

142028

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

SEGMENTER KORTİKAL KEMİK KAYIPLARININ
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
SENTETİK HÜCRE BAĞLAYICI PEPTİDİN (P-15)
ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. GÖKHAN ÇAKMAK

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. SELÇUK BÖLÜKBAŞI

142028

ANKARA-2004

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI
TEZ KURUMANTASYON FİKRİ MÜHÜRÜ

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. Selçuk Bölükbaşı başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Şahap Atik, Prof. Dr. Haluk Yetkin, Prof. Dr. Özcan Kaymak, Prof. Dr. Necdet Altun, Prof. Dr. Erdal Cila, Prof. Dr. Ertuğrul Şener, Prof. Dr. Sacit Turanlı, Doç. Dr. Aykın Şimşek, Doç. Dr. Ulunay Kanatlı'ya sonsuz teşekkürler ederim.

Tezin oluşumundaki katkılarından dolayı, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ayşe Dursun'a, Uzm. Dr. Özlem Erdem'e ve Araş Gör. Dr. Güldal Yılmaz'a, Deney Hayvanları Laboratuvarı Cerrahi Araştırma Bölümü sorumlusu Vet. Dr. Ceyda Diker'e teşekkür ederim.

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

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

GİRİŞ VE AMAÇ-----	1
GENEL BİLGİLER-----	2
GEREÇ VE YÖNTEM -----	33
BULGULAR-----	54
TARTIŞMA VE SONUÇ-----	63
ÖZET -----	68
KAYNAKLAR-----	69

GİRİŞ VE AMAÇ

Her yıl Türkiye’de 90- 100 bin trafik kazası sonucunda meydana gelen yaralanmaların % 50’den fazlası hareket sistemini ilgilendirir. Amerika Birleşik Devletleri’nde (A.B.D) ise yılda 33 milyon insan kas-iskelet sistemi yaralanmaları ile karşılaşmaktadırlar. Bunlar arasında kemik kırıklarının sıklığı yılda altı milyondur. Bu kırıklar 3,5 milyonu acil servise başvuru, 11 milyon poliklinik muayenesi, 6,5 milyon yatarak tedavi, 36 milyon gün iş gücü kaybı ve 7,3 milyon gün okula gidememe ile sonuçlanır.^{21,63} Kırıkların büyük bölümü iyileşmekle beraber birçoğu da tedaviye direnç göstererek gecikmiş kaynama veya kaynamama ile sonuçlanır. Tam olarak kaynamayan kemikler fonksiyon göremez ve ortaya çıkardığı ağrı yanında, sosyal ve ekonomik kayıplara yol açmaktadırlar. Kemik kırıklarının komplikasyonları yaygındır ve kemik greftleri ile desteklenmesi gerekmektedir. A.B.D’de yılda 500.000 kemik grefti uygulaması yapılmaktadır ve bu uygulamaların yaklaşık yarısı spinal cerrahide füzyon yapılırken kullanılmaktadır.^{28,63,14} Yeni kemik oluşumunu sağlayan osteoindüktif, osteojenik ve osteokondüktif özellikleri nedeniyle otolog kansellöz kemik, kemik greftlemede altın standart olmaya devam etmektedir. Bununla beraber otogreft kullanımının belirli dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar: morbiditede artış; ameliyat süresinde artma; miktar, büyüklük ve şekil olarak yetersizlik (Özellikle çocuklarda büyük kemik kayıplarının tedavisinde) olarak karşımıza çıkarlar. Greft uygulamaları sonrası hastanın iyileşme süresinin uzaması ve iş göremez duruma gelmesi ile sonuçlanabilecek iatrojenik komplikasyonlar görülebilir. Otogreft uygulanamayan durumlarda allogreftler alternatif olarak sıklıkla kullanılmaktadır.⁶³ 1990’ larda kompozitler içeren sentetik alternatiflerin geliştirilmesi ile ilerleme sağlanmıştır. Bununla beraber tüm dünyada 2,2 milyon greft uygulaması arasında sentetik greftlerin kullanım oranı % 10’ dur.⁶³

Bu çalışmada “İnorganik kemik matriksiyle birleştirilmiş sentetik hücre bağlanma polipeptidi (P-15)” greft materyalinin segmenter kortikal kemik defektlerinin tedavisinde etkinliği tespit edilmeye çalışılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Kemik Anatomisi ve Fizyolojisi

Kemik iskeletin; yumuşak dokular ve kaslar için koruyucu ve yapısal destek olması yanında torakoabdominal organlar için de koruyucu rolü bulunmaktadır. Aynı zamanda hematopoez ve kalsiyum metabolizmasında da rol alır.

Kemik hücresel ve hücresel olmayan yapılardan meydana gelir. Hücreler birçok kök hücrelerden köken alırlar. Kemikte bulunan hücreler osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve mezenşimal osteoprogenitör hücrelerdir. Hücresel olmayan matriks yapı organik (Kuru ağırlığının % 40'ı) ve organik olmayan (Kuru ağırlığının % 60'ı) bölümlere ayrılır. Organik kısımda kollajen fibriller, proteoglikanlar, glikoproteinler, fosfolipitler ve fosfoproteinler yer alır. Organik olmayan bölümde ise kalsiyum fosfat ve osteokalsiyum fosfat yer alır.

Kemikler, matür (lamellar) ve immatür (woven) yapıda bulunurlar. Lamellar kemikten meydana gelen kortikal (%80) ve kansellöz kemiklerdir. İmmatür kemik, lamellar kemiğe göre daha hücrelidir ve esnektir; ancak daha zayıftır. Matür kortikal kemiğin mikroskopik yapısı; osteondan oluşur. Osteonlar kemiğin fonksiyonel birimleridir. İnsan iskeletinin büyük bir kısmını osteonlar oluşturmaktadır. Osteonlar, Havers kanalı ve onun içeriği olan damar ve sinirlerden oluşmaktadır. Bir osteon diafiz boyunca spiral olarak organize olan konsantrik lamellar kemikten oluşur. Bu lamellar kemik tabakaları içinde, osteositler içeren lakunalar bulunur. Bunlar birbirlerine kanaliküller aracılığıyla bağlıdırlar ve bu sayede hücreler arası sinyal alışverişi ve beslenme sağlanır.^{47,81,82}

Kemiğin kanlanmadan zengin olması metabolik aktivitesinin fazla olmasını sağlar. Kanlanması nutrisyonel, periartiküler ve periosteal arterler aracılığıyla olur. Kompakt kemikte kan damarları ve sinir fibrilleri longitudinal kanaliküllü Havers kanalları içinde ilerler ve radyal olarak osteositlere dağılırlar. Kansellöz kemik kanlanmasını medüller kavitenin endosteal tabakasından sağlar. Volkmann kanalları, Havers kanallarını birbirlerine

bağlayan büyük transvers ve oblik kanallardır ve endosteal-perosteal damar ağını oluştururlar.

Periosteum Sharpey lifleri ile kemiğe bağlanır ve eklem kapsülü ile devam eder. Periost, vasküler (kambium) bir iç tabaka içerir. Periost embriyonik ve postnatal büyümede de osteoblastlar içerir. İskelet büyümesi durduğunda bu osteoblastlar osteoprogenitör faza geçerler ; fakat yaralanma olduğunda yanıt oluşturabilirler. Dış tabaka yoğun fibröz bağ dokusundan oluşur. Endosteum skuamöz hücrelerden oluşan ince bir tabaka olarak kemik içindeki kaviteleri çevrelerler.

Kemik büyümesi üç farklı mekanizma ile meydana gelir.:

1. Enkondral osifikasyon: Kıkırdak modelinin mineralizasyonu ile olur. Kemik oluşumu, longitudinal büyüme ve kırık iyileşmesi ile sonuçlanır. İskelet büyümesinde fizis üç zona ayrılır; rezerv zonu, proliferatif zon ve hipertrofik zon. Bunlar sayesinde kıkırdak modeli osteoblastlar tarafından metafizer bölgede önce immatür kemiğe, sonra da matür kemiğe çevrilir ve kalsifiye olur.
2. Intramembranöz osifikasyon: Kıkırdak modeli olmadan oluşur. Farklılaşmamış mezenşimal hücreler tabakalar oluştururlar. Bu hücreler osteoblastlara dönüşürler ve ileride mineralize olup kemik oluşturacak organik matriks depolarlar. Yassı kemiklerin embriyolojik gelişimi, distraksiyon osteogenezisi ve amputasyon sonrası çocuklarda kemik oluşumunda rol alır.
3. Apozisyonel osifikasyon: Osteoblastlar kemik yüzeyinde dizilerek yeni kemik oluştururlar. Periosteal kemik genişlemesinde (enine) ve kemik yeniden şekillenmesi esnasında yapım aşamasında görülürler.^{47,81}

Kemik dört temel hücre tipi içerir:

1. Osteoblastlar: Plüripotent mezenşimal hücrelerden köken alır. Birçok faktör tarafından uyarıldıktan sonra tip 1 kollajen ve matriks proteinlerini içeren kemik matriksini oluşturur.
2. Osteositler: Matriks içinde hapsolmuş öncü osteoblastlardır. Kalsiyum ve fosfor dengesinde rol alırlar.

3. Osteoklastlar: Monosit öncülerin birleşmesi ile oluşan dev multinükleer hücrelerdir. Asidik ve proteolitik olarak kemik rezorbsiyonunu sağlarlar. Bu rezorbsiyonu kemik yüzeyinde “cutting cone” olarak nitelendirilen gruplar oluşturarak sağlarlar.³⁸
4. Osteoprogenitör hücreler: Aktive olmayı bekleyen osteoblastların mezenşimal öncüleridir.

Kemiğin biyomekanik özellikleri bileşenlerinden ve yapısından dolayıdır. Kollajen, kemiğe gerilime karşı dayanıklılık ve esneklik verir. Kalsiyum hidroksiapatit, kompresif güçlere karşı dayanıklılık verir. Tübüler yapı, hafiflik yanında dayanıklılık verir.

Kırık İyileşmesi

Kırık iyileşmesi histolojik olarak; hematoma oluşumu, akut inflamasyon , tamir ve kaynama olarak dört fazda meydana gelir. Hücresel ve moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesi ile farklı hücre tipleri, biyokimyasal mediyatörler ve hücre reseptörleri belirlenmiştir. Hızlı kırık iyileşmesinin ve kırık kaynamamasının tedavisindeki gelişmeler bu genetik olayların çözümü ile sağlanılmaya çalışılmaktadır.

Kemik yaralandığı zaman kendi kendini rejenere edebilir. Bu süreçler diğer doku tiplerinde de benzerdir; ancak bu dokuların iyileşmesi skar dokusu oluşumu ile olur. Fakat bununla beraber kemik dokusu iyileşirken iyileşme dokusu kemiktir. İyileşen kemik yeniden yapılanma ile yaralanma öncesi duruma gelir.

Histolojik olarak primer ve sekonder olmak üzere iki tip kırık iyileşmesi bulunur.

- Primer (direkt) kırık iyileşmesi: Anatomik redüksiyon, tesbit ve kompresyon uygulanarak kırığın tesbiti sonrası kemik iyileşmesidir. AO grubu tarafından açık redüksiyon ve rijid internal tesbit sonrası olan kırık iyileşmesi primer kırık iyileşmesidir. Kırıkların büyük bölümü kırık hattında biraz hareketin olduğu sekonder iyileşme ile düzelir. Kırık hattındaki bu hareket cerrahi olmayan yöntemler ve stabil elastik osteosentez gibi cerrahi yöntemlerle sağlanır.^{24,81} Primer kemik iyileşmesi esnasında yeniden kortikal yapılanma gerçekleşir. Osteoklastlar tünel

oluşturarak kırık hattına doğru yol alır. Bu süreç içerisinde yeni kan damarları ve osteoblastlar kortikal kemiğin Haversian yapıda şekillenmesini sağlar.

- Sekonder kırık iyileşmesi: Sekonder kırık iyileşmesi üç fazda gerçekleşir: 1) *Akut inflamasyon*; hematoma oluşması, inflamatuvar reaksiyon ve anjiogenez ile meydana gelir. 2) *Tamir fazı*; kırıkta oluşumu, kalsifikasyon, dekalsifikasyon ve kemik oluşumundan oluşur. 3) *Yapılanma ve şekillenme fazı*

1. Akut İnflamasyon Fazı:

Yaralanma esnasında kırık alanında meydana gelen kanama sonucunda periost ve çevre yumuşak dokuların yardımıyla hematoma oluşur. Hematom, inflamatuvar döngüyü başlatacak hematopoetik hücreler ve trombositler için kaynak oluşturur. Hücresel içerik akut inflamatuvar yanıt meydana getirir. Bu yanıt nötrofiller başta olmak üzere, monositler, lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar ile olur. Nötrofillerin başlıca rolü sitokinler salgılayarak hematopoetik hücrelerin proliferasyonunu ve değişimin erken iyileşme fazında sağlanmasıdır. Fagositik hücreler kırık alanındaki nekrotik debrisı uzaklaştırırlar. Trombositler pıhtılaşmayı sağlayarak kırık hematomaı stabilize ederler ve alfa granüllerinden canlı büyüme faktörlerini salgırlar. Bu faktörler trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve transforming büyüme faktörü- beta'dır (TGF-B). Bu büyüme faktörleri kemotaksis, anjiogenezis ve mezenşimal hücre regülasyonunda rol alırlar.

Kırık alanında kanlanmanın azalması sonucu hipoksik ve nekrotik bölgeler oluşur. Böylece oksijen direnci ve pH düşer. Bu sayede sitokinler salgılanır ve iyileşme süreci başlar. İyileşmenin erken safhalarında kanlanma önemlidir ve sitokinlerin damarlanmayı arttırıcı özellikleri sayesinde olur. Anjiogenezis hasar görmeyen damarlardan kırık hattına kapiller damarların ilerlemesi ile olur. Kemik kan akımının üç bölgesinden en önemlisi periosteal kan akımıdır ve erken iyileşme döneminde büyük önem taşır.

Kanlanmanın ve inflamatuvar yanıtın iyi olduğu kırık çevresinde kallus oluşumu sağlanır. İlk olarak kırık uçlarının birkaç milimetre ilerisinde periosteum altında immatür kemik depolanır. İntramembranöz osifikasyonun bir süreci olarak periostun kambium tabakasında bulunan osteoprogenitör hücreleri tarafından sert kallus oluşturulur. Sert kallus hareket ile uyarılır ve rijid tesbit ile inhibe edilir. Kallus oluşumunun meydana geldiği ikinci yer kırık alanının kendisidir ve endokondral osifikasyon ile olur. Yumuşak kallus,

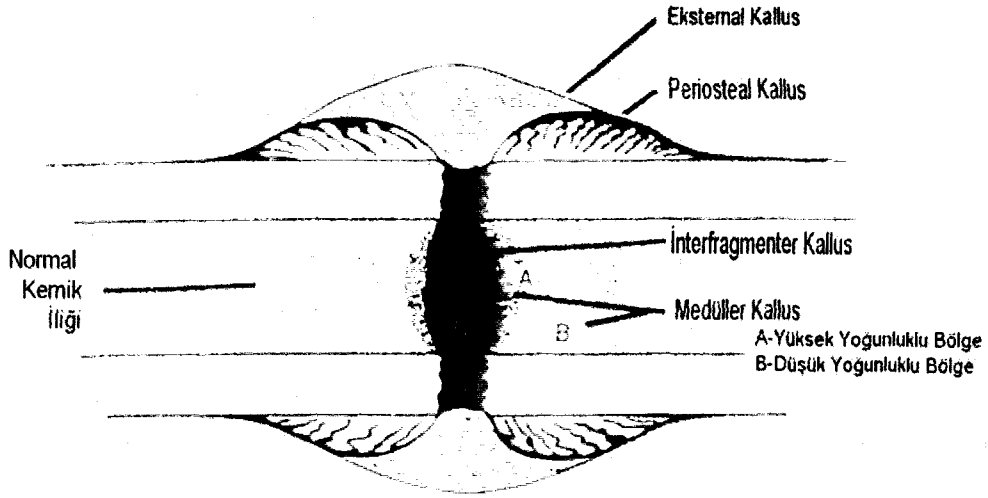
kıkırdak modeli olarak oluşur. Bu kallus, kırık hattında köprüleşme oluşturur (Şekil 1) ve ikinci hafta itibariyle kırık iyileşmesinin tamir fazına girer. Andiferansiye mezenşimal hücreler kırık alanına yumuşak dokulardan ve periosttan etki eder. Bu mezenşimal hücreler büyüme faktörlerinin etkisiyle kıkırdak oluşturan hücreler şeklinde davranırlar. Bu aşama rijid internal fiksasyon ile inhibe edilir.

2. Tamir Fazı:

Tamir evreleri ikinci haftada başlar ve kıkırdak yapı oluşur. Mezenşimal hücrelerin kondroblastlara dönüşümü sonucu bol kıkırdak matriks yapımı olur. Kondrositler matriks içinde çoğalırlar ve yumuşak kallus içinde predominant hücre tipi olurlar. İntrasellüler vezikülllerinde hipertrofi görülmesi ile birlikte genişlerler ve içeriklerini ekstrasellüler matrikse ekzositoz yoluyla verirler. Matriks vezikülleri kıkırdak kalsifikasyonunu sağlayan proteazlar, fosfotazlar ve kalsiyum içerirler. Kıkırdak matriks kalsiyum depolanmasını inhibe eden büyük proteinler ve proteoglikanlar içerirler. Bunların etkileri proteazlar ile azaltılır. Kalsiyumun presipitasyonu fosfat iyonlarına gereksinim duyar ve bu fosfat iyonları da lokal fosfodiesterlere fosfatazların etki etmesi ile ortaya çıkar. Proteaz aktivitesinin kıkırdak modelinin kalsifikasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Tamir fazındaki olaylar kemik gelişimi sırasındaki fizis hattındaki aktiviteler ile benzerdir. Kalsifiye kıkırdak, anjiogenezisi uyarır ve böylece yeni kan damarları kondroklast ve osteoblastları kırık alanına getirir. İlgili hücreler kıkırdak yapıyı ortadan kaldırır ve osteoblastların bu yapı yerine woven kemik yapıyı oluşturmalarını sağlar. Meydana gelen kemik kaybında kemik köprüleşmesi izlenmeye başlandığı anda kallus tamamen immatür kemikten oluşmaktadır.

3. Yapılanma ve Şekillenme Fazı:

Ardından mekanik olarak dayanıklı lameller yapı oluşacak şekilde yeniden yapılanma gerçekleşir. ^{12,21,39,81}



Şekil 1: Kırık hattında izlenen değişiklikler¹²

Ortopedide Doku Mühendisliği

Ortopedide doku mühendisliğinde hücrelerin kullanımı bundan 300 yıl öncesine uzanmaktadır. İlk greftleme girişimi 1668 yılında Hollandalı cerrah Van Meek'ren tarafından yapılmıştır. 1867 yılında Ollier yaptığı deneysel çalışmalarda periost transplantasyonu yaptığı kemiklerde periostun ve kemiğin canlı kaldığını ve yeni kemik oluştuğunu gözlemlemiştir. Goujon (1869) ve Macewen (1881) tarafından transplante edilen kemik iliğinin osteojenik potansiyel içerdiği belirtilmiştir. Albee, Peltier, Ollier, Macewen, Frangenheim, Cotton, Loder, Mc Williams, Mayer, Kausch ve Phemister'in çalışmaları sonucu kırık tedavisinde ve kemik kayıplarında kemik transplantasyonunda ilerleme sağlanmıştır. Günümüzde de bu öncü bilim adamları tarafından belirtilen otogreftleme teknikleri büyük oranda değişmeden kullanılmaktadır.^{25 2} 1908 yılında Lexer taze ampute edilmiş veya kadavradan elde edilen allogreftlerle eklem rekonstrüksiyonu yapmıştır.⁷⁴

Kemik doku mühendisliğinin temeli kemiğin istenen anatomik bölgesinde kemik iyileşmesi için yanıt oluşturmaktır. Klinik başarı, oluşan kemiğin yeniden şekillenme sonucu çevre kemik dokusu ile yapısal olarak integrasyonu ve oluşan kemiğin etkili fonksiyon görebilmesi için mekanik olarak yeterli dayanıklılığa sahip olması ile belirlenir.

^{25 28}

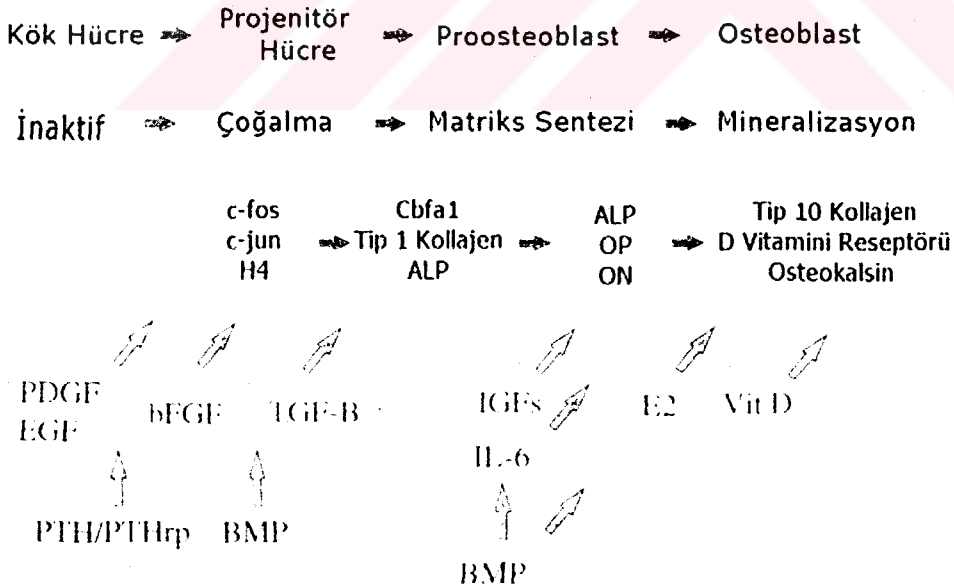
Yeni kemik dokusu oluşumu için öncelikle meydana gelecek dokuyu meydana getirebilecek hücrelerin olması gerekir. Kemik yapımı örnek olarak alındığı zaman istenen kemiği meydana getirebilecek yeterli sayıda “ osteojenik progenitorler” bulunmalıdır (Şekil 2). Yeterli sayıda “osteojenik progenitorler” dokunun bazı alanlarına dağılmış olabilirler. Eğer bu sayı yetersizse, bu sayıyı arttırmak veya artması için uyarmak doku mühendisliği kullanılarak mümkün olabilir.^{25,28}

“Osteojenik progenitorlerin” yeterli sayıda olmasının yanında bazı kriterler de bulunmalıdır. İlgili hücreler greftle uyum sağlamalı ve bu sayede kemik iyileşmesinin devamı ile kemik kaynamasını gerçekleştirmelidir. Bunu oluşturmak için tutunma, migrasyon ve osteoblastik progenitorlere dönüşümü sağlayacak matriks veya materyal ile

ilgili alan doldurulmalıdır. Bu özelliklere sahip matriks veya materyal “osteokonduktif” olarak nitelendirilir.²⁵ Osteokonduktif materyaller kan damarlarının artmasına ve yeni kemik oluşumuna yol açarlar²⁸

“Graft osteogenezisi” ise transplantasyon sonrası sağlam olarak kalabilen ve yeni kemik sentezleyebilen donor kemikte hücre elemanlarının bulunmasıdır.²⁸

Osteojenik hücre popülasyonu aslında birçok farklı hücre tiplerine değişik yollarla dönüşebilen plüripotent hücrelerdir. Bu nedenle kemik oluşumu sırasında uygun uyarılar ile bu hücrelerin kemik oluşumu yönünde yönderilmesi gerekir. Otokrin veya parakrin olarak salgılanan faktörler, ya da kullanılan matriks içerisinde defektif bölgeye verilen uyarıcı maddeler oluşacak dokunun kalitesinde belirleyici rol üstlenirler. Bu maddeler tarafından yapılan uyarıya “osteoinduktif uyarı”denir. Konak çevre dokusunda bulunan mezenşimal hücrelerin kemik oluşturan osteoblastlara dönüşümü ile yeni kemik oluşumu olur. Bu da başta “Kemik Morfojenik Proteinleri” olmak üzere greftte büyüme faktörlerinin olması ile olur.^{25,28}



Şekil 2: Osteoblastik yol-Osteoblastik farklılaşma sürecinde büyüme faktörlerinin etkisi (H4=H4 Histon, ALP=Alkalen Fosfataz, OP=Osteopontin, ON=Osteonektin, Cbfa1=Transcription factor core-binding factor)

Kemik iyileşmesinde iki önemli unsur daha bulunmaktadır. Bunlar; damarlanma ve mekanik dayanıklılıktır. Greft uygulanacak sahanın damarlanmasının iyi olması önemlidir; çünkü vasküler yatak inflamatuvar hücreleri ve stimülatör faktörleri taşıyan araçtır. Damarlanma ile aynı zamanda oksijen ve besinler iyileşecek sahaya taşınarak endotelial hücreler ve osteoblastik progenitorler için osteokondüktif yol oluşturulur. Bu yüzden hastaya yaklaşım ve hasta seçimi önemlidir. Hastaların sağlık durumu ameliyat öncesi dönemde düzeltilmeli ve kemik iyileşmesine yanıtı engelleyecek farmakolojik ajanlar verilmemelidir. ²⁵ İyileşme için mekanik çevre de önemlidir. Kemik iyileşmesi doku gerilimi sınırlı olduğu takdirde en uygun koşullarda gerçekleşir. Aksi takdirde kaynamama ile sonuçlanır. ²⁵

Otolog Kansellöz Kemik

Otolog kansellöz kemik halen spinal füzyon, kemik kayıplarının doldurulması ve kırık tedavisinde kemik iyileşmesini sağlayan en etkili greft materyali olarak altın standarttır. Otojen kansellöz kemik ile osteojenik kemik ve kemik iliği hücreleri; osteoindüktif kollajen ve mineral matriksi ve matriks proteinleri ; ve osteoindüktif matriks proteinleri nakledilir. Burwell'in 1960 yıllarda yaptığı çalışmalarda otogreft uygulaması sonrası gelişen yeni kemik dokusunda primitif osteojenik hücrelerin nakil sonrası hayatta kalarak ileri dönemde matur osteoblastlara dönüştüğü gösterilmiştir. ²⁵

İliak kanattan, Gerdy tüberkülünden, radius distal ucundan ve tibia distalinden otojen kansellöz kemik grefti alınabilir ²³

Otojen kemik grefti uygulamaları esnasında karşılaşılan problemler nedeniyle alternatif greft materyalleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kemik greftinin yerini tutabilecek ideal ajan; biyouyumlu, biyoçözünür, osteokondüktif, osteoindüktif yapısal olarak kemiğe benzer, kolay kullanılabilir ve ekonomik olmalıdır. ^{23,28}

En sık greft alınan bölge olan iliak kanata ait morbiditelerle sık olarak karşılaşılmaktadır. Major komplikasyonlar; kutanöz sinir hasarı, kronik donör saha ağrısı, damar yaralanmaları, enfeksiyon ve iliak kanat kırığıdır. Major komplikasyonlar % 8,6 ve

minor komplikasyonlar %20,6 olarak rapor edilmiştir. Otojen greftleme sonrası donör sahada ameliyat yarası kalması hastalar açısından problem yaratmaktadır. Aynı zamanda greftin az miktarda alınabilmesi kullanım açısından problem yaratmaktadır^{23,25} (Tablo 1). Kansellöz kemik osteoindüktif olarak bilinmesine rağmen indüktif proteinlerin ve sitokinlerin otolog kansellöz greftte aktif olduğuna dair kanıt bulunmamaktadır²³.

Tablo 1: İliak kemik grefti alımında karşılaşılabilecek komplikasyonlar^{3,63}

Perioperatif (Akut)	Kronik
<i>Minör</i> • Geçici, hafif duyu kaybı (Disestezi) • Uzamış kültür negatif drenaj, 20 gün • Yüzeyel enfeksiyon	<i>Minör</i> • İnatçı, hafif duyu kaybı
<i>Major</i> • Derin doku enfeksiyonu • Uzamış drenaj • Revizyon gerektiren yara dokusu • Büyük hematom • Duyu kaybı • Enterokutanöz fistül	<i>Major</i> • İş göremez duruma getiren ağrı, 6 ay • Görüntüyü bozan skar dokuları • Meralgia paresthetica • Yürümede güçlük • Pelvis kırığı veya instabilite • Trikortikal greft alımı sonrası fitik
<i>Hayatı tehdit eden</i> • Major visseral organ yaralanması • Hemoraji • Arteriyovenöz fistül • Ureter yaralanması	

Kemik İliği

Kemik iliği tek başına osteojenik greft olarak kullanılabilir. Aspirasyon sonrası elde edilen kemik iliği, sitokinler açısından zengin diğer kemik iliği kökenli hücreler gibi osteoblastik progenitorler de içerir. Aynı zamanda hızlı revaskülarize olan emilebilir biyolojik fibrin matriks içerir. Connolly ve arkadaşları 20 tibia nonunion olan hastanın 18'inde intramedüller çivi ve heparin uygulanmamış kemik iliğinin perkutan enjeksiyonu ile tedavide başarılı sonuç elde etmişlerdir. Kemik iliği alternatif olarak diğer materyallerle karıştırılarak greftlemeye tedavi yanıtını arttırmak için kullanılabilir.^{25,71}

Muschler ve arkadaşları iliak kanattan aspire edilen kemik iliğini periferik kan ile 20-40 kat seyrelttikten sonra ortalama 1000 –1400 bağ dokusu progenitörü aspirat başına bulunduğunu görmüşlerdir.²⁵

Otolog Kortikal Kemik

Kortikal kemik greftleri otojen kansellöz kemik greftlerine göre biyolojik olarak daha az başarılıdır. Kortikal kemiğin porozitesinin az olması nedeniyle damar yapıların içeriye doğru ilerlemesi engellenir ; bu yüzden damarlanması yavaştır. Kortikal kemik trabeküler daha az sayıda osteoblastik progenitor hücre içerir. Kortikal kemikteki hücreler oksijen difüzyonu ve besin aktarımı az olması nedeniyle nakil olmaya daha az dirençlidir.²⁵

Kortikal kemik greftlerinin başlıca avantajları; mekanik olarak dayanıklı olması ve büyük kemik kayıplarının doldurulmasında miktar olarak yeterli olmalarıdır.²⁵ 5-6 cm'in üzeri kemik kayıplarında otolog kortikal kemik greftleri iyi seçenektir. Ancak 12 cm'in üzeri kemik kayıplarında nonvaskülarize greftlerin başarısız olma oranının %25-50 olması nedeniyle vaskülarize greftler daha üstündür.²³

Başlıca dezavantajları; belirgin morbiditeye yol açacak bölgelerden alınabilmeleridir (Örnek: Fibula, kosta, tibia, olekranon ve iliak kanat)^{3,23,25,48}

Allogreft Kemik Matrisleri

Allogreftler; poroz yapıları içinde progenitor hücreleri ve endotelyal hücrelerin tutunduğu birçok kimyasal alan içerirler. Bu osteokondüktif matris için prototip olabileceklerini gösterir. Allogreft kemik aynı zamanda osteoklastlar tarafından rezorbsiyon sonrası serbest kalan kemik matrisi içinde bulunan büyüme faktörlerini içerir. Bu büyüme faktörleri şunlardır: insulin benzeri büyüme faktörü, büyüme faktörü tip 2, transforming büyüme faktörü- β , platelet-derived büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü (Allogreft kemiğin osteoindüktif özellik taşımasını sağlayan az miktarda kemik yapısal proteinleri içerirler.) Demineralizasyon, allogreft kemik matrisindeki büyüme faktörlerinin biyoyararlanımını arttırırlar. Ayrıca demineralizasyon ile HIV (Human immunodeficiency virus) enfeksiyonu geçmesi de önlenmiş olur.⁶²

Tarihte ilk olarak 1900'lerde Lexer tarafından diz eklemi nakilleri sonucundan birkaç yıl sonra greftlerin % 50' sinin fonksiyonel olduğunu gösteren yayınlar yapılmıştır.⁷⁴ Modern allogreft kemik elde etme işlemleri esnasında uygulanan ileri yıkama basamakları hücre sayısı azalır. Bu yıkama basamakları ile immunojenik antijenler ve virus kaynaklı hastalık geçme riski azaltılır. Tüm bu işlemler uygulanan allogreft kemiklerde allogreft matris osteokondüktif ve osteoindüktif özellik taşırlar. Tomford ve arkadaşlarının 303 kurutulup dondurulmuş allogreft kullanılan olguda yaptıkları retrospektif çalışmada % 6,9 oranında bakteriyel enfeksiyon saptanmıştır.Yine Tomford ve arkadaşlarının 1990 yılında yaptıkları farklı bir çalışmada masif kemik allogrefti kullanılan 190 olgunun 13'ünde (%6,8) bakteriyel enfeksiyona rastlanmıştır.^{69,70}

Allogreftlerin standart otogreftlere göre avantajları: ²⁵

1. Otolog kemik alımı esnasında ortaya çıkan morbidite önlenir
2. Otogreftin yeterli olmadığı büyük kemik kayıplarında yeterli miktarda greft sağlanır.
3. Otolog kortikal greftlere göre daha büyük allojen kortikal kemik kullanımı sağlanabilir.
4. Jel, toz, fiber, ve macun şeklinde birçok fiziksel formda allogreftler işlenebilir. Bu da kullanım kolaylığı sağlar.

Allojen kemik hazırlanması ve sterilizasyonunun immunojenik etkileri yanında osteoindüktivite, osteokondüktivite ve mekanik özellikler yönünden de etkileri bulunmaktadır. Donörün sağlık surumu ve bulaşıcı hastalık bulunup bulunmadığı tespit edildikten sonra ölümden sonra 24 saat içinde greftler alınır. -60-70 derecede 1 yıl veya daha fazla süre saklanarak immunojenik etkiler azaltılır; ancak ortadan kaldırıılmaz. “Kurutularak dondurma- freeze drying” işlemi ile immunojenite daha da azaltılır ; ancak -60-70 derecede dondurulan “taze donmuş- fresh frozen” kemiklere göre mekanik dayanıklılık % 50 daha azdır.^{13,68} Yapılan biyomekanik bir çalışmada derin dondurulmuş allogreftler normal dayanıklılığının % 100’ üne ulaşamamışlardır ve vaskülarize olmayan otogreftlere göre daha dayanıksız olarak bulunmuşlardır.⁵⁰

Tıbbi malzemelerin gama irradyasyonu ile sterilizasyonu için Uluslararası Atom Enerji Ajansı tarafından önerilen doz 25000 gray’dır. Fideler ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada taze donmuş kemik- patellar tendon-kemik allogreftin sterilizasyonun 30000 gray (3 megarad) veya üstü gama irradyasyonu ile yapılması gerektiğini; bu doz ve üzerinde HIV’ in dokuda saptanmadığını vurgulamışlardır.²²

Gama irradyasyonun kemik greftin kırılabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir.Cornu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı yöntemlerle sterilize edilen kemik allogreftlere göre dondurulup kurutulan ve gama ışınları ile sterilize edilen greftlerin daha kırılabilir ve daha sert olduğu gösterilmiştir.¹⁸ Bu nedenle gama ışınlarının dozu arttıkça kemik allogreftin dayanıklılığı azalacak ve kırılabilirliği artacaktır.⁵⁶

Taze dondurulmuş allogreftler daha az kırılabilir olmaları nedeniyle masif allogreftler ile rekonstrüksiyon planlanırken dondurulup kurutulan allogreftlere tercih edilmelidir. Bununla beraber saklanması ve transportu esnasında soğuk zincir gerekmesi, bakteriyel ve viral enfeksiyon riski ve yüksek maliyeti dondurulup kurutulmuş allogreftlere göre dezavantajlarıdır.

Allogreftler demineralize kemik matriksleri; morsalize ve kansellöz yongalar; kortikokansellöz ve kortikal greftler; osteokondral ve tüm kemik segmenti olacak şekilde hazırlanabilir.

Demineralize Kemik Matriksi

Demineralize kemik matriksi (DBM) osteokondüktif ve osteoindüktif bir materyal olarak kemik kayıplarını ve boşlukları doldurmada kullanılır.²⁷ Demineralize kemik matriksi hızlı bir şekilde yeniden damarlanır ve aynı zamanda otolog kemik iliği için iyi bir taşıyıcıdır.

Urist ve arkadaşları tarafından tarif edilen ve daha sonra Reddi ve Huggins tarafından modifiye edilen standardize edilmiş yöntemle demineralize kemik matriksi elde edilir. Bu yöntemde allojen kemik 74-420 µm partikül büyüklüğüne erişene kadar ezilir ve ardından üç saat 0,5 N HCL mEq/g'de demineralize edilir. Kalan asit; steril su , etanol ve etil eter ile yıkanır. Demineralize kemik matriksi elde etme aşamaları doku bankaları ve firmalar arasında demineralizasyon zamanı, asit uygulaması, ısı, yağdan arındırıcı ajan uygulamaları ve gama ışınları veya etilen oksit ile sterilizasyon açısından farklılık gösterebilir.^{23 35}

Demineralize kemik matriksinin biyolojik aktivitesi ekstrasellüler matrikste bulunan proteinler ve büyüme faktörleri ile olmaktadır. Demineralize kemik matriksin osteoindüktif kapasitesi saklama, kemiğin işlenmesi, sterilizasyon yöntemi ve donöre göre değişebilir. Örnek olarak etilen oksit ile belirli koşullarda sterilizasyon ve 2,5 Mrad gama ışını ile sterilizasyon ile osteoindüktivite azalır. Demineralize kemik matriksi dondurulmuş-kurutulmuş toz , ezilmiş granüller veya yonga, jel veya macun şeklinde kullanılabilir.²³ Gliserol, hyaluronik asit, kalsiyum sulfat ve jelatin karıştırılarak bu formlar elde edilir.

Bostrom ve Wang'ın yaptıkları çalışmalarda gliserolle kombine edilen DBM'lerde aşırı dozda kullanımda nörotoksik ve nefrotoksik etkiler saptanmıştır.^{11,80} Bu yüzden gliserolle kombine edilen DBM kullanılacağı zaman 2 cc/kg' ın üzerinde dozda kullanılmamaya çalışılması, düşük vücut ağırlığına sahip çocuk ve yaşlılarda kullanımından kaçınılması, renal fonksiyonları bozuk hastalarda kullanımdan kaçınılması ve açıkta bulunan spinal sinirlerle direkt temasının önlenmesi gerektiği belirtilmiştir.^{19,80}

Demineralize kemik matriksinin uzun kemik nonunionları ve kırık sonucu oluşan kemik kayıplarında otolog kemik greftlerine benzer iyileşme sonucu elde edildiğini gösteren çalışmalar ve spinal artrodezlerde iyi iyileşme sonuçları elde edilen çalışmalar bulunmaktadır.^{23,34,36,67}

Demineralize kemik matriksi kemik kaybı büyük olduğu zaman otolog kemik greftini arttırmak ve yoğunlaştırmak için kullanılabilir. Aynı zamanda otolog kemik grefti kullanılamayan hastalarda alternatif olarak kullanılabilir. Yine perkütan olarak demineralize kemik matriksi ve otolog kemik iliği kullanımı bu tip vakalarda göz önünde bulundurulmalıdır.²³

Demineralize kemik matriksi bir takım dezavantajlar da taşımaktadır. Allojen bir materyal olması nedeniyle HIV bulaştırma riski taşımaktadır. Ancak donör seçimi esnasında yapılan tetkik ve değerlendirmeler ve dekalsifikasyon işlemi esnasında virusun inaktive olması ve elimine olması ile bu risk çok düşüktür. Bugüne kadar yapılan yayınlarda demineralize kemik matriksi kullanımı sonrası HIV geçişi saptanmamıştır.

Morselize ve Kansellöz Allogreftler

Morselize ve kansellöz allogreftler osteokondüktiftirler ve kompresyona karşı mekanik destek sağlarlar. Dondurulup kurutularak(Freeze-drying, lyophilization) ve vakumla paketlenerek kullanıma hazırlanırlar. Kemik kistlerinde kuretaj sonrası oluşan kaviterlerin doldurulmasında ve periartiküler metafiz kırıklarında eklem yüzeylerinin kalıdırılması sonucu oluşan kemik boşluklarının doldurulmasında morselize allogreftler kullanılabilir. Morselize allogreftler otojen greftler ile karıştırılarak uygulanacak greft miktarını arttırmada da kullanılır.

Osteokondral ve Kortikal Allogreftler

Osteokondral ve kortikal allogreftler pelvis, kostalar, femur, tibia ve fibuladan elde edilerek major kemik ve eklem kayıplarında kullanılırlar. Ekstremitte koruyucu cerrahiler sonrası, büyük kemik kayıplarını doldurmak için ve periprostetik kırıklarda yapısal ve

mekanik destek sağlamak için kullanılırlar. Bu grefler osteokondüktiftir ve mekanik destek sağlarlar. Derin dondurularak veya dondurulup kurutularak saklanabilirler. Derin dondurulmuş allogreftler materyal özelliklerini korurlar ve eritildikten sonra hemen kullanılabilirler. Ancak dondurulup kurutulan allogreftler rehidratasyon sonrası uygulanmalarına rağmen torsiyon ve eğilme kuvvetlerine karşı zayıftırlar.

Osteokondral ve kortikal allogreft uygulamaları sonrası düşük de olsa HIV enfeksiyonu riski bulunmaktadır. ABD’de HIV virusu tanımlandıktan sonra 3 milyon doku transplantasyonu yapılmıştır ve taze donmuş allogreft uygulanan iki vakada HIV virusu saptanmıştır.²³

Taze allogreftlerde herhangi bir saklama yöntemi uygulanmadığından belirgin immun reaksiyon meydana gelme riski bulunur ve bu da onları otogreftlerden daha az etkili kılar. Bu taze allogreftlerin kullanımı sınırlıdır ve eklem yüzeyi oluşturmada kullanılabilmektedir.²³

Seramik Matriksler

Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi kalsiyum fosfat seramikler seramik matriksler olarak adlandırılırlar. Klinik uygulamalarda başarılı sonuçlar elde edilen kalsiyum sülfat tuzları da bu gruba dahil edilebilir.³⁹ Seramiklerin rekonstrüktif ortopedik cerrahide rolü osteokondüktif etkisinin olmasıdır.⁴¹ Bu materyaller üç gruba ayrılır: 1) Hızlı rezorbe seramikler, 2) Yavaş rezorbe olan seramikler, 3) Enjekte edilebilen seramik çimentolar²⁵

1. Hızlı Rezorbe Olan Seramikler ve Kalsiyum Tuzları

Klasik hızlı rezorbe olan kalsiyum fosfat seramiği trikalsiyum fosfattır. Poroz TCP implantları TCP tozlarının naftalin gibi taşıyıcılar kullanıldıktan sonra sıkıştırılması ile elde edilir. Elde edilen poroz yapı %35 oranındadır ve oluşan porlar 100-300 µm boyutlarındadır. TCP hidroksiapatite göre daha çözünürdür ve bunun sonucu olarak implantlar daha hızlı rezorbe olur. İmplantların gözenek yapısı çok küçük olması ve gözenekler arasında bağlantı bulunmaması nedeniyle rezorbsiyon olmadan kemik hücreleri

yapının içine ilerleyemez. Bu yüzden TCP' nin granül formu kemik grefti olarak daha kullanılışlıdır.²⁵

Yüksek kalsiyum fosfat iyon konsantrasyonu içeren yüzeyler ve lokal mikroçevre TCP rezorbsiyonunu etkiler. TCP' nin bulunması ve kalsiyum fosfat kristallerinin lokal depolanması osteoklastları uyarır. Osteoklastik aktivitenin artması ile osteoblastik aktivite de artacağı için bu sayede yeni kemik oluşumu meydana gelir.^{25,63}

2. Yavaş Rezorbe Olan Seramikler

Klasik yavaş rezorbe olan kalsiyum fosfat seramik örneği hidroksiapatittir. Yüksek derecede kristalize hidroksiapatit(örn: mercanlardan elde edilenler) invivo olarak stabildir ve yılda %5-10 oranında rezorbe olur. Chiroff ve arkadaşları mercanların yapılarının kortikal ve kansellöz kemikler ile benzer olduğunu ilk olarak vurgulamışlardır. Basit hidrotermal değişiklik sonucu mercan kalsiyum karbonatından (CaCO_3) mekanik olarak güçlü hidroksiapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}$]₂ dönüşür.²⁵

Hayvan ve insanlarda yapılan uygulamalar neticesinde hidroksiapatit poroz implantların fibrovasküler doku ile kaplandığı ve sonra lameller kemiğe döndüğü gözlenmiştir.²⁵ Oluşan kemik otojen greftlere benzer görünümündedir.²⁵

Klinik olarak hidroksiapatitin yavaş emilimi dezavantajdır. Bu nedenle emilimi arttırmak için değişik uygulamalar geliştirilmiştir. Bunlar; kalsiyum karbonatın dış kabuğunun hidrotermal olarak hidroksiapatite çevrildiği implantlar, hidroksiapatitten bifazik kalsiyum fosfat seramik elde edilmesi ve hidroksiapatit ile TCP karışımı olan bifazik materyaller olarak sayılabilir.²⁵

3. Enjekte Edilebilen Seramik Çimentolar

Bu çimentolar α -TCP, dibazik dikalsiyum fosfat ve terakalsiyum fosfat monoksit karışımlarından oluşur. Maddeler likid macun şeklinde karıştırılır ve ardından belirgin ısı oluşmadan kristalize olarak sertleşir. Bir miktar hidroksiapatit oluşsa da sertleşen çimentonun büyük kısmı saflaşmamış kolay rezorbe olan kalsiyum fosfat seramik kristalleri

içerir ve osteoklastlar tarafından remodelize edilir. Meydana gelen sertleşmiş materyalin kompresif güçlere dayanıklılığı kansellöz kemiklere eşdeğerdir.²⁵

Histolojik olarak implantasyon sonrası vasküler kanalların invazyonu ve osteoklastik aktivite birkaç hafta sonra gözlenir ve yeni kemik oluşumu izlenir. Klinik olarak açık ve kapalı olarak kırık sahasına ve kemik kaybı olan bölgeye uygulanabilir. Bu çimentolar radius distal uç kırıklarında, humerus proksimal uç kırıklarında, vertebra kompresyon kırıkları gibi kırıklarda kullanılabilir.²⁵

Kollajen

Kırık sahasında tip 1 ve 2 kollajen yüksek konsantrasyonda bulunur. Tip 1 kollajen çapraz bağlı fibriler yapısıyla kemiğin ekstrasellüler matriksi içinde en fazla bulunan proteindir. Tip 2 kollajen ise kırıkta bulunur. Northern blot teknikleri (mRNA hibridizasyonu) ile ilk haftanın sonunda tip 2 kollajende artış ve ikinci haftanın sonunda miktarında hızlı bir düşüş saptanır bu haftada sonra tip 1 artarak hakim olur. Bu kırıkta kallus modelin woven kemiğe dönüşümüyle sonuçlanmaktadır.⁸¹

Diğer kollajen molekülleri de kırık kallusunda aktiftir. Endotel hücre matriksiyle ilişkili tip 4 kollajen ve hipertrofik kondrositler tarafından üretilen tip 10 kollajenin büyüme faktörlerini seçici olarak bağladığı öne sürülmüştür. Bu büyüme faktörleri mezenşimal hücreleri osteoblastlara dönüştürmekte rol almaktadırlar. Tip 5 kollajen kırık kallusunda fibriler yapıyı oluşturmada rol alır.⁸¹

Kollajenin kemik oluşumunda ve mineral depolanmasında katkısı bulunmaktadır. Sadece yüzeyinde mineral depolanması için alanlar bulunmakla kalmaz aynı zamanda kollajen olmayan matriks proteinlerini bağlayarak hücre tutunmasını ve mineralizasyonun kontrolünü sağlayan alanlar elde eder. Örnek olarak osteonektin kollajen ile birleştiği zaman kristal depolanması için güçlü bir destekleyici olur ve asit fosfolipidle yapılan kollajen kompleksi matrikste hidroksiapatit depolanmasını sağlar.²⁵

Klinikte kullanımı bulunan saflaştırılmış sığır kaynaklı tip 1 cilt kollajeni çapraz bağlı yapıda değildir. Bu kollajen. bununla beraber değişik matriks yapılarının (jel, toz ve poroz

sünger) elde edilmesinde esnek bir madde olarak kullanılır²⁵. Osteoblastik progenitor hücrelerin ve diğer osteoprogenitör materyallerin uygulanmasında taşıyıcı olarak kollajen kullanılabilir.⁶³

Tek başına çözünebilir fibriler kollajen zayıf etkili bir graft materyalidir. Seramik granüller, kemik morfojenik proteinler ve osteoblastik progenitor hücrelerin taşınmasında etkili oldukları gösterilmiştir. Werntz ve arkadaşları tek başına kollajenin rat femurlarında diafiz kayıplarının iyileşmesinde etkisiz olduğunu; ancak kemik iliği ile birlikte kullanıldığı zaman otolog kansellöz greftlemeye göre üstün olduğunu göstermişlerdir.⁸³ Johnson ve arkadaşları kemik kaybı modelinde kullanımının tek seramik kullanımına göre kemik oluşumunu kollajen jel ile bifazik seramik hidroksiapatit ve TCP' den oluşan kompozitin (Collagraft) belirgin olarak arttırdığını göstermişlerdir ve bu çalışmada Grundel ve Chapman ile aynı sonucu elde etmişlerdir.^{23,25,37}

Zerwekh ve arkadaşları kollajen jel ile bifazik seramik hidroksiapatit ve TCP' den oluşan kompozitin anterior spinal füzyonda otojen greft ile karıştırılarak kemik grefti miktarının arttırılmasında kullanılabileceğini göstermişlerdir.⁹⁰ Bunun tersi olarak Muschler ve arkadaşları köpeklerde uyguladıkları posterior spinal füzyon modelinde otolog kemiğin etkisinin kollajen jel ile bifazik seramik hidroksiapatit ve TCP' den oluşan kompoziti ile karıştırıldığı zaman azaldığını bulmuşlardır.²⁵

Sığır kollajeni immunolojik olarak küçük bir risk taşır.bununla beraber bazı çalışmalar kemikler uygulandığı zaman sığır kollajeninin yan etkilerinin bulunmadığını göstermişlerdir. Sığır fibriler cilt kollajeni ile bifazik seramik hidroksiapatit ve TCP' den oluşan kompozitin kullanıldığı hastaların % 5'inde tip 1 kollajene karşı kan dolaşımında antikor saptanmıştır. Bu antikorlar insan kollajeni ile çapraz reaksiyon vermemişlerdir.²⁵

Hyaluronan (Hyaluronik Asit)

Hyaluronik asit; hyalin kıkırdağın temel yapı elemanı ve normal eklem sıvısında çözünebilir bir bileşen olarak bulunan büyük bir biyolojik moleküldür. Erken kırık kallusunda da hyaluronik asit fazla miktarda bulunur. Osteoindüktif etkisi bulunmamasına rağmen bazı özellikleri sayesinde doku mühendisliğinde kullanım alanı bulmuştur.²⁵

Hyaluronan horozlardan elde edildikten sonra saflaştırılarak klinik kullanıma sunulur. Gözde vitreous humor değiştirilmesinde ve osteoartritte intraartiküler olarak kullanılır. Hyaluronan insan kaynaklı recombinant fibroblast büyüme faktörü tip 2' nin taşınmasında kullanılmıştır.²⁵

Polilaktik ve Poliglaktik Asit Polimerleri

Çözünebilir polimerlerin osteokondüktif potansiyelleri azdır. Polilaktik asit, poliglaktik asit ve kopolimerler (PLGA) kemik oluşumunu uyarmadan cerrahi uygulamalarda kullanılırlar. Biyouyumlulukları sayesinde güvenle dikiş materyali olarak ve greft matrislerinin geliştirilmesinde kullanım alanı bulmuşlardır. Peptid büyüme faktörlerinin zamanla salınımını sağlayan taşıma sistemleri geliştirilmesinde de kullanılmışlardır. Çözünmeleri hidroliz yoluyla olur. PLGA boncukların kemik morfojenik proteinleri ile karıştırıldıktan sonra kemik kaybı olan bölgeye uygulandıklarında o bölgede indüktif ajanların daha yoğunlaştığı ve oluşumunu hızlandığı gösterilmiştir.²⁵

Biyoaktif Camlar

Değişik şekillerde biyoaktif camlar periyodontal cerrahide kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bonucuklar silikon dioksit (%45), kalsiyum oksit (%24,5), disodyum oksit (%24,5) ve pirofosfattan (% 6) oluşur. Uygulandıkları zaman kollajen, büyüme faktörleri ve fibrine bağlanarak osteojenik hücrelerin infiltrasyonunu sağlayan poroz matris oluştururlar..²³

Granül, blok ve çubuk şeklinde bulunurlar. Absorbe olan ve olmayan formları bulunmaktadır. Antibiyotikler ile kemik yapımını arttıran maddeler ile karışım halinde

kullanılamazlar. Hidroksiapatit implantlardan daha dayanıklıdır.⁴⁸ Kemik greftinin miktarını arttırmada, vertebra cisim protezlerinde, ossikular replasmanda, orbital implantlarda ve metal implantları kaplamada kullanılırlar.⁴⁸

Cam İyonomerleri

Cam iyonomerleri ilk olarak 1971 yılında dişçilikte kullanılmıştır. İyonomerik çimento kalsiyum/aluminyum/florosilikat cam tozunun polikarboksilik asit ile karıştırılması ile oluşur. PMMA kemik çimentosundan polimerizasyon esnasında ekzotermik reaksiyon oluşmaması nedeniyle üstündürler.

Toz formunda bulunurlar. Reabzorbe olmazlar. Antibiyotik ve kemik oluşumunu uyaran maddeler ile karıştırılabilirler. Kompresif gücü ve elastisitesi kortikal kemik ile eşdeğerdedir. Dişçilikte, maksillofasiyal cerrahide ve ossikular replasmanda kullanılır.⁴⁸

Aluminyum Oksit

Aluminyum oksit birkaç biyoaktif materyalin karışımından oluşur; ancak tek başına greft yerine kullanılmaz. Aluminyum seramikler biyoaktif camlar gibi implant ve kemik arasında iyon değişimi yapmazlar. Bu yüzden osteointegrasyon yapmazlar. Bunun yerinde implantın üzerindeki streslere bağlı olarak çevreleyen kemikle arasında mekanik bir bağ olur.

Aluminyum seramikler çok sert ve katıdır. Eğilmeye bağlı kırılmaya karşı seramik hidroksiapatitlere göre çok daha dayanıklıdır. Granül ve blok formları bulunur. Reabzorbe olmazlar. Antibiyotik ve kemik oluşumunu uyaran maddeler ile karıştırılamazlar. Kemik greftini büyütücü olarak, kama osteotomilerinde, ossikular replasmanda, eklem protezlerinde kaplama olarak kullanılmaktadırlar.⁴⁸

Kemik Morfojenik Proteinleri (Bone morphogenic protein-BMP)

Kemik morfojenik proteinleri düşük molekül ağırlıklı kollajen olmayan glikoproteinlerdir. Bu protein ailesi çok sayıda büyüme ve farklılaşma faktörü içeren bir grup olan TGF- β grubuna dahil olan dimerik moleküllerden oluşmaktadır.⁸⁴ BMP adı ile

anılan BMP-2' den BMP-8' e kadar yedi üyesi olmasına rağmen ,osteojenik proteinler, kırık kaynaklı morfojenik proteinler ya da büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi çeşitli isimlerle anılan otuzdan fazla molekül bu aile içinde yer almaktadır ve hepsi birlikte TGF- β grubunun üçte birden fazlasını oluştururlar.

Tüm kemik proteinlerinin ağırlık olarak %0,1' ni oluştururlar. DBM kemik morfojenik proteinlerinin karışımından oluşur ve immünojeniktir. Ancak saf BMP immünojenik değildir ve türlere özgü değildir. Rekombinant gen teknolojisi ile kemik morfojenik proteinleri ayrı ayrı üretilmiştir. Klinik kullanımda ise BMP karışımları saflaştırılmış kemik ekstratlarından elde edilmektedir.. Çalışılmakta olan rekombinant BMP'ler rh-OP-1 (osteojenik protein 1) , rh-BMP-2 ve rh-BMP-7'dir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çok merkezli bir çalışmada lomber spondilolistezis tanısıyla 14 hastaya metal kafeslerin içine rhBMP-2/ kollajen (11 hasta) ve otogreft (3 hasta)konularak spinal füzyon yapılmıştır. rhBMP-2/ kollajen kullanılan 11 hastada altıncı ayda füzyon saptanırken diğer üç hastanın ikisinde füzyon birinci yılda olmuştur⁹

Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Avustralya'da rhOP-1 ve kollajen kombinasyonu spondilolistezis vakalarında posterolateral spinal füzyonda iliak kanatttan alınan otogreftin yerine kullanılmaktadır. Patel ve arkadaşlarının yaptığı pilot çalışmada macun benzeri karışımdan oluşan material kullanılan 24 hastanın 21' inde kemik köprüleşmesi görülmüş; kontrol grubu olarak otogreft kullanılan 12 hastanın 11' inde (%90 oranında) köprüleşme görülmüştür. rhOP-1kullanılan hastalar otogreft başarı oranına(>20% Oswestry gelişim skoru) ve radyografik başarı oranına göre (fleksiyon/ ekstansiyondaki grafilerde stabilite ve köprüleşme) iki kat daha fazla başarılı bulunmuştur. Maddeye bağlı yan etki rapor edilmemiştir. ⁷⁶

Gelecekte BMP' ler revizyon artroplastisinde, femur başı avasküler nekrozunda ve enjekte edilebilir formlarıyla kapalı tedavi edilebilecek kırıklarda ve omurga füzyonunda minimal invaziv cerrahide yaygın kullanım alanı bulacaktır.

Diğer Büyüme Faktörleri

Kemiğin ekstrasellüler matriksinden elde edilen büyüme faktörlerinin (DBM, BMP) yanında kan dolaşımında bulunan diğer büyüme faktörleri de (TGF- β , IGF-I, IGF-II, PDGF, FGF) kırık iyileşmesinde etkilidir. TGF- β kemik biyolojisinde en çok çalışılan büyüme faktörüdür. BMP'leri oluşturan molekül ailesinin tümünü kapsar. 1994 yılında rekombinant teknoloji ile ilk olarak elde edilmiştir ve kırık iyileşmesini hızlandırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır.^{33,40}

Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF) tavşan tibialarında yapılan osteotomilerde kırık iyileşmesini uyardığı gösterilmiştir.⁴⁹ Otolog büyüme faktörleri cerrahi sırasında "cell saver"daki kan pıhtısından santrifüj sonucu elde edilirler. Bu madde büyüme faktörlerinden özellikle TGF- β ve PDGF' den zengindir. Bu otolog büyüme faktörlerinin kırık iyileşmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Diğer kırık iyileşmesine etkili faktörlerden temel fibroblast büyüme faktörün de (bFGF) klinikte kullanımı bulunmaktadır.

Gen Tedavisi

Gen terapisi ile exvivo veya invivo olarak nükleik asit materyallerinin (DNA veya RNA) transferi mümkün olmaktadır.Bu sayede konjenital veya akkiz hastalıkların tedavisi yapılabilmektedir. Gen tedavisinin ekzojen kaynaklı osteoindüktif kemik morfojenik proteinlerinin bolus olarak enjekte edilmesine göre avantajları bulunmaktadır. Örnek olarak hücresel taşıyıcı ile modifiye edilmiş genetik materyalin kullanılması zamanlama ve konsantrasyon olarak osteokondüktif matrikse göre daha fizyolojiktir. Kemik iyileşmesinde etkili bazı genler başarıyla transfer edilmiştir(TGF- β 1, LMP-1 ve BMP-2)⁵ önümüzdeki yıllarda doku mühendisliği ve gen terapisi konularındaki gelişmeler ile en uygun otojen olmayan kemik grefti bulunacaktır.⁵⁵

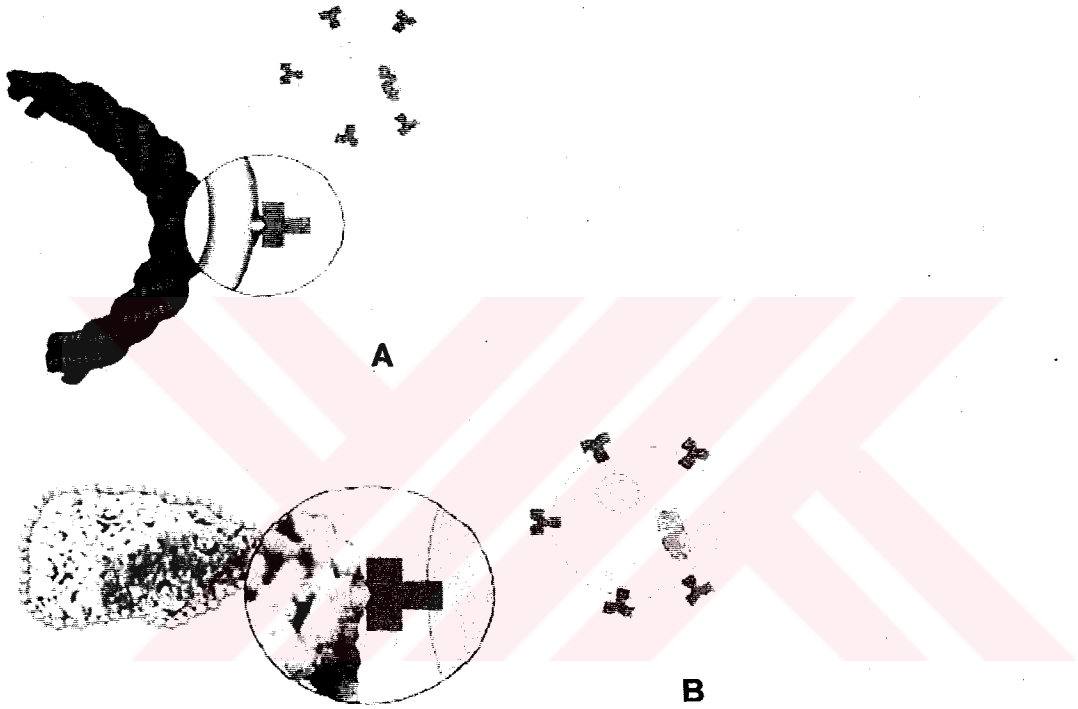
Vigeswarapu ve arkadaşları LIM mineralizasyon protein-1'i adenoviral vektör aracılığıyla transfer etmiştir.⁷⁸ Bu gen terapisi sayesinde sistemik veya lokal kemik yapımı arttırılarak kırık iyileşmesi ve spinal füzyon oranları arttırılabilecektir.⁷⁵

Organik Olmayan Sığır Kaynaklı Hidroksiapatit Matrisi/ Sentetik Hücre Bağlayıcı Peptid (ABM/ P-15)

Dokularda tip 1 kollajen; hücrelerin göç etmesi ve tutunması için bir şablon gibi görev alır. Bu işlemle ilgili reseptörleri düzenleyen sinyallerin yönetilmesinde görev alır. Hücreler tip 1 kollajene haptotaktik mekanizmalarla tutunur ve göç ederler. Kollajen ve hücreler arasındaki bağ yüksek derecede özgü reseptörler aracılığı ile olur. Bu bağ sayesinde oluşan hücre iskelet yapısı mekanik enerjinin biyokimyasal olaylara çevrilmesinde rol alır. Aynı zamanda bu hücre iskeleti hücrelerin farklılaşması ve morfogenezisi için rol alır.⁸

Bhatnagar ve arkadaşları, tip 1 kollajenin hücre bağlayıcı alanını $\alpha 1(I)$ zincirinde tanımlamışlardır($^{766}\text{GTPGPQGIAGQRGVV}^{780}$). Bu sekans kollajene özgüdür. Tip 1 kollajenin hücre bağlayıcı aktivitesini biyoseramik iskeletler veya polimer taşıyıcı matrisler üzerine üç boyutlu olarak aktararak kemik oluşturan hücrelerin tutunmasını, göç etmesini ve farklılaşmasını sağlayacaklarını düşünmüşlerdir. Bhatnagar ve arkadaşları buldukları bu sekansa dayanarak yaptıkları sentetik peptidin (P-15) kollajen bağlayıcı reseptörlere yüksek afinitesi olan bir ligand olduğunu göstermişlerdir.⁶⁻⁸ (Şekil 3)

ŞEKİL 3: a- Kollajenin hücre yüzeyindeki integrin reseptörü ile birleşmesi
b-P-15 şablonunun hücre yüzeyindeki integrin reseptörü ile birleşmesi⁷⁷



Peptid P-15 ($^{766}\text{GTPGPQGIAGQRGVV}^{780}$), katı faz prosedürleri ile 9-florenilmetoksikarbonil koruyucu gruplar kullanılarak sentezlenir. Peptid, asetonitril ve H_2O ' nun gradienti içinde C-18 sırasını kullanan ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile saflaştırılır. Peptidin saflığı % 95'dir. Amino asit sekansı sekans analizi ile doğrulanır.⁶⁻⁸

Partiküller halinde sığır kemiğinden elde edilen poroz anorganik kemik minerali (Hidroksiapatit) (Anorganic bone mineral- ABM) 250- 420 μm çapındadır. ABM'in ortalama gözenek hacmi 0,13 cc/g ve cıva porozimetriye göre total porozite % 28'dir. Mikroanalitik prosedürlerle hidroksiapatit hazırlanmasında nitrojenöz materyaller bulunmadığı gösterilmiştir. Meydana gelen ABM'nin saflığı laboratuvar yöntemleri ile gösterilmiştir.⁶⁻⁸ Sığır kaynaklı hidroksiapatitler düşük ısıda elde edildikleri zaman geride kalan proteinler ve prionlar ile hastalık oluşturma riski bulunmaktadır (Jakob Creutzfeld hastalığı gibi). Yüksek ısıda yapılan sığır kaynaklı hidroksiapatitlerdeyse bu risk bulunmamaktadır. ABM bu açıdan avantajlıdır.⁴³

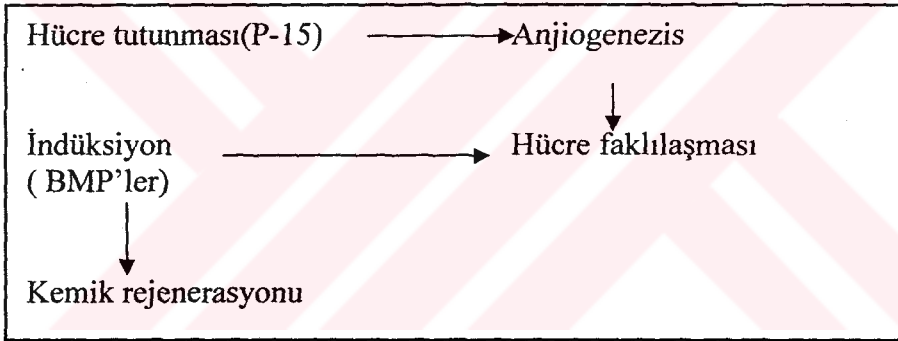
P-15, hidroksiapatit üzerine doymuş şekilde emdirilir. Peptidin en fazla emdirilmesi , partikül halindeki hidroksiapatit iki katı hacimde fosfatla tamponlanmış salin içindeki 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ P-15 solüsyonunda 24 saat inkubasyon sonrası elde edilir. Emilmeyen peptid; partiküllerden hacmin 5 katı fosfatla tamponlanmış salinle yıkanarak , nazikçe çalkanarak ve 24 saatlik periyod sonrası boşaltılarak uzaklaştırılır. HA-P-15 kompoziti kurutulduktan sonra oda ısısında nemden koruyucu kaplarda saklanırlar.⁶⁻⁸ Hücre bağlayıcı peptid ile yüzeyi kaplanarak kemik greft materyaline hücre bağlanmasının artması hedeflenmektedir.⁴³ P-15 hücre bağlayıcı peptid, apoptozu regülasyonu ile hücre tutunmasını artırarak hücre sayısını ve doku yapısını düzenler.³²

Qian ve arkadaşları, doku kültürlerinde ABM/P-15 ile yaptıkları invitro çalışmada alkalin fosfataz için yapılan boyamalar sonucunda P-15 ile kaplanan ABM'in kemik iyileşmesinde etkili olduğunu vurgulamışlardır.⁵⁸

ABM/P-15 kombinasyonunun hücelere tutunduğu ve periodontal ligament fibroblastlarının bu taşıyıcıya tutunmasını uyardığı invitro olarak gösterilmiştir.⁴⁴ Deneysel hayvan çalışmalarında kemik oluşumu gösterilmiştir. Osteokondüktif özelliği bulunan ABM/P-15 kombinasyonunun periodontal defektlerde klinik kullanımı gündeme gelmiştir.^{1,15} Tip 1 kemik matriks kollajeninin küçük bir amino asit zincirinden oluşan P-15 antijenik değildir ve bu yüzden immün reaksiyon oluşturmaz.^{79,87}

ABM, hücrel invazyon için gerekli olan kalsiyum fosfat ve doğal anatomik matriksi sağlamaktadır. P-15; hücrel bağlanmayı, göçü, proliferasyonu ve farklılaşmayı ayarlamaktadır. Bu sayede çevre dokulardaki hücreler özellikle fibroblast ve osteoblastlara bağlanırlar.⁴² (Tablo 2)

Tablo 2: Kemik oluşumunu sağlayan olaylar zinciri⁴²



Özet olarak :

Osteointegrasyon: Greftin arada fibröz doku oluşumuna yol açmayacak şekilde alıcı kemik yüzeyine kimyasal olarak tutunabilmesidir.

Osteokondüksiyon: Alıcı kemikten vasküler ve perivasküler yapıların grefte ilerlemesi için greftin çatı görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilmesidir.

Osteoindüksiyon: Plüripotent hücrelerin çevre dokuda osteoblastik fenotipe dönmelerini uyurabilmektir.

Osteogenezis: Osteoblastik hücreler tarafından greft materyali içinde yeni kemik oluşabilmesidir. Yeni kemik dokusu ortaya çıkabilmesi için öncelikle kemiği meydana getirebilecek yeterli sayıda “osteojenik progenitor hücreler” ortamda bulunmalıdır.^{4,48}

Kullanılan greft materyalleri osteointegrasyon, osteojenik, osteokondüktif veya osteoindüktif özelliklerin birine veya birden fazlasına sahiptirler. Bu özellikler sentetik materyallerde ve saflaştırılmış büyüme faktörlerinde de bulunmaktadır. Bu da doku mühendisliğini mevcut maddelerin kombinasyonları veya yeni materyaller ile kırık iyileşmesi için en uygun ortamın ve greftleme metodlarının geliştirilmesi yoluna itmiştir. Bu sayede greftleme tekniklerinin maliyetinin azaltılması ve tedavide yeniliklerin elde edilmesi amaçlanmaktadır²⁵ (Tablo3-4).

Tablo 3: Ototreft ve allotreftlerin karşılaştırılması²⁸

Kemik grefti	Yapısal dayanıklılık	Osteokondüksiyon	Osteoindüksiyon	Osteogenezis
Ototreft				
Kansellöz	Yok	+++	+++	+++
Kortikal	+++	++	++	++
Allotreft				
Kansellöz- Donmuş	Yok	++	+	Yok
Kansellöz- Dondurulup kurutulmuş	Yok	++	+	Yok
Kortikal- Donmuş	+++	+	Yok	Yok
Kortikal- Dondurulup kurutulmuş	+	+	Yok	Yok

Tablo 4 :Klinik ve deneysel greft materyallerinin özellikleri (Skorlama 0-3 arası) ^(25,76)

Materyal	Osteokondüktif	Osteoindüktif	Osteojenik	Avantajlar	Dezavantajları	Klinik sonuçlar
Otogreft	3	2	2	"Altın standart" (biyouyumluluk ve füzyon açısından)	Morbidite, sınırlı miktarda kullanım, elde etme zorluğu	% 56-100 spinal füzyon
Allogreft	3	1	0	Değişik şekillerde bulunabilmesi	Immunojenik, hastalık transfer riski	%60-90 spinal füzyon
Demineralize kemik matriksi	1	2	0	Osteoindüktif kemik yapısal proteinleri(BMP) içerir. Kemik greftinin hacmini artırır	Yapısal destekte bulunmaz. Değişken osteindüktif özellikleri vardır.	Yoğunlaştırıcı olarak kullanıldığı zaman saf otogreftle eşdeğerdir
Trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit	1	0	0	Kaynak sınırlılığı yok biyouyumlu	Başlangıçta az yapısal destek	otogreftle eşdeğer ; fakat daha az komplikasyon
Kalsiyum fosfat çimentosu	1	0	0	Enjekte edilebilir Kaynak sınırlılığı yok Başlangıçta bir miktar yapısal destek	Yerleştirirken kontrol etme problemi Tam olmayan rezorbsiyon	Konvansiyonel tedaviye eşdeğer veya daha üstün sonuçlar
B-Trikalsiyum fosfat/kemik iliği kompoziti	3	2	2	Bol kaynak	Başlangıçta az yapısal destek	Preklinik sonuçlar bulunmaktadır
Kollajen	2	0	0	Diğer greft materyalleri için iyi bir taşıyıcıdır	Az yapısal destek Immunojenik reaksiyon potansiyeli	Uzun kemik kırıklarında kemik iliği ile birlikte kullanıldığında otogreft kullanımına eşdeğer sonuçlar
BMP/sentetik kompozit	-	3	-	Sınırsız kaynak potansiyeli	Deneysel çalışma ve pazarlama nedeniyle yüksek maliyet	rhBMP-2' in seramik veya kollajen ile birlikte kullanıldığında otogreftle eşdeğer sonuçlar elde edilen klinik çalışmalar yapılmaktadır
Kemik iliği	2	2	2	Diğer materyallerle karıştırılarak greftlemeye tedavi yanıtını arttırmak için kullanılabilir.	Sınırlı miktarda kullanım	Başarılı deneysel ve klinik sonuçlar

Kırık İyileşmesi İçin Kullanılan Deneysel Hayvan Modelleri

Kırık iyileşmesini araştırmak için hayvan deney modelleri kullanılması ile insan kırık tedavilerinde büyük ilerlemeler elde edilmiştir. Hayvan deneyleri ışığında geliştirilem yöntemler insane epidemiyolojik ve klinik çalışmaları ile geliştirilmiştir. Kırık çalışmalarında ratlar, tavşanlar, kedi, köpek, koyun, primatlar, tavuk ve güvercin gibi kuşlar da kullanılmaktadırlar. Bu deney modellerinden elde edilen sonuçlar değerlendirilirken insan kırık iyileşmesinden farklı biyoloji ve anatomiye sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Anatomik olarak fare ve ratlar gibi rodentler kemik yapılarında havers sistemi olmaması nedeniyle farklıdır. Tavşan, kedi ve köpek gibi üst filogenetik sınıflara çıkıldıkça havers sistemi ortaya çıkmaya başlar. Türler arasındaki bu anatomik farklılık da kırık iyileşmesinin araştırılmasında önemli rol oynar ve göz önünde bulundurulması gerekir. Deney laboratuvarlarında kullanılan hayvanların yaşları da dikkat çeken bir konudur. Birçok laboratuvar hayvanı gençtir ve büyüme plakları bulunmaktadır. Bu nedenle yaşlı hayvanlara göre kırık iyileşmesi daha hızlı olarak izlenebilir. Aynı zamanda türler arasındaki, biyokimyasal farklılıklara bağlı olarak ilaçlara yanıtlar da farklı olabilir. Bu ayrıntı kırık iyileşmesinde kullanılan maddelerin etkinliğinin değerlendirilmesinde önemlidir.⁵³

Düşük maliyet ve deney gruplarının sayıca fazla tutulabilmesi nedeniyle fareler deney modellerinde sıklıkla kullanılır. Genetik yapılarının iyi bilinmesi nedeniyle moleküler biyoloji alanında farelerden yararlanılır. Hiltunen ve arkadaşları ekstrasellüler matriks genlerinin üzerinde yapılan çalışmada 0,2 mm intramedüller rod kullanarak fare tibialarında standart kırık modelini tanımlamışlardır. Histolojik ve mekanik testler uygulanmıştır.⁵³

Fareler ile yapılan bir çalışmada; genetik yapısına müdahale edilen farenin kollajen yapısı ve kırık iyileşmesinde etkili proteinlerdeki değişiklikler ile kemiklerin mekanik özellikleri değerlendirilmiştir.⁵³

Ratlar kırık iyileşmesinde yaygın olarak kullanılan hayvanlardır. Ancak rat, fare gibi rodentlerin kemiklerinde haversiyen sistemin bulunmaması ve anatomik olarak küçük

olmaları dezavantaj oluşturur. Femur, tibia, fibula, radius, ulna, metatarslar ve kranial kemikler kırık modeli olarak kullanılmışlardır. Kırıktan önce veya osteotomiden önce intramedüller çivi kullanımı sıklıkla uygulanmaktadır. Kapalı kırık oluşturulduktan sonra kırık tespit edilmeden ve immobilizasyon uygulanan deney modelleri bulunmaktadır. Bu çalışmalar ile birçok mekanik, histolojik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik çalışmalar yapılmaktadır. Ratlar fareler göre daha büyük olmaları nedeniyle mekanik çalışmalar daha kolay uygulanmakta ve incelemek için daha fazla histolojik doku elde edilebilmektedir. Deney maliyeti fazla denek sayısı gereken gruplar içeren deneyler için düşük seviyededir.⁵³

Tavşanlar da sık kullanılan deney hayvanlarındandır. Yapısal olarak büyük olmaları nedeniyle eksternal fiksasyon, plak-vida ile fiksasyon veya intramedüller çivi ile fiksasyon metodları ile yapılan deneylerde uygun model oluşturabilirler. Pahalı ilaçların ve kimyasal ajanların kullanılmasına hayvanların büyüklükleri izin verir.⁵³

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Modeli:

Bu çalışmada ratların radiuslarında oluşturulan segmenter kortikal kemik defektlerinde “İnorganik kemik matriksiyle birleştirilmiş sentetik hücre bağlanma polipeptidi (P-15)” greft materyalinin kırık iyileşmesine etkisinin radyolojik, histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Bu deneysel hayvan çalışmasında ; iskelet sistemi gelişimini tamamlamış, Wistar albino tipi ratlar kullanıldı. Denekler arası genetik farklılıkları azaltmak için ratların tamamı aynı hayvan laboratuvarından temin edildi. Çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Ünitesi Cerrahi Araştırma Laboratuvar’ında gerçekleştirildi.

Çalışmada ağırlıkları 300 ± 20 gram olan 36 adet Wistar tipi dişi rat kullanıldı (Şekil 4). Deney grubunda tüm hayvanlar standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile beslendi. Cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından Ketamine-HCL (50 mg/ml) rat başına 10 mg/kg +Benzetonyum-Cl karışımı (Ketalar®-IM) anestezisi altında yapıldı. Çalışma sırasında ölüm ve otomutilasyon nedeniyle denek kaybı olmadı.

Bu çalışma için “ Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu”nun 02.01.2004 tarih ve 001-00008 sayılı kararı ile etik kurul çalışma onayı alındı.

Çalışma Grupları ve Cerrahi Teknik

36 adet rat 13/ 12/11 adet olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Her bir grup ayrı tel kafesler içerisinde muhafaza edildi.

Ratların sağ ön kollarına cerrahi girişim uygulandı. Longitudinal insizyon ile cilt, cilt altı ve kas tabakası geçildikten sonra radius orta 1/3 diafiz kısmına ulaşıldı (Şekil 5-6). Keski yardımıyla radiusa osteotomi uygulandı ve diafiz çapının iki katından fazla olacak şekilde kemik segment çıkartıldı (Şekil 7-9). Osteotomi hattı serum fizyolojik ile yıkandı.

Deney grupları şu şekilde yapılandırıldı: (Tablo 5)

1. grup segmenter kemik defektine jel formundaki ABM/P-15 Flow konuldu (Şekil 10-12).
2. grupta oluşturulan segmenter kemik defekti toz formundaki ABM/P-15 ile dolduruldu. (Şekil 13-18)
3. gruptaki segmenter kemik defektleri boş bırakıldı.

Ardından tüm gruplarda cilt primer olarak kapatıldı (Şekil 19). 10 haftalık iyileşme süreci sonunda ratlar yüksek doz ketamin anestezisi sonrası intrakardiyak yolla kan alınarak feda edildi. Segmenter defekt oluşturulan kollar kallus dokusuna zarar verilmeden omuz hizasından dezartikülasyon uygulanarak çıkartıldı. Kırık bölgeleri ayrıldıktan sonra radyolojik değerlendirmeye alındı ve ardından % 10 formaldehit içeren solüsyona alındı.

GRUP	ABM/P-15 FLOW	ABM/P-15 Toz
1. Grup	+	-
2. Grup	-	+
3. Grup (Kontrol)	-	-

Tablo 5: Deney gruplarının oluşturulması ve grupların kodları

Radyolojik Değerlendirme:

On haftalık iyileşme süresi sonunda denekler feda edildikten sonra cerrahi uygulanan kollarına omuz hizasında dezartikülasyon uygulandıktan sonra ait oldukları gruplara göre sınıflandırılmıştır. Örneklerin tamamına anteroposterior direkt radyografiler çekilmiştir. Radyolojik değerlendirme; daha önce Cook ve arkadaşları tarafından tarif edilen radyolojik değerlendirme tablosu kullanılarak yapıldı. (Tablo 6) Bu değerlendirme tekniğinin, daha önce yapılan çalışmalarda, deneyimli gözlemcilerin sonuçları ile uyumlu olduğu gösterildiğinden, radyodansite ölçümü için özel bir araç kullanılmamıştır. ^{16,45,66}

Deney Grubu☐1 ☐2 ☐3 ☐4 ☐5**Numarası**☐1 ☐3 ☐5 ☐7 ☐9 ☐11 ☐13
☐2 ☐4 ☐6 ☐8 ☐10 ☐12 ☐14**Radyolojik derecelendirme**

Erken post-op görünümünden değişiklik yok	☐ 0
Defekt içerisinde radiodens değişiklik izleri	☐ 1
Yer yer kalsifikasyon gösteriyor defekte köprüleşme yok	☐ 2
En az bir noktada köprüleşme var	☐ 3
Uniform kalsifikasyon ile medial ve lateral kenarda köprü var	☐ 4
3. derece ile aynı, ancak en az bir korteksde yeni kemik var	☐ 5
Defekt düzgün kemik ile kaynamış, defekt görülüyor	☐ 6

Tablo 6: Radyolojik değerlendirme tablosu

Histopatolojik Değerlendirme:

Histopatolojik değerlendirme için ayrılan materyaller, değerlendirme zamanına kadar % 10 formol içeren kavanozlarda patolojik değerlendirme yapılmıyaya kadar saklanmıştır. Değerlendirmeyi yapan patoloğa, örneklerin ait oldukları gruplar hakkında bilgi verilmemiştir. Histopatolojik değerlendirme Salkeld ve arkadaşları tarafından kullanılan histopatolojik değerlendirme çizelgesi kullanılarak yapılmıştır. ^{45,59}(Tablo 7) Örnekler daha sonra, longitudinal kesit alınmasını mümkün kılmak için % 10 formik asit içeren solüsyonda, asit çözeltisi günlük olarak değiştirilerek on gün bekletilmiş, yeterli dekalsifikasyonun sağlandığı görüldükten sonra örnekler parafin bloklara gömülmüştür. 5µm kesitler alındıktan sonra kesitler hemotoksilen-eozin ile boyanmıştır ve histopatolojik değerlendirmeye alınmıştır. Kırık hatlarında gelişen kırık iyileşme cevabı değerlendirilmiştir.

Histolojik Değerlendirme Skalası

Deney Grubu		Numarası	
☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5		☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5	
Kaynama Kalitesi	Hiç kaynama belirtisi yok Fibröz kaynama Fibrokartilaj veya kartilaj kaynama Mineralize kıkırdak ve kemik kaynaması Tam kemik kaynaması	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4	
Korteks Gelişimi ve Remodeling	Korteks oluşumu yok Dış kenarlarda yeni korteks yoğunlaşması Belirgin dış korteks ve medulla oluşumu Korteks oluşmuş ancak köprüleşme yok Defektin tam köprüleşmesi ve korteks oluşumu	☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4	
Kemik Graft İnkorperasyonu ve Yeni Kemik oluşumu			
Yeni kemik oluşumu yok	Graft duruyor, inkorperasyon yok, yeni kemik yok	☐ 0	
	Graft duruyor, az miktarda yeni kemik ile inkorpearsyon var	☐ 1	
	Graft duruyor, orta miktarda yeni kemik ve inkorperasyon var	☐ 2	
Graft azalmış,	Graft duruyor, yeni kemik var, erken remodelizasyon var	☐ 3	
artmış yeni kemik oluşumu	Azalmış graft, iyi graft inkorperasyonu, belirgin yeni kemik	☐ 4	
	Az miktarda graft, iyi kemik inkorperasyonu ve yeni kemik	☐ 5	
Graft yok, yaygın yeni kemik ,	Mükemmel kemik inkorperasyonu, ileri derrecede remodeling	☐ 6	

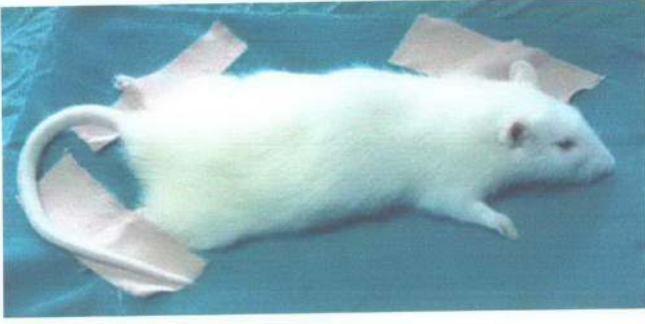
Tablo 7. Histolojik değerlendirme cetveli

Biyokimyasal Değerlendirme:

Deneklerden on haftalık iyileşme süresi sonunda feda edildikten sonra intrakardiyak yolla kan alınarak serum alkalin fosfataz değerlerine bakıldı. Kan düzeyleri biyokimya laboratuvarında rutin kullanılan kitler ile belirlendi.

İstatistiksel Değerlendirme:

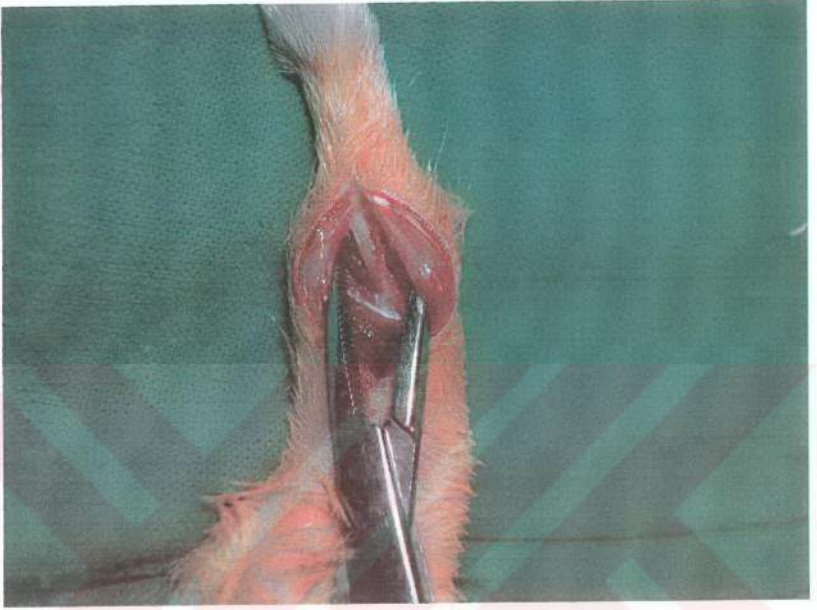
Gruplar arası verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 10.0 for Windows istatistik programı kullanıldı. Test olarak Kruskal- Wallis ve Mann- Whitney U testi uygulandı.



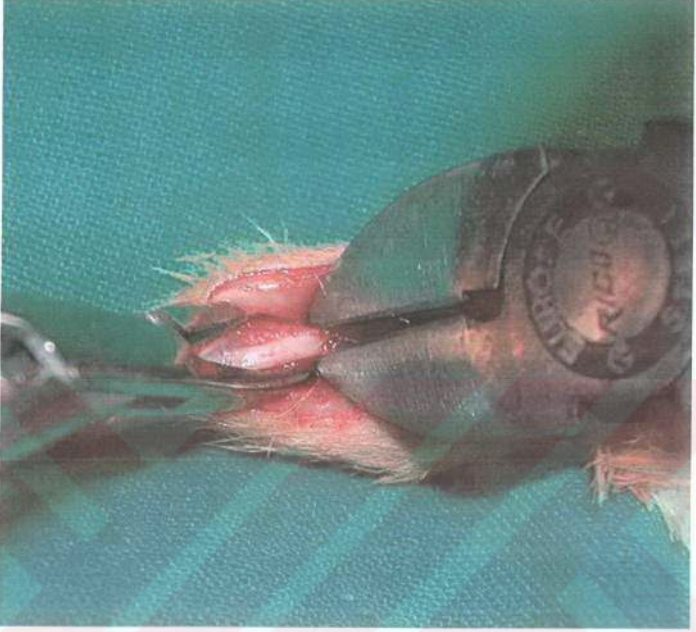
Şekil 4: Wistar tipi ratın cerrahi girişim öncesi hazırlanması



Şekil 5: Posterolateral longitudinal cilt- ciltaltı insizyon



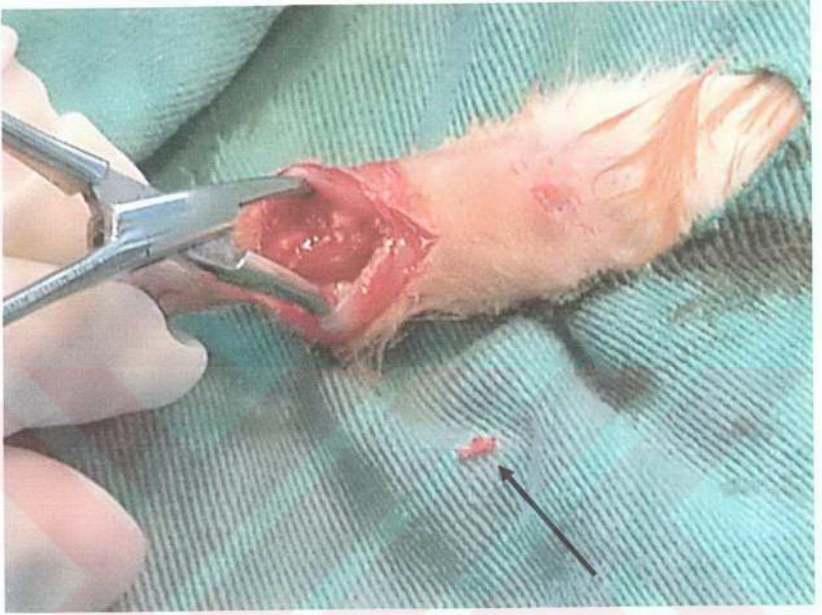
Şekil 6: Radiusun çevre dokulardan sıyrılması



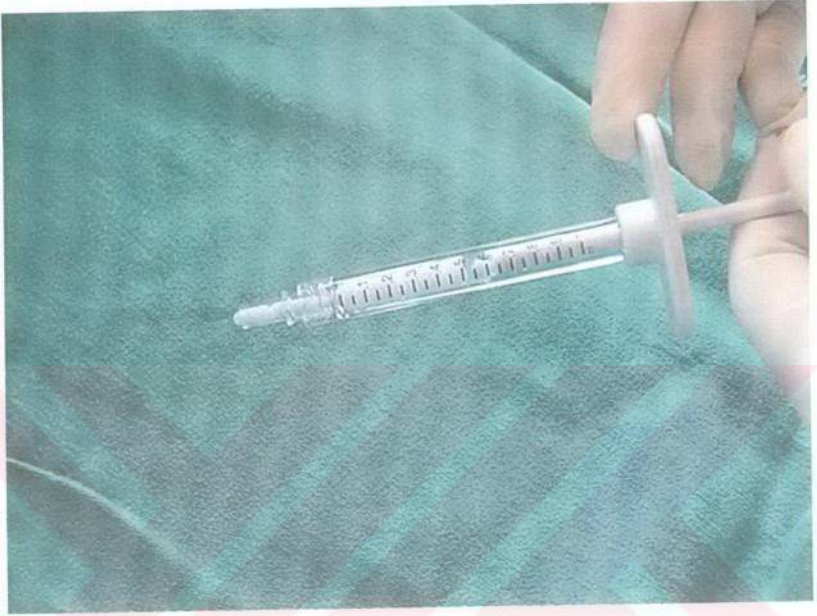
Şekil 7: Ratusa osteotomi uygulanması



Şekil 8: Osteotomi alanı



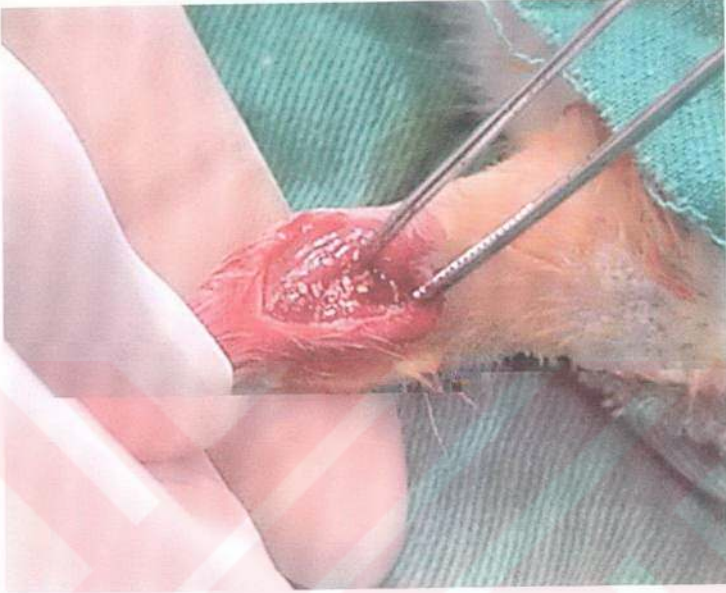
Şekil 9: Osteotomi hattı ve radiustan çıkartılan kemik segment



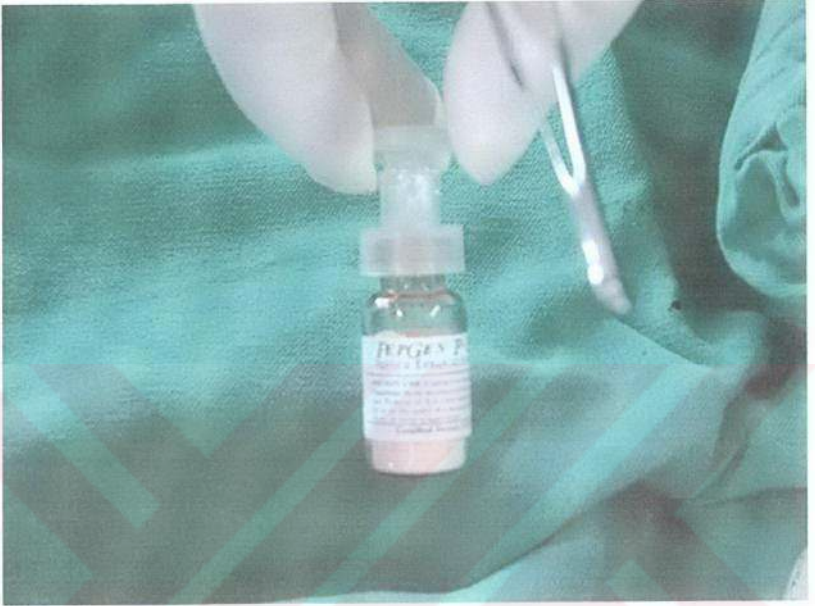
Şekil 10: ABM/ P-15 Flow (Jel formu) preparat



Şekil 11: ABM/ P-15 Flow' un osteotomi hattına uygulanması



Şekil 12: ABM/ P-15 Flow[®] un ostetomi hattına uygulanması sonrası görünüm



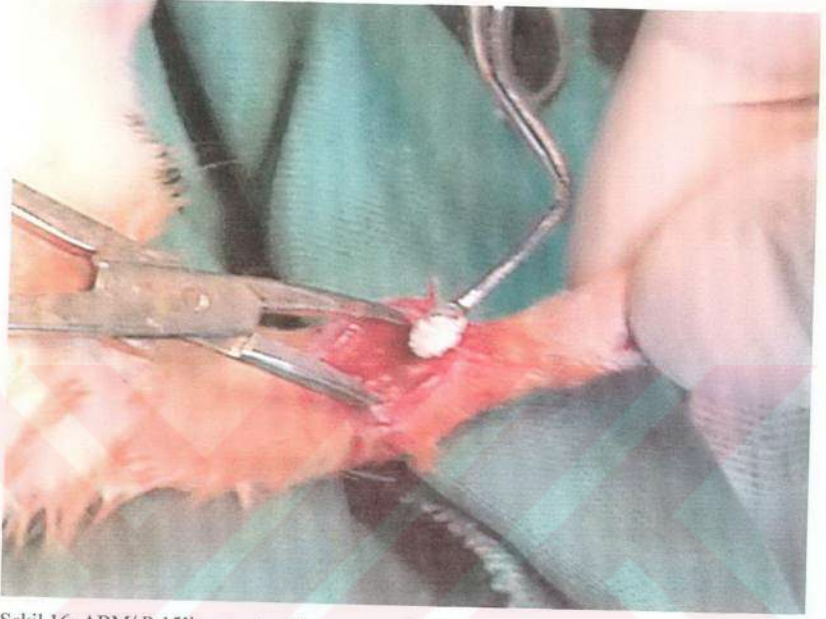
Şekil 13: ABM/ P-15 (Toz Formu) preparat



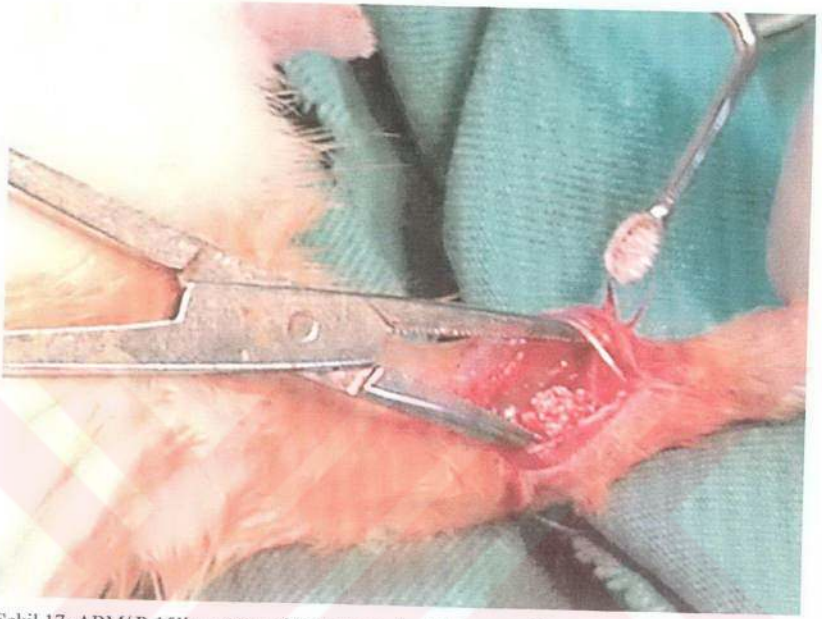
Şekil 14: ABM/ P-15 (Toz Formu) hazırlanışı



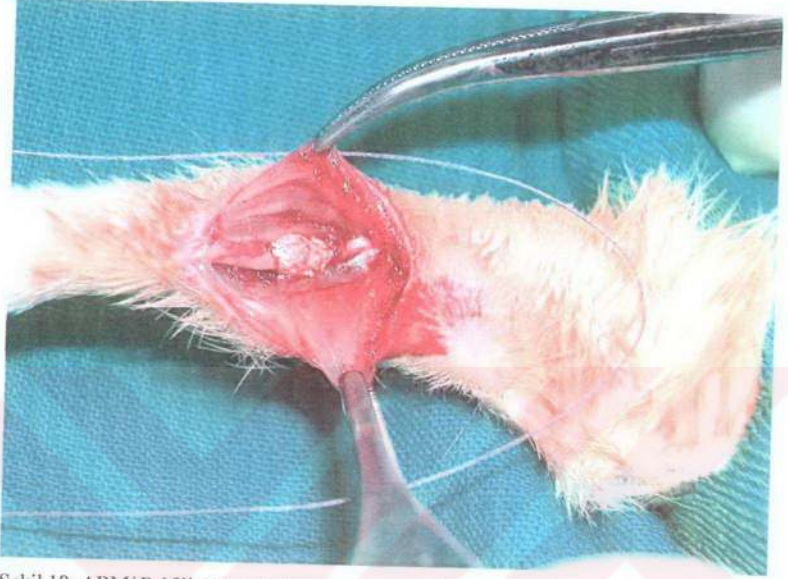
Şekil 15: ABM/ P-15* in radiustaki osteotomi hattına uygulanışı



Şekil 16: ABM/ P-15'in osteotomi hattına uygulandığı



Şekil 17: ABM/P-15'in osteotomi hattına uygulandıktan sonraki görünüm



Şekil 18: ABM/ P-15'in osteotomi hattına uygulandıktan sonraki görünüm



Şekil 19: Cerrahi işlem bittikten sonra cilt-ciltaltının primer olarak kapatılması

BULGULAR:

Radyolojik Değerlendirme Bulguları

On haftalık kırık iyileşme süresi sonunda deneklerin ön-arka direkt radyografileri çekildi (Şekil 20-22). Radyolojik değerlendirme; daha önce Cook ve arkadaşları tarafından tarif edilen radyolojik değerlendirme tablosu kullanılarak yapıldı. Kruskal-Wallis' e göre yapılan istatistiksel incelemeye göre her üç grup arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$). Mann Whitney U testine göre; grup 1-3 arasında ($p<0,001$), grup 2-3 arasında ($p<0,001$) ve grup 1-2 arasında ($p=0,011$) radyolojik olarak anlamlı fark bulunmuştur. Grup 1 ve 2 ile grup 3 (kontrol grubu) karşılaştırıldığında radyolojik olarak kaynamanın olduğu görülmüştür. Grup 1 ve 2 kendi aralarında karşılaştırıldıkları zaman grup 2'de radyolojik olarak kaynamanın daha iyi olarak izlendiği görülmüştür. (Tablo 8)

Histolojik Değerlendirme Bulguları

Işık mikroskopisi incelemesi sonucunda yapılan derecelendirmeden elde edilen veriler istatistiksel olarak incelendi.

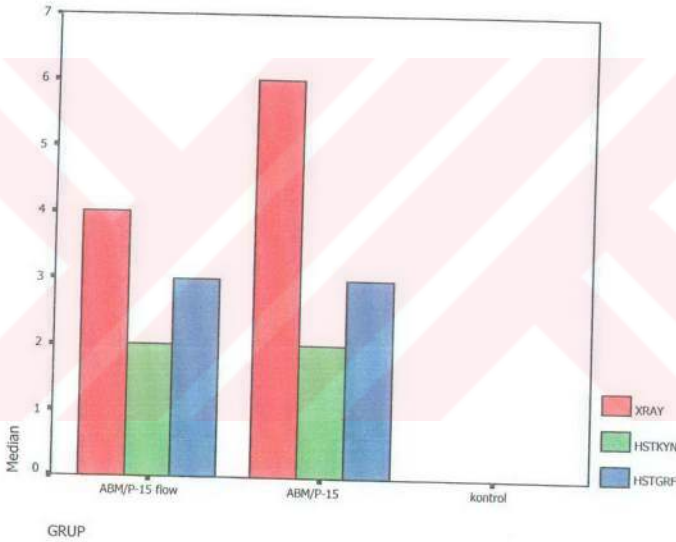
Kaynama kalitesi esas alınarak yapılan değerlendirmede grup 1-2 arasında fark bulunmamıştır ($p=0,247$). Grup 1-3 arasında ($p<0,001$) ve grup 2-3 arasında ($p<0,001$) fark bulunmuştur. Grup 1 ve 2'de kontrol grubu ile karşılaştırıldıkları zaman histolojik olarak kaynama görülmüştür. (Tablo 8)

Kemik grefti inkooperasyonu ve yeni kemik oluşumu esas alınarak yapılan değerlendirmede grup 1-2 arasında fark bulunmamış ($p=0,852$), grup 1-3 arasında fark bulunmuş ($p=0,003$) ve grup 2-3 arasında fark bulunmuştur ($p<0,001$). Grup 1 ve 2'de kontrol grubu ile karşılaştırıldıkları zaman histolojik olarak grefti inkooperasyonu ve yeni kemik oluşumu görülmüştür. (Tablo 8)

Grup 1 ve grup 2'de osteotomi hattında kallus formasyonu, yer yer mineralizasyonun olduğu görülmüştür. Özellikle grup 2'de belirgin olmak üzere osteoblastik aktivite artışı izlenmiştir.(Şekil 24-26)

Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları:

On haftalık takip süresi sonrası denekler feda edilmeden önce alınan kan örneklerinde alkalen fosfataz düzeyi çalışılmıştır. Grup 1'de ortalama kan ALP düzeyi 296,38 IU/L, grup 2'de ortalama kan ALP düzeyi 290,75 IU/L ve grup 3' de ortalama kan ALP düzeyi 290,75 IU/L olarak saptanmıştır. Her üç grupta da alkalen fosfataz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. ($p>0,005$) (Tablo 9)



Tablo 8: Grupların radyografi, histolojik kaynama kalitesi ve “kemik greft inkooperasyonu ve yeni kemik oluşumu” na göre karşılaştırılması

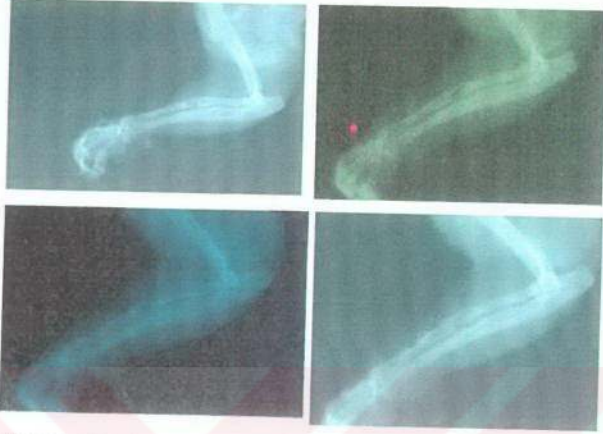
XRAY: radyolojik derecelendirme

HSTKYN: histolojik kaynama kalitesi

HSTGRF: histolojik kemik greft inkooperasyonu ve yeni kemik oluşumu



Tablo 9: Grupların ortalama ALP düzeylerine göre karşılaştırılması



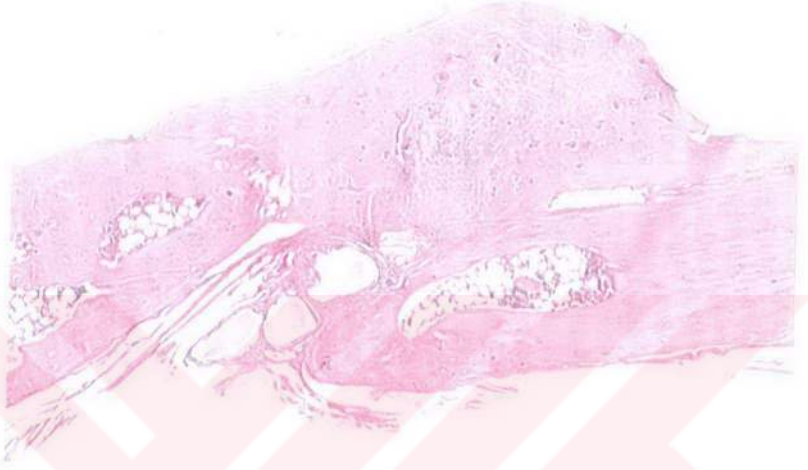
Şekil 20: ABM/ P-15 Flow uygulanan deneklerin (grup1) operasyon sonrası 10. hafta radyografileri



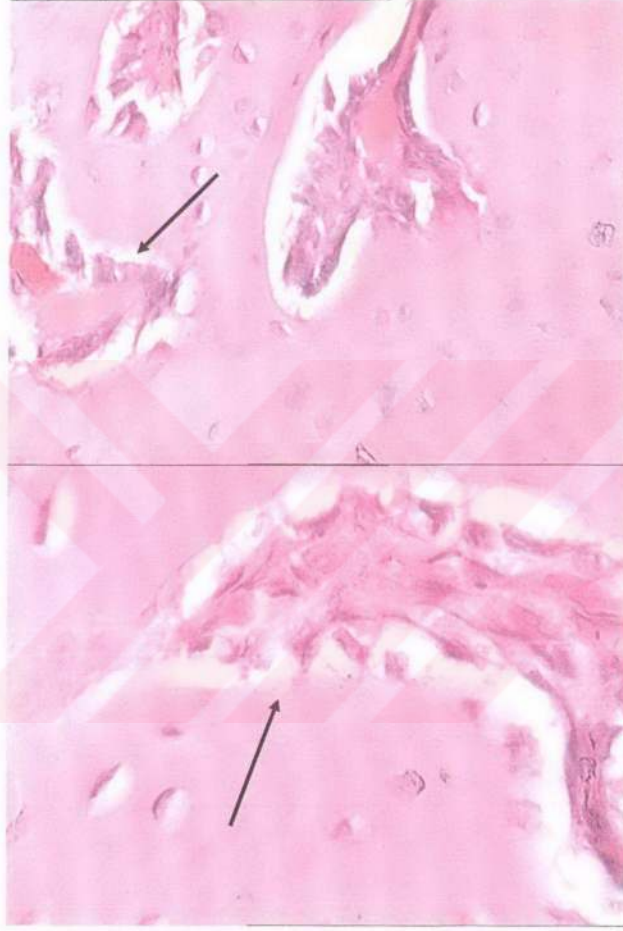
Şekil 21: ABM/ P-15 uygulanan deneklerin (grup 2) operasyon sonrası 10. hafta radyografileri



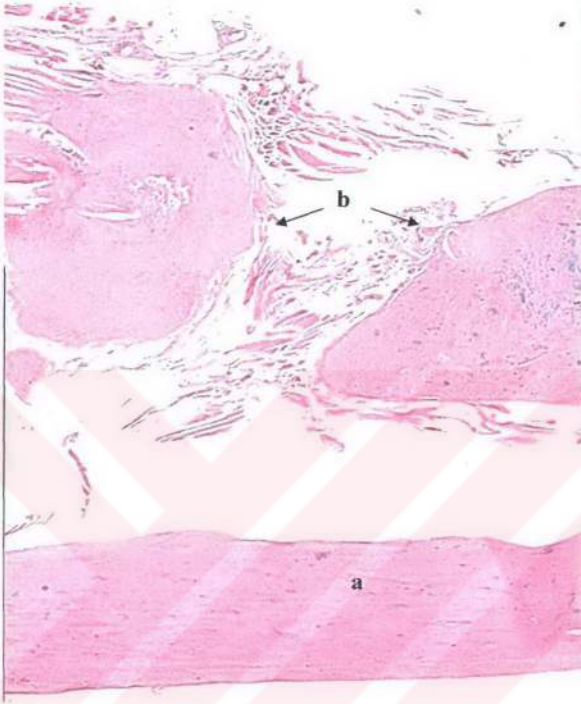
Şekil 22: Kontrol grubundaki (grup 3) deneklerin operasyon sonrası 10. hafta radyografileri



Şekil 23: Osteotomi hattında osteoblast sayısında artma ve kallus oluşumu, Grup 1, hematoksilen eosin X 12,5



Şekil 24: Grup 2'de ABM/P-15 çevresinde grup 1'e göre artmış osteoblastik aktivite, hematoxilen eosin X 400



Şekil 25: Kontrol grubunda (Grup 3) kaynama göstermeyen osteotomi hattı, hematoxilen eosin X 12,5

a : Ulna

b: Radiusa uygulanan osteotomi hattı

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik greftlemeleri, ortopedik cerrahi girişimler arasında sık yapılan uygulamalardandır. Yurdumuzun kaynakları göz önüne alındığında otogreft kullanımı altın standart olarak önemini korumaktadır. Bununla beraber uygun vakalarda kemik greftlerinin yerini tutabilecek ajanların klinik kullanımı her geçen gün yaygınlaşmaktadır. Önemli olan uygun vakalarda ve uygun endikasyonlarda greft materyallerinin kullanımıdır.

Ortopedik cerrahide kemik grefti veya kemik greftlerinin yerini tutabilecek materyallerin seçimi cerrahın seçimine bağlıdır. İlk olarak göz önünde bulundurulması gereken unsur cerrahi uygulanan sahanın özelliklerine göre yeni kemik oluşumunun güçlüğüne derecesinin belirlenmesidir. İkinci olarak akılda tutulması gereken doku kültürlerinde ve hayvan deneylerinde başarılı sonuçlar veren bir ajanın insanlar üzerinde uygulandığı zaman aynı olumlu sonuçları verip veremeyeceğidir. Üçüncü olarak akılda tutulması gereken DBM, otolog büyüme faktörleri gibi ajanların hücre ve dokulara minimal manipülasyonlar yapılarak elde edildiğidir. Bu maddelerin güvenilirliğini ve yararlılığını belirten bir standart bulunmamaktadır. Bu yüzden insan uygulamalarında hayvan modellerinde saptanmayan beklenmedik sonuçlar görülebilir.^{28,57}

Klinik çalışmalara göre fazla sayıda denek kullanılabilmesi, maliyetin düşüklüğü, etik sorunların ve gruplar arasındaki değişkenliğin az olması nedeniyle deneysel hayvan modelleri kırık iyileşme modellerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Potansiyel greft materyallerinin kırık iyileşmesine etkisinin araştırılmasında, hayvanlarda iskelet defekt modeli temel araçtır.^{20,45,46,53,65,73} Bu çalışmada, anatomik yapılarının cerrahi girişim ve inceleme için uygun olması ve maliyetin düşük olması nedeniyle deney hayvanı olarak ratlar kullanıldı. Ratların bir önkollarından radius diafiz çapının iki katından fazla olacak şekilde segment çıkartılmış ve serbest bırakılmıştır. Benzer deney modellerinde de uygulandığı gibi ulna ve interosseöz membran sağlam olması nedeniyle herhangi bir internal fiksasyona gerek duyulmamıştır.^{10,16,17,26,29,45,52,54,61,85} Ratlar cerrahi işlem sonrası herhangi bir tesbit uygulanmadan serbest bırakılmıştır. Bu sayede cerrahi işlem basitleştirilerek süre kısaltılmış ve maliyet azaltılmıştır. Ayrıca ek olarak fiksasyon

materyali uygulanmaması nedeniyle enfeksiyon riski de azaltılmıştır. Ratların ameliyat sonrası kollarını kullanmaları nedeniyle bakım ve beslenme gereksinimleri azalmıştır.

Periodontal defektler için geliştirilen ABM/P-15 ile birçok klinik çalışma yapılmıştır. Yukna ve arkadaşları yaptıkları klinik çalışmada, periodontal kemik defekti bulunan 31 hastayı ABM/P-15, demineralize kurutulup dondurulmuş kemik allogrefti ve açık flep debridmanı uygulanan üç gruba ayırmışlardır. ABM/P-15 uygulanan grupta defektlerin daha iyi dolduğu ve klinik olarak daha iyi sonuç elde edildiği belirtilmiştir.⁸⁷ Yukna ve arkadaşları yaptıkları diğer bir klinik çalışmada, periodontal kemik defekti bulunan 33 hastayı iki gruba ayırmışlardır. Bir grupta sadece ABM ve diğer grupta ABM/P-15 kombinasyonu kullanmışlardır. Defektlerin dolması değerlendirilerek elde edilen sonuçlarda, ABM/P-15 kombinasyonu ile tek başına ABM uygulamalarına göre daha iyi klinik yanıt elde edildiği belirtilmiştir.⁸⁸

Yapılan incelemelerde ABM/P-15'in, alveolar kemik defektlerin uzun dönem klinik takiplerinde yararlı etkisi olduğu belirtilmiştir.⁸⁹ Alveolar kemiklere ABM/P-15 uygulanması sonrası yapılan biyopsilerin histolojik olarak incelenmesi sonucunda osteojenik hücrelerde artış ve tam olarak damarlanma izlenmiştir.^{77,86} Sekiz yıl önce periodontal kemik defektine ABM/P-15 uygulanan bir olgunun takibinde yerleştirilen implantların klinik ve radyolojik olarak stabilitesini koruduğu gösterilmiştir.³⁰

Krauser ve arkadaşları maksiller sinus elevasyonu sonrası bir hastaya önce anorganik sığır kemik minerali ve demineralize dondurulup kurutulmuş kemik allogrefti kombinasyonu ve daha sonra ABM/P-15 uygulamışlardır. ABM/P-15 uyguladıktan sonra diğer yöntemlere göre radyolojik, histolojik ve histomorfometrik olarak daha kısa süre içerisinde kemik oluşumu izlenmiştir.⁴²

ABM/P-15'in biyouyumlu hidrojel formu ve toz formu bulunmaktadır. Karboksimetilselüloz ve gliserolden oluşan bu hidrojel, partiküllerin arasını düzgün olarak doldurur ve hücrelerin P-15 hücre bağlayıcı alanlara doğru ilerlemelerini sağlar. Hahn ve arkadaşları iki adet periodontal kemik defekti olan hastada bir defekte ABM/P-15 ve diğerine ABM/P-15 Flow (Jel formu) uygulamışlardır. Sonuç olarak ABM/P-15 flow'un

daha hızlı kemik oluşumunu sağladığı gösterilmiştir.^{31,51} Bizim yaptığımız deneysel çalışmada ise ABM/P-15 toz formunda osteoblastik aktivitede artış izlenmiştir.

Kübler ve arkadaşlarının insan kemik dokusu hücre kültüründe yaptıkları çalışmada beş farklı kemik greft materyalini karşılaştırmışlardır. Bu materyaller fitojen hidroksiapatit, α - trikalsiyum fosfat, düşük ısıda elde edilen sığır kaynaklı hidroksiapatit, yüksek ısıda elde edilen sığır kaynaklı hidroksiapatit ve yüksek ısıda elde edilen sığır kaynaklı hidroksiapatit ve P-15 kombinasyonudur (ABM/ P-15). Farklı materyallerin osteoblastların üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücre proliferasyonu ve varlığı alkalen fosfataz düzeyine bakılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca doku kültürleri ışık ve elektron mikroskobu ile incelenmiştir. ABM/P-15 bu materyaller arasında en fazla hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını oluşturmuştur. Bu maddeden sonra en etkili greft materyali olarak yüksek ısıda elde edilen sığır kaynaklı hidroksiapatit (Osteograf) bulunmuştur.^{43,64}

İnorganik kemik matriksiyle birleştirilmiş sentetik hücre bağlanma polipeptidi (P-15) ile yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda maddenin çoğunlukla periodontolojide yapılan cerrahi uygulamalar sırasında kullanılmaları nedeniyle alveoler kemik üzerinedir. Bugüne kadar, bir çalışmada kortikal kemik kayıplarında ABM/P-15'in yeri vurgulanmıştır.⁶⁰ Bu çalışmada tavşanlarda kortikal kemik defektlerinde hücre bağlayıcı peptidin iyileşmeye etkisini histolojik olarak inceleyen bir çalışmada beş tavşanda yirmi adet 8 mm'lik defekt oluşturulmuş. 8 defekt ABM/P-15 toz formuyla ve 8 defekt ABM/P-15 Flow ile doldurulmuştur. 4 defekt de kontrol grubu olarak boş bırakılmıştır. Histolojik inceleme sonunda yapılan istatistiksel değerlendirmede her iki grupta yeni kemik oluşumu yönünden kontrol grubuna göre farklılıklar olduğu vurgulanmıştır. ABM/P-15 Flow uygulanan grupta ise ABM/P-15 uygulanan gruba göre daha az kemik oluşumu saptanmıştır.⁶⁰

İnsan hücre kültürü çalışmalarında etken maddenin uygulanması sonrası Alizarin Red S ile histolojik boyama yapılmış ve mineralizasyonu gösterecek şekilde pozitif boyanma elde edilmiştir. P-15 uygulanan kültürlerde yapılan northern blot, PCR ve western blot testlerinde osteojenik proliferasyonu gösteren alkalen fosfataz, TGF-B-1, tip 1 kollajen osteokalsin ve osteonektin düzeylerinin belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Bu da etken maddenin kırık iyileşmesini hızlandırıcı etkisini göstermektedir.^{6-8,72}

Periodontal tedavide P-15'in uygulandığı klinik çalışmalarda kısa ve uzun dönem takiplerde implant çevresinde yapılan radyolojik incelemelerde radyoopasite saptanmış ve bunun yeni kemik oluşumunu gösterdiği belirtilmiştir. Yaptığımız deneysel çalışmada denek sayısı artırılarak ve radyolojik inceleme sonrası derecelendirme yapılarak P-15'in etkinliği gösterilmiştir.

Uyguladığımız deney modelinde ortaya çıkan verilere dayanarak şu çıkarımları elde ettik:

1. Radyolojik değerlendirme kriterlerine göre evrelendirildiğinde Grup 1 (ABM/P-15 Flow) ve grup 2 (ABM/P-15) ile kontrol grubuna göre kaynamanın olduğu izlenmiş ve istatistiksel olarak gösterilmiştir.. Buna göre her iki etken maddenin segmenter kemik kaybı sonrası kemik iyileşmesi üzerine etkili oldukları sonucuna varılabilir. Bunun yanında grup 1 ve 2 kendi aralarında karşılaştırıldıkları zaman kırık iyileşmesi açısından radyolojik olarak grup 2'nin daha iyi kaynakıldığı istatistiksel olarak gösterilmiştir.
2. Histolojik değerlendirmeler sonucunda grup 1 ve grup 2' de kontrol grubuna göre belirgin olarak kırık iyileşmesinin daha iyi olduğu istatistiksel olarak görülmektedir. Ayrıca osteotomi alanında osteoblastik proliferasyonun ABM/P-15 uygulanan grupta daha belirgin olduğu saptanmıştır. Bundan yola çıkarak ABM/P-15'in ABM/P-15 Flow'a göre segmenter kortikal kemik kayıplarında daha iyi bir greft seçeneği olacağı sonucuna varılabilir.
3. On haftalık takip süresi sonrası denekler feda edilmeden önce alınan kan örneklerinde alkalin fosfataz (ALP) düzeyi çalışılmıştır. Kontrol grubunda ALP düzeyi istatistiksel olarak fazla Her üç grupta da alkalin fosfataz düzeyleri arasında farklılık bulunamamıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak Kan serum ALP düzeyinin kırık iyileşmesinin gelişimi ile ilişkilendirilemeyeceği düşünülebilir. Yapılan klinik çalışmalarda da kan ALP düzeyi ile kırık iyileşmesinin progresyonu arasında bir ilişkili olmadığı vurgulanmıştır.⁶⁴

Sonuç olarak ABM/P-15 ve ABM/P-15 Flow oluşturulan segmenter kortikal kemik defektlerinde özellikle periferde yeni kemik oluşumunu sağlamışlardır. Bu radyolojik ve

histolojik olarak izlenmektedir. ABM/P-15' de diğ er maddeye g ore daha fazla osteojenik proliferasyon g or lm  st ur. Periodontal defektlerde yapılan çalışmalarda bunun tersi olarak ABM/P-15 Flow' da daha fazla iyileşme g or lm  st ur. Bu  alışma ile P-15'in formlarının etkinliği arasındaki farklılığa değişik bir bakış açısı getirilmiştir. Yine diğ er deneysel çalışmalardan farklı olarak histolojik ve radyolojik değerlendirmeyi birleştirmesi ile bu etken madde üzerinde yapılan çalışmalara önemli bir katkı sağlanmıştır. Periodontal defektlerde sıkça kullanılan sentetik hücre bağlanma polipeptid (P-15); kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkisi, immunojenik özelliğinin olmaması, enfeksiyon taşınma riskinin olmaması ve kolay elde edilmesi nedeniyle önümüzdeki yıllarda ortopedik cerrahide önemli yer bulabilecektir.



ÖZET

Amaç: Bu çalışmada ratların radiuslarında oluşturulan segmenter kortikal kemik defektlerinde “İnorganik kemik matriksiyle birleştirilmiş sentetik hücre bağlanma polipeptidi (P-15)” greft materyalinin iyileşmeye etkisinin radyolojik, histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Toplam 36 adet rat 13/ 12/11 adet olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Tüm gruplardaki deneklerin bir önkollarında radiuslarına diafiz çapının iki katı olacak şekilde osteotomi uygulandı. 13 defekt ABM/ P-15 Flow (macun formu) ve 12 defekt ABM/ P-15 ile dolduruldu. 11 defekt ise kontrol grubu olarak boş bırakıldı. Cerrahi girişim sonrası 10. haftada denekler feda edilerek radyolojik ve histolojik değerlendirmeler yapıldı. Radyolojik olarak direkt radyografilere faydalanıldı. Materyallere dekalsifikasyon işlemi uygulandıktan sonra ışık mikroskopisi ile histolojik değerlendirme yapıldı. Deneklerden alınan kan serumlarında serum alkalen fosfataz düzeyleri biyokimyasal olarak çalışıldı.

Bulgular: Yapılan radyolojik ve histolojik incelemeler sonucunda yapılan istatistiksel değerlendirmeler ile ABM/ P-15 Flow ve ABM/ P-15 uygulanan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman segmenter kemik kayıplarının iyileştiği görüldü ($p<0,005$). Aynı zamanda ABM/ P-15 uygulanan grupta radyolojik olarak iyileşmenin ABM/ P-15 Flow uygulanan gruba göre daha iyi olduğu gözlemlendi ($p=0,011$); ancak histolojik olarak istatistiksel farklılık saptanmadı. Bununla birlikte ABM/P-15’in uygulandığı sahada ABM/ P-15 Flow’a göre osteojenik proliferasyonun daha fazla arttırdığı görüldü. Kan ALP düzeyleri arasında her üç grupta da farklılık görülmedi.

Sonuç: Çalışma sonunda “İnorganik kemik matriksiyle birleştirilmiş sentetik hücre bağlanma polipeptidi (P-15)” greft materyalinin segmenter kortikal kemik kayıplarının iyileşmesinde etkili olduğu radyolojik ve histolojik değerlendirmeler sonucunda görülmüştür.

KAYNAKLAR:

1. Ail, Y.; Springer, I. N.; Broek, V.; Terheyden, H.; and Jepsen, S.: Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. *J Cell Biochem*, 86(1): 90-8, 2002.
2. Albee, F.: Bone graft surgery. *Clin Orthop*, 1(324): 5-12, 1996.
3. Arrington, E.; Smith, W.; Chambers, H.; Bucknell, A.; and Davino, N.: Complications of Iliac Crest Bone Graft Harvesting. *Clin Orthop*, 1(329): 300-309, 1996.
4. Bauer, T., and Muschler, G. F.: Bone Graft Materials: An overview of the Basic Science. *Clin Orthop*, 1(371): 10-27, 2000.
5. Betz, R.: Limitations of Autograft and Allograft: New Synthetic Solutions. *Orthopedics*, May 25(5 suppl), 2002.
6. Bhatnagar, R. S.; Qian, J. J.; Wedrychowska, A.; Dixon, E.; and Smith, N.: Biomimetic habitats for cells: Ordered matrix deposition and differentiation in fibroblasts cultured on hydroxyapatite coated with a collagen analogue. *Cells and Materials*, 9(2): 93- 104, 1999.
7. Bhatnagar, R. S.; Qian, J. J.; Wedrychowska, A.; Sadeghi, M.; Wu, Y. M.; and Smith, N.: Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng*, 5(1): 53-65, 1999.
8. Bhatnagar, R. S.; Qian, J. J.; Wedrychowska, A.; and Smith, N.: Construction of biomimetic environments with a synthetic peptide analogue of collagen. *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 530: 43- 54, 1998.
9. Boden, S. D.; Zdeblick, T. A.; Sandhu, H. S.; and Heim, S. E.: The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine*, 25(3): 376-381, 2000.
10. Bostrom, M.; Lane, J.; Tomin, E.; Browne, M.; Berberian, W.; Turek, T.; Smith, J.; Wozney, J.; and Schildhauer, T.: Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop*, 327: 272-82, 1996.
11. Bostrom, M.; Yang, X.; Kennan, M.; Sandhu, H.; Dicarlo, E.; and Lane, J.: An unexpected outcome during testing of commercially available demineralized bone graft materials: how safe are the nonallograft components? *Spine*, 26(13): 1425-8, 2001.
12. Brighton, C., and Hunt, R.: Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg*, 73-A(6): 832-847, 1991.
13. Burchardt, H.: The biology of bone graft repair. *Clin Orthop*, 174: 28-42, 1983.
14. Buttermann, G.; Glazer, P.; and Bradford, D.: The use of bone allografts in the spine. *Clin Orthop*, 1(324): 75-85, 1996.
15. Caffesse, R. G.; de la Rosa, M.; and Mota, L. F.: Regeneration of soft and hard tissue periodontal defects. *Am J Dent*, 15(5): 339-45, 2002.
16. Cook, S.; Baffes, G.; Wolfe, M.; Sampath, T.; and Rueger, D.: Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop*, 301: 302-312, 1994.
17. Cook, S.; Baffes, G.; Wolfe, M.; Sampath, T.; Rueger, D.; and Whitecloud, T.: The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg*, 76-A: 827-38, 1994.

18. **Cornu, O.; Libouton, X.; Naets, B.; Godts, B.; Van Tomme, J.; Delloye, C.; and Banse, X.:** Freeze-dried irradiated bone brittleness improves compactness in an impaction bone grafting model. *Acta Orthop Scand*, 75(3): 309-14, 2004.
19. **Dickman, C. A.:** Osteoinductive Demineralized Bone: What's the Risk? *Spine*, 26(13): 1409-1410, 2001.
20. **Einhorn, T.; Lane, J.; Burstein, A.; Kopman, C.; and Vigorita, V.:** The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg*, 66-A: 274-9, 1984.
21. **Einhorn, T. A.:** The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop*, 355 S: S7-21, 1998.
22. **Fideler, B.; Vangsness, C. J.; Moore, T.; Li, Z.; and Rasheed, S.:** Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. A study in frozen human bone-patellar ligament-bone grafts obtained from infected cadavera. *J Bone Joint Surg*, 76-A(7): 1032-5, 1994.
23. **Finkemeier, C.:** Bone-grafting and bone -graft substitutes. *J Bone Joint Surg*, 84-A(3): 454-464, 2002.
24. **Firica, A.; Negruoiu, M.; and Laptoiu, D.:** Stable elastic osteosynthesis. *European Instructional Course Lectures*, 6: 39-47, 2003.
25. **Fleming, J. E.; Cornell, C.; and Muschler, G. F.:** Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am*, 31(3): 357-371, 2000.
26. **Gepstein, R.; Weiss, R.; and 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*, 69-A: 984-92, 1987.
27. **Glowacki, J.:** Cellular interactions to bone- derived material. *Clin Orthop*, 1(324): 47-54, 1996.
28. **Greenwald, A. S.; Boden, S. D.; Goldberg, V. M.; Khan, Y.; Laurencin, C. T.; Rosier, R. N.; and Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. J Bone Joint Surg**, 83-A Suppl 2 Pt 2: 98-103, 2001.
29. **Grundel, R.; Chapman, M.; Yee, T.; and Moore, D.:** Autogeneic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna. *Clin Orthop*, 266: 244-58, 1991.
30. **Hahn, J.:** 8-year onlay bone graft and ridge augmentation with pepgen p-15: a clinical and radiographic case study. *Implant Dent*, 13(3): 228-231, 2004.
31. **Hahn, J.; Rohrer, M. D.; and Tofe, A. J.:** Clinical, radiographic, histologic, and histomorphometric comparison of PepGen P-15 particulate and PepGen P-15 flow in extraction sockets: a same-mouth case study. *Implant Dentistry*, 12(2): 170-4, 2003.
32. **Hanks, T., and Atkinson, B.:** Comparison of cell viability on anorganic bone matrix with or without P-15 cell binding peptide. *Biomaterials*, 25: 4831-4836, 2004.
33. **Heckman, J. D.; Ehler, H.; Brooks, B.; Aufdemorte, T.; Lohman, C.; and Morgan, T.:** Bone morphogenic protein but not transforming growth factor β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg*, 81-A: 1717-39, 1999.
34. **Hu, X.; Yao, L.; Lu, C.; Wang, S.; and Chen, Y.:** Experimental and cilinical investigations of human insoluble bone matrix gelatin. A report of 24 cases. *Clin Orthop*, 293: 360-5, 1993.

35. **Iwata, H.; Sakano, S.; Itoh, T.; and Bauer, T.:** Demineralized bone matrix and native bone morphogenic protein in orthopedic surgery. *Clin Orthop*, 395: 99-109, 2002.
36. **Johnson, E.; Urist, M.; and Finerman, G.:** 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 autolyzed, antigen-extracted, allogenic (AAA) bone. *Clin Orthop*, 277: 229-37, 1992.
37. **Johnson KD; Frierson KE; and Keller TS, e. a.:** Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: A biomechanical, histological and radiographic analysis. *J Orthop Res.*, 14: 351-369, 1996.
38. **Kalfas, I.:** Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*, 10(4): 1-5, 2001.
39. **Kelly, C.; Wilkins, R.; Gitelis, S.; Hartjen, C.; Watson, T.; and Kim, P.:** The use of a surgical grade calcium sulphate as a bone graft substitute. *Clin Orthop*, 382: 42-50, 2001.
40. **Khan, S.; MP., B.; and Lane, J.:** Bone growth factors. *Orthop Clin North Am*, 31(3): 375-386, 2000.
41. **Khan, S. N.; Tomin, E.; and Lane, J. M.:** Clinical applications of bone graft substitutes. *The Orthopedic Clinics of North America*, 31(3): 389-98, 2000.
42. **Krauser, J. T.; Rohrer, M. D.; and Wallace, S. S.:** Human histologic and histomorphometric analysis comparing OsteoGraf/N with PepGen P-15 in the maxillary sinus elevation procedure: a case report. *Implant Dentistry*, 9(4): 298-302, 2000.
43. **Kübler, A.; Neugebauer, J.; Oh, J.; Scheer, M.; and Zöller, J.:** Growth and Proliferation of Human Osteoblasts on Different Bone Graft Substitutes An In Vitro Study. *Implant Dent*, 13(2): 171-77, 2204.
44. **Lallier, T. E.; Yukna, R.; St Marie, S.; and Moses, R.:** The putative collagen binding peptide hastens periodontal ligament cell attachment to bone replacement graft materials. *J Periodontol*, 72(8): 990-7, 2001.
45. **Lane, J. M., and Sandhu, H.:** Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*, 18(2): 213-225, 1987.
46. **Lee, J.; Musgrave, D.; Pelinkovic, D.; and et.al:** Effect of bone morphogenic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical size bone defects in mice. *J Bone Joint Surg*, 83-A(7): 1032-39, 2001.
47. **Miller, M.:** Review of Orthopaedics. Edited, 1-19, W.B Saunders, 2004.
48. **Moore, W.; Graves, S.; and Bain, G.:** Synthetic Bone Graft Substitutes. *ANZ J.Surg.*, 71: 354-61, 2001.
49. **Nash, T. J.; Howlett, C. R.; Martin, C.; Steele, J.; Johnson, K. A.; and Kicklin, D. J.:** Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone*, 15: 203-8, 1994.
50. **Nather, A.; Thambbyah, A.; and Goh, J.:** Biomechanical strength of deep-frozen versus lyophilized large cortical allografts. *Clinical Biomechanics*, 19: 526-533, 2004.
51. **Nguyen, H.; Qian, J. J.; Bhatnagar, R. S.; and Li, S.:** Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochem Biophys Res Commun*, 311(1): 179-86, 2003.
52. **Nielsen, F.; Karring, T.; and Gogolewski, S.:** Biodegradable guide for bone regeneration. *Acta Orthop Scand.*, 63(1): 66-69, 1992.

53. **Nunamaker, D. M.:** Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop*, 355S: 56-65, 1998.
54. **Nyman, R.; Magnusson, M.; Sennerby, L.; Nyman, S.; and Lundgren, D.:** Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. *Acta Orthop Scand*, 66: 169-73, 1995.
55. **Parikh, S.:** Bone graft substitutes: past, present, future. *Postgrad Med.J*, Apr-Jun;48(2): 142-8, 2002.
56. **Pelker, R., and Friedlander, G.:** Biomechanical aspects of autografts and allografts. *Orthop Clin North Am*, 18(2): 235-239, 1987.
57. **Petruskevicius, J.; Nielsen, S.; Kaalund, S.; Knudsen, P.; and Overaard, S.:** No effect of osteoset, a bone frafit substitute, on bone healing in humans. *Acta Orthop Scand.*, 73(5): 575-578, 2002.
58. **Qian, J. J., and Bhatnagar, R. S.:** Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res*, 31(4): 545-54, 1996.
59. **Salkeld, S. L.; Patron, L. P.; Barrack, R. L.; and Cook, S. D.:** The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg*, 83-A(6): 803-16, 2001.
60. **Scarano, A.; Iezzi, G.; Petrone, G.; Orsini, G.; Degidi, M.; Strocchi, R.; and Piattelli, A.:** Cortical bone regeneration with a synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric pilot study. *Implant Dent*, 12(4): 318-24, 2003.
61. **Solheim, E.; Pinholt, E.; Andersen, R.; Bang, G.; and Sudmann, E.:** The effect of a composite of polyorthoester and demineralized bone on the healing of large segmental defects of the radius in rats. *J Bone Joint Surg*, 74-A: 1456-63, 1992.
62. **Swenson, C., and Arnoczky, S.:** Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg*, 85-A(2): 323-32, 2003.
63. **Szpalski, M., and Gunzburg, R.:** Applications of calcium phosphate-based cancellous bone fillers in trauma surgery. *Orthopedics*, 25(5): 601-609, 2002.
64. **Taniguchi, T.; Matsumoto, T.; and Shindo, H.:** Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, IGF-I and IGF-binding protein-3 during fracture healing. *Injury*, 34: 477- 479, 2003.
65. **Tiedeman, J.; Connolly, J.; Strates, B.; and Lippiello, L.:** Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clin Orthop*, 268: 294-302, 1991.
66. **Tiedeman, J.; Lippiello, L.; Connolly, J.; and Strates, B.:** Quantitative roentgenographic densitometry for assessing fracture healing. *Clin Orthop*, 253: 279-286, 1990.
67. **Tiedemann, J.; Garvin, K.; Kile, T.; and Connolly, J.:** The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics*, 18: 1153-8, 1995.
68. **Tomford, W.; Mankin, H.; Friedlander, G.; Dopplet, S.; and Gebhart, M.:** Methods of banking bone and cartilage for allograft transplantation. *Orthop Clin North Am*, 18(2): 241-247, 1987.
69. **Tomford WW; Starkweather RJ; and MH., G.:** A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *J Bone Joint Surg Am.*, 63(2): 244-8, 1981.

70. **Tomford WW, T. J., Mankin HJ, Ferraro MJ.:** Frozen musculoskeletal allografts. A study of the clinical incidence and causes of infection associated with their use. *J Bone Joint Surg Am.*, 72(8): 1137-43, 1990.
71. **Troum, S., and Dalton Jr., M.:** Osteogenesis in a rat model: use of bone marrow cells and biodegradable gelatin matrix carrier. *Journal of the southern orthopedic association*, 10(1): 37-43, 2001.
72. **Turhani, D. et al.:** Nachweis der osteokalzinexpression osteoblastärer zellen mandibularen ursprungs, wachsend auf biomaterialien, mittels RT-PCR und SDS-PAGE/ western blotting. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 7(5): 294-300, 2003.
73. **Utvag, S.; Grundnes, O.; and Reikernas, O.:** Healing of segmental and simple fractures in rats. *Acta Orthop Scand.*, 65(5): 559-63, 1994.
74. **Vacanti, C., and Vacanti, J.:** The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am*, 31(3): 351-355, 2000.
75. **Vaccaro, A. et al.:** Contemporary Concepts In Spine Care Bone grafting alternatives in spinal surgery. *The Spine Journal*, 2: 206-215, 2002.
76. **Vaccaro, A. R.:** The Role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone Graft. *Orthopedics*, 25(5 suppl): 571-8, 2002.
77. **Valentin, A., and Weber, J.:** Receptor technology – cell binding to P-15: a new method of regenerating bone quickly and safely preliminary histomorphometrical and mechanical results in sinus floor augmentations. *Keio J Med*, 53(3): 166-171, 2004.
78. **Viggeswarapu AR; Boden SD; and Liu Y, e. a.:** Adenoviral delivery of LIM mineralization protein-1 induces new bone formation in vitro and invivo. *J Bone Joint Surg*, 83A: 364-76, 2001.
79. **Walters, S. P.; Greenwell, H.; Hill, M.; Drisko, C.; Pickman, K.; and Scheetz, J. P.:** Comparison of porous and non-porous teflon membranes plus a xenograft in the treatment of vertical osseous defects: a clinical reentry study. *J Periodontol*, 74(8): 1161-8, 2003.
80. **Wang JC; Kanim LE; Nagakawa IS; Yamane BH; Vinters HV; and EG., D.:** Dose-dependent toxicity of a commercially available demineralized bone matrix material. *Spine*, 26(13): 1429-35; discussion 1435-6., 2001.
81. **Webb, J. C. J., and Tricker, J.:** A review of fracture healing. *Current Orthopaedics*, 14: 457-463, 2000.
82. **Weinstein, S., and Buckwalter, J.:** Turek's Orthopedics Principles and Their Applications. Edited, 21-30, J.B Lippincott Company, 1994.
83. **Werntz JR; Lane JM; and C., P.:** The repair of segmental bone defects with collagen and marrow. *Orthop Trans*, 10: 262, 1986.
84. **Wozney, J., and Rosen, V.:** Bone morphogenic protein and bone morphogenic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop*, 346: 26-37, 1998.
85. **Yasko, A.; Lane, J.; Fellingner, E.; Rosen, V.; Wozney, J.; and Wang, E.:** The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenic protein (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg*, 74-A(5): 659-70, 1992.
86. **Yukna, R.; Salinas, T. J.; and Carr, R. F.:** Periodontal regeneration following use of ABM/P-1 5: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 22(2): 146-55, 2002.
87. **Yukna, R. A.; Callan, D. P.; Krauser, J. T.; Evans, G. H.; Aichelmann-Reidy, M. E.; Moore, K.; Cruz, R.; and Scott, J. B.:** Multi-center clinical evaluation of

- combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol*, 69(6): 655-63, 1998.
88. **Yukna, R. A.; Krauser, J. T.; Callan, D. P.; Evans, G. H.; Cruz, R.; and Martin, M.:** Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol*, 71(11): 1671-9, 2000.
89. **Yukna, R. A.; Krauser, J. T.; Callan, D. P.; Evans, G. H.; Cruz, R.; and Martin, M.:** Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *J Periodontol*, 73(1): 123-8, 2002.
90. **Zerwekh JE; Kouros S; Scheinberg R; Kitano T; Edwards ML; Shin D; and DK., S.:** Fibrillar collagen-biphasic calcium phosphate composite as a bone graft substitute for spinal fusion. *J Orthop Res*, 10(4): 562-72, 1992.