

行政院原子能委員會  
委託研究計畫研究報告

奈米複合骨材於活體內降解及植入試驗之臨床前  
生物相容性和安全性研究

**Study of pre-clinical biocompatibility and safety of nanocomposite  
materials for orthopaedic implant**

計畫編號：1022001INER048

受委託機關(構)：臺北醫學大學

計畫主持人：曾靖嬭 博士

聯絡電話：(02)27361661 #5214

E-mail address：chingli@tmu.edu.tw

核研所聯絡人員：伍德馨 博士

報告日期：102 年 11 月 28 日

## 目 錄

目 錄.....	I
中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
壹、計畫緣起與目的.....	3
一、研究目的.....	3
二、研究背景.....	4
三、研究重要性.....	5
貳、研究方法與過程.....	6
一、兔子大缺陷骨缺損實驗設計及動物手術程序.....	6
二、骨生成評估.....	9
三、組織切片檢測評估.....	10
參、主要發現與結論.....	11
一、動物手術程序.....	11
(一) 手術位置與骨填補材料之狀況.....	11
二、骨生成評估.....	12
(一)活體 CT 照影.....	12
(二)檢體 Micro-CT 照影.....	14
(三)檢體外觀觀察.....	16
三、組織切片評估.....	18
四、結論.....	20
肆、參考文獻.....	21

## 中文摘要

生物及生醫工程產業早已被經濟部列入我國經濟發展重點項目，配合此經濟發展重點，發展醫療器材。然近年來國內各種事故意外，常成造成傷者嚴重骨損傷、骨折、斷裂或骨發炎造成鄰近關節攣縮和急性骨腫脹等傷痛而痛苦。本計畫針對國內最大生醫材市場之人工骨迫切需要，以高品質骨填補材產品進行認證或技轉廠商必須之臨床前生物適應性試驗，以早日達成合法化，且技轉業界廠以推廣應用及造福廣大傷患。

本計畫選用生物適應性良好且以輻射加以交聯製成之奈米複合骨材，建立其活體內降解試驗模式與生物安全性測試實驗等；且合作探討複合骨材添加血小板膠用於標準動物較大型骨缺損植入實驗模式及數據因素，尋求其作為醫用複合水膠骨材之臨床適用性。藉由本年度之計畫執行，本研究業已建立醫療用奈米複合骨材-血小板膠作為骨材於較大型骨缺損動物植入實驗技術；並完成其骨缺損造影(micro CT)及組織切片觀察，並評估其骨修復生長情形。

目前成果顯示大缺陷之骨損傷確實不易自體癒合，自行研發以輻射交聯法製成之奈米複合骨材，於添加血小板膠後，作為骨填補材時，因血小板膠攜帶生長因子，顯現出較優良之骨癒合促進效果。

## **Abstract**

With the increasing requirement of orthopedic implant for bone disease or trauma, the orthopedic biomaterials become the focused items in biotechnology industry. Currently, autogenously bone graft is the most commonly used material for surgical operation. However, autogenously bone has un-predictable resorption and may result in donor site complications.

In this study, we focused on biocompatible osteoconductive scaffold mixed with platelet glue which performs good biocompatibility and small defect repair as a composite bone graft material made of PAA-NIPAAm powder were applied for bone reconstruction.

In this study, we have established of a large bone defect model in rabbit crania for evaluate the nanocomposite (PAA-NIPAAm powder) combined with plate-rich plasma (PRP) gel as a bone filling materials. From the micro-CT imaging quantification and histological examination, results show that the nanocomposite with PRP incorporation has better bone healing outcome for a large defect.

## 壹、計畫緣起與目的

富含血小板膠對於組織工程來說，一直以來都是個熱門的話題，而大範圍骨缺陷的修補大多因自體修補的能力有限，常導致許多後遺症之發生，而濃縮血小板膠所富含大量隻生長因子對於組織上的修補是相當有能力的，故本研究期許材料混和濃縮血小板膠後對於大範圍骨缺陷上的幫助有其貢獻。

### 一、研究目的

於 101 年核能所合作計畫中，本研究團隊業已完成具高強度及低摩擦富含血小板膠之醫療用奈米複合骨材開發作為上顎骨增厚填補材料之植入骨再生/血管新生評估測試，顯示其具有作為牙床骨再生修復材料，可於植牙應用，研究團隊證實其為醫療用奈米複合骨材之價值。然而上顎竇骨增厚之應用為小缺陷之骨填補，有可能受自體癒合能力影響；而大缺陷之骨填補材是臨床上較為棘手的議題！當骨骼缺陷不大時，骨骼可以自行重建，只要給予適當的固定與照顧就可以回復，但是若骨缺陷較大時，骨細胞就無法快速完整地重建，此時可能會在缺陷處產生纖維組織，而使骨骼失去原有的支撐強度，這種情形下就必須藉由骨填補材料來幫助骨骼的重建了。因而本研究計畫將評估血小板膠奈米水膠做為大缺陷骨填補再生修復材料之可行性，建立含血小板膠之醫用複合水膠骨材於大型骨缺陷相關技術及測試分析，以擴展及提高此奈米複合骨材之應用價值。

## 二、研究背景

本研究材料之來源由本研究團隊製作，包含以丙烯酸 (Acrylic acid, AAC) 以及感溫性單體 N-isopropyl acrylamide(NIPAAm)，利用  $\gamma$ -ray 照射製作而成之高機械強度和結構緊密之雙層網狀(Double-Network, DN)水膠並且富含有血小板膠新式的醫療用複合骨材，經測試分析其壓縮強度高達 40 MPa 以上，而其平均壓縮強度亦達到 20 MPa，同時其表面磨擦係數約為  $2 \times 10^{-3}$ ，其高強度以及低表面磨擦係數性質極適合作為重建骨缺損材料。101 年本研究團隊結合核能所、三總、國立台北科大等先進研究能量，業已完成材料本身生物相容性相關研究，初步上顎竇骨增厚填補應用，獲得良好的結果。但為完整高值化醫療奈米複合骨材臨床前試驗評估與設計快速上市流程，協助國內生技醫療產業研究發展，本期研究希望透過大型骨缺損植入評估，以滿足臨床需求，擴大產品應用面。並以符合 ISO10993-6 植入相關要求進行實驗，以評估大型骨缺陷植入物之成效。其主要驗證技術平台建立要點如下：

- (一) 建立醫療用奈米複合骨材-血小板膠等於活體降解試驗模式分析和生物安全評估
- (二) 與醫院配合建立醫用骨材及加上血小板膠於較大型骨缺損植入動物實驗技術及資料，做為未來查驗登記或技轉需求。
- (三) 建立醫用複合骨材-血小板膠等植入動物較大型骨缺損試驗之造影及組織切片觀察及評估其骨修復生長情形。

藉由上述規劃，與醫院共同合作進行臨床動物植入含血小

板膠之醫用複合水膠骨材實驗與骨缺損組織修復型態評估，透過病理切片、免疫螢光染色、micro CT、MRI 等造影技術進行成骨缺損修復面積觀察，評估動物植入促進骨缺損組織修復實驗療效。而於動物測試前 將與研究團隊之體外試驗結果進行比對，來修正選取適當條件進行體內測試。

### **三、研究重要性**

為完整高值化醫療奈米複合骨材臨床前試驗評估與設計快速上市流程，協助國內生技醫療產業研究發展，本期研究希望透過臨床需求導向與快速上市規畫流程，進行相關實驗設計。所採用實驗方法為將已合成之富含血小板膠之醫療用複合骨材進行動物植入測試，結合動物臨床實驗結果共同建立此醫療用骨材之標準植入較大型骨缺陷動物實驗模式，逐次評估生物體內之安全性。透過符合醫療器材管理法規 符合 ISO10993-6 規範，建立合宜的新型醫療用大型骨缺損填補材料安全性、體內降解及骨癒合成效評估。

## 貳、研究方法與過程

對於骨缺陷之修補，首先須給予兔子頭蓋骨部分手術後，製造一個大的骨缺陷，再填入混和濃縮血小板膠之材料，經過兩週、三個月、六個月後進行活體 CT 拍攝，於手術後六個月進行犧牲後，以 Micro-CT 進行檢體之拍攝。之後將檢體進行切片染色以及骨密度計算之分析。

### 一、兔子大缺陷骨缺損實驗設計及動物手術程序

本研究目的為評估奈米骨填補材對大缺陷的修復助益程度而大缺陷骨癒合時間要需較長修復時間，因此實驗設計上最常評估時間為六個月。動物實驗手術過程簡述如下：

- (一)紐西蘭白兔進行麻醉。
- (二)於麻醉呈昏迷狀態後。
- (三)先將頭顱部位進行剃毛。



圖一、手術位置剃毛之情況



(四) 固定於手術檯上，於欲開創部位塗碘酒消毒處理。

(五) 以手術刀劃開頭顱骨上方之軟組織，約 3cm。



圖二、使用手術刀劃開外皮。

(六) 剝離顱骨上方之肌肉組織，並以撐開器撐開固定。

(七) 再以磨牙鑽機將頭顱骨磨出一直徑為 15mm 之圓洞。



圖三、製造頭顱骨缺陷位置與大小。

(八) 大型骨缺損部位創造完成後，先以生理食鹽水沖洗後清除骨碎片。

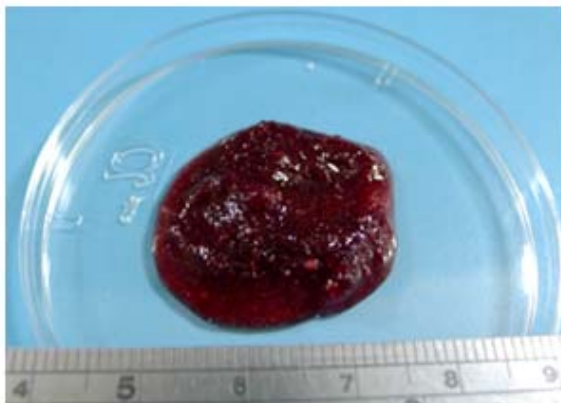
(九) 然後將混合血小板膠之奈米複合骨材植入缺陷部位。



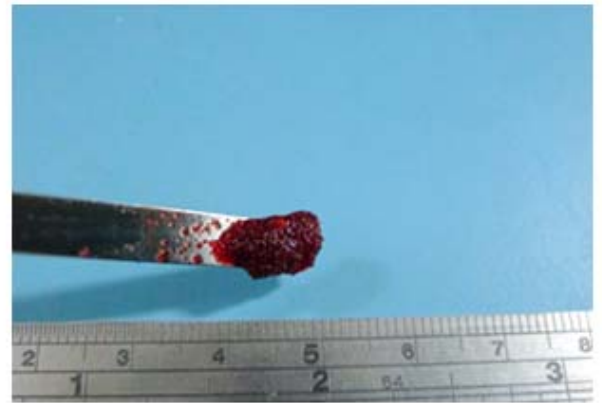
(a)



(b)



(c)



(d)

圖四、材料(圖為：Hydrogel)混合 PRP。(a) Hydrogel (b) Hydrogel +PBS(c) (d)Hydrogel +PRP

(十) 最後以縫線將肌肉與表皮縫合。

實驗條件表：

陰性對照組	無填補
陽性對照組	搭載血小板之市售補骨材料 (Calcium phosphate powder+ PRP組別)
實驗組	搭載血小板奈米水膠 (Hydrogel + PRP組別)

## 二、骨生成評估

於預定時間，以電腦斷層攝影(computed tomography, CT)對兔子頭顱骨區域進行造影，以評估兔子頭顱骨大型股缺陷於植入複合骨材後的骨缺損修復情形。

### 1. 電腦斷層攝影：

手術後一個月、三個月、六個月後，讓動物進行相關造影檢測後，再犧牲取出涵蓋植入物周圍 5~10 mm 之組織，以福馬林固定後，進行組織切片處理。

### 2. 巨觀檢查：

取出組織前，先觀察正常部位和植入的生醫複合物之間骨缺損修復的癒合及組織發炎反應狀況。

### 3. 使用軟體計算骨密度：

分析軟體會依造骨頭硬度與密度不同分成了 256 個色階，按照不同色階將可判斷材料、軟組織、新生骨及既有骨頭的分別，進而可以判斷生長情形。

## 三、組織切片檢測評估

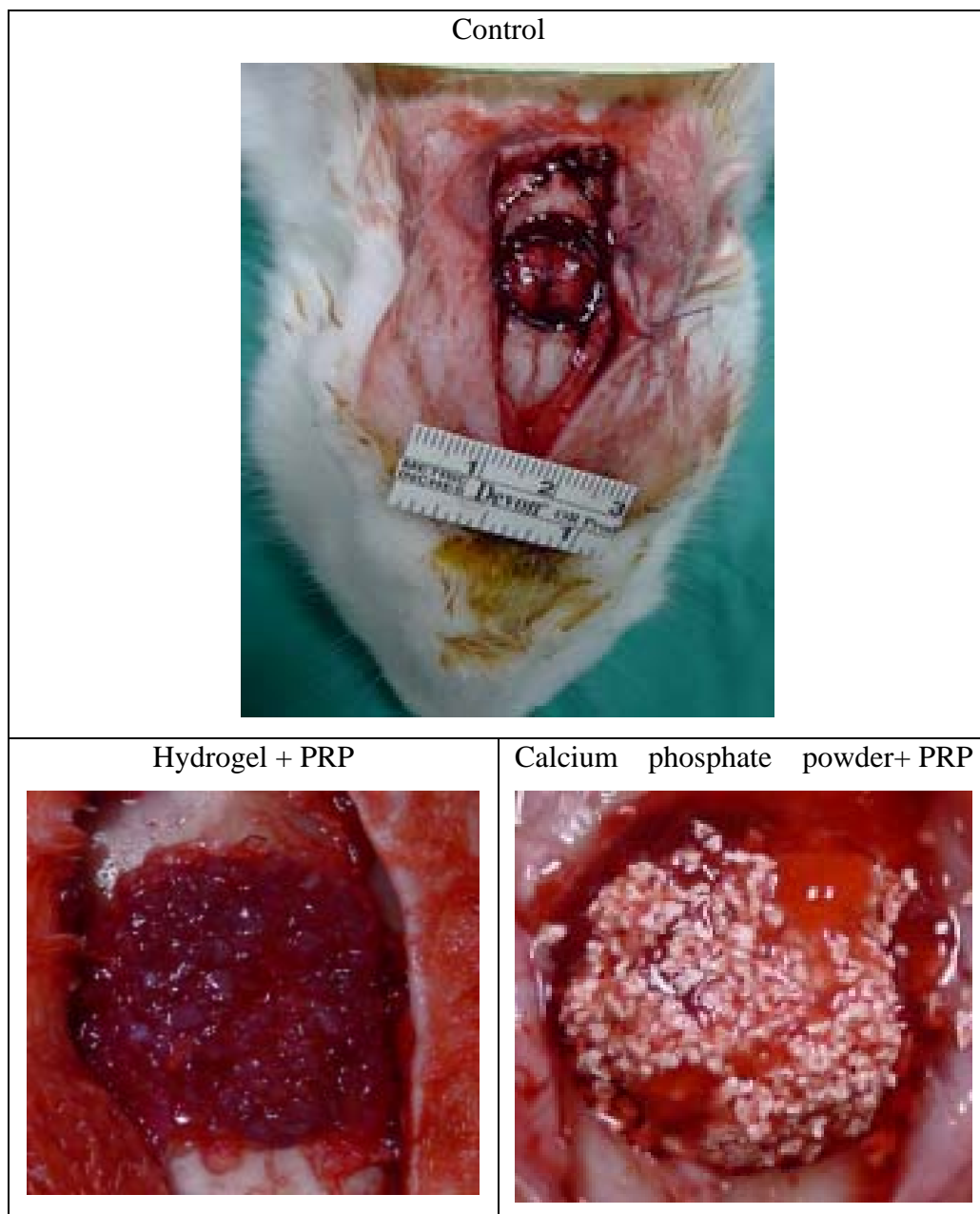
分別於手術後 1 個月、3 個月，完成相關造影檢測後，將犧牲兔子，並取出手術部位組織進行組織切片。以脫鈣評估法，瞭解細胞生長分佈於植入材料的情況。脫鈣包埋法：在石蠟包埋之前，骨骼必需經過脫鈣處理才能切薄。將欲進行脫鈣包埋處理之骨組織，以生理緩衝液(PBS)清洗後，放置於 3.7% 福馬林緩衝液中將細胞固定住。使用迅速脫鈣液(plank&Rychlo) 脫鈣處理。且於脫鈣過程中必須時常以細針輕輕穿刺組織，若感覺無阻力即穿刺，則表示脫鈣完成。組織脫鈣後以 5% 硫酸鈉溶液中和，再以大量流水沖洗，便可依序脫水、脫酒精、灌蠟等步驟，然後包埋成石蠟塊，進而進行切片及染色(蘇木紫及伊紅染色法、Hematoxylin and Eosin stains)，進行細胞分布及型態之觀察分析。

### 參、主要發現與結論

#### 一、動物手術程序

##### (一) 手術位置與骨填補材料之狀況

表一、手術位置與骨填補材料之狀況



由表一可以清楚看到經由外力產生頭骨大範圍缺陷之情形(Control 組),缺陷範圍達 1.3~1.5 cm,再將 Hydrogel 以及 Calcium 以固定比例混參濃縮血小板膠(Thrombin/PRP)以固定比例混合完成並靜置數分鐘形成膠狀物後,再填補至手術缺損部位(Hydrogel + PRP 與 Calcium phosphate powder + PRP 組)。


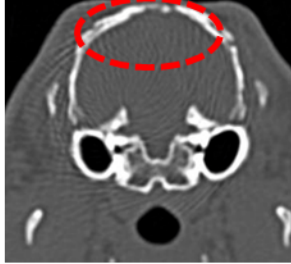


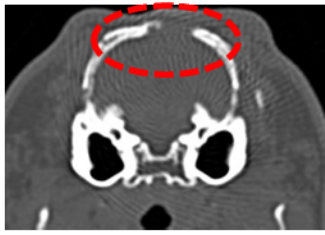
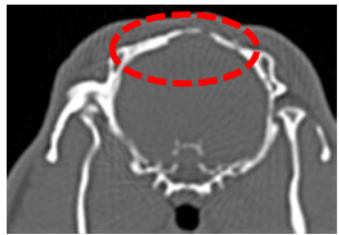



填補完成後將手術位置進行縫合,待兩週、三個月、六個月後進行活體 CT 拍攝,期間觀察兔子頭部外觀是否有腫脹的現象產生。

於手術後六個月進行犧牲後,以 Micro-CT 進行檢體之拍攝。之後將檢體進行切片染色以及骨密度計算之分析。

## 二、骨生成評估

### (一)活體 CT 照影

表二、活體 CT 照影

	2 weeks	3 months	6 months
Control			
Hydrogel+PRP			
Calcium phosphate powder+ PRP			

如表二所示，Control 組、Hydrogel + PRP 組或是 Calcium phosphate powder + PRP 組別經過時間的變化均有骨癒合的情形(紅色圈圈處)。Control 組、Hydrogel + PRP 組在手術後三個月時，均有明顯新生骨長出之情形；於六個月時，可以發現 Hydrogel + PRP 組相較於 Control 組有顯著的癒合情形。Calcium phosphate powder + PRP 組則因為 Calcium phosphate powder 有鈣之訊號，所以骨癒合狀況在 CT 照影上較不明顯，但從圖中依然可以確定 Calcium phosphate powder + PRP 組隨著時間變化，白色部分依然有訊號變亮且變多之趨勢。故證實 Hydrogel + PRP 組對於骨癒合有促進之能力。

## (二)檢體 Micro-CT 照影

表三為各實驗組別檢體之 micro CT 影像。於動物犧牲後，取下兔子頭顱骨組織並於當天進行電腦斷層掃描(Micro Computer Tomograph, Micro-CT)(機種: Skycan 1076)，並利用 Micro-CT 分析軟體進行各條件下骨新生之計算。檢體由 Micro-CT 照影可看出頭蓋骨缺陷處經過六個月後修補之情形，經由軟體計算後，將所有軟硬度分成 256 個色階呈現，故可以判斷材料、軟組織、硬組織的差別。

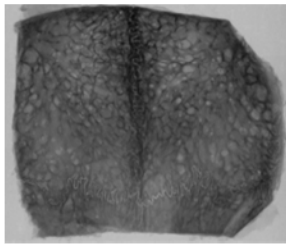
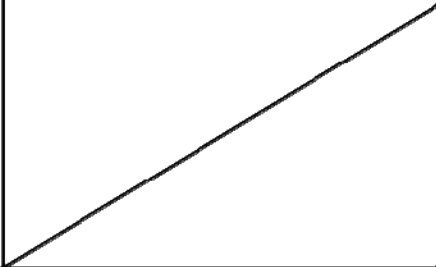
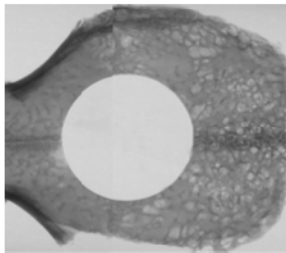
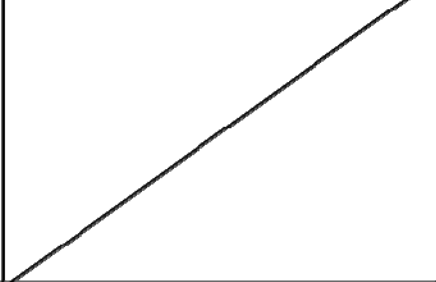
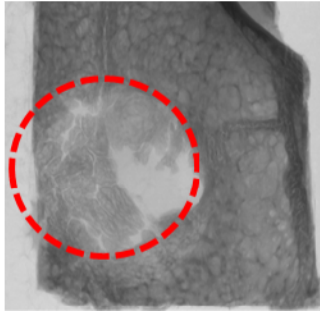
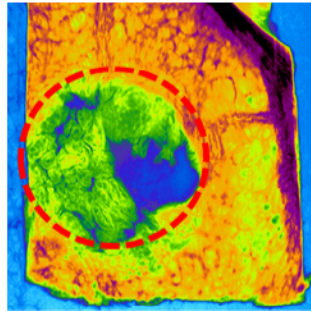
由頭蓋骨缺陷處(紅色圈圈處)可以判斷修補之情形，可以看到 Control 組、Hydrogel + PRP 組、Calcium phosphate powder + PRP 組於缺陷處均有硬組織的色階產生，也發現 Control 組與 Hydrogel + PRP 組相比較後發現 Hydrogel + PRP 組的修復情形佳，結果顯示 Hydrogel + PRP 組對於骨缺陷之修補是有其效果性的，證實血小板膠確實可加強並加速組織生長的功能，有高度做為大缺陷骨填補再生修復材料之可行性。

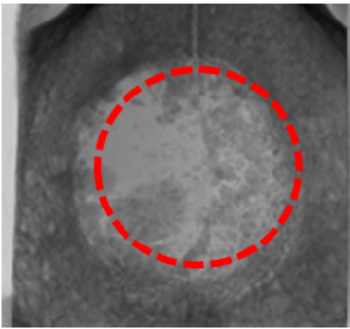
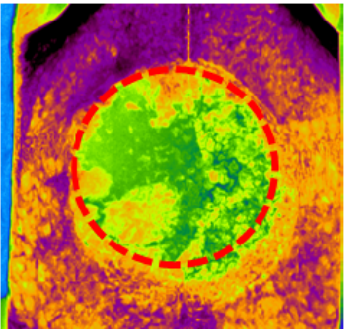
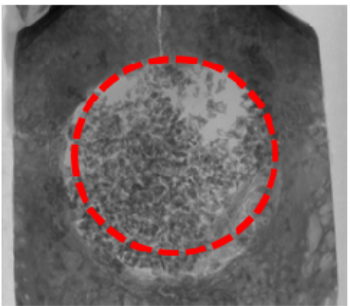
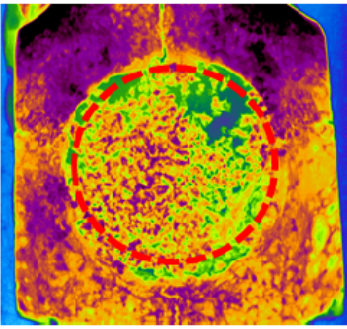
而 Calcium phosphate powder + PRP 組則因為 Calcium phosphate powder 有鈣之訊號，所以骨癒合狀況在 CT 照影上會受到一點干擾，但從圖中依然可以確定 Calcium phosphate powder + PRP 組在骨缺陷處(紅色圈圈處)之材料的顏色較為偏紫色，而新生骨的部分則較為偏



黃色，故顯示 Calcium phosphate powder + PRP 組別對於取缺陷之修補有其能力。

表三、各實驗組別之 micro CT 影像

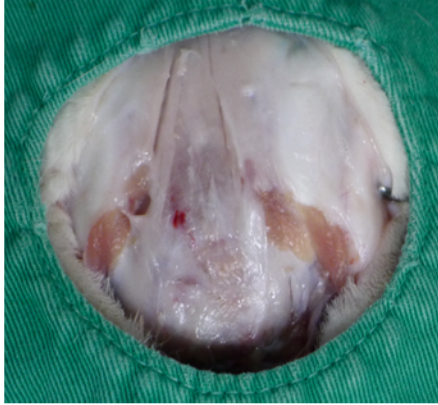
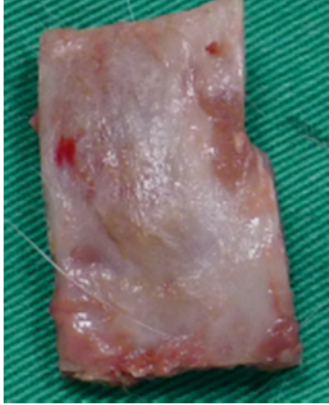

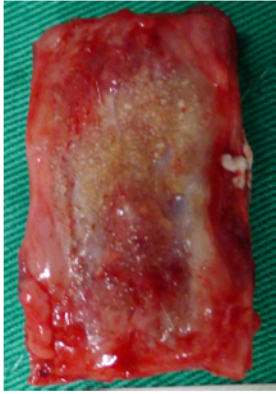
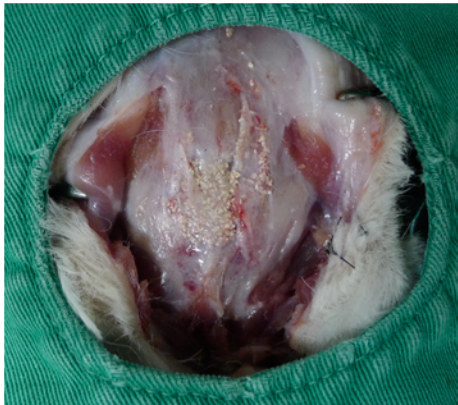
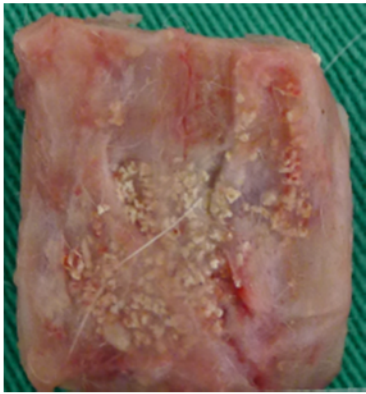
	CT灰階圖	CT轉換彩色色階圖
Normal		
Defect ( 15 mm )		
Control		

Hydrogel + PRP		
Calcium + PRP		

### (三) 檢體外觀觀察

表四，由手術位置圖之外觀，可以觀察到從材料植入六個月之後，沒有腫脹的現象發生，代表 Hydrogel + PRP 組及 Calcium phosphate powder + PRP 組並沒有引起嚴重之發炎反應，對於生物相容性而言為佳。而 Hydrogel + PRP 組及 Calcium phosphate powder + PRP 取出之檢體外觀也可觀察骨缺陷之部分為填滿的狀態，故代表有材料及 PRP 之協助修補是有其效用的。

表四、檢體外觀

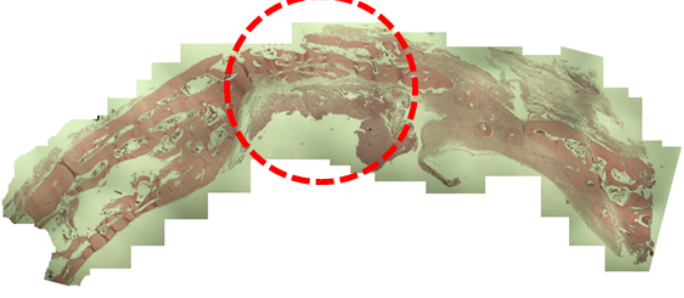
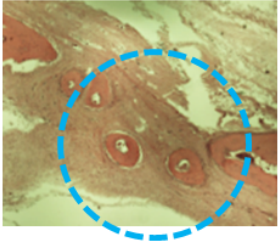
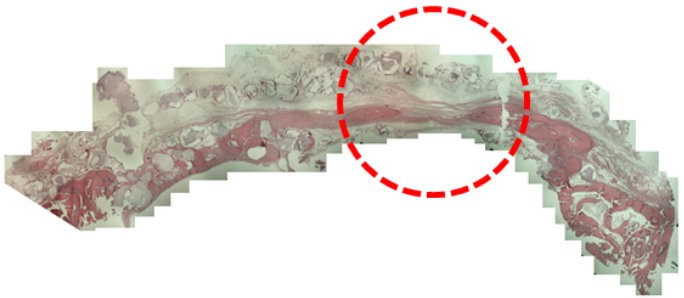
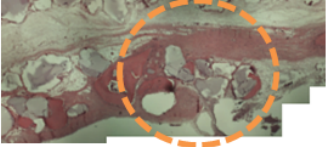
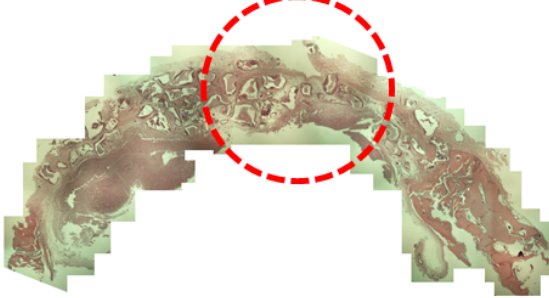
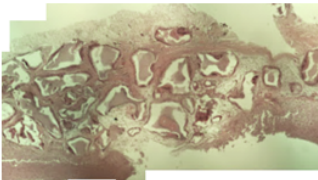
	手術位置圖	檢體
Control	 A photograph of a rat's back during surgery, showing the incision site and surrounding tissue. The area is clean and appears to be a control specimen.	 A photograph of a rectangular piece of tissue, likely a skin or muscle specimen, showing a smooth, pinkish surface with some minor discoloration.
Hydrogel + PRP	 A photograph of a rat's back during surgery, showing the incision site. The tissue appears slightly more inflamed or red compared to the control.	 A photograph of a rectangular piece of tissue, showing a more reddish and irregular appearance, possibly indicating the presence of the hydrogel and PRP.
Calcium + PRP	 A photograph of a rat's back during surgery, showing the incision site. The tissue appears slightly more inflamed or red compared to the control.	 A photograph of a rectangular piece of tissue, showing a more reddish and irregular appearance, possibly indicating the presence of the calcium and PRP.

### 三、組織切片評估

由表三觀察組織切片後觀察組織完整圖，顯示大範圍之骨缺陷(紅色圈圈處)於 Hydrogel + PRP 組及 Calcium phosphate powder + PRP 組於手術六個月後的傷口範圍大大的縮小均有骨癒合之情形，並可分辨既生骨頭與新生骨頭的顏色差異，新生骨頭的顏色會稍微深一點的粉紅色。在組織放大圖中，也有觀察到骨原細胞新生的現象(藍色圈圈處)。

Hydrogel+ PRP 組別之組織放大圖中之橘色框框處，可清楚觀察到 Hydrogel 與組織間的相互作用無排斥的現象，故其生物相容性良好。Calcium phosphate powder + PRP 組因 Calcium phosphate powder 與骨組織成分相當，故生物相容性佳，癒合情形也良好。對於 Calcium phosphate powder + PRP 組來說 Hydrogel + PRP 組的效果相近，故對於骨缺陷的修補來說，在未來有淺力發展成新型大缺陷之骨填補材料。

表三、組織缺陷切片圖與局部放大圖

	組織完整圖	組織放大圖
Control		
Hydrogel + PRP		
Calcium + PRP		

#### 四、結論

本實驗結果顯示由外觀、Micro-CT 掃描與計算均可看出 Calcium phosphate powder 材料適合作為骨缺損填補材料，有良好的新生骨生成，而我們的濃縮血小板膠結合行政院原子能委員會自行研發之水膠(Hydrogel) 進行大缺陷骨填補再生修復也具有相當的潛力，並再次證實血小板膠確實可加強並加速組織生長的功能，有高度做為大缺陷骨填補再生修復材料之可行性。

#### 肆、参考文献

1. Bahadir O, Bahadir A, Kosucu P, Livaoglu M. The effect of maxillary sinus surgery on its development. *Acta Oto-Laryngologica* 2008;128:551-555.
2. Lenz JH, Henkel KO, Hingst V, Versen Ruv, Gundlach KH. Reconstruction of the frontal calvarian continuity in a child using a freeze-preserved autogenous bone graft. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2003;31:154-158
3. Weibrich G GS, Otto M, Reichert TE, Wagner W. Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombocyte concentrates in vitro. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2002;6:168-174.
4. Schultze SM, Keweloh M, Wiltfang J. Histomorphometric and densitometric changes in bone volume and structure after avascular bone grafting in the extremely atrophic maxilla. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2001;39:439-445.
5. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proc Aesth Dent* 2001;13:487-493.
6. Robiony M. PF, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:630-635.
7. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:297-306.
8. Chen TM, Tsai J-C, Burnouf T. Cranioplasty using osteoconductive scaffold and platelet glue. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 2008;65(6):1321-1327.

9. Stiehler M, nger CB, Baatrup A, Lind M, Kassem M, Mygind T. Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2009; 89:96-107.
10. Zou X, Hi L, Baatrup A, Lind M, Bunger C. Engineering of bone tissue with porcine bone marrow stem cells in three dimensional trabecular metal: In vitro and in vivo studies. *APMIS* 2003; Suppl :127-32.
11. 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; 24:1745-50.
12. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: Effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng* 2004; 32:112-22.
13. Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, Li H, Zou X, Flyvbjerg A, et al. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 2007; 28:1036-47.
14. Comes ME, Bossano CM, Johnston CM, Reis RL, Mikos AG. In Vitro Localization of Bone Growth Factors in Constructs of Biodegradable Scaffolds Seeded with Marrow Stromal Cells and Cultured in a Flow Perfusion Bioreactor. *Tissue Eng* 2006;12:177-88.
15. Jaisawl N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J of Cellular biochem* 1997; 64:295-312.
16. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of



- adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol* 2003; 31:723-32.
17. Mehmet T. O., Mustafa C. K. Repair of long bone defects with demineralized bone matrix and autogenous bone composite. *Indian J. of Orthopaedic* 2011; 45: 226-230.
  18. Zhou J, Lin H, Fang T, Li X, Dai W, Uemura T, Dong J. The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone. *Biomaterials*. 2010; 31(6):1171-1179.
  19. Wang TW, Wu HC, Wang HY, Lin FH, Sun JS. Regulation of adult human mesenchymal stem cells into osteogenic and chondrogenic lineages by different bioreactor systems. *J Biomed Mater Res A* 2009; 88:935-46.
  20. Coelho MJ, Cabral AT, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility test. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in  $\alpha$ -MEM and in DMEM. *Biomaterials* 2000; 21:1087-94.
  21. Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Research* 1986;46:5320-9.
  22. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res* 2002; 62:136-48.
  23. M. J. Le, S. K. Sohn, K. T. Kim et al. Effect of Hydroxyapatite on Bone Integration in a Rabbit Tibial Defect Model. *Clinics in Orthopedic Surgery* 2010;2 :90-97.
  24. Bjerre L, nger CEB, Kassem M, Mygin T. Flow perfusion culture of

human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29:2616-27.

25. Dallari D, Fini M, Stagni C et al. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J. Orthopaedic Res.* 2006; May: 877-888.