

Rat Tibiasında Oluşturulan Defektlerde Demineralize Kemik Tozunun ve Trombositten Zengin Plazmanın Osteogenezis Üzerine Etkilerinin Histolojik Olarak Araştırılması

HISTOLOGICAL RESEARCH FOR DEMINERALIZE BONE GRAFT AND PLATELET RICH PLASMA'S EFFECTS OF BONE OSTEOGENESIS IN RAT TIBIAL DEFECT

Dr.Dt. Zozan Erdoğan¹, Doç.Dr. Selver Özekinci², Prof.Dr. Belgin Gülsün³

1. Sağlık Bakanlığı, Diyarbakır Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi, Diyarbakır
2. Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır
3. Dicle Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Diyarbakır

ÖZET:

Yüz ve çene defektlerinin etyolojisinde; enfeksiyöz, inflamatuvar, kistik ve neoplastik nedenlerle ortaya çıkan patolojik durumlar, travma ve konjenital deformiteler sayılabilir. Oral ve maksillofasiyal cerrahide, tedavi amacıyla yapılan müdahalelerin sonunda da fiziksel yaralanmalar meydana gelebilir. Yıllardan beri çeşitli araştırmacılar, oluşan kemik defektlerinin onarımında yeni kemik yapımını stimüle edebilecek nitelikte olan greftler ve biyomateryaller üzerinde çalışmaktadırlar. Bu amaçla yaptığımız deneysel araştırmada, demineralize kemik tozu ve trombositten zengin plazma kullanılarak, bu materyallerin kemik defektindeki etkilerinin histolojik olarak araştırılması hedeflendi.

Ratların tibiasında 10 mm uzunluğunda 3 mm derinliğinde ve 2 mm genişliğinde kemik defektleri oluşturuldu. Denekler 3 gruba ayrıldı ve ilk gruptaki deneysel defektlere demineralize kemik grefti (n:12), ikinci gruptaki defektlere demineralize kemik grefti ve trombositten zengin plazma uygulanırken (n:12), üçüncü gruptaki defektler ise (n:3) boş bırakılarak kontrol grubu olarak klasifiye edilmiştir. Deneklerin tamamı 2., 8. ve 12. hafta sonunda sakrifiye edildi.

Histolojik değerlendirmede, gruplar arasında osteoblastik aktivite, osteogenezis ve maturasyon kriterleri dikkate alınarak elde edilen sonuçlara göre, erken dönemde (2. haftada) tüm gruplarda osteoblastik aktivitenin tam olarak başlamadığı, geç dönemde ise (8. ve 12.haftada) yeni kemik oluşumunun, gerek greft gerekse greft+TZP uygulanan her iki çalışma grubunda da gerçekleştiği saptanmıştır. Ancak Greft+TZP grubundaki kemik onarımının ise tamamlanarak, sadece greft uygulanan gruba kıyasla daha ideal bir osteogenezisin meydana geldiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik Defekti, Demineralize Kemik Tozu, Trombositten Zengin Plazma, Osteogenesis

SUMMARY

Pathological conditions (that caused by infectious, inflammatory, cystic and neoplastic lesion), trauma and congenital deformities are common factors of facial and jaw defect's etiology. In oral and maxillofacial surgery, physical injuries can occur during the surgical procedure. For many years, various researchers have been worked on new bone grafts and biomaterials that stimulate bone healing in bone defect. To prevent adverse events and to provide faster regeneration experimental and clinical studies have been still done by using graft materials. In this experimental study, we aimed to histologically research the effects of demineralized bone graft and platelet rich plasma on bone defects. In this study, using 31 Wistar-Albino female rats, bone defects were formed in the tibia of the rats at a length of 10 mm and a depth of 3 mm and a width of 2 mm. Rats divided into 3 groups and were applied to experimental defects in the first group demineralized bone graft (n: 12), were applied to the defects in the second group demineralized bone grafts and platelet rich plasma (n: 12), in the third group defects were left empty and were classified as control group (n:3). At the end of the 2th, 8th and 12th week, all of the rats were sacrificed.

In histologic evaluation between the groups according to the results obtained by considering osteoblastic activity, osteogenesis and maturation criteria, in all groups at an early stage (2th week) osteoblastic activity did not completely start and late stage (8th and 12th week) bone formation was observed in both study groups (both grafts and grafts + TZP). However, it has been observed that osteogenesis in the Graft + TZP group is more ideal than only in the graft group.

Keywords: Bone Defect, Demineralized Bone Graft, Platelet Rich Plasma, Osteogenesis

Giriş

İletişim Adresi

Dr.Dt.Zozan ERDOĞMUŞ
Sağlık Bakanlığı, Diyarbakır Ağız ve Diş Sağlığı
Merkezi, Diyarbakır

e-mail: zozan_erdogmus@hotmail.com

Demineralize kemik matriksi (DKM) türevleri yaygın olarak kemik defektlerinin onarımında kullanılırlar. Laurencin ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmalarında, kemik greftlerini sınıflandırırken

demineralize kemik tozunu allogreft esaslı kemik materyalleri olarak tanımlamışlar (1).

Demineralize kemik matriksinin, kemik defektlerinde etkinliğini gösteren pek çok deneysel çalışma bulunmaktadır (2-6). Demineralize kemik matriksinin %93'ü kollajenden oluşur ve %5 oranında ise kollajen dışı proteinler içerir (7-9). Bu kemik matriksinin osteoindüktif olmasının yanısıra, yapısındaki kollajen sayesinde osteokondüktif özelliği de vardır (10,11). Ayrıca DKM' nin kemik yapıcı özelliğinden 'kemik morfojenik proteinler (KMP)' sorumludur ve içerisinde 2'den 16'ya kadar olan birçok KMP bulunur. Kemik morfojenik proteinler, mezenkimal kök hücrelerin (MKH) ortama kemoatraksiyonunu artırarak, kemik yapıcı hücreler yönünde farklılaşmalarını sağlarlar. Ayrıca kemik morfojenik protein-2, -4 ve -7'nin kemik oluşumundaki etkisi bilinmekle beraber, özellikle terminal osteoblastik ön hücrelere dönüşümünde KMP-2, -6 ve -9'un önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (12-15).

Trombositlerin hemostaz sürecindeki etkin fonksiyonlarının çok önceden bilinmesine karşın, yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin anlaşılması ise yakın zamanlarda anlaşılmıştır. Dolaşımdaki trombositler aktive olmaları durumunda, alfa granülleri içerisinde bulunan çok sayıdaki büyüme faktörünü ortama salmaktadırlar. Yüksek yoğunlukta trombositin trombin ile aktive edilmesi, mitojenik faktörler yönünden zengin bir plazma elde edilebilmesini sağlamaktadır ki, bu son ürün "trombositten zengin plazma (TZP)" olarak adlandırılmıştır (16,17).

TZP, ilk olarak Whitman ve arkadaşları tarafından 1997'de osseointegre titanyum implantlar ile yapılan maksillofasiyal rekonstrüksiyon ameliyatlarında kullanılmıştır (18). Daha sonra Marx ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları karşılaştırmalı bir çalışmada, mandibular defekt rekonstrüksiyonu için kullandıkları kansellöz kemik greftleri üzerine TZP uygulamışlar ve TZP' nin kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri olduğunu tespit etmişlerdir (19).

Bizim bu deneysel çalışmadaki amacımız, kemik augmentasyonlarında greft uygulamalarının yanısıra, son dönemde popüler olan trombositten zengin plazma kullanarak ideal ve istenilen boyutta yeni kemik oluşturmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız deneysel olarak gerçekleştirilmiş olup, ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, 31 adet dişi rat tibiaları kullanılmıştır. 31 adet ratın 4'ü trombositten zengin plazma elde edilmesinde kullanılmış olup, geriye kalan ratlar ise 3 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar;

- Grup: Sadece demineralize kemik tozu uygulanan grup (12 adet rat)
- Grup: Demineralize kemik tozu ve trombositten zengin plazma kombinasyonu uygulanan grup (12 adet rat)
- Grup: Kontrol grubu (3 adet rat) olarak sınıflandırılmıştır.

Ayrıca çalışmamız multidisipliner bir çalışma olup, farklı bölümlerin ve araştırma

merkezlerinin katkılarıyla objektif olarak şekillendirilmiştir. Öncelikle Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DÜSAM), operasyon yapılan günde implante edilecek TZP hazırlandı. TZP hazırlamak için ayrılan ratlardan 4' ünün anestezisi, Xylazine HCl 5mg/kg (Alfazyne®) ve Ketamin HCl 35mg/kg (Alfamine®) kombinasyonu ile intramusküler olarak sağlandı. Anestezi sağlandıktan sonra, ratın tüm kanı intrakardiyak olarak enjektörle çekilip sodyum sitrat tüplerine boşaltıldı. Tüpteki bu kanlar daha sonra Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında 2400 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Bu yöntemle TZP ve TFP' nin (trombositten fakir plazma), kırmızı kan hücre fraksiyonlarından ayrılarak en üstte toplanması sağlandı. TZP ve TFP başka tüpe alınıp, bunları birbirinden ayırmak için tekrar 15 dakika 3600 rpm'de santrifüj edildi ve konsantrasyonu artırılmış TZP elde edildi.

Daha sonra ratların sağ arka bacağının iç yüzünde, tibiaya paralel midline insizyon yapılarak yumuşak doku ve periost eleve edildi. Tibiada fizyodispenser kullanılarak 10 mm uzunluğunda, 3 mm derinliğinde ve 2 mm genişliğinde kemik defekti oluşturuldu. 1.gruptaki ratların tibiasında oluşturulan deneysel defekte yalnızca demineralize kemik tozu, 2. gruptakilere demineralize kemik tozu ve trombositten zengin plazma kombinasyonu uygulanmış ve 3. grup yani kontrol grubundaki defektler ise boş bırakılmıştır. Daha sonra cilt altı dokular 6/0 vikril suture, cilt ise 5/0 ipek suture kullanılarak kapatıldı. Olası enfeksiyondan korunmak için her ratın gluteal kasına

operasyondan hemen sonra tek doz antibiyotik (gentamisin 0.05ml/kg) enjeksiyonu yapıldı.

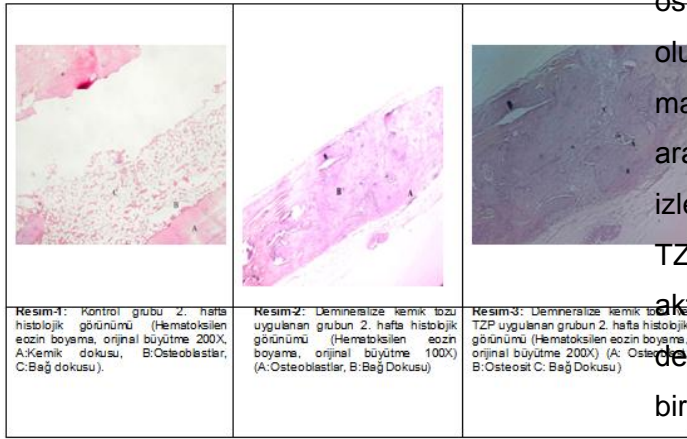
Deney hayvanları 2., 8., ve 12. haftalarda sakrifiye edilerek, elde edilen spesmenlerin histolojik incelemeleri yapıldı. Dokular, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında hemotoksilin-eosin boyama sistemi ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

BULGULAR

Elde edilen spesmenlerin histolojik değerlendirmelerinde, gruplar osteoblastik aktivite, osteogenezis, maturasyon, enflamasyon ve biouyumluluk kriterleri dikkate alınarak değerlendirilmiş ve 2., 8. ve 12. haftalardaki yeni kemik oluşumu incelenerek gruplar arasında kıyaslamalar yapılmıştır.

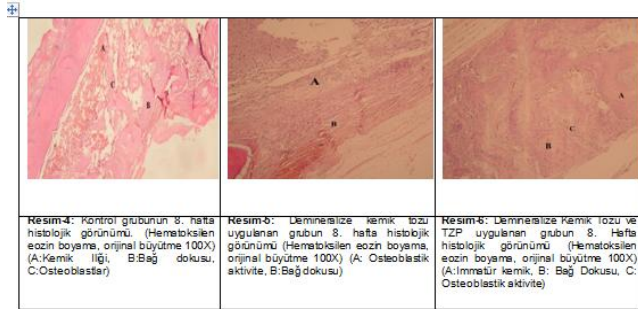
2. HAFTA BULGULARI

Kontrol grubunda defekt alanı içerisinde bağ dokusu varlığı saptanmış olup, herhangi bir enfeksiyon bulgusuna rastlanılmamıştır (Resim-1). Sadece demineralize kemik tozu uygulanan grupta defektin tabanında osteosit yoğunluğu gözlemlendi. Bölgede bağ dokusu artışı ve az miktarda enflamasyon izlendi ve osteoblastik aktivitenin ise henüz başlamadığı gözlemlendi (Resim-2). Kemik tozu ve TZP uygulanan defektlerde ise, belirgin bir bağ dokusu ve osteoblast yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir. Bölgede hafif miktarda enflamasyon varlığı saptanmış, ancak herhangi bir yabancı cisim reaksiyonuna rastlanılmamıştır (Resim-3).



8. HAFTA BULGULARI

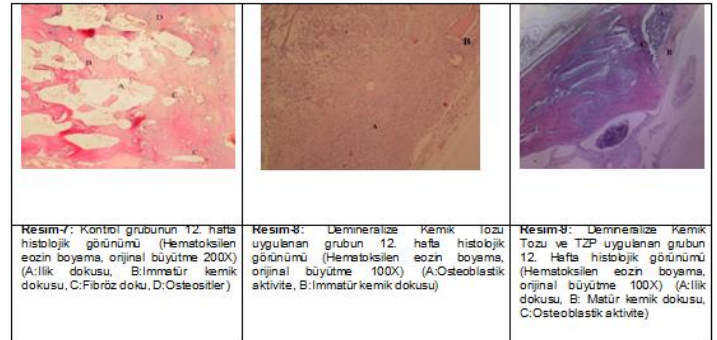
Kontrol grubunda bölgede vasküler yapılardan zengin bağ dokusu ve kemik iliği oluşumu tespit edildi (Resim-4). Greft grubunda osteoblastik aktivitenin başladığı ve greft materyalinin etrafını bağ dokusunun çevrelediği izlendi (Resim-5). Demineralize Kemik Tozu ve TZP uygulanan grupta ise, osteogenezisin iyiye yakın derecede olduğu, yeni oluşan kemiğin ise poröz yapılarla temas kurduğu gözlemlendi. Bölgede hafif bir yabancı cisim reaksiyonuna da rastlanmıştır (Resim-6).



12. HAFTA BULGULARI

Kontrol grubunda osteoblastik aktivitenin devam ettiği ve immatür kemik oluşumunun başladığı gözlemlendi. İyileşme alanında fibröz doku büyümesine rastlanılmıştır (Resim-7). Greft grubunda ise 12. haftada defekt bölgesinde,

osteoblastik aktivitenin ve yeni kemik oluşumunun geliştiği görüldü. Greft materyallerinin birbirleriyle ve kemik korteksi ile aralarında fiziksel ataçmanın meydana geldiği izlendi (Resim-8). Demineralize kemik tozu ve TZP uygulanan grupta ise, osteoblastik aktivitenin devam ettiği ve yeni osteoid yapının defekti doldurduğu gözlemlendi. Greft maddelerinin birbirleriyle ve korteksle iyi-mükemmel derecede ataçman sağladığı, bağ dokusunun giderek azaldığı ve defekt onarımının tamamlandığı gözlemlendi. Her iki çalışma grubunda da, herhangi bir yabancı cisim reaksiyonu ile karşılaşılmazken, greftin biyouyumluluğunun iyi olduğu izlendi (Resim-9).



TARTIŞMA

Demineralize kemik matriksi (DKM) uzun yıllardır kraniofasiyal defektler, uzun kemik defektleri, eklem cerrahisi, tümör cerrahisi ve spinal füzyon cerrahisinde kullanılan osteoindüktif bir materyaldir (20). Mezenkimal kök hücrelerin ortama çağrılmasını uyarak, kemik yapıcı hücreler yönünde farklılaşmalarını ve çoğalmalarını sağlarlar, böylece kırık iyileşmesi ve kemiğin yeniden şekillendirilmesinde etkilidirler (21-23).

Yapılan literatür araştırmaların DKM'i ile ilgili pek çok araştırma mevcuttur. Tiedeman ve arkadaşları (1991), köpeklerde deneysel olarak oluşturdukları kaynaşmamış tibia fraktürlerinde DKM'ini kullanmışlardır. Postoperatif 12 hafta sonra yapılan histolojik değerlendirmede; bol miktarda kartilaj, izole kalsifiye kartilaj bölgeleri, endokondral ossifikasyon ile yeni kemik formasyonu tespit edilmiştir. Boş bırakılan kontrol grubunda ise, minimal yeni kemik formasyonu ile fibröz doku gözlenmiştir (24).

Yamamoto ve arkadaşları (1993), erkek Wistar ratların premaksillalarında oluşturdukları kritik boyuttaki defektleri 7 mg'lık DKM ile doldurmuşlar ve kontrol grubundaki defektleri ise boş bırakmışlardır. Çalışmanın sonunda, greftlenmemiş grubun fibröz doku ile iyileştiği ve periferde az miktarda kemik formasyonunun olduğu, DKM ile greftlenen grupta ise 35 günde ossöz köprü ile yeni kemik dokusunun olduğunu bildirmişlerdir (25).

Clokier ve arkadaşlarının çalışmalarında (2002), demineralize kemik matriksi kritik boyuttaki kranial kemik defektinde 6. hafta sonunda belirgin oranda kemikleşmenin ve kemik iliği oluşumunun gerçekleştiği, 12. hafta sonunda ise büyük oranda kemik onarımının tamamlandığı ve 6. haftaya göre matür kemik ve kemik iliği alanlarının belirgin oranda artmış olduğu gözlenmiştir. Araştırma sonucunda yeni kemik dokusu oluşum oranının 6. hafta sonunda % 88, 12. hafta sonunda ise % 95 oranında olduğu rapor edilmiştir (26).

Colnot ve ark.'nın çalışmasında da (2003), kritik boyuttaki kemik defektine demineralize kemik matriksi uygulandığında, bu defektin

kontrol grubuna göre iki kat daha hızlı şekilde yeni kemik ile dolduğu rapor edilmiştir (27).

Ayrıca, Breitbart (1998) ve Kuznetsov (2001) isimli araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda demineralize kemik matriksi ile yeni kemik oluşumunun iyileşmenin inflamatuvar fazında başladığı saptanmış ve osteoblastların bu kadar erken dönemde aktive olmaları, çevre dokulardan osteoprogenitör kök hücrelerin erken dönemde bölgeye gelmeleri ile açıklanmıştır (28,29).

Bizim çalışmamızda ise, DKM'li gruplarda herhangi bir yabancı cisim reaksiyonu ve enfeksiyon varlığı tespit edilmemiştir. Çalışmamızda erken dönem (2. hafta) incelemelerde, DKM uygulanan gruplarda elde ettiğimiz sonuçların, kontrol grubuna kıyasla kemik iyileşmesi yönünden belirgin bir farklılık göstermediği saptanmıştır. Ancak geç dönem incelemelerde (8. ve 12. haftalarda) demineralize kemik matriksi yerleştirilen defekt alanlarında belirgin oranda matür ve yer yer kemik iliği alanları içeren yeni kemik dokusunun olduğunu saptadık. Bu histolojik sonuçlarımızın; literatür taramalarında araştırmacıların elde ettiği sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Oral ve maksillofasiyal cerrahide araştırmacılar, sürekli olarak kemik greftleme tekniklerini geliştirmek, daha hızlı ve daha yoğun bir kemik rejenerasyonu elde etmek için çalışmaktadırlar. TZP de, bu amaçla yara iyileşmesini ve rejenerasyonu arttırmak için baş boyun cerrahisi, oral ve maksillofasiyal cerrahide yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (30).

Wilson ve arkadaşları (2006), yeni Zelanda tavşanları üzerinde yaptıkları deneysel bir çalışmada, oluşturdukları defektlere TZP ve biyomateryal yerleştirmişlerdir. 12. haftanın sonunda kontrol grubu ile biyomateryal konulmuş olan grupta kısmi bir kemikleşme olduğunu, TZP grubunda ise anlamlı derecede daha fazla bir kemik dokusu oluşumu gözlemlediklerini ve TZP'nin kemik yapımını indüklediğini bildirmişlerdir (31).

Pryor ve arkadaşları (2005), ratlarda deneysel olarak açılan defektlerin birinde TZP ile absorbe olabilen kollajen sponjeli, diğer defekte de kollajen sponjeli tek başına kullanarak çalışma yapmışlardır. 4. ve 8. haftalarda inceleme sonucunda TZP'nin tek başına kullanımında osteogenezis üzerinde olumlu etkilerini görememişlerdir (32).

Froum ve ark.'nın 2002 yılında yayınladıkları çalışmalarında bilateral sinüs augmentasyonu ihtiyacı olan 3 hasta, inorganik sıgır kemiği kullanılarak tedavi edilmiş ve test grubunda greft ile TZP karıştırılmıştır. Yapılan histomorfometrik analiz sonucunda, grefte TZP eklemenin ne yeni kemik üretiminde ne de kemik ile kullanılan test implantları arasındaki temasta olumlu bir fark yaratmadığı belirlenmiştir. Araştırmacı, küçük periodontal defektlerde TZP'nin etkili olabileceği düşünülse de, greft içinde otojen kemik bulunmadığında veya defekt büyük hacimli olduğunda TZP'nin istenen stimülatör etkiyi gösteremeyeceğini ileri sürmüştür. Bunun nedeni bu stimülasyonun gerçekleşebilmesi için, greft içinde canlı kemik hücrelerinin bulunmasının gerekliliği ile açıklanmıştır (33).

Kim ve arkadaşları köpeklerde yaptıkları deneysel çalışmada (2002), demineralize kemik tozunu tek başına ve TZP ile birlikte uygulayarak, dental implantların osseointegrasyonunu histomorfometrik olarak incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda tedavi edilmeyen kontrol grubuna ve sadece demineralize kemik tozu ile tedavi edilen gruba oranla, demineralize kemik tozu ve TZP uygulamasının implant çevresindeki defekt bölgesinde daha fazla kemik oluştuğunu saptamışlardır (34).

Yine Mazor ve arkadaşları (2004), 105 hastada maksiller sinüs tabanı yükseltilmesi ve aynı zamanda implant uygulamasını içeren klinik çalışmalarında otojen ve ksenojen greft materyali ile karıştırarak kullandıkları TZP'nin kemik oluşumunda iyileşme süresini kısalttığını, greft uygulamasını kolaylaştırdığını ve yumuşak doku iyileşmesini de hızlandığını bildirmişlerdir (35).

Jensen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2004), 8 köpeğin humerusunda oluşturulan defektler TZP, dondurulmuş kurutulmuş kemik grefti (FDBA), FDBA+TZP ile rekonstrükte edilmiş ve dental implantlar yerleştirilmiştir. Bu araştırma sonucunda, TZP'nin greft uygulanan ya da uygulanmayan implantlarda kemik oluşumunda farklı bir etki göstermediği rapor edilmiştir (36). İlgenli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da (2006), 22 hastada 28 kemik içi defekti, dondurulmuş kurutulmuş demineralize kemik allogrefti (DFDBA)+TZP ve sadece TZP ile doldurulmuştur. Araştırmacılar 18 aylık radyografik ve klinik takip sonrası, DFDBA+TZP karışımının daha iyi sonuç

verdiğini rapor etmişlerdir (37). Kassolis ve arkadaşları ise (2000), sinüs elevasyonu ve/veya alveoler kret augmentasyonu için dondurulmuş-kurutulmuş kemik allogreftleri (DKKA) ve TZP kombinasyonu ile tedavi edilen 15 hastanın sonuçlarını sundukları olgu serisinde, sinüs yükseltilmesi ve kret augmentasyonunda DKKA ve TZP karışımının implant yerleştirilmesinden önce kullanılabilecek alternatif bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (38).

SONUÇ

Yaptığımız bu deneysel çalışmada kemik grefti ile greft+TZP uyguladığımız grupları, yeni kemik oluşumu açısından kıyaslayarak, TZP'nin osteogenezisteki etkisini araştırdık. Histolojik sonuçlarımıza göre, erken dönemde (2. haftada) tüm gruplarda osteoblastik aktivitenin tam olarak başlamadığı görülmüştür. Ancak geç dönemde (8. ve 12.haftada) osteogenezisin her iki grupta da başladığı, fakat greft+TZP grubunda kemik onarımının tamamlanarak daha ideal olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlarımız kontrol grubuna kıyasla, iki grup arasında erken dönemde belirgin bir histolojik farklılığın olmadığı, geç dönemde ise iyileşme süresinin artışına paralel olarak TZP uygulanan grupta daha ideal bir osteogenezisin meydana geldiği ve istenilen kemik onarımın gerçekleştiği yönünde yorumlanmıştır.

Teşekkür

Yaptığımız bu deneysel çalışma 10-DH-102 proje nosu ile Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF: Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* J.;2006;3(1): 49-57.
2. Bolander ME, Balian G. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *Bone Joint Surg Am.*1986; 68: 1264-74.
3. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am.* 1984;66: 274-79.
4. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, Wu L, McAllister P, Lee YP, Kabo JM, Finerman GA, Berk AJ, Witte ON. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81: 905-17.
5. Moghadam HG, Sandor GK, Holmes HH, Clokie CM. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62: 202-13.
6. Oakes DA, Lee CC, Lieberman JR. An evaluation of human demineralized bone matrices in a rat femoral defect model. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;413: 281-90.
7. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg.* 2005;16: 981-989.
8. Hollinger JO, Mark DE, Goco P, Quigley N, Desverreux RW, Bach DE: A comparison of four particulate bone derivatives. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1991;267: 255- 63.
9. Hornicek FJ, Woll JE, Kasprisin D. American Association of Tissue Banks In: *Standards for Tissue Banking*, ed. McLean, VA.10th, 2002.
- 10- Davy DT. Biomechanical issues in bone transplantation. *Orthop Clin North Am.* 1999;30(4):553-63.
- 11- Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965;150: 893-99.
- 12- .Izawa H, Hachiya Y, Kawai T, Muramatsu K, Narita Y, Ban N, Yoshizawa H. The effect heat-treated human bone morphogenetic protein on clinical implantation. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;390: 252-58.
- 13- . Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 83-A Suppl 2001;1: 1-6.
- 14- . Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 367 Suppl: 1999;95-106.

- 15- .Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A(8): 1544-52.
- 16- . Carlson NE, Roach RB. Platelet – Rich Plasma: Clinical Applications in Dentistry. *JADA.* 2002;133: 1383– 86.
- 17- Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet–Rich Plasma Enhances Human Osteoblast – Like cell Proliferation and Differentiation. *J.Oral Maxillofac. Surg.* 2005; 63: 362– 69.
- 18- Whitman DH, Berry RL, Green DM, Platelet gel, an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55(11), 1294-99.
- 19- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma, growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*1998;85(6), 638-46.
- 20- Takikawa S, Bauer TW, Kambic H, Togawa D. Comparative evaluation of the osteoinductivity of two formulations of human demineralized bone matrix. *J Biomed Mater Res A.*2003; 65:37-42.
- 21- Reddi AH, Anderson WA. Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. *J Cell Biol.*1976; 69(3): 557-72.
- 22- Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrowderived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest.* 1995;95: 881-87.
- 23- Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;355 Suppl: S66-S72.
- 24- Tiedeman JJ, Connolly JF, Strates BS, et al. Treatment of Nonunion by Percutaneous Injection of Bone Marrow and Demineralized Bone Matrix. *Clinical Orthopaedics and Related Research,* 1991;268: 294-302.
- 25- Yamamoto TT, Kawakami M, Sakuda M. Defects of the Rat Premaxilla as a Model of Alveolar Clefts for Testing Bone-Inductive Agents. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 51:887- 91.
- 26- Clokie CM, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GK. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg.* 2002;13: 111-21.
- 27- Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development.* 2003;130: 4123-33.
- 28- Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101: 567-74.
- 29- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001;153: 1133-40.
- 30- Raghoebar GM, Schortinghuis J, Liem RSB, Ruben JL, Van Der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodelling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin. Oral Impl. Res.* 2005;16,349-56.
- 31- Wilson EMK, Barbieri CH, Mazzer N. Bone healing stimulation by platelet-rich autogenous plasma, *Acta Ortop. Bras.*2006;14(4), 208-12.
- 32- Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, Safadi FF, Wikesjö UM. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol.* 2005;32(9): 966-72.
- 33- Froum SJ, Wallace SS, Tanow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2002;22: 45-53.
- 34- Kim SG, Kim WK, Park JC, Kim HJ. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-driven bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60:1018-25.
- 35- Mazor Z, Peleg M, Garg AK, Luboshitz J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement :patient series study. *Implant Dent.* 2004;13:65-72.
- 36- Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Sraballe K. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allografts enhancement of implant fixation an experimental study in dogs. *Journal of Orthopaedic Research.* 2004;22: 653–58.
- 37- Ilgenli T, Dündar N, Kal BI. Demineralized freeze-dried bone allograft and platelet-rich plasma vs platelet-rich plasma alone in infrabony defects:a clinical and radiographic evaluation. *Clin Oral Invest.* 2007;11: 51-9.
- 38- Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizingplatelet rich plasma in combination with freeze-dired bone allograft: Case series. *J. Periodontol.* 2000;71: 1654- 61.