

**T.C. GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI BAŐKANLIĐI**

132131

KEMİK DEFİKTLERİNİN KOMPOZİT BİYOMATERYALLERLE TAMİRİ

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

UZMANLIK TEZİ

132131

**Mehmet Taner ÖZDEMİR
Tbp.Yzb.**

ANKARA - 2003

ÖNSÖZ

“Kemik Defektlerinin Kompozit Biyomateryallerle Tamiri” konulu tez Gülhane Askeri Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığının 25.09.2001 tarih ve 0532-2001 sayılı yazısı ile verilmiştir.

Asistan olarak çalışmaktan gurur duyduğum GATA Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği’nde yetişmemde büyük katkıları olan sayın hocalarım Prof.Tbp.Alb. Mehmet ALTINMAKAS’a ve Prof.Tbp.Alb. Mustafa BAŞBOZKURT’a, tez danışman yardımcısı olan Prof. Dr. Vasıf HASIRCI’ya (ODTÜ Biyoteknoloji BD. Ankara) ihtisas sürem boyunca her konuda desteklerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof.Tbp.Tuğg. Ethem GÜR’e ve Prof.Tbp.Kd.Alb. Nuri GÜLTEKİN’e, Doç.Dz.Tbp.Alb. A.Sabri ATEŞALP’e, Doç.Dz.Tbp.Yb. Vecihi KIRDEMİR’e, Doç.Tbp.Yb. Kaan ERLER’e Doç.Tbp.Alb. Ali ŞEHİRLİOĞLU’na, Doç.Dz.Tbp.Yb. Servet TUNAY’a, bu tezin deneysel modelinin hazırlanmasında tecrübesini ve fikirsel desteğini esirgemeyen Emre TOMİN’e (Hospital for Special Surgery, New York, USA), cerrahi bilgi ve tecrübeleriyle bize yol gösteren ağabeylerim Op.Tbp.Yb. Mustafa DİKER’e, yardımcı doçentlerimiz Can SOLAKOĞLU, Barbaros BAYKAL, Mahmut KÖMÜRCÜ, Erbil OĞUZ, Cemil YILDIZ, İbrahim YANMIŞ, Bahtiyar DEMİRALP ve Doğan BEK’e beraber çalıştığım dönem arkadaşlarım Tbp. Kd. Yzb. F.Volkan TERCAN’a, Tbp.Yzb. Mustafa KÜRKLÜ’ye, Tbp.Yzb. Selim TÜRKKAN’a, diğer asistan arkadaşlarıma, kliniğimizde çalışan başhemşire, hemşirelere, fizyoterapistlere, sekreterlere, poliklinik, suni aza personeline ve hastabakıcılarına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
TARİHÇE	2-3
GENEL BİLGİLER	4-28
I - KEMİK ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ	
II -ORTOPEDİDE GREFTLER VE GREFT KULLANIMI	
A- OSTEOKONDÜKTİF GREFTLER	
B- OSTEOİNDÜKTİF GREFTLER	
C- OSTEOJENİK GREFTLER	
D- KOMPOZİT GREFTLER (Demineralize Kemik Matriksi)	
E- GREFT İNKORPERASYONU	
III- ORTOPEDİDE KEMİK DEFEKTLERİ VE ONARIMI	
AMAÇ	29
GEREÇ VE YÖNTEM	30-42
I- ALLOJENİK TAVŞAN DEMİNERALİZE KEMİK MATRİKSİ SENTEZİ	
II-DENEY GRUPLARININ BELİRLENMESİ VE GREFTLERİN İMPLANTASYONU	
III- DEĞERLENDİRME	
BULGULAR	43-56
TARTIŞMA	57-67
SONUÇ	68-69
ÖZET	70-71
KAYNAKLAR	72-81

GİRİŞ

Uzun kemiklerdeki segmental kemik defektlerinin tamir edilmesi, ortopedinin teknoloji ile daha fazla yakınlaştığı son iki dekat içinde, değişik çözümler üretebildiği bir problemdir. Kemik kayıplarının “biyolojik rekonstrüksiyonu” terimi, defektin “yaşayan kemik doku” ile tamir edilmesi olarak nitelendirilmektedir. Günümüzde biyolojik rekonstrüksiyon için kullandığımız iki yol; distraksiyon osteogenezisi ve vaskülarize kemik greftleridir.

Biyolojik rekonstrüksiyon kavramı içinde değerlendirilebilecek başka bir metod ise; kemik doku mühendisliğidir. Kemik doku mühendisliği modern teknolojiyi, sahip olduğu biyolojik ve sentetik kaynaklarla birleştirerek, kemik dokunun tamir edilmesi, yeniden yapılandırılması ve replase edilmesi konuları üzerinde çalışmaktadır. Segmental kemik defektlerinin tamiri için kemik doku mühendisliği, konvansiyonel ortopedik kemik greft uygulamalarını temel alan farklı çözüm yolları geliştirmektedir. Bu yollardan birisi, “kompozit greft” uygulamalarıdır. Kompozit greftler bu defektleri biyolojik olarak kapatmaya çalışırken zaman tasarrufu, artmış hasta konforu, azalmış morbidite ve düşürülmüş maliyetleri de hedeflemektedir.

Dünyadaki bu gelişmeler ışığında kemik doku mühendisliği gelecek vaateden bir araştırma alanıdır. Bu noktadan hareketle kemik defektlerinin kapatılmasında kullanılacak kompozit greftlerin geliştirilmesi, kemik defektleri ile ilgili deneysel modellerin kullanılması, sonuçların kantitatif yöntemlerle değerlendirilmesi ve klinik uygulamalara yön verecek şekilde yorumlanması, bu tezin birincil amaçları olarak sıralanabilir.

TARİHÇE

Demineralize kemiğin greft materyali olarak kullanılması yaklaşık yüzyıllık bir kavramdır. 1889 yılında Senn adlı araştırmacı kemiğe hidroklorik asitle demineralizasyon işlemi uygulamış ve implante etmeden önce sterilize etmiştir. İmplantasyondan sonra greftte yeni kemik oluşumunun başladığını ve kaynamanın tatmin edici bir şekilde sonuçlandığını rapor etmiştir (20).

1930'lu yılların başında Huggins, üriner sistemde gözlenen mineralizasyon üzerine yaptığı çalışmalarda, kemik formasyonu ile ilgili bazı önemli veriler elde etmiştir (49). Ancak Huggins'in çalışmalarını ortopedik uygulamalarla birleştirmesi için Urist'in bu konudaki öncül deneylerini beklemesi gerekecektir.

1960'lara gelinceye kadar demineralize kemik ve bunun invivo etkisi hakkında çok detaylı çalışmaların yapılmadığı görülmektedir. Marshall Urist bu dönemde demineralize kemiğin işlenmesi, organizma içinde etkisinin gözlenmesi ve klinik kullanıma sunulması ile ilgili çok önemli bilgileri, ortopedinin ilgi alanına sokmuştur. Demineralizasyon işleminin geride, protein yapıda bir greft materyali bıraktığını ve bu greft materyalinin heterotopik-ortotopik lokalizasyonlarda yeni kemik oluşumuna neden olduğunu bildirmiştir (111). Urist ortaya koyduğu bu yeni kavrama "osteoindüksiyon" adını vermiştir (28,29,84,112). 1972 yılında Reddi ve Huggins demineralizasyon işlemini standardize etmiş ve bu işlemin demineralize kemik üzerine etkisi ortaya koymuştur (49,89,90).

Urist'in, demineralize kemiğin mezenkimal kök hücreleri, kemik ve kırıkta hücrelerine farklılaştırdığını gözlemlemesiyle, osteoindüksiyon kavramının hücresel temelleri araştırılmaya başlanmıştır. Bu keşfin ardından, indüktif etkinin bazı proteinler tarafından oluşturabileceği hipotezi ortaya atılmıştır. Bu gelişmeleri izleyen yıllarda, Urist kemik dokuda lokal büyüme faktörlerinin olduğunu öngörmüş ve bunlara kemik morfogenetik proteinleri (Bone morphogenetic proteins - BMP) adını vermiştir. 1979 yılında Urist, BMP'leri demineralize kemikten izole etmeyi başarmıştır (60,113). Bu proteinlerin keşfi osteoindüksiyon tanımına moleküler bir boyut kazandırmıştır. Bu dönemden günümüze kadar geçen sürede, daha değişik osteoindüktif peptidler ve bu peptidlerin alt grupları ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bu peptidlerin hücrelerle olan ilişkileri ve etki mekanizmaları da ortaya konmuştur.

Günümüzde demineralize kemik grefti ortopedide geniş ölçüde kullanılan bir materyaldir. İzole osteoindüktif faktörlerin kullanılması hususunda ise gerekli prelinik çalışmalar tamamlanmıştır ve yakın gelecekte ise insan çalışmaları yapılmaya başlanılacaktır (41,54,55,60,94,114).



GENEL BİLGİLER

Kemik her ne kadar çok sert ve dayanıklı bir doku olsa da, fizyolojik döngüsünde, maruz kaldığı travmalar ve çeşitli hastalıklar sonucunda hasarlanmakta ve doku kaybına uğramaktadır. İyileşebilmesi, işlevlerinin devamı için gereklidir. Kemik iyileşmesinin yetersiz veya hiç olmaması, klinik ortopedide karşılaşılan sorunların çözülmesini zorlaştırır. Kemik iyileşmesinin güçlendirilmesi ve kemik defektlerinin tamir edilmesi amacıyla kullanılan başlıca yöntemlerden biri de kemik greft uygulamalarıdır. Son iki dekat içinde kemik fizyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla, greftlerin invivo-invito ortamdaki davranışları daha iyi anlaşılmıştır. Bu bilgiler ışığında yeni kemik oluşumu sağlamak veya kemik iyileşmesini hızlandırmak/güçlendirmek üzerine yoğunlaşan yeni ve etkili bir bilim dalı olan “ortopedik doku mühendisliği” gelişmiştir (6,7,46,47,64). Deneysel ortamda üretilen sentetik ve bioaktif materyallerin fizyolojik dokunu yerini alarak, organizmaya uyum sağlaması bilim adamları için üzerinde çalışılması heyecan veren bir olgudur. Vücut içinde oluşan olaylara dışarıdan müdahale ile normal fonksiyonları isteğimiz doğrultusunda manipüle edebilmek için, doku fizyolojisinin anlaşılması en temel gereksinim olmayı her zaman için sürdürecektir. Bu nedenle ana konularımıza geçmeden önce kemik dokuya ve iyileşme sürecine kısa olarak bir göz atılacaktır.

I- KEMİK ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ:

İnsan hareket sisteminin en önemli yapıtaşı olan kemik, bu sistemin diğer unsurlarını destekleyen özel bir bağ dokusudur (57). Hücreler arası madde (matriks) ve hücrelerden meydana gelir. Matriks üzerine inorganik tuzların çökmesiyle kalsifiye olmuştur. Matriks yapımından sorumlu olan osteoblastlar, fizyolojik kemikleşme ve kemikte oluşan hasarların onarımından sorumlu olan hücrelerdir.

İnorganik maddeler kemiğin kuru ağırlığının % 55-70’ini oluştururlar (57,64). Özellikle kalsiyum ve fosfat çoktur. Ayrıca bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da vardır. En önemli yapı $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ olarak bilinen kalsiyum hidroksi apatit kristalleridir.

Organik matriks, tip 1 kollajen ve proteinler ile ilgili glikozaminoglikanları içeren amorf temel maddeden oluşur. Kemikte bulunan spesifik proteinler olan kemik siyaloproteinleri ve osteokalsinde kalsiyumun bağlanması için temel molekül olan gama

karboksi glutamik asit vardır. Bu madde kemik matriksinin kalsifikasyonunun başlatılmasından sorumludur. Tip 1 kollajen içeren diğer dokularda bu molekül yoktur ve kalsifiye olmamalarının nedeni de budur. Diğer glikozaminoglikanlar ise kondroitin 4 sülfat, kondroitin 6 sülfat ve keratan sülfattır. Hidroksiapatit ve kollajen lifleri arasındaki ilişki kemiğin karakteristik sertliğinin ve dayanıklılığının ana sebebidir (57).

Osteoblastlar başlıca tip 1 kollajen, proteoglikan ve glikoprotein' den oluşan kemik matriksinin organik kısmının sentezinden sorumludurlar. İnorganik kısım ancak yapılan organik kısım üzerine oturabilir. Matriks üretimi sırasında osteoblastlar tipik olarak aktif protein sentezi yapan ve salgılayan hücrelere benzerler. Sentez faaliyeti sırasında alkalen fosfataz aktivitesinde artma olur. Sentez ürünleri daha önceden yapılmış matriks ile temas eden hücre yüzeyinden salınırlar. Böylece yeni matriks daha önceden yapılmış ve kalsifiye olmuş matriksle hücre arasında yer alır, zamanla bu da mineralize olup matür matriks haline gelecektir. Buna "kemik apozisyonu" denir. Osteoblastların olgun kemikte matriksle çevrili hal alması sonucunda osteositler oluşmaktadır.

Kemiğin iç ve dış yüzeyleri kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan kaynaklanan tabakalarla örtülüdür. Dıştaki tabaka olan periosteum iki katmandan oluşur. Dış tabaka kollajen lifleri ve fibroblastlardan oluşmuştur. Demetler halinde periostal kollajen liflerinden oluşan sharpey lifleri matriks içinden geçip periostu kemiğe bağlar. Hücreden daha zengin olan iç tabaka ise bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme potansiyeli olan osteoprogenitör hücreleri barındırır (4,31,57). Kemiğin içindeki tüm boşlukları örten endosteum ise daha bol miktarda osteoprogenitör hücre içerir.

Travma sonrası kırık tamiri, kemiğin rejenerasyon yeteneği, kemikte fiziksel streslere karşı oluşan cevap ve remodelizasyon dikkati çeken fizyolojik olaylardır. Bu olayların gerçekleşmesinde osteoblastik kemik oluşumu ve osteoklastik rezorpsiyon önemli rol oynar (57). Osteoblastik kemik oluşumu ve osteoklastik kemik rezorpsiyonu uygun kemik hacminin homeostasisindeki hassas dengeye öncülük eder. İki temel mekanizmanın, bu iki karşıt olayın regülasyonun da rol oynadığı öne sürülmüştür. Bunlar, hormonlarla yapılan sistemik regülasyon (kalsitonin, paratiroid hormonu vb.) ve kemik büyüme faktörleriyle olan lokal regülasyondur. Lokal kemik büyüme faktörlerinin otokrin veya parakrin yol ile osteoblastlar ve osteoklastlara etkiyerek, hücresel proliferasyon veya biyosentetik aktivitelerini etkilediğine inanılmaktadır (7,31,61). Bu biyolojik olayın sabit kemik hacminin fizyolojik ve patolojik

durumlarda devam ettirilmesinde temel mekanizma olduğu tartışılmazdır. Regulator mekanizmalar çocukluktaki normal kemik büyümesinde olduğu gibi osteoporoz gibi metabolik hastalıklar ve kırık iyileşmesinde de önemlidir.

Kemik dokunun oluşmasında ve hasarlara karşı cevabında iki yolaç rol oynar:

- 1-Osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu ile (intramembranöz) oluşan kemikleşme.
- 2-Daha önceden var olan kıkırdak matriks üzerine kemik matriksin çökmesi ile (endokondral) oluşan kemikleşme.

Her iki yolla ortaya çıkan kemik dokusu primer veya olgunlaşmamış kemik dokusudur. Bu geçicidir ve bir süre sonra yerini lamelli yani sekonder kemiğe bırakır. Kemiğin gelişiminde ve tüm hayat boyu süren bir döngüsel dinamiği vardır, böylelikle primer ve sekonder kemik oluşumu ile rezorpsiyon ve remodeling kemikte aynı anda oluşan olgular olarak yan yana yer alır.

1- İntramembranöz Kemikleşme:

Pek çok yassı kemiğin kaynaklandığı intramembranöz kemikleşmeye, mezenkimal doku yoğunlaşmaları içinde olduğu için bu ad verilmiştir. Kısa kemiklerin büyümesinde ve uzun kemiklerin kalınlaşmasında da rolü vardır.

Mezenkimal yoğunlaşma içinde ossifikasyonun başladığı ilk noktaya primer kemikleşme merkezi denir. Olay bir grup mezenkimal hücrenin osteoblasta dönüşmesi ile başlar. Yeni kemik matriksinin oluşmasını kalsifikasyon takip eder. Bazı osteoblastların etrafları sarılarak, osteosit haline gelmeleri sağlanır. Bu gelişmekte olan kemik adacıklarına spikül denir. Spikül olarak adlandırılmaları, histolojik kesitlerdeki görünümünden kaynaklanır. Spiküller; etraflarında kapillerler, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreler bulunduran kaviteletin uzamış duvarlarının kesitleridir. Böylece birkaç mezenkimal yoğunlaşma, kemikleşme merkezinde hemen hemen aynı zamanda ortaya çıkarak, birleşip zamanla süngerimsi yapıyı meydana getirirler. Kemik spikülleri arasındaki bağ dokusuna, kan damarları ve daha fazla farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin girmesi ile kemik iliği hücreleri de meydana gelir.

Mezenkimal doku yoğunlaşmalarındaki hücreler bölünerek, kemikleşme merkezinin devamlı olarak büyümesinden sorumlu olan hücreleri ve özellikle osteoblastları meydana getirirler. Çeşitli ossifikasyon merkezleri radial olarak büyüyüp birleşerek başlangıçtaki orijinal bağ dokusunun yerini alırlar (57). Bu olaya fizyolojik bir diğer örnekte fontanellerdir. Bağ dokusunun kemikleşmeye iştirak etmeyen bölümleri ise intramembranöz kemiğin periosteum ve endosteumunu oluştururlar.

2-Endokondral Kemikleşme:

Endokondral kemikleşmede, meydana getirilecek kemiğin şekli hyalin kıkırdaklardan oluşmuş küçük bir model içinde başlar. Bu tür ossifikasyon kısa ve uzun kemiklerin şekillenmesinden sorumludur. Temel olarak endokondral kemikleşme iki aşamadan ibarettir: İlk aşama; kemik modeli oluşturacak kondrositlerinin hipertrofisi ve harabiyetidir. Bu aşamadan sonra geride, kalsifiye kıkırdak matriksi ile septaların birbirinden ayırdığı genişlemiş lakünalar kalır. İkinci aşama; osteoprogenitör hücreler ve kan kapillerlerinden oluşan osteojenik tomurcuk dejenere olmuş kıkırdak hücrelerinden geriye kalan alanlara girer. Osteoprogenitör hücreler kıkırdağımsı septumun üstünü kemik matriksi ile kaplayan osteoblastlara dönüştür. Böylece kalsifiye kıkırdak dokusu septumları, başlayan ossifikasyona destek olur.

Uzun kemikler epifiz ve diafizden oluşmuş hyalin kıkırdak modellerinden meydana gelir (57). Ortaya çıkması gereken ilk kemik dokusu, diafizleri saran perikondriumun içindeki intramembranöz kemikleşmeyle meydana gelir, böylece kıkırdağı saran perikondriumun iç kısmında kemik halkası (bone collar) adı verilen silindirik kemik yapısı oluşur. Yeni oluşan kemiği de sardığı için perikondriuma da periosteum adı verilir. Yeni oluşan kemiksi halka besin maddelerinin diffüzyonuna engel olacağı için kemik halkanın içinde kalan kondrositler dejenere oldukça, kıkırdak matriksinin devamlılığını sağlayan yetenekleri de ortadan kalkar. Böylelikle kalsiyum çökmeye başlar ve kıkırdak matriks kalsifiye olur (57). Periosteumdan kaynaklanan osteojenik tomurcuğa ve kalsifiye olmuş kıkırdak matriksi içine, kan damarları osteoklastlar tarafından kemik halkada açılan deliklerden geçerek girerler. Kan damarlarının yanı sıra osteoprogenitör hücrelerde bu alana girerler ve proliferasyon olarak osteoblastları oluştururlar. Osteoblastlar kalsifiye kıkırdak matriksi üzerinde aralıksız bir tabaka oluşturarak kemik matriksinin sentezine başlarlar. Böylece primer kemik sentezi, kalsifiye olmuş kıkırdak artıkları üzerinde başlar ve sonlanır.

Sonuç olarak kemikte oluşan kendine has fonksiyonel süreçlerden biri olan kırık iyileşmesi kas iskelet sisteminin yapısal bütünlüğünün korunmasını amaçlayan özelleşmiş bir tamir olayıdır. Bu biyolojik süreç kas iskelet sisteminin fonksiyonunu sürdürmesine olanak tanıyan, kemik dokunun restorasyonu ile sonuçlanan ve bir dizi biyolojik olayın birbirine girdiği kompleks bir kaskad olarak nitelenebilir.



II- ORTOPEDİDE GREFTLER VE GREFT KULLANIMI

Ortopedide kemiğin yerini alması için kullanılan kemik benzeri yapılara greft denir. Kemik greftlerini etki mekanizmalarına (osteojenik, osteokondüktif, osteoindüktif) ve kaynaklarına (sentetik, doğal, semisentetik) göre sınıflamak mümkündür. Her ne kadar bundan sonraki bölümlerde greftleri etki mekanizmalarına göre inceleyecek olsak ta, greft terminolojisinden kısaca bahsetmek yararlı olacaktır. Allogreft aynı türdeki, genetik olarak farklı iki birey arasında transfer edilen dokudur. Ksenogreft ise ayrı türler arasındaki, iki birey arasında transfer edilen dokudur. İzogreft ise aynı türdeki monozigot ikizler arasında yapılan doku transferidir (104). Greftler alıcılarında yerleştirildikleri yere göre iki gruba ayrılırlar. Ortotopik terimi greftin alındığı anatomik ve fonksiyonel yerle aynı özellikteki bir başka yere yerleştirilmesi, heterotopik ise anatomik ve fonksiyonel olarak ayrı bir yere yerleştirilmesidir (104).

Bu tezde esas itibarı ile greft çeşitleri etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmıştır. Ama öncelikle bu bölümde kullanılacak olan üç terime değinilecektir. Bunlar osteokondüksiyon, osteoindüksiyon ve osteojenitedir (61,64,102,104,108). Osteokondüksiyon terimi kemiği oluşturan mimari yapıyı ilgilendirir, yeni kemik oluşumu için hücreler iskelet görevi gören, mekanik destek sağlayarak üzerine yapışabildikleri bir çatıya ihtiyaç gösterirler, işte bu etkiye osteokondüktif etki denir (10,24). Osteoindüksiyon ise yeni kemiği oluşturacak hücrelerin üretim faaliyetlerini kontrol eden hücrel stimulusları ifade eder (7,60). Hücrelerin üretim faaliyetleri lokal veya sistemik indüktif faktörlerce yönetilir. Bu osteoindüktif tarzdaki uyaranlar genelde lokal büyüme faktörleri gibi görev yaparlar. Hücrelerdeki etkilerini çeşitli biyokimyasal yollarla kullanarak gösterirler. Osteojenite ise kemik oluşturma kapasitesine sahip hücreler için kullanılan bir terimdir (16,26,37,46). Osteojenik yani yeni kemik dokuyu sentez edebilen hücreler osteoblastlardır. Bir materyal bu hücreleri veya bu hücrelerin öncüllerini taşıyorsa ancak osteojenik etki oluşturabilir (13,14,47).

Greft uygulamalarında en etkili sonucu veren otojen kansellöz kemiktir (65,102). Çünkü sahip olduğu inorganik matriks ve bunun üç boyutlu mimarisi ile osteokondüktiftir. Hücreler arası organik matrikste osteoblastların faaliyetlerini düzenleyen peptid yapıdaki lokal indüktif faktörleri ile osteoindüktiftir. Ayrıca bu üç boyutlu yapının içinde hem matür osteoblastları hem de taşıdığı kemik iliği sayesinde osteoblastların prekürsörleri olan

mezenkimal kök hücreleri içererek osteojenik karakterdedir. Bu üç etkiyi taşımasından dolayı greftler hakkında bilgi vermeden önce otolog kansellöz kemikten bahsedilecektir.

Otolog Kansellöz Kemik:

Otolog kansellöz kemik günümüzde kırık tamiri, spinal füzyon, kemik defektleri ve kırık iyileşmesinin güçlendirilmesinde en etkili greft materyali olarak nitelendirilerek, altın standart olarak kabul edilir (83,102,104). Otolog kansellöz kemiğin implantasyonu ile osteojenik kemik ve ilik hücrelerinin, osteokondüktif matriks olarak HA kristalleri ile kollajenin, ve organik matriks ile osteoindüktif proteinlerin transplantasyonu sağlanmaktadır.

Ancak otojen kansellöz kemikle ilgili bazı dezavantajların olması, ortopedik doku mühendislerini, otojen kansellöz kemiğin yerine kullanılabilecek greft materyallerinin geliştirilmesine yönlendirmiştir. Bu dezavantajlara kısaca değinmek faydalı olacaktır. Otolog kansellöz kemiğin kaynağı olan iliak kemikle ilgili morbidite küçümsenmemesi gereken bir sorundur. Bu işlemin major komplikasyonları; kutanöz sinir hasarı, kronik donör saha ağrısı, vasküler yaralanma ve % 10 oranında görülen kırıklardır (33,60,83). Greft alınması ayrıca kalıcı skar oluşumuyla sonuçlanır. Otojen kemik grefti istenilen şekilde ve istenildiği miktarda elde edilemez. Bu nedenle klinik kullanımında sınırlamalarla karşılaşmaktadır. Çeşitli raporlar otolog kemik kullanımına rağmen füzyondaki yetersizliğin yaklaşık % 34 olduğunu göstermiştir (9,65,102). Tüm bu durum tekrar değerlendirildiğinde daha iyi bir greft kompozisyonu geliştirmek için doku mühendisliğinin çabalarının haklı olduğu ortaya çıkmaktadır.

Klinik kullarımdaki greftler sahip oldukları başlıca etki mekanizmasına göre üç başlık altında incelenebilir.

- 1-Osteokondüktif greftler.
- 2-Osteoindüktif greftler.
- 3-Osteojenik greftler.
- 4-Kompozit greftler.

A-OSTEOKONDÜKTİF GREFTLER

Osteokondüksiyon terimi greftlenecek alanda kemik iyileşme cevabından sorumlu hücrelerin dağılımını, migrasyon ve yapışmasını güçlendiren mimari yapıya sahip materyaller için kullanılır (10,104). Bu üç boyutlu yapının etkinliği; yüzeyindeki kimyasal özelliklere,

porositesine ve degradasyon mekanizmasının işleme oranına bağlıdır. Porositeli osteokondüktif yapı kemiğe implante edildiğinde çevredeki hücreler matriksin boş hacmine doğru migre olurlar. Bu süreç başlangıçta fibrovasküler büyüme ve yeni kan damarı oluşumu ile karakterizedir. Bu yeni gelişen doku implantın boş hacmine invaze olur ve bunu yeni kemik oluşumu izler (31,33,83).

Osteokondüktif greftler basit bir pasif yapısal iskelet değildir. Daha ileri boyutuyla, greftin kimyasal yüzeyinin fonksiyonu etkinliğini belirler. Bu yüzey, kendisiyle temas halinde olan hücrelere etki eder. Ek olarak greftlenen bölgede, adhezyon molekülleri ve büyüme faktörlerini de içeren çeşitli biyoaktif moleküllerin konsantre olduğu bir saha olarak ta işlev görür (10,24). Biyoaktif moleküllerin greft bölgesine taşıma ve bağlama yeteneği, bu materyallerin çoğunu otojen, biyoaktif moleküllerin transferi için potansiyel araçlar haline sokar. Kullanılan başlıca osteokondüktif greftleri 5 grupta incelemek faydalı olacaktır.

1-Allogreftler

2- Seramik Matriksler

3-Kollajen

4- Hyaluronan (hyaluronik asit)

5- Polilaktik ve poliglikolik asit polimerleri (degrede olabilen polimerler)

1-Allogreftler:

Kemik allogreftleri kadavralardan elde edilen ve ortopedik cerrahlarca sıklıkla kullanılan materyallerdir. Kadavralardan alınan greft kemiğin osteokondüktif mimarisini bozmayan çeşitli metodlarla işlenerek kullanıma hazırlanır. Allogreft işlenmesi ilk önce uygun vericinin seçilmesi ile başlar (10). Tüm vericilere belirli bulaşıcı hastalıklarla ilgili serolojik testler uygulanır (10,104). Seçilen uygun vericilerden alınan greftlerdeki hücre artıklarının tamamen uzaklaştırılmasına ve enfektif transmisyonun engellenmesine dikkat edilmektedir (10,108). Kemik allogreftleri konak dokuya inkorperasyon yollarına göre iki gruba ayrılırlar; kortikal ve kansellöz allogreftler (104).

Kortikal allogreftler genelde mekanik destek sağlayıcı olarak kemik defektlerinin tamir edilmesinde kullanılırlar. Bunlara örnek olarak tümör rezeksiyonları sonrasında kullanılan osteoartiküler greftler sayılabilir (40,52). Bu tip bir greft inkorperasyonun sağlanabilmesi amacıyla metafizyal bir segment içerir. Başka bir kortikal greft tipi ise

diafizeal kemiğin bir kısmından oluşan strut greftlerdir. Strut greftler ise genelde artroplasti revizyonlarında, sement tarafından erode edilmiş diafizeal segmentin replasmanında kullanılır. Kortikal greftlere bir başka örnek ise genelde vertebral füzyonlarda ve tümör cerrahisinde kullanılan fibular segmentlerdir.

En çok kullanılan kansellöz greft tipi kansellöz çipslerdir. Çipsler genellikle küp veya ufak bloklar şeklinde ve 1 cm³ boyutundaki yapılardır. Genel kullanım alanları kemik defektlerinin doldurulması ve kemik kaynamasının güçlendirilmesidir.

2- Seramik Matrisler:

Kemik greftlemesinde kullanılan seramik matrisler; hidroksi apatit (HA) ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi seramik fosfatlardır. Bunların her ikisi de genişçe üzerinde çalışılan materyallerdir. Kalsiyum sülfat tuzları da bu grup içine dahil edilebilir. Fonksiyonel bakış açısı ile bu materyalleri sahip oldukları mineral tiplerine göre sınıflandırılırlar (24,38,56,61).

Porus TCP implantları, TCP'nin naftalin gibi bir taşıyıcı ile toz halindeyken karıştırılması ile yaratılır. Sonra taşıyıcı molekül ortadan kaldırılarak materyale porus yapısı kazandırılmış olur. TCP'de porosite oranı yaklaşık % 35 kadardır. Por çapları ise 100-300 mikrometredir. TCP hidroksi apatitlerden çok daha fazla çözünabilirliğe sahiptir, buda implantın daha kısa zamanda degradasyonuna neden olur. TCP'nin porositesinin çok ufak olması ve porlar arasında bağlantıların tam olmaması nedeni ile greftlenmiş bölgedeki yeni kemik gelişimi TCP matrisinin rezorpsiyonundan önce tamamlanamaz (56,81).

Hidroksi apatit greftler ise, her ne kadar kristal büyüklüğünün azaltılması ve yapısına karbonat gibi katkılar yapılarak daha çözünür hale getirilse de, yüksek derecede kristalize bir yapıdır. Bu nedenlerle çözünürlüğü azdır ve invivo yıllık % 5-15'lik rezorpsiyon oranı ile stabil bir greft materyalidir (63,68). Klinik uygulamalarda en çok lanse edilen porlu ve yüksek derecede kristalize hidroksi apatit, coral (deniz mercanı)'den elde edilir. Hidrotermal bir tepkime, nazik yapıdaki coral kalsiyum karbonatı, mekanik olarak çok daha üstün olan coral hidroksi apatit haline çevirir (60,83). Özel porus yapısı yeni kemiğin invazyonu için ideal bir ortam sağlar.

Bifazik seramikler ise bu iki mineralin karışımı ile yapılır. En çok kullanılanı, %30'luk HA ve daha çözünür olan % 70'lik TCP' den oluşan bifazik TCP/HA greftidir. Bu materyal implante edildiğinde TCP hızla erir ve hidroksi apatit yapısında porosite bırakır. Buda yeni kemiğin daha uzun süre kalan ve daha stabil olan bir çatı üzerinde oluşmasını sağlar (24,63).

Başka bir sentetik seramik ise; yüzeyi hidroksiapatitle kaplı kalsiyum karbonattır. Bu greftte kalsiyum karbonatın üzeri ince bir hidroksiapatit manto ile kaplanmıştır. İmplantasyonu takiben erken performans saf hidroksi apatit implanta benzer ancak birkaç ay sonra hidroksi apatit manto erode olur ve kalsiyum karbonat ekspozite olarak hızlı bir absorpsiyona uğrar (61,83).

İnjektabil seramik sementler ise kullanım açısından değişik avantajlar sağlar. Bu amaçla kullanılan seramik sementler; alfa TCP, bifazik dikalsiyum fosfat ve tetrakalsiyum fosfat monooksid gibi çeşitli yapıların kombinasyonu sonucu oluşur. Komponentler likid yapıda bir araya getirilirler ve belirli bir ısı üretimi olmaksızın göreceli daha sert olan kristal fazına geçerler.

3-Kollojen:

Tip 1 kollajen çapraz fibriler yapısıyla kemiğin ekstrasellüler matriksinin yapısında en bol bulunan proteindir (57). Kollajen kemik yapımı ve mineral depozisyonu için kondüktif özellik gösterir. Sadece mineral depozisyonu için yüzey alanı yapmakla kalmaz, nonkollajenöz matriks proteinlerindeki bağlayarak indirekt yoldan mineralizasyonun kontrolünün ve hücre adezyonunun düzenlenmesinde de rol oynar (60,104). Mesela osteonektin ile bağlanmış kollajen kristal depozisyonunun kuvvetli bir sunucusu haline gelir ve asid fosfolipid kompleksleri de matrikse hidroksi apatit depozisyonunu kuvvetlendirir (24). Klinik olarak çapraz halde olmayan kollajen tipleri fleksibil formda hazırlanıp çeşitli seramiklerle kombine edilerek kullanılabilir (115).

4- Hyaluronik asit:

Hyaluronan, hyalin kıkırdakta yapısal element olarak yer alan, moleküler ağırlığı büyük bir organik moleküldür. Normal eklem sıvısında geniş oranda çözünebilen bir komponenttir. Erken kırık kallusunda da bol miktarda bulunur, ama zayıf bir osteokondüktif materyaldir (24,61). Tavuklardan elde edilen yüksek derecede saflaştırılmış hyaluronan gözde vitröz hümör replasmanı için ve erken osteoartritte diz içi enjeksiyonlar halinde

kullanılmaktadır. Bir greft materyali olarak hyaluronan; hücreler için bir matriks ve bir taşıma sistemi olarak (osteoindüktif faktörler için) kullanılabilir (87).

5- Polilaktik asit Poliglikolik asit polimerleri:

Degredabil polimerler az bir osteokondüktif potansiyele sahiptir. Bu polimerler, peptid büyüme faktörlerinin zaman ayarlı ve kontrollü salımı için taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır (6,65,117). Çünkü degradasyonu hidroliz ile olmakta ve degradasyon oranı hidroliz özelliği modüle edilerek geniş oranda ayarlanabilmektedir (3).

Bunlar çeşitli üç boyutlu yapılarda fibromash, porus foam veya toz formunda üretilir (60). Ayrıca bu şartlar altında denatüre olmayan peptid büyüme faktörlerle kendi hidrolizi esnasında zaman ayarlı bir salım yapabilecek şekilde kombine edilebilirler (9,32,33,117). Bu zaman ayarlı salım çok fazlı taşıma sistemlere olanak tanır.

B-OSTEOİNDÜKTİF GREFTLER

Büyüme faktörleri hücrel aktiviteyi lokal olarak regüle eden doku spesifik polipeptidler olarak tanımlanabilir (60,75). İskelet sisteminde yaralanmanın olduğu bölgelerde büyüme ve tamiri uyarıcı bazı peptid yapıda maddeler tanımlanmıştır ve bunlar kırık iyileşmesinde kritik roller oynamaktadır. Büyüme faktörleri biyolojik fonksiyonlarını hedef hücrelerdeki transmembranöz reseptörlerine bağlanarak gösterirler (5,6). Bu reseptörlerin ekstrasellüler parçasına bağlandıktan sonra intrasellüler parça stimüle olur ve spesifik protein kinazların aktivasyonu oluşur. Protein kinaz kaskadının invivo etkisi ile gen transkripsyonu, intrasellüler veya ekstrasellüler olarak kullanılacak proteinlere translase olacak mRNA oluşumu ile sonuçlanır (61).

Büyüme faktörleri sistemik ve lokal birçok regülatuar yolların kesiştiği bir olay olan kırık iyileşmesinde kritik rol oynar (86,88,89). Büyüme faktörleri otokrin ve parakrin yol aracılığıyla farklılaşmamış mezenkimal hücreleri kırık alanına migre, diferansiye ve prolifer ederler. Bu faktörler ayrıca hücrel genleride etkileyip, tamir hücrelerinde değişikliklere neden olarak, oluşacak matriks tipinde kodlarlar (9,61).

Kemik matriksi çeşitli büyüme faktörleri içerir. Bunlar: bone morphogenetic protein, transforming growth factor, insulin like growth factor, platelet derived growth factor, fibroblast growth factor (BMP's, TGF-B, ILGF 1-2, PDGF ve FGF)'dür

(7,32,49,79,105,112,118). Deneysel invivo osteoblast kültür modellerinde bu faktörlerin hücresel proliferasyon, diferansiasyon, kemotaksis ve protein sentezini etkilediğini gösterilmiştir (23,36,59,75,120).

Demineralize kemiğin osteoinduktif özelliklerinin fark edilmesi kemik indüksiyonundan sorumlu tüm faktörleri belirlemek üzere araştırmalar yapılmasına yol açmıştır (111,113). Şu anda çoğu TGF süperailisi içerisinde sınıflandırılan bir grup BMP tanımlanmıştır. BMP'ler embriyogenez sırasında mezenkimal hücrelerden farklı hücre tiplerinin gelişmesinde rol oynar (9,60). Bu faktörler mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasında da önemlidir. Ayrıca kırık iyileşmesini ve kemik remodelizasyonunun tüm basamaklarını etkilerler. BMP'nin 24 den fazla farklı tipi tanımlanmıştır (6,60). BMP'ler tüm bu büyüme faktörleri arasında kemik dokuya en etkili olanı ve en fazla osteoinduktif kapasiteye sahip peptid grubudur. BMP'ler içinde ise en etkilileri BMP - 2, BMP - 4, BMP -7 (OP-1) dir. BMP 2 ve 4'ün fizyolojik dokulardaki varlığı, Bostrom ve arkadaşlarının kırık iyileşmesi esnasında BMP'ler için kullandığı immünolokalizasyon tekniğini ile anlaşılmıştır (9,60,83). BMP 2 ve 4'ün miktarı kırık iyileşme sürecinde kallus içinde bulunduklarını ve oranlarının süreç boyunca değiştiğini gözlemlenmiştir. Bu bulgular bu moleküllerin kırık tamiri sırasında önemli görevler üstlendiğini göstermektedir.

Bu gözlemlerin ardından BMP'leri rekombinant yöntemlerle elde etmek mümkün hale gelmiştir. Daha sonra ise rekombinant ve doğal BMP'lerin kullanıldığı deneysel modellerde BMP'lerin etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Yosko ve arkadaşları rhBMP – 2 ile tip 1 kollajeni ratlarda 5 mm'lik femoral defekt modelinde uygulamış ve %81 oranında kaynama elde etmişlerdir (120). BMP'nin etkinliğinin gösterilmesi, bu büyüme faktörlerinin osteokondüktif matrislerle birleştirilmesi fikrini doğurmuştur. Bu faktörlerin gerekli konsantrasyonlarda, bir taşıyıcı sistem ile implantasyonu üzerine çalışmalar devam etmektedir (117).

C- OSTEOJENİK GREFTLER

Osteojenik hücreler kemik yapan hücrelere diferansiye olabilen veya kemik üreten hücrelerdir (4,14,16,57). Bu hücreler periostta, peritrabeküler yumuşak dokularda ve kemik iliğinde mevcuttur. Bu hücrelerin farklılaşmamış pluripotent konnektif doku kök hücre havuzundan kaynaklandıkları bilinmesine rağmen, fiziksel lokalizasyonları ve kemikteki bu

progenitörlerin tam karakteristikleri hala tam olarak bilinmemektedir (4,12,16). Osteoblastik progenitörler yumuşak dokularda da bulunabilir (46). Klasik çalışmalar kemik iliğindeki bu osteoblastik progenitörlerin, ortotopik lokalizasyonlarda kemik doku oluşturabildiklerini göstermiştir. Bu da kemik iliğinin farklılaşmamış hücreler ihtiva ettiğini kanıtlamıştır (13,50,51).

Kemik iliğinden elde edilen progenitör hücrelerden; mezenkimal kök hücreler, konnektif doku progenitor hücreleri, ilik stromal hücreleri gibi çeşitli adlarla anılmaktadırlar (4,71). Bu isimler verilen hücreler kemik iliğinde bulunan hücre gruplarının sadece ufak bir bölümünü oluşturmaktadır. Ancak bu hücreleri bizim açımızdan önemli kılan tek şey, yeni kemik oluşumu ve kemik tamirinde anahtar rol oynayan osteoblastlara farklılaşabilmeleridir (16,70). Osteoblastlar ise konumuz olan kemik dokunun üretilmesinde merkezi görev alan hücrelerdir. Yukarıda anlatılan osteokondüktivite ve osteoindüktivite kavramları ancak bu özellikleri kullanabilen hücrelerin varlığında fonksiyonel olarak anlam kazanabilir. Yani hücre olmayan bir sahada ne kemik doku oluşumundan, ne osteokondüktiviteden, ne de osteoindüktiviteden bahsedilebilir (30,31,77,83).

Klinik uygulamalarımızda osteojenik hücrelerin iki yolla sağlanır. Bunlar otojen greftler ve otolog kemik iliği aspirasyonlarıdır (16,21). Otojen greftler kemik doku içinde hem matür osteoblastları hem de onların progenitörlerini taşımaktadır. Kemik iliği ise bünyesinde kemik oluşturan osteoblastlara farklılaşabilen mezenkimal kök hücreleri bulundurur (13). Mezenkimal kök hücreler multipotent yapıdadırlar, yani değişik fenotipik hücrelere (osteoblast, kondrosit, fibroblast vb.) farklılaşabilirler (4,16,26). Ancak, uygun uyaranlarla karşılaştıklarında (BMP gibi osteoindüktif faktörler ile), osteoblastlara farklılaşarak, kırık iyileşmesinde anahtar rol oynarlar. Kök hücrelerden, kemik, kırık veya kas fenotipindeki hücrelere farklılaşmada çeşitli faktörler rol oynamakla birlikte, osteoblastik fenotipin gelişmesi için anahtar rol oynayan indüktif faktörler, kemik morfogenetik proteinleridir. Osteoblastik fenotipin hücrede tamamen oturmasını sağlayan moleküler yapı, core binding factor alfa 1 (CBFA1) dir. CBFA1'in ekspresyonu, o hücrede osteoblastik farklılaşma ile ilgili çeşitli genlerin üretim yolağına girmelerinin gösterilmesi ve osteoblastik farklılaşma hipotezinin varlığı için gereklidir (37,70).

Osteoblastik farklılaşma orijinal bir kök hücreden başlar ve birçok osteotropik faktör (BMP,TGF vb.) ve sitokinler tarafından yönetilir. Başlangıçtaki proliferatif fazda, nükleer

proteinler olan H4 histon, C Fos ve C Jun ekspresyonu mevcuttur. Core binding factor alpha1 (CBFA1'in) ekspresyonundan sonra Tip 1 kollajen, osteopontin, osteonektin ve alkalin fosfataz gibi gen regülasyon ürünleri ortaya çıkar (12,66,70). Sonuçta matriks mineralizasyon fazı ile osteoblastik fenotip oturur. Bu safhada hücredeki terminal belirteçler ise; osteokalsin, kemik siyaloproteini ve 1 - 25 dihidroksi vitamin D₃ ile paratiroid hormon duyarlılığıdır. Bu aşamalardan sonra oluşan osteoblast artık kemik üretmek için gerekli genetik kodu hücre fonksiyonlarına yansıtmıştır ve osteoid üreterek kemiğin fizyolojik döngüsündeki merkezi rolünü oynayabilir (61).

D- KOMPOZİT GREFTLER

Kemik grefti yerine geçen materyallerden hiçbiri tek başına otojen kemik greftinin sağladığı, osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerin tümünü birden karşılayamaz. Bu üç özelliğe sahip kompozit greftler otojen kemiğe eşit veya daha iyi bir kemik iyileşme cevabı oluşturabilir (37,61,64). Bu tip greftler doğal veya sentetik yollardan elde edilebilirler. Otojen greft gibi sadece hastaya bağımlı bir greft tipi değildir. Osteokondüktif ve osteoindüktif etkileri sentetik yolla sağlamak mümkünse de, osteojenik hücreleri kompozit grefte dahil etmek için yine hastanın kemik iliğine başvurmak gerekmektedir. Kaynak açısından bakıldığında kompozit greftler, otojen kemiğe göre çok üstündür, kemik iliği aspirasyonu hariç morbidite bırakmazlar, istenilen miktarda ve uygulanacak anatomik lokalizasyona uygun şekilde üretilebilirler. Taşıdıkları osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikler manipüle edilerek değişik kompozisyonlarda kullanılabilirler. Bu tip kompozit greftlerin geliştirilmesi otojen greftlere olan ihtiyacı azaltabilir hatta tamamen ortadan kaldırabilir (9,83).

Kompozit greftler çeşitli materyallerin tüm elverişli özelliklerini bir araya getirerek kraniofasiyal rekonstrüksiyon ve travmatik kemiksel defektlerin tamirinde kullanılmaktadır (69,85,97,120). Kompozit greftleri, biyoyararlanımda, otojen kemiğe eşdeğer hale getirmek için doku fizyolojisini daha iyi anlamak gerekmektedir. Bu greftleri başarılı kılacak olan özellikler; uygun endikasyonlara göre içeriğinin ayarlanabilir olması ve büyük miktarlarda elde edilebilme olanaklarıdır (37,64). İdeal bir sentetik kompozit greft; osteojenik hücre, transplante edilen ve lokal osteoprogenitör hücreleri etkileyecek osteoindüktif büyüme faktörleri ve hücreler için uygun bir çatı görevi yapacak osteokondüktif matriks içermelidir (6,33,47,78,88,97,101,112,113).

Günümüzde kullanılan greft materyallerinin birçoğu osteokondüktivite, osteoindüktif stimulus ve osteojenik hücrelerin bir veya birkaçına sahiptir (Tablo 1). Bu özellikleri kullanarak yeni materyalleri geliştirilerek, klinik olarak optimal kemik iyileşmesi sağlanabilir. Ayrıca varolan tekniklerin maliyetlerinde azalma yapılabilir ve tamamen yeni yaklaşımların tedavi uygulamalarında kullanılmaları sağlanabilir.

Materyal	Osteojenik	Osteoindüktif	Osteokondüktif
Otojen kansellöz kemik	+	+	+
Otojen kortikal kemik	+	+	+
Vaskülarize otogreft	+	+	+
Allogreft	-	+ \ -	+
Deproteinize ksenogreft	-	-	+
Kemik iliği	+	+	+
DBM	-	+	+
Kollajen	-	-	+
Seramikler	-	-	+
BMP	-	++	-

Tablo 1: Klinik kullanımdaki greft materyallerinin özellikleri.

Kompozit greft materyalleriyle yapılan deneysel çalışmalar gittikçe fazlalaşmaktadır. Hayvan çalışmalarında kullanılan greftler osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteojenik etki mekanizmasından en az ikisine sahiptir. Kullanılan greftin özelliğine göre, kompozit greftlerin çeşitli iyileşme yolları izlediklerini göstermiştir. Örneğin Lane ve arkadaşları rh BMP 2, sentetik matriks ve otojen kemik iliğinden oluşan kompozit greftin etkisi üzerine çalışmışlardır (65). Cornell ve arkadaşları ise Collagraft adındaki, kompozit hale getirilmiş deantijene bovin fibriller kollajen ve porus kalsiyum fosfat (%65 HA ve %35 TCP) seramiği üzerine çalışmışlardır. Collagraft ve otojen kemik iliğini, kansellöz otolog iliak kanat grefti ile akut uzun kemik kırıklarının tedavisinde karşılaştırmış ve radyolojik ve fonksiyonel olarak belirgin bir farklılık saptamamışlardır (24,61).

Tek başına osteoindüktif ve osteokondüktif etkiye sahip olan demineralize kemik matriksi her ne kadar allojenik kaynaktan elde edilse de, sahip olduğu bu özellik nedeniyle

doğal bir kompozit greft olarak işlev görmektedir. Deneysel çalışmamızda da kullanılan DBM'in işlenme yoluna ve etki mekanizmasına daha yakından bakmak faydalı olacaktır.

Demineralize Kemik Matrisi:

1960'lı yılların başında Urist, kemiğe uyguladığı demineralizasyon işleminden sonra kalan kemik matriksinin heterotopik ve ortotopik lokalizasyonlarda yeni kemik oluşumunu indüklediğini belirledi (111-113). Ardından Reddi ve Huggins demineralize kemik matriksinin hücre diferansiasyonunu, kırıkta - kemik doku oluşumunu indüklediğini ve impante edildiği bölgelerde yüksek alkalen fosfataz seviyesi oluşturduğunu rapor ettiler (88,89). 1979 yılında ise Urist, demineralize kemik matriksinde bu osteoindüktif etkiden başlıca sorumlu olduğunu düşündüğü, protein yapıdaki bir molekül olan kemik morfogenetik proteinini (BMP) izole etti (14,60).

Demineralizasyon süreci boyunca yapılan işlemler kemiğin mineral içeriğini büyük ölçüde ortamdaki uzaklaştırarak geride glikoproteinler ve protein yapıdaki molekülleri bırakır (1,45,46,91). Demineralize kemik bir bakıma kemiğin organik matriksinin serbestleştirilmiş halidir. DBM bünyesinde hücrelere etki edecek biyoaktif peptid yapılı molekülleri ve bu hücreler için çok stabil olmasa da osteokondüktif etki gösteren kollajen ve benzeri proteinleri içerir. Ancak DBM'in kemik oluşumunu sağlayıcı esas etkisi, taşıdığı osteoindüktif komponentlerden kaynaklanmaktadır (42,43,49,113). Yani DBM; osteokondüktif, osteoindüktif ve biokompatibil bir greft materyalidir.

DBM esas itibarıyla osteoindüktif etkisiyle uygulandığı sahada yeni kemik formasyonunu, kemik mineralizasyonunu, osteoblast ve diğer bir kısım hücreleri stimüle ederek gösterir. DBM bu etkisini yapısında taşıdığı; kemik morfogenetik proteinleri (BMPs), transforming growth factor beta (TGF β), insulin like growth factor (ILGF), osteogenin (BMP 3) ve fibroblast growth factor (FGF) gibi peptidler sayesinde yapmaktadır (8,10,61).

Demineralize kemik matrisi günümüzde etkili üretim prosedürleri ile klinik kullanıma sunulmuş, ortopedinin birçok alanında kemik oluşumunu indüklemek için uygulanan, ticari bir greft materyali haline gelmiştir. Demineralize kemiğin etki mekanizması ve işleme prosedürlerinin detayları hakkında bilgi sahibi olmak, klinisyenin DBM'i kullanma amaçlarını yönlendireceğinden bu konulara değinilecektir.

Demineralize kemik matriksi hızla revaskülarize olan, yapısal destek sağlayamayan ve orta derecede osteokondüktif potansiyeli olan bir greft materyalidir. DBM'in indüklediği yeni kemik oluşumu başlıca endokondral yolak ile oluşur. DBM implantasyonundan hemen sonra ilk 18 saat içinde platelet agregasyonu, hematoma oluşumu ve inflamasyonla karakterize polimorfonükleer lökositlerin migrasyonu başlar (10,48,49,67). Bundan sonra fibroblast benzeri mezenkimal hücreler, demineralize matriks üzerine yapışarak yakın bir ilişki içine girerler. DBM ve mezenkimal hücreler arasındaki bu etkileşim sonucunda yaklaşık olarak implantasyonu takip eden 5 gün içinde kondrosit oluşumu ile sonuçlanan hücresel differansiasyon meydana gelir. Kondrositler ise daha sonra mineralize olacak kondroid matriksi üretirler. 10-12. günlerde damarsal invazyon ve buna eşlik eden osteoblastlar ve multinükleer hücreler ortamda görülürken, kondrositler dejenere olmaya başlar (49,67,90). Yeni kemik mineralize kırık dokusunun yüzeyinde oluşmaya başlar. Remodeling ve bu kompozit yapının yerini konağa ait kemiğe bırakması son olarak meydana gelecek olan süreçlerdir. Zaman ile remodeling devam ederek implante edilen DBM tamamen rezorbe olur ve yerini konağa ait yeni kemik alır. DBM ile oluşan yeni osteogenezisin devamlı ve başarılı olması için kollajen uygun çapraz bağlara sahip olmalı ve ortamda osteoindüktif proteinlerinde bulunması gerekmektedir.

Uygun olarak işlenerek hazırlanmış DBM kemik iyileşmesini iki yol ile uyarabilecek güce sahiptir. Birincisi, DBM hücreler için infiltre olacakları, yerleşecekleri, sayılarını arttıracakları ve yeni kemiği üzerinde oluşturacakları bir kondüktif yapı sunar (28,49,89,112). DBM ayrıca mezenkimal kök hücreleri, doğal biyoaktif molekülleri kullanarak, kemiği yapacak hücrelere yani osteoblastlara farklılaştırır. Kemiğin osteoindüktif potansiyeli ekstrasellüler matrikste yer alan nonkollajenöz indükleyici proteinlerde gizlidir. Bu faktörler, implante edildikleri yerde endokondral kemikleşme kaskadını tetikleyerek görev yaparlar. Bunun tersine mineralize allogreftler yeni kemik oluşumunu sadece osteokondüktif yolak ile uyarırlar, çünkü indüktif proteinler mineralize matriksin içinde hapis olmuşlardır ve hücresel farklılaşmayı uyaramazlar (10,44,108). DBM'in yeni kemik oluşturma potansiyeli bu implantların hayvan modellerinde denenmesiyle gösterilebilir (111). DBM subkutanöz veya intramüsküler (heterotopik bölgeler) dokulara implante edildiğinde ve histolojik olarak incelendiğinde, yeni kemik dokusunun oluştuğu izlenmiştir (1,29,91,112). Yeni kemik endokondral ossifikasyon üzerinden oluşur. Kırık doku ortalama 14. gününde implante edilen bölgede görülmeye başlanır ve 21-28. günler arasında kemik dokusuna dönüşür. İnsan kaynaklı DBM'in test edilmesi amacıyla atimik (nude) ratlar kullanılmaktadır.

DBM'in aktivitesi kemiklerin alındığı vericiden başlayıp ticari olarak sunulduğu son aşamaya kadar birçok faktörden etkilenir. DBM in hem alındığı kaynak, hem de işlenme süreci direk olarak osteoindüktif potansiyelini belirlemektedir (2,10,76,123). Mesela DBM yapımında kullanılacak kemiklerin işlemiden önce oda sıcaklığında 1 gün bekletilmesi DBM'i biyolojik olarak inaktif hale çevirir (121). Belirli koşullar altında etilen oksitle yapılan sterilizasyon ve 2.5 Mrad gama radyasyonu osteokondüktiviteyi önemli ölçüde azaltır (104,108). American Association of Tissue Banks ve US. Food and Drug Administration kurumu, kullanıma sunulan her DBM paketinin tek kullanıcıdan alınmış olmasının gerekliliğini vurgulamıştır.

Demineralize kemik matriksinin alındığı vericilerle ilgili yapılan çalışmalar yaşın veya cinsiyetin osteoindüktif potansiyeli istatistiksel olarak etkilemediğini ortaya koymuştur (10). Ancak DBM hazırlanmasında kullanılan kemik tipi önemlidir. Kortikal kemikten ve kansellöz kemikten yapılan DBM'lerin osteokondüktivitesi karşılaştırıldığında kortikal DBM'in yeni kemik oluşumunu indüklediği görülürken, kansellöz kemikten yapılan DBM yeni kemik oluşumu yapamadığı görülmüştür (96). Bu nedenle DBM'e, spesifik bir işlem sonucunda mineral ve kalsiyum içeriği ortadan kaldırılarak, geride glikoproteinlerin ve kemik morfogenetik proteinlerinin kaldığı kortikal kemik tozu diyebiliriz.

DBM'in işlenme metodu osteoindüktif potansiyelini direk olarak etkiler. Demineralizasyon işlemi için seçilen ajanın önemli olduğu gösterilmiştir. Hidroklorik asit en sık kullanılan ajandır. Formik asit ve sitrik asitin 1:1 kombinasyonunun kullanılması osteoindüktif potansiyele zarar vermeyen bir işlemdir. Hidroklorik asitin alkollerle (metanol, etanol) kombinasyonu ile yapılan DBM ise osteoindüktif değildir (113). Ayrıca asetik asit, nitroz asit, nitrik asit, ve laktik asitte osteoindüktif potansiyeli kötü yönde etkiler (1,10,113).

Demineralizasyon süresi de DBM'in nihai kalsiyum içeriğini etkiler. Bu nedenle işleme sürecinde kontrol edilmesi gereken bir değişkendir (44,48,53). İmplant içinde kalan mineral içerik, hücrelerin osteoindüktif proteinleri algılayıp, tanımlarını etkiler. Kemığın mineral içeriğinin en azından normalin %40'ına kadar azaltılmasının, osteoindüktif etkinin güçlü olması ile sonuçlanacağı bildirilmiştir (48). Ortamdan yağ uzaklaştırıcı solventlerin kullanılması (alkol, eter, aseton) osteoindüktif potansiyeli etkilemez, hatta artırır (49,112,124). Çeşitli antibiyotikler DBM elde edilmesinin son aşamalarında implanta

karıştırılmaktadır. Bu antibiyotik tipleri genellikle eritromisin, streptomisin, ve penesilindir. Bu antibiyotiklerin hiçbirisi osteoindüktif potansiyeli azaltıcı etki göstermez (88,112,). Sıcaklık osteoindüktif potansiyel üzerine açık bir etkiye sahiptir. Aşırı ısı (70°C - 100°C) ve 3 defadan fazla donma\erime siklusu indüktivite üzerine yıkıcı etkiye sahiptir (49,113). DBM partikülünün büyüklüğü de önemli bir faktördür. 75µm altındaki partiküller osteoindüktif etkinin oluşmasını engelleyen, kronik inflamatuvar cevap oluşturmaktadır. Partikül boyu 75µm-2mm² arasındaki DBM ise osteoindüktif etkiye sahiptir (10,95,111). Freeze drying (liyofilizasyon) işleminin DBM'in osteoindüktif gücü üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı kanıtlanmıştır (27,29).

Demineralize kemik matriksinin viral ve bakteriyel etkenlerden arındırılması amacıyla, önce kemiğin alındığı vericiler infeksiyöz ajanlar tarafından taranır, ardından potansiyel olarak mevcut olan veya saptanamayan mikroorganizmaları temizlemek için belirli teknikler kullanılır. Bu teknikler üç basamaktan oluşur 1- Asit uygulaması 2- Ethanol uygulaması 3- Liyofilizasyon. Son olarak ise kullanılan materyaller ve kullanılan kişiler mümkün olduğu kadar takip edilir (10,108). Demineralize kemik, mineralize kemikten dezenfeksiyon işlemi açısından farklıdır. Çünkü morsolize edilmesi ve demineralizasyon süreci, bu greftten kan ve kan elemanlarının etkili bir şekilde uzaklaştırılmasına olanak tanır ve temizleme solusyonları tüm matrikse kolayca nüfus edebilir. Bunun aksine mineralize kemikler sahip oldukları kompleks mimari nedeniyle virüsler için potansiyel olarak rezervuar olarak görev yaparlar (10,83).

Demineralizasyon işleminden sonra kullanıcıya verilecek olan ürünün tamamen steril olması gerekmektedir. Bu amaçla iki farklı strateji geliştirilmiştir. Birincisi tüm sürecin (vericiden alınıp kullanıcıya verilene dek) aseptik koşullarda yapılması. İkincisi ise terminal sterilizasyon uygulanmasıdır. Terminal sterilizasyon uygulamaları DBM'in performansı üzerine az yada çok etkiye sahiptir. Bazı çalışmalarda 2-2.5 Mrad ve yukarıdaki gama radyasyonu, osteoindüktif etkiyi önemli ölçüde azaltmaktadır (76,123). Etilen oksit ile yapılan sterilizasyonda ise osteoindüktif etki, işlemin ısısına ve zamana bağlı olarak belirli bir ölçüde etkilenmektedir (2,27,76).

Özetle DBM'in iyi bir osteindüktif performans göstermesi birçok faktöre bağlıdır. Ayrıca ticari olarak üretilmiş DBM çeşitlerinin farklı konsantrasyonlarda indüktif faktör

ihativa ettiği ortaya konulmuştur. Demineralize kemik matriksinin etkinliğinin kantitatif olarak ölçölmesi amacıyla çeşitli invivo ve invitro testler geliştirilmiştir (29,124). Artık ticari olarak üretilen tüm DBM prepertalar bu tip kantitatif testlerden geçirilmektedir. Martin ve arkadaşları yaptıkları deneyde aktif DBM'i inaktif DBM'le (guanidin-hidroklorür ile karıştırılmış) tavşan spinal füzyon modelinde kıyaslamışlardır (74). Sonuçta aktif DBM'in inaktif formula karşılaştırlamayacak ölçüde, yeni kemik oluşumunu tetiklediğini ortaya koymuşlardır (74). Bu çalışma açıkça göstermiştir ki, kaliteli bir kemik doku oluşumu, iki önemli iyileşme mekanizması olan osteoindüksiyon ve osteokondüksiyonun aynı anda var olması ile başarılabılır.



E- GREFT İNKORPERSYONU

İnkorperasyon terimi, greft materyali ve konak arasında yeni kemik oluşumu ile sonlanacak süreçteki biyolojik etkileşimleri tanımlamak için kullanılır. Kısaca inkorperasyona greftin kemik dokuya dönüşmesi de denebilir. Graft iyileşmesi, greft bölgesindeki cerrahi girişime karşı oluşan inflamatuvar cevap ile greftin kendisine karşı konağın oluşturduğu inflamatuvar ve immün cevabın kombinasyonu ile başlatılır (10,33,96). Yeni kemik oluşumu, greft çevresinde gelişen; hücre proliferasyonu, migrasyonu, diferansiasyonu, revaskülarizasyon, rezorbsiyon ve remodelizasyon süreçlerini izleyerek tamamlanır. Sonuçta greft tamamen rezorbe olarak, geride konağa ait yeni oluşmuş kemiği bırakır.

İnkorperasyon sürecinde greftte ve greft bölgesinde görülen biyolojik olaylar şunları içermektedir:

- 1-Sitokin ve büyüme faktörlerinin salınması ile hematoma oluşumu.
- 2-Greftin içine ve etrafına mezenkimal hücrelerin migrasyonu ve proliferasyonu ile fibrovasküler doku gelişimi.
- 3-Greft içine damarların invazyonu.
- 4-Greftte bölgesel osteoklastik rezorbsiyon.
- 5-Greft etrafında intramembranoz veya endokondral kemik oluşumu.

Bu aşamalara bakıldığında genel anlamda greft inkorporasyonunun kırık iyileşmesine benzer aşamaları takip ettiği söylenebilir. Graft bölgesi içinde görülen inflamatuvar reaksiyon çok önemlidir. Herhangi bir yara iyileşmesi cevabında olduğu gibi plateletler hızla greft yüzeyine yapışır. Graft bölgesinde kan ve ekstra sellüler sıvı tarafından oluşturulan fibrin ağı içerisine, FGF-2, PDGF, TGF- β gibi peptid büyüme faktörleri, plateletlerden serbestleşir (24,33,83). Bu büyüme faktörlerinin uyarıları doğrultusunda inflamasyonda ve kırık iyileşmesinde yer alan hücreler bu bölgeye migre olarak proliferatif bir süreçte girerler.

Bir greftin konak dokuya inkorporasyonu tamamen o greftin revaskülarizasyonu anlamına gelir. Yeni kemik doku ancak kan damarlarının sağladığı mikro çevredeki değişiklikler sayesinde oluşur. Eğer greft revaskülarize olmazsa inkorpore olamaz. İnkorpore olmayan greftte, Wolf kanununa uygun davranamaz. Bu da fizyolojik streslere dayanamayacağı ve mekanik bütünlüğü sağlayamayacağı anlamına gelir. Osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif stimulus kombinasyonundan oluşan greft materyalinin

etkinliği, doku yatağının iyi kan akımı ile hazırlanması ile sağlanır (10,61,62). Damarsal yatak, stimülatör faktörleri salgılayan inflamatuvar hücreleri taşıyan bir araç gibi davranır. Ayrıca osteoprogenitor hücreler ve neovaskülarizasyon için gerekli hücrelere oksijen ve besin maddeleri taşır. Bu nedenle her greft revaskülarize olurken, greft rezorbsiyonu ve yeni kemik oluşumu bir denge halinde gitmelidir (24). Yeni kemiğin oluşabilmesi için gerekli önemli bir faktör de greftin rezorbsiyonudur. Graft rezorbe olarak yeni kemik oluşumu için gerekli ortamı sağlamalıdır. Rezorbsiyon ve yeni kemik oluşumu beraber yürüten iki süreçtir. Nihai rezorbsiyon sonucunda, greftin tam anlamıyla inkorpore olarak yerini konak kemik ile aynı özelliğe sahip yeni kemiğe bıraktığı söylenebilir. Bu aşamalarda konak ile inkorpore olan kemik, biyolojik streslere cevap vermeye başlayarak aynı zamanda remodelize olmaya başlar. Graftin bulunduğu yerdeki mekanik altyapı greft iyileşmesinde ki başka önemli bir faktördür. Mekanik etkiler greftte bulunan hücreler için farklılaşma yollarında önemli bir biyolojik stimulus olarak davranır. Örneğin makrohareket mezenkimal kök hücreleri fibrokartilajinöz farklılaşma yoluna sokar ve sonuçta greft iyileşmesi kemik doku gelişimi ile sonuçlanmaz (24,32,83). Kemik doku gelişimi ise mekanik stabilitenin mikrohareketlere müsaade ettiği durumlarda aktive olmaktadır.

Bu olayların hepsi tüm greft çeşitleri için aşağı yukarı aynı olarak işler. Ancak greftteki başarılı inkorperasyonu etkileyen başka kritik faktörlerde vardır. Bunlar; konağa ait damarsal problemler ve lokal osteojenik özellikler, cerrahın grefti uygularken yaptığı stabilizasyon prosedürleri ve hazırladığı greft yatağı ve bizzat greftin kendi ait por çapı, mineral içeriği, antijenik durum vb özelliklerdir (31,33). İnkorperasyonun miktarı greft materyalinin tipine, greft çevresindeki dokulara ve konağın fizyolojik durumuna göre değişiklik göstermektedir.

III- ORTOPEDİDE KEMİK DEFEKTLERİ VE ONARIMI

(Klinik ve Deneysel Bakış)

Klinik ortopedi de karşılaşılan en büyük sorunlar dan biri, tümör rezeksiyonları, travmalar ve artroplasti revizyonları gibi çeşitli nedenlerle ortaya çıkmış diafizeal kemiklerdeki segmental defektlerin tamir edilmesidir. Bu amaçla birçok biyolojik ve non biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar;

- 1- Allogreftler
- 2- Metal endoprotezler
- 3- Vaskülarize kemik greftleri
- 4- Kallus distraksiyonu'dur

Son yıllarda kemik doku mühendisliğinin ortopedinin ilgi alanına girmesiyle kemik defektlerine bakış açımız değişmiştir. Kemik doku mühendisliği kemik iyileşmesini uyguladığı yöntemlerle manipüle ederek, daha kısa zamanda oluşmuş ve daha güçlü yeni kemik dokusu oluşturmayı amaçlamaktadır (37,64). Kemik doku mühendisliğinin bu amaçla kullandığı yöntemleri üç farklı gruba ayırabiliriz.

- 1- Matriks temelli yöntemler (osteokondüktivite)
- 2- Faktör temelli yöntemler (osteoindüktivite)
- 3- Hücre temelli yöntemler (osteojenite)

Bu yöntemlerle ilgili çalışmaların sayısı son 20 yıldır artmaktadır. Bu yöntemlerin detayları verilecek olan referanslarda bulunabilir (16,33,49). Ancak hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın insanlara uygulanabilecek verileri elde etmenin yolu preklinik çalışmalardan geçmektedir. Bu amaçla insanlardaki segmental kemik defektlerinin onarımı için kullanılacak yöntemleri test etmek için, çeşitli hayvan modelleri oluşturulmuştur. Bu modeller incelendiğinde “kritik ölçüde segmental kemik defekti” kavramı ile karşılaşılır. Bu kavramın anlamı diafizeal bir kemikten segmental bir parça çıkarmaktır. Ancak bu çıkarılan defektin kendi kendine iyileşmemesi gereklidir. İyileşme defekte uygulanacak tedavi yöntemi ile sağlanmalıdır. Defektin kendi kendine iyileşmemesi için ve insanlardaki masif kemik kayıplarını taklit edebilmesi için, çıkartılacak kemiğin bulunduğu kemik çapının en az 2 katı olması gerektiği bildirilmiştir (13,31,61).

Kritik boyutlu diafizeal kemik defektleri geleneksel olarak kemik greftlerinin etkinliğini test etmek için kullanılan metodlardır. Her ne kadar bu defektler herhangi bir greft materyalinin implantasyonu olmadan kendiliğinden iyileşmeseler de, gerçek anlamda bir nonunion modeli olarak kullanılmaları doğru değildir. Çünkü defektin boyutu nedeniyle kırık iyileşmesinin sekteye uğraması, nonunionu oluşturacak anatomik ve fizyolojik özelliklerin oluşmasını engeller. Buna rağmen bu modeller segmental defektlerin yanında, nonunionlar içinde kullanılmaktadırlar. Bu modellerin insanda gözlenilen ortopedik problemleri bire bir yansıtmadığı bir gerçektir. Bunun tek istisnası ise kemik tümörleri ve travmalar sonucu oluşan masif kemik defektleridir. Yani bu hayvan modelleri insanlardaki masif kemik defektlerinin tamiri için çalışılacak tek preklinik deney grubunu oluşturur (32,65,80,97).

Kritik boyuttaki defektlerin tersine, hayvanlarda oluşturulan osteotomi ve kırık modelleri ise insandaki kırık iyileşme sürecini yakın olarak kopya eden modellerdir (37,60). Bu modellerin çoğunda oluşturulan osteotomiler ve kırıklar tedavi uygulanmasına bakılmaksızın iyileşirler. Bu modellerde lokal olarak uygulanan büyüme faktörlerinin veya sistemik olarak verilen stimüle edici ajanın amacı, normal kırık iyileşmesinin hızlandırılması veya güçlendirilmesidir (59,75,79,87).

Deneysel olarak oluşturulan uzun kemik defekt modelleri ve bunların çeşitli osteokondüktif ve osteoindüktif greftlerle tamiri hakkında yapılmış birçok çalışma vardır. (9,12,23,31,33,43,79,87,120). Bu defektler spontan iyileşmeye müsaade etmeyecek boyutta ki, diafizeal segmentin çıkarılması ile oluşturulur. Bunun yanı sıra kraniomandibulofasiyal bölgede de benzer şekilde kritik boyutlu defektler ile ilgili modeller oluşturulmuştur (28,69,84).

Bu konuda yapılan başlıca çalışmalara kısaca değinmek faydalı olacaktır. Einhorn ve arkadaşları demineralize kemik matriksinin rat femurunda 6 mm'lik diafizeal segmentin tamirinde yeterli olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak bu çalışma greftleme olmadan iyileşmeyecek en küçük boyuttaki femoral defekt boyutu hakkında kesin bir bilgi vermemiştir (30). Ardından Yasko ve arkadaşları rat femurlarındaki kritik boyuttaki defekt kavramını, çeşitli boyutlarda defektler çıkartarak yaptıkları deneylerde ortaya koymuşlardır. Greft veya osteokondüktif materyal koymadan iyileşmeyecek defekt boyunu rat femurlarında 5 mm olarak bildirmişlerdir (120). Rat femur modelinin bazı avantajları vardır; defektin iyileşmemesi için gerekli boyut küçük değildir, modelin oluşturulması kolay ve ucuzdur,

tespit materyali olarak internal polietilen plak kullanılırsa mekanik test için tespit materyalinin uzaklaştırılmasına gerek yoktur. Bu model osteoindüktif materyaller ve diğer kemik doku mühendisliği stratejileri için güvenilirlikle kullanılmaya devam edilmektedir (13,14).

Filogenetik benzerlikler nedeniyle ve defekt oluşturma konseptindeki ilerlemeler sonucunda tavşan ulnası kritik boyuttaki defekt modeli için uygun bir lokalizasyon olarak saptanmıştır. Çünkü önkoldaki radius ulna ile dar ve güçlü bir interosseöz membran ile bağlantılıdır. Ayrıca ulnadan büyük miktarda bir diafizal segment çıkartılsa bile radius ulna için bir internal splint olarak görev görür. Tavşan ulnasından çıkarılabilecek diafizal kemik segmenti oldukça fazladır ve böylece insanlardaki klinik uygulamalarla karşılaştırma yapmaya olanak tanır. Segmental defektin çıkarılmasından sonra ulnaya herhangi bir internal veya eksternal tespit materyali uygulamaya gerek yoktur. Bostrom ve arkadaşları tavşan ulnaları için kritik boyutta defektin 2 cm olduğunu bildirmişlerdir (9). Rekombinant insan kemik morfogenetik proteini (rhBMP-2) ile yapılan bir çalışmada tavşan ulnalarında kontrol grubunda defekt iyileşmezken farklı rhBMP-2 dozlarında %50 ve %100 kaynama sağlanmıştır (32).

Her ne kadar pahalı ve sürdürülebilirliği zor olsa da, insanlara uyarlanması en kolay ve güvenilir modelleme, primatlarda yapılan defekt modelleridir. Cook ve arkadaşları yukarıda tavşanlar için anlatılan modelle aynı şekilde maymunlarda 2 cm'lik defekt oluşturmuş ve bir osteoindüktif materyalle iyileşmeyi incelemiştir (23). OP-1 bu çalışmada kullanılan indüktif materyaldir ve yine yukarıdaki sonuçlara benzer şekilde kontrol grubunda iyileşme olmazken 12 hafta sonunda OP-1 implante edilenlerde iyileşme tamamlanmıştır (23).

Yasko ve arkadaşlarının çalışması hariç tümünde greft implante edilmediğinde iyileşmeyen defekt boyları verilmiştir (120). Bu modellerin hepsi de segmental kemik defektlerinin tamirinde güvenle kullanılan çalışma şablonlarıdır ve insanlardaki segmental kemik kayıpları hakkında öngörülerde bulunmamızı sağlayabilirler. Bu modellerin kullanım alanı primer olarak uzun kemiklerdeki segmental defeklerin tamiridir ayrıca bu defektlerin boş bırakıldığında iyileşmediği göz önüne alınırsa ayrıca bir nonunion modeli sayılabileceği söylenebilir. Bundan dolayı bu modellerde kullanılan herhangi bir osteokondüktif matriks, osteoindüktif faktör yada osteojenik potansiyeli olan hücrenin sağladığı kaynamanın insanlardaki hem defekt iyileşmesinde hem de nonunionlarda kullanılabilir olduğu aşikardır.

AMAÇ

Kemik defektleri, ateşli silah yaralanmaları ve trafik kazaları gibi yüksek enerjili travmalardan, tümöral hastalıklara kadar geniş bir etiyolojik yelpazeye sahip, multidisipliner tedavi gerektiren, sık karşılaşılan ve halen çözümü güç olan bir sorundur. Ortopedik cerrahide karşılaşılan kemik defektleri günümüzde çeşitli yaklaşımlarla (allogreftler, endoprotezler, vb.) tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Bu yaklaşımlara ek olarak ortopedik doku mühendisliği de kendi yöntemleri ile bu sorunu çözmeye uğraşmaktadır. Kemik defektlerini tamir etmek için kullanılabilecek en etkili yöntem, defekti otojen kemikle doldurmaktır. Ancak otojen kemiğin defekti tamamen dolduracak miktarda sağlanamaması, morbiditesinin olması gibi dezavantajları vardır. Bu noktadan hareketle genel bilgilerde anlatılan greft çeşitlerinin kombinasyonu ile otojen greftin etkinliğine eşit kompozit greftler oluşturulmaya çalışılmaktadır. Biz de çalışmamızda otojen greftin yerine kemik defektlerinin kapatılmasında kullanılabilecek bir kompozit greft olan Demineralize Kemik Tozunun iyileştirme potansiyelini tek başına ve otojen greftle 1:1 oranında karıştırıp, tavşan ulnalarında oluşturulan kritik boyutlu segmental kemik defektlerine uygulayarak araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmanın muhtemel klinik önemini ve beklentilerimizi beş maddede sıralayabiliriz.

- 1- Kompozit greftler ile kapatılan defekt sonuçta konağa ait kemik doku ile tamir edildiğinden biyolojik bir tamir yöntemidir.
- 2-Kompozit greftler tek başına kullanılarak otojen kemiğin yerini alabilir ve otojen kemiğe olan ihtiyacı ortadan kaldırabilir.
- 3-Otojen kemiğin tek başına yetersiz kalacağı boyuttaki defektlerde, otojen kemikle beraber kullanılarak iyileşme potansiyelini arttırarak otojen kemiğe duyulacak ihtiyacı azaltabilir.
- 4- Kompozit greftler konakçı morbiditesini azaltabilir, hasta için daha konforlu bir tedavi süreci sağlayabilir.
- 5-Kompozit greftler kemik iyileşme cevabını güçlendirerek tedavi süresini kısaltabilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Tavşan ulnalarında oluşturulan kritik boyutlu segmental diafizeal kemik defektinin kompozit bir greft kullanılarak tamir edilmesini amaçlayan çalışmamızın detayları aşağıda verilmiştir. Ostokondüktif ve osteoindüktif etkisi kanıtlanmış olan Demineralize Kemik Matriksi tavşan ulnalarında oluşturulan segmental defekte tek başına ve kansellöz otojen iliak kanat grefti ile kombine edilerek implante edildi. Deneye katılan hayvanlar defektin iyileşmesi için öngörülen süre olan 12 hafta sonrasında sakrifiye edildiler. Ekstremiteler iyileşmenin kantitatif ve kalitatif olarak incelenmesi amacıyla çeşitli ölçümlere tabi tutuldu.

Çalışmamızda kullandığımız deneysel modeli 3 ana başlık altında inceleyebiliriz.

I- Allojenik tavşan demineralize kemik matriksi sentezi.

II- Deney gruplarının belirlenmesi ve greftlerin implantasyonu.

II- Değerlendirme

I- ALLOJENİK TAVŞAN DEMİNERALİZE KEMİK MATRİKSİ SENTEZİ

Demineralize Kemik Matriksi (DBM) çalışmamızda kullanılması amaçlanan, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri beraber taşıyan bir greft materyalidir. Bu greft materyali çalışmamızda GATA Farmakoloji A.D. ve ODTÜ Biyoteknoloji B.D. tarafından sağlanmıştır. Demineralize kemik matriksinin elde edilmesi için çalışmamızda kullanılacak tavşanlarla aynı cins (New Zeland, White Rabbit) hayvanlardan taze olarak alınan kemikler Reddi-Huggins'in tarif ettiği metod kullanılarak işlendi (88,89,120).

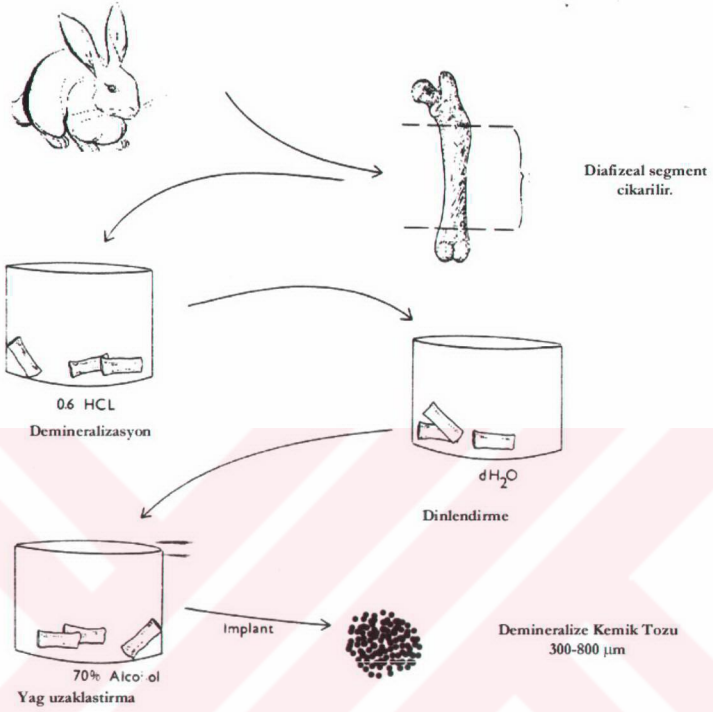
1- Allojenik kemiğin donör hayvanlardan alınması: Tavşanlar yüksek doz indüksiyon anestezi ile sakrifiye edildiler. Ardından tibia, femur ve humerusları dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Ardından kemiklerin üzerindeki tüm yumuşak doku ve periosteum temizlendi. Kemiklerin sadece diafizeal bölümleri kalacak şekilde metafizeal ve epifizeal bölümleri uzaklaştırıldı. İntramedüller kemik iliği distile su ile ortamdan uzaklaştırıldı ve kemik iyice yıkanarak yüzeydeki tüm organik kalıntılar ve hücre debrisleri tamamen temizlendi ve sonraki aşamalara hazır hale getirildi (Şekil 1-2).

2-Yağ uzaklaştırma ve demineralizasyon: Hazırlanmış diafizeal kemik parçalarındaki yağın uzaklaştırılması amacıyla %70'lik alkolde ve eter içinde tutuldu. Sonra 24 saat süre ile kurutulmaya bırakıldı. Ardından kemikler porselen havanda parçalanarak toz haline getirildi.

Kurutulmuş kortikal kemik metal eleklerden geçirilerek 800 µm'den daha büyük partiküller uzaklaştırıldı. Elde edilen kemik tozu her gram için 50 ml 0.5 N HCL içinde 48 saat bekletildi. Bu süre içinde iki kez asit değişimi yapıldı. Demineralize edilen kemik tekrar kurutulmaya bırakıldı ve son kez elenerek partikül büyüklüğü açısından 50-300µm ve 300-800µm boyutlarında iki gruba ayrıldı (1,29,30,34,35,74,94,123). Deneyde oluşturulan defektlere 300-800 µm çapındaki demineralize kemik tozu implante edildi.

3- Sterilizasyon: Bu işlemlerin sonucunda demineralize kemik tozu etilen oksit ile sterilize edildi. Sterilizasyon esnasında ısıнын en düşük olduğu ve etilen oksit ile kontaminasyon süresinin en kısa olduğu sterilizasyon tipi seçildi. Bu amaçla Steri Vac 4 XL gas sterilizer, 3M Company, St. Paul, Minesota, USA, cihazı kullanıldı. Sterilizasyon sürecinde en yüksek ısı 38°C, etilen oksite maruz kalma süresi 90 dakika ve toplam sterilizasyon süresi 4.5 saat olarak belirlendi. Sterilizasyondan sonra greftler 24 saat normal oda sıcaklığında havalandırıldı.

4- Saklama:Demineralize kemik tozu kullanılıncaya kadar – 70 °C de saklandı. Bu amaçla VF-240-86, deep freezer, Snijders Scientific, Holland, cihazı kullanıldı.



Şekil 1: Demineralize kemik matriksinin elde edilmesi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2: DBM üretmek için kurban edilen hayvanların diafizeal kemik segmentleri dikkatli bir şekilde temizlendi. Sonuçta demineralize kemik tozu (300 -800 µm) elde edildi.

II- DENEY GRUPLARININ BELİRLENMESİ VE GREFTLERİN İMPLANTASYONU

A- Deneysel hayvanlarının tanımı ve sayısı:

İn vivo deneylerde ağırlıkları 2090 ± 390 g (1500g – 3000g) olan 6 aylık erkek Yeni Zellanda tavşanlarının kullanılması planlanmıştır. Projede erişkin 27 beyaz tavşanın her iki ön kolu (54 ön kol) kullanılmıştır. Tavşanlar ve bunların bakımları deney süresince GATA hayvan barınağında sağlandı. Cerrahi öncesi tavşanlar bir hafta boyunca optimal sağlık şartlarının sağlanması ve enfeksiyondan korunmaları için hayvan barınağında bakıma ve ön hazırlığa tabii tutuldular.

B-Araştırmaya dahil olma ölçütleri:

Araştırmada GATA Araştırma Merkezi Başkanlığınca yetiştirilen 6 aylık sağlıklı erkek beyaz Yeni Zellanda tavşanları kullanıldı. Tavşanların ön kollarında kemik anomalisi olup olmadığı cerrahi öncesinde fizik muayene ve gerekirse radyografi ile araştırıldı.

C-Araştırmadan çıkarılma ölçütleri:

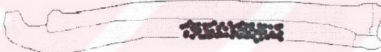
Cerrahi sonrasında ön kollarında kırık veya derin enfeksiyon gelişen tavşanlar çalışmadan çıkartıldılar.

D-Deneysel grupları ve sayısı:

Deneyde kullanılan tavşanlar 5 gruba ayrıldı. 1. gruptaki 7 hayvana (14 ekstremite) otojen iliak kanat kaynaklı kansellöz greft uygulanması planlandı. 2. gruptaki 7 hayvana (14 ekstremite) demineralize kemik tozu uygulanması planlandı. 3. gruptaki 7 hayvana (14 ekstremite) demineralize kemik tozu ve otojen iliak kanat kaynaklı kemik 1:1 oranında uygulanması planlandı. 4. gruptaki 3 hayvana (6 ekstremite) defekt oluşturulması ancak herhangi bir greft materyali konulmaması planlandı (- kontrol grubu). 5. gruptaki 3 hayvana (6 ekstremite) operasyon uygulanmaması, kemiklerin intact bırakılması planlandı (+ kontrol grubu), (Tablo 2-3).

Grup	Hayvan sayısı	Ekstremité sayısı	Greft uygulaması
1	7	14	Otojen iliak kanat grefti
2	7	14	DBM
3	7	14	DBM+ Otojen iliak kanat grefti
4	3	6	Defekt oluşturuldu, boş bırakıldı, (-) kontrol
5	3	6	Defekt oluşturulmadı, intakt bırakıldı, (+) kontrol

Tablo 2: Deney grupları, hayvan – ekstremité sayısı ve kullanılan greft materyalleri özetlenmiştir

Grup 1		<i>Otojen Greft</i>
Grup 2		<i>DBM</i>
Grup 3		<i>DBM + Otojen Greft</i>
Grup 4		<i>Boş Defekt</i>
Grup 5		<i>Defekt Yok</i>

Tablo 3: Deney grupları ve implante edilen materyaller şematik olarak gösterilmiştir.

E-Cerrahi Prosedür:

Defekt oluşturulması

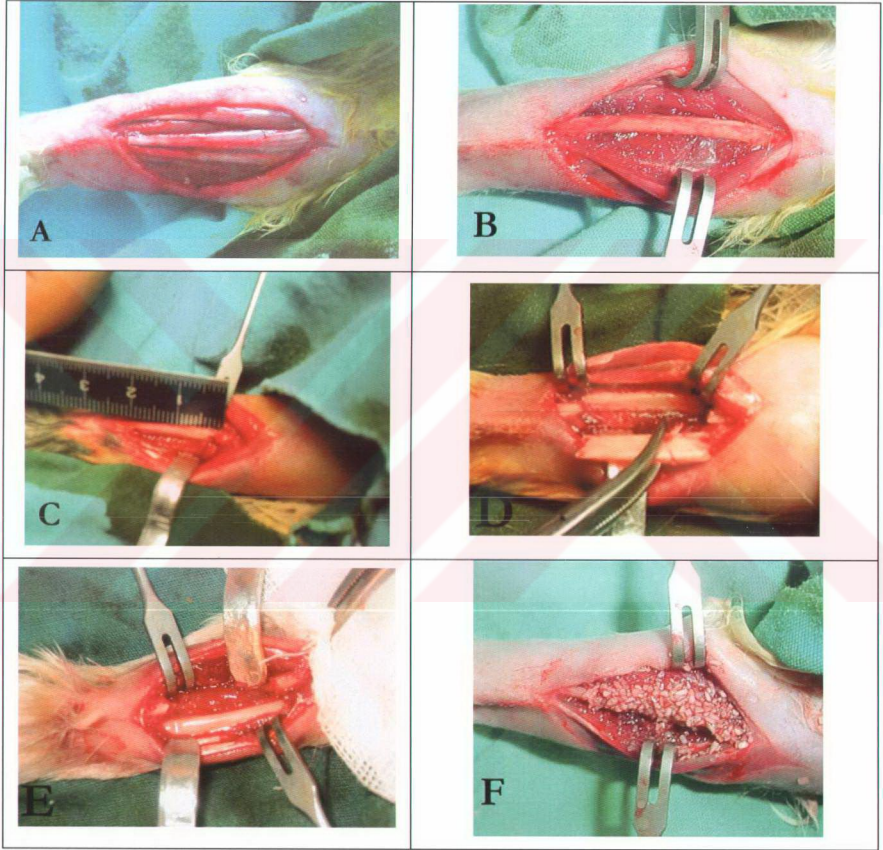
Deneyde kullanılan tavşanlar asepsi antisepsi kurallarına uyularak preoperatif başlayıp postoperatif 7. güne kadar devam eden 5 mg\ kg penesilin kristalize ile profilaksi altına alındılar. Cerrahi işlem sırasında hayvanlara öncelikle indüksiyon anestezisi uygulandı (I.M.

ketamine ve rompun, 25 -50 mg/kg). Ardından inhalasyon anestezisi (halotane ve O₂ karışımı) uygulanıp, operasyona bu şekilde devam edildi. Tavşanların her iki önkolü ve sol iliak kanatlarındaki tüyler traş edildi ve insizyon bölgeleri cerrahi sabun ile temizlenerek operasyona hazır hale getirildi. Tavşanların ulnasına lateral yaklaşım ile ortalama 5 cm lik insizyonla girildi. Dikkatli bir eksplorasyon ile ekstansör ve flaksör kaslar arasından unlaya künt disseksiyonla ilerlenerek ulaşıldı Ulna diafizi boyunca ekspoze hale getirilerek, defektin oluşturulma safhasına geçildi. Defektler tavşanların ön kollarında ulna üzerinde distal radioulnar eklemin 1.5 cm proksimalinden başlayarak 2 cm daha proksimale uzanan diafizal segmentin çıkarılmasıyla oluşturuldu. 2 cm'lik defekt oluşturulurken proksimal ve distal uçlar osteotomi noktaları belirlenip, drill ile delindikten sonra osteotom kullanılarak osteotomi tamamlanarak 2 cm lik diafizal segment periostuyla beraber çıkartıldı. Defekt hattındaki kemik iliği ve kemik parçacıkları SF ile yıkanarak dikkatli şekilde ortamdan uzaklaştırıldı. Radiuslar intakt olarak bırakıldı ve internal splint olarak görev gördüğü için herhangi bir internal veya eksternal tespit materyali kullanılmadı.

Defekte greft materyallerinin yerleştirilmesi:

İmplantasyondan önce lokal kemik debrisleri ve yayılmış olan ilik hücreleri dikkatli bir yıkamayla ortamdan uzaklaştırıldı. Tavşanların iliak kanatlarından yaklaşık 4 cm'lik insizyon yapıldıktan sonra künt disseksiyon uygulanarak iliak kanata ulaşıldı ve pens kupon yardımıyla ortalama 3-4 cm² otogreft alındı. Alınan greft yaklaşık 1- 2 mm'lik parçalara ayrılarak morsolize hale getirildi ve uygulamaya hazırlandı. Otojen greft (grup 1) defektin her iki tarafındaki kemikle temas sağlayıp, defekti tamamen dolduracak tarzda kullanıldı. Demineralize kemik tozu ise bir defekt için ortalama 200 mg olacak şekilde (grup 2) kullanıldı (8). DBM kullanılmadan önce SF ile hidrate edildi ve ardından defekti tamamen kapatıp her iki taraftaki osteotomi hattı ile temas sağlayacak şekilde kullanıldı. Demineralize kemik tozu ve otojen greft uygulanırken (grup 3) yaklaşık 100 mg DBM ve 1.5 cm² lik otojen iliak kanat grefti kullanıldı. (-) kontrol grubunda ise (grup 4) defekt oluşturulduktan sonra boş bırakıldı, herhangi bir greft implantasyonu yapılmadı. (+) kontrol grubuna ise (grup 5) hiçbir operatif girişimde bulunulmadı. Opere edilen hayvanlarda, iliak kanat ve önkoldaki operasyon sahalarında, kanama kontrolünü takiben kas poşu ve fasiya 4/0 vikril ile, cilt altı 4/0 vikril ile kapatıldı. Cilt ise 3/0 ipek ile kapatıldı. Cerrahi yerinin kapatılması sonrası kontaminasyonu önlemek için yara yerinin üzerine iyot solusyonu ile pansuman yapıldı, opsite ile örtüldü ve operasyona son verildi (Şekil 3).

Cerrahi sonrası tavşanların serbest hareketlerine izin verildi. Gün aşırı yara yeri kontrolü yapıldı. Tavşanların yeterli su ve yem ile beslenmelerine olanak sağlandı. Tüm işlemlerde Türk Veteriner Hekimliği Medikal Deontoloji Kanunu (6343/ 2; 6.7.26) ve hayvan haklarını içeren Helsinki Deklerasyonuna bağlı kalındı.



Şekil 3: Tavşan ulnasında kritik boyutta defekt oluşturulması ve greft implantasyonu A) Ön kola lateral insizyonla girilmesi. B) Ulna diafizini ortaya çıkaracak şekilde önkoldaki ekstansör ve fleksör kas gruplarının eksplorasyonu. C) Diafizde oluşturulacak defektin ölçülmesi ve drill kullanılarak osteotomi hattının belirlenmesi. D) Osteotominin proksimal ve distalde tamamlanarak, 2 cm'lik segmentin çıkarılması. E) Oluşturulan segmental defektin ortaya konması. F) Defekte greft materyalinin (DBM) implantasyonu.

F- Kontrol grupları ve süreleri:

Her gruptaki tavşanlar için 3, 6, 9 ve 12. haftalarda radyolojik kontroller planlandı. Tavşanlar bu kontrol sürelerinde randomize olarak incelemeye alındılar. Kontrol sürelerindeki radyografik incelemeler, tavşanlar sedatif anestezi altındayken gerçekleştirildi. 12. haftada defekt bölgelerinde kemik mineral dansitometresi ölçümleri yapıldıktan sonra tavşanlar sakrifiye edildiler ve ekstremiteleri çıkartıldı. Bu ekstremitelerde nihai radyolojik ve histolojik incelemeler uygulandı.

G- Çalışma Sonu Deney Hayvanlarına Yapılacak İşlem

Deney süresinin sonunda (12. haftanın ardından) tavşanlar, cerrahi öncesinde olduğu gibi yüksek doz anestezi uygulanarak sakrifiye edildiler. Deney süresince tavşanlara verilen maddeler insan sağlığını tehdit etmemektedir, ancak deney bitiminde ekstremiteleri alınıp çeşitli testler uygulanacağından tavşanların tüketime sunulmamışlardır.

III-DEĞERLENDİRME

Deney gruplarında kaynamanın ve defektin iyileşmesinin tespiti için radyolojik, mekanik ve histolojik incelemeler yapılmıştır. Testler 6 ana grupta gerçekleştirildi.

A-Konvansiyonel ve Dijital radyografi

B-Yüksek çözünürlüklü radyografi (Faxitron)

C-Gross inceleme

D-Kemik yoğunluğu ölçümü

E-Histoloji

F-Hücre kültür çalışması

A-Konvansiyonel ve Dijital radyografi

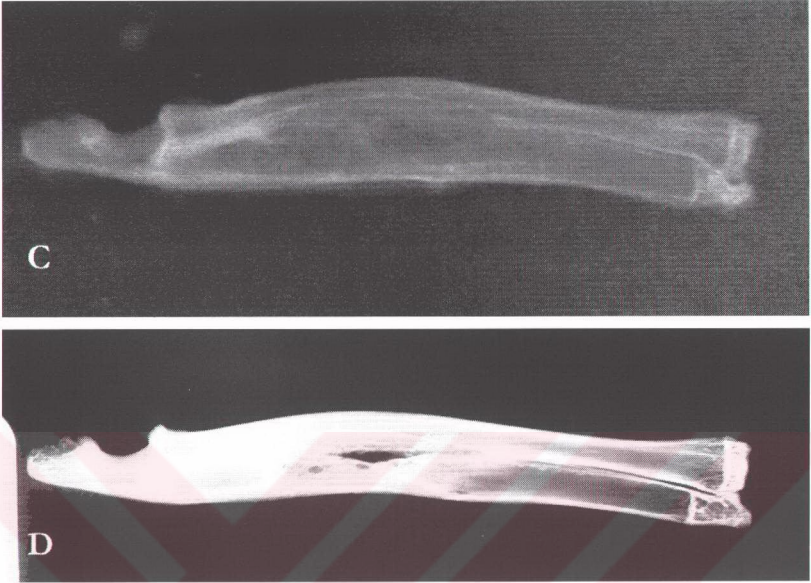
3-6-9-12. haftalarda hayvanlar ketamin anestezisi altında konvansiyonel radyografi ile defekt iyileşmesinin tespiti amacıyla incelendiler. Kontrol sürelerindeki radyografiler için GATA Ortopedi ve Travmatoloji AD'da bulunan GE AMX 4 Plus, General Electric Company, USA, mobil röntgen makinesi kullanıldı. Ekstremitte grafileri 44 kV ve 3.2 mAs'de çekildi. Çekilen radyografiler Medipod 902 S, Calenta Labortechnik GmbH, Germany, film banyo cihazı kullanılarak banyo edildi.

Sakrifikasyonun ardından tavşanların ön kolları dirsek ve bilek seviyelerinden dezartiküle edildi. Detaylı radyolojik inceleme için ekstremite GATA Radyoloji AD'da bulunan dijital röntgen cihazı kullanıldı. Bu amaçla GE Prestige EV, General Electric Company, USA, makinesi kullanıldı. Ekstremitelerin röntgenleri 72 kV, 3,2 mAs'de çekildi. Cihazın tüpü örneklerden 100 cm uzakta iken röntgen ışınları ulna diafizine tam dik olarak gönderildi. Dijital ortama aktarılan veriler 3 kat magnifiye edildikten sonra röntgen filmine baskı yapıldı.

B- Yüksek çözünürlüklü radyografi (Faxitron)

Sakrifikasyondan sonra ekstremitelerdeki yeni kemik oluşumunun, kortikalizasyon ve kaynamanın daha detaylı incelenmesi amacıyla yüksek çözünürlüklü radyografisi çekildi. Bu amaçla GATA Radyoloji AD'da bulunan Mammomat 3, Siemens Electronics, Germany, cihazı kullanıldı. Röntgenler 24 kV, 16 mA'de çekildi. Bu cihaz x-ray ışınlarını özel bir süzme ve miktarda uygulamaktadır. Bu teknik sonucunda yüksek çözünürlükte ve kaliteli görüntü elde edilmektedir (Şekil 4).





Şekil 4: Değişik röntgen makineleri ile çekilmiş röntgen filmleri. A) 9. haftada konvansiyonel röntgen makinesi ile çekilmiş radyografi. B) Sakrifikasyon sonrası konvansiyonel röntgen makinesi ile çekilmiş radyografi. C) Sakrifikasyon sonrası dijital röntgen makinesi ile çekilmiş radyografi. D) Sakrifikasyon sonrası yüksek çözünürlüklü röntgen makinesi ile çekilmiş radyografi.

Radyografik Değerlendirme Kriterleri

Değerlendirme aşamasında sakrifikasyondan sonra elde edilen magnifiye dijital görüntüler (GE Prestige EV, General Electric Company, USA) ve yüksek rezolüsyonlu grafiler (Mammomat 3, Siemens Electronics, Germany) kullanıldı. Deney gruplarından alınan radyografilerin değerlendirilmesinde Lane tarafından tarif edilen yöntem kullanıldı (65). Bu kriterlere göre defekt iki açıdan incelendi (Şekil 5).

1- Defektte Kaynama: Bu kriterde bakılan parametre defektin her iki tarafı ile kaynama sağlamış, köprüleşme yapmış yeni kemik dokusunun varlığıdır. Burada geçerli olan kaynama miktarı diafiz çapının en az %25'i kadar kalınlıkta yeni kemik dokusunun defekti doldurarak, defektin her iki ucunda konağa ait kemikle kaynamış olmasıdır.

2- Defektteki yeni kemik oluşumu ve remodeling: Bu amaçla 5 bölüme ayrılan puanlama sistemi kullanıldı.

0 puan	Yeni kemik oluşumu hiç yok.
1 puan	Defekt %0 - % 25 oranında yeni kemikle dolu.
2 puan	Defekt % 26 - %50 oranında yeni kemikle dolu.
3 puan	Defekt % 51 - %76 oranında yeni kemikle dolu.
4 puan	Defekt % 76 - %100 oranında yeni kemikle dolu.

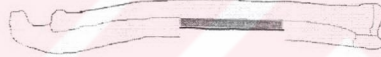
Puan: 0



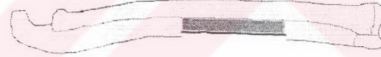
Puan: 1



Puan: 2



Puan: 3



Puan: 4



Şekil 5: Radyolojik değerlendirme kriteri olarak kullanılan Lane skalasının şematik görünümü.

C- Gross İnceleme

Ekstremiteler dissekte edildikten sonra etrafındaki yumuşak dokular tamamen temizlenerek, defekt bölgesi ortaya konduktan sonra değerlendirilme yapıldı. Bu amaçla; defektin ne tür bir doku ile kapanmış olduğu, yeni oluşan dokunun şekli, defektte korteks oluşumu, kemik iliği alanlarının varlığı ve ulnanın gross stabilitesi açısından ekstremiteler incelendi.

D-Kemik yoğunluğu ölçümü

12. hafta sonunda tüm hayvanların defekt bölgesindeki kemik mineral yoğunlukları ölçüldü. Kemik yoğunluğu, Dual-energy X-ray absorptiometry tekniği kullanılarak ölçüldü. Bu amaçla Lunar ACT, Lunar Corporation, USA, DEXA cihazı ve software for small animals yazılımı kullanıldı. Ölçüm esnasında önce xray ve laser ışını ile tüm ön kol tarandı, ardından ulnadaki defekt bölgesi belirlendi ve işaretlendi. İşaretli bölgelerin ortalama boyutu 2cmx 0.5 cm idi. İşaretli bölgeden kemik mineral dansitometresi (BMD, gr/cm²) ölçümü yapıldı (73).

E- Histoloji

Bu amaçla ayrılan ekstremiteler %70 lik formaldehit içinde 7 gün boyunca fikse edildiler. Ardından % 10 formik asitte 6 gün süreyle dekalsifiye edildiler. Örnekler daha sonra sodyum sülfate işlenerek yeniden tesbit edildi. Örnekleme işleminde ilk olarak hem radiusu hemde ulnadaki defekti içine alan sagittal kesit kullanıldı. Bu işlemde defekt hattı ve her iki tarafındaki sağlam kemiğin örnekleme alanına alınmasına dikkat edildi. Dereceli alkolle dehidratasyonu takiben parafin bloklara alındılar. İnceleme için her ekstremitte için 5 µm kalınlıkta en az 6 kesit alındı. Boyama işleminde Hematoksilin – Eozin ve Masson trikrom boyaları kullanıldı. Örnekler, Olympus BH – 7 ışık mikroskopunda değerlendirildiler. Değerlendirmeler bağımsız iki patoloji uzmanınca gerçekleştirildi.

Histolojik – Histomorfometrik Değerlendirme Kriterleri:

Histolojik değerlendirme yapılırken; yeni kemik oluşumu, defektteki lamellar ve primer kemiğin birbirine oranı, kortikalizasyon oranı, kemik iliği elemanlarının yeni oluşan kemikteki oranları, osteotomi uçlarındaki greft ile sağlam kemik arasındaki kaynama gibi parametrelere öncelikle dikkat edildi. Ayrıca histolojik değerlendirme parametresi olarak semikantitatif skala kullanıldı (35).

a- Kaynama

0 puan	Nonunion
1 puan	Tek taraflı kortikal kaynama veya korteks genişliğinin yarısı kadar.
2 puan	Çift kortikal kaynama veya korteks genişliğinin tamamı kadar.

b- Yeni kemik hacimi

0 puan	Kemik yok
0.5 puan	Yetersiz kemik
1 puan	Zayıf ölçüde yeni kemik
1.5 puan	Orta derecede yeni kemik
2 puan	Aşırı yeni kemik

F-Hücre kültür çalışması:

12. haftada hayvanlar sakrifiye edilirken grup 1, 2 ve 3'ten defekt bölgesinden kansellöz kemik alındı ve defekti kapatan yeni kemik dokusundaki osteoblastik hücrelerin kültüre edilerek fenotiplerinin ortaya konması amaçlandı. Kültür ortamında üretilen hücrelerin osteoblastik fenotipleri ise invitro ALP seviyesinin tespiti ile yapıldı.

Biopsi ile cerrahi sırasında defekt bölgesinden alınan kansellöz kemik materyali steril olarak taşınarak mümkün olan en kısa zamanda laboratuara ulaştırıldı. Labaratuarda kemik PBS içeren petri kutularına kondu. Yıkamanın ardından kemikler flasklara aktarıldı, bu aşama primer kültür aşaması olup flasklara besleyici medium olarak primer medium kondu. Flasklar nemli atmosferde ve % 95 hava ve % 5 CO₂ içeren inkübatörlerde kültüre edildiler. Flask içindeki mediumlar 3 günde bir değiştirildi ve bu işleme 14. güne kadar devam edildidi. Bu esnada kemikten flaska yapışan hücreler invert mikroskopta değerlendirildi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra kolonize edilmeleri amacıyla sekonder kültür ortamına alındılar. Bu safhada ise flasklara sekonder medium ile üç günde bir medium değişimi yapılarak inkübatör içinde 12 gün daha tutuldular. İnvirt mikroskopta yeterli yoğunluğa erişen hücrelerde ki osteoblastik fenotipin kanıtlanması amacıyla ALP aktivitelere bakıldı.

Alkalen fosfataz aktivitesinin tayini sekonder kültür ortamında yapıldı. Bu enzim osteoblastlarda yüksek oranda bulunan intrasellüler bir proteindir. ALP ölçümü için kullanılan metod Lowry ve arkadaşlarınca tarif edilen tekniktir (4,70). P -nitrofenilfosfat'ın substrat olarak kullanılması esasına dayanır. Genelde 410 nm'de spektrofotometrik absorbans ölçümü ile hem total protein hem de ALP hesaplamaları yapılabilir. Sonuçlar mU/mg protein veya U/mg protein olarak elde edilmektedir. ALP aktivitesi hem bir idantifikasyon testi (osteoblastik fenotipin kesin olarak ortaya konması için) hem de hücresel aktivitenin kantitatif ölçümü amacıyla kullanılabilir.

ALP ölçümü yapılmadan önce hücreler birkaç basamaktan oluşan bir prosedüre tabi tutulurlar. Hücreler kültür kabından alınarak, mediuumu ile beraber santrifüje edildi, ardından süpernatant alınarak üzerine soğuk PBS eklenerek tekrar santrifüje edildi. Süpernatantın üzerine Tris HCl eklenerek hücreler mekanik olarak parçalandı. Elde edilen materyalin üstüne proteaz inhibitörü eklenerek tekrar santrifüje edildikten sonra yukarıda tanımlanan metoda göre ölçümü yapıldı.

BULGULAR

2. gruptan bir tavşan erken post operatif komplikasyon sonucu postop 3. günde ex oldu. Yine 2. gruptan bir tavşanın takipleri sırasında sol radiusunda kırık oluştu ve bu ekstremitesi de çalışma dışı bırakıldı. Diğer hayvanların tümünde normal yara iyileşmesi komplikasyonsuz olarak tamamlandı (hem ekstremitelerinde, hem iliak kanatlarında) ve hiçbir tavşanda derin enfeksiyon gelişmedi. Çalışma dışı bırakılan üç ekstremitelik hariç (grup 1), tüm ekstremitelerde çalışma dışı kalmalarını gerektirecek hiçbir komplikasyon gelişmedi ve hepsi 12. haftaya ulaşılar.

1- Radyolojik İncelemeler:

Grup 1, 2 ve 3'te yeni kemik dokusunun üçüncü haftada yapılan röntgen incelemelerinde oluşmaya başladığı izlendi. Bu aşamada radyolusent olan demineralize kemik matriksi (grup2) etrafında dens dokuların oluşmaya başladığı görüldü. Grup 1 ve grup 3'te ise kemik doku oluşumu ve radyodens alanların grup 2'ye göre daha baskın olduğu izlendi. Negatif kontrol grubunda (grup 4) yeni kemik oluşumu hiç başlamadı. Gross olarak grup 1, 2 ve 3'te 12. haftada post mortem dönemde yapılan röntgen incelemelerinde yeni oluşan kemiğin dansitesinin normal kemiğe göre daha az olduğu izlendi. Yeni kemikte kortikal düzensizlik mevcuttu ve korteksin sağlam tarafa göre daha ince olduğu izlendi. Gruplardaki yeni kemik oluşum oranları, kaynama oranları ve bu parametrelerin zamana göre dağılımı (Lane skalasına göre) aşağıda verilmiştir (Tablo 4).

Otojen kansellöz kemik (Grup 1):

3. haftada yeni kemik oluşumu defekt bölgesinde 8 ekstremitede (% 57.1) mevcuttu, 6. haftada yeni kemik oluşumu ve lokal dansite artmaya giderek artmaya başlayarak, 10 ekstremitede (%71.4) izlendi. Bu safhada defektin her iki tarafındaki konağa ait kemikle kaynama belirtileri görüldü. 12. haftada ise defekt içinde köprüleşme 14 ekstermitenin 13'ünde (% 92.8) izlendi. Defektin hacimsel olarak kapanması ise 12. hafta sonunda; 3 evre 3 (%21.4) ve 11 evre 4 (%78.6) olarak belirlendi (Şekil 6).

Demineralize kemik matriksi (Grup2):

3. haftada yeni kemik oluşumu defekt bölgesinde 6 ekstremitede (% 54.5) mevcuttu, 6. haftada yeni kemik oluşumu ve lokal dansite giderek artmaya başlayarak, 7 ekstremitede

(%63.6) izlendi. Bu safhada defektin her iki tarafındaki konağa ait kemikle kaynama belirtileri görüldü. 12. haftada ise defekt içinde köprüleşme 11 ekstermitenin 8'sinde (%72.2) izlendi. Defektin hacimsel olarak kapanması ise 12. hafta sonunda; 4 evre 3 (%36.4) ve 7 evre 4 (%63.6) olarak belirlendi (Şekil 7).

Demineralize kemik matriksi + otojen kansellöz kemik (Grup 3):

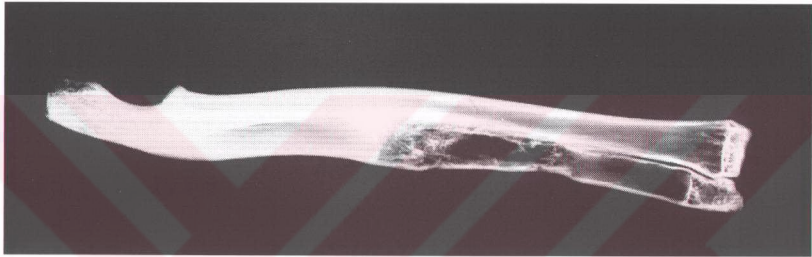
3. haftada yeni kemik oluşumu defekt bölgesinde 9 ekstremitede (% 64.2) mevcuttu, 6. haftada yeni kemik oluşumu ve lokal dansite artmaya giderek artmaya başlayarak, 12 ekstremitede (%85.7) izlendi. Bu safhada defektin her iki tarafındaki konağa ait kemikle kaynama belirtileri görüldü. 12. haftada ise defekt içinde köprüleşme 14 ekstermitenin hepsinde (%100) izlendi. Defektin hacimsel olarak kapanması ise 12. hafta sonunda; 14 evre 4 (%100) olarak belirlendi (Şekil 8).

Defektin boş bırakıldığı negatif kontrol grubu (Grup 4):

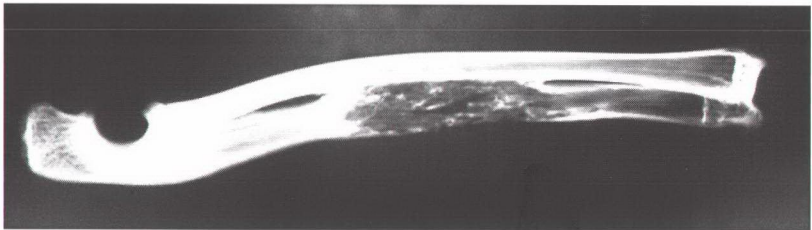
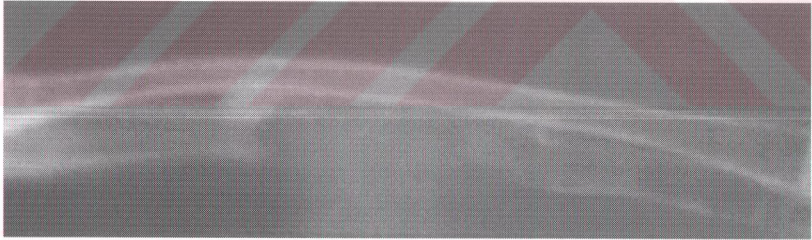
Defekt bölgesinde herhangi bir kemik oluşumu izlenmedi. Ancak osteotomilerin yapıldığı bölgelerde kemik uçlarında zayıf bir kemik oluşumu görüldü. 12 hafta sonunda hiçbir defekte köprüleşme izlenmedi. Defektin hacimsel olarak kapanması 12 hafta sonunda; 4 evre 0 (%66.6), 2 evre 1 (%33.3) olarak izlendi (Şekil 9).

Defektin oluşturulmadığı pozitif kontrol grubu (Grup 5):

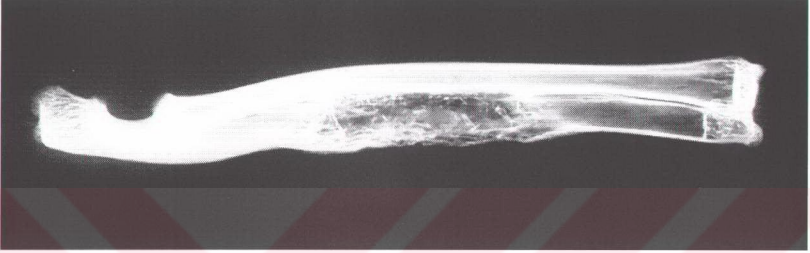
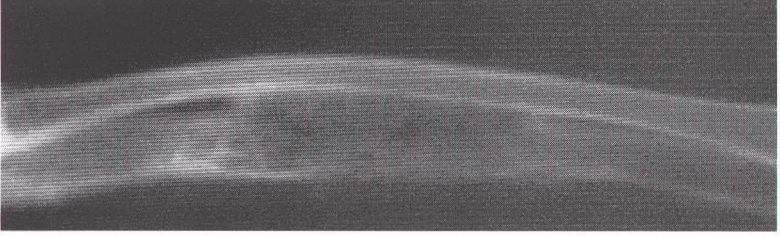
Deney süresi boyunca yapılan kontrollerde kemik yapıda her hangi bir değişiklik izlenmedi (Şekil 10).



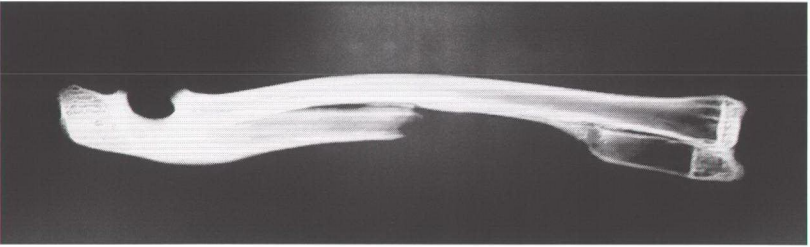
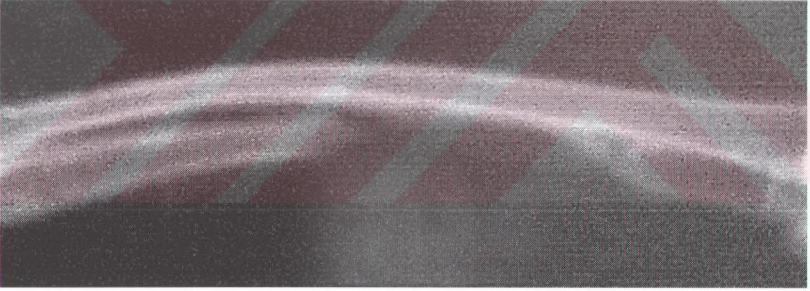
Şekil 6: Otojen ilak kanat grefti ile tamir yapılan 1. grupta 6. ve 12. haftalardaki radyolojik görünüm.



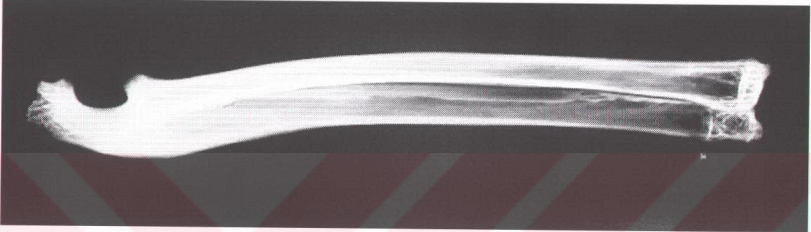
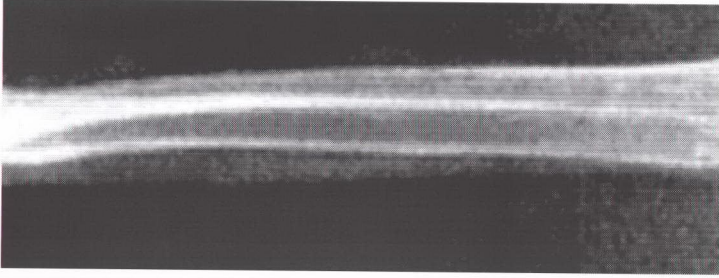
Şekil 7: Demineralize kemik matriksi ile tamir yapılan 2. grupta 6. ve 12. haftalardaki radyolojik görünüm.



Şekil 8: Demineralize kemik matriksi ve otojen kansellöz greft ile tamir yapılan 3. grupta 6. ve 12. haftalardaki radyolojik görünüm.



Şekil 9: Defekt oluşturulup greft materyali implante edilmeyen (-) kontrol grubunda (grup4), 6. ve 12. haftalardaki radyolojik görünüm



Şekil 10: Defekt oluşturulmayan (+) kontrol grubunda (grup 5), 6. ve 12. haftalardaki radyolojik görünüm.

Gruplar	Kaynama Oranları 12. hafta	Defektin hacimsel tamiri (evre 4)
Grup 1	%92.8	%78.6
Grup 2	%72.2	%63.6
Grup 3	%100	%100
Grup 4	%0	%0
Grup 5	-	-

Tablo 4: Grupların 12 hafta sonundaki radyolojik değerlendirme kriterlerine göre sonuçları.

2 - Gross inceleme:

Sakrifikasyon sonrası tavşanların önkollarına bilek ve diz dezartikülasyonu uygulandı. Ön kollarındaki tüm yumuşak dokular temizlenerek ulna ve radius tamamen ortaya kondu. Radyografik olarak elde edilen kaynama görüntüleri ve stabilite gross olarak test edildi. Defekti dolduran dokunun niteliği ve hacmi, kaynama şekli, kortikalizasyon, kemik iliği oluşumu gibi parametreler her grup için ayrı ayrı incelendi. Gross inceleme ile elde edilen bulgular radyolojik bulgulara eşlik etmekteydi. Grup 1, 2 ve 3'te uygulanan greftler defekti doldurmuş ve konağa ait kemikle köprüleşme sağlamıştı. Grup 4'te defektin kemik doku ile dolmadığı fibröz doku ile dolduğu gözlemlendi. Grup 5'te ise ulna intaktı.

Ulnadaki defektin yeni kemik ile dolduğu gruplarda, greft bölgesi ve çevresinde ince bir fibrotik doku mevcuttu ve normal periosteum ile devam etmekteydi. Ayrıca yeni oluşan kemik radiusla rijit, osseöz bir sinostoz da oluşturmuştu. Kemik iliği yeni oluşan kemik içinde devamlı bir hat boyunca veya odaksal gruplanmalar halinde yerini almıştı. Defekte yeni oluşan kemiğin boyutu, şekli ve defektin proksimal-distalindeki ulnaya kaynaması açısından gruplar arasında bazı farklılıklar mevcuttu. Özellikle DBM'in tek başına implante edildiği gruptaki bazı ekstremitelerde kemik hacmi, grup 1 ve 3'e göre daha azdı. Kortikal yapı ve yeni oluşan kemiğin hacmi, DBM + otojen kansellöz kemik grubunda (grup 3) daha fazla olarak izlendi. Gross olarak grup 1, 2 ve 3'te defektin stabilitesinin yeterli olduğu izlendi. Grup 4'te ise defekt bölgesindeki doku anstabil ve frajildi. Genel gözlem sonucunda grup 1, 2 ve 3'te yeterli kemik dokusunun oluştuğu, ancak gross inceleme kriterleri sonucunda, grup 1 ve 3'ün gross morfolojik olarak bazı konularda daha üstün olduğu sonucuna varıldı (Şekil 11).



Şekil 11: 12 hafta sonrasında sakrifiye edilen tavşanların ekstremitelerinin gross görünümü. A) Grup 1, B) Grup 2, C) Grup 3, D) Grup 4, E) Grup 5.

3- Kemik mineral dansitometresi:

Tamir edilen defekt bölgesinden 12. hafta sonunda yapılan kemik mineral dansitometre ölçümleri yorumlanırken defekt oluşturulmamış pozitif kontrol grubundan (grup 5) elde edilen veriler baz olarak alındı. Her gruptaki ekstremitelere alınan değerlerin ortalaması alındı ve gruplar arasındaki karşılaştırma bu ortalama değer üzerinden yapıldı. Ortalama kemik mineral dansitometrelerinin gruplara göre dağılımı aşağıda verilmiştir (Şekil 12 -13).

1. grup (Otojen kansellöz kemik): 0.164 g/cm^2
2. grup (DBM): 0.138 g/cm^2
3. grup (DBM + otojen kansellöz kemik): 0.194 g/cm^2
4. grup (defekt boş bırakılan – kontrol grubu): 0.41 g/cm^2
5. grup (defekt oluşturulmayan + kontrol grubu): 0.283 g/cm^2

En yüksek BMD değeri grup 3’ te ölçülürken, 1. ve 2. grup arasında otojen kansellöz kemik lehine bir fark tespit edildi. Sonuçlar sağlam ekstremitelereki veriler dikkate alınarak yorumlandı. Deney gruplarındaki ortalama değerlerin (+) kontrol grubu ile karşılaştırılmasında, 1. grupta %58.2’lik, 2. grupta %48.7’lik, 3. grupta %68.5’lik ve 4. grupta %14.4’lük oranlarda dansitometrik değerlere ulaşıldığı saptandı (Tablo 5).

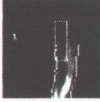
**APPENDICULAR RESULTS
LUNAR CORPORATION**

313 W. BELTLINE HWY., MADISON, WI 53713

HASTA ID: A 300.Y02
ISIM: A, N6A

ÖLÇÜM: 4.8 17.10.2003
ANALİZ: 4.8 17.10.2003

ID: A 300.Y02 ÖLÇÜM TARİHİ 17.10.2003



KEMİK A

Referans Bata Mevcut Degildir

Kemik A 1 BMD (g/cm²)¹ 0.230 ± 0.02

LUNAR®

DPX2 SİSİMEZ İBİM RESİTİSİM

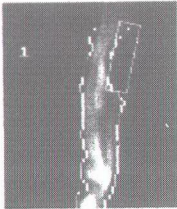
Yas (yıllar).....	0	Büyük Standart.....	273.74	Ölçüm Modu.....	Hızlı
Cinsiyet.....	Erkek	Orta Standart.....	204.12	Ölçüm Tipi.....	DPXMD
Kilo (Kg).....	3	Küçük Standart.....	145.22	Kolimasyon (mm).....	0.84
Boy (cm).....	40	Low keV Air (cps)...	757705	Örnek Boyut (mm).....	0.6x 1.2
Etnik.....	Asyalı	High keV Air (cps)...	414939	Taraf/Uzunluk (mm).....	Sag/300
Sistem.....	7402	R-değeri (Ryag).....	1.318(36.9)	Akım (µA).....	150

Bölge	BMD ¹ g/cm ²	Genç Briskin %	T	Yas Grubu %	Z
Kemik A 1	0.230	-	-	-	-

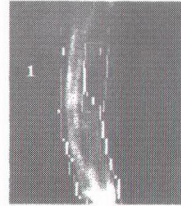
1 - Presizyon ve kesinlik için appendix'e bakınız.

İstatistiksel olarak tekrarlanmış ölçümlerin 68'i 1 SD içinde olur. (±0.02 g/cm²)

Şekil 12: Defekt bölgelerindeki kemik mineral dansitometre değerleri 12. hafta sonrasında ölçülerek kaydedilmiştir. BMD rapor kağıdı izlenmektedir.

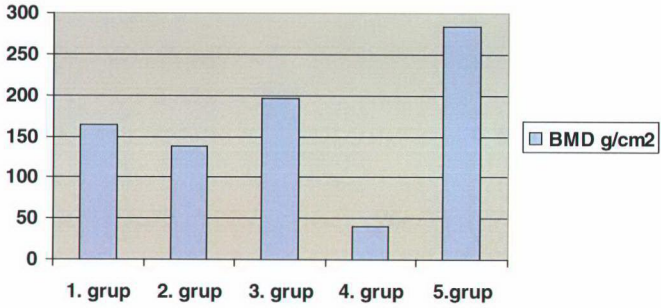


KEMİK A



KEMİK A

Şekil 13: Kemik mineral dansitometresi ölçümü yapılırken öncelikle DEXA cihazı ile tüm ekstremiteler tarandı. Ardından defekt bölgesi belirlenip işaretlendi (dikdörtgen şeklinde) ve bu işaretli alanda BMD ölçümü yapıldı.



Tablo 5: Kemik mineral dansitometre ölçümleri sonucu elde edilen veriler grafik halinde gösterilmiştir.

4- Hücre kültürü ve osteoblastik karakterizasyon:

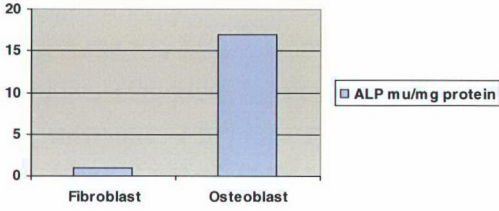
Primer kültür ortamının son aşamalarında faz kontrast mikroskobu ile yapılan incelemelerde kensellöz kemik parçacıklarından flask tabanına doğru iğsi görünümlü, fibroblast benzeri hücrelerin migre olup yapışmaya başladığı görüldü. Sekonder kültür ortamına alınan bu hücrelerin hızla proliferasyon olarak flask yüzeyini kapladıkları ve yaklaşık 10. günde yeterli yoğunluk ve sayıya eriştikleri izlendi. Bu gözlemlerimizin ardından yukarıda tarif edilen yöntem uygun olarak yapılan ALP aktivite ölçümlerinde osteoblast kültürlerinde belirgin aktivite artışı saptandı (osteoblast 17.2 mu/mg protein). Bu ölçüm esnasında kontrol grubu olarak deri kaynaklı fibroblast kültürü kullanıldı (fibroblast 0.7 mu/mg protein). İki grup arasındaki fark, defektten alınan kemik parçacıklarından yapılan kültür çalışması sonucunda üretilen hücrelerin osteoblastik fenotipte olduğunu varlığını kanıtladı (Şekil 14 - 15), (Tablo 6).



Şekil 14: Faz kontrast mikroskopi görüntüsü. Primer kültür ortamında defekt bölgesinden alınan kansellöz kemik ve çevresindeki iğsi yapıdaki osteoblastlar (siyah oklar) izlenmekte.



Şekil 15: Sekonder kültür ortamında flask tabanına yapışmış halde iğsi yapıdaki osteoblastalar (siyah oklar) izlenmekte.



Tablo 6: Sekonder kültür ortamında yapılan karşılaştırmalı ALP aktivite ölçümlerinde osteoblastların fibroblastlara göre belirgin fazla ALP aktivitesi gösterdiği izlendi.

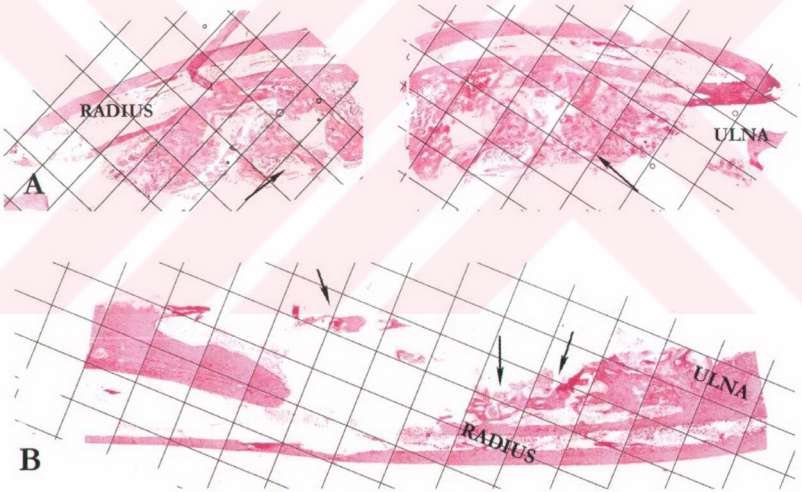
5-Histoloji:

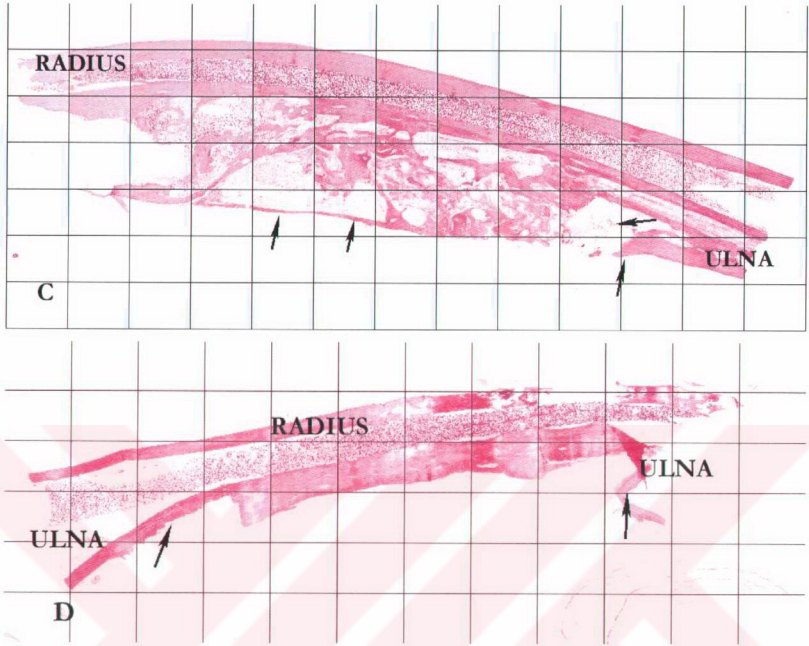
Deney gruplarından alınan histolojik preparatların ışık mikroskopi ile yapılan incelemeleri radyolojik bulgular ile benzerlik gösteriyordu. Otojen kansellöz kemik grefti ile doldurulan defektlerde (grup 1), yeni kemik dokusu, daha çok lamellar kemik tarzındaydı ve defektin tamamına yakını doldurmuştu. Proksimal ve distalde konak kemikle kaynama mevcuttu. Kortikalizasyon tüm örneklerde yeterli ölçüde oluşmuştu ve kemik iliği elemanları defekt bölgesinde izlenmekteydi. Ancak defektin içinde yer yer primer kemik dokusunun baskın olduğu izlendi, bu bölgeler radyografide izlenen radyolusent alanlar ile uyumluydu.

Defektin sadece DBM ile doldurulduğu grupta ise (grup 2), yeni oluşan kemik dokusu hacimsel olarak yeterliydi. DBM'in yerini mineralize osteoide bıraktığı ve vaskülarizasyonun homojen olarak tüm greft hacmine yayıldığı görüldü. Histolojik kesitlerde primer kemiğin lamellar kemikle çevrili olduğu görüldü. Ancak defektin her iki tarafında ki konağa ait kemikle kaynaması konusunda yetersizlikler izlendi. Bu grupta kortikalizasyon otogreft grubuna göre daha hafifti. Defektteki kemik iliği elementleri ise otogreft grubundaki gibi yeterli ölçüdeydi.

Otojen kansellöz greft ve DBM'in beraber kullanıldığı deney grubunda (grup 3) histolojik bulgular, grup 1 ve grup 2'ye benzerdi. Defektler tüm speysmenlerde tamamen kapanmıştı. Kortikalizasyon mevcuttu ve kemik iliği elemanları tamamen belirmişti. Lamellar kemik oranı primer kemik dokusuna göre daha fazlaydı. Grup 1'de izlenen ve radyolusent alanlarla uyumlu primer kemik alanları daha azdı. Greftin histolojik incelemesi diğer gruplara göre daha homojen bir yeni kemik oluşumunu işaret ediyordu. Vaskülarizasyon paterni 2. grupta izlendiği gibi yeni kemik dokusu içinde belirgindi.

Defektin boş bırakıldığı deney grubunda (grup 4) ise, defekt alanı kemik kallus dokusu ile değil fibrovasküler doku ile dolmuştu. Yeni kemik oluşumu, konağa ait kemik ile köprüleşme, osteoid doku gelişimi ve revaskülarizasyon izlenmedi. Ancak osteotomi hatlarından başlayarak radiusa uzanan zayıf sinostoz hatları görüldü. Bu yetersiz kemik oluşumunu, konak dokudaki medüller kanaldaki kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücrelerin indüklediği düşünülür (Şekil 16).





Şekil 16: Deney gruplarının histolojik kesitleri izlenmekte. Boya hematoksilin- eozin., büyütmeye X 10. A) Defektin sadece otogret ile doldurulduğu grupta, yeni kemik oluşumunun hacimsel olarak yeterli olduğu izlenmekte, ancak radyografideki radyolusent alanlara uyan primer kemik oluşumu yer yer daha belirgin olarak saptandı. B) Defektin sadece DBM ile tamir edildiği grupta, yeni kemik oluşumu defektin tüm hacmine homojen olarak yayılmamıştı. Kemik iliği elemanları ve revaskülarizasyon belirgindi ve kortikalizasyon tüm defekt hattı boyunca devamlı değildi. C) Defektin otojen kemik ve DBM ile doldurulduğu grupta yeni kemik hacmi yeterli ve homojen olarak defekte dağılmıştı. Kortikalizasyon, kemik iliği elemanları ve revaskülarizasyon yeterli idi. D) Defektin boş bırakıldığı grupta ise yeni kemik oluşumu izlenmedi. Sadece osteotomi hattından radiusa doğru yeni kemik oluşumunun başladığı ve sinostoz oluşturduğu izlendi. Osteotomi hatlarındaki medullanın kapanarak nonunionun ulaştığı görüldü.

TARTIŞMA

Uzun kemiklerdeki akut veya kronik segmental kemik kayıpları baş edilmesi güç cerrahi problemlerdir. Klinik ortopedide bu tip kemik defektleri ile genelde aggressif ve malign kas iskelet sistemi tümörlerinin rezeksiyonları sonrasında, yüksek enerjili travmalarda ve masif osteolize eşlik eden kemik kayıplarının olduğu artroplasti uygulamalarında rastlanılır. Bunlardan en dramatik olanları negatif cerrahi sınırın elde edilmesinin zorunlu olması nedeniyle geniş kemik segmentlerinin çıkarılmasının zorunlu olduğu ortopedik onkoloji uygulamalarıdır. Ortopedik onkolojide radyolojik görüntüleme modalitelerindeki ilerlemeler, adjuvan kemoterapi uygulamaları ve ortopedik onkolojik cerrahi tekniklerde ki ilerlemeler sayesinde hastaların ekstremiteleri ampute edilmektense kurtarılmaya başlanılmıştır (25,100). Rekonstrüktif prosedürlerde ki ilerlemeler ve rekonstrüksiyon materyallerindeki gelişmeler, mükemmel fonksiyonel sonuçların elde edilmesini sağlamıştır. Bu amaçla değişik cerrahi modaliteler ve rekonstrüktif teknikler, spesifik tanıya, hastalığın evresine ve cerrahın tercihine göre uygulanmaktadır (11,40,72,92,93,100,103,109). Tanımlanmış konvansiyonel tamir yöntemlerinin (massif allogreftler, endoprotezler, vaskülarize otogreftler, İlizarov'un kallus distraksiyonu) kendine has avantaj ve dezavantajları vardır.

Hastaya ve hastalığa ait değişken faktörlerin, tedavi metodunun seçilmesine olan etkisi bir kenara bırakılsa bile, tümör rezeksiyonu sonucu oluşan defekt kendi başına bile üstesinden gelinmesi zor bir problemidir. Çünkü tamir edilmesi gereken defekt oldukça büyüktür, mekanik desteği tamamen ortadan kalkmış bir kemik geride kalmıştır ve çevre yumuşak dokularda rezeksiyona dahil edildiğinden yarayı örtücü doku desteği yetersizdir. Bu sorunla yüzleşen cerrah tecrübelerine, defektin lokalizasyonuna, hastalığın sürecine ve elindeki rekonstrüktif materyallere bağlı olarak bir tedavi şekli seçer.

Günümüzde geniş segmental kemik defektlerinin tamirinde en sık kullanılan metodlar endoprotezler ve masif allogreftlerdir (52). Vaskülarize otogreftler, distraksiyon osteogenezisi, yapısal destek sağlamayan greftler ve rezeksiyon artrodezleri gibi diğer yöntemler rutin olarak kullanılmamaktadır (25,33,103,109). Her yöntemin avantajları ve dezavantajları ilgili literatürlerde detaylı ve karşılaştırılmalı olarak anlatılmıştır. Bütün bu yöntemler göz önüne alındığında, her yöntemin kabiliyeti, sınırları ve zayıf yönleri ortaya konarak en uygun metod cerrah tarafından seçilmelidir.

Yukarda değinilen yöntemlere bakıldığında cerrahın önünde birçok seçenek var gibi görünmektedir. Ancak reksonstrüksiyon yöntemlerinin insan biyolojisine uyumu, uzun dönem fonksiyonel sonuçları, komplikasyonları, hasta memnuniyetini ve rekonstrüksiyon yönteminin akibetini etkileyen en önemli faktördür. Cerrahın nihai amacı bozulan anatomiye ve fonksiyonu normale en yakın seviyede tekrar sağlamaktır. Rekonstrüksiyon yöntemlerini bu açıdan değerlendirdiğimizde, biyolojik ve non-biyolojik rekonstrüksiyon metodları ile karşılaşırız. Biyolojik yöntemler ise vaskülarize otogreftler ve distraksiyon osteogenezisidir (25).

Vaskülarize greftler tek başlarına tümör rezeksiyonlarını tamir etmede nadir olarak kullanılırlar. Genelde diğer rekonstrüksiyon prosedürlerine destek olarak tercih edilmektedir. Bu prosedürün kabul gören endikasyonları; nonunionların tedavisi, cerrahi yatağın vasküler yapısının bozuk olduğu durumlar (radyasyon tedavisi sonrası gibi) ve tek başına kullanımda ise distal radius tümörleridir (10,11). Vaskülarize greftler tüm hacimleri boyunca canlı kalırlar. Bundan dolayı iyileşmeleri, kaynamaları uzun sürmez ve remodeling ile doku içine yeni kemik dokunun invazyonu kısa zamanda olur. Ancak cerrahi teknik olarak zordur ve uzun operasyon zamanına ihtiyaç gösterirler. Vücuttaki kaynakları sınırlıdır (fibula, iliak kanat), alındığı alan morbiditesi mevcuttur. Kullanıldıkları yer için yapısal ve boyutsal olarak yetersiz olabilirler. Bu nedenlerle klinik uygulamalarda genelde; distal radial tümörlerde vaskülarize fibular greft olarak ve diğer yöntemlerle oluşan kaynama ve vaskülarizasyon sorunlarını çözmede kullanılmaktadır (11).

İlziarovun tarif ettiği kortikotomi sonrası yavaş distraksiyonla elde edilen “de novo” kemik dokusu, özellikle interkalar defektlerin kapatılmasında başarılı bir yöntemdir (25). Distraksiyon osteogenezisi ile elde edilen yaşayan kemik nihayetinde yeterli mekanik güce sahip, stabil ve dayanıklıdır. Biyolojik bir teknik olması, ekstremitenin uzunluğunun tüm defekt tiplerinde sağlanmasındaki becerisi ve erken hareket - tam yük vermeye olanak sağlaması önemli avantajlarıdır (109). Ayrıca çocuklarda tümör rezeksiyonları sonucunda oluşan ekstremitenin uzunluk eşitsizliğini de giderebilir. Doğal olarak bu yöntemin sahip olduğu dezavantajlar vardır; uzun tedavi süresi, gecikmiş maturasyon ve ossifikasyon, kullanılan fiksatöre bağlı fonksiyonel kısıtlılık, hastaların adaptasyon problemleri ve ağrı (25,109). Tümör rezeksiyonları ile oluşan kemik defektlerinin tedavisinde, kemik transportu her ne kadar uzun süreli bir tedavi süreci gerektirse de, gerek rekonstrüksiyonun sürekliliği, gerekse

TARTIŞMA

Uzun kemiklerdeki akut veya kronik segmental kemik kayıpları baş edilmesi güç cerrahi problemlerdir. Klinik ortopedide bu tip kemik defektleri ile genelde aggressif ve malign kas iskelet sistemi tümörlerinin rezeksiyonları sonrasında, yüksek enerjili travmalarda ve masif osteolize eşlik eden kemik kayıplarının olduğu artroplasti uygulamalarında rastlanılır. Bunlardan en dramatik olanları negatif cerrahi sınırın elde edilmesinin zorunlu olması nedeniyle geniş kemik segmentlerinin çıkarılmasının zorunlu olduğu ortopedik onkoloji uygulamalarıdır. Ortopedik onkolojide radyolojik görüntüleme modalitelerindeki ilerlemeler, adjuvan kemoterapi uygulamaları ve ortopedik onkolojik cerrahi tekniklerde ki ilerlemeler sayesinde hastaların ekstremiteleri ampute edilmektense kurtarılmaya başlanılmıştır (25,100). Rekonstrüktif prosedürlerde ki ilerlemeler ve rekonstrüksiyon materyallerindeki gelişmeler, mükemmel fonksiyonel sonuçların elde edilmesini sağlamıştır. Bu amaçla değişik cerrahi modaliteler ve rekonstrüktif teknikler, spesifik tanıya, hastalığın evresine ve cerrahın tercihinine göre uygulanmaktadır (11,40,72,92,93,100,103,109). Tanımlanmış konvansiyonel tamir yöntemlerinin (massif allogreftler, endoprotezler, vaskülerize otogreftler, İlizarov'un kallus distraksiyonu) kendine has avantaj ve dezavantajları vardır.

Hastaya ve hastalığa ait değişken faktörlerin, tedavi metodunun seçilmesine olan etkisi bir kenara bırakılsa bile, tümör rezeksiyonu sonucu oluşan defekt kendi başına bile üstesinden gelinmesi zor bir problemdir. Çünkü tamir edilmesi gereken defekt oldukça büyüktür, mekanik desteği tamamen ortadan kalkmış bir kemik geride kalmıştır ve çevre yumuşak dokularda rezeksiyona dahil edildiğinden yarayı örtücü doku desteği yetersizdir. Bu sorunla yüzleşen cerrah tecrübelerine, defektin lokalizasyonuna, hastalığın sürecine ve elindeki rekonstrüktif materyallere bağlı olarak bir tedavi şekli seçer.

Günümüzde geniş segmental kemik defektlerinin tamirinde en sık kullanılan metodlar endoprotezler ve masif allogreftlerdir (52). Vaskülerize otogreftler, distraksiyon osteogenezi, yapısal destek sağlamayan greftler ve rezeksiyon artrodezleri gibi diğer yöntemler rutin olarak kullanılmamaktadır (25,33,103,109). Her yöntemin avantajları ve dezavantajları ilgili literatürlerde detaylı ve karşılaştırılmalı olarak anlatılmıştır. Bütün bu yöntemler göz önüne alındığında, her yöntemin kabiliyeti, sınırları ve zayıf yönleri ortaya konarak en uygun metod cerrah tarafından seçilmelidir.

Yukarda değinilen yöntemlere bakıldığında cerrahın önünde birçok seçenek var gibi görünmektedir. Ancak reksonstrüksiyon yöntemlerinin insan biyolojisine uyumu, uzun dönem fonksiyonel sonuçları, komplikasyonları, hasta memnuniyetini ve rekonstrüksiyon yönteminin akibetini etkileyen en önemli faktördür. Cerrahın nihai amacı bozulan anatomiye ve fonksiyonu normale en yakın seviyede tekrar sağlamaktır. Rekonstrüksiyon yöntemlerini bu açıdan değerlendirdiğimizde, biyolojik ve non-biyolojik rekonstrüksiyon metodları ile karşılaşırız. Biyolojik yöntemler ise vaskülarize otogreftler ve distraksiyon osteogenezisidir (25).

Vaskülarize greftler tek başlarına tümör rezeksiyonlarını tamir etmede nadir olarak kullanılırlar. Genelde diğer rekonstrüksiyon prosedürlerine destek olarak tercih edilmektedir. Bu prosedürün kabul gören endikasyonları; nonunionların tedavisi, cerrahi yatağın vasküler yapısının bozuk olduğu durumlar (radyasyon tedavisi sonrası gibi) ve tek başına kullanımda ise distal radius tümörleridir (10,11). Vaskülarize greftler tüm hacimleri boyunca canlı kalırlar. Bundan dolayı iyileşmeleri, kaynamaları uzun sürmez ve remodeling ile doku içine yeni kemik dokunun invazyonu kısa zamanda olur. Ancak cerrahi teknik olarak zordur ve uzun operasyon zamanına ihtiyaç gösterirler. Vücuttaki kaynakları sınırlıdır (fibula, iliak kanat), alındığı alan morbiditesi mevcuttur. Kullanıldıkları yer için yapısal ve boyutsal olarak yetersiz olabilirler. Bu nedenlerle klinik uygulamalarda genelde; distal radial tümörlerde vaskülarize fibular greft olarak ve diğer yöntemlerle oluşan kaynama ve vaskülarizasyon sorunlarını çözmede kullanılmaktadır (11).

İlziarovun tarif ettiği kortikotomi sonrası yavaş distraksiyonla elde edilen “de novo” kemik dokusu, özellikle interkalar defektlerin kapatılmasında başarılı bir yöntemdir (25). Distraksiyon osteogenezisi ile elde edilen yaşayan kemik nihayetinde yeterli mekanik güce sahip, stabil ve dayanıklıdır. Biyolojik bir teknik olması, ekstremitenin uzunluğunun tüm defekt tiplerinde sağlanmasındaki becerisi ve erken hareket - tam yük vermeye olanak sağlaması önemli avantajlarıdır (109). Ayrıca çocuklarda tümör rezeksiyonları sonucunda oluşan ekstremitenin uzunluk eşitsizliğini de giderebilir. Doğal olarak bu yöntemin sahip olduğu dezavantajlar vardır; uzun tedavi süresi, gecikmiş maturasyon ve ossifikasyon, kullanılan fiksatöre bağlı fonksiyonel kısıtlılık, hastaların adaptasyon problemleri ve ağrı (25,109). Tümör rezeksiyonları ile oluşan kemik defektlerinin tedavisinde, kemik transportu her ne kadar uzun süreli bir tedavi süreci gerektirse de, gerek rekonstrüksiyonun sürekliliği, gerekse

biyolojik bir yöntem olması nedenleri alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (109). Bu yöntemle ilgili en önemli sorun olan tedavi süresinin uzunluğu kısaltılabilirse çok daha çekici bir tedavi alternatifi olacağı açıktır.

Segmental kemik defektlerinin tedavisinde yukarıda değinilen metodların dışında başka biyolojik metodları arayan bilim dalı ise “ortopedik doku mühendisliğidir”. Ortopedik doku mühendisliğinin kemik defektlerine bakış açısının merkezinde, sahip olduğu osteojenite, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon özellikleri ile otojen kansellöz kemiğin olduğu bir gerçektir (33,37). Amaç kansellöz otogrefte eşdeğer etkinlikte kompozit greftleri oluşturabilmektir.

Doku mühendisliği mikroçevreyi, hücreleri ve matriksi kontrol ederek, bunları istenilen yerlere uygulayıp, biyolojik dokuları tamir ve rejenere etmeyi amaçlar. Doğal dokularda olduğu gibi doku mühendisliği ile yapılan implantlarda, invivo ortamda biyolojik ve fiziksel stimuluslara cevap verirler (37). Doku mühendisliğiyle bir yapının oluşturulması, istenen doku fonksiyonlarının, hedef için gerekli en uygun hücre tipinin, taşıyıcı yapının ve düzenleyici mediatörlerin seçilmesi ile başlar (6,9,60,64). Bu greftin implantasyonundan sonra, başlangıç safhasında yeni doku ve içerisindeki hücreler, ekstrasellüler matriks üzerinde büyürler ve greft sentetik muhafaza işlevi görür. Zamanla implant konakçısındaki tüm özelliklere uygun hale gelecektir. Bu nedenle bu materyallerin biyodegradabil olmaları ve rezorbe olabilmeleri öngörülmüştür. Normal fonksiyonel gerekliliklere uygun hücre ve doku oluşumunu sağlamak ancak ekstrasellüler matriks, yapısal iskelet ve hücre davranışının regülasyonu ile sağlanabilir (7,16,37,122).

Kemik doku mühendisliğinin amacı; kemikte istenilen anatomik yerde ve istenilen özelliklere uygun yeni kemik oluşumunun veya kemik iyileşmesinin sağlanmasıdır (33,37). Klinik olarak başarılı kemik oluşumu; yapısal olarak çevresindeki kemiğe benzeyen kemik dokusunu geliştirebilmek anlamını taşır. Dayanıklı, fonksiyonu için gerekli yorgunluk direncine sahip, yük taşıyabilen, mekanik özellikleri tam olan, güvenilir kemik oluşumu ve remodelizasyon kemik iyileşmesinin arzu edilen sonuçlarıdır. Doku mühendisliğindeki temel konular içinde ilk akla geleni, üç önemli faktör olan osteokondüktivite, osteojenite ve osteoindüktivitenin bir arada buluşturulmasıdır. Bu üç faktörün hepsine birden sahip tek materyal otojen kansellöz grefttir (83,102,118). Doku mühendisliğinin amacı da elindeki tüm imkanları kullanarak, etkinlik olarak otojen grefte eşit ancak kaynağı insan olmayan bir greft

geliştirmektir. Otojen kansellöz kemiğe alternatif olarak kullanılabilen greft materyallerinin oluşturulması amacıyla bir çok çalışma yapılmıştır (22,26,35,39,53,67,77,80,95,97,107). Denenen materyaller çok çeşitlidir; allogreftler, xenogreftler, inorganik greftler (kalsiyum hidroksiapatit, seramik kalsiyum fosfat, porus karbon, porus polietilen), sentetik greftler (bifazik TCP/HA), degrade olan materyaller (polilaktik asit, poliglaktik asit, polilaktik ko glikolik asit), bioaktif büyüme faktörleri (kemik morfogenetik proteinleri, transforming growth faktör alfa vb), (1,3,12,31,36,38,42,45,48,56,62,68,75,91,95,120). Tüm bu faktörler osteojenik, osteokondüktif veya osteoindüktif özelliklerin birine sahiptirler. Bu nedenle tek başlarına otojen greftin sahip olduğu iyileştirme potansiyelini sağlayamamışlardır. Her üç özelliği taşıyan bir greftin oluşturulabilmesi için, yukarıda sayılan greft materyallerinin birleştirilmesiyle oluşan kompozit greftler üzerinde çalışan bilim dalı, ortopedik doku mühendisliğinin bir alt disiplini olan “kemik doku mühendisliği”dir. Kemik doku mühendisliğinin spesifik amacı kemik iyileşmesi ve fizyolojisine vücut dışında sentez edilen materyallerle müdahale etmektir (37).

Segmental kemik defektlerinin kapatılmasında ortopedik doku mühendisliği tarafından kullanılan kompozit materyallerden birisi de demineralize kemik matriksidir. Demineralize kemik matriksi kollajen ve nonkollajenöz proteinlerden oluşan bir grefttir. Kemik matriksinde bulunan kollajen osteokondüktif potansiyele sahip bir proteindir. Nonkollajenöz proteinler ise (BMP's, TGF α , FGF) pluripotent mezenkimal kök hücreleri osteoblastik yolağa girmelerini sağlayacak uyarıyı içerirler. Ayrıca bu hücrelerin istenilen bölgeye kemotaksisine, faaliyetlerinin indüksiyonuna ve bu bölgede konsantre olmalarını da sağlarlar. Demineralize kemik matriksi taşıdığı osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri ile kemik iyileşmesinin, kırık kaynamasının sağlanması ve güçlendirilmesi amacıyla birçok preklinik ve klinik çalışmada kullanılmaktadır (8,17,34,39,53,67,76,84,95,106,119).

Klinik kullanımda yer bulan DBM, otojen greftin yarattığı morbiditeyi azaltabilir. Ayrıca allogreft ve sentetik greftlere göre hızla inkorpore olarak, mekanik yüklere dayanıklı bir kemik formasyonu yaratabilir.

Deneyimizde kullanılan hayvan modeli olan, tavşan ulna defekt modeli segmental kemik defekti ve nonunion modeli olarak mükemmel bir uygulamadır. 6 aylık erişkin tavşan ulnasının boyu ortalama 6.5 cm'dir. Ulna diafizinden çıkartılan defekt ise 2 cm'dir. Yani kemiğin toplam uzunluğunun 1/3'ü çıkartılmıştır. Bu nedenle oluşturulan segmental defektin

masif olduğu söylenebilir. Oluşturulan defektin boş bırakıldığı kontrol grubunda 12 hafta sonunda defektin spontan olarak iyileşmemesi ve kemik uçlarında nonunionun hem radyolojik hemde gross olarak izlenmesi, deneysel modelin güvenilirliğini kanıtlamaktadır. Bu modelde herhangi bir tespit şeklinin uygulanması gerekmemektedir, çünkü radioulnar sinostoz ve hayvanların önkollarında supinasyon hareketinin olmaması kullanılacak implantın defekt bölgesindeki stabilitesine katkıda bulunan faktörlerdir (101).

Deneyimizde olduğu gibi, segmental kemik defektlerinin kapatılmasında kompozit materyal olarak demineralize kemik matriksinin kullanıldığı prelinik çalışmalara literatürde rastlanılmaktadır (8,17,18,20,30,35,39,42,101,119). Demineralize kemik matriksi appendiküler iskelet dışında ayrıca kraniofasial defektlerin kapatılmasında da kullanılmıştır (53,69,84,85).

Demineralize kemik matriksi segmental defektlerin kapatılmasında tek başına (20,30,42) kullanıldığı gibi çeşitli greftlerle de kombine halde kullanılmıştır (17,18,35,101,119). Bu çalışmalarda DBM'in zayıf yönlerini tamamlamak amacıyla DBM bazı greft materyalleri ile kombine edilmiştir. Bu kompozit kullanımdaki üç amaç DBM'in yetersiz kaldığı üç noktayı güçlendirmektir. Bunlardan birincisi osteoindüktif faktörlerin DBM implante edildikten sonra erken dönemde ortamdan uzaklaşarak yeterli kemik formasyonu yapamaması hipotezidir (101,117). DBM'in yapısındaki osteoindüktif faktörlerin çabuk rezorbsiyonunu önlemek ve konsantrasyonunun iyileşmenin kritik safhaları boyunca, implantasyon bölgesinde istenen oranda kalması için, bazı matriks yapıda maddelerle kombine edilmiştir. İkinci amaç ise DBM'in yapı itibarıyla zayıf osteokondüktif etkisinin olması ve bunun sonucunda mekanik dayanıklılık gerektiren yerlerde tek başına kullanılamamasıdır. Bazı çalışmalarda trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatit kristalleri, DBM ile kombine edilerek defekt kapatılmasında kullanılmıştır (35). Son olarak DBM yapısında kemik oluşumunda rol alan osteojenik hücreleri barındırmamaktadır. DBM'e osteojenik hücreleri kombine edebilmek için otolog kemik iliği kullanılmaktadır (39).

Einhorn ve arkadaşları demineralize kemik matriksi kullanarak rat femurlarında oluşturduğu segmental defekt modelinin kapatılması amacıyla bir çalışma yapmıştır (30). Bu çalışmada DBM uygulanan grupta (n=10) klinik ve radyografik kaynamanın ortalama %71 oranında olduğunu bildirmiştir. Radyografik değerlendirmede dikkat edilmesi gereken bir husus olarak unionun sağlandığı vakalarda remodelingin de sağlanıp sağlanmadığının ortaya

konmasıdır. Bu açıdan bakıldığında remodeling DBM uygulanan hayvanların %50'sinde saptanmıştır. Kemik iyileşmesi ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan biyomekanik testler kemiğin sağlamlığının tayininde gereklidir. Bu veriler yeni kemiğe ait biyomekanik özelliklerinin saptanmasında çok önemlidir. Biyomekanik testlerde kullanılan değerlendirme skalasını ilk tanımlayan White ve arkadaşlarına göre kırık iyileşmesinde 4 biyomekanik sürecin olduğu söylenebilir (15,116).

- 1- Yetersizlik orijinal kırık hattında, dayanıklılık az
- 2- Yetersizlik orijinal kırık hattında, dayanıklılık fazla
- 3- Yetersizlik parsiyel olarak kırık hattında ve parsiyel olarak intakt kemikte, dayanıklılık fazla
- 4-Yetersizlik tamamen intakt kırık hattında ve dayanıklılık fazla

Einhornun çalışmasındaki klinik başarıya mekanik açıdan bakıldığında tamir edilen defektlerde normal kemiğe göre torsiyonal stresin % 35 oranında, enerji absorpsiyonun ise % 65 oranında korunduğunu bildirmiştir. Biyomekanik sonuçları ise defekte klinik kaynama olmasına rağmen, yeni oluşan kemiğin mekanik özelliklerinin ancak erken kırık iyileşme fazına (white evre 2) eşdeğer olduğu ortaya çıkmıştır (116).

Solheim ve arkadaşları demineralize kemik matriksini tek başına ve biodegrade olabilen bir materyalle (polyorthoester) ile kombine ederek rat radiuslarında oluşturdukları segmental defektlerde kullanmışlardır (101). Oluşturulan segmental defekt boyu 11 mm'dir. Kullanılan DBM miktarı 10 mg dir, DBM + polyortoester kombinasyonunda ise DBM 10 mg, polyorthoester ise 25 mg olarak kullanılmıştır. 7 hafta sonra sakrifikasyon uygulanmış ve radyolojik incelemelerde polyorthoester + DBM kombinasyonunda, tek başına DBM kullanılan gruba göre defektteki yeni kemik dokusunun daha fazla hacimde olduğu izlenmiştir. Demineralize kemik matriksi içinde yer alan osteindüktif faktörlerin implante edildikleri yerden erken rezorpsiyonu istenilen boyutta yeni kemik oluşumunu engeller (95). Bu nedenle osteindüktif faktörler için biodegradabil matrikslerin kullanılması hakkında çalışmalar yapılmıştır (19,23,65,120). Kullanılan biodegradabil materyallerde olması gereken ideal özellikler ise; biokompatibilite, aktif peptid yapının devamlı ve kontrollü salınmasını sağlayabilme, biodegradabil olma, lokal hemostazı sağlama ve osteoindüksiyonu inhibe etmemek sayılabilir (101). Ek olarak bu tip biodegradabil materyallere kontür verilebilmekte,

osteoidüktif faktörlerle beraber implante edilecekleri anatomik lokalizasyona uygun şekil ve boyutta sentezlenebilmektedirler.

Feighan ve arkadaşları DBM ve hidroksiapatit silindirlerinden oluşan kompoziti rat femurlarında oluşturdıkları segmental modelde denemişlerdir (35). Rat femurundan çıkartılan segment 8 mm'dir ve fiksasyonda ise poliasetil plak-yivli Kirshner teli kullanılmıştır. DBM, HA silindirlerine santrifüje edilerek implante edilmiştir. Deney gruplarında DBM tek başına 210 mg, HA silindirle kombine edilirken ise 130 mg olarak kullanmıştır. 4 ay sonunda sakrifikasyon ardından yapılan değerlendirmede defektteki yeni kemik oluşumunun DBM ve DBM+HA silindir kompozisyonunda yeterli olduğu izlenmiştir. Kompozit greftin biyomekanik ve histolojik sonuçları sadece DBM kullanılan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Radyolojik olarak yeni kemik oluşumu HA silindirin radyopak yapısı nedeniyle objektif olarak değerlendirilememiştir. İstenilen sonucun alınamamasının muhtemel nedeni HA gibi mineralize implantların DBM ile beraber implantasyonunda, ortama salınan inorganik tuzlar nedeni ile DBM hızla mineralize olmaktadır. Bir süre sonra ise tekrar demineralize olarak normal süreç işlemeye başlamaktadır. Bu süreç nedeniyle DBM ve seramik kombinasyonunun, greft konak inkorperasyonuna pozitif bir etkisinin olduğunu söylemek zordur (35).

Wittbjer ve Gebhart yaptıkları iki ayrı çalışmada DBM ve otolog kemik iliğinden oluşan kompoziti sırasıyla tavşan radiusunda ve rat femurunda kullanmışlardır (39,118). Wittbjer tavşan radiuslarından 12 mm boyunda bir segment çıkarıp, bunu demineralize ettikten sonra, ikinci bir operasyonla otolog DBM'i tek başına ve otolog kemik iliği ile kombine ederek radial defekte tekrar implante etmiştir. Kemik iliği demineralize kemik matriksi ile kombine edildiğinde yeni kemik oluşumunun erken safhasında indüktif etki gösterdiğini ve mineralizasyonu hızlandığını rapor etmişlerdir (118). Ancak kemik oluşumunun tamamlandığı geç safhalarda, kemik iliği uygulanan ve uygulanmayan grup arasında farkın olmadığını bildirmiştir. Bu etkinin açıklamasını da erken dönemdeki kemik oluşumunun osteojenik kapasitedeki hücrelerin etkisiyle, geç dönemdeki kemik oluşumunun ise matriks tarafından indüklendiğini öne sürerek yapmışlardır (67,118). Ancak deneyde değerlendirme kriteri olarak sadece radyolojik ve sintigrafik testler kullanılmış, histoloji ve biyomekanik inceleme yapılmamıştır.

Gepstein DBM'i tek başına kullanıp, otolog kansellöz kemikle karşılaştırmak için masif segmental defektlerde bir çalışma yapmıştır (42). Ratlarda radius diafizinin %50-60'ını çıkarttıktan sonra, defekti DBM ve otojen kortikokansellöz kemikle tamir etmiştir (42). 7 hafta sonra sakrifikasyon uygulanmış ve radyolojik-histolojik-sintigrafik olarak incelemişlerdir. DBM'in otolog kemiğe göre daha yüksek oranda defekti doldurduğunu (%95) ve kaynama sağladığını (%71) bildirmişlerdir. Ancak kullandıkları otojen greftte kansellöz kemik oranının az, kortikal onlay greftin fazla olduğunu ve bu nedenle kaynama oranlarının DBM'in gerisinde kaldığı yorumunu yapmışlardır.

Literatürde demineralize kemik matriksinin kullanıldığı segmental kemik defektlerindeki kaynama oranları farklılıklar göstermektedir. Bu oran % 60'tan % 100'e kadar değişen bir spektrumdadır (8,17,30,35,101,118,119). Sonuçlardaki bu farklılık deneylerde kullanılan DBM'in üretilmesin esnasında oluşan farklılıklara bağlı olabilir. Çünkü DBM'in aktivitesini ölçmek için çeşitli invitro (hücre kültürü çalışmaları) ve invivo testler (heterotopik – ortotopik implantasyon) kullanılsa da, DBM'in osteoindüktif etkisini kantitatif olarak ortaya koymak zordur. Ancak yukarıda anlatılan tüm deney modellerinde, segmental defektinin DBM ile kapatılabildiği hakkında fikir birliği vardır. Bu sonuç osteokondüktif ve osteoindüktif özelliklere sahip bu greft materyalinin etkinliğini ortaya koyar. Bizde deneyimizde kullandığımız defekt modelini tamir ederken kullandığımız demineralize kemik tozu ile literatüre benzer oranda (% 72) başarı sağladık.

Segmental kemik defektlerinin kapatılmasıyla ilgili deneylerde kullanılan greft materyalinin etkinliğini karşılaştırmak amacıyla, otojen kemik greftinin kullanıldığı kontrol grubu çalışmaya dahil edilmektedir. Literatüre otojen kemik greftinin kullanıldığı defektlerdeki kaynama oranları açısından bakıldığında, kaynama oranları %40 - %100 arasındadır (8,30,65,118,119). Düşük oranların muhtemel sebepleri otojen greft olarak kortikal morsolize greft veya sinjenik greft kullanılması olabilir (8,65,119). Otojen kansellöz kemik kullanılan deneylerde ise kaynama her zaman %90'ın üzerinde rapor edilmiştir (8). Çalışmamızda da DBM'in etkisini karşılaştırmak için otojen kansellöz kemik kullanıldı ve % 92.8'lik bir kaynama oranına ulaşıldı.

Otojen kemik grefti ile demineralize kemik greftinin beraber kullanıldığı prelinik deneylerde ortaya atılan kavram DBM'in otojen kemik greftinin etkisini "güçlendirici ve genişletici" (enhancer and extender) olarak kullanılmasıdır (74). Bu kavrama uygun olarak

DBM + Ototogreft kombinasyonları vertebral füzyonlarda ve kraniofasial cerrahide deneysel metodlarda denenmişlerdir (74,84,85). Defektteki kaynama oranları değerlendirildiğinde, oluşan yeni kemik hacmi açısından kompozit greftin yalnız DBM'e göre % 178 oranında daha iyi olduğu bildirilmiştir (85). Yeni oluşan kemik dokunun, kompozit greftte yalnız DBM kullanılan gruba göre erken safhalarda daha matür hale geldiği de gözlenmiştir. Bu çalışmaların sonucunda DBM in otojen greft uygulamalarını optimize ettiği açıktır. DBM'in otojen greftin etkisini sahip olduğu osteoindüktif faktörler ile potansiyelize ettiğini söylemek mümkündür. Ayrıca DBM'in erken revaskülarizasyona uğrayarak greft yatağını yeni kemik oluşumu için uygun hale getirmesi ve endokondral kemik formasyonunu aktive etmesi de otojen greftin etkisini potansiyelize etmektedir. Çalışmamızda DBM + otojen kansellöz greft kompoziti yeni kemik oluşumunu daha iyi indüklediği ortaya çıkmıştır. Radyolojik kaynama ve defektin hacimsel tamiri tamdır %100, ayrıca yeni oluşan kemiğin dansitometrik özellikleri daha iyidir. DBM+otogreft kompozitindeki yeni kemik oluşumunun, DBM'in tek başına kullanımındaki kemiğe göre, daha kısa zamanda radyolojik olarak matür hale geldiği de araştırmamızın sonuçları arasında sayılabilir. Bu sonuçlar literatürle uyumludur.

Etkinliği kanıtlanmış bir greft materyali olarak DBM, kemik greftinin kullanılması gereken ortopedik uygulamalarda otojen grefte bir alternatif olarak yerini almıştır (94). Demineralize kemik matriksi; kırık kaynamasının güçlendirilmesinde, kaynama eksikliklerinin tedavisinde, spinal füzyonlarda, kemik tümörlerinde ve artrodezlerde denenmiştir (41,54,55,58,94,98,107,110,114). DBM farklı anatomik lokalizasyonlarda hatta greft yatağının yetersiz olduğu yerlerde (nonunion sahaları) çok değişik endikasyonlarda istenilen yeni kemik oluşumunu sağlamıştır. Literatürlerdeki farklılıklara rağmen DBM'in elde ettiği ortalama başarı % 81'dir (94) DBM ayrıca otojen greft alınması ile ilgili komplikasyon ve morbiditeleride azaltmıştır. Ancak yukarıda sayılan çalışmaların çoğu retrospektif ve kontrol grubu olmayan klinik uygulamalardır. Bu çalışmalar içinde sadece Geesnik'in yaptığı prospektif ve kontrollü çalışma demineralize kemik matriksinin insan segmental kemik kayıplarındaki kullanımına ışık tutmaktadır (41). Bu çalışmada diz osteoartriti nedeniyle yüksek tibial osteotomi uygulanan hastaların fibulalarından 15 mm'lik bir segment çıkartılmıştır. Defekte DBM ve osteojenik protein 1 + kollajen taşıyıcı yerleştirilmiştir. Takip süresi 12 aydır. İncelemede radyoloji ve kemik mineral dansitometresi kullanılmıştır. En yüksek değerler % 100 ile DBM'in kullanıldığı gruptan elde edilmiştir (41). Bu sonuçlar DBM'in kullanıldığı preklinik deneyler ile paralellik göstermektedir, ancak bu

deneydeki çıkartılan kemik segmenti küçüktür. Ayrıca literatürde hala insanlardaki masif segmental kemik kayıplarında DBM kullanımı ile ilgili bir yayın yoktur.

Deneyimiz segmental kemik defektlerinde DBM + otojen kensellöz kemik kompozitinin kullanıldığı ilk çalışmadır. Sonuçlarımız DBM'in kemik kayıplarının tedavisinde otojen grefte bir alternatif olduğunu, ancak klinik başarının tek başına otojen kensellöz kemik kullanımında daha yüksek olduğu yönündedir. Bu iki greft materyalinden oluşan kompozit ise radyolojik, histolojik ve dansitometrik açıdan her iki gruba üstünlük sağlamıştır. Defekt bölgesinde oluşan yeni kemik erken safhalarda kortikalize olarak, dens hale gelmiştir. Bu sonuçlar DBM'in otojen kemiğin etkisini potansiyelize ederek daha kısa zamanda ve yapısal olarak daha iyi bir kemik dokusu oluşturduğunu göstermiştir. Bu noktadan hareketle DBM'in tek başına kemik iyileşmesini sağlamakta yetersiz kaldığı masif segmental kemik kayıplarında, otojen greftle beraber kullanılması uygun bir rekonstrüksiyon seçeneği olabilir.. Bu sayede hem istenilen yeni kemik oluşumu, kısa sürede ve istenilen kalitede sağlanabileceği gibi, otojen kemiğe olan ihtiyaç yarı yarıya azaltılabilir. Demineralize kemiğin oranını arttırıp 3/4, otojen greftin oranını 1/4'e azaltarak yapılacak olan deneysel çalışmalar bu kompozitin insanlardaki masif kemik kayıplarında kullanılabilirliğini test edebilir.

Deneyimizde elde ettiğimiz sonuç demineralize kemik matriksi ile otojen kemik grefti kombinasyonunun (grup 2), bu materyallerin tek başlarına implantasyonlarından daha iyi seviyede klinik sonuç verdiği şeklindedir. Bu sinerjistik etkinin nedenleri hakkında muhtemel hipotezler sırasıyla açıklanacaktır.

- 1- Otojen greft defekt alanında neovaskülarizasyonu indükleyerek buraya mezenkimal kök hücrelerin gelmelerini sağlar. Bu kök hücreler ise implant alanında bulunan DBM tarafından kondroblast ve osteoblastlara farklılaştırılır.
- 2- Otojen greft defekt alanında kemiksel devamlılık sağlanana kadar, geçici bir mekanik stabilizatör olarak işlev görür.
- 3- Otojen greft, DBM içindeki bioaktif moleküller için matriks görevi yaparak, fizyolojik döngülerine benzer hızda salınmalarını sağlayabilir.
- 4- Demineralize kemik matriksi otojen greft için kırık hematomundan çok daha iyi bir osteoindüktif ortam sağlar. Partikül büyüklüğü fazla olan otojen kansellöz kemik cipslerinin arasını doldurarak yeni kemik oluşumu için ideal bir ortam oluşturur.

- 5- Demineralize kemik içindeki osteoindüktif faktörler otojen greftte bulunan, indükleyebileceği osteoblastik prekürsörlere ve osteoblastlara kolayca ulaşabilir.
- 6- DBM yeni kemik indüksiyonunu endokondral kemikleşme ile indükler, bu otolog kemiğin oluşturduğu yeni kemik için mükemmel bir template olarak işlev görür.

Muhtemelen bu hipotezlerin hepsinin yer aldığı kompleks bir etkileşim sonucunda, DBM + otogreft kompoziti yeni kemik dokusunu hızlı ve etkin bir şekilde oluşturmaktadır (42,84,85). Ancak sıralanan hipotezlerin geçerliliğinin kanıtlanması için biyokimyasal ve kantitatif test metodlarının kullanılması gerekmektedir.



SONUÇ

- 1- Deneyimizde kullanılan tavşan ulna segmental kemik defekti, güvenilirliğini kanıtlamıştır ve insanlardaki masif segmental kemik kayıplarını simüle edebilecek kapasitededir. Bu model üzerinden osteoindüktif, osteokondüktif ve osteojenik çeşitli greft materyallerinin kemik defektlerindeki etkinliği araştırılmaya devam edilebilir.
- 2- Demineralize kemiğin hastanemizde işlenerek elde edilmesi mümkündür. DBM işleme prosedürünün standardize edilmesi ve invivo-invito aktivite testlerinin yapılması, ileride bu konuda yapılacak çalışmalar için gerekli bir prosedür olmalıdır.
- 3- Segmental kemik defektlerinin kapatılmasında DBM etkinliğini kanıtlamış bir greft materyalidir. Ancak gerekli mekanik integritesinin olmaması ve rezorbsiyonunun hızlı olması, masif segmental defektlerde kullanım alanını kısıtlamaktadır. Bu nedenle osteoindüktif faktörler için uygun bir taşıyıcıyla veya osteokondüktif kapasitesi fazla olan başka bir greft ile kombine edilmesi faydalı olmaktadır.
- 4- Demineralize kemik matriksi ve otojen kansellöz kemik kombinasyonunun segmental kemik defektlerinde hızlı ve tam bir iyileşme sağlayarak, kemiğin biyolojik olarak rekonstrüksiyonunu yapabildiği çalışmamızda görülmüştür. Bu kombinasyonun sinerjistik etkisi sonucunda otojen kemik ihtiyacı yarı yarıya azaltılmıştır. Ancak daha düşük oranlarda otojen kemiğin kullanıldığı çalışmalar yapılabilir.
- 5- Osteoindüktif ve osteokondüktif etkiye sahip DBM'in osteojenik materyallerle kombinasyonu otojen kemiğe olan ihtiyacımızı tamamen ortadan kaldırabilir. Osteojenik materyal olarak kliniğimizde uygulanan kemik iliği kaynaklı osteoblast kültürünün kullanılması bu çalışmayı bir adım daha ileri götürerek, ideal bir kompozit grefte ulaşmamızı mümkün kılabilir.
- 6- Sonuçta ideal bir kompozit greft şu özelliklere sahip olmalıdır (42).
 - a- Yeni kemik oluşturacak hücreleri taşımalıdır.
 - b- Hücreleri destekleyecek, hücrelerin adhezyonunu sağlayarak proliferatif faaliyetleri başlatabilecekleri bir matriks ihtiva etmelidir.
 - c- Hücreleri kemik oluşturmaları için indükleyecek bir stimulus içermelidir.

- d- Yeni oluşan kemiği desteklemek için gerekli olan neovaskularizasyonun greftin tüm hacmine ulaşmasını sağlayabilecek uygun yapısal özellikler göstermelidir.



ÖZET

Diáfiezeal kemiklerdeki segmental defektlerin tedavisinde, otojen kansellöz kemiğin yerini alabilecek çeşitli greft materyalleri denenmektedir. Demineralize kemik matriksi ise etkisini kanıtlamış, ostekondüktif ve osteindüktif bir grefttir. Bu araştırmanın amacı DBM ve otojen greftin kombine kullanımının tavşan ulna kemik defekti modelindeki etkinliğini araştırmaktır. Deneysel model olarak DBM ve otojen iliak kanat grefti tek başlarına ve birbirleriyle kombine edilerek kullanılmıştır. Kontrol grupları olarak; defekt oluşturulup boş bırakılan ve defekt hiç oluşturulmayan iki grup daha deneye dahil edilmiştir. Sonuçlar radyolojik, histolojik ve dansitometrik olarak değerlendirilmiştir. 12 hafta sonunda defekt alanında ki yeni kemik dokusunun hacimsel ve dansitometrik olarak en iyi DBM + otogreft kompozitinin varlığında olduğu izlenmiştir. Ayrıca kemik dokunun oluşma süreci, yine kompozit grefte diğer gruplara göre daha hızlıdır. Defekt oluşturulup boş bırakılan kontrol grubunda ise yeni kemik oluşumu gözlenmemiştir. Bu sonuçlardan hareketle DBM'in otojen kansellöz kemiğin etkisini potansiyelize ettiği kanısına varıldı. Bu sinerjistik etkinin; DBM'in indüklediği endokondral kemikleşmenin varlığı, DBM'in ihtiva ettiği osteoindüktif faktörlerin otojen greftteki hücrelerle etkileşimi ve DBM'in hızla vaskülarize olmasıyla sağladığı anjiojenik greft yatağının sayesinde olduğu söylenebilir. İnsanlardaki masif segmental kemik defektlerinin onarılmasına DBM + otojen greft kombinasyonu hızlı ve tam defekt tamirinde kullanılabilecek güvenli bir alternatiftir. Böylece DBM'in güçlendirici ve greft hacmini genişletici etkisiyle otojen grefte olan ihtiyaç azalabilir.

SUMMARY

REPAIR OF BONE DEFECTS WITH COMPOSITE BIOMATERIALS

Reconstruction of diaphyseal bone defects is a challenge for orthopaedic surgeons. Cancellous autogenous bone is considered as gold standard for bone grafting applications. Many graft materials had been used for substitution of autogenous bone graft like Demineralized Bone Matrix. DBM has both osteoinductive and osteoconductive capacity. Aim of this study to investigate the efficacy of DBM and autogenous cancellous bone graft composite in a rabbit ulna segmental defect model. DBM alone and autogenous cancellous bone alone were also used for implantation. Other experimental groups in this study were negative control group (defect created but not treated) and positive control group (defect not created). Union was evaluated with radiographical, histological and DEXA measurement at the defected area. Healing was significantly higher in the defects treated with DBM and autogenous graft. Also new bone formation is clearly evident in the early stages of healing process in this group. Negative control group showed no new bone formation. According to these results DBM may increase the effect of autogenous bone grafts. DBM serves as a graft extender or enhancer. Additionally DBM has some capabilities like; rapid revascularization, serving as an excellent graft bed, enhancing of endochondral ossification and osteoinduction by specific peptides. These features of DBM are the key points of its synergistic effect on autogenous grafts. DBM + autogenous bone graft composite an effective alternative in treatment of segmental bone defects in humans. Therefore DBM may decrease the requirement of autogenous bone graft in orthopaedic applications.

KAYNAKLAR

1. Aspenberg, P., Andolf, E.: Bone induction by fetal and adult human bone matrix in atymic rats. *Acta Orthop Scand*, 60:195-199, 1989.
2. Aspenberg, P., Lindqvist, S.B.: Ethene oxide and bone induction. Controversy remains. *Acta Orthop Scand*, 69(2):173-176, 1998.
3. Behraves, E., Yasko, A.W., Engel, P.S., Mikos, A.G.: Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. *Clin Orthop*, 367:118-130, 1999.
4. Beresford, J.N.: Osteogenic stem cells and stromal system of bone marrow. *Clin Orthop*, 240: 270- 280, 1989.
5. Boden, S.D., Schimandle, J.H., Hutton, W.C.: Lumbar intertransverse-process spinal arthrodesis with use of a bovine bone derived osteoinductive protein. *J Bone Joint Surg*, 77(A):1404-1417, 1995.
6. Boden, S.D.: Bioactive factors for bone tissue engineering. *Clin Orthop*, 367:84-95, 1999.
7. Boden, S.D., Lane, J.M., Finnegan, M.: Breakout session 2: Bone. *Clin Orthop*, 367:130-132, 1999.
8. Bolander, M.E., Balian, G.: The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. *J Bone Joint Surg*, 68(A):1264-1274, 1986.
9. Bostrom, M., Lane, J.M., Tomin, E., et. al.: The use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit unlar nonunion model. *Clin Orthop*, 327:272-282, 1996.
10. Boyce, T., Edwards, J., Scarborough, N.: Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*, 30(4):571-581, 1999.
11. Brown, K.L.: Limb reconstruction with vascularized fibular grafts after bone tumor resection. *Clin Orthop*, 262:64-73, 1991.
12. Bruder, S.P., Kurth, A.A., Shea, M., et. al.: Bone regeneration by implanting of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells. *J Bone Orthop Res*, 16:155-162, 1998.
13. Bruder, S.P., Kraus, K.H., Goldberg, V.M., Kadiyala, S.: The effect of autologous mesenchymal stem cell implants on the healing canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg*, 80(A):985-996, 1998.
14. Bruder, S.P., Fox, B.S.: Tissue engineering of bone. Cell based technologies. *Clin Orthop*, 367: 68-84, 1999.

15. Burstein, A.H., Frankel, V.H.: A standart test for laboratory animal bone. *J Biomech*, 4:155-158, 1971.
16. Caplan, A.I.: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9: 641-650, 1991.
17. Chakkalakal, D.A., Strates, B.S., Mashoof, A.A., Garvin, K.L., Novak, J.R., Fritz, E.D., Mollner, T.J., Mc Guire, M.H.: Repair of segmental bone defects in the rat: An experimental model of human fracture healing. *Bone*, 25(3): 321-332, 1999.
18. Chakkalakal, D.A., Strates, B.S., Garvin, K.L., Novak, J.R., Fritz, E.D., Mollner, T.J., Mc Guire, M.H.: Demineralized bone matrix as a biological scaffold for bone repair. *Tissue Eng*, 7(2):161-177, 2001.
19. Cole, B.J., Bostrom, M., Pritchard, T.L., Sumner, D.L., Tomin, E.: Use of bone morphogenetic protein 2 on ectopic porous coated implants in the rat. *Clin Orthop*, 345:219-228, 1997.
20. Concannon, M.J., Boschert, M.T., Puckett, C.L.: Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: A long term study. *Plast Recons Surg*, 99(7):1983-1988, 1997.
21. Connolly, J., Guse, R., Lipiello, L., et. al.: Development of an osteogenic bone marrow preperation. *J Bone Joint Surg*, 71(A): 684- 691, 1989.
22. Connolly, J., Guse, R., Tiedeman, L., et. al.: Autogolous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop*, 266: 259-270, 1991.
23. Cook, S.D., Baffes, G.C., Wolfe, M.W., et. al.: The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg*, 76(A):827-838, 1994.
24. Cornell, C.N.: Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am*, 30(4):591-598, 1999.
25. Demiralp, B., Baykal, B., Erler, K., Basbozkurt; M.: Kemik tümörlerinin tedavisinde biyolojik rekonstrüksiyon. 18. Milli Ortopedi Kongresi Kongre Kitabı, İstanbul, 2003.
26. Dennis, J.E., Haynesworth, S.E., Young, R.E., et. al.: Osteogenesis from marrow derived mesenchymal cell porus ceramic composites transplanted subcutaneously. Effect of fibronectin and laminin on cell retantion and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant*, 1: 23-32, 1992.
27. Doherty, M.J., Mollan, R.A.B., Wilson, D.J.: Effect of ethylene oxide sterilization on human demineralized bone. *Biomaterials*, 14:994-998, 1993.

28. Dupoirieux, L., Costes, V., Jammet, P., Souyris, F.: Experimental study on DBM and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 23:395-398, 1994.
29. Edwards, J.T., Diegmann, M.H., Scarborough, N.L.: Osteoinduction of human demineralized bone, osteoinduction in a rat model. *Clin Orthop*, 357:219-228, 1998.
30. Einhorn, T.A., Lane, J.M., Burnstein, A.H., Kopman, C.R., Vigorita, V.J.: The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg*, 66(A):274-279, 1984.
31. Einhorn, T.A.: Current concepts review. Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg*, 77(A): 940- 956, 1995.
32. Einhorn, T.A., Majeska, R.J., Oloumi, G., et. al.: Enhancement of experimental fracture healing with a local percutaneous injection of rhBMP-2. *Trans Am Acad Orthop Surg*, 64:415, 1997.
33. Einhorn, T.A.: Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop*, 367: 59-68, 1999.
34. Erler, K.: Nonunionların demineralize kemik matriksi ve kemik iliğinin kombine perkütan enjeksiyonları ile tedavisi. Uzmanlık tezi, Ankara, 1993.
35. Feighan, J.E., Davy, D., Prewett, A.B., Stevenson, S.: Induction of bone by a demineralized bone matrix gel. A study in a rat femoral defect model. *J Orthop Res*, 13(6): 881-891, 1995.
36. Ferguson, D., Dawis. W.L., Urist. M.R., et. al.: Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction induced repair of craniotomy defect in rhesus monkey (*Maraca Speciosa*). *Clin Orthop*, 219: 251-258, 1987.
37. Fleming, J.E., Cornell, C.N., Muschler, G.F.: Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am*, 31: 357-375, 2000.
38. Gatti, A.M., Zaffe, D., Poll, G.P.: Behavior of tricalcium phosphate and hydroxyapatite granules in sheep bone defects. *Biomaterials*, 11:513 -517, 1990.
39. Gebhart, M., Lane. J.M.: A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta Orthop Belg*, 57:130-143, 1991.
40. Gebhardt, M.C., Flugstad, D.I., Springfield, D.S., et. al.: The use of bone allografts for limb salvage in high grade extremity osteosarcoma. *Clin Orthop*, 270:181-196, 1996.

41. Geesink, R.G.T., Hoefnagels, N.H.M., Bulstra, S.K.: Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg*, 81(B): 710-718, 1999.
42. Gepstein. R., Weiss. R.E., Hallel. T.: Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder: a radiographical, histological and radioisotope uptake study in rats. *J Bone Joint Surg*, 67(A):984-992, 1987.
43. Gerhart, T.N., Kirker-Head, C.A., Kriz, M.J., et. al.: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*, 293:317-326, 1993.
44. Glowacki, J., Kaban, L.B., Sonis, S.T.: Physiological aspects of bone repair using demineralized bone. In Hurt TK, Heppinstall RB, Pines E, et al: *Soft and hard tissue repair*. New York, Praeger, 1984, pp 265-280.
45. Glowacki, J., Mulliken, J.B.: Demineralized bone implants. *Clin Plast Surg*, 12:233-241, 1985.
46. Goldstein, S.A., Bonadio, J.: Potential role of direct gene transfer in the enhancement of fracture healing. *Clin Orthop*, 355: 154-162, 1998.
47. Goldstein, S.A.: Breakout session 2: Bone. *Clin Orthop*, 367:133-134, 1999.
48. Guo, M.Z., Xia. Z.S., Lin. L.B.: The mechanical and biological properties of demineralized cortical bone allografts in animals. *J Bone Joint Surg*, 73(B): 791-794, 1991.
49. Harakas, N.K.: Demineralized bone matrix-induced osteogenesis. *Clin Orthop*, 188:239-251, 1984.
50. Haynesworth, S.E., Baber, M.A., Caplan, A.I.: Cell surface antigens on human marrow derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13: 69-80, 1992.
51. Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., et. al.: Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13: 81-88, 1992.
52. Hornicek, F.J., Gebhardt, M.C., Sorger, J.I., et. al.: Tumor reconstruction. *Orthop Clin North Am*, 30(4):673-684, 1999.
53. Hosny, M., Sharawy, M.: Osteoinduction in rhesus monkeys using demineralized bone powder allografts. *J Oral Maxillofac Surg*, 43:837-844, 1985.
54. Johnson, E.E., Urist, M.R., Finerman, G.A.: Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. *Clin Orthop*, 230:257-265, 1988.

55. Johnson, E.E., Urist, M.R., Finerman, G.A.: Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones. *Clin Orthop*, 277:229-237, 1992.
56. Johnson, K.D., Frierson, K.E., Keller, T.S., et. al.: Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects. A biomechanical histological and radiographic analysis. *J Orthop Res*, 14:351- 369, 1996.
57. Junquera, L.C., Carnerio, J., Kelley, R.O.: Basic histology. 1993, Lange medical book.
58. Kado, K.E., Gambetta, L.A., Perlman, M.D.: Uses of grafton for reconstructive foot and ankle surgery. *J Foot Ankle Surg*, 35:59-66, 1999.
59. Kawaguchi, H., Kurokawa, T., Hanada, K., et.al.: Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology*, 135:774-781, 1994.
60. Khan, S.F., Bostrom, M.P., Lane, J.M.: Bone growth factors. *Orthop Clin North Am*, 31(3): 375- 389, 2000.
61. Khan, S.F., Tomin, E., Lane, J.M.: Clinical aplication of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*, 31(3): 389- 399, 2000.
62. Kohler, P., Glas, J.E., Larson, S., Kreivberg, A.: Incorporation of nonviable bone grafts. *Acta Orthop Scand*, 58:54-60, 1987.
63. Korkusuz, F., Karamete, K., İrfanoğlu, B., Yetkin, H., Hastings, G.W., Akkaş, N.: Do porous calcium hydroxyapatite ceramics cause porosis of bone? A bone densitometry and biomechanical study on cortical bones of rabbits. *Biomaterials*, 16:537-543, 1995.
64. Lane, J.M., Tomin, E., Bostrom, M.P.: Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop*, 367: 107-118, 1999.
65. Lane, J.M., Yasko, A.W., Tomin, E., et.al.: Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin Orthop*, 361:216-227, 1999.
66. Lattermann, C., Baltzer, A.W.A., Whalen, J.D., et.al.: Establishment and validation of an atrophic non-union model in a rabbit for the use of gene therapy. *Trans Int Soc Fracture Repair*, 6:55, 1988.
67. Lindholm, T.S., Nilsson, O.S., Lindholm, T.C.: Extraskkeletal and intraskkeletal new bone formation induced by demineralized bone matrix combined with bone marrow cells. *Clin Orthop*, 171:251-255, 1982.
68. Lousia, S., Stromboni, M., Meunier, A., Sedel, L., Petite, H.: Coral grafting supplemented with bone marrow. *J Bone Joint Surg*, 81(B):719-724, 1999.

69. Lu, M., Bakr, A., Rabie, M.: The effect of demineralized intramembraneous bone matrix and basic fibroblast growth factor on the healing of allogenic intramembraneous bone grafts in the rabbit. *Arch Oral Biol*, 47:831-841, 2002.
70. Majors, A., Boehm, C.A., Nitto, H., et. al.: Charecterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differantiation. *J Orthop Res*, 15: 546- 557 1997.
71. Maniopoulos, C., Sodek, J., Melcher, A.H.: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*, 254: 317- 330, 1988.
72. Mankin, H.J., Gebhardt, M.C., Tomford, W.W.: The use of frozen cadaveric allografts in the manangement of patients with bone tumors of the extremities. *Orthop Clin North Am*, 18: 275-289: 1987.
73. Markel, M.D., Morin, R.L., Wikenheiser, M.A., Lewallen, D.G., Chao, E.Y.S.: Quantitative CT for the evaluation of bone healing. *Calcif Tissue Int*, 49:427-432, 1991.
74. Martin, G.J., Boden, S.D., Titus, L., et. al.: New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine*, 24:637-645, 1999.
75. Mulliken, H.J., Kaban, L.B., Glowacki, J.: Induced osteogenesis: The biological principles and clinical applications. *J Surg Res*, 37: 487-496, 1984.
76. Munting, E., Willmart. J.F., Wijne. A., Hennebert. P., Delloye. C.: Effect of sterilization on osteoinduction: Comparision of five methods in deminalized rat bone. *Acta Orthop Scand*, 59:34-38, 1988.
77. Nade, S.: Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. The initial cellular events fallowing transplantation of decalcified allografts of cancellous bone. *Acta Orthop Scand*, 48:572, 1977.
78. Nade, S., Burwell, R.G.: Decalcified bone as a substrate for osteogenesis: An apprasial of the interrelation of bone and marrow in combined grafts. *J Bone Joint Surg* 59(B):189-196, 1977.
79. Nakajima, F., Yamazaki, M., Ogasawara, A., et. al.: Enhancement of experimental fracture healing with a local injection of basic fibroblast growth factor. *Trans Orthop Res Soc*, 23:596, 1998.
80. Nyman, R., Magnusson, M., Sennerby, L., Nyman, S., Ludgren, D.: Membrane guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. *Acta Orthop Scand*, 66(2):169-173, 1995.

81. Ohgushi, H., Goldberg, V.M., Caplan, A.I.: Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand*, 0: 334-339, 1989.
82. Oikarinen, J.: Experimental spinal fusion with decalcified bone matrix and deep frozen allogeneic bone in rabbits. *Clin Orthop*, 162: 210-218, 1982.
83. Perry, C.R.: Bone repair techniques, bone grafts and bone graft substitutes. *Clin Orthop*, 360:71-86, 1999.
84. Rabie, A.B.M., Deng, Y.M., Samman, N., Hagg, U.: The effect of demineralized bone matrix on the healing of intramembranous bone grafts in the rabbit skull defects. *J Dent Res*, 75(4):1045-1051, 1996.
85. Rabie, A.B.M., Wong, R.W.K., Hagg, U.: Composite autogenous bone and demineralized bone matrices used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 38:565-570, 2000.
86. Radomsky, M.L., Thompson, A.Y., Spiro, R., et al: Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop*, 355: 283- 293, 1998.
87. Radomsky, M.L., Spiro, R., Poser, J.: Augmentation of fracture healing with fibroblast growth factor in a hyaluronan gel. *Trans Intl Soc Fracture Repair*, 6:41-42, 1998.
88. Ragni, P.C., Lindholm. T.S.: Interaction of allogeneic demineralized bone matrix and porous hydroxyapatite bioceramics in lumbar interbody fusion in rabbits. *Clin Orthop*, 272: 292-299, 1991.
89. Reddi, A.H., Huggins, C.: Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci*, 69:1601-1605, 1972.
90. Reddi, A.H., Ripamonti, U.H.: Growth and morphogenetic bone induction. *Crit Rev Oral Biol Med*, 39(1-2):1-14, 1992.
91. Ripamonti, U.: Bone induction in nonhuman primates: An experimental study on the baboon. *Clin Orthop*, 269:284-294, 1991.
92. Rosen, G., Murphy, M., Huvos, A., et. al.: Chemotherapy, en bloc resection and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer*, 31:1-11, 1976.
93. Rougraff, B.T., Simon, M.A., Kniesl, J.S., et. al.: Limb salvage compared with amputation for osteosarcoma of the distal end of the femur. *Clin Orthop*, 76:649-656, 1994.
94. Russel, J.L., Block, J.E.: Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis and reconstruction. Impact of processing techniques and study methodology. *Orthopedics*, 22(5):524-531, 1999.

95. Schwarz, N., Redl, H., Schlag, G., Schiesser, A., Lintner, F., et.al.: The influence of fibrin sealant on demineralized bone matrix dependent osteoinduction. *Clin Orthop*, 238:282-287, 1989.
96. Schwarz, N., Schlag, G., Thurner, M., et.al.: Decalcified and undecalcified cancellous bone block implants do not heal diaphyseal defects in dogs. *Arch Orthop Trauma Surg*, 111:47-50, 1991.
97. Sciadini, M.F., Dawson, J.M., Johnson, K.D.: Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res*, 15:844-857, 1997.
98. Seitz, W.H., Froimson, A.I., Leb, R.B.: Autogenous bone marrow and allograft replacement of bone defects in the hand and upper extremities. *J Orthop Trauma*, 6(1):36-42, 1992.
99. Shen, W.J., Chung, K.C., Wang, G.J., Balian, G., McLaughlin, R.E.: Demineralized bone matrix in the stabilization of porous coated implants in bone defects in rabbits. *Clin Orthop*, 293:346-352, 1993.
100. Simon, M.A.: Limb salvage for osteosarcoma. *J Bone Joint Surg*, 70(A): 307-310, 1988.
101. Solheim, E., Pinholt, E.M., Andersen, R., et. al.: The effect of a composite of polyorthoester and demineralized bone on healing of large segmental defects of the radius in rats. *J Bone Joint Surg*, 74(A):1456-1463, 1992.
102. Springfield, D.: Massive autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am*, 18: 249-256, 1987.
103. Springfield, D., Schmidt, R., Graham-Pole, J., et.al.: Surgical treatment for osteosarcoma. *J Bone Joint Surg*, 70(A):1124-1130, 1988.
104. Stevenson, S.: Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am*, 30(4):543-552, 1999.
105. Takagi, K., Urist, M.R.: The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Ortop*, 171:224-231, 1982.
106. Tiedeman, J.J., Connolly, J.F., Strates, B.S., 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.
107. Tiedeman, J.J., Garvin, K.L., Kile, T.A., Connolly, J.F.: The role of composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics*, 18:1153-1158, 1995.

108. Tomford, W.W., Mankin, H.J.: Bone banking, update on methods and materials. *Orthop Clin North Am*, 30(4) :565-570, 1999.
109. Tsuchiya, H., Tomita, K., Minematsu, K., et. al.: Limb salvage using distraction osteogenesis. *J Bone Joint Surg*, 79(B): 403-411, 1997.
110. Upton, J., Glowacki. J.: Hand reconstruction with allograft demineralized bone: 26 implants in 12 patients. *J Hand Surg*, 17(A): 704-713, 1992.
111. Urist, M.R.: Bone: Formation by autoinduction. *Science*, 150:893-899, 1965.
112. Urist, M.R., Silverman. B.F., Buring. K., Dubuc. F.L., Rosenberg. J.M.:The bone induction principle. *Clin Orthop*, 53:243-283, 1967.
113. Urist, M.R., Dowell, T.A., Hay, P.H. et.al.: Inductive substrates for bone formation. *Clin Orthop*, 59:59-96, 1968.
114. Xiaobo, H., Lunlong, Y., Chuanzin, L., Shucheng, W., Yankun, C.: Experimental and clinical investigation of human insoluble bone matrix gelatin. *Clin Orthop*, 293:360-365, 1993.
115. Werentz, J.R., Lane, J.M., Piez. C.: The repair of segmental bone defects with collagen and marrow. *Orthop Trans*, 10: 262, 1986.
116. White, A.A., Panjabi, M.M., Southwick, W.O.: The four biomechanical stages of fracture repair. *J Bone Joint Surg*, 59(A):188-197, 1977.
117. Winn, S.R., Uludag, H., Hollingery, J.O.: Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop*, 367:95-107, 1999.
118. Wittbjer, J., Palmer, B., Rohlin, M., Thorngren, K.G.: Osteogenic activity in composite grafts of demineralized compact bone and marrow. *Clin Orthop*, 173:229-238, 1983.
119. Yang, C.Y., Simmons, D.J., Lozano, R.: The healing of grafts combining freeze dried and demineralized allogenic bone in rabbits. *Clin Orthop*, 298:286-295, 1994.
120. Yasko, A.W., Lane, J.M., Fellingner, E.J., et.al.: The healing of segmental bone defects induced by recombinant bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg*, 74(A):659-970, 1992.
121. Yazdi, M., Bernick, S., Paule, W.J., et. al.: Postmortem degradation of demineralized bone matrix osteoinductive potential: Effect of time and storage temperature. *Clin Orthop*, 262:281-287,1991.
122. Yıldız, C.: Otolog kondrosit transplantasyonu. *Uzmanlık tezi*, Ankara, 1996.
123. Zhang, M., Powers, R.M., Wolfenbarger, L.: Effects of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Periodontol*, 68:1085-1092, 1997.

124. Zhang, M., Powers, R.M., Wolfinbarger, L.: Quantitative assesment of odteoinductivity of human demineralized bone matrix. J Periodontol, 68:1076-1084, 1997.

