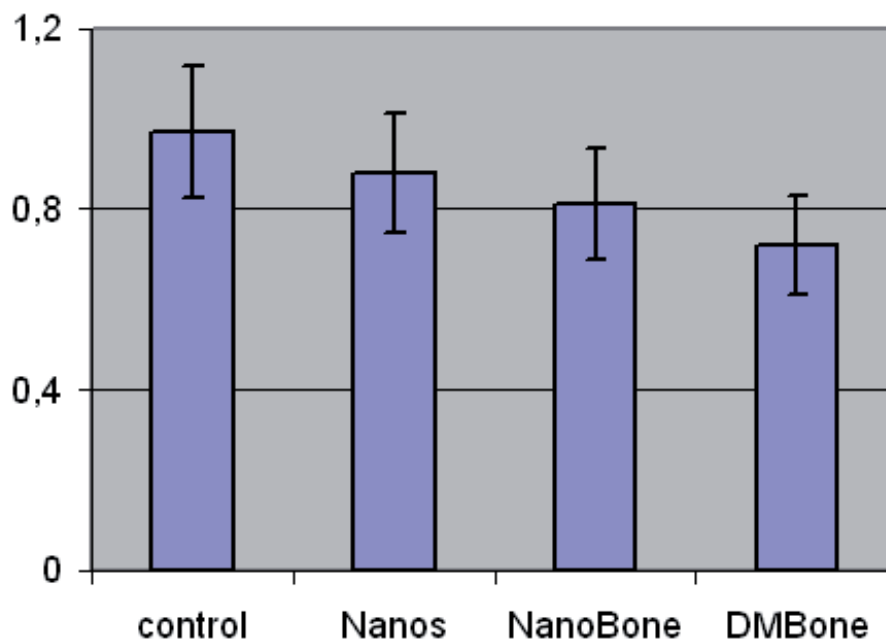


Рисунок 7 – Определение активности дегидрогеназ (МТТ-тест) в фибробластах человека

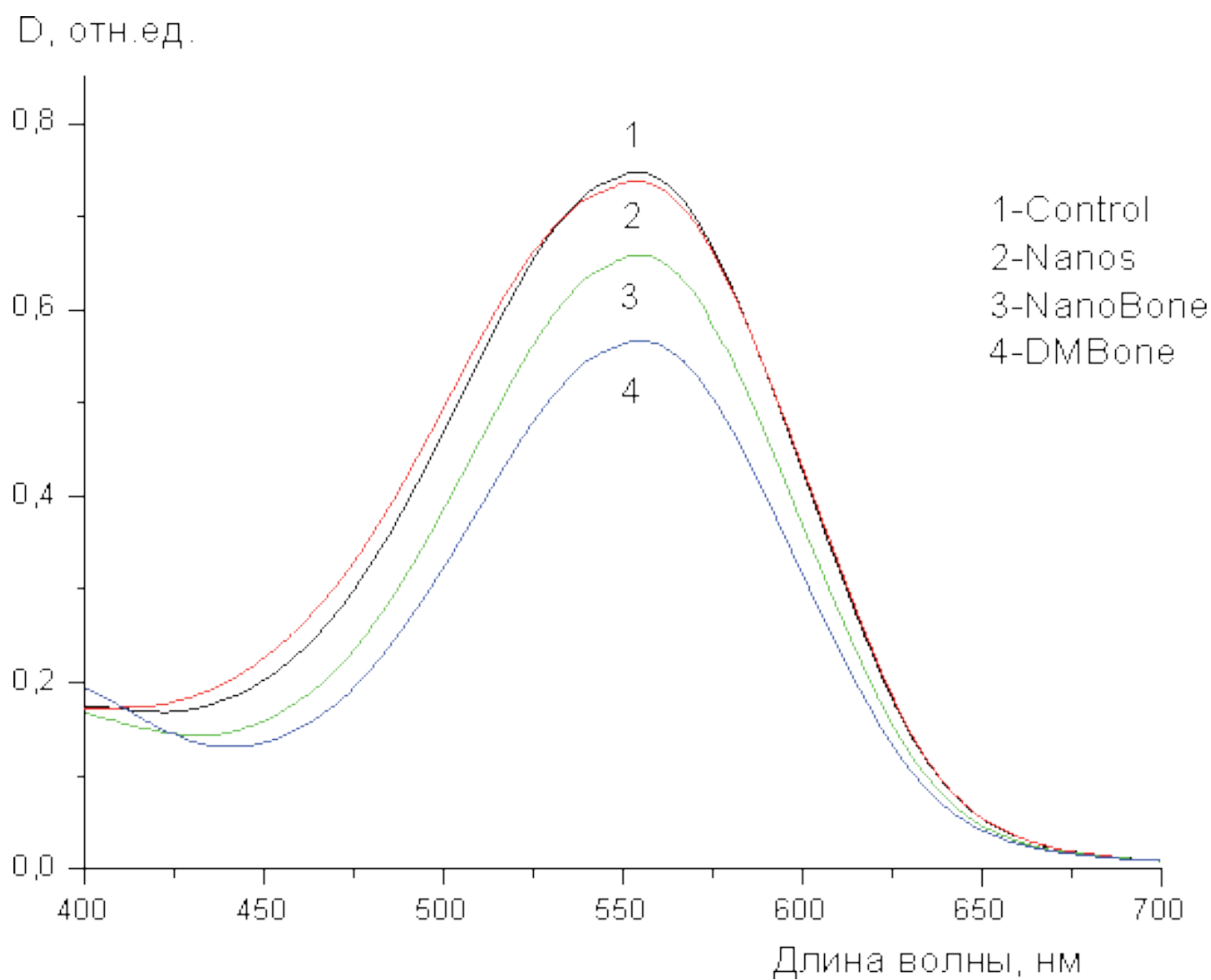


Рисунок 8 – Относительная оптическая плотностей элюата для каждого образца

## 1. Проточная цитофлуориметрия

Для характеристики жизнеспособности клеток определяли процент клеток, находящихся в квадрант Q4 (положительные по FDA и отрицательные по PI), квадранте Q1 (отрицательные по FDA и положительные по PI), квадранте Q3 (отрицательные по FDA и PI), на двойной диаграмме интенсивности флуоресценции в канале FITC и PerCP-Cy5-5-A [12,17].

Анализ диаграммы прямого-бокового рассеивания фибробластов показал, что в данной суспензии клеток имеется одна основная популяция и несмотря на некоторую гетерогенность в суспензии нельзя выделить другие субпопуляции, четко различающиеся по данным параметрам. Гейтирование основной популяции фибробластов, показывает, что она включает более 90% от общего количества клеток (рисунок.9).

На двумерной диаграмме интенсивности флуоресценции FITC/PerCP-Cy5-5-A контрольные клетки, инкубированные с FDA и PI, располагаются преимущественно в квадранте Q4, т.е. характеризуются высокой интенсивностью флуоресценции FDA (рисунок 10). Некоторое количество клеток регистрируется в квадрантах Q1 и Q3. Статистический анализ показывает что FDA+/PI- клетки составляют около 97,5%, тогда как количество клеток FDA-/PI+ и FDA-/PI- - 2,0 и 0,5% соответственно. Следовательно исходная популяция фибробластов характеризуется высокой жизнеспособностью с низким содержанием некротических и апоптотических клеток (Таблица 3).

**Таблица 3 Статистические данные по количеству жизнеспособных, апоптотических и некротических клеток в суспензиях**

Фибробласты	Живые, %	апоптотические	некротические
Фибробласты (контроль)	97,0	0,7	2,3
Фибробласты+Nanos	97,1	0,7	2,1
Фибробласты+NanoBone	97,0	0,7	2,2
Фибробласты+DMBone	96,6	1,1	2,3
Контроль+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	88,3	11,7

Двумерные диаграммы прямого-бокового рассеивания и интенсивности флуоресценции FITC/PerCP-Cy5-5-A фибробластов, культивированных в среде с остеотропными материалами BoneMedik-DM, Nanos и NanoBone, практически идентичны с контрольными. Это позволяет предполагать, что присутствие в среде культивирования остеотропных материалов на основе гидроксиапатита (BoneMedik-DM, Nanos и NanoBone) не оказывают достоверного влияния на жизнеспособность фибробластов. Это предположение подтверждается представленными в таблице данными статистического анализа по количеству жизнеспособных, апоптотических и некротических клеток в суспензиях.

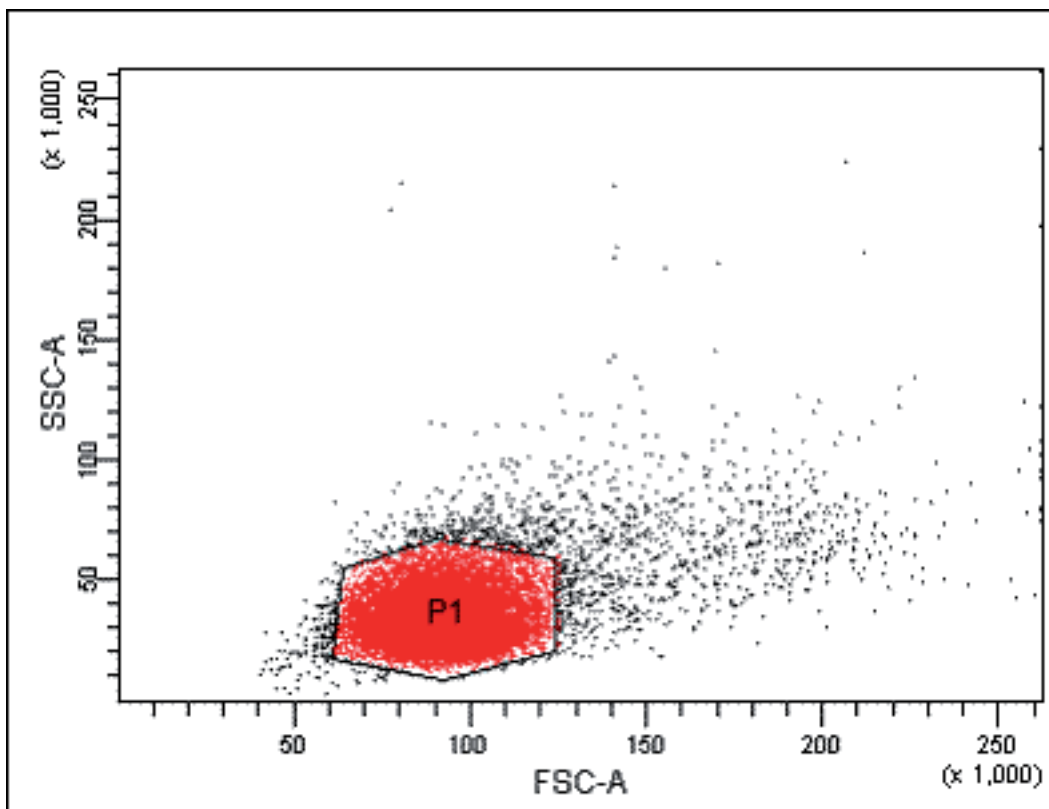


Рисунок 9 Диаграмма прямого-бокового рассеивания фибробластов

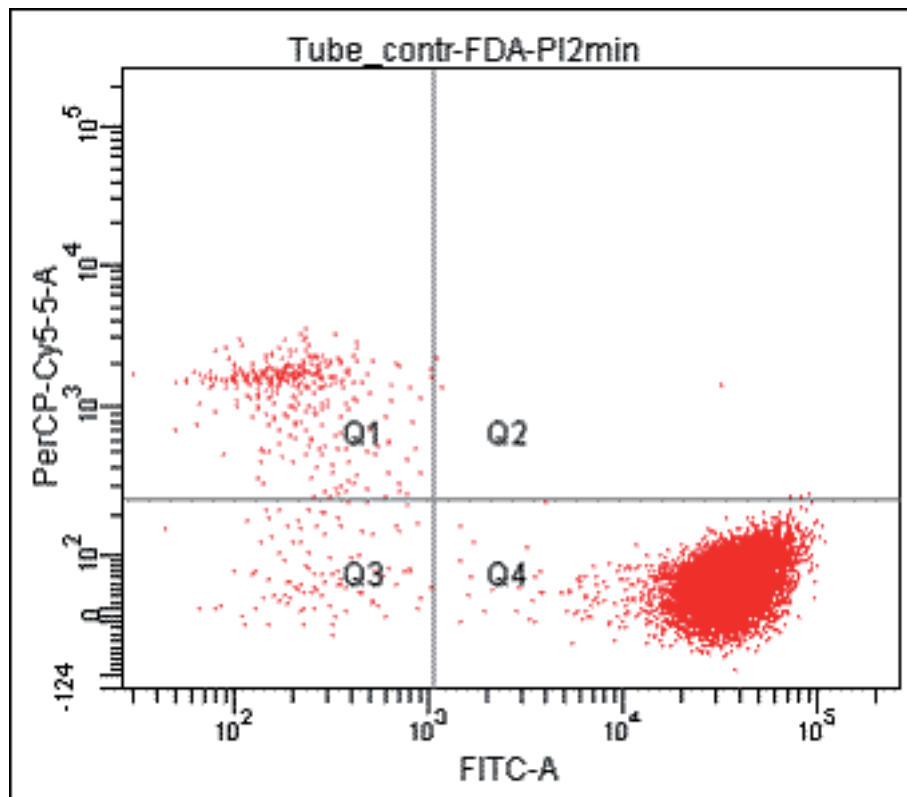


Рисунок 10 Диаграммы интенсивности флуоресценции фибробластов в каналах FITC и PerCP-Cy5-5-A после инкубации с FDA и PI

Фибробласты, подвергнутые окислительному воздействию перекиси (1 мл 30 мин) имеют существенно отличающиеся от контрольных клеток двумерные диаграммы прямого-бокового рассеивания и интенсивности флуоресценции FITC/PerCP-Cy5-5-A.

Одновременно на диаграмме интенсивности флуоресценции FITC/PerCP-Cy5-5-A, фибробластов, подвергнутых воздействию перекиси, регистрируется полное отсутствие клеток в квадранте Q4, тогда как в квадрантах Q1 и Q3 количество клеток резко увеличивается (рисунок.11). После инкубации фибробластов с перекисью в течение 30 мин количество апоптотических клеток составляет около 92%, некротических – 8%.

Потеря жизнеспособности фибробластов при действии перекиси вначале реализуется посредством развития апоптоза, в дальнейшем часть апоптотических клеток претерпевают некротическую гибель, вероятно, вследствие чрезмерной окислительной нагрузки. Эти данные указывают также на высокую чувствительность

метода проточной цитофлуориметрии с использованием FDA и PI при оценке жизнеспособности фибробластов.

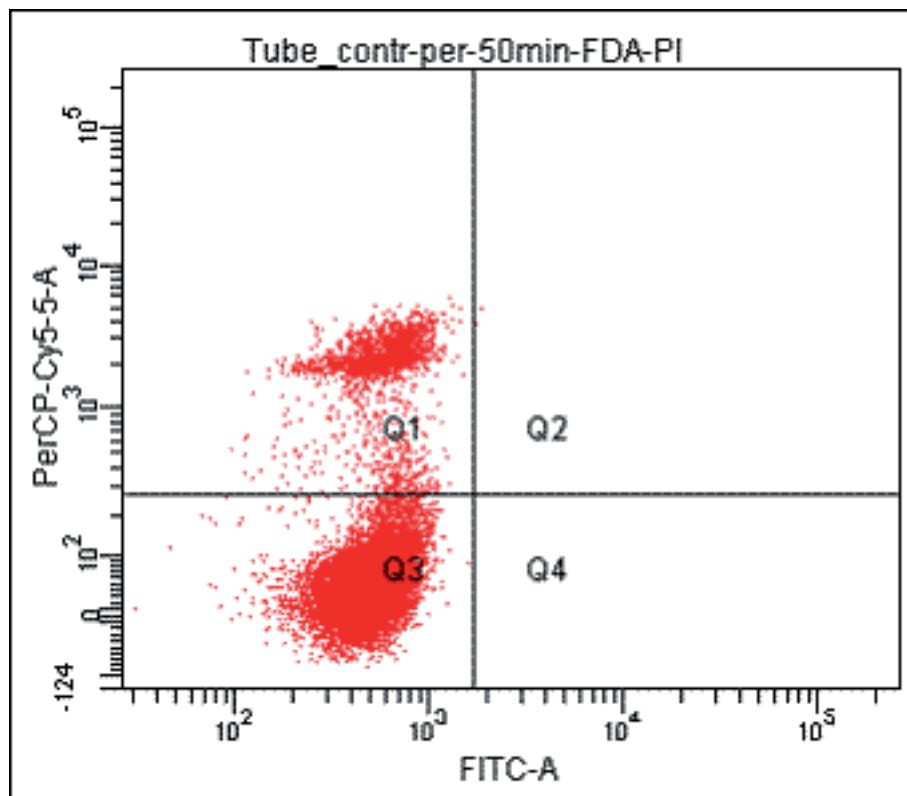


Рисунок 11 Диаграммы интенсивности флуоресценции подвергнутых воздействию перекиси фибробластов, в каналах FITC и PerCP-Cy5-5-A после инкубации с FDA и PI



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эксперименте была изучена реакция клеточной культуры фибробластов на различные остеотропные материалы на основе синтетического гидроксиапатита.

Примененная методология исследования на культурах клеток – ее принципы, методы и модели, позволили *in vitro* проводить комплексную оценку материалов на цитотоксичность, биосовместимость и их влияние на пролиферативную активность и основную синтезирующую функцию клеток.

По результатам изучения динамики роста культуры фибробластов, оценки активности их внутриклеточных дегидрогеназ, прижизненного флуорохромирования клеток флуоресцеин диацетатом и пропидиум иодидом установлено, что присутствие в среде культивирования остеотропных материалов на основе гидроксиапатита (BoneMedik-DM, Nanos и NanoBone) не оказывает достоверного влияния на жизнеспособность фибробластов.

Использование принципа параллельного исследования клеточных культур с помощью морфологических, биохимических методов позволило установить инертный характер биологического эффекта синтетического гидроксиапатита. Под влиянием изучаемых материалов на основе ГА не регистрировалось значимое повреждающее действие на клетки, не было стимуляции пролиферации.

Таким образом, проведенное исследование, в рамках которого изучена пролиферация фибробластов человека на образцах современных

остеотропных материалов, позволяет сделать вывод об отсутствии у них цитотоксических свойств.

## Список используемых источников

1. Воловая, Л.Т. Результаты тестирования синтетического и аллогенного гидроксипатита на культурах клеток / Л.Т. Воловая, А.А. Долгалёв, С.З. Хубаев, А.С. Школин // Пародонтология. – 2006. – №4 (41). – С. 60-65.
2. Грудянов, А.И. Лабораторное исследование активности фибробластов в сочетании с различными видами подсадочных материалов *in vitro* / А. И. Грудянов, А. И. Ерохин, Л. Л. Миронова, О. И. Конюшко // Цитология. — 2001. – №9. — С.854.
3. Долгалев, А.А. Обоснование дифференцированного применения имплантационных материалов в стоматологии: автореф. дис. на соискание ученой степени. канд. мед. наук: 14.00.21 / А.А. Долгалев; Сам гос мед ун-т. – М., 2009. – 28 с.
4. Коэн, Э. Атлас косметической и реконструктивной пародонтологической хирургии / Э. Коэн – Москва: Издательский дом «Азбука», 2004. – 416 с.
5. Макаренков, А.С. Изучение вариабельности интенсивности метаболизма МТТ в культуре клеток при оценке пролиферации и гибели клеток с помощью МТТ-теста / А.С. Макаренков, С.М. Терехов, Е.А. Калашникова, Т.Д. Смирнова // Цитология. — 2003. – №9. — 899 с.
6. Островский, А. Остеогенные материалы в современной пародонтологии и имплантологии. / А. Островский // Dent-Inform. – 2001. – №8. – С. 22-30.
7. Пищинский, И.А. Средства для оптимизации остеогенеза в стоматологии: область применения, актуальность проблемы и перспективы разработок и внедрения новых препаратов / И.А. Пищинский // Средства для оптимизации остеогенеза [Электронный ресурс]. – 2004. – Режим доступа : [http://www.bsmu.by/index.php?option=com\\_content&view=article](http://www.bsmu.by/index.php?option=com_content&view=article). Html. – Дата доступа : 02.02.2010
8. Сергеева, Н.С. Исследование динамики роста фибробластов человека *in vitro* на пористых наноструктурированных гранулах из кальций-фосфатных материалов / Н.С. Сергеева, И.К. Свиридова, В.И. Путляев, Т.В. Сафронова, М.А. Шехирев, А.А. Степук, В.А. Кирсанова, С.А. Ахмедова // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2008, – №4, – С. 74-78.
9. Татаренко-Козмина, Т.Ю. Влияние гидроксипатита в составе биостабильных композитов на заселение и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток / Т.Ю. Татаренко-Козмина, Ю.И. Денисов-Никольский, А.И. Воложин, А.А. Докторов, Н.Н. Мальгинов, А.П. Краснов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – №2, – С. 83-87
10. Фрешни, Р. Культура животных клеток. Методы / Р. Фрешни // - М.:«Мир», 1989 – 333с
11. Цогоев, В.К. Обоснование использования биорезорбируемых средств при непосредственной и ранней отсроченной дентальной имплантации : диссертация ... канд. мед. наук : 14.00.21

/ В. К. Цогоев; ФГУ „Центральный научно-исследовательский институт стоматологии“. – Москва, 2007. – 136 с.

12. Bartkowiak, D. Comparative Analysis of Apoptosis in HL60 Detected by Annexin-V and Fluorescein-Diacetate / D. Bartkowiak, S. Hogner, H. Baust, W. Nothdurft, E.M. Rottinger // *Cytometry*.- 1999.- V.37. – P.191–196.

13. Guha, A.K. Mesenchymal cell response to nanosized biphasic calcium phosphate composites / A.K. Guha , S. Singh , R. Kumaresan , S. Nayar , A. Sinha // *Colloids And Surfaces*. – 2009. – Vol. 1, № 86. – P. 146-151.

14. Holst-Hansen, C. MMT-cell proliferation assay / C. Holst-Hansen, N. Bruner // *Cell Biollgy. A Laboratory Handbook*. □ 1998. □ Vol. 1. □ P.16-18.

15. Hott, M. Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite / M. Hott, B. Noel, B.A. Didier, C. Rey, P.J. Marie // *J Biomed Mater Res*. – 1997. – Vol. 37. – P. 508–516.

16. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay / T. Mosmann // *J of Immunological Methods*. □ 1983. □ V.65. □ P.55-63.

17. Ross, D. D. Estimation of Cell Survival by Flow Cytometric Quantification of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide Viable Cell Number / D.D. Ross, C.C. Joneckis, J.V. Ordonez, A.M. Sisk, R.K. Wu, A.W. Hamburger, R.E. Nora // *CANCER RESEARCH*. – 1989.- V.49. – P.3776-3782.

18. Studzinski, G.P. Cell Growth, Differentiation and Senescence. A Practical Approach / G. P. Studzinski // Oxford University Press, USA. – 1999. –P.307

19. Xie, J. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression / J. Xie, M.J. Baumann, L.R. McCabe // *J Biomed Mater Res A*. – 2004. – V.71. – P.108-117.

20. Xu, J.L. Protein expression profiles in osteoblasts in response to differentially shaped hydroxyapatite nanoparticles / J.L. Xu, K.A. Khor , J.J. Sui , J.H. Zhang , W.N. Chen // *Biomaterials* . – 2009. – Vol. 30.



## EDUCATIONAL VIDEO SERIES

### Maxillary Implant Placement

1 CRESTAL & BASAL IMPLANTS  
Order Nr. 6667

2 AND REPLACING REPLACE®  
Order Nr. 6669

Each DVD contains approx. 20 minutes of oral surgery. With explanations in english and german language.

€ 35,00

Please send your order via e-mail to:  
[publishing@implantfoundation.org](mailto:publishing@implantfoundation.org)  
[www.implantfoundation.org](http://www.implantfoundation.org)

or via regular postage mail to:  
**International Implant Foundation**  
Leopoldstr. 116, DE-80802 München

## Guide for Authors

ID publishes articles, which contain information, that will improve the quality of life, the treatment outcome, and the affordability of treatments.

The following types of papers are published in the journal:

Full length articles (maximum length abstract 250 words, total 2000 words, references 25, no limit on tables and figures).  
Short communications including all case reports (maximum length abstract 150 words, total 600 words, references 10, figures or tables 3)  
Technical notes (no abstract, no introduction or discussion, 500 words, references 5, figures or tables 3).  
Interesting cases/lessons learned (2 figures or tables, legend 100 words, maximum 2 references).

Literature Research and Review articles are usually commissioned.

Critical appraisals on existing literature are welcome.

Direct submissions to:

[publishing@implantfoundation.org](mailto:publishing@implantfoundation.org).

The text body (headline, abstract, keywords, article, conclusion), tables and figures should be submitted as separate documents.

Each submission has to be accompanied by a cover letter. The cover letter must mention the names, addresses, e-mails of all authors and explain, why and how the content of the article will contribute to the improvement of the quality of life of patients.