تقييم فعالية مادّة كربونات الكالسيوم المشتقة من قشرة البيض كمادّة تطعيم عظمي عند الأرانب

رشاد مراد*

الملخص

خلفية البحث وأهدافه: هَدَفَ هذا البحث إلى تقييم فعالية مادّة كربونات الكالسيوم (CaCo3) المشتقة من قشرة بيض الدجاج في ترميم العيوب العظمية المستحدثة في عظام الفكين عند الأرانب، إذْ تعد هذه المادّة من المواد المتوافرة دوماً بتكاليف منخفضة وسهلة التحضير.

مواد البحث وطرائقه: أُجريت الدراسة على 20 أرنباً ذكراً بالغاً، أحدث عند كل منها 3 عيوب داخل عظمية في كل من عظمي الفكين العلوي والسفلي. حُضِّرَتْ مادّة التطعيم العظمي كما يأتي: 1- المادّة أ: مادّة كربونات الكالسيوم المشتقة من قشر البيض ممزوجة مع بروتين التخلق العظمي BMP7. 2- المادّة ب: مادّة كربونات الكالسيوم المشتقة من قشر البيض على شكل بودرة فقط. وترك العيب الثالث فارغاً للمقارنة. ضُحِّيَ بالحيوانات بعد 15 يوماً و30 يوماً و45 يوماً على التوالي. دُرِسَتْ كمية العظم المتشكل، وكمية المادّة المتبقية في كل مادّة تطعيم .

النتائج: أظهرت المادّة (أ) مستوى أعلى من التشكل العظمي متبوعة بالمادّة (ب) بعد 30 يوماً، وقد لاحظنا فرقاً دالاً إحصائياً في اليومين 30 و45؛ وذلك بين المناطق الخاضعة للتطعيم، وغير الخاضعة؛ وذلك بالمقارنة باليوم 30.

الاستنتاج: تبيّن أن مواد التطعيم العظمي المشتقة المكونة من كربونات الكالسيوم، والمشتقة من قشور بيض الدجاج هي مواد متقبلة حيوياً، وتملك القدرة على تعزيز التشكل العظمي، وقد لاحظنا فرقاً واضحاً بين المناطق الخاضعة للتطعيم، وغير الخاضعة بعد 30 يوماً، وتزداد هذه القدرة عند إضافة عوامل نمو عظمية إلى مادّة التطعيم.

كلمات مفتاحية: مواد التطعيم العظمي، طعوم كربونات الكالسيوم، BMP7، التقييم النسيجي

* أستاذ مساعد- قسم علم تأثير الأدوية والسموم- كلية الصيدلة- جامعة دمشق.

Evaluating the Efficiency of Eggshell - Derived Calcium Carbonate as a Bone Grafting Material in Rabbits

Rashad Murad*

Abstract

Background and Objective: this study aimed to evaluate the efficiency of calcium carbonate (CaCo3) derived from Hen's eggshells in repairing induced bony defects in the rabbit's jaws bones; this material is always available in low cost and easy preparation.

Materials and Methods: the study was conducted on 20 male adult rabbits; three bony defects were induced in the lower and upper jaws. Grafting materials were prepared as following: 1- material(A): calcium carbonate derived from eggshell was mixed with bone morphogenic protein BMP7; 2- material (B) : calcium carbonate derived from eggshell in the form of powder; the third defect was left as a control. Animals were sacrificed after 15,30,45 days consequently. The amount of new formed bone and the grafts remnants were investigated.

Results: material (A) showed a higher level of bone formation followed by material (B) after 30 days. Statistically significant differences were observed between graft materials and controls after 30 and 45 days .

Conclusion: eggshell's derived calcium carbonate is a biocompatible materials which has the ability to enhance bone formation. a significant difference was observed between grafted and non-grafted sites after 30 days. This ability can be increased by adding growth factors to the grafting material.

Key words: Bone grafting materials, calcium carbonate grafts, BMP7, histopathological evaluation.

* Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of pharmacy, Damascus university.

المقدمة:

تعدُّ عملية إعادة البناء العظمي Bone regeneration من العمليات الفيزيولوجية المعقدة والفائقة التنظيم، إذْ تشترك فيها العديد من الأنماط الخلوية وسبل الإشارات داخل الخلوية وخارجها[1].

تقدم الطعوم العظمية إطاراً لتطور الخثرة Clot، ونضجها وإعادة تشكيلها كي تدعم عملية البناء العظمية ضمن مناطق العيوب العظمية. ويجب أن تتمتع هذه المواد بخاصية التقبل الحيوي Biocompatibility، والناقلية العظمية Osteoconductivity فضلاً عن الخواص التي تدعم عملية التشكل العظمي Osteogenesis.

في أفضل حالاتها يجب أن تكون الطعوم العظمية غير سامة nontoxic، وغير مستضدية nonantigenic ومقاومة للإنتان، وسهلة التكييف، وقادرة بسهولة وفعالية على تحريض إحداث ارتباط جديد، وأن تطلق عملية التشكل العظمي Osteogenesis.[2]

يعدُّ النسيج العظمي من الأنسجة التي تتمتع بقدرة الشفاء الذاتية العالية High endogeneous healing capacity. وقد دُبِّرَتِ العيوب العظمية بنجاح باستخدام العديد من المواد الحيوية والصنعية كالطعوم الذاتية Auto، والمغايرة Allo، والأجنبية Xeno، والمواد اللاعضوية Alloplastic. ومع أننا نقبل بما لا لبس فيه بأن الطعوم الذاتية هي المعيار الذهبي إلا أن عواملَ أخرى كالأذى الحاصل في المنطقة المتبرعة ومحدودية كمية العظم التي يمكن الحصول عليها دفعت بالممارسين للبحث عن بدائل [3].

لطالما استعملت مادّة الكورالين Coralline المشتقة من المرجان والتي تتألف بشكل رئيسي من كربونات الكالسيوم CaCo3 في عمليات التطعيم العظمي، وذلك لكونها مادّة قابلة للامتصاص ومتقبلة حيوياً [4]، وتتشابه قشور بيض الطيور من حيث بنيتها المعدنية مع المرجان بنسبة 95%.

وقد درست كمادّة تطعيم عظمي في الحفرة الفموية[5]، فهي تتألف بشكل رئيسي من الكالسيوم والفوسفور والمغنيزيوم والصوديوم كمكونات لا عضوية، كما تعدُّ من المواد بيولوجية التدرك (الاستقلاب) Biodegradable التي يسهل الحصول عليها. وقد بيّنت العديد من الدراسات وجود تأثيرات إيجابية لهذه المادّة في الاستقلاب العظمي ما يجعلها مرشحة لأن تكون مادّة تطعيم عظمي ذات شأن[6،7]، فهي تحتوي على مادّة كربونات الكالسيوم التي أشارت العديد من الدراسات على حيوانات التجارب إلى أنها تتمتع بخواص الناقلية العظمية والتقبل الحيوي[8-10].

ومع أنَّ المادّة المكونة لقشرة بيض الطيور قد طرحت واستخدمت في السابق كمادّة تطعيم عظمي، لكنّ المعلومات ما تزال محدودة جداً عن استخدامها بمختلف الأشكال، أو مشاركتها مع مواد أخرى.

تبيّن بأن المواد الحيوية المخلوطة مع عوامل النمو مثل بروتينات التخلق العظمي BMPs يمكن أن تشكل مقاربة فعالة في هندسة النسيج العظمي؛ لأنّها قادرة على أداء الدورين: أولاً دور السقالة، وثانياُ دور المنظومة الدوائية التي تعزز عملية الترميم، وإعادة التشكيل العظمي.

ينتمي بروتين BMP7 إلى عائلة عوامل النمو التي تؤدي دوراً رئيسياً في عملية التكاثر الخلوي والتمايز وتصنيع المكونات القالبية فضلاً عن دوره في عمليات الموت الخلوي المبرمج apoptosis. كما يشير اسمه فهو يطلق ويعزز وينظم إعادة تشكيل الأنسجة العظمية والغضروفية تطوّرها ونموها ونمو. يستخدم بروتين BMP7 في ترميم العيوب العظمية نظراً لدوره المحرض ويمكن مشاركته مع العديد من المواد التطعيمية. ولا تزال استعمالاته في مجالات الجراحة الفموية قيد البحث والدراسة.

هدفت دراستنا إلى تقييم فعالية تطبيق مادّة كربونات الكالسيوم المشتقة من بيض الدجاج فضلاً عن تقييم مشاركتها مع بروتين التخلق العظمي BMP7 عند الأرانب.

المواد والطرائق:

بعد الحصول على الموافقات الأخلاقية لإجراء البحث، أُجْرِيَ البحث على 20 من الأرانب النيوزيلندية البيضاء التي تزن بين 2000 و2500 غرام؛ وذلك في حواضن حيوانات التجربة في كلية الصيدلة بجامعة دمشق.

تحضير بيض الدجاج: اِشْتُرِيَ بيض الدجاج من السوق المحلية ، وقد غُسِلَ بماء مقطر ومعقم بعد تفريغ محتوى البيضة، ثم أزيلَتِ الأغشية الداخلية والخارجية بلطف، بعدها سحقت القشور، وغُرْبِلَتِ لاستخراج القطع التي بقطر 1 ملم. وغسلت البودرة 3 مرات بالماء المقطر المعقم مع الرج مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة، ثم وضعت في الاوتوغلاف بدرجة حرارة 136 درجة مئوية مدة 18 دقيقة[5].

خلطت 10غرامات من البودرة مع 10 ميكروغرام من بروتين BMP7 من شركة (Germany،PROspec) وحفظت بدرجة حرارة أقل من 18 درجة مئوية تمهيداً لتطبيقها.

الإجراءات الجراحية:

تمت الإجراءات الجراحية تحت التخدير العام بواسطة حقنة عضلية تحتوي على مزيج من Ketamin HCL بجرعة 50 ملغ/كغ و Xzlazine بجرعة 5 ملغ/كغ. حُلِقَ الشعر في منطقة العمل، وعُقِّمَتْ بمحلول بوفيدون- ايودين 10%. أُجْرِيَ بعدها الشق الجراحي، ورُفِعَتْ شريحة كاملة الثخانة وصولاً إلى العظم القاعدي للفك السفلي وجسم الفك العلوي، بعدها أُحْدِثَتْ 3 ثقوب باستخدام سنبلة Trephine بقطر 4 ملم.

وضعنا 0.5 سم^3 من مادّة التطعيم في كل عيب عظمي محدث عشوائياً، وترك العيب الثالث فارغاً كعينة مقارنة، ثم أعيدت الأنسجة الرخوة إلى مكانها، وخِيطَتِ الشرائح بواسطة خيوط من الحرير 3-0.

تحضير الخزعات النسيجية والتحليل الشكلي:

ضُحِّيَ بالحيوانات بعد 15 يوماً (المجموعة الأولى) و30 يوماً (المجموعة الثانية)، و60 يوماً (المجموعة الثالثة)؛ وذلك باستخدام جرعة مفرطة من الكيتامين والكزالين. قسمت الحيوانات عشوائياً بين مجموعات الدراسة. أزيلت عظام الفكين من الأرانب وأُخِذَ بلوك عظمي من كل منطقة عمل، وأُنْجِزَتِ الإجراءات التقييمية والنسيجية في قسم النسج والتشريح المرضي بكلية طب الأسنان في جامعة دمشق، حيث ثُبِّتَتِ الخزعات مع الأنسجة الرخوة المحيطة بها بواسطة الفورمالين 10%، ثم خُسِفَتْ بحمض الآزوت 10% بعدها غُسِلَتْ بالماء. بعد الحلمهة والإدماج بشمع البرافين قُطِعَتِ الخزعات بمقاطع سماكتها 5 ميكرومتر، بعدها وضعت الشرائح في حمّامين من الاكزيلول 2 د، ثم وُضِعَتْ في الكحول المطلق، ثمّ الكحول 95%، ثم 70%،50% مدة 2 د لكل حمّام. بعدها تُغْسَلُ في الماء وتوضع في الهيماتوكسيلين بضع دقائق ثمّ تُغسل، ثمّ توضع في الايوزين 1- 5،1 د، تغسل بالماء، ثمّ توضع في حمامات الكحول والاكزيلول المتعاقبة، وبعدها يتم الستر باستخدام بلسم كندا.

أُجْرِيَ التحليل الشكلي للخزعات بعد أخذ صور للعينات كلّها تحت المجهر الضوئي، وحُدِّدَتِ الكميات النسبية للأنماط النسيجية في كل عينة باستخدام برنامج Photoshop cs5، عن طريق إجراء القياسات الشكلية الآتية: 1-أبعاد المنطقة المعيبة الإجمالي، 2- مساحة العظم حديث التشكل، 3- العظم المتموت، 4- العظم المتبقي. بعدها اِسْتُنْبِطَتْ النسب المئوية للقيم وحدِّدت علاقتها مع مساحة العيب الإجمالية كما يأتي:

1- النسبة المئوية للعظم حديث التشكل= مساحة العظم الجديد/كامل مساحة العيب *100

2- نسبة الطعم المتبقية = مساحة الطعم المتبقي/ كامل مساحة العيب *100

أجريت الدراسة الإحصائية باستخدام اختبار Anova ثنائي الاتجاه عند P<0.05.

النتائج:

تمت عملية الشفاء التالي للعمل الجراحي بهدوء ولم يسجل حدوث أي ردة فعل تجاه الجس(الطعم). (الطعم).

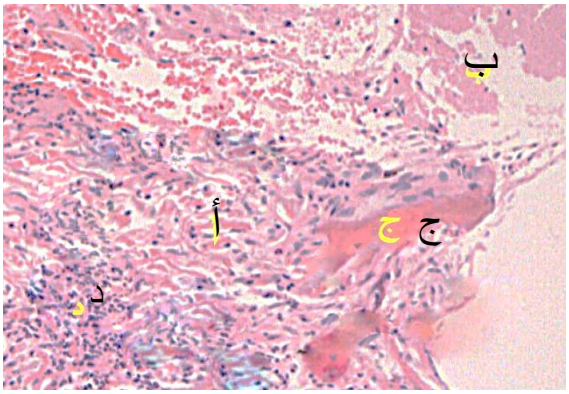
الموجودات النسيجية:

في اليوم 15: امتلأت مناطق الفقد في العينات جميعها بنسيج ضام ليفي كانت نسبته أدنى في المناطق المملوءة بالمادّة (أ). كما لاحظنا تكاثراً واضحاً للخلايا الالتهابية في النسيج الضام ضمن الفراغات التي ملئت ببودرة قشر البيض فقط (ب) بنسبة تقارب العينة الشاهدة التي تركت فارغة، كما لاحظنا بقايا مادّة التطعيم في العينتين بنسب متقاربة. كانت كمية العظم المتشكلة في المادّة (أ) ضئيلة نسبياً، في حين لم نلاحظ أي بنية عظمية حقيقية في المادّة (ب) أو العينة الشاهدة. كما لوحظ وجود نسيج عظمي متموت في مناطق العيوب جميعها بنسبة أكبر في العينة الشاهدة .

في اليوم 30: لوحظت زيادة في كمية العظم المتشكل على حساب الانخفاض في كمية العظم المتموت والنسيج الليفي، كما لوحظ انخفاض كمية المادّة المتبقية من الطعم. كانت كمية العظم المتشكل في المادّة (أ) أكبر بوضوح.

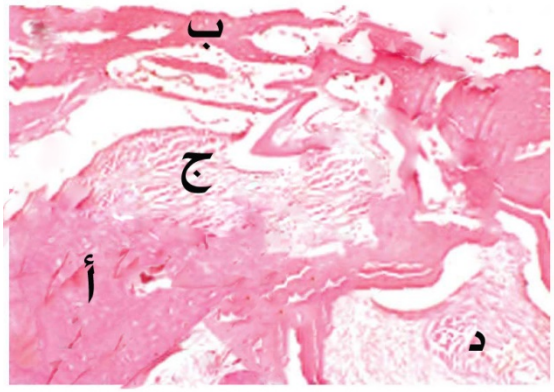
في اليوم 45: لوحظ تشكل عظمي جيد في العينات جميعها، مع غياب المظاهر الالتهابية ووجود نسبة ضئيلة من العظم المتموت، خاصة في العينة الشاهدة.

أي حدث شفاء تام لمنطقة العيب العظمي في المادّة (أ) دون أن نلاحظ أي بقايا لمادّة التطعيم، في حين وجدت كمية ضئيلة من البقايا في المادّة (ب). أمَّا العينة الشاهدة فقد أظهرت كمية تشكل عظمي أقل نسبياً من عينتي الدراسة.



شكل (1) الصورة النسيجية لمنطقة العيب العظمي المملوء بالمادة (أ) بعد 15 يوماً.

أ: النسيج المتموت، ب: بقايا مادة الطعم، ج: النسيج العظمي حديث التشكل، د: الرشاحة الالتهابية

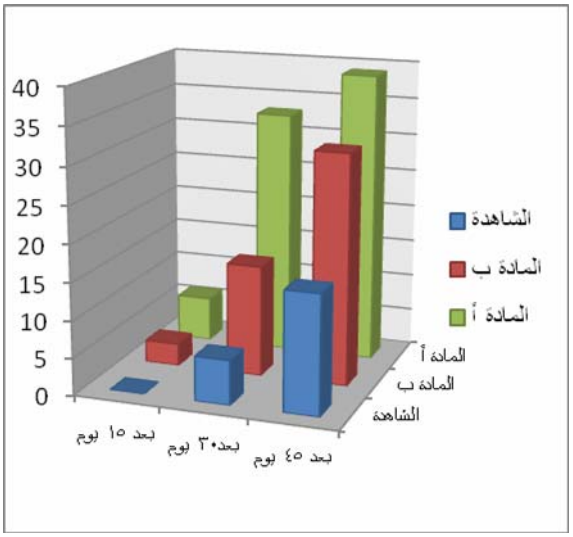


شكل (2) صورة نسيجية لمنطقة العيب العظمي المملوء بالمادة (ب) بعد 45 يوماً.

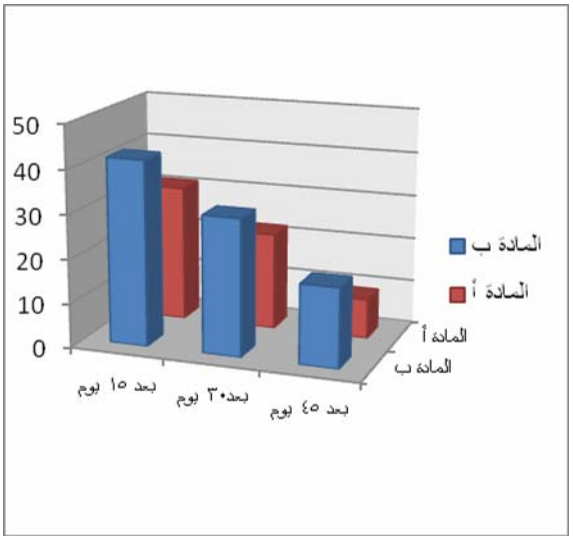
أ: النسيج العظمي المتشكل، ب: قاعدة منطقة العيب، ج: نسيج متموت، د: بقايا مادة الطعم.

إحصائياً: وجدنا فرقاً إحصائياً واضحاً بين نسبة النسيج العظمي المتشكل في اليومين 30 و 45؛ وذلك بين العينة الشاهدة وعينات الدراسة، كما نلاحظ تشكل النسيج العظمي في اليوم 45 في العينات جميعها مقارنة باليوم 15. وقد لوحظت نسبة أكبر من النسيج العظمي في المادّة (أ) تليها (ب) ثم العينة الشاهدة. وقد امتصت مادّة الطعم تدريجياً،

واِسْتُبْدِلَ بها النسيج العظمي الجديد. كما كانت نسبة كمية الطعم المتبقية في المادّة (أ) هي الأدنى.



مخطط (1) نسبة النسيج العظمي المتكون في عينات الدراسة والعينة الشاهدة



مخطط (2) نسبة مادّة التطعيم المتبقية خلال مدة الدراسة .

المناقشة:

كان الهدف من هذا البحث هو تقييم دور مادّة التطعيم العظمي المشتقة من قشور بيض الدجاج – سواء بمفردها أو بخلطها مع بروتين التخلق العظمي BMP7– في ترميم العيوب العظمية المحدثة في عظام الفكين عند حيوانات التجربة.

وكما أشرنا فقد استعملت العديد من مواد التطعيم العظمي المكونة من مادّة كربونات الكالسيوم على نطاق واسع في مجال طب الأسنان. وقد أتت الفكرة من كون التركيب الكيميائي لمادّة CaCo3 المشتقة من قشور البيض تتشابه تقريباً مع نظيرتها الموجودة في النسيج العظمي للمضيف[7،10].

أشارت دراسة Dupoirieuxet al إلى أن مواد التطعيم المشتقة من قشور البيض تتمتع بقابلية الامتصاص من قبل جسم المضيف، وبعد متابعة استمرت عاماً كاملاً تبيّن أن المادّة قد امتصت بشكل تام، وأن قابلية الامتصاص والاستقلاب تعتمد على حجم جزيئات الطعم[5]. في حين أشارت دراسات عديدة أجريت على بيض النعام إلى أن الجزيئات الصغيرة سريعة الامتصاص تملك معدلاً أقل من حيث تكوينها للنسيج العظمي؛ في حين أن الجزيئات الكبيرة تعطي كمية أكبر من العظم بعد أشهر من تطبيقها[7].

استخدمنا في دراستنا جزيئات بحجم 1 ملم؛ وهذا قد يكون له دور في زيادة كمية التشكل العظمي في مناطق العيوب، وهذا ما تتفق عليه معظم البحوث[8].

وجدنا في دراستنا كمية ضئيلة من بقايا مادّة التطعيم في اليوم 45 من التجربة، وذلك في عناصر العينة جميعها، وهذا يتوافق مع الدراسات السابقة التي ربط معظمها بين حجم الجزيئات والتأثير المحرض على بناء العظم الذي تمتلكه هذه المادّة.

تعدُّ قدرة مادّة التطعيم العظمي على الإسهام في شفاء الجروح فضلاً عن تحريضها على التشكل العظمي من الأمور المهمة التي تراقبها أغلب الدراسات، لكننا لم نلاحظ أي دور لمادّة قشر البيض في هذا الإطار إلاّ عند إضافة بروتين BMP7، وهنا يمكن رد سرعة شفاء الجرح إلى التأثير الذي يؤديه هذا البروتين على خلايا النسيج الضام [11، 12].

ظهرت النسبة العليا من النسيج العظمي المتشكل في العيوب التي ملئت بالمادّة (أ) الحاوية على مادّة قشر البيض الممزوجة مع بروتين التخلق العظمي BMP7 الذي يعرف بقدرته على تحريض سلسلة من ردود الفعل الخلوية التي تقود في النهاية إلى تكوين نسيج عظمي جديد، إذْ يقوم هذا البروتين باستدعاء الخلايا الجذعية الميزانشيمية القريبة، ويحرض تمايزها إلى خلايا غضروفية خلال 5 إلى 7 أيام، وبعدها يبدأ النسيج العظمي بالتشكل بعد 9 إلى 12 يوماً على زرع الطعم، يخضع بعدها النسيج العظمي المتشكل إلى عملية إعادة تشكل remodeling وتتكون الترابيق العظمية و تمتلئ بمادّة النقي خلال 14 إلى 21 يوماً؛ وهذا يفسر مشاهداتنا النسيجية في الخزعات المملوءة بالمادّة (أ) إذْ كانت هي الوحيدة التي أبدت تنشوءاً عظمياً واضحاً بعد 15 يوماً. تدعى العملية السابقة بالتعظم الغضروفي إلاّ أنّ الدراسات أشارت إلى قدرة بروتين BMP7 على تحريض الخلايا الميزانشيمية على التحول إلى خلايا صانعة للعظم بشكل مباشر متجاوزة المرحلة الغضروفية؛ وهذا ما يسمى بالتعظم الغشائي[13، 14].

أظهرت العيوب المملوءة بمادّة قشر البيض فقط كمية أكبر من التشكّل العظمي بالمقارنة بالعيوب التي تركت فارغة؛ وذلك خلال مدة الشفاء، وهذا يتوافق مع معظم الدراسات السابقة[5، 7، 10] وهذا يشير إلى قابلية هذه المادّة للامتصاص والاستبدال بنسيج عظمي حديث، لكن هذه القدرة تبقى محدودة نسبياً إذا لم تمزج هذه الطعوم مع محرضات للنمو العظمي.

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن كمية المادّة المتبقية من الطعم قد انخفضت بمرور الوقت تدريجياً، وبشكل متزامن مع استبدالها بمادّة النسيج العظمي حديث التشكل، وهذا أيضاً كان متوافقاً مع الدراسات السابقة [5، 10].

لم تبدِ حيوانات التجربة أي رد فعل مناعي واضح أو رفض أو تحسس تجاه مادّة الطعم، ويدعم ذلك مشاهداتنا النسيجية التي لم تلحظ أي وجود للخلايا الحمضة في الرشاحة الالتهابية في أي من مدد الدراسة. فضلاً عن ذلك لم نلاحظ وجود رد فعل شديد تجاه الجسم الأجنبي أو ارتشاحاً كثيفاً بالعدلات أو أنسجة متموتة أو خلايا بالعات عملاقة؛ وهذا يشير إلى التقبل الحيوي لمادّة قشر البيض وإمكان استعمالها كمادّة تطعيم عظمي.

الاستنتاج:

تبيّن أن مواد التطعيم العظمي المشتقة المكونة من كربونات الكالسيوم، والمشتقة من قشور بيض الدجاج هي مواد متقبلة حيوياً، وتملك القدرة على تعزيز التشكل العظمي، وقد لاحظنا فرقاً واضحاً بين المناطق الخاضعة للتطعيم وغير الخاضعة بعد 30 يوماً. كما تساعد إضافة عوامل النمو مثل BMP7 على تقليل زمن الشفاء والترميم العظمي.

التوصيات:

يمكن ضمن حدود هذه الدراسة عدّ مادّة كربونات الكالسيوم المشتقة من قشور بيض الدجاج مادّة قابلة للاستعمال في إجراءات التطعيم العظمي نظراً لسهولة استعمالها، وانخفاض تكاليفها، ولا تزال هناك حاجة لمزيد من الدراسات عن أشكال تطبيقاتها السريرية.

Reverence

.1Kempen DH، Creemers LB، Alblas J، Lu L، Verbout AJ، Yaszemski MJ، et al. Growth factor interactions in bone regeneration. Tissue Eng Part B Rev 2010;16(6):551-66.
.2Romagnoli C، D'Asta F، Brandi ML. Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. Clin Cases Miner Bone Metab 2013;10(3):155-61.
.3Moy PK، Lundgren S، Holmes RE. Maxillary sinus augmentation: histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. J Oral Maxillofac Surg 1993.62-857:(8)51؛
.4Yukna RA، Yukna CN. A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (BIOCORAL) bone replacement grafts in infrabony defects. J Clin Periodontol 1998;25(12):1036-40.

.5Dupoirieux L، Pourquier D، Neves M، Teot L .Resorption kinetics of eggshell: an in vivo study. J Craniofac Surg 2001;12(1):53-8.
.6Dupoirieux L. Ostrich eggshell as a bone substitute: a preliminary report of its biological behaviour in animals--a possibility in facial reconstructive surgery. Br J Oral Maxillofac Surg 1999;37(6):467-71.
.7Durmus E، Celik I، Aydin MF، Yildirim G، Sur E. Evaluation of the biocompatibility and osteoproductive activity of ostrich eggshell powder in experimentally induced calvarial defects in rabbits. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2008;86(1):82-9.
.8Durmus E، Celik I، Ozturk A، Ozkan Y، Aydin MF. Evaluation of the potential beneficial effects of ostrich eggshell combined with eggshell membranes in healing of cranial defects in rabbits. J Int Med Res 2003;31(3.30-223:(
.9Uraz A، Gultekin SE، Senguven B، Karaduman B، Sofuoglu IP، Pehlivan S، et al. Histologic and histomorphometric assessment of eggshell-derived bone graft substitutes on bone healing in rats. J Clin Exp Dent 2013;5(1):e23-9.
.10Park JW، Bae SR ،Suh JY، Lee DH، Kim SH، Kim H، et al. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: a pilot study. J Biomed Mater Res A 2008;87(1):203-14.
.11Gavenis K، Schneider U، Groll J، Schmidt-Rohlfing B. BMP-7-loaded PGLA microspheres as a new delivery system for the cultivation of human chondrocytes in a collagen type I gel: the common nude mouse model. Int J Artif Organs 2010;33(1):45-53.
.12Cloutier M، Girard B، Peel SA، Wilson D، Sandor GK، Clokie CM، et al. Calvarial bone wound healing: a comparison between carbide and diamond drills، Er:YAG and Femtosecond lasers with or without BMP-7. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;110(6):720-8.
.13Kim HK، Kim JH، Park DS، Park KS، Kang SS، Lee JS، et al .Osteogenesis induced by a bone forming peptide from the prodomain region of BMP-7. Biomaterials 2012;33(29):7057-63.
.14Sampath TK، Maliakal JC، Hauschka PV، Jones WK، Sasak H، Tucker RF، et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. J Biol Chem 1992;267(28):20352-62.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2015/12/08.
تاريخ قبوله للنشر 2016/01/27.