

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

KAVİTER KEMİK DEFEKTLERİNİN
TEDAVİSİNDE XENO-OSTEOİNDÜKTİF KEMİK
PROTEİN EKSTRAKTININ KULLANIMI

UZMANLIK TEZİ
DR. MURAT SONGÜR

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NECDET ŞÜKRÜ ALTUN

ANKARA 2007

TEŞEKKÜR

Ortopedi ve Travmatoloji asistanlığım süresince bilgi ve becerilerimin her geçen gün artmasında, bu mesleğin inceliklerini öğrenmemde kendi tecrübeleri ve bilgilerini bana aktararak destek olan, etik ve bilimsel açıdan örnek aldığım, tez danışmanım Prof. Dr. Necdet Şükrü Altun başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Selçuk Bölükbaşı, Prof. Dr. Şahap Atik, Prof. Dr. Haluk Yetkin, Prof. Dr. Erdal Cila, Prof. Dr. Ertuğrul Şener, Prof. Dr. Sacit Turanlı, Prof. Dr. Aykın Şimşek, Doç. Dr. Ulunay Kanatlı, Yrd. Doç. Dr. Alparslan Şenköylü, Yrd. Doç. Dr. Akif Muhtar Öztürk, Öğr. Gör. Dr. Hakan Selek, Öğr. Gör. Dr. Hamza Özer ve Öğr. Gör. Dr. Erdinç Esen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım ederim.

Tezimin oluşumundaki katkılarından dolayı, Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama merkezi'nden Prof. Dr. Engin Çalgüner, Uzm. Vet. Şeyda Diker'e, Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Deniz Erdoğan, Doç. Dr. Gülnut Take ve Arş Gör. Bilge Sinanoğlu'ya özverili çalışmalarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitimim süresince her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm tüm asistan arkadaşlarıma, poliklinik, klinik ve ameliyathane hemşire, personel ve sekreterlerine, Uz. Ft. Funda Bülgin Kesici'ye teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca yetiştirmemi sağlayan ve sonsuz desteklerini esirgemeyen babam Op. Dr. Ali Ulvi Songür, annem Yıldız Songür, ablalarım Zeynep Gül Aktaş ve Arzu Esmahan Çınar ve eşlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO.
GİRİŞ-----	1
GENEL BİLGİLER-----	2
GEREÇ VE YÖNTEM-----	20
BULGULAR-----	36
TARTIŞMA VE SONUÇ-----	43
ÖZET-----	48
KAYNAKLAR-----	50

GİRİŞ

Kemik greftleri ve kemik yerini tutabilecek maddeler, ortopedik cerrahide günümüzde yaygın kullanım alanı bulmaktadırlar. Travma, kemik enfeksiyonları, omurga cerrahisi, konjenital deformiteler ve eklem rekonstrüksiyonu v.b. alanlarda meydana gelen kemik defektlerinin tedavisi, çoğu kez ortopedik cerrah için çözülmesi zor sorunlara yol açmaktadır. Cerrahi olarak tedavi edilen bir kemik defektinin tedavisinde günümüzde halen otojen kansellöz kemik grefti altın standart olarak kabul edilmekteyse de, otojen kemik grefti, miktar olarak sınırlı miktarda oluşu (özellikle çocuklarda), donör saha morbiditeleri, uzamış cerrahi süresi ve artmış hasta beklentileri gibi nedenlerden dolayı günümüzde farklı arayışlara yol açmıştır. Günümüzde osteoindüktif, osteojenik ve osteokondüktif özellikleri nedeniyle otojen kansellöz greft, en yaygın kullanım alanı bulan yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde tüm dünyada yılda yaklaşık 2,2 milyon, A.B.D.'de ise yılda 500 bin civarı kemik greftlemesi yapılmaktadır. Tüm greftleme olgularının içinde sentetik greftlerin kullanım oranı ise yaklaşık % 10'dur.^{29,74,16} Greft amacıyla kullanılan maddeler bazı özellikler göstermektedirler. Bu özellikler; osteointegrasyon, osteokondüksiyon, osteoindüksiyon ve osteogenezis olarak sıralanabilir. İdeal kemik yerini tutan bir madde, üstte sıralanan bu dört özelliği de içermelidir. Mevcut kemik greftleri ve kemik yerini tutan maddeler bu özelliklerin bir veya birden fazlasına sahiptirler. Doku mühendisliğindeki gelişmeler ile elde edilen sentetik – organik, saflaştırılmış maddeler, bu özelliklerin geliştirilmesine imkan vermiştir.^{25,29,59,79}

Kemik greftleri, donör kaynağa göre otogreft (hastanın kendi kemiği), allogreft (aynı türden bir kaynak- kadavra) ve xenogreft (farklı bir tür) olmak üzere

sınıflandırılmaktadır. Kemik yerini tutan maddeler (bone graft substitutes) ise seramikler (yapay veya mercan), demineralize kemik matriksi, kemik morfojenik protein, büyüme faktörleri, otolog kemik iliği ve kollajen olarak sayılabilir.^{25,29}

Sığır kemiğinden saflaştırılarak elde edilen kemik protein ekstraktı, tip 1 kollajenin üçlü helix formunda saflaştırılmış hali ve diğer nonkollajenöz kemik proteinlerini içeren bir preparat olarak kullanım görmektedir. Bu preparatların etkinliği ile ilgili yapılmış bir çok çalışma mevcut olup üzerinde değinilecektir. Tip 1 kollajen, kemotaktik etkisi, adezyonu kolaylaştırması, sitokinler (fibronektin, osteokalsin) ve büyüme faktörleri (IGF, TGF- β gibi) ile komplekslerin oluşturulması, kondrosit farklılaşmasının uyarılması, liflerin doğrultusunca mineralizasyonun sağlanması üzerinden osteoindüktif etki göstermektedir. Bu yapının, otolog kemik greftinden farklı olarak osteoklastik süreç olmaksızın osteojenik aktivite gösterdiği görülmüştür.⁴⁷

Bu çalışmada, at kaynaklı kemik protein ekstraktının, kaviter kemik defektlerinin iyileşmesindeki kullanımının histolojik ve radyolojik davranışının incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Kemik anatomisi ve Fizyolojisi

İskelet sistemi, vücutta kas ve yumuşak dokulara mekanik destek sağlamanın yanında hematopoietik ve metabolik görevleri mevcuttur.⁸³

Oldukça sert ve dayanıklı bir yapıya sahip olan kemik, iki ayrı elemandan oluşmaktadır. Kemiğin hücresel elemanları, osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve mezenkimal osteoprogenitör hücrelerdir. Hücresel olmayan kesim ise, organik ve

inorganik matriks olmak üzere iki ayrı kesimde incelenir. İnorganik matriks, kalsiyum hidroksiapatit ve osteokalsiyum fosfattan oluşmaktadır. Organik matriks ise, kollajen, proteoglikanlar, glikoproteinler, fosfolipidler ve fosfolipoproteinlerden oluşmaktadır. Hücresel yapı, kemiğin esas yapısal bütünlüğünü sağlayan matriksin üretilmesini, dönüşümünü ve yenilenmesini sağlamaktadır.³⁹

Kemik, lameller ve süngerimsi (woven) kemik olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. Süngerimsi kemik, hücresel olarak daha esnek ve zayıf olmakla birlikte düzensiz bir yerleşim şekline sahiptir. Lameller kemik ise, santral bir vasküler yapı etrafına tabakalanmış hücreler ve bu hücreler arasını dolduran kemik matriksinden oluşmaktadır. Bu yapı, spongiöz kemikte açılmalı mozayik şeklinde yerleşim gösterirken kortikal kemikte ise bu yapı, daha sıkı bir şekilde birarada olup ek olarak bu yapıların arasında interstisiyel lakünalar bulunmaktadır.^{5,49}

Kemiğin iç yüzeyini oldukça ince bir tabaka olan ve yassılaştırmış hücrelerden oluşan endosteum kaplarken, dış yüzeyini ise periosteum kaplamaktadır. Periosteum, iç tabakada oldukça proliferatif selüler bir özellik gösteren kambiyum tabakası ile dışta fibröz tabakadan oluşmaktadır.⁵

Kemik dolaşımı, kortikal ve süngerimsi kemikte farklılıklar göstermektedir. Kortikal kemikte, Haversian ve Volkmann kanallar içerisindeki vasküler sistem dolaşımı sağlarken, süngerimsi kemikte ise dolaşım, doğrudan medüller kaviteye açılan endosteal tabakadan geçen damarlar ile sağlanmaktadır.⁵

Kemikte dört temel hücre tipi mevcuttur:³⁸

1. Osteoblast: Mezenkimal kök hücre kökenli olup uyarıldığında kemik matriksini oluşturur.

2. Osteosit: Matriks içinde kalan osteoblastlardır. Matriksin mineral dengesini düzenlemektedir.
3. Osteoklastlar: Monositlerden oluşan makrofajlardır. Kemik rezorpsiyonunu sağlarlar.
4. Osteoprogenitör hücreler: Mezenkimal kök hücreleridir. Osteoblastlara farklılaşırlar.

Osteogenez yani kemik oluşumu üç farklı mekanizma sonucu meydana gelmektedir.^{49,83}

1. Endokondral osifikasyon: Kıkırdak bir kalıbın, osteoblastlar tarafından önce immatür kemiğe, daha sonra bu yapının matürasyonu ve mineralizasyonu ile matür kemiğe dönüşmesi şeklinde meydana gelmektedir. Fizislerdeki büyüme ile kırık sonrası meydana gelen sekonder iyileşme, endokondral osifikasyona örneklerdir.
2. İntramembranöz osifikasyon: Mezenkimal hücrelerden oluşmuş olan bir yapının osteoblastlara dönüşmesi sonucu meydana gelir. Yassı kemiklerin embriyonal oluşumu ile bazı kırık iyileşme tiplerinde görülmektedir
3. Apozisyonel osifikasyon: Kemiğin yüzeyine dağılmış olan osteoblastların oluturduğu kemikleşme sürecidir. Kemiğin enine büyümesi ve kırık remodelizasyonu, bu tip kemikleşmeye örnek teşkil etmektedir.

Kemik üzerindeki mekanik yüklenmeler, osteblastların ve osteoklastların uyarılmasına yol açarak kemikte yeniden şekillenmeye neden olmaktadır. Bu durum “Wolff kanunu“ olarak bilinmektedir.⁴⁹

Kemiğin biyomeknik özellikleri, genel olarak fiziksel yapısı, organik ve inorganik bileşenleri sonucu şekillenmektedir. Örneğin, inorganik matriksin bir bileşeni olan hidroksiapatit kompresif dayanıklılığı sağlarken kollajen ise esnekliğini sağlamaktadır.³⁹

KIRIK İYİLEŞMESİ

Kırık iyileşmesinin fazları, hematoma, akut inflamasyon, onarım ve remodeling olarak histolojik olarak belirlenmiş aşamalara ayrılmaktadır.³² Bu olaylar, bir çok hücre sinyal proteinleri ve reseptörlerin karmaşık ilişkileri sonucu oluşmaktadır. Dolayısıyla bu proteinlerin etkinliklerinin genetik olarak belirlenmesi ile, kırık tedavisinde gelişmelerin meydana gelmesi umulmaktadır.²²

İki tip kırık iyileşmesi tanımlanmış olup, primer ve sekonder kırık iyileşmeleri olarak bilinmektedir.²² Primer kemik iyileşmesi, anatomik redüksiyon sonrası, mikrohareketin görülmediği ve rijit tespit uygulanan kemiklerde birbiriyle temas halindeki kortikal kemikler arasında gerçekleşir. İyileşme doğrudan kortikal remodelizasyonla oluşur. Osteoklastlar, kırık hattında tüneller açarak ardından gelen osteoblastlara öncülük ederler. Diğer bir kemik iyileşmesi tipi olan sekonder iyileşme ise, kırık yüzeyleri arasında mikrohareketin olduğu, doğrudan hücresel temas olmaksızın meydana gelen kırık iyileşmesidir. Bu tip iyileşme, rijit tespit yapılmadığı kırıklarda meydana gelmektedir. Sekonder iyileşme hem endokondral hem de intramembranöz osifikasyon yoluyla meydana gelmektedir.^{22,83}

Kırık sonrası ilk gerçekleşen olay, kanama sonucu oluşan hematoma'dur. Hematom içindeki hematopoietik hücreler, akut enflamatuvar cevabı tetiklemektedirler. Nötrofillerden sitokinlerin salınması, ortama makrofajların ve diğer enflamatuvar hücrelerin göçünü hızlandırmaktadır. Kırık hattındaki trombositlerden salgılanmakta olan

PDGF ve TGF- β , kemotaktik, anjiogenetik ve mezenkimal kök hücrelerinin düzenlenmelerini sağlamaktadır.^{28,32,83}

Kırık sonrası salınan sitokinler, sağlam damarlardan kapiller tomurcuklanma ve bu yapıların kırık hattına doğru göç etmesine yol açmaktadır. Kırık sonrası endosteal kan akımı, diğer sistemlerden daha fazla etkilendiğinden periosteal kan akımı büyük önem kazanmaktadır. Bu nedenle periostun bütünlüğünün korunması, kırık tedavisinin en önemli ilkelerinden biri olmaktadır.^{28,83}

Kırık bölgesinde iki tip kallus dokusu meydana gelmektedir. Periostun kambiyum tabakasındaki osteoprogenitör hücrelerin intramembranöz kemikleşmeyle oluşturdukları ve kırık hattını çevreleyen sert kallus, hareketle uyarılmakta, rijit tespit uygulanan kemiklerde ise görülmemektedir. Kırık hattında ise, çevreden gelen mezenkimal hücreler farklılaşarak kıkırdak bir model üzerinden kırık hattında köprü oluşturmaktadırlar. Bu tip kallus dokusu ise rijit tespit uygulanan kırıklarda görülmemektedir.^{22,32,83}

Oluşan kıkırdak model içindeki kondrositler, ortama protezlar, fosfatazlar ve kalsiyum salgılamaktadırlar. Proteazların matriksteki proteinleri yıkması, fosfatazların ortamdaki fosfodiesterleri parçalaması ile ortaya çıkan fosfat iyonlarının kalsiyum ile birleşmesi sonucu kalsiyum birikintileri oluşmaktadır. Kalsifiye kıkırdağa damarlanma ile ulaşan kondroklastlar ve osteoblastlar, kıkırdağın spongiöz kemik ile değiştirilmesini sağlamaktadır.^{14,22,32,83} Zamanla, oluşan spongiöz kemik remodelizasyon ile lamellar kemiğe dönüştürülür. Remodelizasyon onarım fazında başlayarak yıllarca sürebilir.⁸³

Kırık iyileşmesinde bir çok molekül görev almaktadır. Bu moleküllerin osteogenez içindeki görevleri halen araştırılmaktadır.

Kollajen

Bilindiği gibi tip I kollajen kemikte, tip II kollajen ise kırıkta yoğun bir şekilde yer almaktadır. Kırık iyileşmesinin ilk aşamalarında tip II kollajen ağırlıkla gözlenirken ikinci haftadan sonra, tip I kollajen üretimi söz konusu olur. Bunların yanında tip IV, tip X ve tip V kollajenin, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasına ve kallusun mikroyapısının sağlanmasında rol aldıkları düşünülmektedir.^{30,71}

Kollajen dışı matriks proteinleri

Bu proteinler, osteopontin, osteokalsin, fibronektin ve osteonektin adı verilen bağlanma proteinleridir.²² Bu proteinlerin, hücrelerin birbirlerine bağlanması, hücreler arası sinyal iletilmesi ve matriks oluşumu üzerinde etkileri mevcuttur.⁸⁴

Kemik morfojenik proteini

Yaklaşık 14 tipi olup osteoindüktif özellik gösterdikleri gösterilmiştir. BMP 2,4, ve 7 özellikle yüksek miktarda üretilen kemik morfojenik proteinler olup kırık iyileşmesinin hematoma fazında mezenkimal hücreler tarafından üretilip, daha ilerleyen aşamalarda kondroblastlar ve osteoblastlar tarafından üretilmektedir. Bu proteinlerin, etkinliklerini süngerimsi kemiğin lameller kemiğe dönüşümüne dek sürdükleri bilinmektedir.⁶⁴

Transforming growth factor β – Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β)

TGF- β , yaklaşık 25.000 D ağırlığında iki zincirli bir proteindir. TGF- β vücuttaki hemen tüm hücreler tarafından üretilmekle birlikte hücreler arası hemostaz ve embriyogenez ile birlikte inflamasyon ve doku onarımında rol oynadığı düşünülmektedir. TGF- β öncelikle kırık hematoma içinde trombositler tarafından salgınır. Takiben kallus dokusundaki kondrositler ve osteoblastlar tarafından üretilmektedirler. Erken evrede osteoprogenitör

hücrelerin uyarılmasını ve makrofajların ortama çekilmesine yol açarken, ileri dönemlerde ise matriks üretimini uyardıkları gösterilmiştir.^{11,21,83}

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)

Mezenkimal kök hücrelerin mitotik aktivitelerini uyardıkları gösterilmekle birlikte bu hücrelerin kemotaktik uyarılabilirliğini artırmaktadır. Aynı şekilde makrofaj ve monositler üzerinde kemotaktik etki gösterirken anjiogenezi de uyardıkları gösterilmiştir.^{21,32}

Fibroblast büyüme faktörü (FGF)

FGF'nin kondrositler üzerinde kemotaktik ve proliferatif etkisi olduğu, aynı zamanda da anjiogenezi uyardığı gösterilmiştir. Büyüme kıkırdığı üzerinde de trofik etkisi olduğu gösterilmiştir.^{21,32,61}

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)

Kırık iyikleşmesi üzerindeki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, kondrositler üzerinde proliferatif ve sekretuar etkiye sahip oldukları bildirilmiştir.^{11,76}

KIRIK İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Kırık iyileşmesinin beklenenden yavaş ilerlemesine gecikmiş kaynama, kaynamanın durması ise kaynamama olarak nitelendirir. İki tip kaynamama vardır. Hipertrofik kaynamama, yoğun kallus dokusu ile birlikte kaynamamanın olduğu durumu tarif etmektedir. Atrofik kaynamamada ise kırık uçlarında rezorpsiyon söz konusudur ve kallus dokusu görülmez. Kırık hattında kıkırdak dokusu oluşup eklem sıvısına benzer bir sıvı teşekkül etmesine de psödoartroz adı verilir. Kırığın kaynamasını etkileyen faktörler şu şekilde sıralanabilir.⁴⁹

HASTAYA BAĞLI FAKTÖRLER

Yaş: İskelet gelişimi tamamlanmadan önce kırık iyileşmesi belirgin derecede hızlı olmakla birlikte, iskelet gelişimi sonrası belirgin bir fark saptanmamaktadır.⁴⁹

Beslenme: Tek bir kemik kırığı, vücudun metabolik ihtiyaçlarını % 20-25 oranında artırmaktadır.⁴⁶ Bu oranın, çoklu kırık ve enfeksiyon varlığında % 50'leri bulduğu gösterilmiştir. Ancak, metabolizması normal bir hastada, artmış gıda alımı ile kırık iyileşmesinin hızlandırıldığına dair bir veri bulunmamaktadır.

Endokrinolojik faktörler: Kortikosteroidlerin iyileşmeyi baskıladığı, tiroid hormonu, kalsitonin ve anabolik steroidlerin ise iyileşmeyi uyardığı gösterilmiştir.¹⁵

Nikotin: Nikotinin kırık iyileşmesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir.⁶³

TRAVMAYA BAĞLI FAKTÖRLER

Travma şiddeti: Yüksek enerjili travmalar kırık iyileşmesini olumsuz etkiler. Açık kırıklar da yaygın doku hasarı, enfeksiyon riski gibi nedenlerden dolayı kaynamamaya eğilimlidir. Benzer şekilde yumuşak doku interpozisyonu da kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir.¹⁵

Eklem içi kırıklar: Eklem hareketleri ve eklem sıvısının kırık hattına girmesi nedeniyle kırık iyileşmesi olumsuz etkilenir.⁴⁹

Segmente kırıklar: İntramedüller dolaşım bozulduğu için olumsuz yönde etkilenmektedir.

DOKUYA BAĞLI FAKTÖRLER

Kansellöz kemik, kortikal kemiğe göre daha kısa sürede kaynamaktadır. Ek olarak, ortamdaki nekrotik kemik kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir.

Patolojik kırıkların iyileşmesi, altta yatan primer hastalık nedeniyle olumsuz etkilenmektedir. Benzer şekilde kemikte enfeksiyon varlığı kaynamayı engellemektedir.¹⁵

TEDAVİYE BAĞLI FAKTÖRLER

Kırık uçlarının yetersiz redüksiyonu kaynamayı geciktirirken, kırığın tespiti, aksiyel yüklenme ve mikrohareket ise kırık iyileşmesini uyarmaktadır.¹⁵

Tüm bu faktörlere bağlı olarak, kırık iyileşmesi sekteye uğrayabilir ve kırık iyileşmesini sağlayacak yöntemlere ihtiyaç duyulabilir.

Kemik Greftleri

Tüm dünyada yılda 2,2 milyon kemik greftlemesinin yapıldığı tahmin edilmektedir. Bu işlemin, hastanın kendi kemiğinin alınarak yapıldığı otojen greftleme, halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Neden olduğu morbidite ve kısıtlı miktarda bulunması nedeniyle, alternatif yöntemler artan sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.⁵⁹

İdeal bir kemik grefti:

- Yeni kemik oluşumunun gerçekleşeceği osteoindüktif bir matriks veya iskeleye sahip olmalı.
- Osteoindüktif faktörleri içermeli
- Kemik yapımı ve kırık iyileşmesini sağlayıcı canlı osteojenik hücreler barındırmalı
- Yapısal desteğe sahip olmalıdır.²⁵

Kemik greftlerinin ve kemik yerine geçen maddelerin biyolojilerinin anlaşılması çok önem taşımaktadır. Buna göre:

-Graft osteojenezi: Graftte bulunan hücresel elemanların canlılıklarını korumaları ve nakil edildikleri yerde kemik oluşturmalarıdır.

-Osteoindüksiyon: Greft içindeki büyüme faktörleri ve diğer sinyal proteinlerinin, alıcı dokudaki mezenkimal kök hücrelerini osteojenez yönünde farklılaşmalarına neden olmasıdır.

-Osteokondüksiyon: Greftin kemik dokunun üzerine inşa edileceği, kan damarlarının içerisine penetre edeceği iskeleyi teşekkül etmesidir.²⁵

Kadavra insan kemiğinden elde edilen allojenik yöntemler, otoplastikten sonra en sık kullanılan greftleme tipidir. Bir çok potansiyel avantajları olmasına karşın, bazı olumsuz özellikleri söz konusudur:

- Hastalık bulaştırma potansiyelleri
- İmmün reaksiyon geliştirme ihtimali
- Hazırlanma sürecinde yapısal ve biyolojik özelliklerinin bir kısmını yitirmesi
- Pahalı olmaları gibi olumsuzlukları söz konusudur.^{12,18,59}

ALLOGREFTLER

İnsan kadavrasından elde edilen allogreftler kansellöz, kortikal, segmenter, osteokondral ve demineralize kemik matriksi şeklinde olmaktadır. En sık kullanılan tipleri ise demineralize kemik matriksi ve kansellöz allogreftlerdir.²⁵

Demineralize kemik matriksi

Demineralize kemik matriksi, kollajen tip 1, osteoindüktif büyüme faktörleri ve diğer kollajen olmayan büyüme faktörlerini içermektedir. BMP, kemikteki tüm proteinin % 0,1'ini teşkil etmesine rağmen osteoindüksiyonun başlatılmasında ve regülasyonunda çok önemli role sahip olduğu bildirilmektedir.^{78,79}

Demineralize kemik matriksi, hem osteokondüktif, hem de osteoindüktif özellik göstermektedir. DBM; kemotaksis, mitoz, kıkırdak metaplazi ve endokondral

ossifikasyon basamakları ile osifiye olmaktadır. Demineralize kemik matriksi, canlı kemik hücresi veya diğer yapı taşı hücrelerini içermemektedir. Bu nedenle, demineralize kemik matriksi, ya iyi kanlanan ve yoğun osteoprogenitör desteği olan bölgelerde kullanılması ya da otojen kemik grefti ile desteklenmesi gerekmektedir.

Mekanik desteği olmayan demineralize kemik matriksine, uygulama kolaylığı için bazı katkı maddeleri eklenmektedir. Hazırlanmasında, yaklaşık 100-400µm büyüklüğe parçalanmış kemik, 0,5 N HCl ile demineralize edilir. Gliserol eklenerek hazırlanan formun (jel), atimik ratlarda toksisiteye yol açtığı bildirilmekle birlikte insanlarda uzun süre kullanıma rağmen bir toksisite ile karşılaşılmamıştır. Daha sonra steril edilen form (gamma radyasyon veya etilen oksit) kullanıma hazır hale gelmektedir. Bir çok üretici tarafından üretilerek kullanıma sunulan preparatlar ile ilgili olarak, hazırlanma yöntemlerine bağlı olarak fiyat ve etkinlik farkları bildirilmektedir.^{25,65,78,79} Demineralize kemik matriksinin (DBM), osteoindüktif özelliğinin donörden donöre değişiklik göstermesi nedeniyle, Amerikan Doku Bankası Birliği ve F.D.A., her DBM preparatının tek donörden hazırlanması şartını koymuşlardır. Demineralize kemik matriksi, toz, granül, cips, jel ve hamur gibi formlarda sunulmaktadır.^{3,48,54}

DBM kaviter kemik defektlerinin greftlenmesi için uygun bir materyeldir. Ayrıca, DBM'nin uzun kemik kaynamamalarında ve kırık sonrası akut defektlerin tedavisinde, otogreftte yakın sonuçların alındığında da sonuçlar bildirilmiştir. DBM, sık olarak omurga füzyonlarında ve daha az sıklıkla diğer eklem artrodezlerinde de kullanım alanı bulmaktadır. Kombinasyonlar içerisinde en uygun olanının, DBM ile otolog kemik iliği kombinasyonunun stabil tespit varlığında kullanıldığı yöntem olarak bildirilmiştir. Ayrıca

DBM, otogreftin miktarının yetersiz kaldığı durumlarda greft hacmini arttırmak için de kullanılmaktadır.^{17,33,35,37,73,75,77,78,85}

Demineralize kemik matriksi de bir takım dezavantajlara sahiptir. Her ne kadar potansiyel hastalık bulaştırma ihtimali varsa da dekalsifikasyon işlemi esnasında mikroorganizmaların (özellikle HIV) inaktive ve elimine ettiği düşünülmektedir. Ancak, potansiyel risk her zaman devam etmektedir.^{13,44} Benzer şekilde genç donörden hazırlanan DBM ile daha yoğun osteoprogenitor özellik sağlanırken, bu özellik yaşlı donörlerden hazırlanan DBM'lerde ise daha düşüktür. Pek çok araştırmacı DBM ile otojen kansellöz greft ile elde edilenlere benzer kemik iyileşmesi elde ettiklerini bildirirse de bu iki yöntemi prospektif, randomize, kontrollü çalışmalarla karşılaştıran çalışmaların yetersizliği nedeniyle sağlıklı bir karşılaştırma yapılamamaktadır.^{23,25,27,60,62,66}

Allogreftlerin bir diğer dezavantajı ise uygulanan hazırlanma yöntemlerine rağmen gösterdikleri immünojenik özellikleridir. Bu nedenle daha sık oranda greft rezorpsiyonu, enfeksiyon ve daha yavaş kemik oluşumu ile sonuçlanabilmektedir. Bu özelliklerin otogreft ile daha az oranda gözlemlendiğini bildiren çalışmalar mevcuttur.²⁶

Kollajen

Tip I kollajen, kemik hücre dışı matriksinde en fazla bulunan proteindir. Mineralizasyon için uygun bir yapı oluşturduğu düşünülen kollajen aynı zamanda matriks proteinleri için bağlanma noktası olarak görev alır.

Kemik Büyüme Faktörleri

Kemikte meydana gelen osteojenik aktiviteler bazı hormonlar ile lokal olarak salınan peptidler ile düzenlenmektedir. Kemik üzerinde etkisi olan büyüme faktörleri, kemik morfojenik protein (BMP), dönüştürücü büyüme faktörü- beta (TGF- β), insülin

benzeri büyüme faktörü (IGF-I, II), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü olarak sıralanabilir. Bu proteinlerin kullanıldığı bir çok çalışmada osteoblastik hücrelerin farklılaşması, çoğalması ve sekretuar fonksiyonlarının etkilendiği gösterilmiştir.^{40,42,45,87}

Kemik morfojenik protein, düşük molekül ağırlıklı bir polipeptittir. Etkisini, osteoprogenitör hücrelerin kondroid dönüşüm göstermesi ve endokondral kemik oluşumunu ve kollajen sentezlenmesini uyarması şeklinde gösterir. Rekombinant teknoloji ile oldukça yüksek maliyet ile üretilen BMP, etkinliği en çok araştırılmış büyüme faktörlerindendir.^{40,42,45}

Dönüştürücü büyüme faktörü- beta (TGF- β), enflamasyon ile iyileşme süreçlerini ilişkilendiren büyüme faktörüdür. Fibroblastlar ve makrofajlar için kemotaktik özellik gösteren TGF- β , kollajen ile diğer ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezini, angiogenezi ve mezenkimal hücre göçünü uyarmaktadır. Kırık hematomundan trombositlerce yoğun miktarda TGF- β salındığı gösterilmiştir. Hem intramembranöz, hem de endokondral iyileşme üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir.^{40,42,87}

Kemik morfojenik proteinler

İleri düzeyde osteoindüktif özellikler gösteren kemik morfojenik proteinler (BMP), rekombinant yöntemler ile sınırsız miktarda üretilmektedirler. Rekombinant insan BMP-2 ve osteojenik protein-1 (OP-1) ile deneysel ve klinik çalışmalar ile başarılı sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen, çok yüksek maliyeti, potansiyel doz etkileşimleri ve antikor oluşum ihtimali, bu maddelerin rutin klinik kullanımının önünde bir engel teşkil etmektedir.^{7,8,36,72}

Kemik morfolojik protein, iki şekilde elde edilmektedir: Rekombinant ve ekstrakt. Ekstraktlar rekombinantlardan farklı olarak hem BMP, hem TGF, hem tip I kollajen, hem de diğer büyüme faktörlerini içermektedir. Ekstrakt BMP preparatlarının bir diğer avantajı ise, kemik oluşumu için gereken daha fizyolojik miktarlarda bulunmalarıdır. Ekstrakt BMP preparatları, heterodimer BMP'ler içermektedir. BMP'ler dokuda dimerler halinde bulunmaktadır: homodimerler (aynı alt-üniteden oluşmuş) ve heterodimerler (iki farklı alt –üniteden oluşmuş). Bazı heterodimer BMP'lerin homodimer BMP'lerden daha etkili olduğuna dair veriler bildirilmiş. Ancak ekstrakt BMP'lerin de bazı dezavantajları söz konusudur. En önemli dezavantajı, içeriğindeki BMP miktarının çok değişken olması ve rekombinant BMP'den daha düşük olmasıdır. Bir diğer sorun ise, kemikte normalde yer alan ve osteojenezi inhibe eden faktörler ile birlikte bulunmasıdır.

Rekombinant BMP, kemik morfojenik proteini encode eden cDNA'nın viral vektörler kullanarak memeli hücre kültürüne (Çin hamster yumurtalığı) ekilmesi ile elde edilir. Daha sonra kültürdeki hücreler çoğaltılarak BMP üretmeleri sağlanır. Kullanılan hücre kültürü memeli olduğu için BMP, İn vivo ortamdakine benzer şekilde, tamamen fonksiyonel glikolize dimerler halinde salgılanmaktadırlar. Dolayısıyla etkisi standardize edilmiş bir kemik morfojenik protein elde edilmektedir. Rekombinant BMP'nin dezavantajları ise, heterodimer BMP'lerin üretilmesinin mümkün olmaması ve yüksek maliyeti olarak sayılabilir.³¹

Rekombinant BMP'lerin etkinliğinin doz bağımlı olduğuna dair çalışmalar bildirilmiştir. Rat femurunda oluşturulan 5 mm.'lik defektin sıgır kaynaklı protein ekstraktı (SKPE) yoluyla BMP uygulanması ile iyileşmenin araştırıldığı bir çalışmada 11.0 µg BMP ile hem radyolojik, hem histolojik, hem de mekanik olarak kaynamanın

oluştugu bildirilmiş. Buna karşın 1,4 µg BMP ile osteogenezin uyarıldığı ancak kaynama için yeterli olmadığı gösterilmiş.⁸⁹

İnsan kemiğinden pürifiye edilerek elde edilen kemik morfojenik proteinin, antijenden arındırılmış, allojenik kortikal kemik taşıyıcıyla kullanıldığı bir modelde, 30 femur kaynamama veya yanlış kaynama vakasında % 80 sorunsuz kaynama elde edildiği bildirilmiş. İnsan kaynaklı BMP/ antijenden arındırılmış allogreft ile oluşturulan sistemin femoral rekonstrüksiyonlarda alıcı dokuda kemik oluşumunu ve greft remodelizasyonunu uyardığı bildirilmiş.³⁴ Ancak bu yöntemin dezavantajı olarak insan kemiğinden kemik morfojenik proteinin elde edilmesinin maliyetleri çok yükseltmesi olarak sayılabilir.

Kemik protein ekstratları

Kemik protein ekstratları hem allojenik hem de xenojenik olarak elde edilmektedir. Allojenik KPE elde edilmesi maliyeti çok fazla artıran bir sorun olarak karşılaşılmıştır. Bu nedenle sığır kemiğinden ekstrakt üretilmesi yoluna gidilmiştir.

Sığır veya at kaynaklı kemik protein ekstratları, allogreftlere alternatif olarak kullanılabilecek maliyeti düşük, sınırsız miktarda bulunabilecek bir yöntem olarak düşünülmektedir. Çeşitli ticari isim altında üretilen sığır kemik protein ekstratı (Colloss-B), yüksek oranda saflaştırılmış tip I kollajen ve çözünür olmayan matriks proteinleri içermektedir. İmmünojenik özellik ve hastalık transmisyonu riski açısından allogreftlerden daha üstün olduğu belirtilen bu greftlerin kullanıldığı deneysel ve klinik çalışmalarda başarılı sonuçlar bildirilmiştir.^{2,4,70} Osteoindüktif ve osteokondüktif özellik gösteren bu yapı, mekanik destekten yoksundur ve genellikle bir taşıyıcı gereksinimi oluşturmaktadır.

Sığır kaynaklı kemik protein ekstraktı, olumlu sonuçlar vermiş olan üç BMP preparatından biridir.^{10,20} Diğer iki preparat, memeli hücre kültürlerinde üretilen rekombinant proteinlerdir. Bu proteinlerin saflaştırılmasıyla elde edilen rhBMP-2 ve rhBMP-7 (Osteojenik protein-1) ile ümit verici sonuçlar bildirilmiş.^{68,82} Sığır protein ekstraktı, bu iki preparattan farklı olarak bünyesinde tip I kollajen ile diğer bazı çözülmeyen matriks proteinleini barındırmaktadır. Bu içeriği nedeniyle hem osteoindüktif, hem de osteokondüktif bir özellik taşımaktadır. Ek olarak kollajenin, kemik formasyon sürecinde mezenkimal hücreler üzerinde kemotaktik etki gösterdiği, bu hücrelerin adezyonunu ve büyüme faktörleri ile kompleksler oluşturduğu düşünülmektedir.^{52,53} Kollajen fibrilleri, ek olarak yeni oluşmuş mineral kristalleri için bağlantı noktaları teşkil etmektedir. Bu yöntemin kullanıldığı modelde, mezenkimal hücrelerin kondroid matriks üreten hücrelere farklılaşmasının ardından endokondral kemikleşme ile iyileşme meydana geldiği gösterilmiş. Otojen otogreft ile sığır- kemik protein ekstraktının karşılaştırıldığı bir deneysel anterior spinal füzyon modelinde birinci ayda alınan dokuda otogreft grubundan daha yoğun kıkırdak dokusu oluşumu izlenmiş. Buna neden olarak, otojen greftte daha fazla canlı hücrenin barındığını ve buna ikincil olarak endokondral osifikasyonun daha hızlı olduğu düşünülmüş. Aynı çalışmada üçüncü ayda alınan spesimenlerde ise bu farkın kaybolduğu ve otogreft ile aynı miktarda osifikasyon gözlenmiş.⁴⁷

Sığır kaynaklı kemik-protein ekstraktı, rekombinant kemik morfojenik proteinlere ucuz bir alternatif olarak etkin olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.⁴⁷ Ancak bu ekstraktın hücrese seviyedeki mekanizmasının mezenkimal kök hücreler üzerinde mi olduğu, yoksa ostegenetik döngüde rol alan matür hücreler mi olduğu tam olarak ortaya

konamamıştır. İnsan telomeraz reverse-transkriptaz aktivitesi gösteren insan mezenkimal kök hücresi serisi üzerinde yapılan bir in vitro çalışmada, sığır kemik protein ekstraktının hem immatür seri hem de matür seri üzerinde etkisi olduğu gösterilmiş. Bu çalışmaya göre, sığır kemik protein ekstraktı (SKPE), farklılaşmamış hücrelerin farklılaşma sürecini etkilemeksizin proliferasyonunu uyardığı, daha matür osteoblastların ise alkalen fosfataz ve kollajen üretim aktivitesini artırdığını ancak proliferasyonunu etkilemediği gösterilmiştir.⁸⁸ Mekanizmasında, tip 1 kollajenin ek olarak mezenkimal osteoprogenitör hücrelerin kemotaksisinde, adezyonunda, proliferasyonunda ve büyüme faktörleri ile kompleksler yapmasına yol açtığı bildirilmektedir.^{1,52,53,58} Ayrıca kollajen, yeni oluşmuş mineral kristalleri için bir bağlanma yeri oluşturmaktadır.

Her ne kadar sığır kemiği, insan kemiğine göre çok daha bol ve sorunsuz elde edilebilse de, prionlar ile taşınabilen spongiform ensefalopati riski sığır kaynaklı xenogreftlerde söz konusu olabilen bir sorun teşkil edebilmektedir. Taşınabilen spongiform ensefalopatinin (TSE), büyük baş hayvanlarda, küçük baş hayvanlarda, evcil bazı hayvanlarda görülebildiği bildirilmekle birlikte atlarda TSE vakası bildirilmemiştir.^{86,43} Bu sorundan kaçınmak için at kaynaklı kemik protein ekstraktı geliştirilmiştir. Bu çalışmada at kaynaklı kemik-protein ekstraktının etkinliğinin, sık olarak klinik uygulamalarda kullanılan demineralize kemik matriksi ile karşılaştırması amaçlanmıştır.

Sığır kemik protein ekstraktının ektopik kemik oluşumundaki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, ratlarda subkutan dokuya titanyum kafes içinde SKPE yerleştirilerek osteoindüktif etkinliği araştırılmış. Bu çalışma sonucunda rekombinant BMP'lerin kullanıldığı çalışmalara benzer bir yeni kemik oluşumu bildirilmiş. Ancak bu

çalışmada kıkırdak matriks olmaksızın kemik dokusunun geliştiği gözlenmiş. Buna neden olarak, nisbeten uzun (8-12 hafta) implantasyon süresi düşünülmüş. Bu çalışmada aynı zamanda BMP-2 ile TGF beta'nın birlikte bulunduğu SKPE ile, yalnız BMP-2 ye kıyasla daha yoğun osteoindüksiyon gözlendiği bildirilmiş. Bu çalışmada aynı zamanda yerleştirilen SKPE'nin zamanla küçülme gösterdiğine dikkat çekilmiş ve bu preparatın dokuda daha eşit bir şekilde sağlanabilmesi için uygun çatı-iskelet ihtiyacına dikkat çekilmiş.⁸¹

Sığır kaynaklı kemik protein ekstraktı ile otojen kemik greftleri üzerine trombosit zengin plazmanın etkinliğini araştıran bir çalışmada, trombosit zengin plazmanın osteogenezi uyardığını bildirmekle birlikte, 12 hafta sonunda SKPE ile otojen kemik grefti ile elde edilen kemik dokusu ile eşdeğer bir kemik dokusu elde edildiğini mikroskopik ve mikroradyografik olarak göstermişlerdir.⁶⁹ Çalışmada SKPE uygulanan grupta histolojik olarak 2. hafta sonunda defekte paralel trabeküler doku içerisinde kapiler oluşum gözlenmiş. 4. hafta sonunda ise, bu trabeküler yapı içerisinde periferde daha yoğun olmak üzere kemikleşme gözlenmiş. 12. hafta sonunda ise tam bir yapısal kemik iyileşmesi gözlenmiş.

Sığır kemik protein ekstraktının kullanıldığı bir güvenlik ve doz-yanıt çalışmasında, SKPE'nin güvenli ve etkin bir füzyon sağladığı gösterilmiş. Çalışmada tavşan ve insan olmayan primatlarda (resus maki) laminektomi sonrası posterolateral intertransvers lomber füzyon modeli kullanılmış. Laminektomi sonrası sığır BMP uygulamasının ardından herhangi bir enflamatuvar reaksiyonun gözlenmediği ve % 100 füzyon oranı bildirilmiş. Çalışmada tavşanda füzyonun sağlanması için 0,15 mg'dan fazla BMP uygulanması gerektiği, resus maymunu için ise 3-5 mg sığır kaynaklı BMP'nin

füzyon için yeterli olacağı bildirilmiş. Rhesus mamunundan elde edilen verilere dayanarak insanda sağlam bir füzyon dokusunun elde edilebilmesi için 12,5 – 50 mg sığır BMP gerekli olacağı tahmin edilmiştir.²⁰

At kemik protein ekstraktının (AKPE) etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, rat modelinde, titanyum kafes içerisinde ektopik (yumuşak doku) yerleşim sonrası osteoindüktif aktivite araştırılmış. Bu çalışmada AKPE ile SKPE ile eş miktarda osteoindüktif aktivite gözlenmiştir.⁵⁵ Bu çalışmada AKPE ile, yoğun bağ dokusu aktivitesi gözlenmekle birlikte bu durum tip I kollajene bağlanmıştır. Kollajen ağı osoteojenez ve anjiogenez için bir çatı işlevi görerek osteokondüksiyon etkinliği gösterdiği düşünülmektedir.⁵⁵

Çalışmada kullanılan at kemik-protein ekstraktı (Colloss-E), 12 yaşından genç atların uzun kemiklerinin diyafizlerinden ekstraselüler matriksin işlenmesi ile elde edilmektedir. Tüm ekstraksiyon ve liyofilizasyon işleminin aseptik şartlarda yapıldığı süreç sonunda, tip I kollajen ve BMP-2 ve TGF beta'nın da içlerinde bulunduğu diğer çözilemeyen proteinler elde edilmektedir.

Deneysel Hayvan Modelleri

Temel kemik biyolojisi ve kırık iyileşmesinin biyolojik temelleri, deney hayvanlarından elde edilen bilgilere dayanmaktadır. Rat ve fareler, haversiyan sisteme sahip olmamaları, anatomik olarak küçük olmaları ve tespit güçlüğü dezavantaj oluşturmaktadır. Kemiğin dayanıklılık ve sertliğinin in vivo değerlendirilmesi zordur. Aynı kemikten histolojik ve biyomekanik değerlendirme yapılabilmesi mümkün olamayabilmektedir. Kemirgenler ile bir deney yürütülmeden önce bir pilot çalışma yapılması ve modelin denenmesi gereksiz denek kaybını önlemek adına

uygulanmalıdır.^{41,56} Filojenik açıdan üst sınıflara yükseldikçe, tavşan ve kedi gibi türlerde haversiyan sistem oluşmaktadır. Boyutları nedeniyle tavşan, eksternal tespit, internal tespit ve intramedüller tespite uygun modeller oluşturabilmektedir. Büyüklükleri ve periferik venöz giriş mümkün olduğundan sistemik ilaç çalışmalarında kullanılabilir. ⁵⁶ Kontrol grubunda gözlenen spontan kaynama, ratlara göre tavşanlarda daha zor oluşmaktadır. Tavşan radiuslarında iyatrojenik oluşturulan 10 mm.'lik segmenter defektin, ulna sağlam bırakılmasına rağmen kaynamadığı gözlenmiştir.^{24,57} Kaviter defektlerde osteojenik aktivitenin araştırılması için tavşanda distal femurda lateral – medial yönde 5 mm.-12mm. defektlerin erken kaynama olmaksızın değerlendirme yapılabilmesine izin verdiği bildirilmiştir.¹⁹

Bu çalışmada at kaynaklı kemik protein ekstraktının osteoindüktif özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla kaviter kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine olan etkilerinin araştırılması için AKPE ve insan kaynaklı demineralize kemik matriksi karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, “T.C. Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı” tarafından B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/51-8294 sayılı etik kurul onayı ile yürütülmüştür.

Çalışmada, ortalama ağırlıkları 800- 1000 gr. Ağırlığında, 8-12 aylık 18 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. 18 tavşan üç gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol, ikinci grup demineralize kemik matriksi üçüncü grup ise at kaynaklı kemik protein ekstraktının kullanıldığı grup olarak belirlendi. Deneklerin tamamı aynı hayvan üretim merkezinden

temin edilmişlerdir. Çalışma Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Gruplar cinsiyet ve yaş olarak homojenize edilmişlerdir. Denekler muhtemel bir konsepsiyonun engellenmesi için dişi ve erkek olmak üzere ayrı barınaklarda tutulmuşlardır.

Greft materyali

Grup II'ye demineralize kemik matriksi 5 cc.(MTF, Edison NJ) , grup III'e at kaynaklı kemik protein ekstraktı olarak Colloss-E 20 mg. (Ossacur AG, Almanya) kullanılmıştır.

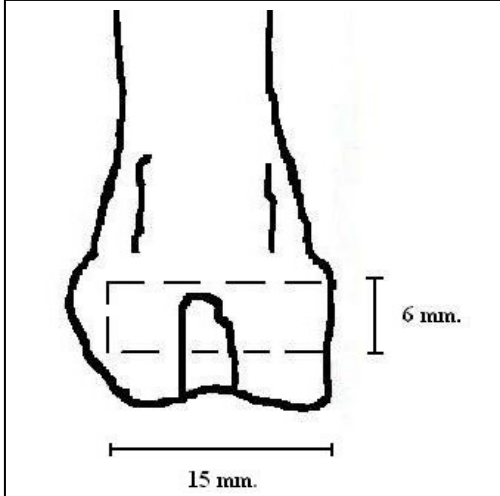
Cerrahi işlem

Cerrahi işlem Gazi Üniversitesi deney Hayvanları Laboratuvarı Ameliyathanesinde uygulanmıştır. İntramusküler ketamin 35 mg/kg ve xylazine 5 mg/kg ile genel anestezi sağlanmıştır. Yeterli anestezi ve analjezi sağlandıktan sonra deneklerin sol dizlerinin traş edilmesinin ardından antiseptik solüsyonlar kullanılarak antisepsi sağlandı. Ardından steril yara örtüleri ile örtüldükten sonra femur lateral kondil lateralinden 1,5 cm.'lik bir insizyon uygulandı. Cilt, cilt-altı ve fasya geçildikten sonra quadriceps lateralinden femur lateral kondiline ulaşıldı. Anterior eklem yüzeyinden 4 mm. posteriorda, distal eklem yüzeyinden 6 mm. proksimalde olacak şekilde, distal femur metafizinde 6 mm. çapında delici kullanılarak 6 mm. çapında, 12- 15 mm. derinliğinde defekt oluşturuldu.Eklem yüzeyinin ve medial duvarın sağlamlığı prob kullanılarak kontrol edildi. Ardından:

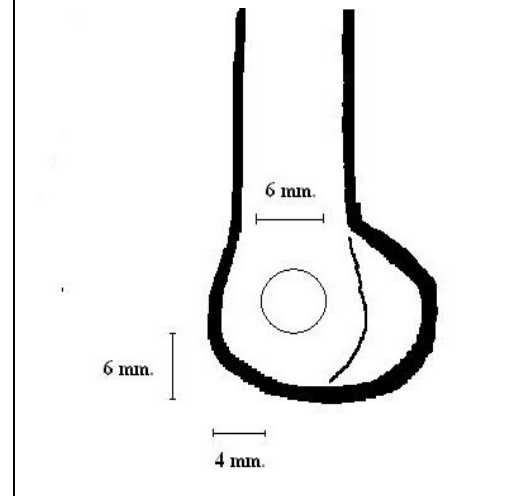
- Grup I, kontrol grubunda defektler boş bırakılıp cilt kapatılmıştır.
- Grup II, demineralize kemik matriksi grubu, defektler jel DBM ile her bir defekt yaklaşık 0,4 cc. olacak şekilde doldurularak cilt kapatıldı
- Grup III, at kaynaklı kemik protein ekstraktı grubunda ise her bir defekt 20 mg. Colloss-E ile doldurularak cilt ciltaltı kapatıldı.

Perioperatif ve postoperatif dönemde hiç bir denek kaybedilmemiş, hiç bir denekte de komplikasyon saptanmamış. Aynı gün içerisinde rutin beslenmelerine devam eden deneklerin birinci günden sonra serbest bir şekilde mobilize oldukları gözlenmiştir.

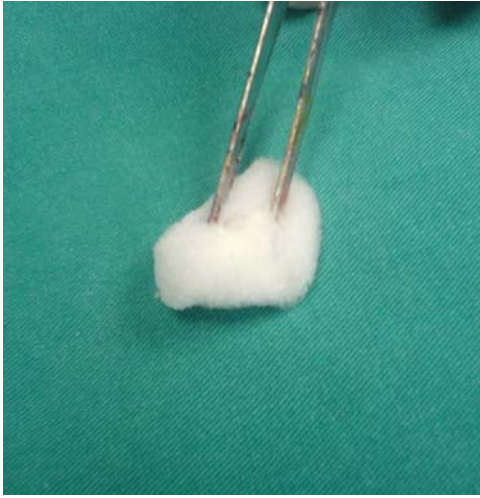
Denekler 6. hafta sonunda yüksek doz intravenöz ketamin uygulaması ile sakrifiye edilmişlerdir. Her bir deneğin femuru, diz ve kalça dezartikülasyonu uygulanmak suretiyle çıkarılmış ve radyolojik incelemeye alınmışlardır. Radyolojik incelemenin ardından spesimenler % 10 formaldehide alınarak histopatolojik incelemeye tabi tutulmuşlardır.



Resim 1. Oluşturulan defektin A-P plandaki görünümü



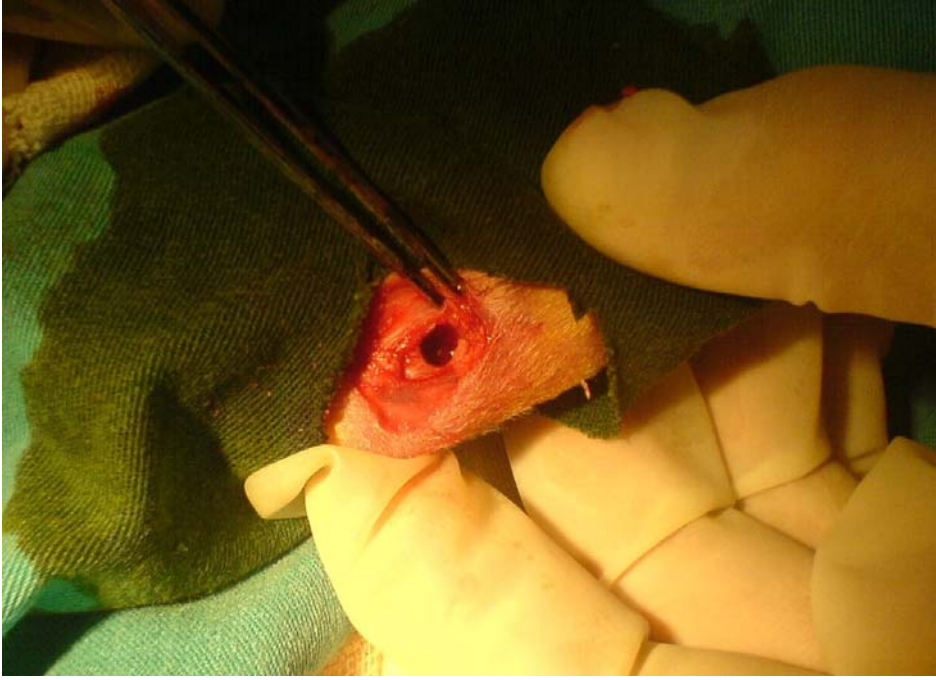
Resim 2. Oluşturulan defektin yan plandaki görünümü



Resim 3. At kaynaklı kemik protein ekstraktı (Colloss-E)



Resim 4. İnsan kaynaklı demineralize kemik matriksi



Resim 5. Diz lateralinden distal femura ulaşılarak oluşturulan defekt



Resim 6. Defektin doldurulmuş hali

Radyolojik değerlendirme

Alınan spesimenler AP ve lateral direkt radyografi alınarak değerlendirildi

Histolojik değerlendirme

Histopatolojik değerlendirme için alınan materyaller, yeterli dekalsifikasyon sağlanana dek % 10'luk formik asit solüsyonunda bekletilmiştir. İncelemeyi yapacak histoloğa hangi grubun hangi grefti temsil ettiğine dair bilgi verilmemiştir. Yeterli dekalsifikasyonun ardından dokular parafin bloklara gömülmüştür. Sagital planda lateral kondilden 5 µm. kesitler alınarak hematoksilen-eozin ile boyamanın ardından mikroskopik değerlendirmeye alınmışlardır.

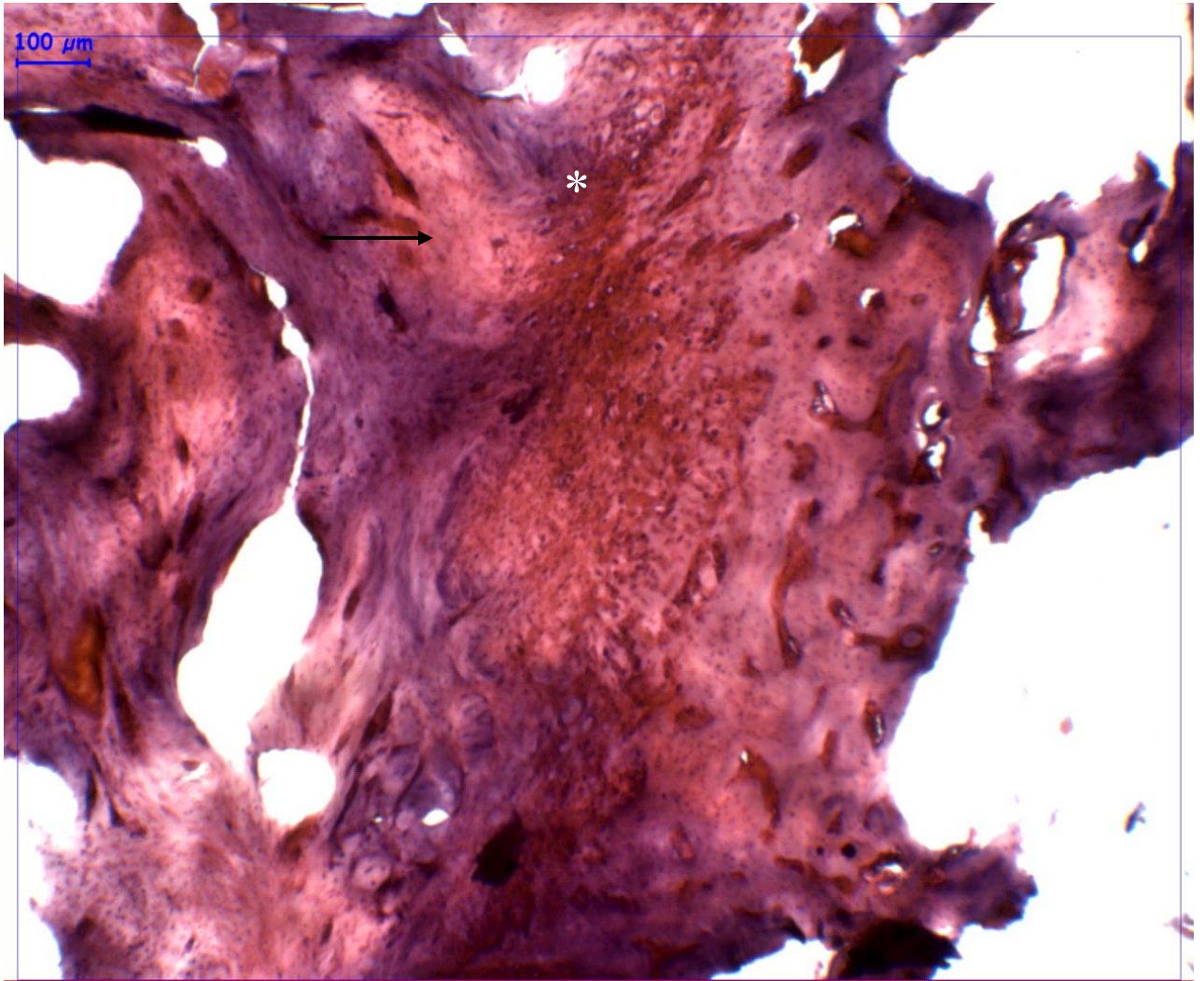
Histopatolojik değerlendirmede Salkeld ve arkadaşları tarafından kemik greftleri ve benzeri maddelerin iyileşmesinin değerlendirmesi için tanımladıkları histopatolojik skalası kullanılmıştır⁶⁷ (Tablo 1)

Kaynama Kalitesi	Kaynama bulgusu yok	0
	Fibröz kaynama	1
	Fibrokartilaj veya kartilaj kaynama	2
	Mineralize kıkırdak ve kemik kaynama	3
	Tam kaynama	4
Korteks gelişimi ve remodelizasyon	Korteks oluşumu yok	0
	Dış kenarlarda yeni korteks yoğunlaşması	1
	Belirgin dış korteks ve medulla oluşumu	2
	Korteks oluşmuş ancak köprüleşme yok	3
	Defektin tam köprüleşmesi ve korteks oluşumu	4
Kemik greft inkorporasyonu ve yeni kemik oluşumu	Greft duruyor, inkorporasyon yok, yeni kemik yok	0
	Greft duruyor, az miktarda yeni kemik ile inkorporasyon	1
	Greft duruyor, orta miktarda yeni kemik ve inkorporasyon	2
	Greft duruyor, yeni kemik var, erken remodelizasyon var	3
	Greft azalmış, greft inkorporasyonu iyi, belirgin yeni kemik	4
	Greft miktarı çok azalmış, kemik inkorporasyonu iyi, yeni kemik	5
	Mükemmel kemik inkorporasyonu, ileri derecede remodelizasyon	6

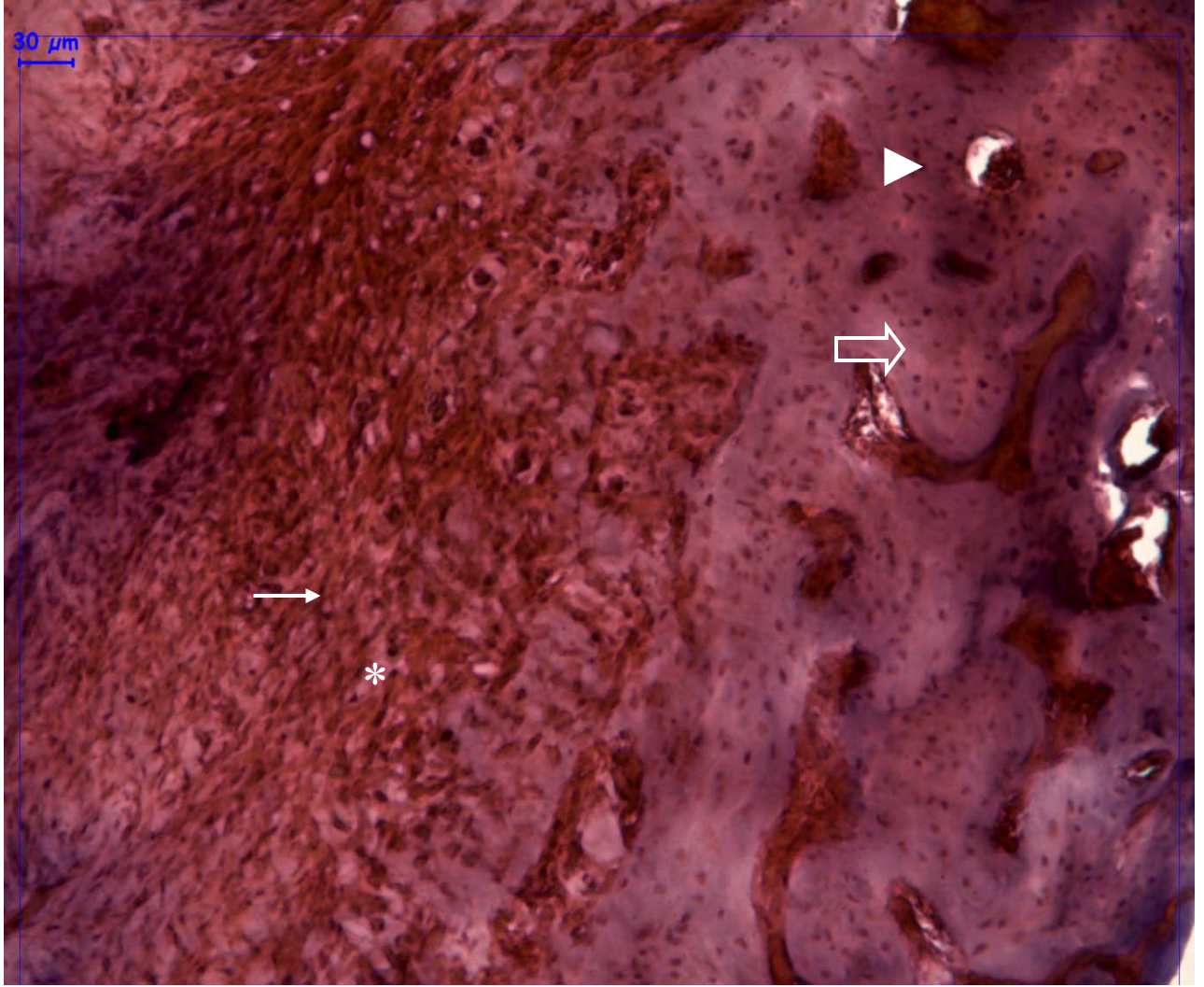
Tablo 1: Histolojik değerlendirme cetveli.

Histolojik değerlendirme için alınan kesitler lateral kondilden sagital planda alındığı için skorlamadaki korteks gelişimi ve remodelizasyon değerlendirilmedi. Kaynama kalitesi ve greft inkorporasyonu ve yeni kemik oluşumu ile ilgili veriler değerlendirildi.

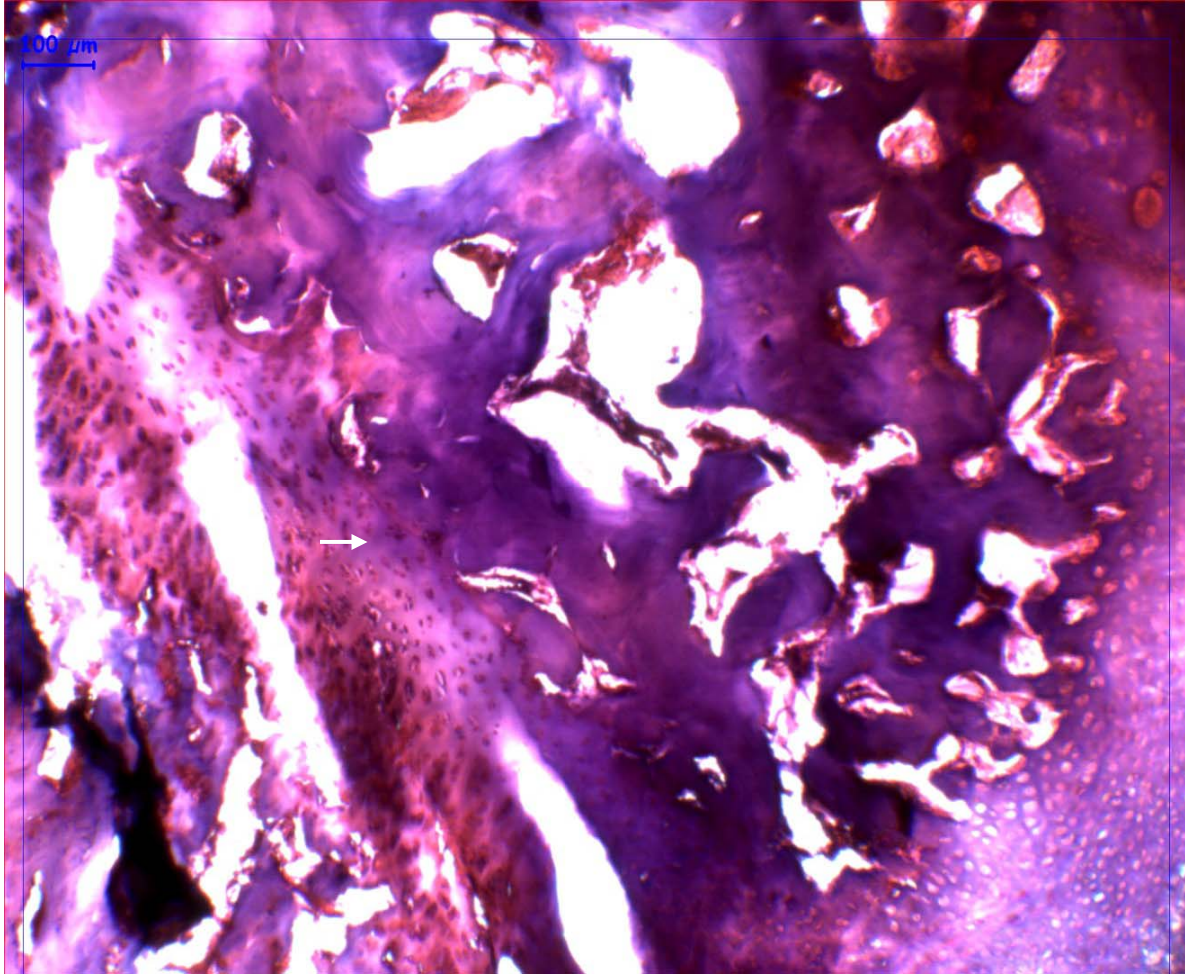
Bulgular SPSS 12.0 for Windows kullanılarak Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi.



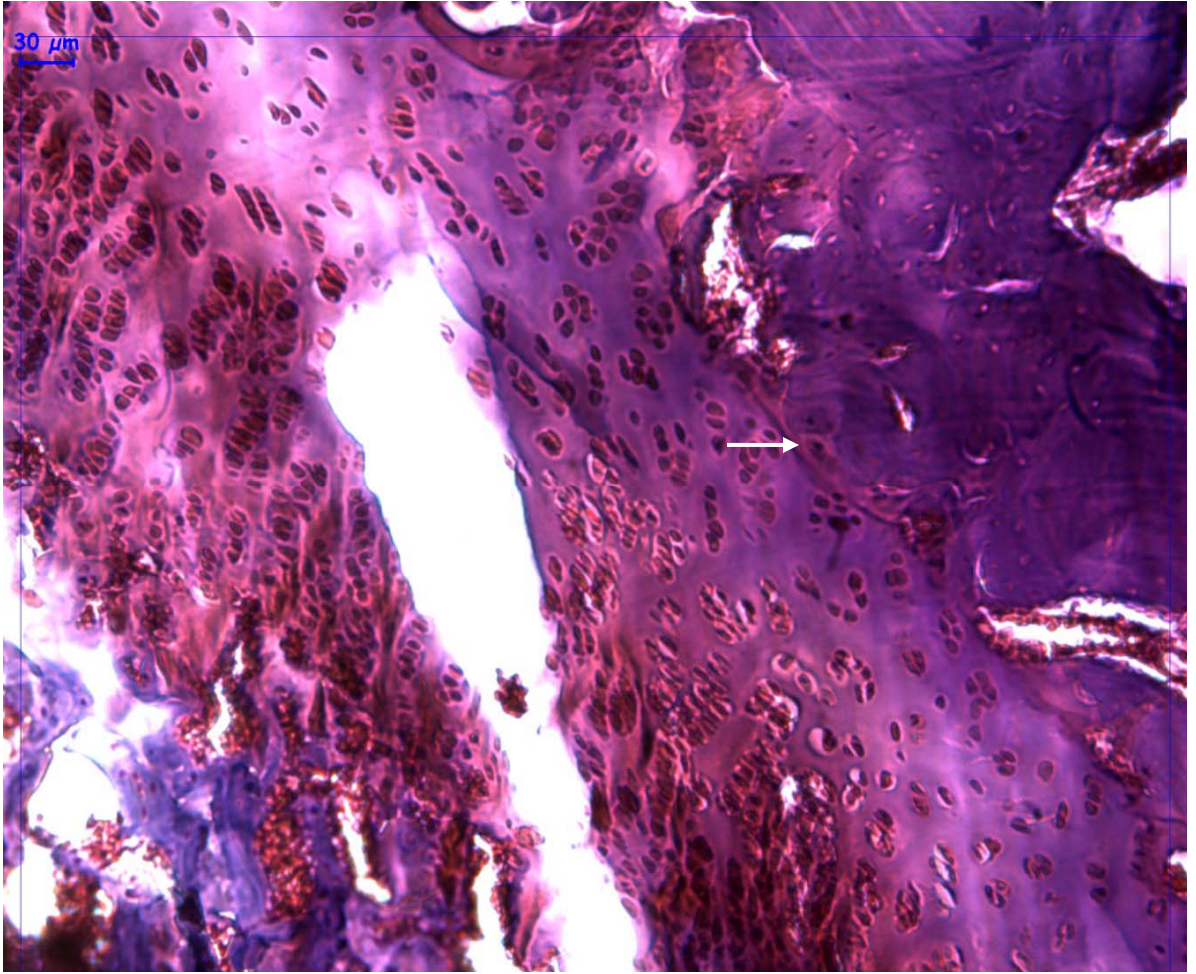
Resim 7. Kontrol grubu. Kollajen liflerinden zengin bağ doku (→), ve immature kemik dokusu.(*).
H&E X40



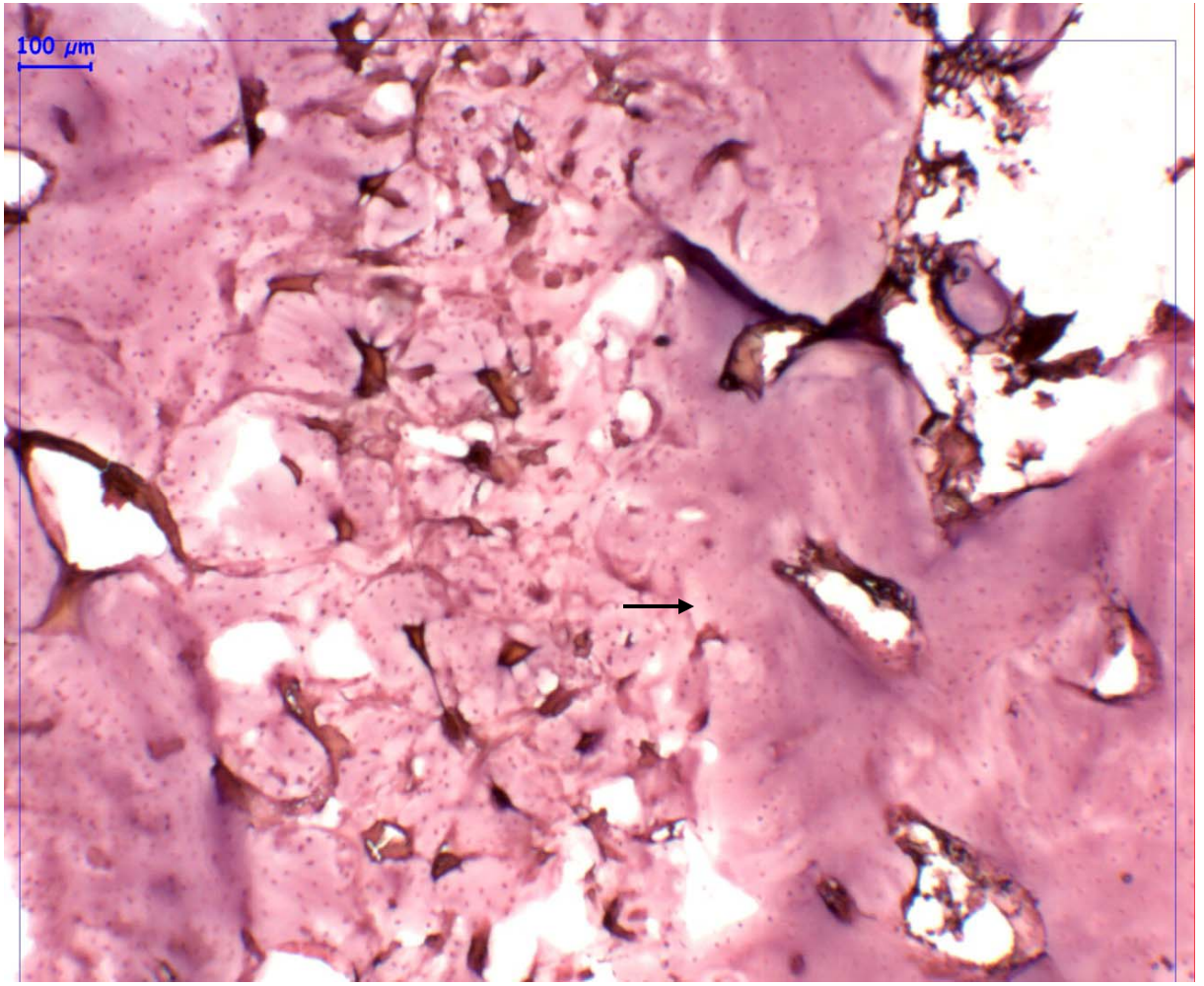
Resim 8. Kontrol grubu. İrregüler seyirli kollajen lifleri (→), ve iğsi şekilleri ile fibroblastlar (*) görülüyor. Düzenli kemik lamelleri(⇒) ve lameller arasına sızılmış lakünalar içerisindeki osteositler (►) izleniyor. H&E X100



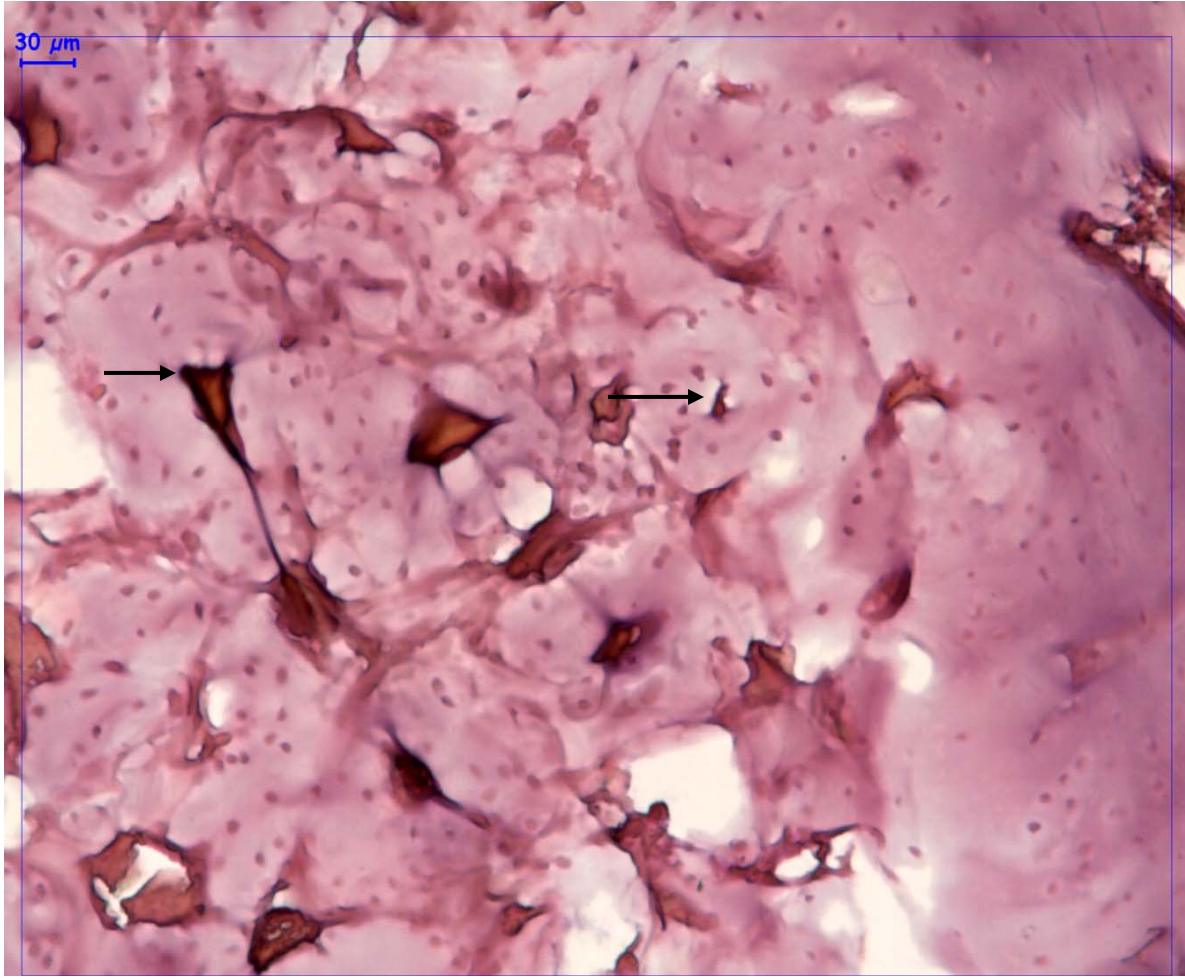
Resim 9. Demineralize kemik matriksi. İmplantasyon bölgesinde kemik öncülü kıkırdak doku (→) izlenmekte. H&E X40



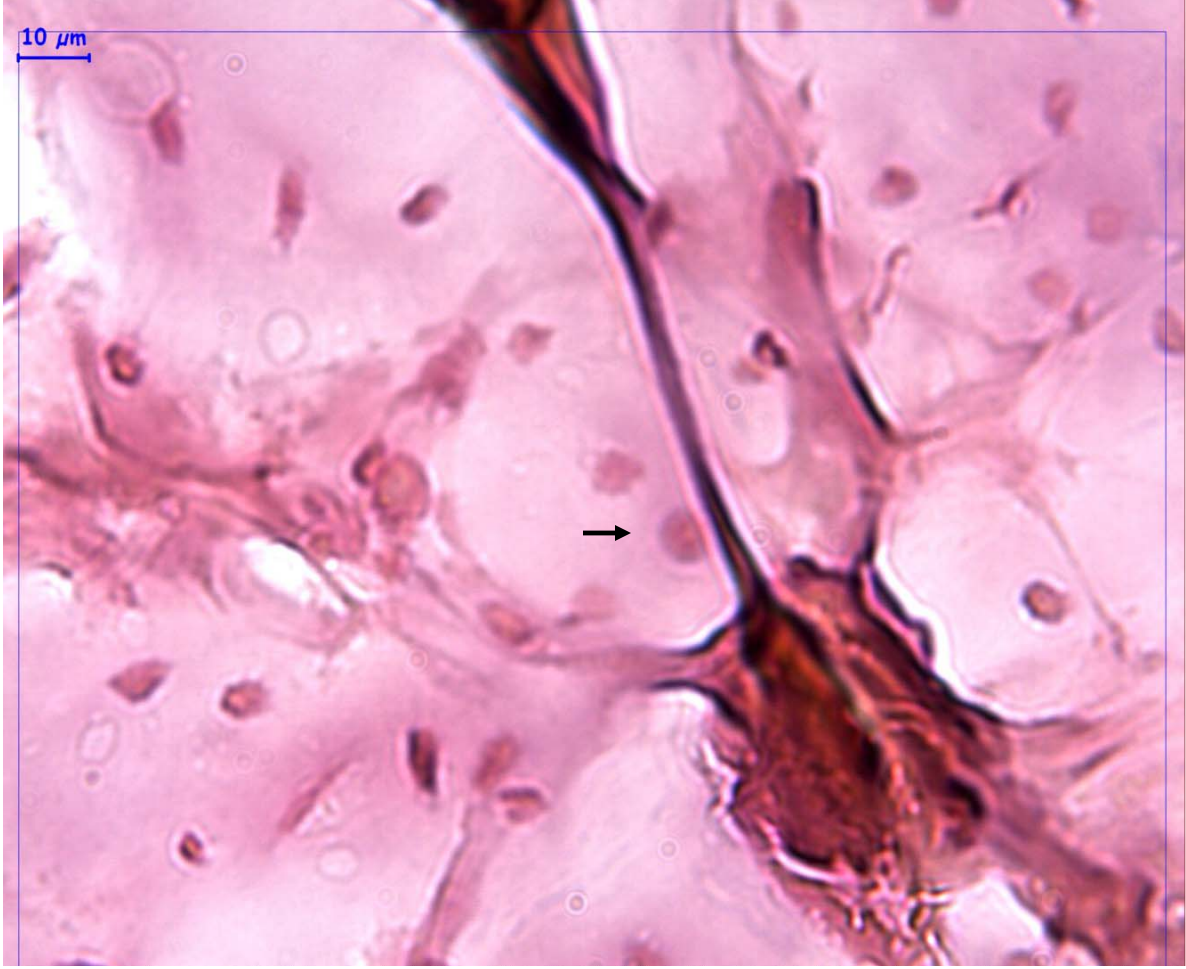
Resim 10. Demineralize kemik matriksi. Greftin kemik dokusuna farklılaştığı alan (→). H&E X 100



Resim 11. Kemik protein ekstraktı grubu. İmplantasyon bölgesinin matür kemik dokusuna dönüştüğü alan(→). H&E X 40



Resim 12. Kemik ekstraktı grubu. İmplantasyon bölgesinde yer yer dairesel dizilim gösteren lameller yapı (→). H&E X100



Resim 13. Kemik protein ekstraktı grubu. Oval ve şişkin osteositler (→). H&E X400

BULGULAR

Histopatolojik değerlendirmede genel olarak, kontrol grubu kemik dokusu incelendiğinde yara bölgesinin tamamen kollejenz (kollagen liften zengin fibröz bağ doku) bir doku ile dolduğu ve komşu yara bölgelerindeki kemik dokunun yeni şekillenen kollajenöz skar dokusu ile birleştiği izlendi (Resim 7). Büyük byltmeli incelemelerde kemik dokudan ayrı olarak henüz demetler oluşturmamış, her yönde seyreden kollajen lifleri ve iğsi şekilleri ile karakterize fibroblastlar izlendi. Aynı alanda kemik dokusu, düzenli kemik lamelleri ve lameller arasına dizilmiş lakünalar içerisindeki osteositlerle belirgin olduğu dikkat çekti (Resim 8).

Demineralize kemik matriksi uygulanan grupta ise, yara bölgesine implante edilmiş olan demineralize kemik matriksinin çoğu alanda kemik öncülü olan kıkırdak dokuya farklandığı ve bu görünümü ile epifiz plağını taklit ettiği izlendi. Yeni oluşan kıkırdak dokunun yaranın yaygın alanlarında kemik dokuya farklaştığı, bazı bölgelerde ise greftin kemik dokuya farklılaşmaya devam ettiği izlendi. Bu alanlarda henüz olgun kemik dokusu şekillenmediği gözlendi. (Resim 9,10).

Kemik protein ekstraktı implante edilen 3. grupta kesi bölgesinin tamamen kemik dokuya farklılaştığı dikkati çekmektedir. Gerek hücresel içerik, gerek kollagen lif düzenlenimi, gerekse mineralizasyona bağlı boyanma özelliği açısından görünümün yara bölgesine komşu kemik bölgesiyle eşdeş olduğu izlendi (Resim 11). Büyük byltmeli incelemelerde implant bölgesi değerlendirildiğinde kemik lamellerinin yer yer dairesel dizilim göstermekle birlikte henüz tam olarak organize olmadığı ve osteositlerin olgun kemik dokudakilere göre şişkince oval oldukları izlendi. Bu bulgu, yeni oluşan bu kemik dokunun primer kortikal kemik olduğunu göstermekteydi (Resim 12,13).

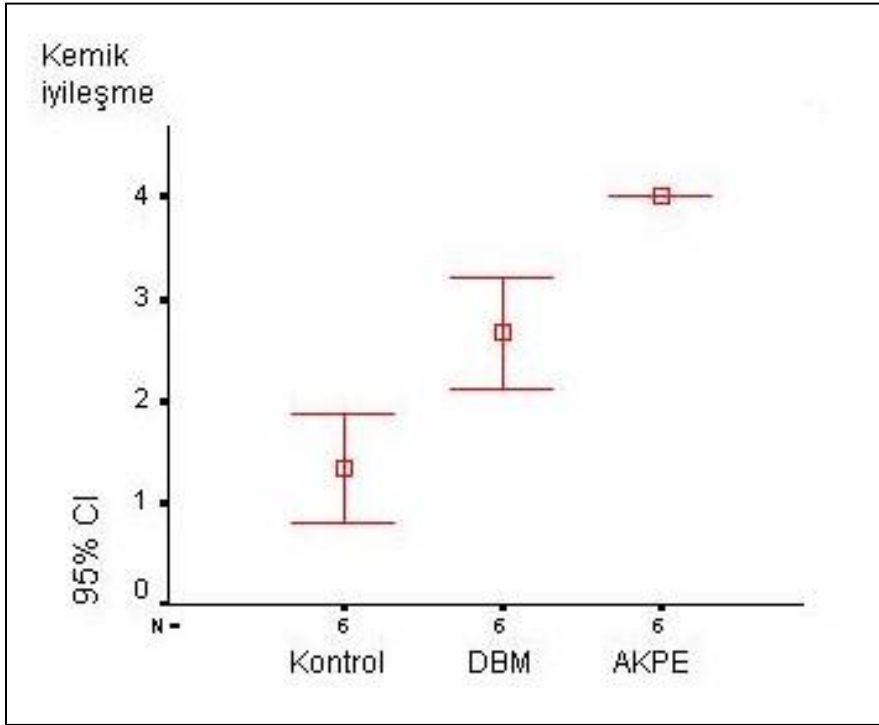
Kaynama kalitesi skorları açısından:

Kontrol grubu (n=6): Ort. 1,33 (SD=0,516)

Demineralize kemik matriksi grubu (n=6): Ort. 2,66 (SD=0,516)

Kemik protein ekstraktı grubu (n=6): Ort. 4 (SD=0)

Kaynama kalitesi skorları açısından, kontrol grubu ile demineralize kemik matriksi grubu arasındaki istatistiksel fark Kruskal-Wallis testi ve Bonferroni sağlaması ile hesaplandığında, DBM lehine anlamlı farklılık gözlemlendi.(p=0,007). Kontrol grubu ile at kemik protein ekstraktı grubu arasında AKPE lehine de benzer yöntem ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi.(p=0,002). Demineralize kemik matriksi grubu ile AKPE grubu arasında da aynı yöntemle anlamlı farklılık gözlemlendi (p=0,002). (Grafik 1)



Grafik 1. % 95 confidence intervalde at kaynaklı kemik protein ekstraktı ile anlamlı derecede yüksek kemik iyileşme skorları.

Kemik greft inkorporasyonu ve yeni kemik oluşumu:

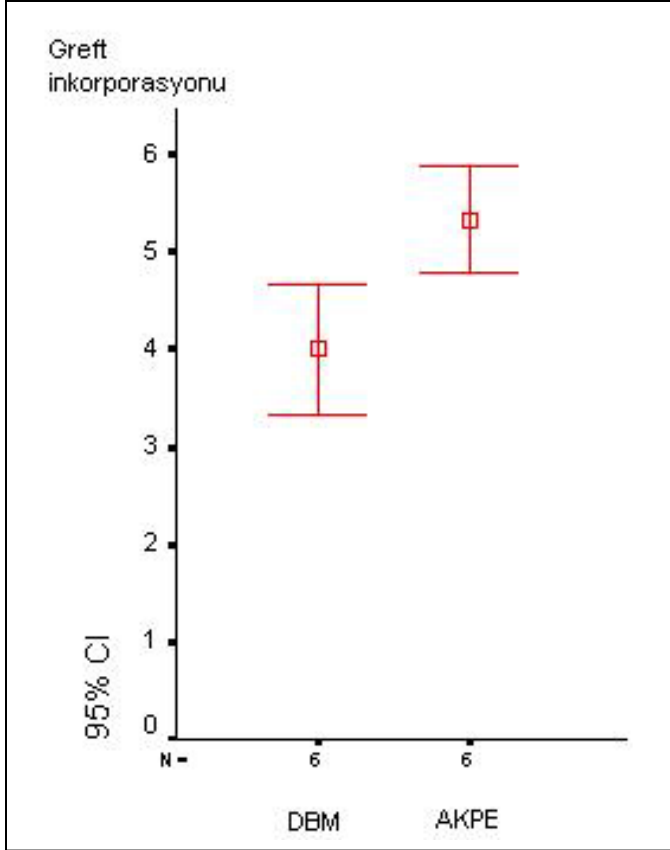
Demineralize kemik matriksi grubu (n=6): Ort. 4 (SD=0,632)

Kemik protein ekstraktı grubu (n=6): Ort. 5,33 (SD=0,516) olarak hesaplandı.

Kemik-greft inkorporasyonu skorları ise demineralize kemik matriksi ve kemik protein ekstraktı gruplarında değerlendirildi. Veriler Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı P değeri 0,05 olarak belirlendi. AKPE grubunda ortalama 5,33, demineralize kemik matriksi 4,0 olarak bulundu. Buna göre bu iki grup

arasında inkorporasyon açısından kemik protein ekstraktı lehine yüksek skor elde edildi.

($p=0,002$) (Grafik 2)



Grafik 2. % 95 confidence intervalde at kaynaklı kemik protein ekstraktı ile anlamlı derecede yüksek greft inkorporasyon skorları.

Radyolojik olarak, defektlerin AP ve lateral grafilerinde herhangi bir X-ray bulgusu açısından farklılık gözlenmedi (Resim 14,15,16).



Resim 14: Kemik protein ekstraktı uygulanan distal femurun lateral grafisi. (*) Defektin oluşturulduğu bölge.



Resim 15: Demineralize kemik matriksi grubu lateral grafisi. (*) Defektin oluşturulduğu bölge.



Resim 16: Kontrol grubu lateral grafisi, (*) Defektin oluşturulduğu bölge.

TARTIŞMA

Radyolojik olarak kaviter defektlerin iyileşmesi ve mineralizasyonunun değerlendirilmesi sorun teşkil etmektedir. Segmenter defektler radyolojik olarak direkt radyografi ile kalsifikasyon, köprüleşme ve kaynama açısından değerlendirilebilirken, kaviter ve blok defektler ancak mikro BT ile kısmen değerlendirilebilmektedir^{47,67}. Dolayısıyla almış olduğumuz direkt radyografi görüntüleri açısından bakıldığında her ne kadar bir miktar fark gözlenmekte ise de, bu veriler tamamen subjektif olup bilimsel bir değer taşımamaktadır.

Literatürde sığır kemiğinden elde edilen kollajen tip I ve diğer matriks proteinlerden oluşan kemik ekstrelerinin etkinliği ile ilgili bir çok çalışma yayınlanmıştır.

Yüksek fiyatlı rekombinant kemik morfojenik proteine alternatif olarak geliştirilmiş sığır kemiği kaynaklı kemik morfojenik protein ve kollajen ekstraktlar ile yapılan hayvan modellerinde güvenli ve etkili oldukları bildirilmiştir. İlk olarak 1995 yılında resus maymunlarında intertransvers füzyonda demineralize kemik matriksi ile kullanıldığında 12 haftada füzyon oluştuğu görülmüş.⁹ Primat olmayan modellerde ise Boden ve arkadaşları otogreftten daha yoğun ve güçlü bir füzyon elde ettiklerini bildirmişlerdir.¹⁰

Minomide ve arkadaşları, rekombinant BMP için taşıyıcı olarak seramik ile tip I kollajene göre daha başarılı füzyon oranları bildirmişlerdir.⁵⁰ Ancak Boden, bu yazıya yanıt olarak Minomide ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan BMP dozunun önceki çalışmalarda uygulananndan daha düşük (100 µg) olduğuna dikkat çekmişlerdir.⁶ Çalışmada kullandığımız 20 mg. kemik protein ekstraktının ise değişken oranlarda BMP

içerdiği için standardize edilmesi ve bu değer ile karşılaştırma yapılabilmesi mümkün olmamaktadır.

Minomide ve arkadaşları yaptıkları bir diğer çalışmada ise, tavşan posterolateral lomber intertransvers füzyon modelinde, tip I kollajen ve rekombinant kemik morfojenik proteinini sığır kemiği ile taşıdıkları bir model ile otojen kemik greftini karşılaştırdıkları bir çalışmada tarif ettikleri model ile otogreftten daha başarılı füzyon elde ettiklerini bildirmişlerdir.⁵¹

Li ve arkadaşları, domuz anterior interbody füzyon modelinde sığır kaynaklı kemik protein ekstraktı (Colloss) ile otojen greftten daha başarılı füzyon elde ettiklerini hem histolojik hem de radyografik (mikro BT) olarak göstermişlerdir.⁴⁷

Walboomers ve arkadaşları, sığır kaynaklı kemik protein ekstraktı (Colloss) ile rat subkutan kemik oluşumu modelinde 8-12 hafta içinde ektopik kemik oluşumu elde etmişlerdir.⁸¹

Schlegel ve arkadaşları, domuz kranium kritik boyut defekti modelinde sığır kaynaklı kemik protein ekstraktı (Colloss) ile otojen kemik grefti ile karşılaştırılabilir derecede kemik iyileşmesi oluştuğuna dikkat çekmişlerdir. Bu çalışmada dikkat çeken önemli bir özellik ise 2 ve 4. haftadaki mineralizasyonun otojen greft grubundan daha yoğun olduğu olarak bildirilmiş. Buna neden olarak ekstredeki proteinlerin osteojenezi daha erken olgunlaştırması olarak düşünülmüş.⁶⁹

Damien ve arkadaşları, primatlarda pre klinik güvenlik çalışması ile sığır kaynaklı kemik protein ekstraktının (NeOsteo) etkinliğinin otojen kemik greftinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.²⁰

Woo ve arkadaşları, sığır kaynaklı kemik protein ekstraktının direkt olarak mezenkimal kök hücreleri ve immatür osteoblastların üzerinde etki gösterdiği ve endokondral osifikasyon olmaksızın osteojenezi uyardığı düşünülmektedir.⁸⁸ Ancak bu teoriye karşı olarak Vehof ve arkadaşları, rekombinant insan kemik morfolojik proteininin uyardığı osteogenez modelinde her ne kadar miktarı farklılık gösterse de endokondral osifikasyona yol açtığını belirtmişlerdir.⁸⁰ Bu bulgular ile uyumlu olarak çalışmamızda, kemik protein ekstraktı uygulanan defektlerde, demineralize kemik matriksi ve kontrol grubunda gözlenen endokondral osifikasyon gözlenmemiştir.

Nienhuijs ve arkadaşları, at kaynaklı kemik protein ekstraktı (Colloss E) ile rat subkutan ektopik kemik oluşumu modelinde titanyum bir kafes içerisinde ciltaltı dokuda kemik oluşumu elde etmişlerdir.⁵⁵ Bu çalışma literatüre geçmiş tek at kaynaklı kemik protein ekstraktı çalışması olarak dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda, defekt bölgesindeki iyileşme hem yeni oluşan kemiğin kalitesi, hem de kullanılan greftin alıcı dokuya inkorporasyonu şeklinde değerlendirildi. Buna göre yeni oluşan kemik dokusunun kalitesi açısından, kontrol grubunda ortalama 1,33 ($\pm 0,516$) değeri elde edildi. Bu oran, fibröz kaynama ile fibrokartilaj ile kaynama şeklinde yorumlanmaktadır. Demineralize kemik matriks grubunda ise 2,66 ($\pm 0,516$) değeri elde edildi. Bu değer ise, yüksek oranda mineralize kıkırdak ile kemik kaynamaya karşılık gelmektedir. Çalışmada özellikle etkinliğini incelediğimiz at kemik protein ekstraktı grubunda ise ortalama 4 (± 0) değeri elde edilerek tüm spesimenlerde tam kaynama elde edildi. Üç grup arasındaki fark, Kruskal-Wallis testi ve Bonferroni sağlaması doğrultusunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,011$). Çalışmamızda elde ettiğimiz en önemli bulgu, defektlerin kemik protein ekstraktı uygulanan grupta,

demineralize kemik matriksi ve kontrol gruplarına göre çok daha matür bir kemik dokusuyla iyileştiği bulgusudur. Bu bulgu, bildirilmiş sonuçlar ile uyumluluk göstermektedir. Üç grup arasındaki bu farkın kemik, protein ekstraktının içerdiği osteoindüktif faktörlerin osteojenezi daha erken matüre etmesi dolayısıyla eşit süre sonunda daha matür bir kemik dokusunun oluşması nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir.

Kemik greft inkorporasyonu ve yeni kemik oluşumu açısından gruplar değerlendirildiğinde ise demineralize kemik matriksi grubunda ortalama $4 (\pm 0,623)$ değeri elde edildi. Bu değer, azalmış greft, iyi kemik inkorporasyonu ve yeni kemik oluşumunu belirtmektedir. Kemik protein ekstraktının değerlendirildiği gruptaki spesimenlerde ise ortalama 5,33 değer elde edildi. Bu değer, mükemmel kemik inkorporasyonu ve ileri derecede remodelizasyonu temsil etmektedir. İki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu Mann-Whitney testi kullanılarak gösterildi. ($p=0,002$). Bu bulgular dahilinde at kaynaklı kemik protein ekstraktı, kaviter defektlerde demineralize kemik matriksinden daha başarılı bir iyileşme dokusuna yol açtığı gözlenmiştir. Literatürde bildirilen sonuçlar, kemik protein ekstraktının otojen kemik grefti ile karşılaştırılabilir sonuçlar verdiğini belirtmekle birlikte elde edilen bulgular literatür ile uyumluluk göstermektedir. Bu etkisini kollajenin ve kemik içinde bulunan diğer proteinlerin (kemik morfojenik proteinler, büyüme faktörleri, matriks proteinleri, sinyal molekülleri) mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmalarının ve sayılarının artmaları üzerine olan etkileri ile sağlamaktadır. Sonuçta hızlandırılmış bir osteojenez süreci ile daha matür bir kemik dokusu elde edilmiştir. Oluşturduğumuz yaklaşık 0,4 cc kaviter

defekte uygulanan 20 mg Colloss E, bildirilmiş olan çalışmalardaki dozdan daha yüksek olduğundan (20mg/cc) elde edilen etkinin bu kadar farklı olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak at kaynaklı kemik protein ekstraktı ile sığır kaynaklı kemik protein ekstraktı ile elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla bulaşıcı hastalık açısından daha güvenli olduğu bilinen at kaynaklı kemik proteininin sığır kaynaklı kemik protein ekstraktına etkili bir alternatif olarak kullanım alanı bulacağı düşünülmektedir.

SONUÇ

At kaynaklı kemik protein ekstraktı, kaviter kemik defektlerinin iyileşmesinde insan kaynaklı demineralize kemik matriksinden daha başarılı bir kemik oluşumuna yol açtığı gözlenmiştir. Ancak bu preparatların yaygın klinik kullanıma geçebilmesi için öncül primat deneylerine ardından da yaygın katılımlı klinik çalışmalara ihtiyaç duyulduğu ortadadır. Ancak alınan bu sonuçların ise umut vaat edici olduğu düşünülmektedir.

ÖZET

Amaç: Kaviter kemik defektlerinin tedavisinde, osteoindüktif bir ajan olan ve yüksek oranda tip I kollajen ve diğer kemik proteinlerini içeren at kaynaklı kemik protein ekstraktının etkinliğinin insan demineralize kemik matriksi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Kaviter kemik defekti modeli olarak tavşan distal femur kondili kullanıldı. Lateral girişimle femur kondillerinde 6 mm. çapında ve 12-15 mm. derinliğinde kemik defektleri oluşturuldu. 3 gruba ayrılan 18 tavşandan, birinci grup (n=6), boş bırakılırken, ikinci gruba (n=6) 0,4 cc demineralize kemik matriksi, üçüncü gruba ise (n=6) 20 mg. at kaynaklı kemik protein ekstraktı (Colloss-E) uygulandı. Altıncı hafta sonunda defekt bölgesinin radyolojik ve histolojik incelenmesi yapılarak analiz edildi.

Bulgular: Radyolojik incelemede defektin kaviter defekt olması nedeniyle belirgin bir radyolojik fark saptanmamıştır. Histopatolojik incelemede ise, kaynama kalitesi açısından kemik protein ekstraktı grubu hem demineralize kemik matriks grubundan hem de kontrol grubundan daha yüksek değerler bulunmuştur ve bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Greft inkorporasyonu ve yeni kemik oluşumu açısından da kemik protein ekstraktı grubunda, demineralize kemik matriksi grubuna göre daha yüksek değerler elde edilmiştir.

Sonuç: Kemik protein ekstraktının osteoindüktif özellikleri ile ilgili bildirilmiş önceki yayınlar ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. At kaynaklı kemik protein ekstraktının, kaviter kemik defektlerinin tedavisinde başarılı olduğu saptanmıştır.

ABSTRACT

Objective: For the treatment of cavitary bone defects, efficacy of equine derived bone protein extract as an osteoinductive agent, composed of high amount of type I collagen and other bone matrix proteins, is aimed to be compared with human derived demineralized bone matrix

Materials and Methods: Rabbit distal femoral condyles were used as the cavitary bone defect model. A defect of 6 mm. diameter and 12-15 mm. depth was created by lateral approach. 18 rabbits were divided into 3 consecutive groups. Group I (n=6) was left empty as control while group II (n=6) was filled with 0,4 cc. demineralized bone matrix and group III (n=6) received 20 mg. Equine derived bone protein extract (Colloss-E). At the end of 6th week defects were evaluated both histologically and radiologically.

Results: Since defect is cavitary, any radiologic difference were found by plain x-ray. Histopathologic evaluation revealed that, from quality of unions aspect, bovine bone protein extract demonstrated better results than both control group and demineralized bone matrix group and these results were found to be statistically significant. From graft incorporation and new bone formation aspect, similarly bone protein extract group demonstrated higher scores than demineralized bone matrix group.

Conclusion: Results acheived were concordant with previously reported results concerning osteoinductive properties of bone protein extracts. It is concluded that equine derived bone protein extract was effective in treatment of cavitary bone defects.

REFERANSLAR

1. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, et al. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 1990;143:213–21.
2. Arzt T, Merten HA. Klinisch relevante, durch ‘Bone inducing Complex’ (BIC) induzierte Osteogenese im Rahmen der Sinus-bodenelevation. *Stomatologie* 1998; 95:73–9.
3. Aspenberg P, Johnsson E, Thorngren KG. Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72B:1036-7
4. Bertagnoli R. Osteoinductive bone regeneration substance Colloss in spinal fusion. *Eur Spine J* 2002;11:189–90.
5. Bloom and Fawcett. *Bone Histology in Textbook of Histology*. 11th ed. W.B.Saunders Company, 1986:199-238
6. Boden SD. Evaluation of Carriers of Bone Morphogenetic Protein for Spinal Fusion. *Spine*. 2001;26(8):850
7. Boden SD, Kang J, Sandhu H, et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 2002;27:2662–73.
8. Boden SD, Martin GJ Jr, Morone MA, et al. Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine* 1999;24:1179–85.

9. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. 1995 Volvo Award in basic sciences. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: Study of dose, carrier, and species. *Spine*. 1995;20(24):2633-44.
10. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. Lumbar intertransverse-process spinal arthrodesis with use of a bovine bone-derived osteoinductive protein: a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1404–17.
11. Bostrom MPG, Asnis P. Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop*. 1998;355:124-131
12. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*. 1999;30:571-581
13. Buck BE, Malinin TI, Brown MD. Bone transplantation and human immunodeficiency virus: an estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop* 1989;129–36.
14. Buckwalter JA, Einhorn TA, Bolander ME, Cruess RL. Healing of the musculoskeletal tissues. *Rockwood and Green's Fractures in Adults*. 4th ed. Lippincott-Raven Publishers, 1996:Chapter 5.
15. Buckwalter JA, Marsh JL. Bone and fracture healing. *Rockwood and Green's fractures in adults*. Lippincott-Williams-Wilkins. 2001;245-269
16. Buttermann G, Glazer P, Bradford D. The use of bone allografts in the spine. *Clin Orthop*. 1996;324:75-85
17. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop*. 1995;313:8-18

18. Conrad EU, Grech DR, Obermeyer KR. Transmission of hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77A:214-224
19. Cook, SD, Dalton JE, Tan EH, et al. *In vivo* evaluation of recombinant human osteogenic protein (rhOP-1) implants as a bone graft substitute for spinal fusions. *Spine.* 1994;19:1655–63
20. Damien CJ, Grob D, Boden SD, Benedict JJ. Purified bovine BMP extract and collagen for spine arthrodesis: preclinical safety and efficacy. *Spine.* 2002;27(16): 550-558
21. Einhorn TA. Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77A: 940-56
22. Einhorn TA The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop.* 1998; 355:7-21
23. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, et al. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix: a radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 1984;66:274–9
24. Farso NF, Karring T, Gogolewski S. Biodegradable guide for bone regeneration. Polyurethane membranes tested in rabbit radius defects. *Acta Orthop Scand.* 1992; 63(1):66-69
25. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84:454–64.
26. Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW. Studies on the antigenicity of bone: I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1976;58A:854–8

27. Gepstein R, Weiss RE, Hallel T. Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder: a radiographic, histological, and radioisotope-uptake study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 1987;69:984–92
28. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop*. 1998;355:82-89
29. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone graft substitutes: Facts, fictions and applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A,Suppl 2,Pt 2:98-103
30. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res*. 1993;11:305-12
31. Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C. *Bone tissue engineering*. 2005; CRC Press:320-325
32. Hollinger J, Wong MEK. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Med Oral Pathol*. 1996;82:594-606
33. Hu X, Yao L, Lu C, Wang S, Chen Y. Experimental and clinical investigations of human insoluble bone matrix gelatin. A report of 24 cases. *Clin Orthop*. 1993;293: 360-5
34. Johnson EE, Urist MR. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion *Clin Orthop*. 2000;371:61-74
35. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones. Treatment with implants of a composite of a human bone morphogenic protein (BMP) and autolysed, antigen-extracted, allogenic (AAA) bone. *Clin Orthop*. 1992 ;277:229-37

36. Johnsson R, Stromqvist B, Aspenberg P. Randomized radiostereometric study comparing osteogenic protein-1 (BMP-7) and autograft bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 2002;27:2654–61
37. Kakiuchi M, Hosoya T, Takaoka K, Amitani K, Ono K. Human bone matrix gelatin as a clinical alloimplant. A retrospective review of 160 cases. *Int Orthop*. 1985;9: 181-8
38. Kalfas I. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001;10(4):1-5
39. Keene GS, Robinson AHN, Bowditch MG, Edwards DJ. *Key topics in orthopaedic trauma surgery*. Bios 1999;11-13,34-36
40. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. *Orthop Clin North Am*. 2000;31(3):375-388
41. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*. 1987;18(2):213-25
42. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop*.1999; 367:107-117
43. Lasmezas CI. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 2003;22(1):23–36
44. Leads from the MMWR. Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. *JAMA*. 1988;260:2487–8.
45. Lee JY, Musgrave D, Pelinkovic D, Fukushima K, Cummins J, Usas A, Robbins P, Fu FH, Huard J. Effect of bone morphogenic protein-2-expressing muscle-derived

- cells on healing of critical-sized bone defects in mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2001; 83A(7):1032-39
46. Leung KS, Sher AH, Lam TS, Leung PC. Energy metabolism in fracture healing. Measurement of adenosine triphosphate in callus to monitor progress. *J Bone Joint Surg Br.* 1989;71B(4):657-60
 47. Li H, Zou X, Woo C, Ding M, Lind M, Bunger C. Experimental anterior lumbar interbody fusion with an osteoinductive bovine bone collagen extract. *Spine.* 2005; 30(8):890-6
 48. McLean VA. AATB information alert. American Association of Tissue Banks.1993
 49. Miller MD. *Review of Orthopaedics.* 2nd ed. W.B.Saunders Company, 1996:1-19
 50. Minamide A, Kawakami M, Hashizume H, Sakata R, Tamaki T. Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for spinal fusion. *Spine.* 2001; 26(8):933-9.
 51. Minamide A, Tamaki T, Kawakami M, Hashizume H, Yoshida M, Sakata R. Experimental spinal fusion using sintered bovine bone coated with type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine.*1999;24(18):1863-70
 52. Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2 beta1 integrin interaction. *J Cell Physiol* 2000;184:207–13.
 53. Mundy GR. Osteoblasts, bone formation and mineralization. In: Fogelman I.ed. *Bone Remodeling and Its Disorders.* London: Maetin Dunitz, 1995:17–38.
 54. Munting E, Wilmart JF, Wijne A, HennebertP, Delloye C. Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand.* 1998;59:34-8

55. Nienhuijs MEL, Walboomers XF, Merckx MAW, Stoelinga PJW, Jansen JA. Bone-like tissue formation using an equine COLLOSSs E-filled titanium scaffolding material. *Biomaterials*. 2006;27:3109–3114
56. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop*. 1998;355:56-65
57. Nyman R, Magnusson M, Sennerby L, Nyman S, Lundgren D. Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. *Acta Orthop Scand*. 1995;66(2):169-173
58. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420–30
59. Parikh SN. Bone graft substitutes in modern orthopaedics. *Orthopedics*. 2002;25(11):1301-11
60. Prewett AB, Moyer MP, O’Leary RK, Mellonig JT. Decalcification inactivates HIV in spiked and infected bone. *Trans Orthop Res Soc*. 1992;17:436
61. Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC, Posey JW. Potential role of fibroblast growth factor in fracture healing. *Clin Orthop*. 1998;355:283-293
62. Ragni P, Lindholm TS. Interaction of allogeneic demineralized bone matrix and porous hydroxyapatite bioceramics in lumbar interbody fusion in rabbits. *Clin Orthop* 1991; 272:292–9

63. Raikin SM, Landsman JC, Alexander WA, Froimson FI, Plaxton NA. Effect of nicotine on the rate and strength of long bone fracture healing. *Clin Orthop*. 1998; 353:231-7
64. Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenic proteins. *Clin Orthop*. 1998;355:66-72
65. Reddi AH, Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;69:1601-5
66. Russell JL, Block JE. Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of processing techniques and study methodology. *Orthopedics* 1999;22:524-31
67. Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg Am*. 2001; 83A(6):803-16
68. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, 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; 267:20352-62.
69. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felshzeghy E, Wiltfang J. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2004; 25:5387-5393
70. Schlegel KA, Kloss FR, Kessler P, et al. Bone conditioning to enhance implant osseointegration: an experimental study in pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18: 505-11.

71. Seeherman H, Li R, Wozney J. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors. *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85A:96-108
72. Suh DY, Boden SD, Louis-Ugbo J et al. Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate. *Spine.* 2002; 27:353–60
73. Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br.* 1989;71B:677-680
74. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of calcium phosphate- based cancellous bone fillers in trauma surgery. *Orthopaedics.* 2002; 25(5):601-609
75. Tiedman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. The role of composite, demineralised bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopaedics.* 1995;18:1153-8
76. Trippel SB. Potential role of insulin like growth factors in fracture healing. *Clin Orthop.* 1998; 355:301-313
77. Upton J, Glowacki J. Hand reconstruction with allograft demineralized bone:twenty-six implants in twelve patients. *J Hand Surg [Am].* 1992;17:704-13
78. Urist MR, Dawson E. Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolysed antigen-extracted allogenic (AAA) bone. *Clin Orthop.* 1981; 154: 97-113
79. Urist MR. Bone: formation by autoinduction: 1965. *Clin Orthop.* 2002;395:4-10
80. Vehof JW, Takita H, Kuboki Y, Spauwen PH, Jansen JA. Histological characterization of the early stages of bone morphogenetic protein-induced osteogenesis. *J Biomed Mater Res.* 2002 Sep 5;61(3):440-9

81. Walboomers XF, Jansen JA. Bone tissue induction, using a COLLOSS-filled titanium fibre mesh-scaffolding material. *Biomaterials*. 2005;26:4779–4785
82. Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:9484–8.
83. Webb JCJ, Tricker J. A review of fracture healing. *Current Orthopaedics*. 2000;14: 457-63
84. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ. Receptor ligand interaction between CD44 and osteopontin. *Science*. 1996;271:509-512
85. Whiteman D, Gropper PT, Wirtz P, Monk P. Demineralized bone powder. Clinical applications for bone defects of the hand. *J Hand Surg [Br]*. 1993;18:487-90
86. Williams EM, Miller MW. Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals: origin, transmission and risk factors. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 2003;22(1):145–56.
87. Wlodarski KH. Properties and origin of osteoblasts. *Clin Orthop*. 1990; 252: 276-93
88. Woo C, Li H, Baatrup A, Krause A, Kassem M, Bunger C, Lind M. Effects of bone protein extract on human mesenchymal stem cells proliferation and differentiation. *J Biomed Mat Res*. 2006;552-556
89. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am*. 1992;74(5):659-70