



Τμήμα Οδοντιατρικής
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Εργαστήριο Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής,
Χειρουργ. Εμφυτευματολογίας &
Ακτινολογίας

Διευθυντής: ο Αν. Καθηγ. Νικόλαος Παρίσης

«Εκτίμηση της οστεογένεσης σε τεχνητά
οστικά ελλείμματα με ή χωρίς τον
αποκλεισμό της μυελώδους μοίρας της
κνήμης σε κουνέλια»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία
Κωνσταντίνος Κούγιας
Μεταπτυχιακός φοιτητής

Ιανουάριος 2008

Επιβλέπον μέλος Δ.Ε.Π. :

Βέης Αλέξανδρος

Λέκτορας, Εργαστήριο Οδοντοφατνιακής Χειρουργικής,
Χειρουργικής Εμφυτευματολογίας & Ακτινολογίας

Στους γονείς μου και τη σύζυγό μου...

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	4
Υλικά και Μέθοδος	7
Προετοιμασία Δειγμάτων	10
Αποτελέσματα / Στατιστική Ανάλυση Ιστομορφομετρίας	14
Ιστολογικά αποτελέσματα	16
Συζήτηση	18
Συμπεράσματα	24
Βιβλιογραφία	25
Παραρτήματα	
A: Φωτογραφική παρουσίαση χειρουργικού πρωτοκόλλου	34
B: Στατιστική Ανάλυση	36
Γ: Βεβαίωση της Επιτροπής Ερευνών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης	42

Εισαγωγή

Η επιτυχής θεραπεία με οδοντικά εμφυτεύματα απαιτεί την ύπαρξη επαρκούς οστικού υπόβαθρου τόσο σε ύψος, όσο και σε εύρος. Η τοπική, ή γενικευμένη απώλεια του φατνιακού οστού μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών αιτιών όπως τραυματισμός κακοήθεια, ή χρόνια φλεγμονώδης περιοδοντίτιδα. Για να αποκατασταθεί η απώλεια του οστού σε διαθέσιμο όγκο που να επαρκεί για την τοποθέτηση οστεοενσωματούμενων εμφυτευμάτων εφαρμόζεται η τεχνική της κατευθυνόμενης οστικής αναγέννησης (ΚΟΑ)⁽¹⁾. Στην τεχνική ΚΟΑ είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση μιας μεμβράνης αποκλεισμού ταχέως αναπτυσσόμενων επιθηλιακών κυττάρων ^(2,3) ούτως ώστε ο προστατευμένος χώρος να αποικηθεί από τα βραδύτερα εξελισσόμενα οστεογενετικά κύτταρα. Για να διατηρηθεί ο χώρος κάτω από τη μεμβράνη αλλά και για να καθοδηγηθεί η οστική αναγέννηση συχνά χρησιμοποιούνται οστικά μοσχεύματα (βιολογικά ή συνθετικά) ⁽⁴⁻⁷⁾.

Οι ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τις δυνατότητες ενός μοσχεύματος είναι τρεις: η οστεογένεση, η οστεοκαθοδήγηση και η οστεοεπαγωγή⁽⁸⁾. Ως οστεογένεση χαρακτηρίζεται η διαδικασία κατά την οποία νέο οστό δημιουργείται απ' ευθείας από ζωντανά κύτταρα. Ο όρος οστεοκαθοδήγηση περιγράφει τη διαδικασία κατά την οποία το νέο οστό δημιουργείται άμεσα στη δομή ενός βιοσυμβατού υλικού από οστεογενετικά κύτταρα που προέρχονται από το υπάρχον οστό. Η οστεοκαθοδήγηση είναι μια παθητική διαδικασία ενώ το μόσχευμα αποτελεί ένα τρισδιάστατο ικρίωμα το οποίο διηθείται από αγγεία, οστεογενετικά κύτταρα και σταδιακά απορροφάται και αντικαθίσταται από νέο οστό. Η οστεοεπαγωγή είναι η ικανότητα ενός μοσχεύματος να διεγείρει και να διαφοροποιεί πολυδύναμα κύτταρα, όπως για παράδειγμα τα μεσεγχυματικά κύτταρα και άλλα αρχέγονα οστεογενετικά κύτταρα. Τα

διάφορα οστικά μοσχεύματα είτε φυσικά, είτε συνθετικά διαθέτουν ως ένα βαθμό μέρος ή όλα τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά.

Το αυτόλογο μόσχευμα παρουσιάζει και τα τρία χαρακτηριστικά και κατά συνέπεια θεωρείται το μέτρο σύγκρισης (Gold Standard) με το οποίο συγκρίνονται όλα τα άλλα μοσχεύματα ^(9,10). Ωστόσο παρουσιάζει και αρκετά μειονεκτήματα όπως το γεγονός ότι βρίσκεται σε περιορισμένες ποσότητες, απαιτεί επιπρόσθετο χειρουργικό πεδίο με πιθανές συνοδές επιπλοκές και ενδεχόμενα γενική αναισθησία εφόσον το μόσχευμα λαμβάνεται εξωστοματικά (λαγόνιο, στέρνο) ⁽¹¹⁾.

Οι ανάγκες για μεγαλύτερες ποσότητες απαιτούμενου μοσχεύματος οδήγησε στην έρευνα και την ανάπτυξη βιολογικών και συνθετικών οστικών μοσχευμάτων ⁽¹²⁾.

Σε ένα μεγάλο αριθμό ερευνητικών εργασιών έχει χρησιμοποιηθεί το πειραματικό μοντέλο της διάνοιξης οστικών ελλειμμάτων σε κνήμη κουνελιού με σκοπό την εκτίμηση της οστεογενετικής δυνατότητας διάφορων οστικών μοσχευμάτων με ή χωρίς οδοντικά εμφυτεύματα. ⁽¹³⁻⁵⁴⁾

Σε όλες αυτές τις έρευνες δεν έχει αξιολογηθεί το κατά πόσον το νέο οστό δημιουργείται από τα τοιχώματα του τεχνητού οστικού ελλείμματος ή από την αποδεδειγμένη οστεογενετική δυνατότητα του μυελού των οστών. Η δυνατότητα αυτή έχει αποδειχθεί από πρωτοπόρες έρευνες από τον Friedenstein και τους συνεργάτες του από το 1976 ^(55,56) όταν και απέδειξαν την ύπαρξη των αρχέγονων και πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων στον μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε πρόδρομα (precursor) κύτταρα που με τη σειρά τους μπορούν να παράγουν μυελοβλάστες, χονδροβλάστες και οστεοβλάστες ⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾.

Κατά την μελέτη της οστεογενετικής δυνατότητας μοσχευμάτων και υλικών στο πειραματικό μοντέλο κνήμης κουνελιού θεωρούμε ότι θα πρέπει να απομονωθεί η οστεογενετική δυνατότητα του οργανισμού ώστε να αναδειχθεί η δυναμική οστεογενετική ικανότητα του υπό έλεγχο μοσχεύματος. Για αυτόν το λόγο η πειραματική υπόθεση του αποκλεισμού της οστεογενετικής δραστηριότητας του μυελού των οστών αφήνει το περιθώριο στη δημιουργία νέου οστού μόνο από τα οστικά τοιχώματα του τεχνητού ελλείμματος και του υπερκείμενου περιοστέου. Πριν λοιπόν, τη

δοκιμασία των δυνατοτήτων των οστικών μοσχευμάτων θα πρέπει να ερευνηθεί η μορφή της παρέμβασης του μυελού της κνήμης κουνελιού κατά την αυθόρμητη οστεογένεση τεχνητών οστικών ελλειμμάτων χωρίς οστικό μόσχευμα γεγονός το οποίο αποτελεί το σκοπό της παρούσης έρευνας.

Η έρευνα διεξήχθη σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας ερευνών της επιτροπής ερευνών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης βεβαίωση της οποίας υπάρχει στο παράρτημα Γ.

Υλικά και Μέθοδος

Στο πειραματικό στάδιο χρησιμοποιήθηκαν 10 κουνέλια Νέας Ζηλανδίας και των δύο φύλων, βάρους 3-4 κιλών τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες των 5. Η φύλαξη έγινε σε ξεχωριστά κλουβιά, και η διατροφή τους αποτελείτο από ξηρά τροφή και νερό κατά βούληση (*ad libitum*) σύμφωνα με τις αρχές του Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών της Επιτροπής Ερευνών του Α.Π.Θ.

Χειρουργικό πρωτόκολλο

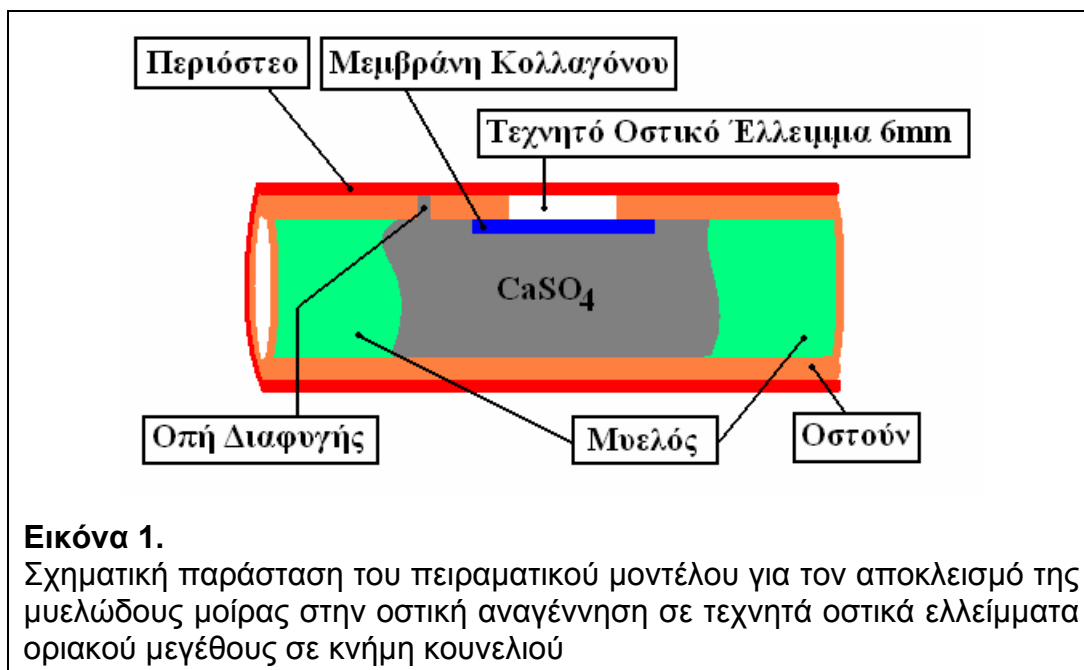
Αναισθησία. Χορηγήθηκε ενδομυϊκά συνδυασμός κεταμίνης 0,2 ml/kg (Imalgene[®] 1000, Merial, Lyon, France) και ξυλαζίνης υδροχλωρικής 0,15 ml/kg (Rompun[®], Bayer, Germany) η οποία επαναλήφθηκε εναλλάξ κατά την διάρκεια της επέμβασης όπου χρειάστηκε.

Χειρουργική επέμβαση. Τα πίσω πόδια του κουνελιού ξυρίστηκαν και απολυμάνθηκαν με ποβιδόνη ιωδιούχο (Betadine[®] 10%. Mundipharma, Switzerland). Ακολούθως αποκαλύφθηκε η κνήμη του κουνελιού με μία επιμήκη τομή ολικού πάχους. Αποκολλήθηκε το περίοστεο και δημιουργήθηκε τεχνητό οστικό έλλειμμα διαμέτρου 6mm με τη χρήση αντίστοιχης διαμέτρου κοίλης εγγλυφίδας (trephine) υπό συνεχή καταιονισμό με φυσιολογικό ορό ενώ δημιουργήθηκε, ένα εκατοστό παρακείμενα του τεχνητού ελλείμματος, οπή διαφυγής από στρογγύλη εγγλυφίδα διαμέτρου 1,25mm.

Στην πρώτη πειραματική ομάδα για να επιτευχθεί αποκλεισμός της μυελώδους μοίρας αποφασίστηκε να αφαιρεθεί ο μυελός της κνήμης του κουνελιού κάτω από το υπερκείμενο τεχνητό οστικό έλλειμμα και να χρησιμοποιηθεί μία μεμβράνη αποκλεισμού. Για να σταθεροποιηθεί η μεμβράνη και να αποκατασταθεί το κενό που δημιουργήθηκε από την αφαίρεση του μυελού ήταν απαραίτητο ένα στερεό βιοσυμβατό υλικό. Το βιοσυμβατό υλικό που επελέχθη ήταν το θειούχο ασβέστιο, ή «Γύψος των Παρισίων» (Plaster of Paris, PoP).

Υπερκείμενα της γύψου των Παρισίων και κάτω από το τεχνητό έλλειμμα τοποθετήθηκε τεμάχιο μεμβράνης από λυοφιλοποιημένο κολλαγόνο (Biocollagen[®], Bioteck, Arcugnano, Italy) στο εσωτερικό του αυλού της κνήμης ένα χιλιοστό μεγαλύτερο από το τεχνητό έλλειμμα. Ακολούθως

νεαροποιήθηκε το οστό στις παρυφές του ελλείμματος και απομακρύνθηκαν ρινίσματα οστού και υπολείμματα γύψου με καταιονισμό φυσιολογικού ορού. Το θειούχο ασβέστιο (PoP) εξασφαλίζει την υποστήριξη της μεμβράνης στη θέση της, ενώ η μεμβράνη αποκλείει τυχαία μετανάστευση οστεογενετικών κυττάρων από την περιοχή του μυελού εφ' όσον αυτά διηθήσουν με τον καιρό το PoP. Ακολούθησε συρραφή κατά στρώματα α) του περιστέου με απορροφήσιμα ράμματα (πολυγλυκολικού οξέος , Medipac , Kilkis, Greece) και β) συρραφή του δέρματος με μη απορροφήσιμα ράμματα μετάξης (Medipac , Kilkis, Greece). Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας απεικονίζεται στην εικόνα 1.



Στη δεύτερη πειραματική ομάδα, η οποία αποτελούσε και την ομάδα ελέγχου δεν τοποθετήθηκαν μεμβράνες και POP στα τεχνητά οστικά ελλείμματα αλλά πραγματοποιήθηκε μόνον συρραφή κατά στρώματα ομοίως με την προηγούμενη πειραματική ομάδα.

Αναλγησία. Χορηγήθηκε ενδομυϊκά κετοπροφένη (Romefen[®] 100mg/ml σε αραιώση 1/10, Rhone, Merieux GMBH, Germany) άπαξ μετά την χειρουργική επέμβαση.

Αντιβίωση. Χορηγήθηκε υποδορίως αντιβιοτικό ευρέος φάσματος της ομάδας των φθωροκινολονών -Enrofloxacin 0,1ml/kg (Baytril 5%[®], Bayer, Germany) άπαξ ημερησίως για τρεις ημέρες συμπεριλαμβανομένης της ημέρας της εγχείρησης.

Κατά την διάρκεια της εκτέλεσης της πειραματικής φάσεως, ένα από τα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου απεβίωσε από ασαφείς λόγους, χωρίς την ύπαρξη εμφανούς φλεγμονής, ωστόσο αντικαταστάθηκε από νέο πειραματόζωο.

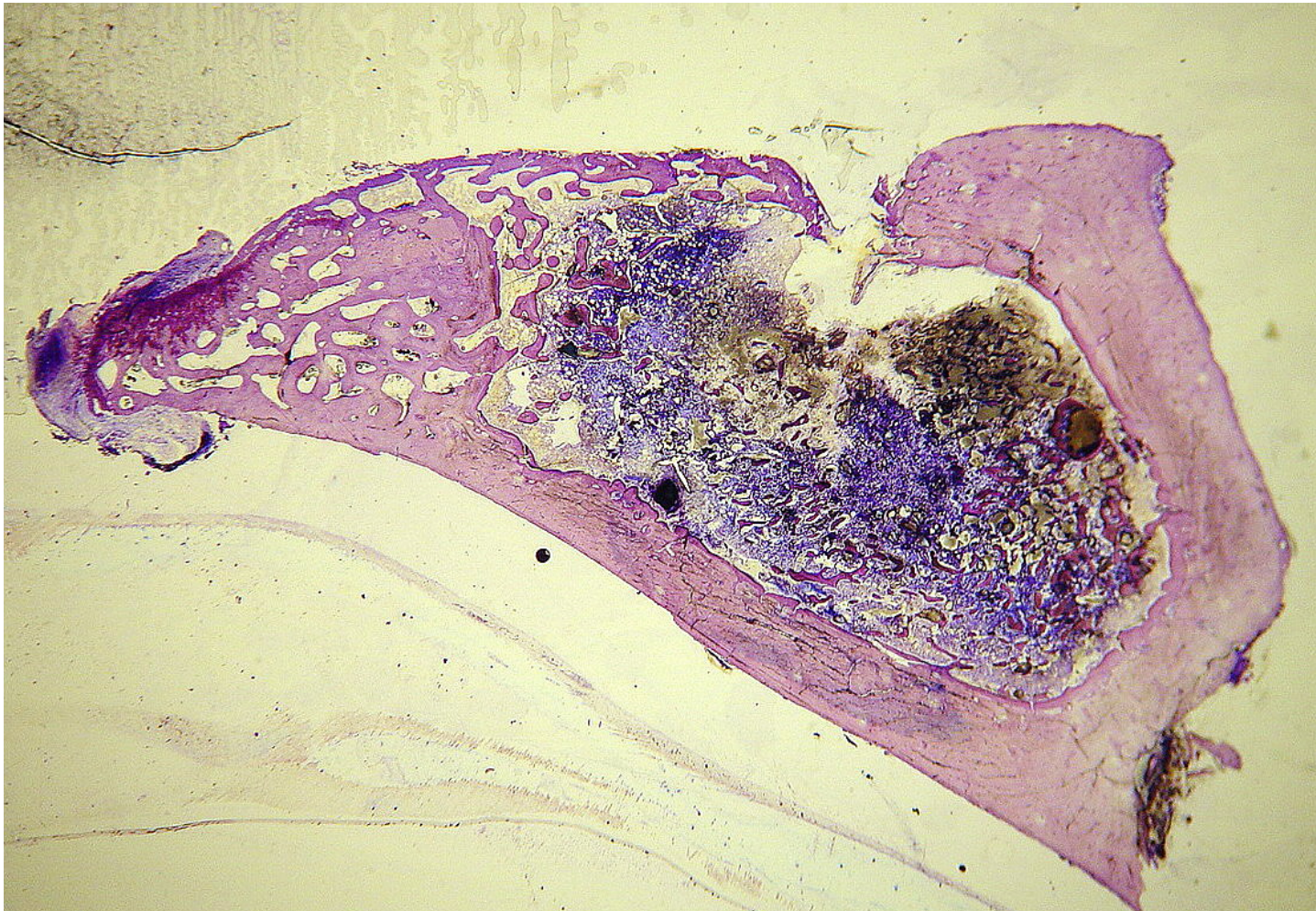
Η χειρουργική διαδικασία απεικονίζεται φωτογραφικά στο Παράρτημα Α.

Προετοιμασία Δειγμάτων και Ιστομορφομετρική Ανάλυση

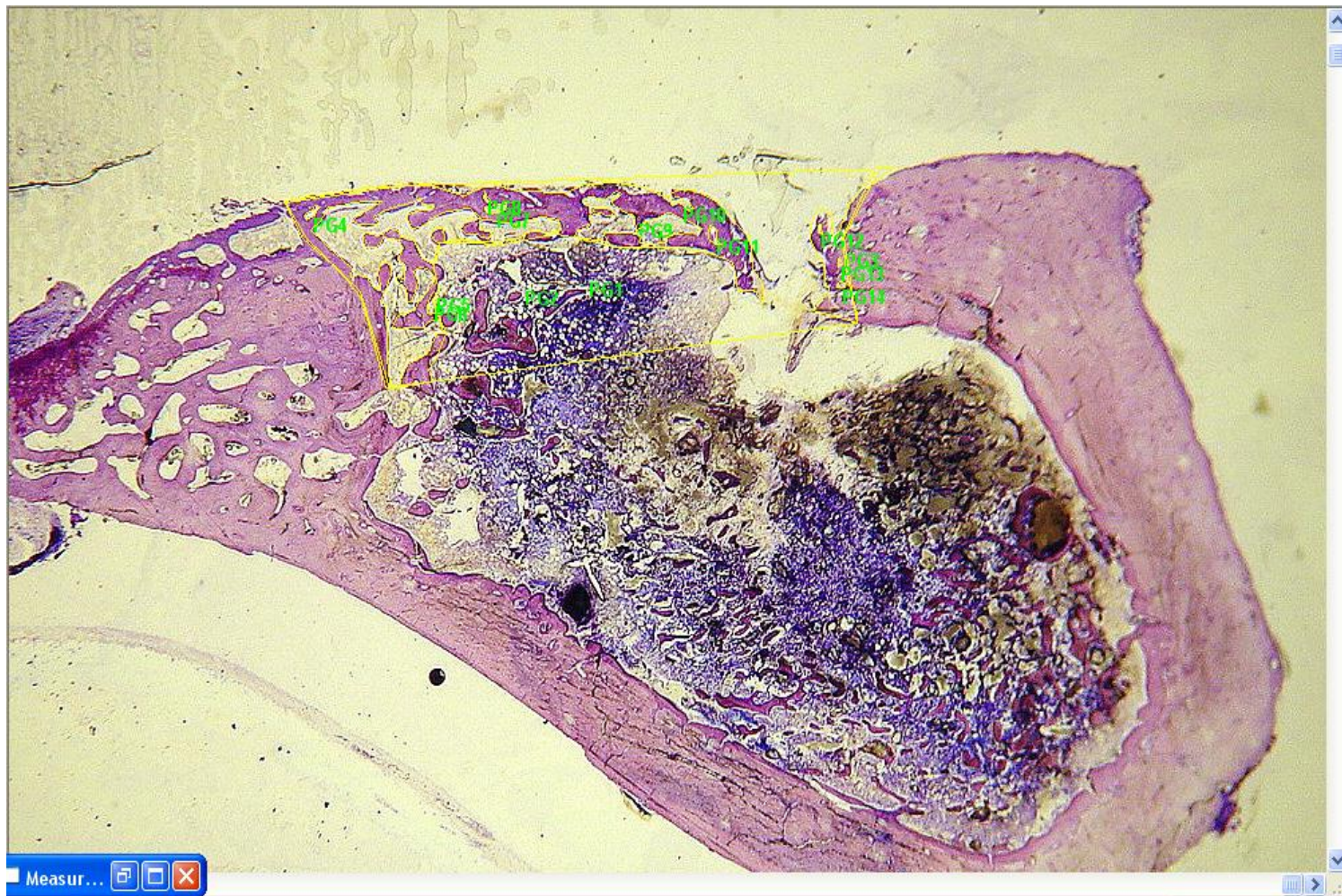
Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν στις οκτώ (8) εβδομάδες χορηγώντας τους ενδοφλεβίως υπερβολική δόση χλωριούχου καλίου 10% (DEMO S.A., Athens, Greece) αφού πρώτα είχαν αναισθητοποιηθεί με την μέθοδο που περιγράφεται παραπάνω στο χειρουργικό πρωτόκολλο και ανακτήθηκαν οι κνήμες. Για να εκτιμηθεί η οστεογένεση στα τεχνητά οστικά ελλείμματα τα δείγματα προετοιμάστηκαν για την ιστολογική ανάλυση με την τεχνική των μη απασβεστωμένων τομών ^(61,62). Κόπηκαν τα τεμαχίδια της κνήμης του κουνελιού με το τεχνητό έλλειμμα με πριόνι χειρός και ακολούθως μονιμοποιήθηκαν σε διαλύματα φορμόλης 30% (1 ώρα) και συντηρήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% (48 ώρες). Στη συνέχεια αφυδατώθηκαν με εμβύθιση σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθυλικής αλκοόλης σε χρονικό διάστημα έξι (6) ημερών. Ακολούθησε εγκλεισμός των δειγμάτων σε διαλύματα ρητίνης (Technovit[®] 7200; Heraus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) σε χρονικό διάστημα τεσσάρων (4) ημερών. Τα δείγματα κόπηκαν με μικροτόμο (Accutom II[®] high speed microtome, Struers, Copenhagen, Denmark) εγκάρσια προς τη διάμετρο του οστικού ελλείματος και επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα χρησιμοποιώντας υγρή φωτοπολυμεριζόμενη ρητίνη (3M[®] ceramic primer και Kulzer Technovit[®] 7210 VLC adhesive). Τα παρασκευάσματα τοποθετήθηκαν ξανά στον μικροτόμο για να κοπούν σε πάχος περίπου 200μ και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε αποτριπτική συσκευή (DAP-V[®], Struers, Copenhagen, Denmark) για να επιτευχθεί η τελική αποτριβή και στίλβωση των δειγμάτων σε πάχος 70μ. Για την χρώση των παρασκευασμάτων χρησιμοποιήθηκε κυανού της τολουιδίνης και πυρονίνη G.

Τα τελικά παρασκευάσματα τοποθετήθηκαν σε μικροσκόπιο διερχόμενου φωτός (Axiostar Plus; Zeiss, Göttingen, Germany) και η εικόνα φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (DC88AP; Sony, Tokyo, Japan). Οι ψηφιοποιημένες εικόνες μεταφέρθηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και επεξεργάστηκαν ως προς τις ιστομορφομετρικές εκτιμήσεις με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Υπολογίστηκαν σχετικές τιμές για

το εμβαδόν του οστικού ελλείμματος, του εμβαδού του νεοσχηματιζόμενου οστού, και για την πυκνότητα του νεοσχηματιζόμενου οστού για κάθε δείγμα (Εικ.2, Εικ.3).



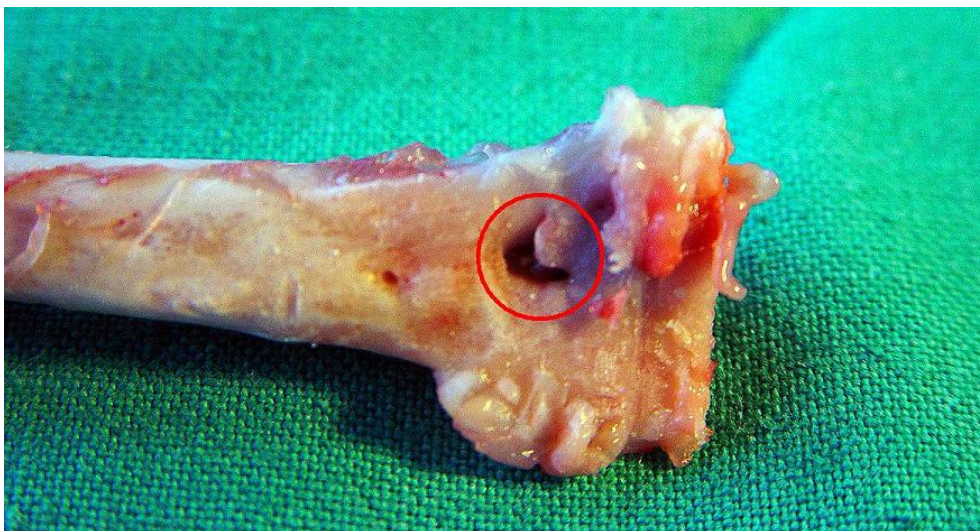
Εικόνα 2. Ψηφιακή εικόνα δείγματος της πειραματικής ομάδας PoP



Εικόνα 3. Το ίδιο δείγμα με την εικόνα 2 με την ιστομορφομετρική ανάλυση όπως αυτή δίνεται από το λογισμικό Image ProPlus.

Αποτελέσματα και Στατιστική Ανάλυση Ιστομορφομετρίας

Μακροσκοπικά και μικροσκοπικά παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα ελέγχου το κενό στο φλοιώδες πέταλο της κνήμης του κουνελιού στη περιοχή του τεχνητού οστικού ελλείμματος γεφυρώθηκε σε όλα τα δείγματα της πειραματικής ομάδας ελέγχου ενώ δε παρατηρήθηκε αντίστοιχη οστική γεφύρωση σε κανένα δείγμα της πειραματικής ομάδας PoP (Εικ.4).



Εικόνα 4. Μακροσκοπική εικόνα μη γεφύρωσης του τεχνητού οστικού ελλείμματος σε δείγμα της ομάδας PoP.

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για να ελεγχθεί η πιθανή διαφορά στις μέσες τιμές για το εμβαδόν του νεοσχηματιζόμενου οστού ανάμεσα στις δύο πειραματικές ομάδες. Τα δείγματα των δύο ομάδων ακολουθούσαν κανονική κατανομή οπότε χρησιμοποιήθηκε ο αντίστοιχος στατιστικός έλεγχος για ανεξάρτητα δείγματα που ακολουθούν κανονική κατανομή (Independent Samples T-Test). Βρέθηκε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας Ελέγχου ($68,08 \pm 12,09$) και μεταξύ της ομάδας PoP ($54,02 \pm 13,93$), βαθμοί ελευθερίας $t(22)=2,615$ $p=0.016 < 0.05$, άρα οι δύο μέσες τιμές ως προς το εμβαδόν του νεοσχηματιζόμενου οστού (Bone Area) διέφεραν στατιστικά σημαντικά.

Ομοίως για τη διαφορά στις μέσες τιμές ως προς την πυκνότητα του νεοσχηματιζόμενου οστού ανάμεσα στις δύο πειραματικές ομάδες πραγματοποιήθηκε ο ίδιος στατιστικός έλεγχος αφού και σε αυτή την

περίπτωση τα δείγματα των δύο ομάδων ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Τα αποτελέσματα του ελέγχου έδειξαν ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας Ελέγχου ($95,99 \pm 1,74$) και μεταξύ της ομάδας PoP ($75,37 \pm 13,27$), βαθμοί ελευθερίας $t(22)=5,546$ $p<0.001$, άρα οι δύο μέσες τιμές ως προς τη πυκνότητα του νεοσχηματιζόμενου οστού (Bone Density) διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Συνοπτική παρουσίαση των μέσων τιμών του εμβαδού και της πυκνότητας του νέου οστού φαίνεται στον πίνακα 1. Η στατιστική ανάλυση παρουσιάζεται λεπτομερέστερα στο Παράρτημα Β.

Πίνακας 1. Συνοπτική παρουσίαση των μέσων τιμών εμβαδού και πυκνότητας νέου οστού των πειραματικών ομάδων.

Πειραματική Ομάδα	Εμβαδόν Νέου Οστού (Μέση τιμή %)	Πυκνότητα Νέου Οστού (Μέση τιμή %)
Ελέγχου (Control)	$68,08 \pm 12,09$	$95,99 \pm 1,74$
PoP	$54,02 \pm 13,93$	$75,37 \pm 13,27$

Ιστολογικά αποτελέσματα

Ομάδα ελέγχου.

Σε όλα τα δείγματα της ομάδας αυτής παρατηρήθηκε οστική αναγέννηση σε βαθμό που το τεχνητό οστικό έλλειμμα καλύφθηκε πλήρως από νέο οστό. Η οστική γέφυρα ήταν παχύτερη στη περιοχή γεινίασης με το προϋπάρχον οστό στα όρια του ελλείμματος και λεπτότερη στο κέντρο του οστικού ελλείμματος. Τα όρια μεταξύ προϋπάρχοντος και νέου οστού ήταν στα δείγματα της ομάδας αυτής δυσδιάκριτα καθόσον το νέο οστό είχε παρόμοια ιστολογική εικόνα με το προϋπάρχον. Η παρουσία μεγαλύτερου αριθμού οστεώνων, κάποιες διαφορές στο προσανατολισμό των πεταλίων και η διαφορετική χροιά της χρώσης χαρακτηρίζουν τα όρια μετάπτωσης του προϋπάρχοντος σε νέο οστό. Το εξωτερικό σκληρό πέταλο δεν αποκαταστάθηκε σε αρκετά σημεία της περιοχής οστικής αναγέννησης. Έντονη οστεοκλαστική δραστηριότητα ήταν προφανής με εμφανείς κοιλότητες του Howship ενώ σε όμορες περιοχές η επαναδιαμόρφωση του οστού ακολουθούσε την προηγηθείσα απορρόφηση. Οστεώνες σε ενεργή φάση ήταν παρόντες πλησίον των περιοχών της οστικής επαναδιαμόρφωσης. Σε αντίθεση, η επιφάνεια του νέου οστού προς το εσωτερικό της κοιλότητας παρουσίαζε ενιαία μορφή με ανάπτυξη πεταλιώδους οστού του οποίου οι δεσμίδες ήταν προσανατολισμένες παράλληλα με την οστική γέφυρα με χαρακτηριστικά ήπιας και συνεχούς οστεογενετικής δραστηριότητας.

Πειραματική ομάδα (PoP)

Βασικό χαρακτηριστικό της πειραματικής ομάδας ήταν η αδυναμία της ολοκλήρωσης της οστικής γέφυρας του τεχνητού ελλείμματος. Η κλινική αυτή παρατήρηση τεκμηριώθηκε και ιστολογικά. Συνήθως στο κέντρο της περιοχής οστικής αναγέννησης υπήρχε κατάδυση ινώδους συνδετικού ιστού διαμέτρου που κυμαίνονταν από 1-2mm η οποία περιβάλλονταν από λεπτές δοκίδες νέου οστού με κατεύθυνση προς το εσωτερικό του αυλού της κνήμης σε διαφορετικό εκάστοτε βάθος. Σε ορισμένα δείγματα η κατάδυση αυτή εξελίσσονταν σε διάσπαρτο και αρκετά αραιό δοκιδωτό οστό το οποίο μάλιστα καταλάμβανε σημαντικό μέρος του αυλού. Ουσιαστικά, η εικόνα αυτή υποδηλώνει κάποια οστεοκαθοδηγητική ικανότητα του PoP με μικρού βαθμού

οστική αναγέννηση που ακολουθεί την σύντομη κατά τα άλλα απορρόφηση του ρορ. Σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου, η εσωτερική μορφολογία του αναγεννημένου οστού ήταν περίπλοκη αποτελούμενη από πολυάριθμες διακλαδιζόμενες προσεκβολές νεαρού ανώριμου οστού οι οποίες αραίωσαν καθώς επεκτείνονταν προς το εσωτερικό του αυλού.

Συζήτηση

Το πειραματικό μοντέλο της διάνοιξης οστικών ελλειμμάτων σε κνήμη κουνελιού έχει καθιερωθεί και χρησιμοποιηθεί σε πλήθος ερευνητικών εργασιών με αντικείμενό τους την εκτίμηση της οστεογενετικής δυνατότητας διαφόρων οστικών μοσχευμάτων με ή χωρίς την ταυτόχρονη τοποθέτηση οδοντικών εμφυτευμάτων ⁽¹³⁻⁵⁴⁾.

Στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε ο ρυθμός οστεογένεσης σε τεχνητά οστικά ελλείμματα με αποκλεισμό ή μη της μυελώδους μοίρας στο πειραματικό μοντέλο της κνήμης κουνελιού.

Η συμβολή του μυελού των οστών στην οστεογενετική διαδικασία έχει ερευνηθεί και αποδειχθεί από τον Friedenstein και τους συνεργάτες του από το 1976 ^(55,56). Τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα που περιέχει ο μυελός έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε πρόδρομα κύτταρα και δυνητικά να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε μυελοβλάστες, χονδροβλάστες και οστεοβλάστες ⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾ ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του οργανισμού.

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα απαντώνται διάσπαρτα στο μυελό των οστών ⁽⁶³⁾ κατά κύριο λόγο όμως βρίσκονται κοντά στο ενδόστεο ⁽⁶⁴⁾ ενώ τα ποσοστά τους κυμαίνονται από 0,01 έως 0,0001% του συνολικού αριθμού των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού ⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾.

Η οστεογενετική δυνατότητα του μυελού των οστών αποτελεί αντικείμενο έντονης κλινικής έρευνας στην μηχανική των ιστών (tissue engineering) καθώς υπάρχει η ανάγκη για εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις στην αποκατάσταση οστικών ελλειμμάτων στην κρανιοπροσωπική χώρα που να μη συμπεριλαμβάνουν αλλομοσχεύματα ή πολύπλοκες επεμβάσεις που να απαιτούν αυτόλογα μοσχεύματα από δότριες περιοχές ⁽⁶⁸⁾. Τέτοιες έρευνες έχουν δείξει πως μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στην αποκατάσταση ελλειμμάτων σε πειραματικά μοντέλα *in vivo* ^(69,70). Είναι μάλιστα τόσο αποτελεσματικά που ο συνδυασμός τους με ένα οστεοκαθοδηγητικό ικρίωμα όπως για παράδειγμα ο υδροξυαπατίτης χαρακτηρίζεται ως «platinum standard» ⁽⁷¹⁾ σε σχέση με το αυτόλογο μόσχευμα που θεωρείται το «gold standard» στα υπάρχοντα οστικά μοσχεύματα.

Στην παρούσα εργασία, αποκλείεται ο μυελός των οστών από τη διαδικασία επούλωσης και οστικής αναγέννησης αλλά εκτός από τα τοιχώματα του περιβάλλοντος οστού συμμετέχει και το περίοστεο το οποίο αποτελεί επίσης μια πηγή οστεογενετικών κυττάρων. Το περίοστεο αποτελεί έναν εξειδικευμένο συνδετικό ιστό που βρίσκεται σε επαφή με την επιφάνεια του οστού μέσω των ινών του Sharpey. Συνίσταται από δύο διακριτές στιβάδες, την εξωτερική ινώδη στιβάδα που περιέχει ινοβλάστες, αγγεία και ίνες του Sharpey, και την εσωτερική στιβάδα, γνωστή και ως «κάμβιο», που περιέχει νεύρα, τριχοειδή αγγεία, οστεοβλάστες και αδιαφοροποίητα μεσεγχοματικά κύτταρα. Το περίοστεο ως πηγή αυτών των πολυδύναμων αδιαφοροποίητων κυττάρων, που έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε χονδροβλάστες, ή οστεοβλάστες και επιπλέον ως πηγή αυξητικών παραγόντων συμμετέχει στην οστική επούλωση σε περίπτωση καταγμάτων καθώς επίσης και στην διαδικασία της οστικής ανάπλασης ⁽⁷²⁾ (Bone Remodeling). Αυτή η εναλλακτική πηγή κυττάρων με οστεογενετική δυναμική διατηρείται ακόμα και σε προχωρημένη ηλικία ⁽⁷³⁾. Κύτταρα περισσέου ανθρώπινης προέλευσης σε συνδυασμό με συνθετικά πολυμερή μοσχεύματα (TCP) in vitro διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες ⁽⁷⁴⁾ ενώ μπορούν να παράγουν οστό έκτοπα ⁽⁷⁵⁾. Πράγματι, έρευνα σε πειραματικό μοντέλο σε κουνέλια έδειξε ότι ελεύθερα μοσχεύματα περισσέου με διατήρηση της αιμάτωσής τους σε συνδυασμό με οστικά μοσχεύματα παρουσιάζουν αυξημένη οστεογενετική δυνατότητα στην αποκατάσταση μικρών οστικών ελλειμμάτων ⁽⁷⁶⁾. Σε κλινική εφαρμογή η χρήση ελεύθερων μοσχευμάτων περισσέου από το λαγόνιο χρησιμοποιείται στην ανακατασκευή και θεραπεία υπερωισχιστιών και την επίτευξη κάθετης οστικής αναγέννησης ⁽⁷⁷⁾.

Συγκριτικά όμως, σε πειράματα ιστικής μηχανικής όπου συγκρίνονται διάφοροι τύποι μοσχευμάτων σε συνδυασμό με κύτταρα προερχόμενα από περίοστεο ανθρώπινης γνάθου ή κύτταρα προερχόμενα από μυελό των οστών ληφθέντα με παρακέντηση αναφέρεται ότι ο δεύτερος συνδυασμός αποτελεί πιο αξιόπιστη λύση ⁽⁷⁸⁾.

Η πιθανή οστεογενετική δυνατότητα ενός υπό έλεγχο μοσχεύματος μπορεί να αναδειχθεί και αξιολογηθεί μόνον εφόσον απομονωθεί από την γενικότερη οστεογενετική ικανότητα του οργανισμού. Στο μοντέλο κνήμης κουνελιού η πειραματική υπόθεση του αποκλεισμού του μυελού επιτρέπει τη δημιουργία

νέου οστού από οστεογενετικά κύτταρα, που προέχονται από τα τοιχώματα του οστικού ελλείμματος, του υπερκείμενου περιοστέου και ίσως του υπό έρευνα οστικού μοσχεύματος.

Για να αποκλειστεί ο μυελός και να ελεγχθεί η πειραματική υπόθεση προτάθηκε η αφαίρεσή του και η πλήρωση του κενού χώρου που δημιουργήθηκε από ένα σταθερό και βιοσυμβατό υλικό. Το βιοσυμβατό υλικό που επελέχθη ήταν το θειούχο ασβέστιο, ή «Γύψος των Παρισίων» (Plaster of Paris, PoP).

Η γύψος των Παρισίων προέρχεται από τη γύψο (διυδρικό θειούχο ασβέστιο), μία φυσικά απαντώμενη πετρώδη ουσία που ανευρίσκεται σε ορυκτά άλατα. Όταν η γύψος θερμανθεί στους 128° C, το μεγαλύτερο ποσοστό νερού εξατμίζεται και παράγεται μία ουσία σε μορφή σκόνης κοινά γνωστή ως «Γύψος των Παρισίων»(PoP: 2CaSO₄H₂O). Με την προσθήκη νερού στη ξηρά γύψο των Παρισίων, τα μόρια του νερού ενσωματώνονται μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα του διυδρικού θειούχου ασβεστίου, μετατρέποντας την σκόνη της γύψου των Παρισίων σε μία σκληρή μάζα ελευθερώνοντας ταυτόχρονα ενέργεια με τη μορφή θερμότητας.

Το θειούχο ασβέστιο είναι ένα βιοσυμβατό υλικό με ιστορία κλινικής εφαρμογής που ξεπερνάει τα 100 χρόνια ^(79,80). Απαντάται σε δύο μορφές (άλφα και βήτα) οι οποίες διαφέρουν ως προς τις φυσικές ιδιότητες και απορροφάται εντελώς μετά την εμφύτευσή του παρέχοντας ένα πλούσιο υπόστρωμα σε ασβέστιο που πιθανώς να διεγείρει τους οστεοβλάστες στη σύνθεση νέου οστού ⁽⁸¹⁾. Αποτελεί ένα από τα ασφαλέστερα συνθετικά μοσχευματικά υλικά ενώ στην Οδοντιατρική έχει χρησιμοποιηθεί στον τομέα της περιοδοντολογίας ⁽⁸²⁾, της ενδοδοντίας ^(83,84) και στην οδοντοφατνιακή χειρουργική ⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾.

Το θειούχο ασβέστιο παρουσιάζει υψηλό ρυθμό απορρόφησης και αντικατάστασης από φυσικό οστό που κυμαίνεται από 4 εβδομάδες ⁽⁸⁸⁾ έως 8 εβδομάδες ⁽⁸⁹⁾. Η υψηλή βιοσυμβατότητα του θειούχου ασβεστίου και η επιστημονικά τεκμηριωμένη μακρά χρήση του ως ασφαλές και μη κυτταροτοξικό μοσχευματικό υλικό οδήγησε στην επιλογή του στη παρούσα έρευνα ως κατάλληλο υλικό για την αντικατάσταση του μυελού του οστού από τον αυλό της κνήμης κουνελιού στην πειραματική ομάδα. Ο ρυθμός απορρόφησης που αναφέρεται παραπάνω και πλησιάζει τον χρόνο θυσίας

των πειραματόζων (8 εβδομάδες) κατέστησε απαραίτητη και τη χρησιμοποίηση μεμβράνης αποκλεισμού ούτως ώστε να αποκλειστεί τυχαία διήθηση οστεογενετικών κυττάρων από την περιοχή του μυελού στην περιοχή του τεχνητού οστικού ελλείμματος.

Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν από λυοφιλοποιημένο κολλαγόνο (Biocollagen[®], Bioteck, Arcugnano, Italy) ίππειας προέλευσης. Έρευνες που μελετούν το ρυθμό αποδόμησης φυσικών μεμβρανών κολλαγόνου αναφέρουν πλήρη αποδόμηση για μεμβράνες χοίρειας προέλευσης στις 12 εβδομάδες⁽⁹⁰⁾. Ο ρυθμός αποδόμησης της μεμβράνης Biocolagen[®] είναι 8 εβδομάδες όπως αναφέρεται στην ιστοσελίδα της κατασκευάστριας εταιρίας (www.bioteck.com).

Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας έδειξαν ότι ο πλήρης αποκλεισμός του μυελού των οστών που επετεύχθει από την αντικατάσταση του μυελού από θειούχο ασβέστιο και την κάλυψη του από μεμβράνη αποκλεισμού οδήγησαν σε σημαντικά μικρότερο οστικό όγκο (Bone Volume) καθώς και μικρότερη οστική πυκνότητα (Bone Density). Το γεγονός αυτό επιβεβαίωσε την αρχική υπόθεση της καθοριστικής παρέμβασης του μυελού των οστών στην οστική αναγέννηση.

Πράγματι, η ιστολογική ανάλυση της πειραματικής ομάδας PoP έδειξε ότι μετά τον αποκλεισμό του μυελού των οστών δεν υπήρξε πλήρης οστική επούλωση του τεχνητού οστικού ελλείμματος αν και το τελευταίο δεν αποτελούσε έλλειμμα οριακού μεγέθους. Επιπλέον, στα ιστολογικά δείγματα παρατηρήθηκε κατάδυση ινώδους συνδετικού ιστού στο κέντρο του ελλείμματος διαμέτρου 1-2mm, ένδειξη ότι η πλήρης οστική επούλωση αναχαιτίστηκε, ή επιβραδύνθηκε μετά τον πλήρη αποκλεισμό της μυελώδους μοίρας. Το νεοσχηματιζόμενο οστό στην ομάδα αυτή αποτελούνταν από λεπτές δοκίδες που εκτείνονταν από τα τοιχώματα του ελλείμματος και είχαν κατεύθυνση προς το εσωτερικό του αυλού ενδεχομένως υποδηλώνοντας μια οστεοκαθοδηγητική ιδιότητα της γύψου των Παρισίων και παράλληλα υποδεικνύοντας τον γρήγορο ρυθμό απορρόφησης του θειούχου ασβεστίου όπως επίσης και της μεμβράνης κολλαγόνου. Η δομή της προς τον αυλό στιβάδος του αναγεννημένου οστού ήταν περίπλοκη αποτελούμενη από πολυάριθμες διακλαδιζόμενες προεκβολές νεαρού ανώριμου οστού που αραίωναν προς το εσωτερικό του αυλού, σαφώς λιγότερο οργανωμένου από

το αντίστοιχο νεοσχηματισθέν οστόν της ομάδας ελέγχου και με σημαντικά μικρότερη οστική πυκνότητα. Είναι προφανής η επίδραση του μυελού των οστών στη μορφή της εσωτερικής νεοσχηματισθείσας οστικής στιβάδας.

Συνεπώς, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι το νεοσχηματισθέν οστόν στην ομάδα της γύψου των Παρισίων οφείλεται στην οστεογενετική δράση κυττάρων προερχόμενων από τα περιβάλλοντα τοιχώματα του φλοιώδους πετάλου του ελλείμματος, καθώς και τη σύμπραξη κυττάρων προερχομένων από το υπερκείμενο περίστωο.

Το παραπάνω συμπέρασμα οδηγεί στην πρόταση αυτού του πειραματικού μοντέλου ως ένα πειραματικό έλεγχο ώστε να αξιολογηθούν οι πραγματικές οστεογενετικές, οστεοκαθοδηγητικές και οστεοπαγωγικές ιδιότητες διαφόρων οστικών μοσχευμάτων.

Αρχικά το μέγεθος του ελλείμματος των 6mm επελέχθη στο πειραματικό μοντέλο της παρούσης έρευνας ως οριακό. Ως οστικό έλλειμμα οριακού μεγέθους ορίζεται το ελάχιστο μέγεθος ενός ελλείμματος που δεν παρουσιάζει αυθόρμητη επούλωση, το οποίο σημαίνει ότι το έλλειμμα δε θα πληρωθεί με οστό ισοβίως ⁽⁹¹⁾. Διάφορες έρευνες έχουν αναφερθεί και έχουν προσπαθήσει να ορίσουν το μέγεθος του τεχνητού οστικού ελλείμματος στην κνήμη του κουνελιού που μπορεί να χαρακτηριστεί οριακό. Το εύρος των μεγεθών που έχουν προταθεί κυμαίνονται από 5mm ⁽⁹²⁾ έως 8mm ⁽⁹³⁾, ωστόσο σε αυτή την πειραματική εργασία επελέχθη το τεχνητό οστικό έλλειμμα των 6mm όπως αυτό προτείνεται από διάφορους ερευνητές σε εργασίες που έχουν διεξαχθεί σε παρόμοια πειραματικά μοντέλα ^(94,95).

Η ιστολογική ανάλυση της ομάδας ελέγχου έδειξε πως είχαμε οστική πλήρωση του τεχνητού οστικού ελλείμματος ενώ είχε σχηματιστεί μία οστική γέφυρα σε όλο το μήκος της έκτασης του ελλείμματος σε όλα τα δείγματα. Συνεπώς το οστικό έλλειμμα μεγέθους 6mm δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως οριακό.

Ένας τρόπος για να μειωθεί η πιθανότητα αυθόρμητης επούλωσης των τεχνητών οστικών ελλειμμάτων στα πειραματικά μοντέλα είναι να αυξηθεί το μέγεθος του ελλείμματος. Ωστόσο υπάρχουν ανατομικοί περιορισμοί, όπως η διάμετρος της κνήμης που είναι περίπου 8mm ⁽⁹⁶⁾. Επίσης σε πολλές εργασίες αναφέρεται ότι στη προσπάθεια των ερευνητών να πετύχουν οριακό μέγεθος οστικού ελλείμματος αυξάνοντας το στα ανατομικά όρια συχνά οδηγούνται σε

απαράδεκτα ποσοστά καταγμάτων με συνεπακόλουθη θανάτωση και απώλεια πειραματόζων⁽⁹⁷⁾.

Στην παρούσα πειραματική εργασία ο αποκλεισμός της μυελώδους μοίρας της κνήμης στην διαδικασία της επούλωσης και της οστικής αναγέννησης, συνέπραξε στον περιορισμό του τεχνητού οστικού ελλείμματος σε μέγεθος τέτοιο ώστε να αποφευχθούν κατάγματα αλλά και να αποφευχθεί η πιθανότητα αυθόρμητης οστικής επούλωσης.

Κατά την διεξαγωγή της παρούσης έρευνας δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα καταγμάτων. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν σημάδια φλεγμονής. Πιστεύεται ότι η εσωτερική ναρθηκοποίηση που προσφέρει η στερεά γύψος των Παρισίων συνέβαλε στην μη ύπαρξη καταγμάτων. Επιπλέον η γύψος εύκολα αποστειρώνεται σε ξηρό κλίβανο ούτως ώστε να εξοντωθούν μικροοργανισμοί που θα μπορούσαν να ευθύνονται για την πρόκληση τοπικής φλεγμονής και πιθανής δυσχέρειας στην αξιολόγηση του υπό έλεγχο μοσχεύματος.

Συμπεράσματα

- Η παρούσα έρευνα επιβεβαιώνει την καθοριστική συμβολή του μυελού των οστών στην οστεογένεση, ο αποκλεισμός του οποίου απέτρεψε την αυθόρμητη επούλωση οστικών ελλειμμάτων μη οριακού μεγέθους.
- Η αφαίρεση του μυελού της κνήμης κουνελιού κάτω από το τεχνητό έλλειμμα και η αντικατάστασή του με θειούχο ασβέστιο και μεμβράνη λυοφιλοποιημένου κολλαγόνου, ανέδειξε τις πραγματικές δυνατότητες επούλωσης του ελλείμματος αποκλειστικά και μόνο από κύτταρα του τοιχώματος του φλοιώδους πετάλου και του υπερκείμενου περιostίου.
- Το πειραματικό μοντέλο της διάνοιξης τεχνητών οστικών ελλειμμάτων στη κνήμη κουνελιού και ο αποκλεισμός της μυελώδους μοίρας από την οστεογενετική διαδικασία μπορεί να αποτελέσει μία περισσότερο αξιόπιστη μέθοδο ελέγχου και σύγκρισης των οστεογενετικών, οστεοκαθοδηγητικών και οστεοεπαγωγικών χαρακτηριστικών διαφόρων οστικών μοσχευμάτων.

Βιβλιογραφία

1. Buser, D., Brägger, U., Lang, N.P. & Nyman, S. (1990) Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clinical Oral Implants Research* 1: 22–32.
2. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1988 May;81(5):672-6.
3. Malmquist JP. Successful implant restoration with the use of barrier membranes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57:1114-1116
4. Becker W, Schenk R, Higuchi K, Lekholm U, Becker BE. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995 Mar-Apr;10(2):143-54.
5. Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996 Apr;54(4):420-32; discussion 432-3.
6. Camelo M, Nevins ML, Lynch SE, Schenk RK, Simion M, Nevins M. Periodontal regeneration with an autogenous bone-Bio-Oss composite graft and a Bio-Gide membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001 Apr;21(2):109-19
7. von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Buser D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Jun;12(3):260-9.
8. Hadjipavlou AG, Simmons JW, Tzermiadianos MN, Katonis PG, Simmons DJ. Plaster of Paris as bone substitute in spinal surgery. *Eur Spine J*. 2001 Oct;10 Suppl 2:S189-96.
9. Urist M (1980) Bone transplants and implants. In: Urist M (ed) *Fundamentals and clinical bone physiology*. Lipincott, Philadelphia, pp 331-368
10. Ludwig SC, Kowalski JM, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes. *Eur Spine J*. 2000 Feb;9 Suppl 1:S119-25. Review.
11. Gardiner A, Weitzel PP. Bone graft substitutes in sports medicine. *Sports Med Arthrosc*. 2007 Sep;15(3):158-66. Review.
12. MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J Clin Periodontol*. 1999 Apr;26(4):239-45.

13. Kroese-Deutman HC, Wolke JG, Spauwen PH, Jansen JA. Closing capacity of cranial bone defects using porous calcium phosphate cement implants in a rabbit animal model. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jun 20; [Epub ahead of print]
14. Ito K, Yamada Y, Ishigaki R, Nanba K, Nishida T, Sato S. Effects of guided bone regeneration with non-resorbable and bioabsorbable barrier membranes on osseointegration around hydroxyapatite-coated and uncoated threaded titanium dental implants placed into a surgically-created dehiscence type defect in rabbit tibia: a pilot study. *J Oral Sci*. 2001 Mar;43(1):61-7.
15. Veis AA, Dabarakis NN, Parisis NA, Tsirlis AT, Karanikola TG, Printza DV. Bone regeneration around implants using spherical and granular forms of bioactive glass particles. *Implant Dent*. 2006 Dec;15(4):386-94.
16. Stubbs D, Deakin M, Chapman-Sheath P, Bruce W, Debes J, Gillies RM, Walsh WR. In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. *Biomaterials*. 2004 Sep;25(20):5037-44.
17. Jamali A, Hilpert A, Debes J, Afshar P, Rahban S, Holmes R. Hydroxyapatite/calcium carbonate (HA/CC) vs. plaster of Paris: a histomorphometric and radiographic study in a rabbit tibial defect model. *Calcif Tissue Int*. 2002 Aug;71(2):172-8. Epub 2002 Jun 5.
18. Piattelli A, Scarano A, Piattelli M, Coraggio F, Matarasso S. Bone regeneration using Bioglass: an experimental study in rabbit tibia. *J Oral Implantol*. 2000;26(4):257-61.
19. Chang YS, Oka M, Nakamura T, Gu HO. Bone remodeling around implanted ceramics. *J Biomed Mater Res*. 1996 Jan;30(1):117-24.
20. Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D, Taylor A, Gottlow J, Nyman S. Bone augmentation at titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier. An experimental study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res*. 1997 Apr;8(2):82-9.
21. Pal AK, Pal TK, Mukherjee K, Pal S. Animal experimentation with tooth derived calcium hydroxyapatite based composites as bone-graft substitute biomaterials. *Biomed Sci Instrum*. 1997;33:561-6.
22. Johnson MW, Sullivan SM, Rohrer M, Collier M. Regeneration of peri-implant infrabony defects using PerioGlas: a pilot study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Nov-Dec;12(6):835-9
23. Ito K, Nanba K, Nishida T, Sato H, Murai S. Comparison of osseointegration between hydroxyapatite-coated and uncoated threaded titanium dental implants placed into surgically-created bone defect in rabbit tibia. *J Oral Sci*. 1998 Mar;40(1):37-41.

24. Turunen T, Peltola J, Makkonen T, Helenius H, Yli-Urpo A. Bioactive glass granules and polytetrafluoroethylene membrane in the repair of bone defects adjacent to titanium and bioactive glass implants. *J Mater Sci Mater Med*. 1998 Jul;9(7):403-7.
25. Ito K, Nanba K, Nishida T, Fujikawa K, Murai S. Osseointegration around titanium screws placed into the areas between guided bone augmented sites compared with osseointegration around guided bone graft augmented sites in rabbit tibia. *J Oral Sci*. 1999 Jun;41(2):87-92.
26. Zhao YF, Mendes M, Symington JM, Listrom RD, Pritzker KP. Experimental study of bone growth around a dental implant after Surgibone grafting. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Nov-Dec;14(6):889-97.
27. Dalkyz M, Ozcan A, Yapar M, Gokay N, Yuncu M. Evaluation of the effects of different biomaterials on bone defects. *Implant Dent*. 2000;9(3):226-35. PMID: 11307409 [PubMed - indexed for MEDLINE]
28. Al Ruhaimi KA. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001 Jan-Feb;16(1):105-14.
29. Dayi E, Aslan M, Simsek G, Yilmaz AB. The effects of bone chips dehydrated with solvent on healing bone defects. *J Int Med Res*. 2002 Mar-Apr;30(2):168-73.
30. Yang C. Effect of calcium phosphate surface coating on bone ingrowth onto porous-surfaced titanium alloy implants in rabbit tibiae. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Apr;60(4):422-5; discussion 426
31. Cook JL, Williams N, Kreeger JM, Peacock JT, Tomlinson JL. Biocompatibility of three-dimensional chondrocyte grafts in large tibial defects of rabbits. *Am J Vet Res*. 2003 Jan;64(1):12-20.
32. Zaffe D, Rodriguez Y Baena R, Rizzo S, Brusotti C, Soncini M, Pietrabissa R, Cavani F, Quaglini V. Behavior of the bone-titanium interface after push-in testing: a morphological study. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Feb 1;64(2):365-71.
33. Franke Stenport V, Johansson CB. Enamel matrix derivative and titanium implants. *J Clin Periodontol*. 2003 Apr;30(4):359-63.
34. Walsh WR, Chapman-Sheath PJ, Cain S, Debes J, Bruce WJ, Svehla MJ, Gillies RM. A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model. *J Orthop Res*. 2003 Jul;21(4):655-61
35. Liljensten E, Adolfsson E, Strid KG, Thomsen P. Resorbable and nonresorbable hydroxyapatite granules as bone graft substitutes in rabbit cortical defects. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003;5(2):95-101.

36. Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres JA. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 Nov-Dec;18(6):807-11
37. Oberg S, Johansson C, Rosenquist JB. Bone formation after implantation of autolysed antigen extracted allogeneic bone in ovariectomized rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Dec;32(6):628-32.
38. Duyck J, Vrielinck L, Lambrichts I, Abe Y, Schepers S, Politis C, Naert I. Biologic response of immediately versus delayed loaded implants supporting ill-fitting prostheses: an animal study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005;7(3):150-8
39. Hall J, Miranda-Burgos P, Sennerby L. Stimulation of directed bone growth at oxidized titanium implants by macroscopic grooves: an in vivo study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005;7 Suppl 1:S76-82.
40. Mitri FF, Yoshimoto M, Allegrini Junior S, Koo S, Carbonari MJ, Konig Junior B. Histological findings in titanium implants coated with calcium phosphate ceramics installed in rabbit's tibias. *Ann Anat*. 2005 Mar;187(1):93-8.
41. Huang HM, Cheng KY, Chen CF, Ou KL, Li CT, Lee SY. Design of a stability-detecting device for dental implants. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 2005 May;219(3):203-11.
42. Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl*. 2006 Jan;20(3):209-20.
43. Salina S, Maiorana C, Iezzi G, Colombo A, Fontana F, Piattelli A. Histological evaluation, in rabbit tibiae, of osseointegration of mini-implants in sites prepared with Er:YAG laser versus sites prepared with traditional burs. *J Long Term Eff Med Implants*. 2006;16(2):145-56.
44. Koo S, Konig B Jr, Allegrini S Jr, Yoshimoto M, Carbonari MJ, Mitri-Luiz FF. Titanium implant osseointegration with calcium pyrophosphate in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006 Feb;76(2):373-80.
45. Allegrini S Jr, Rumpel E, Kauschke E, Fanghanel J, Konig B Jr. Hydroxyapatite grafting promotes new bone formation and osseointegration of smooth titanium implants. *Ann Anat*. 2006 Mar;188(2):143-51.
46. Bumgardner JD, Chesnutt BM, Yuan Y, Yang Y, Appleford M, Oh S, McLaughlin R, Elder SH, Ong JL. The integration of chitosan-coated titanium in bone: an in vivo study in rabbits. *Implant Dent*. 2007 Mar;16(1):66-79.

47. Coradazzi LF, Garcia IR Jr, Manfrin TM. Evaluation of autogenous bone grafts, particulate or collected during osteotomy with implant burs: histologic and histomorphometric analysis in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007 Mar-Apr;22(2):201-7.
48. Meirelles L, Arvidsson A, Albrektsson T, Wennerberg A. Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Jun;18(3):326-32. Epub 2007 Apr 11.
49. Suh JY, Jeung OC, Choi BJ, Park JW. Effects of a novel calcium titanate coating on the osseointegration of blasted endosseous implants in rabbit tibiae. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Jun;18(3):362-9. Epub 2007 Feb 13.
50. Sollazzo V, Pezzetti F, Scarano A, Piattelli A, Bignozzi CA, Massari L, Brunelli G, Carinci F. Zirconium oxide coating improves implant osseointegration in vivo. *Dent Mater*. 2007 Jul 17; [Epub ahead of print]
51. Guedes E Silva CC, Konig B Jr, Carbonari MJ, Yoshimoto M, Allegrini S Jr, Bressiani JC. Tissue response around silicon nitride implants in rabbits. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Jul 2; [Epub ahead of print]
52. Vandamme K, Naert I, Geris L, Sloten JV, Puers R, Duyck J. Histodynamics of bone tissue formation around immediately loaded cylindrical implants in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Aug;18(4):471-80. Epub 2007 May 21.
53. Park JW, Park KB, Suh JY. Effects of calcium ion incorporation on bone healing of Ti6Al4V alloy implants in rabbit tibiae. *Biomaterials*. 2007 Aug;28(22):3306-13. Epub 2007 Apr 10.
54. Stoppie N, Wevers M, Naert I. Feasibility of detecting trabecular bone around percutaneous titanium implants in rabbits by in vivo microfocus computed tomography. *J Microsc*. 2007 Oct;228(Pt 1):55-61.
55. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976;47:327-55.
56. Friedenstein, A. J. Stromal mechanisms of bone marrow: Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Bluttransfus* 25:1-29; 1981
57. Sachse A, Wagner A, Keller M, Wagner O, Wetzel WD, Layher F, Venbrocks RA, Hortschansky P, Pietraszczyk M, Wiederanders B, Hempel HJ, Bossert J, Horn J, Schmuck K, Mollenhauer J. Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone*. 2005 Nov;37(5):699-710. Epub 2005 Sep 1.

58. Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, Baldini N, Giunti A. Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials*. 2006 Sep 9; [Epub ahead of print]
59. Aguila HL, Rowe DW. Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis. *Immunol Rev*. 2005 Dec;208:7-18.
60. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E47-51
61. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*. 1982 Aug;11(4):318-26.
62. Donath K. Preparation of Histologic Sections (by Cutting–Grinding Technique for Hard Tissue and Other Material Not Suitable to be Sectioned by Routine Methods). Equipment and Methodical Performance. Norderstedt: EXACT-Kulzer–Publication, 1993
63. Long, M. W., Williams, J. L., and Mann, K. G. Expression of human bone related proteins in the hematopoietic microenvironment. *J Clin Invest* 86: 1387-1395; 1990
64. Ashton, B. A., Allen, T. D., Howlen, C. R., Eaglesom, C. C., Hanori, A., and Owen, M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Rel Res* 151:294-330; 1980.
65. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med*. 2007 Apr-Jun;53(2):121-7. Review.
66. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006;20: 161-171
67. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005;52:2521-9
68. Gronthos S, Akintoye SO, Wang CY, Shi S. Bone marrow stromal stem cells for tissue engineering. *Periodontol* 2000. 2006;41:188-95. Review.
69. van den Dolder J, Farber E, Spauwen PH, Jansen JA. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2003; 24: 1745–1750
70. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation* 1998; 66: 1272–1278

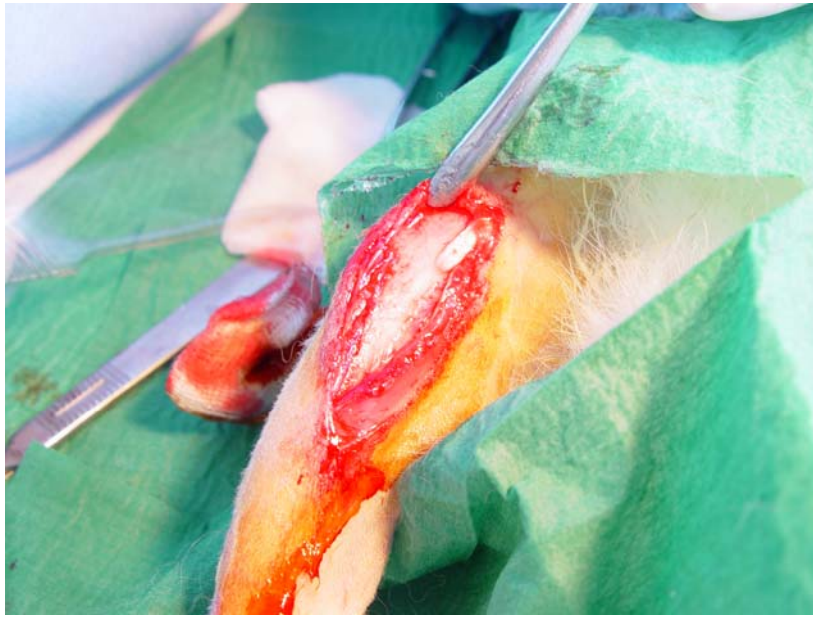
71. Soltan M, Smiler DG, Gailani F. A new "platinum" standard for bone grafting: autogenous stem cells. *Implant Dent.* 2005 Dec;14(4):322-5.
72. Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury.* 2005 Nov;36 Suppl 3:S13-9. Review.
73. Koshihara Y, Hirano M, Kawamura M, et al. Mineralization ability of cultured human osteoblast-like periosteal cells does not decline with aging. *J Gerontol.* 1991;46:B201–B206
74. Arnold U, Lindenhayn K, Perka C. In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials.* 2002;23:2303–2310
75. Schantz JT, Hutmacher DW, Chim H, et al. Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology. *Cell Transplant.* 2002;11:125–138
76. Dailiana ZH, Shiamishis G, Niokou D, et al. Heterotopic neoosteogenesis from vascularized periosteum and bone grafts. *J Trauma* 2002;53(5):934-8
77. Kubota Y, Shirasuna K. The use of free-periosteum for secondary bone grafting to the maxillary alveolar clefts. *Ann Plast Surg.* 2005 Dec;55(6):599-602
78. Jaquier C, Schaeren S, Farhadi J, Mainil-Varlet P, Kunz C, Zeilhofer HF, Heberer M, Martin I. In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells. *Ann Surg.* 2005 Dec;242(6):859-67, discussion 867-8
79. Peltier LF. The use of plaster of Paris to fill large defects in bone. *Am J Surg* 1959;97:311.
80. Pietrzak WS, Ronk R Calcium sulfate bone void filler: A review and a look ahead *J Craniofac Surg* 2000;11:327–333.
81. Thomas MV, Puleo DA, Al-Sabbagh M. Calcium sulfate: a review. *J Long Term Eff Med Implants.* 2005;15(6):599-607. Review
82. Shaffer D, App G. The use of plaster of Paris for treating infrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol* 1971; 42:685-690.
83. Pecora G, De Leonardis D, Ibrahim N, Bovi M, Cornelini R. The use of calcium sulfate in the surgical treatment of a "through and through" periradicular lesion. *Int Endod J* 2001; 34:189 –197

84. Yoshikawa G, Murashima Y, Wadachi R, Sawada N, Suda H. Guided bone regeneration (GBR) using membranes and calcium sulphate after apicectomy. A comparative histomorphometrical study. *Int Endod J* 2002;35:255–263
85. Pecora GE, De Leonardis D, Della Rocca C, Cornelini R, Cortesini C. Short-term healing following the use of calcium sulfate as a grafting material for sinus augmentation. A clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:866–873
86. Douglass GL. Alveolar ridge preservation at tooth extraction. *J Calif Dent Assoc.* 2005 Mar;33(3):223-31.
87. Guarnieri R, Bovi M. Maxillary sinus augmentation using prehardened calcium sulfate: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002 Oct;22(5):503-8.
88. Orsini G, Ricci J, Scarano A, Pecora G, Petrone G, Iezzi G, Piattelli A. Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004 Feb 15;68(2):199-208.
89. Shigeru S, Tomihisa K, Tomoyuki S. Osteogenic response of rabbit tibia to hydroxyapatite particle - Plaster of Paris mixture. *Biomaterials* 1998; 19: 1895-1900
90. von Arx T, Broggin N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Nov-Dec;20(6):843-53.
91. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunions. *Clin Orthop Rel Res* 1986;205:299-308
92. Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J. & Nyman, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic & Reconstructive Surgery* 1988;81: 672–676.
93. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg.* 1994 Jul;5(3):201-3.
94. Ben-fu C, Xue-ming T. Ultrastructural investigation of experimental non-union of fractures. A transmission electron microscopic study. *Chin Med J* 1986;99:207-214
95. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990;1:60-68

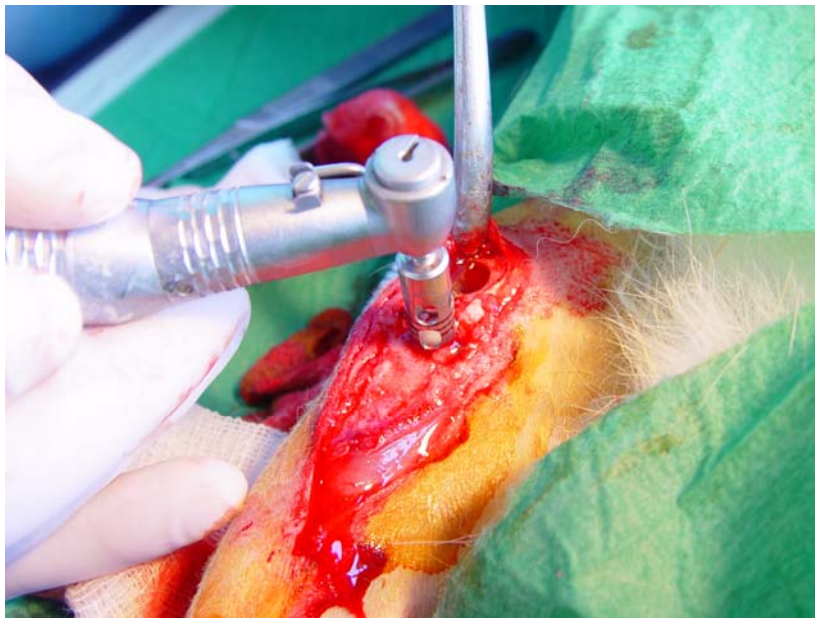
96. Le Guehennec L, Goyenvallé E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, Daculsi G, Layrolle P. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Jan 15;72(1):69-78.

97. Liljensten E, Larsson C, Thomsen P, Blomqvist G, Hirsch JM, Wedenberg C. Studies of the healing of bone grafts, and the incorporation of titanium implants in grafted bone: an experimental animal model. *J Mater Sci Mater Med*. 1998 Sep;9(9):535-41.

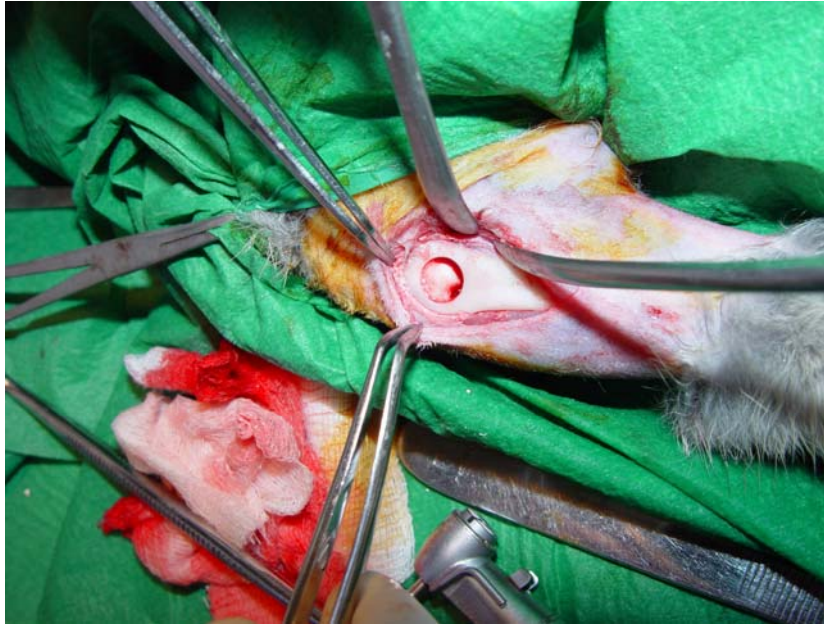
Παράρτημα Α: Φωτογραφική παρουσίαση χειρουργικού πρωτοκόλλου



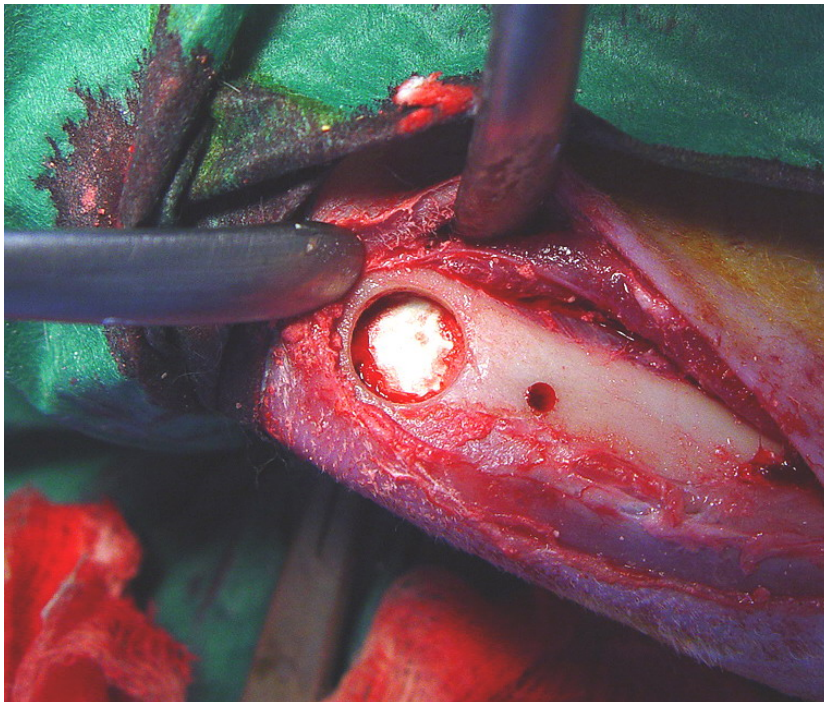
Εικόνα 5. Αποκάλυψη της κνήμης κουνελιού με τομή ολικού πάχους και αποκόλληση περιοστίου.



Εικόνα 6. Δημιουργία τεχνητού οστικού ελλείμματος διαμέτρου 6mm με αντίστοιχη κοίλη εγγλυφίδα (trephine).



Εικόνα 7. Ο μμελός έχει αντικατασταθεί από θειούχο ασβέστιο.



Εικόνα 8. Η μεμβράνη από λυοφιλοποιημένο κολλαγόνο τοποθετημένη στη θέση της καλύπτοντας το θειούχο ασβέστιο. Διακρίνεται επίσης η σπή διαφυγής.

Παράρτημα Β: Στατιστική Ανάλυση

Σχετικά με το εμβαδόν του νεοσχηματιζόμενου οστού (New Bone Area):

Ακολουθεί έλεγχος για τη διαφορά των μέσων τιμών σε δύο ανεξάρτητα δείγματα που ακολουθούν κανονική κατανομή (Independent Samples T-Test)

Μηδενική υπόθεση H_0 : Οι δύο μέσες τιμές για το εμβαδόν του νεοσχηματιζόμενου οστού (Bone Area) δε διαφέρουν.

Αποτελέσματα Independent Samples T-Test

Case Processing Summary

Sample Group		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Bone Area	Control	11	100,0%	0	,0%	11	100,0%
	PoP	13	100,0%	0	,0%	13	100,0%

Descriptives

Sample Group				Statistic	Std. Error			
Bone Area	Control	Mean		68,0855	3,64738			
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	59,9586				
			Upper Bound	76,2123				
		5% Trimmed Mean		67,6449				
		Median		64,1600				
		Variance		146,337				
		Std. Deviation		12,09700				
		Minimum		53,47				
		Maximum		90,63				
		Range		37,16				
		Interquartile Range		17,61				
		Skewness		,854		,661		
		Kurtosis		-,193		1,279		
		PoP		Mean		54,0200	3,86320	
				95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound		45,6028
Upper Bound	62,4372							
5% Trimmed Mean				54,0283				
Median				56,1800				
Variance				194,016				
Std. Deviation				13,92898				
Minimum				34,13				
Maximum				73,76				
Range				39,63				
Interquartile Range				25,70				
Skewness				,026	,616			
Kurtosis				-1,611	1,191			

Tests of Normality

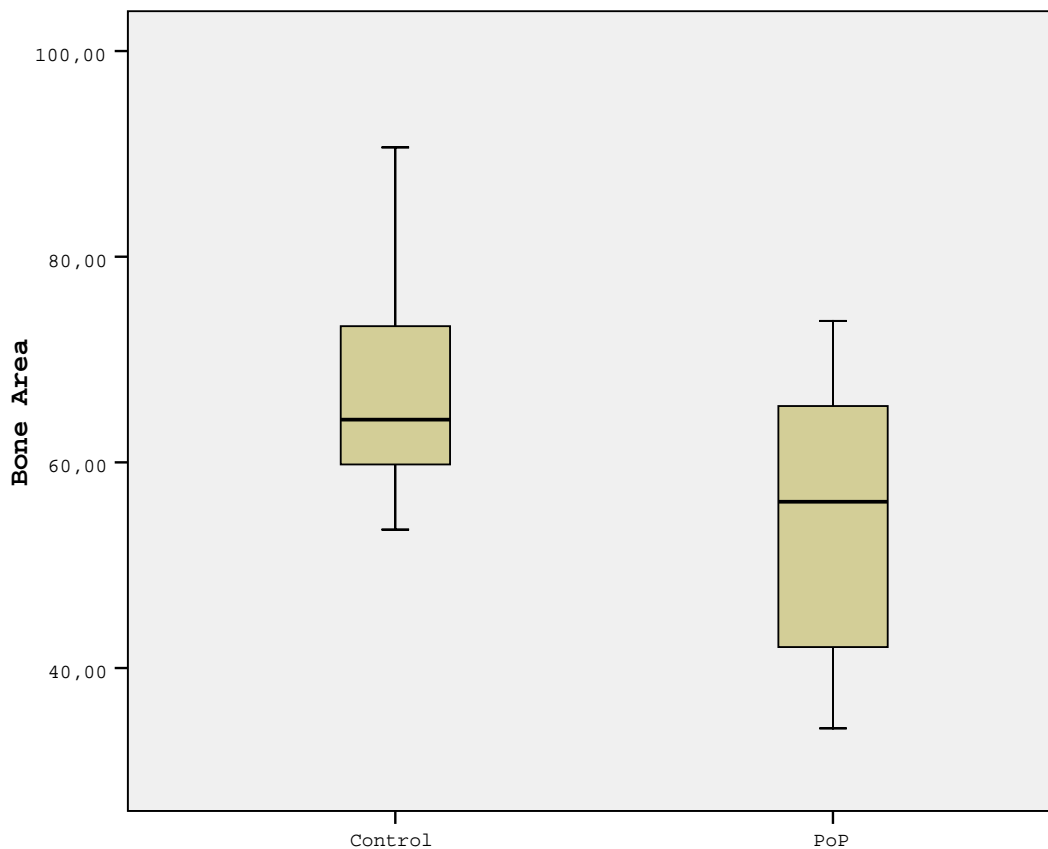
Sample Group		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Bone Area	Control	,173	11	,200*	,915	11	,283
	PoP	,174	13	,200*	,920	13	,249

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Το δείγμα είναι μικρότερο από $n=50$ άρα ισχύουν τα αποτελέσματα της στήλης Shapiro-Wilk. Για την ομάδα ελέγχου $p=0,283 > 0,05$ άρα το δείγμα ακολουθεί κανονική κατανομή ως προς το εμβαδόν (Bone Area) Για την ομάδα PoP $p=0,249 > 0,05$ άρα το δείγμα ακολουθεί κανονική κατανομή ως προς το εμβαδόν (Bone Area).

Βοχplot για τα δείγματα Control και PoP για το εμβαδόν του νεοσχηματιζόμενου οστού.



T-Test

Group Statistics

	Sample Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Bone Area	Control	11	68,0855	12,09700	3,64738
	PoP	13	54,0200	13,92898	3,86320

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Bone Area	Equal variances assumed	1,273	,271	2,615	22	,016	14,06545	5,37819	2,91178	25,21913
	Equal variances not assumed			2,647	21,975	,015	14,06545	5,31298	3,04629	25,08462

Από την στήλη Levene's Test $p=0.271 > 0.05$ άρα θεωρούμε ότι τα δύο δείγματα προέρχονται από πληθυσμούς με ίσες διασπορές έτσι παίρνουμε τα αποτελέσματα του T-Test από την πρώτη γραμμή:

Βρέθηκε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας Control ($68,08 \pm 12,09$) και μεταξύ της ομάδας PoP ($54,02 \pm 13,93$), βαθμοί ελευθερίας $t(22)=2,615$ $p=0.016 < 0.05$, άρα απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση και οι δύο μέσες τιμές ως προς το εμβαδόν του νεοσχηματιζόμενου οστού (Bone Area) διαφέρουν.

Σχετικά με την οστική πυκνότητα του νεοσχηματιζόμενου οστού:

Ακολουθεί έλεγχος για τη διαφορά των μέσων τιμών σε δύο ανεξάρτητα δείγματα που ακολουθούν κανονική κατανομή (Independent Samples T-Test)

Μηδενική υπόθεση H_0 : Οι δύο μέσες τιμές για τη πυκνότητα του νεοσχηματιζόμενου οστού (Bone Density) δε διαφέρουν.

Αποτελέσματα Independent Samples T-Test

Case Processing Summary

Sample Group	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Bone Density Control	11	100,0%	0	,0%	11	100,0%
PoP	13	100,0%	0	,0%	13	100,0%

Descriptives

Sample Group	Statistic	Std. Error
Bone Density Control	Mean	95,9964
	95% Confidence Interval for Mean	94,8298
	Lower Bound	97,1629
	Upper Bound	
	5% Trimmed Mean	96,0010
	Median	95,4600
	Variance	3,015
	Std. Deviation	1,73646
	Minimum	93,37
	Maximum	98,54
	Range	5,17
	Interquartile Range	3,14
	Skewness	,129
	Kurtosis	-1,479
PoP	Mean	75,3731
	95% Confidence Interval for Mean	67,3519
	Lower Bound	83,3943
	Upper Bound	
	5% Trimmed Mean	75,4906
	Median	75,0000
	Variance	176,190
	Std. Deviation	13,27366
	Minimum	55,04
	Maximum	93,59
	Range	38,55
	Interquartile Range	24,38
	Skewness	-,115
	Kurtosis	-1,180

Tests of Normality

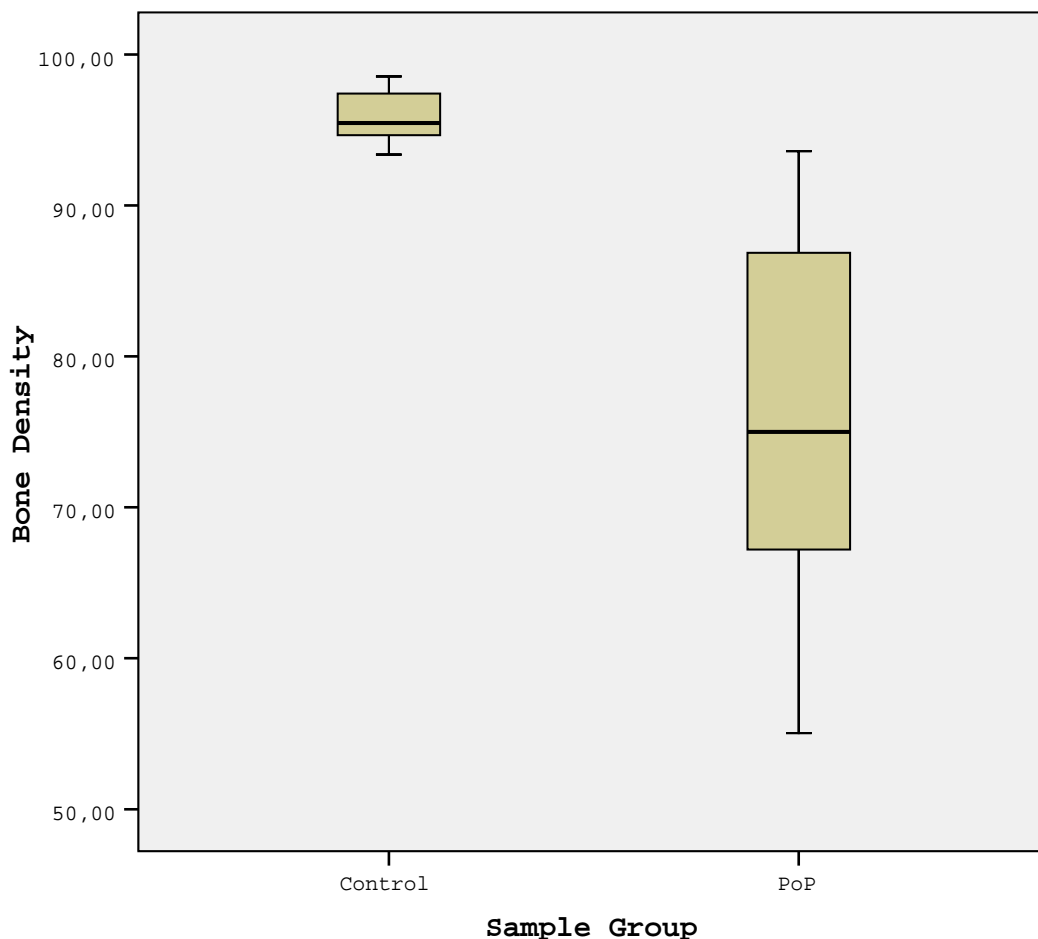
Sample Group	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Bone Density Control	,183	11	,200*	,921	11	,329
PoP	,114	13	,200*	,946	13	,533

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Το δείγμα είναι μικρότερο από $n=50$ άρα ισχύουν τα αποτελέσματα της στήλης Shapiro-Wilk. Για την ομάδα ελέγχου $p=0,329 > 0,05$ άρα το δείγμα ακολουθεί κανονική κατανομή ως προς τη πυκνότητα (Bone Density) Για την ομάδα PoP $p=0,533 > 0,05$ άρα το δείγμα ακολουθεί κανονική κατανομή ως προς την πυκνότητα (Bone Density).

Βοξplot για τα δείγματα Control και PoP για την πυκνότητα του νεοσχηματιζόμενου οστού.



T-Test

Group Statistics

	Sample Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Bone Density	Control	11	95,9964	1,73646	,52356
	PoP	13	75,3731	13,27366	3,68145

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Bone Density	Equal variances assumed	19,208	,000	5,099	22	,000	20,62329	4,04467	12,23516	29,01141
	Equal variances not assumed			5,546	12,484	,000	20,62329	3,71850	12,55610	28,69048

Από την στήλη Levene's Test $p=0.000 < 0.05$ άρα θεωρούμε ότι τα δύο δείγματα προέρχονται από πληθυσμούς με μη ίσες διασπορές έτσι παίρνουμε τα αποτελέσματα του T-Test από την δεύτερη γραμμή:

Βρέθηκε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας Control ($95,99 \pm 1,74$) και μεταξύ της ομάδας PoP ($75,37 \pm 13,27$), βαθμοί ελευθερίας $t(22)=5,546$ $p < 0.001$ άρα και $p < 0.05$, άρα απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση και οι δύο μέσες τιμές ως προς το εμβαδόν του νεοσχηματιζόμενου οστού (Bone Area) διαφέρουν.

Παράρτημα Γ: Βεβαίωση της Επιτροπής Ερευνών του
Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης



ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ Α.Π.Θ.
ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ

έντυπο ΕΔ6^Α

Ημερομηνία 8-11-07

Τίτλος Ερευνητικής Μελέτης: Εκτίμηση της οστεογένεσης σε τεχνητά οστικά ελλείμματα με και χωρίς τον αποκλεισμό της μυελώδους μοίρας της κνήμης σε κουνέλια.

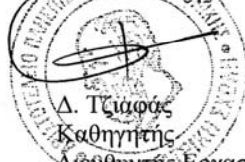
Συμμετέχοντες στην μελέτη: Βέης Αλέξανδρος, Τσίρλης Αναστάσιος και Παρίσης Νικόλαος

Αρ.πρωτ./ημερομηνία αίτησης : 102/4-6-07

Η Επιτροπή Δεοντολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης βεβαιώνει ότι όλες οι διαδικασίες που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές του κανονισμού Δεοντολογίας της Επιτροπής Ερευνών του Α.Π.Θ., σχετικά με τις προβλεπόμενες τυποποιημένες πρακτικές για Βιολογικές Έρευνες σε ανθρώπους / πειραματόζωα / με χρήση μικροοργανισμών/με χρήση ραδιενεργών ουσιών/με χρήση τοξικών ουσιών/ με χρήση ανθρώπινου υλικού (κυττάρων ή ιστών)..

Για την Επιτροπή Δεοντολογίας

Ο Συντονιστής



Δ. Τζιάφας
Καθηγητής

Διευθυντής Εργαστηρίου Ενδοδοντολογίας
Οδοντιατρική Σχολή
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
54124 Θεσσαλονίκη
Ελλάδα

Τηλ./fax: 2310 999626

E – mail: dtziaf@dent.auth.gr