

استفاده از ماتریکس دمینرالیزه استخوان (DBM) در ترمیم نقایص استخوانی (مقاله مروری)

سمیه منزه هر سینی^{۱*}

(تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۵/۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۵/۲۹)

چکیده:

نقیصه استخوانی در اثر کیست، تومور، استئوتومی و غیره به وجود می آید. در طی ۵۰ سال گذشته مواد مختلفی به عنوان جایگزین های استخوانی به کار رفته اند. یک جایگزین استخوانی ایده آل برای استفاده در تمام شرایط وجود ندارد. انواع پیوند استخوان شامل: پیوند اتوگرافت، پیوند آلوگرافت، پیوند زنوگرافت و پیوند مواد سنتتیک است DBM معمولا به صورت آلوگرافت استفاده می شود و دارای خصوصیات استئواینداکتیویته و استئوکنداکتیویته ولی فاقد خصوصیت استئوژنیسیته به دلیل پردازش است. استفاده از DBM مقرون به صرفه است و در مقادیر فراوان در دسترس است. فرمولاسیون های متعدد DBM بر اساس تکنیک های تولید آن وجود دارد. آنها به صورت پودر منجمد، گرانول، ژل، سیمان یا نوار استفاده می شوند. DBM در برای ترمیم نقایص استخوانی به وجود آمده از کیست، تومور و ... خصوصا در استخوان های طویل استفاده می شود. در اکثر مطالعات نتایج استفاده از DBM در ترمیم استخوان قابل قبول بوده است.

مقدمه:

از پلیمره و سایر مواد) است (۵). هر کدام از پیوند ها مزایا و معایب خاص خود را دارند (۶). DBM معمولا به صورت آلوگرافت استفاده می شود (۷). حدود ۲۰٪ از یک بلیون دلاری که هر ساله در زمینه گرافت استخوانی هزینه می شود به DBM اختصاص دارد (۸).

استخوان متشکل از دو جزء اصلی اجزای آلی و معدنی است (۹). کلاژن جزء اصلی ماده آلی استخوان است که سبب تحمل فشار و مقاومت می شود (۱۰). علاوه بر این، پروتئین های بسیاری شامل عوامل رشد وجود دارند که به طور مرتب تشکیل و بازسازی استخوان را تنظیم می کنند (۱۱). بخش معدنی استخوان اساسا شامل نمک های فسفات کلسیم می باشد (۱۲). این جزء استخوان به راحتی در محیط اسیدی حل شده و در نتیجه ماتریکس دمینرالیزه استخوان را به وجود می آورد (۱۳). ماتریکس آلی استخوان شامل کلاژن (عمدتا نوع I) و حدود ۵٪ (بر حسب وزن) پروتئین های غیر کلاژنی است (۱۴). کلاژن، انعطاف پذیری و مقاومت در برابر بارگذاری را فراهم می کند و به عنوان یک الگو برای رسوب کریستال های معدنی عمل می کند (۱۵).

این مقاله خواص ماتریکس دمینرالیزه استخوان را برای استفاده از آن بررسی می کند. در این مطالعه بررسی سیستماتیک مقالات به دست آمده از Pubmed و Google Scholar انجام شد. هدف از این مقاله توصیف و مشخص کردن خواص DBM علاوه بر بررسی نتایج استفاده از آن در مطالعات حیوانی و انسانی است.

نقیصه استخوانی در اثر کیست، تومور، استئونومی و غیره به وجود می آید (۱). وقتی نقیصه استخوانی به قدری بزرگ است که فرآیند ترمیم استخوان از عهده برطرف کردن آن بر نمی آید استفاده از جایگزین های استخوانی اجتناب ناپذیر است (۲). در طی ۵۰ سال گذشته مواد مختلفی به عنوان جایگزین های استخوانی به کار رفته اند (۳). اما هنوز یک جایگزین استخوانی ایده آل برای استفاده در تمام شرایط وجود ندارد (۴). انواع پیوند استخوان شامل: پیوند اتوگرافت (استفاده از بافت های خود موجود)، پیوند آلوگرافت (انتقال بافت از یک موجود به موجود دیگری از همان گونه)، پیوند زنوگرافت (انتقال بافت از یک موجود به موجود دیگری از گونه دیگر) و پیوند مواد سنتتیک (استفاده

تعریف DBM

پروتئین های استخوانی است که باعث شکل گیری استخوان های جدید می شود (۱۸). DBM دارای خصوصیات استخوانینداکتیویته و استئوکنداکتیویته ولی فاقد خصوصیت استئوژنیسیته به دلیل پردازش است (۱۹).

DBM استخوان آلوگرافتی است که اجزای معدنی آن توسط اسید حذف شده است (۱۶). این روند باعث می شود کلاژن نوع I، پروتئین های غیر کلاژنی و عوامل رشد استخوان آزاد شوند (۱۷). ماتریکس خارج سلولی حاوی

تاریخچه استفاده از DBM :

برجسته در توصیف استفاده از استخوان دیمنرالیزه شده در حیوانات را منتشر کرد که منجر به تشکیل استخوان در بافت نرم شد (۲۱). DBM برای چندین دهه در جراحی های انسانی برای درمان خردشدگی، استئومیلیت و نقایص بزرگ ناشی از حذف تومور خوشخیم مورد استفاده قرار گرفت (۲۲). DMB همچنین می تواند پیوند استخوان اتولوگ را تقویت کند و گسترش دهد، خصوصا در زمانی که میزان استخوان های اتوژنیک محدود است یا نقص بسیار بزرگ است (۲۳).

اولین گزارش مربوط است به سن و همکاران در سال ۱۸۸۹ است که از DBM به عنوان یک وسیله آنتی سپتیک در درمان نقیصه استخوانی استفاده کردند و نشان دادند که DBM گاو با موفقیت می تواند نواقص بزرگ استخوانی را به طور کامل درمان کند. سنت این را با استفاده از DBM در نقیصه های بزرگ استخوان جمجمه سگ و تیبیا و فمورال در انسان نشان داد (۲۰). مارشال اورست در سال ۱۹۶۵ نشان داد که با حذف مواد معدنی استخوان، پروتئین های مورفوزنیک استخوان بیشتر فعال می شود. او یک مقاله

مزایای استفاده از DBM

ایجاد می شود (۲۵). همچنین فعالیت القای استخوان سازی DBM به خوبی شناخته شده است (۲۶). بعضی از پروتئین های DBM سبب تمایز سلول های مزانشیمی می شوند و سنتز استخوان جدید را با استئوژنز داخل غضروفی موجب می شوند (۲۷). DBM سبب تحریک آنژیوژنز و تکثیر فیبروبلاست ها می شود (۲۸). به نظر می رسد اشکال

مزایای استفاده از DBM از جمله موجودیت در مقادیر زیاد است (۲۴). مطالعات تجربی قبلی نشان داده است که پیوند DBM به محل های زیر جلدی یا عضلانی منجر به تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی می شود که به سلول های غضروفی تمایز پیدا کرده و بافت غضروفی را سنتز می کنند و سپس یک فرآیند شبیه به استخوان سازی داخل غضروفی

دمینرالیزیشن مواد آنتی ژنیک داخل استخوان ها را از بین می برد و باعث می شود که DBM کمتر از آلوگرافت ایمونوژن باشد پس مسئله پس زدن پیوند اتفاق نمیفتد (۳۱).

است (۳۳). یکی دیگر از محدودیت های احتمالی آن این است که دسته های مختلف از آن ممکن است به علت طیف گسترده ای اهدا کنندگان دارای خصوصیات مختلف باشند (۳۴). علاوه بر آن DBM استحکام ساختاری ندارد و استفاده از آن باید در یک محیط باثبات صورت بگیرد (۳۵).

استفاده از حامل برای بهبود ویژگی های استحکام و خواص مکانیکی آن است (۴۰). اضافه کردن مغز استخوان یا استخوان اتوژن به DBM منبع سلول های پیش ساز استئوژنیک را تامین می کند که سبب استئوژنز بهتر می شود. هیدروکسی آپاتیت، استخوان آلوگرافت نیز ممکن است به ماتریکس دمینرالیزه شده ی استخوان افزوده شوند (۴۱).

بالقوه پتانسیل تشکیل استخوان را کاهش می دهد، اما پتانسیل ایمنی زایی و خطر عفونت را کاهش می دهد (۴۳). استخوان ها به صورت آسپتیک جمع آوری می شوند و بافت های نرم قبل از ذخیره سازی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد

خاصی از DBM در مطالعات بالینی و تجربی بهتر عمل می کنند (۲۹). نحوه آماده کردن DBM در خصوصیات استئواینداکتیویته آن تاثیر می گذارد (۳۰). علاوه بر این مزایا استفاده از DBM مقرون به صرفه است و فرآیند

معایب DBM

از آنجا که این ماده به صورت آلوژنیک استفاده می شود ممکن است سبب انتقال ویروس ایدز و هیپاتیت شود (۳۲). البته شرکت های تولید کننده ی DBM گزارش می دهند که از زمان معرفی آن به بازار در سال ۱۹۹۱ تا کنون هیچ گونه انتقال بیماری مرتبط با گرافت استخوانی دیده نشده

اشکال مختلف DBM

فرمولاسیون های متعدد DBM بر اساس تکنیک های تولید آن وجود دارد (۳۶). آنها به صورت پودر منجمد، گرانول، ژل، سیمان یا نوار استفاده می شوند (۳۷). همه در مطالعات حیوانی اثرات استخوان سازی دارند (۳۸). از اسید هیالورونیک، کلاژن، گلیسرول و یا ژلاتین به عنوان حامل برای ارائه DBM استفاده می شود (۳۹). علاوه بر این

روش تهیه DBM

روش تهیه DBM شامل دمینرالیزه کردن، استریل کردن و به حداقل رساندن خطر انتقال بیماری است (۴۲). در حقیقت پردازش شامل درمان شیمیایی و پرتوی است که خصوصیات بیومکانیک استخوان را کاهش می دهد و به طور

گیرند (۴۸). دمنرالیزه شدن با ارزیابی رادیوگرافی و تعیین غلظت کلسیم بررسی می شود. ماتریکس دمنرالیزه شده ی استخوان به صورت تجارتي نیز تهیه می شود و بیشتر در مورد شکستگی های چند تکه ای مورد استفاده قرار می گیرد (۴۹).

حذف می شوند (۴۴). استخوان ها از فاسیا پاک می شوند (۴۵). قطعات استخوانی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمانی که استفاده می شوند، ذخیره می شوند (۴۶). سپس قطعات در اتانول و هوا خشک می شوند (۴۷). سپس قطعات در HCL در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ قرار می

پیوند استخوان DBM

تهاجم قرار می گیرد (۵۲). DBM کاشته شده به تدریج جذب شده و با بافت استخوانی جایگزین می شود (۵۳). این رویدادهای سلولی که پس از پیوند DBM مشاهده می شود، تقلیدی است از رشد استخوان های جنینی و ترمیم طبیعی استخوان (۵۴).

به دنبال کاشتن DBM در محل نقیصه هماتوم و یک فرآیند التهابی شکل می گیرد و در طی هجده ساعت مهاجرت سلول های پلی مورفون به محل دیده می شود (۵۰). سلول های مزانشیمی در روز ۵ شروع می کنند به تقسیم شدن (۵۱). در روز ۱۰ تا ۱۲ غضروف شروع می کند به مینرالیزه شدن و سپس توسط عروق خونی جدید مورد

برخی از کاربردهای جراحی DBM ها عبارتند از

- پر کردن حفره پس از حذف کیست استخوان یا تومور استخوان
- شکستگی استخوان های طویل
- شکستگی تیبیا
- شکستگیهای تالوس
- نقص کندیلار
- شکستگی های ناحیه ای رادیوس
- شکستگی Supracondylar
- عدم یکپارچگی
- نقص های قطعه ای همراه با تثبیت
- Osteotomies

- برداشت ستیغ ایلیاک
- نقص maxillofacial دهان و جمجمه
- همراه با قرار دادن ایمپلنت دندان (۵۵)

بحث

Bostrom و همکاران (۲۰۰۵) گزارش دادند تفاوت های قابل توجهی در استفاده از DBM در پیوند استخوان دیده می شود (۵۹). Bigham و همکاران (۲۰۰۸) DBM را در نقیصه پیشانی خرگوش مورد استفاده قرار دادند (۶۰). پس از ۶ هفته نتایج بیومکانیک آن بهتر از پیوند استخوان اتولوگ بود (۶۱). Liebschner و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند DBM همراه با سلول های مغز استخوان که خودشان استئوژنیک هستند، یک القا کننده موفق تری در همجوشی ستون فقرات است نسبت به استفاده از DBM به تنهایی یا مغز استخوان به تنهایی (۶۲). Nasori و همکاران (۲۰۱۳) از غشای پریکاردی انسان (HPM) و DBM در نقص مهره ای خرگوش استفاده کردند (۶۳). نتایج گروه DBM بهتر از گروه های حاوی HPM در آزمایش های بیومکانیک و بیوشیمیایی بود (۶۴). با این حال، آنها از لحاظ آماری معنادار نبودند (۶۵). Wang و همکاران (۲۰۰۰) از DBM در نقیصه استخوان جمجمه موش استفاده کردند (۶۶). داده ها نشان می دهند که استخوان سازی که در محل حضور DBM بوجود می آید بوسیله القاء مستقیم سلول های بنیادی مزانشیمال ساکن در محل به استئوبلاست ها و

نتایج مطالعات حیوانی نشان دهنده تنوع عملکرد DBM در ترمیم استخوان است (۵۶). برخی از تفاوت های این مطالعات شامل مدل های حیوانی استفاده شده، نحوه آماده سازی DBM و حاملی است که با DBM ترکیب شده است (۵۷). اکثر مطالعات بالینی انسانی، زمانی که DBM به عنوان یک پروتز گرفت یا پیوند استفاده می شود، میزان بالای همجوشی را گزارش می کنند (۵۸). یکی از محققان نشان داده است که ماتریکس دمینرالیزه شده ی استخوان سبب تشکیل استخوان هتروتروپیک می شود (۲۰). این محقق ماتریکس دمینرالیزه شده ی استخوان را با کمک آنزیم کلاژناز باکتریایی هضم کرده و در مخلوطی از نمک و اتیلن گلیکول حل نمود (۱۲). تزریق پروتئین مورفوژنیک استخوان در عضلات موش صحرایی سبب القاء استخوان سازی می شود. پروتئین مورفوژنیک استخوان برای سلول های پروژنیاتور جاذبه شیمیایی داشته و آنها را به کندروپلاست تبدیل کرده و همچنین باعث مینرالیزه شدن ماتریکس غضروف می شوند. این مواد می توانند باعث رگزایی و در نهایت استخوان سازی در محل ضایعه شوند (۳).

گروه DBM گاو نتایج بهتری را نسبت به گروه کنترل (منفی) به دست می دهد (۷۵). Sanaei و همکاران (۲۰۱۳) در ترمیم نقیصه استخوانی از استخوان مرغ استفاده کردند و گزارش دادند استخوان پرندگان در ارتوپدی زیست سازگار و ایمن است و داری خصوصیات استئوینداکتیویتی بالا است (۷۶). Lindsey و همکاران (۲۰۰۶) از DBM همراه با مغز استخوان استفاده کردند و نتایج بهتری را نسبت به گروه اتوگرافت (گروهی که از اتوگرافت برای ترمیم استخوان استفاده کردند) به دست آوردند (۷۷). Bibbo و همکاران (۲۰۰۶) از DBM و سولفات کلسیم برای درمان شکستگی پاشنه استفاده کردند و نتایج بهتری نسبت به گروه کنترل به دست آوردند (۷۸).

در این مطالعات مختلف فرق زیادی بین استفاده از DBM های مختلف در ترمیم استخوان ها وجود نداشت (۷۹)؛ اما نتیجه بررسی استفاده از DBM نسبت به استخوان در مطالعات مختلف بحث برانگیز است به عنوان مثال Emmanuel و همکاران (۲۰۰۳) اثر DBM و استخوان آلوگرافت را در نقیصه دیافیز استخوان ران رت بررسی نمودند و مشاهده نمودند برخلاف گروه استخوان جوش خوردگی در گروه DBM به شکل بهتری رخ داد (۸۰). در حالی که Rosen و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند DBM آلوگرافت نسبت به استخوان آلوگرافت تاثیر کمتری در بهبود روند ترمیم استخوان دارد (۸۱). متاسفانه مطالعات زیادی در مورد استفاده از DBM های زونوگرافت به جز

تشکیل مستقیم استخوان ایجاد می شود (۶۷). Gossling و همکاران (۲۰۰۴) استفاده از DBM را در فیوژن استخوان های ستون مهره را موثر گزارش کردند (۶۸). Einhorn و همکاران، اثر DBM را که در نقیصه بزرگ فمورال در یک مدل موش مورد بررسی قرار دادند و به نتایج مشابهی رسیدند (۶۹). Emmanuel و همکاران (۲۰۰۳) اثر DBM و استخوان آلوگرافت را در نقیصه دیافیز استخوان ران رت بررسی نمودند و مشاهده نمودند بر خلاف گروه استخوان جوش خوردگی در گروه DBM به شکل بهتری رخ داد (۷۰). بیغم و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش کردند DBM نتایجی شبیه به استخوان اتوژن در ترمیم استخوان دارد (۷۱).

Athanasίου در سال ۲۰۱۰ استخوان اتوگرافت، آلوگرافت، زونوگرافت و گرافت مصنوعی را در نقیصه استخوانی به کار برد و متوجه شد که استخوان زونوگرافت بهتر از آلوگرافت نتیجه داده است (۷۲). متاسفانه مطالعات زیادی در مورد استفاده از زونوگرافت های مختلف به جز زونوگرافت گاو وجود ندارد؛ جالب این که مطالعات موجود در مورد استفاده از استخوان گاو بیشتر از استخوان انسان است (۷۳). آقازاده و همکاران (۲۰۱۰) اثر DBM انسان و گاو را در ترمیم استخوان بررسی کردند و گزارش کردند تفاوتی میان استفاده از این دو ماده وجود ندارد (۷۴). Nasoori و همکاران (۲۰۱۳) از DBM گاو برای درمان نقیصه استخوان جمجمه استفاده کردند و نتایج آنها نشان داد که

مطالعات آینده برای تعیین انواع BMP های موجود در DBM های مختلف برای شناخت و انتخاب بهترین نوع زونوگرافت لازم به نظر می آید.

زونوگرافت گاو وجود ندارد؛ مطالعات مربوط به آنالیز شیمیایی و بیوشیمیایی نشان می دهد ترکیب استخوان گاو از نظر مواد موجود در خاکستر و ماتریکس مشابه ترکیب استخوان انسان است (۸۲). اما به هر حال امکان انتقال انسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی با زونوگرافت های گاوی وجود دارد (۸۳).

منابع

- 1- Bigham A.S., Dehghani S.N., Shafiei Z., Torabi Nezhad S. (2009) Comparison of Novel Xenograft (Bovine Fetal Growth Plate) and Allograft Effects on Experimental Bone Defect Healing in Rabbit. *Comp Clin Pathol* 18(4):345-351
- 2-Nandi S.K., Roy S., Mukherjee P., Kundu B., De D.K., Basu D. (2010) Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* 132: 15-30
- 3- Hansen A., Pruss A., Gollnick K., Bochentin B., Denner K., Versen R. (2001) Demineralized Bone Matrix-Stimulated Bone Regeneration in Rats Enhanced by an Angiogenic Dipeptide Derivate. *J Cell and Tissue Banking* 2: 69-75
- 4- Parikh S.N. (2000) Bone graft substitutes: past, present, future. *Journal of Postgraduate Medicine*, 48(2): 142-8
- 5- Sen M.K., Mclau T. (2007) Autologous iliac crest bone graft: Should it still be the gold standard for treating nonunions? *J Injury* 38S1: S75-S80
- 6- Yao J., Mho A., (2009) Bone Graft Substitutes in the Treatment of Distal Radius and Upper Limb Injuries. *J Oper Tech Orthop* 19:77-87
- 7- Constantz B.R., Ison I.C., Fulmer M.T., (1995) Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 267:1796-1799.
- 8- Kelly C.M., Wilkins R.M., Gitelis S., (2001) the Use of Surgical Grade Calcium Sulfate as a Bone Graft Substitute: Results of a Multicenter Trial. *Clin Orthop Relat Res* 382:42-50.

- 9- Pietrzak W.S., Perns S.V., Keyes J., Woodell-May J., McDonald N.M. (2005) Demineralized Bone Matrix Graft: A Scientific and Clinical Case Study Assessment. *J The Journal of Foot & Ankle Surgery* 44(5):345-353
- 10- Khoshzaban A., Mehrzad S., Tavakoli V., Keshel S.H., Behrouzi G.R., Bashtar M. (2011) the Comparative Effectiveness of Demineralized Bone Matrix, Beta-Tricalcium Phosphate, and Bovine-Derived Anorganic Bone Matrix on Inflammation and Bone Formation Using a Paired Calvarial Defect Model in Rats. *Dove press Journal* 3:69-78
- 11- Keating J.F., McQueen M.M. (2001) Substitutes for Autologous Bone Graft in Orthopaedic Trauma. *J Bone Joint Surg* 82-B: 3-8.
- 12- Boskey A.L., Coleman R. (2010) Aging and Bone. *J Dent Res* 89(12):1333-1348
- 13- R.J. Lomas, H.L. Gillan, J.B. Matthews, E. Ingham, J.N. Kearney, An evaluation of the capacity of differently prepared demineralised bone matrices (DBM) and toxic residuals of ethylene oxide (EtOx) to provoke an inflammatory response in vitro, *Biomaterials* 22 (2001) 913–921.
- 14- Buring K., Urist M.R. (1967) Effects of ionizing radiation on the bone induction principle in the matrix of bone implants. *Clin Orthop Relat Res*; 55: 225-234
- 15- Dubuc F.L., Urist M.R. (1967) The accessibility of the bone induction principle in surface-decalcified bone implants. *Clin Orthop Relat Res*; 55: 217-223
- 16- Hierholzer C., Sama D., Toro J.B., Peterson M., Helfet D.L. (2006) Plate fixation of ununited humeral shaft fractures: effect of type of bone graft on healing. *J Bone Joint Surg Am*; 88: 1442-1447
- 17- Eriksson C. (1985) Surface energies and the bone induction principle. *J Biomed Mater Res*; 19: 833-849
- 18- Jones C.B. (2005) Biological basis of fracture healing. *J Orthop Trauma*; 19: S1-S3
- 19- Han B., Tang B., Nimni M.E. (2003) Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. *J Orthop Res*; 21: 648-654
- 20- Senn N., (1889) on the Healing of Aseptic Bone Cavities by Implantation of Antiseptic Decalcified Bone. *Amer. J Med Sci* 98: 219-243

- 21- Urist M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction. *J Science* 150:893- 899.
- 22- Urist M.R., Maeda H., Shamie A.N., Teplica D., (1998) Endogenous bone morphogenetic protein expression in transplants of urinary bladder, *Plast. Reconstr. Surg.* 101 : 408-415 (discussion 416-407).
- 23- Reddi A.H., Huggins C.B. (1975) Formation of bone marrow in fibroblast-transformation ossicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72 :2212-2216.
- 24- Levander G. (1934) On the formation of new bone in bone transplantation, *Acta Chir. Scand.* 74:425-426.
- 25- Muthukumaran N., Ma S., Reddi A.H. (1988) Dose-dependence of and threshold for optimal bone induction by collagenous bone matrix and osteogenin-enriched fraction, *Coll. Relat. Res.* 8; 433-441.
- 26- Urist M.R. (1970) The substratum for bone morphogenesis, *Symp. Soc. Dev. Biol.* 29:125-163.
- 27- Levander G. (1938) A study of bone regeneration, *Surg. Gynecol. Obstet.* 67: 705-714.
- 28- Lacroix P. (1947) Organizers and the growth of bone, *J. Bone Joint Surg.* 29 :292-296.
- 29- Reddi A.H., Anderson W.A. (1976) Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification and hemopoiesis, *J. Cell Biol.* 69:557-572.
- 30- Ray R.D., Holloway J.A. (1957) Bone implants. Preliminary report of an experimental study, *J. Bone Joint Surg.* 39A:1119.
- 31- Reddi A.H., Huggins C.B. (1973) Influence of geometry of transplanted tooth and bone on transformation of fibroblasts, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143 :634-637.
- 32- Lacroix P. (1945) Recent investigations on the growth of bone, *Nature* 156 :576-586.
- 33- Urist M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction, *Science* 150: 893-899.
- 34- Urist, B.S. (1971) Strates, Bone morphogenetic protein, *J. Dent. Res.* 50:1392-1406.
- 35- Sampath T.K., Reddi A.H. (1981) Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:7599-7603.

- 36- Friedlaender GE. (1983) Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop Relat Res*; (174): 58-68 [PMID: 6339143]
- 37- Horowitz M.C., Friedlaender G.E. (1987) Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. *Orthop Clin North Am*; 18: 227-233
- 38- Friedlaender G.E. (1992) Horowitz MC. Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance. *Orthopedics*; 15: 1171-1175
- 39- Wright J.G., Einhorn T.A., Heckman J.D. (2005) Grades of recommendation. *J Bone Joint Surg Am*; 87: 1909-1910
- 40- OCEBM A. (2011) Levels of Evidence Working Group. "The Oxford Levels of Evidence". Oxford Centre for Evidence-Based Medicine. Available from: URL: <http://www.cebm.net/index.aspx?o=5653>
- 41- Bolander M.E., Balian G. (1986) The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *J Bone Joint Surg Am*; 68: 1264-1274
- 42- Deeb M., Hosny M., Sharawy M. (1989) Osteogenesis in composite grafts of allogenic demineralized bone powder and porous hydroxylapatite. *J Oral Maxillofac Surg*; 47: 50-56
- 43- Einhorn T.A., Lane J.M., Burstein A.H., Kopman C.R., Vigorita V.J. (1984) The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am*; 66: 274-279
- 44- Gebhart M., Lane J. (1991) A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta Orthop Belg*; 57: 130-143
- 45- Milinkovic Z.B., Krneta O., Milickovic S., Dozic D., Curcic A. (2010) Are the additional grafts necessary? *Acta Chir Iugosl*; 57:69-72
- 46- Wang J.C., Kanim L.E., Nagakawa I.S., Yamane B.H., Vinters H.V., Dawson E.G. (2001) Dose-dependent toxicity of a commercially available demineralized bone matrix material. *Spine (Phila Pa 1976)*; 26: 1429-1435; discussion 1435-1436

- 47- Dallari D., Savarino L., Albisinni U., Fornasari P., Ferruzzi A., Baldini N., Giannini S. A. (2012) prospective, randomised, controlled trial using a Mg-hydroxyapatite - demineralized bone matrix nanocomposite in tibial osteotomy. *Biomaterials*; 33: 72-79
- 48- Hatzokos I., Stavridis S.I., Iosifidou E., Karataglis D., Christodoulou A. (2011) Autologous bone marrow grafting combined with demineralized bone matrix improves consolidation of docking site after distraction osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am*; 93: 671-678
- 49- Wilkins R.M., Kelly C.M., Giusti D.E. (1999) Bioassayed demineralized bone matrix and calcium sulfate: use in bone-grafting procedures. *Ann Chir Gynaecol*; 88: 180-185
- 50- Feng Y., Wang S., Jin D., Sheng J., Chen S., Cheng X., Zhang C. (2011) Free vascularised fibular grafting with OsteoSet®2 demineralised bone matrix versus autograft for large osteonecrotic lesions of the femoral head. *Int Orthop*; 35: 475-481
- 51- Etienne G., Ragland P.S., Mont M.A. (2004) Use of cancellous bone chips and demineralized bone matrix in the treatment of acetabular osteolysis: preliminary 2-year follow-up. *Orthopedics*; 27: s123-s126
- 52- Thordarson D.B., Kuehn S. (2003) Use of demineralized bone matrix in ankle/hindfoot fusion. *Foot Ankle Int*; 24: 557-560
- 53- Glowacki J., (2005) A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone, *Cell Tissue Bank*. 6:3-12.
- 54- Russell J.L., Block J.E., (1999) Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of processing techniques and study methodology, *Orthopedics* 22:524-531 (quiz 532-523).
- 55- Munting E.V., Wilmart J.-F., Wijen A., Hennebert P.I., Delloye C. (1988) Effect of Sterilization on osteoinduction: comparison of five methods in demineralized rat bone, *Acta Orthop. Scand*. 59 :34-38.
- 56- Puolakkainen P., Ranchalis J., Strong D., Twardzik D. (1993) The effect of sterilization on transforming growth factor beta isolated from demineralized human bone, *Transfusion* 33:679-685.
- 57- Ijiri S., Yamauro T., Nakamura T., Kotani S., Notoya K. (1994) Effect of sterilization on bone morphogenetic protein, *J. Orthop. Res*. 12:628-636.

- 58- Urist M.R., Hernandez A. (1974) Excitation transfer in bone. Deleterious effects of cobalt 60 radiation-sterilization of bank bone, Arch. Surg. 109:486-493
- 59- Bostrom M.P.G., Seigerman D.A. (2005) The Clinical Use of Allografts, Demineralized Bone Matrices, Synthetic Bone Graft Substitutes and Osteoinductive Growth Factors: A Survey Study. HSS J 1(1): 9-18
- 60- Bigham A.S., Dehghani S.N., Shafiei Z., Torabi Nezhad S. (2008) Xenogenic Demineralized Bone Matrix and Fresh Autogenous Cortical Bone Effects on Experimental Bone Healing: Radiological, Histopathological and Biomechanical Evaluation. J Orthop Traumatol 9(2):73-80
- 61- Thalgott J.S., Giuffre J.M., Klezl Z., Timlin M. (2002) Anterior lumbar interbody fusion with titanium mesh cages, coralline hydroxyapatite, and demineralized bone matrix as part of a circumferential fusion. Spine J; 2: 63-69
- 62- Liebschner M.A.K. (2004) Biomechanical Considerations of Animal Models Used in Tissue Engineering of Bone. J Biomaterials 25:1697-1714
- 63- Nasoori A., Mohitmafi S., Khoshzaban A., Tavakoli S., Shahabi Z. (2013) Biochemical and biomechanical evaluation of human pericardial membrane and demineralized bone matrix in rabbit calvarial defects. JComp Clin Pathol 22:253-259
- 64- Ferreira S.D., Dernel W.S., Powers B.E., Schochet R.A., Kuntz C.A., Withrow S.J., Wilkins R.M. (2001) Effect of gas-plasma sterilization on the osteoinductive capacity of demineralized bone matrix, Clin. Orthop. Relat. Res. 233-239.
- 65- Moore T., Gendler E., Gendler E. (2004) Viruses adsorbed on musculoskeletal allografts are inactivated by terminal ethylene oxide disinfectant, J. Orthop. Res. 22:1358-1361.
- 66- Wang J., Yang R., Gerstenfeld L.C, Glimcher M.J. (2000) Characterization of Demineralized Bone Matrix-Induced Osteogenesis in Rat Calvarial Bone Defects: III. Gene and Protein Expression. J Calcif Tissue Int 67:314-320
- 67- Doherty M.M., Mollan R., Wilson D., (1993) The effect of ethylene oxide sterilization on human demineralized bone, Biomaterials 14:994-998.
- 68- Gossling S., Kunkel T., Schumacher K., Zilger M. (2004) Use of molluscs, fish, and other marine taxa by tourism in Zanzibar, Tanzania. J Biodiversity and Conservation. 13: 2623- 2639.

- 69- Einhorn A., Gerstenfeld E., Song L., Olsen R.E., Spalazzi J.P., Davisson T.W. (2010) Biomechanical evaluation of acellular collagen matrix augmented Achilles tendon repair in sheep. *J Foot Ankle Surg.* 49:438- 441.
- 70- Emmanuel S., Jean Pierre O., Fani A. (2003) Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 95:521- 528.
- 71- Bigham A.S., Shadkhast M., Bigham A.S., Shafiei Z., Lakzian A., Khalegi M.R. (2011) Evaluation of Osteoinduction Properties of the Demineralized Bovine Foetal Growth Plate Powder as a New Xenogenic Biomaterial in Rat. *Research in Veterinary Science* 91: 306-310
- 72- Aspenberg P., Lindqvist S.B. (1998) Ethane oxide and bone induction. Controversy remains, *Acta Orthop. Scand.* 69:173–176.
- 73- Han B., Yang Z., Nimni M. (2005) Effects of moisture and temperature on the osteoinductivity of demineralized bone matrix, *J. Orthop. Res.* 23 :855–861.
- 74- Schwartz Z., Mellonig J., Carnes D., Fontaine J., Cochran D., Dean D., Boyan B. (1996) Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation, *J. Periodontol.* 67:918–926.
- 75- Takikawa S., Bauer W., Kambic H., Togawa D. (2003) Comparative evaluation of the osteoinductivity of two formulations of human demineralized bone matrix, *J. Biomed. Mater. Res.* 65:37–42.
- 76- Oakes D.A., Lee C., Liberman J. (2003) An evaluation of human demineralized bonematrices in a rat femoral defect model, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 413:281–290.
- 77- Bomback D., Grauer J., Lugo R., Troiano N., Patel T., Friedlaender G. (2004) Comparison of posterolateral lumbar fusion rates of Grafton Putty and OP-1 in an athymic rat model, *Spine* 29 :1612–1617.
- 78- Peterson B., Whang P., Iglesias R., Wang J., Lieberman J. (2004) Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix: preparation in a spine fusion model, *J. Bone Joint Surg.* 86-A 2243–2250.
- 79- Acarturk O., Hollinger J.O. (2006) Comparison of commercially available particulate demineralized bone products, *J. Plast. Reconstr.* 118:862–873.

- 80- Urist M.R. (1970) The substratum for bone morphogenesis, Dev. Biol. Suppl. 4: 125–163.
- 81- Reddi A.H. (1975) The matrix of rat calvarium as transformant of fibroblasts (39028), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 150:324–326.
- 82- Reddi A.H. (2000) Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside, Biochem. Soc. Trans. 28:345–349.
- 83- Pietrzak W.S., Woodell-May J., McDonald N. (2006) Assay of bone morphogenetic protein-2, -4 and -7 in human demineralized bone matrix, J. Craniofac. Surg. 17:84–90