



Kemik Defektlerinin Onarımında Kollajenize At Kemik Greftinin Tek Başına ve Trombositten Zengin Plazma (Prp) Uygulaması ile Birlikte Kullanımının Histopatolojik ve Tomografik (Micro-Ct) Değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma*

Demet GÖKDERE^{1a}, Nazmi ATASOY^{2b}✉

1. Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Şarkikaraağaç Meslek Yüksekokulu, Isparta, TÜRKİYE.
2. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0002-8504-4226^a, 0000-0002-2274-5383^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
08.11.2020	13.02.2021	26.04.2021

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Gökdere D, Atasoy N: Kemik Defektlerinin Onarımında Kollajenize At Kemik Greftinin Tek Başına ve Trombositten Zengin Plazma (Prp) Uygulaması İle Birlikte Kullanımının Histopatolojik ve Tomografik (Micro-Ct) Değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 16(1): 8-15, 2021. DOI: 10.17094/ataunivbd.823175

Öz: Bu çalışmada; kollajenize at kemik greftinin PRP ile birlikte, kaviter kemik defektlerinin onarımında etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Kaviter kemik defektleri tavşan femur kondillerinde oluşturuldu. Femur kondillerinden birine, birinci grup (n=16), yalnızca kollajenize at kemik grefti, diğer ikinci gruba (n=16) kollajenize at kemik grefti ve bir hafta sonra kavite bölgesine 0.5 cc PRP uygulandı. Üçüncü ve altıncı hafta sonunda defekt bölgesinin tomografik ve histopatolojik incelenmesi yapılarak analiz edildi. Radyolojik incelemede defektin kaviter defekt olması nedeniyle belirgin bir radyolojik fark saptanmadı. Histopatolojik incelemelerde yeni kemik oluşumu açısından kollajenize at kemik grefti ve PRP uygulanan grupta yalnızca kollajenize at kemik grefti uygulanan gruptan daha yüksek değerler bulunmuştur ve bu değerlerin istatistiksel (P<0.05) olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Tomografik incelemelerde ise greft inkorporasyonu ve kemik oluşum kalitesi açısından kollajenize at kemik grefti ve PRP grubunda, kollajenize at kemik grefti grubuna göre daha yüksek değerler elde edilmiştir (P<0.05). Çalışmada kollajenize at kemik greftinin kullanılmasıyla; kemik protein ekstraktının osteoindüktif özellikleri ile ilgili bildirilmiş önceki yayınlar ile uyumlu bulgular gözlenmiş, ayrıca at kemik greftinin PRP ile birlikte kullanılması protokolünün, kaviter kemik defektlerinin onarımında, uygulanması ile de hem kemik oluşum kalitesi bakımından hem de onarım süresi açısından olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: At kemik grefti, Büyüme faktörleri, Kemik defekti, Osteogenezis, Trombositten zengin plazma

Histopathological and Tomographic (micro-CT) Evaluation of Collagenated Horse Bone Graft Alone and in Combination with Platelet Rich Plasma (PRP) Treatment in Reparation of Bone Defects: Experimental Study

Abstract: In this study it is aimed to evaluate the effectiveness of the collagenized horse bone graft with PRP on the treatment of cavitory bone defects. Cavitory bone defects were created on the condyle of the femur. For one of the condyle, only collagenized horse bone graft was applied (first group n=16), and for the other condyle, one week later following application of collagenized horse bone graft, 0.5 cc PRP was also administered (second group n=16). At the end of the third and sixth week, the tomographic and histopathologic evaluations were performed on the defect areas. In the histopathologic evaluations, higher values were determined in the second group in the aspect of new bone formation, and these values were statically significant (P<0.05). In the tomographic assessments, higher values were obtained in the second group in the aspect of incorporation of the graft and bone formation quality (P<0.05). By the usage of collagenized horse bone graft, similar findings were obtained with earlier publications that report osteoinductive properties of bone protein extracts, and favorable outcomes were achieved by combined usage of horse bone graft with PRP considering the bone formation quality and repair time.

Keywords: Bone defect, Growth factors, Horse bone graft, Osteogenesis, Platelet rich plasma.

✉ Nazmi Atasoy

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.

e-posta: nzmatsy@gmail.com

* Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi BAPB tarafından TYL-2016-5120 nolu proje olarak desteklenmiş ve birinci isim yazarın aynı isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

GİRİŞ

Bilindiği üzere kemik onarımında optimal yöntem ve greft materyali seçilmediğinde kemiğin doğal yapısı sağlanamaz ve sonuçta iyileşmede istenilmeyen fibröz doku şekillendiği görülür (1,2). Kemik onarımında otojen greft kullanımında, altın standart olarak bilinmekle birlikte, ikinci bir operasyon sahasının oluşması, iyileşme süresinin uzaması gibi bazı olumsuzluklarla da karşılaşılabilir (3).

Kemik kaybının onarımı ve yeni kemik oluşumunun sağlanması amacıyla, kemik protein ekstraktları (KPE) (4-9) ve trombosit zengin plazma (PRP) ve trombosit zengin fibrin (PRF) gibi otojen materyaller üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (10-16). Atlarda taşınabilen spongiform ensefalopatinin (TSE) görülmemesi (17) ve sığır kemik protein ekstraktı (SKPE) gibi bünyesinde kollajen tip I, osteoindüktif büyüme faktörleri ve diğer kollajen olmayan büyüme faktörlerini içermesi nedeniyle, at kemik protein ekstraktı (AKPE) na sığır kemiğine göre tercih edilebilir özellik kazandırmış ve bu nedenlerle de kemik onarımlarında kullanılmaya başlanmıştır (4,18-22).

Kandan çok daha fazla trombosit sahip PRP uygulanmasıyla, büyüme faktörlerinin yoğun olarak bölgede bulunması sağlanarak yara iyileşmesi ve rejenerasyonu hızlandırılmaktadır (10,15). Bu nedenle PRP'nin kemik onarımında kemik greftleri ile birlikte ya da tek başına kullanılması ile kemik onarımını hızlandırdığından dolayı, kısa sürede popüler olmuştur. Buna rağmen radyolojik, histopatolojik ve tomografik sonuçları ile ilgili yayınlar sınırlı sayıdadır.

Kemiğin formasyonu, iyileşmesi ve olgunlaşmasını sağlamak amacıyla, uygulanan kemik greftinin yeni kemiğe dönüşmesini, doku iyileşmesini ve olgunlaşmasını stimüle edecek maddelerin, greft materyaline eklenmesi ile daha başarılı sonuçlar elde edilebilir fikrinden hareketle; bu çalışmada, kemik defektlerinin onarımında, heterogreft materyal

olarak hazırlanan hidrojel formunda AKPE'nin tek başına ve PRP ile birlikte kullanılmasının etkilerinin histopatolojik ve tomografik (micro-CT) olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

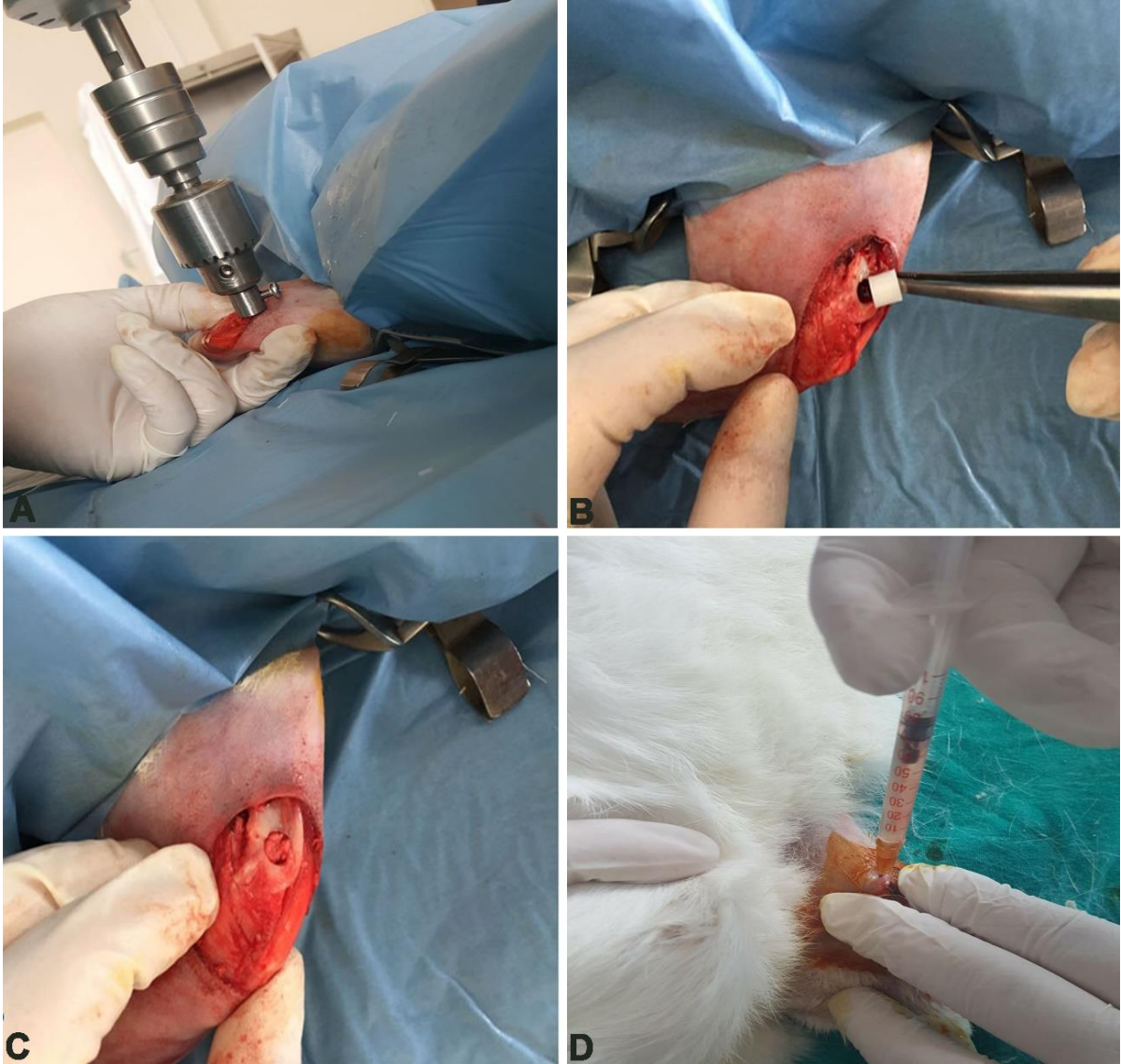
Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu (Protokol No:2016-03) kararı ve denetimi altında, 2.5-3 kg ağırlığında 16 adet erkek New Zealand ırkı tavşanda yapıldı.

At kemik grefti, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi anabilim dalında kadavra olarak kullanılmak üzere yüksek doz anestezi uygulaması sonrası ötenazi edilen yerli ırk 250-300 kg ağırlığında atın femur ve tibialarından hazırlandı. Elde edilen at kemik kollajeni kullanıncaya kadar %70 lik alkol içerisinde muhafaza edildi.

Trombosit zengin plazmanın (PRP), uygulama yapılacak olan her bir tavşanın kulak venasından alınan kanlardan hazırlandı (10).

Tavşanlarda, intramusküler ketamin 35 mg/kg ve xylazine 5 mg/kg ile genel anestezi sağlandı. Şirurjikal anestezi oluştuktan anterior eklem yüzeyinden 4 mm posteriorda, distal eklem yüzeyinden 6 mm proksimalde olacak şekilde, distal femur metafizinde 6 mm çapında, 10 mm derinliğinde defekt oluşturuldu. Ardından tüm femur defektlerine kollajenize at kemik grefti yerleştirildi (Şekil 1 A, B, C). Bu işlemden 7 gün sonra deneklerin defektlerinden bir tanesine 0.5 ml PRP tedavisi uygulandı (Şekil 1 D).

Postoperatif 21. günde deneklerden 8 tanesi, 6. hafta sonunda ise diğer 8 tanesi yüksek dozda intravenöz ketamin uygulaması ile sakrifiye edildi. Her bir denegin femur kondilleri çıkarılıp %10 formaldehide konuldu, daha sonra sırasıyla tomografik, histopatolojik incelemeye tabi tutuldu ve bulgular istatistiki olarak değerlendirildi.



Şekil 1. Distal femur metafizinde defekt oluşturma (A), At kemik greft materyalinin implantasyonu (B, C), İmplantasyon alanına PRP uygulanması (D).

Figure 1. Creating a defect in the distal femur metaphysis (A), Implantation of horse bone graft material (B, C) PRP application in the implantation area (D).

Histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan kemik dokuları dekalsifiye edildikten sonra doku takibi yapıldı. Hematoksilen Eosin ile boyanıp ışık mikroskobu (Olympus BX51) ile incelendi. Ossifikasyon, gelişimine göre; çıkar çatışması olmayan iki patoloj tarafından hafif (+), orta (++) ve ileri (+++) düzeyde olmak üzere değerlendirildi.

Micro-CT değerlendirmesi amacıyla alınan kemik numuneler İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezinde SkyScan 1172 micro-Ct cihazında 100 kV ve 100 mA güç ile 13.6 µm

kesit ile 0.40° açıyla 180° ye tamamlanana kadar döndürülerek 1 saat tarandı. Herbir numuneden elde edilen 1214 görüntü çıkar çatışması olmayan iki radyolog tarafından zayıf (+), orta (++) ve iyi (+++) olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada PRP uygulamasının zamandan, sürenin ise uygulamadan bağımsız etkileri, istatistiki olarak Wilcoxon k testi ve SPSS (ver:21) istatistik paket ile belirlendi.

BULGULAR

Perioperatif ve postoperatif dönemde tavşanlarda herhangi bir komplikasyonla karşılaşmadı. Aynı gün içerisinde rutin beslenmelerine devam eden deneklerin birinci günden sonra serbest bir şekilde mobilize oldukları gözlemlendi.

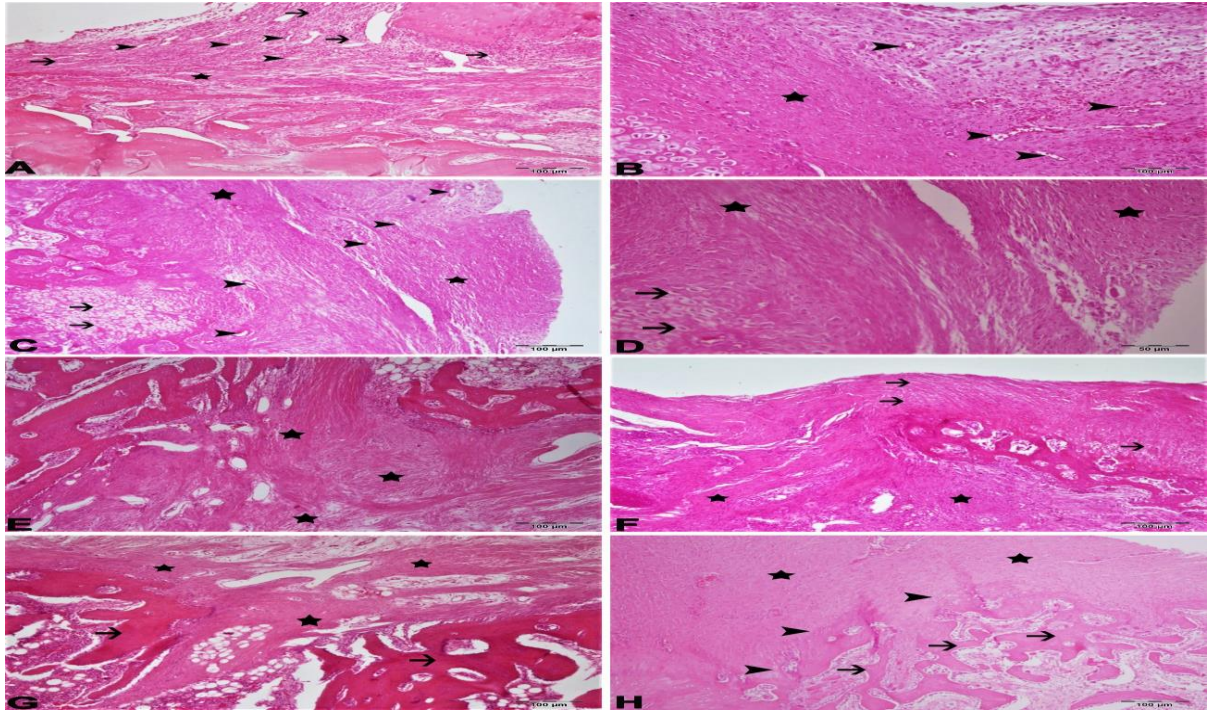
PRP uygulanmayan grupta 3. haftada, implant uygulanan bölgede yoğun bir anjiyogenesis, damarlarda hiperemi, mononükleer hücre infiltrasyonları ve genç fibroz doku şekillendiği tesbit edildi (Şekil 2 A-B).

PRP uygulanan grupta 3. haftada ise tavşanların kondiluslarının histopatolojik incelenmesinde, sıkı bir bağdoku oluşumu tespit edilirken, yangısal olayların

hafiflediği ve bu fibröz dokunun kondrositlere dönüştüğü geçici kallusun şekillenmeye başladığı görüldü (Şekil 2 C-D).

PRP uygulanmayan grupta 6. haftada, tavşanların kondiluslarının histopatolojik incelenmesinde, yoğun şekillenmiş olan fibröz kallusun kondrositlere dönüştüğü ve az sayıda kemik trabeküllerinin şekillendiği görüldü (Şekil 2 E-F).

PRP uygulanan grupta 6. haftada, tavşanların kondiluslarının histopatolojik incelenmesinde, fibröz dokunun önemli derecede azaldığı, geniş kemik trabeküllerinin şekillendiği, gerçek kallusun oluşmaya başladığı görüldü (Şekil 2 G-H). PRP uygulamasının belirgin bir şekilde iyileşme sürecini hızlandırdığı belirlendi.

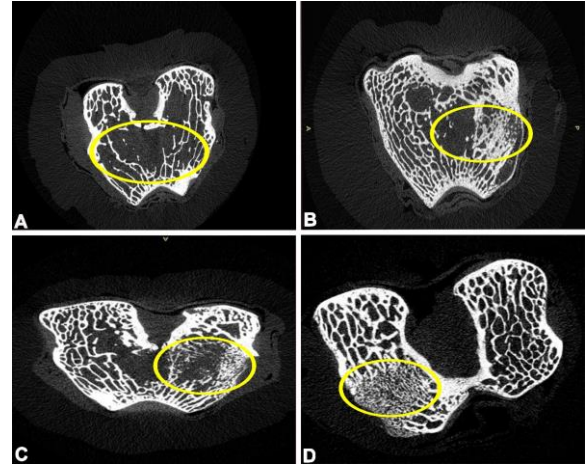


Şekil 2. 3. hafta PRP'siz grup, fibröz kallus (yıldız), mononükleer hücre infiltrasyonu, şiddetli anjiyogenesis (okbaşları) (A-B), 3. hafta PRP'li grup, şiddetli fibröz kallus (yıldız), anjiyogenesis (okbaşları), yangı bölgesinde fibröz dokunun kondrositlere dönüşümü (oklar) (C-D), 6. hafta PRP'siz grup, Olgun fibröz kallus (yıldızlar), geçici kallus oluşumu kondrositler (oklar), damarlarda hiperemi (E-F), 6 hafta PRP'li grup, geçici kallus dönüşüm kodrositler (okbaşları), yoğun kemik trabekülleri (oklar)(G-H), H&E, Bar:100µm.

Figure 2. Week 3, PRP-free group, fibrous callus (star), mononuclear cell infiltration, severe angiogenesis (arrowheads) (A-B), week 3 PRP group, severe fibrous callus (stars), angiogenesis (arrowheads), transformation of fibrous tissue into chondrocytes (arrows) in the inflammation area (C-D), week 6 PRP-free group, mature fibrous callus (stars), temporary callus formation, chondrocytes (arrows), hyperemia in the vessels (E-F), week 6 PRP group, temporary callus transformation coderocytes (arrowheads), dense bone trabeculae (arrows) (G-H), H&E, Bar: 100µm.

Mikro-CT değerlendirmelerinde, trabeküllerin şekillenmesine göre yapılan incelemede 3. haftada PRP uygulanmayan gruptaki trabeküllerin oluşması (Şekil 3 A), 3. haftada PRP uygulanan gruptaki trabeküllerin oluşumu (Şekil 3 B), 6. haftadaki PRP uygulanmayan gruptan daha fazla olarak görüldü (Şekil 3 C). Altıncı haftada PRP uygulanan grupta yoğun trabekül oluşumu ile defektin kemik doku ile tamamen kapandığı saptandı (Şekil 3 D).

Micro CT ve histopatolojik skorlar Tablo 1 de verilmektedir. Tablo 1 de de görüldüğü gibi zamandan bağımsız olarak PRP uygulamasının kemikte matur düzenli trabeküler yapıyı önemli derecede ($P<0.05$) arttırdığı saptandı. Benzer şekilde PRP uygulamasının histopatolojik olarak kemik hücresel yapısını önemli derecede ($P<0.05$) organize ettiği de görüldü. Diğer taraftan PRP uygulamasından bağımsız olarak greft materyali kullanılan defektlerde de hızlı bir iyileşme olduğu belirlendi.



Şekil 3. 3. hafta PRP'siz grup eser miktarda trabekül oluşumu (A), 3. hafta PRP'li grup orta derecede trabekül oluşumu (B), 6. hafta PRP'siz grup orta derecede trabekül oluşumu (C), 6. hafta PRP'li grup yoğun trabekül oluşumu (D).

Figure 3. A small amount of trabecula formation in the PRP free group in the third week (A), week 3 PRP group, moderate trabecula formation (B), week 6 PRP free group, moderate trabecula formation (C), week 6 PRP group, intensive trabecula formation (D).

Tablo 1. Araştırmanın mikro-CT ve histopatoloji skorları.

Table 1. Micro-CT and histopathology scores of the study.

			PRP uygulanmayan					PRP uygulanan					*P
			Medyan	Ort.	Std.Sap.	Min.	Max.	Medyan	Ort.	Std.Sap.	Min.	Max.	
Mikro-CT	Hafta	3	1.00	1.14	.38	1	2	2.00	2.29	.49	2	3	.023
		6	2.00	2.00	.00	2	2	3.00	3.00	.00	3	3	.014
**p			.014					.025					
Histopatoloji	Hafta	3	1.00	1.00	.00	1	1	2.00	1.86	.38	1	2	.008
		6	2.00	1.71	.49	1	2	3.00	3.00	.00	3	3	.014
**p			.025					.011					

* PRP uygulamasının zamandan bağımsız etkisi

** Haftaların uygulamadan bağımsız etkisi

PRP, Platelet Rich Plasma; Micro CT, micro-Bilgisayarlı Tomografi

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kritik boyut kemik defekti (KBD) türlere ve bölgeye göre farklılık göstermek üzere hayat boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük kemik defekti olarak tanımlanır (23-25).

Yeni oluşan kemiğin artışı ve kalsifiye olmaya başlamasını görmek amacıyla dördüncü hafta ara değerlendirme dönemi, 8. hafta ise son değerlendirme dönemi olarak seçilmiştir (7,11,26). Bu çalışmada bulguların değerlendirilmesi üçüncü ve 6. haftada yapılmıştır.

Dokuya yerleştirilen biyomateryallerin büyük bir çoğunluğunun implantasyonu takiben 2-3 hafta içerisinde heterogreftlere bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilen yabancı cisim reaksiyonuna (27) neden olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda PRP uygulanan grupta yabancı cisim reaksiyonuna rastlanmazken, PRP uygulanmayan grupta bu reaksiyona hafif derecede üçüncü haftada rastlandı. Bu durumun PRP ile ortama sağlanan güçlü antiinflamatuvar etkiye sahip TGF- β 'dan (12) kaynaklandığı kanaatine varıldı.

Nienhuijs ve ark. 2009 (8) AKPE'nin osteoindüktif aktivitesinin yanında yoğun bağ dokusu

oluşumunun içerdiği yüksek orandaki tip I kollajenden kaynaklandığını vurgulamışlardır. Çalışmamızda kullanılan greftin yoğun bağ doku aktivitesine neden olmadığı saptandı. Çalışmanın her iki grubunda da hem 3., hem de 6. hafta mikro-CT ve histopatolojik bulgularında düzgün kemik doku oluşumu gözlemlendi.

Deproteinize sığır kemiğinin tamamen rezorbe olmadığı, reabsorpsiyon hızının ve mekanizmasının halen belirsiz olduğu belirtilmiştir (9). Çalışmamızda histopatolojik incelemelerde osteoklastik sürecin gözlenmemesi, apatit yığılımı oluşturacak bir greft materyali kullanılmamasına rağmen özellikle PRP uygulanan grupta yeni kemik oluşumunun 3. haftada iyi düzeyde 6. haftada ise ileri düzeyde olduğunun saptanması ayrıca gerft materyalinin makul bir süre sonra tespit edilmemesi, üretilen demineralize AKPE'nin öncelikle tavşanlarda inert olması ve kısa sürede rezorbe olarak kemik dokuyla yer değiştirmesinden kaynaklandığı kanaatini oluşturmuştur.

Bu çalışmada değerlendirmeler 3. ve 6. haftalarda yapıldı. Dolayısıyla farklı zaman dilimlerinde yapılan değerlendirmeler ile birebir tartışma yapılamamıştır. Çalışmamızdan elde edilen hem histopatolojik hem de tomografik bulgularda gruplar arasında önemli oranda fark görülmesi onarımda PRP uygulamasının olumlu katkısı olduğunu ortaya koymuştur.

Bu süreler zarfında elde edilen bulgular; trombosit kökenli büyüme faktörleri kullanımı açısından bazı kaynaklarla (5,11,20,21,23,26,28-30) uygunluk, bazı kaynaklarla (31,32) kısmen uygunluk, You ve ark. (33) ile Turan ve ark. (34)'nin çalışmalarıyla da tezatlık gösterdi. AKPE yönünden ise bu konuda yapılan araştırmalarla (4,18-22) uygunluk gösterdi.

Kırık iyileşmesinin ilk aşamalarında ağırlıklı tip II kollajen, ikinci haftadan sonra ise tip I kollajen üretimi olduğu bildirilmiştir (25,35). Çalışmada kullanılan AKPE' deki tip I kollajenin ortama uygulanmasının, PRP uygulanmayan grupta 3.

haftada az da olsa trabeküllerin oluşmasına neden olduğu kanaatine varıldı.

Bu çalışmada PRP uygulanan grupta organize kemik 3. haftada, matür ve organize kemik ise 6. haftada oluştu. Bu sonucun elde edilmesinde, PRP'nin olumlu katkıları olduğu sonucuna varıldı. Ancak, oluşturulan kemik defektleri monokortikal olup, kansellöz kemik yapıyla ilişkilidir. Bu nedenle bölgede yeni kemik oluşumunda önemli rolü olan anjiogenetik ve osteogenetik hücrelerin ekstra varlığı da söz konusudur (36). Buna bağlı olarak, elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde bu hususun göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda tavşanlarda KBD'lerinde, planı kapsamında üretilen at kemik greftinin kullanımıyla endokondral ossifikasyon, bunun PRP ile birlikte kullanımından da kısa sürede matür kemik oluşumu saptanmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Görmez U., 2008. Dental implant çevresinde cerrahi olarak oluşturulan kemik defektlerinde sığır kaynaklı laktoferrinin kemik rejenerasyonuna etkisi. Doktora Tezi, T. C. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, Adana.
2. Smiler D., Soltan M., 2006. The bone grafting decision tree: a systematic methodology for achieving new bone. *Implant Dent*, 15, 122-128.
3. Lauthe O., Soubeyrand M., Babinet A., Dumaine V., Anract P., Biau DJ., 2018. The indications and donor-site morbidity of tibial cortical strut autografts in the management of defects in long bones. *Bone Joint J*, 100, 667-674.
4. Songür M., Şahin E., Tuğcan D., Kalem M., Kaplanoğlu G., Altun NŞ., 2015. At kemiği kaynaklı kemik protein ekstresinin (Colloss-E) kaviter kemik defektlerinin tedavisindeki etkisi: Deneysel çalışma. *Acta Orthop Traumatol Turc*,

- 49, 311-318.
5. Çakar G., Özkan E., İpçi ŞD., Ü Noyan., Yılmaz S., 2010. Demineralize kemik matriksi ve kalsiyum sülfat kombinasyonunun kronik periodontitisli hastalardaki kemik içi defektlerin tedavisinde kullanımının klinik ve radyografik olarak incelenmesi: Olgu Serisi. *JIUFD*, 44, 125-132.
 6. Cho H., Bucciarelli A., Kim W., Jeong Y., Kim N., Jung j., Yoon S., Khang G., 2020. Natural sources and applications of demineralized bone matrix in the field of bone and cartilage in "Advances in Experimental Medicine and Biology", Ed., Chun HJ., Reis RL., Motta A., Khang G, 3-14, Springer Nature, Switzerland.
 7. Xu H., Shimizu Y., Onodera K., Ooya K., 2005. Long-term outcome of augmentation of the maxillary sinus using deproteinised bone particles experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*, 43, 40-45.
 8. Nienhuijs ME., Poulsen K., Van Der Zande M., Briest A., Merckx MA., Stoelinga PJ., 2009. Analytical assessment of the osteoinductive material colosse. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 89, 300-305.
 9. Berglundh T., Lindhe J., 1997. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*, 8, 117-124.
 10. Yılmaz B., Keskinburun S., 2013. Plateletten zengin plazma uygulamaları. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg*, 59, 338-344.
 11. Kim TH., Kim SH., Sador GK., Kim YD., 2014. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol*, 59, 550-558.
 12. Dohan DM., Choukroun J., Diss A., Dohan SL., Dohan AJ., Mouhyi J., Gogly B., 2006. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 101, 45-50.
 13. Liu Y., Sun X., Yu J., Wang J., Zhai P., Chen S., Liu M., Zhou Y., 2019. Platelet-rich fibrin as a bone graft material in oral and maxillofacial bone regeneration: Classification and summary for better application. *BioMed Res Int*, 12, 1-16.
 14. Bokhari K., Nada A., Jawaher A., Falah H., Ismail A., 2018. Healing of extracted socket after surgical removal of impacted mandibular 3rd molar a comparison of PRP vs PRP with bone graft, *Annl Int Med Dent Res*, 4, 36-41.
 15. Gawai TK., Sobana CR., 2015. Clinical evaluation of use PRP in bone healing. *Maxillofac Oral Surg*, 14, 67-80.
 16. Taschieri S., Lolato A., Ofer M., Testori T., Francetti L., Fabro M., 2017. Immediate post-extraction implants with or without pure platelet-rich plasma: A 5-year follow-up study. *Oral Maxillofac Surg*, 21, 147-157.
 17. Williams EM., Miller EM., 2003. Transmissible spongiform encephalopathies in nondomestic animals: origin transmission and risk factors. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 22, 145-156.
 18. Nienhuijs MEL., Walboomers XF., Merckx MAW., Stoelinga PJW., Jansen JA., 2006. Bone-like tissue formation using an equine COLLOSS E-filled titanium scaffolding material. *Biomaterials*. 27, 3109-3114.
 19. Heo SH., Na CS., Kim NS., 2011. Evaluation of equine cortical bone transplantation in canine fracture model. *Vet Med*, 56, 110-118.
 20. Li H., Zou X., Springer M., Briest A., Lind M., Bünger C., 2007. Instrumented anterior lumbar interbody fusion with equine bone protein extract. *Spine*, 32, 126-129.
 21. Stefano DAD., Artese L., Iezzi G., Piattelli A., Pagnutti S., Piccirilli M., Perotti V., 2009. Alveolar ridge with equine spongy bone. *Clin Imp Dent Rel Res*, 11, 90-100.
 22. Ding M, Rojskjaer J., Cheng L., Theilgaard N., Overgaard S., 2012. The effects of a novel-reinforced bone substitute and Colloss E on bone defect healing in sheep. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100, 1826-1835.
 23. Badwelan M., Alkindi M., Ramalingam S., Nooh

- N., Al Hazaimi K., 2018. The Efficacy of recombinant Platelet derived growth factor on beta tricalcium phosphate to regenerate femoral critical sized segmental defects: longitudinal in vivo micro- Ct study in a rat model. *J Invest Surg*, 15, 1-13.
24. Aaboe M., Pinholt EM., Hjørtting-Hansen E., 1994. Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg*, 5, 201-203.
25. Hiltunen A., Vuorio E., Aro HT., 1993. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res*, 11, 305-312.
26. El Moheb M., Al-Zarea B. Sghaireen MG., Toriya, J. Mizohata A., Patil S., Siada A., Brad B., Kochaji N., Alam MK., 2017. Mineralized plasmatic matrix to enhance the bone grafting technique. *J Hard Tis Biol*, 26, 289-292.
27. Anderson JM., 2001. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res*, 31, 81-110.
28. Szeponder T., Wessley-Szeponder A., Zylinka B., Adzki RP., Polkowska I., 2018. Platelet rich plasma tricalcium phosphate in the treatment of comunited fractures in animals. *In Vivo*, 32, 1449-1455.
29. Ahmed A., Saleh B., Samia SA., Khadiga YK., Saeeda MO., 2018. Effect of autogenous dentin graft combined with platelet rich plasma on alveolar bone healing after tooth extraction in rabbit, *Alex Dent J*, 43, 6-10.
30. Rezuc A., Saavedra C., Maass R., Poblete C., Nappe C., 2020. Histological comparison of DBBM and platelet rich fibrin for guided bone regeneration in a rabbit model, *J Oral Biol Craniofac Res*, 10, 287-293.
31. Pripatnanont P., Nuntanarant T., Vongvatcharanon S., Phurisat K., 2013. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *J Craniomaxillofac Surg*, 41, 191-200.
32. Karayürek F., Kadiroğlu ET., Nergiz Y., Akçay CN., Tunik S., Kanay BE., Uysal E., 2019. Combining platelet rich fibrin with different bone graft materials: An experimental study on the histopathological and immunochemical aspects of bone healing. *J Craniomaxillofac Surg*, 47, 815-825.
33. You TM., Choi BH., Zhu SJ., Jung JH., Lee SH., Huh JY., 2007. Platelet-enriched fibrin glue and platelet-rich plasma in the repair of bone defects adjacent to titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 22, 417-422.
34. Turan E., Akça MK., Bayar A., Songür M., Keser S., Doral MD., 2017. A comparison of the effects of platelet-rich plasma and demineralized bone matrix on critical bone defects: An experimental study on rats, *Ulus Acil Travma Derg.* 23, 91-99.
35. Seeherman H., Li R., Wozney J., 2003. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors. *J Bone Joint Surg Am*, 85A, 96-108.
36. Munting E., Wilmart JF., Wijne A., Hennebert P., Delloye C., 1998. Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand*, 59, 34-38.