



# At kemiği kaynaklı kemik protein ekstresinin (Colloss-E) kaviter kemik defektlerinin tedavisindeki etkisi: Deneysel çalışma

Murat SONGÜR<sup>1</sup>, Ercan ŞAHİN<sup>1</sup>, Tuğcan DEMİR<sup>2</sup>, Mahmut KALEM<sup>3</sup>,  
Gülnur TAKE KAPLANOĞLU<sup>4</sup>, Necdet Şükrü ALTUN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Zonguldak

<sup>2</sup>Bahçeşehir Üniversitesi, Medikal Park Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, İstanbul

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>4</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>5</sup>Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Ankara

**Amaç:** Kemik protein ekstreleri (KPE), dokuya yerleştirilmeleri esnasında bir taşıyıcıya gereksinim duymaktadırlar. Bu çalışmada deneysel kaviter kemik defekti modelinde, yüksek miktarda tip-I kolla- jen ve diğer kemik matriks proteinlerini içeren osteoindüktif bir biyomateryal olan at kaynaklı KPE'nin (Colloss-E) herhangi bir taşıyıcı olmaksızın etkinliğini, insan kaynaklı demineralize kemik matriksi ile karşılaştırmayı amaçladık.

**Çalışma planı:** Tavşan distal femur kondili stabil kaviter kemik defekti modeli olarak seçildi. 6 mm çap ve 10–12 mm derinlikte defekt oluşturuldu. Çalışma, her grupta altışar denek üzere at kaynaklı KPE (KPE grubu), insan kaynaklı demineralize kemik matriksi (DKM grubu) ve kontrol (K grubu) olmak üzere üç grupta planlandı. KPE grubunda defekt yaklaşık 20 mg. KPE ile doldurulurken DKM grubunda 0,3 cc DKM yerleştirildi. Kontrol grubu ise boş bırakıldı. Boşluk bölgeleri altıncı hafta sonunda histolojik değerlendirilmeye tabi tutuldu.

**Bulgular:** Makroskopik olarak hiç bir defekte çökme gözlenmedi. Histolojik değerlendirmede KPE grubu, DKM ve K gruplarından gerek kaynama kalitesi, gerek yeni kemik dokusu oluşumu, gerekse greft inkorporasyonu skorları açısından daha başarılı sonuçlandı ( $p < 0.05$ ).

**Çıkarımlar:** Çalışmamızda, KPE'nin etkinliğini araştıran geçmiş literatür ile uyumlu sonuçlar elde edildi. At kaynaklı KPE ile, kaviter kemik defektlerinin tedavisinde herhangi bir taşıyıcı kullanmaksızın başarılı sonuçlar elde edildi.

**Anahtar sözcükler:** Colloss-E; deneysel çalışma; distal femur; kemik defekti; kemik protein ekstresi.

Kemik greftleri ve greft yerini tutan maddeleri kemik kaybı ve yeni kemik oluşumunun gerektiği durumlarda sık kullanılmaktadır. Allogreftlerdeki en önemli sorun-

lar kaynak teminindeki sorunlar ve yüksek maliyet olarak sıralanabilir. Bu nedenle farklı tür canlılardan kemik kaynağı arayışı gittikçe popüler hale gelmiştir.

**Yazışma adresi:** Dr. Murat Songür, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Zonguldak.

Tel: +90 372 – 261 30 31 e-posta: msongur77@gmail.com

**Başvuru tarihi:** 25.09.2014 **Kabul tarihi:** 12.12.2014

©2015 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu  
www.aott.org.tr adresinde  
doi: 10.3944/AOTT.2015.14.0344  
Karekod (Quick Response Code)



Sığır kemiğinden üretilen kemik protein ekstresi (KPE), saflaştırılmış üçlü-helikol yapıda tip-I kollajen ve diğer non-kollajenöz proteinleri içeren bir biyomateriyaldir. Kollajenin, çeşitli büyüme faktörleri (TGF-B, IGF) ve sitokinler (fibronectin, osteoclastin) aracılığıyla kondrosit farklılaşmasını ve mineral birikimini uyardığı gösterilmiştir. Kemik protein ekstresinin, otojen kemik greftlerinden farklı olarak osteoklastik süreç olmaksızın osteojenezi uyardığı gösterilmiştir.<sup>[1-3]</sup> Ayrıca kollajenin, üzerine tutunan büyüme faktörleri ile oluşturdukları kompleksler aracılığıyla mezenkimal hücreler üzerinde kemotaktik aktivite gösterdiği bildirilmiştir.<sup>[4,5]</sup> Osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri nedeniyle sığır kaynaklı kemik protein ekstresi ile düşük immünojenite ve düşük bulaşıcı hastalık riski ile başarılı sonuçlar bildirilmiştir.<sup>[6-8]</sup> Her ne kadar sığır kemiği, sorunsuz elde edilebilen bir kemik kaynağı gibi görünse de, spongiform ensefalopati, sığırdan insana, greft hazırlanma sürecinde inaktive olmayan prionlar aracılığıyla geçebilecek potansiyel bir hastalık olarak bilinmektedir. Bugüne kadar at cinslerinde prionlar aracılığıyla taşınan spongiform ensefalopati olgusu bildirilmemiştir. Bu nedenle at kemiği, sığır kemiğine kıyasla daha güvenli bir alternatif olarak kullanılabilir.<sup>[9,10]</sup>

At kaynaklı kemik protein ekstresi, ticari ismiyle Colloss-E (OSSACUR AG, Oberstenfeld, Almanya), at kemiğinden elde edilen pamuksu yapıda bir biyomateriyaldir. At kaynaklı KPE'nin Elisa yöntemiyle  $55 \pm 11$  mg/g TGF- $\beta$ 1,  $2.6 \pm 0.2$  mg/g BMP-2,  $3.8 \pm 2.7$  mg/g BMP-7 ve  $2.9 \pm 0.8$  mg/g IGF-1 içerdiği gösterilmiştir.<sup>[11]</sup> Her ne kadar kemik dışı ektopik dokuda dahi osteoindüktif etki gösterdiği gösterilmiş olsa da,<sup>[12,13]</sup> hem sığır hem at kaynaklı kemik protein ekstresinin en önemli dezavantajı, bu biyomateriyallerin yapısal desteğe sahip olmaması ve vücut sıvılarına maruz kaldıklarında çözünmeye başlamasıdır. Bu nedenle dokuda kullanım esnasında bir taşıyıcı (scaffold) kullanılmaktadır. Rat ektopik kemik oluşumu modelinde at kaynaklı KPE'yi taşımak için mineralize kollajen kullanımında, titanyum kafeste gözlenmeyen yoğun enflamatuvar reaksiyon gözlenmiştir.<sup>[12,14]</sup> Sonuçta taşıyıcı maddeler de biyolojik ortamı değiştirerek biyomateriyalin dokudaki davranışını olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

Bu çalışmada at kaynaklı KPE'nin (Colloss-E), stabil bir kaviter kemik defekti modelinde herhangi bir taşıyıcı olmaksızın etkinliğini araştırmayı amaçladık. Çalışmada at kaynaklı KPE'nin etkinliğini, benzer osteoindüktif etkiler gösteren insan kaynaklı demineralize kemik matriksi (DKM) ile karşılaştırdık. Stabil kaviter kemik defekti modelini seçmemizdeki amacımız taşıyıcı cihazın veya tespit materyallerinin osteojenik süreç üzerindeki

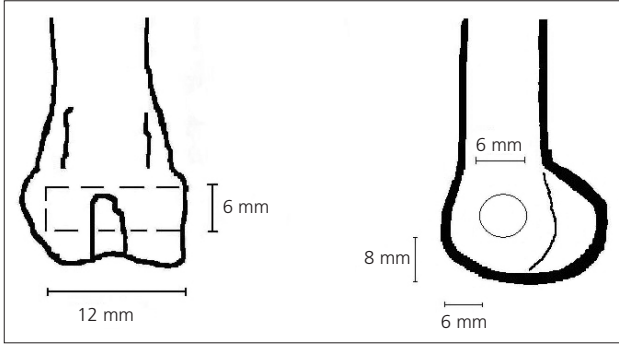
potansiyel olumlu veya olumsuz etkilerinden kaçınmak olarak özetlenebilir.

## Gereç ve yöntem

Bu çalışma Gazi Üniversitesi, Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun B.30.2nci GÜN.0.EU.00.00/51-8294 sayılı etik kurul onayı ve gözetimi altında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, uygun kemik boyutu, insan haversian sistemine benzerliği, kendiliğinden füzyon ihtimalinin düşük olması ve tespit materyaline ihtiyaç duyulmaması nedeniyle tavşan distal femuru, kaviter kemik defekti modeli olarak seçildi. Çalışmada KPE'nin etkinliği, benzer şekilde osteoindüktif özellikleri nedeniyle kullanılmakta olan insan kaynaklı DKM ile karşılaştırıldı. Her ne kadar otojen kansellöz kemik grefti, halen günümüzde altın standart özelliğini sürdürse de, osteokondüktif özellikleri ve hücresel içeriği nedeniyle çalışma sonuçlarının yorumlanmasında karışıklığa yol açabileceğinden çalışma materyali olarak seçilmedi. Çalışma; her grupta altı denek olacak şekilde at kaynaklı KPE (KPE), demineralize kemik matriksi (DKM) ve kontrol (K) olmak üzere üç grupta planlandı. İstatistiksel açıdan anlamlı sonuç verebilen minimum sayıda olmak üzere toplam 18 adet erkek, erişkin 800–1000 gr arası Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı.

Tüm cerrahi işlemler ve takip, Gazi Üniversitesi, Deneysel Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. İntramusküler ketamin ve xylazine ile yeterli genel anestezi sağlandıktan sonra tüm deneklerin sol alt ekstremiteleri tıraş edilerek hazırlandı. Uygun sterilizasyon ve örtünme sonrası distal femur kondili lateralinden 1,5 cm. uzunluğunda uzunlamasına bir insizyon yapıldı. Cilt altı ve fasya geçildikten sonra kemiğe ulaşıldı. Ekleme paralel olacak şekilde 6 mm çapında kanüle-derinlik ölçekli delici ile 10–12 mm derinliğinde tünel açıldı. Tünelin merkezinin distal eklem yüzeyinden 8 mm anterior eklem yüzeyinden 6 mm uzakta olmasına dikkat edildi. Sonuçta anterior korteksten 3 mm distal eklem yüzeyinden 5 mm kalınlığında sağlam kemik bırakıldı (Şekil 1 ve 2a). Kavite duvarlarının sağlamlığı 4 mm'lik artroskopik prob ile kontrol edildi. Sonuçta 0.3 cc hacminde stabil bir defekt elde edildi. KPE grubundaki deneklerde defekt 20 mg Colloss-E ile doldurulurken DKM grubunda ise 0.3 cc jel formunda demineralize kemik matriksi (MTF, Edison, NJ, ABD) enjekte edildi (Şekil 2b ve 2c). Kontrol grubunda ise boş bırakıldı. Defekt üzerindeki periost ve fasya sıkı bir şekilde dikildi. Cerrahi esnasında ve sonrasında hiç bir denek kaybedilmedi. Tüm denekler aynı gün rutin beslenmelerine devam ederek birinci gün sonrası olguların mobilize oldukları gözlemlendi. Kendiliğinden kaynamanın engellenmesi için altıncı haftanın sonunda



Şekil 1. Oluşturulan defektin A-P ve lateral plandaki görünümü.

denekler feda edilerek sol femurlar kalça dezartikülasyonu ile çıkarıldı. Yumuşak dokuların temizlenmesi sonrası makroskopik ve mikroskopik değerlendirme yapıldı.

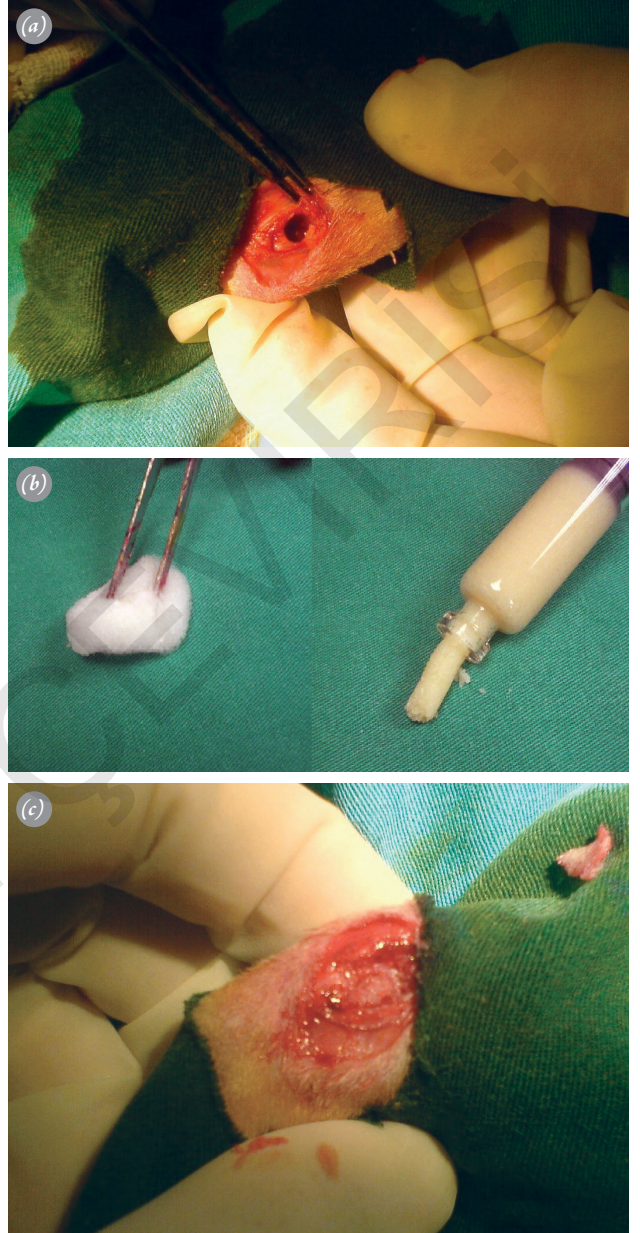
Değerlendirme makroskopik ve mikroskopik olarak yapıldı. Histolojik değerlendirme, iyileşme dokusu rutin mikroskopi ve histomorfometrik skala<sup>[15]</sup> (Tablo 1) yardımıyla subjektif değerlendirme şeklinde gerçekleştirildi. Kesitler, korteks yüzeyinin 5–6 mm derininde olacak şekilde sagittal planda yapıldığından korteks gelişimi ve remodelizasyonu, skorlama esnasında değerlendirilmedi. Kaynama kalitesi, greft inkorporasyonu ve yeni kemik oluşumu ile ilgili veriler skorlamada kullanıldı. Elde edilen skorlar, istatistiksel olarak Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak SPSS 12.0 for Windows programı aracılığıyla değerlendirildi.

## Bulgular

Makroskopik olarak delik yüzeyleri tüm olgularda fibröz doku ile kaplı idi. Hiçbir olguda çökme veya kırık gözlenmedi. Histolojik olarak KPE grubunda defekt bölgesinin tamamen matür kemik dokusuna dönüştüğü gözlemlendi. Hücreli matürite, matür kollajen dizilimi ve mineralizasyonu ile uyumlu boyama özellikleri gözlemlendi (Şekil 3a). Yüksek büyütmede parçalar halinde dairesel dizilim gösteren kemik lamelleri, henüz matüre olmamış şişkin osteositler ve organize olmamış kemik dokusu gözlemlendi. Bu bulgu, primer kemik iyileşmesi ile oluşmuş yeni kemik dokusu olarak yorumlandı.

DKM grubunda yerleştirilen materyalin tamamen kıkırdak dokuya dönüştüğü gözlemlendi. Kemik öncülü olan kıkırdak dokusunun bazı bölgelerde epifiz dokusuna benzediği gözlemlendi. Kıkırdığın defektin içinde büyük oranda kemiğe dönüşmeye başladığı ve bazı yerlerde immatür kemik dokusu ile birlikteliği gözlemlendi (Şekil 3b).

Kontrol grubunda ise defekt alanının tamamen fibröz doku ile dolu olduğu gözlemlendi (kollajenden zengin fibröz bağ doku) (Şekil 3c). Yüksek büyütmede fibroblastların kemik dokudan uzakta tüm yönlerde dağınık



Şekil 2. (a) Femura diz lateralinden yapılan insizyon ile ulaşıldı. (b) Greft materyalleri, Colloss-E (sol) ve demineralize kemik matrisi (sağ). (c) Doldurulmuş defekt. [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

kollajen lifleri arasında fuziform şekilde dağıldığı ve öbelenmediği gözlemlendi. Komşu kemik doku ise, normal lamellar kemik olarak gözlemlendi. İyileşme bulgularının skorları Tablo 2'de özetlenmiştir.

İyileşme skorları açısından bakıldığında tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Kaynama kalitesi açısından bakıldığında; KPE grubu ile DKM grubu skorları arasında KPE lehine anlamlı fark gözlenirken ( $p=0.002$ ), KPE ile kontrol grubu arasındaki fark ise

**Tablo 1.** Histolojik değerlendirme cetveli.<sup>[15]</sup>

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

benzer şekilde anlamlı idi ( $p=0.002$ ). Benzer şekilde DKM grubu ile kontrol arasındaki fark DKM lehinde anlamlı olarak görüldü ( $p=0.007$ ) (Şekil 4a).

Greft inkorporasyonu ve yeni kemik oluşumu:

DKM grubu ( $n=6$ ): Ortalama skor  $4 \pm 0.632$

KPE grubu ( $n=6$ ): Ortalama skor  $5.33 \pm 0.516$

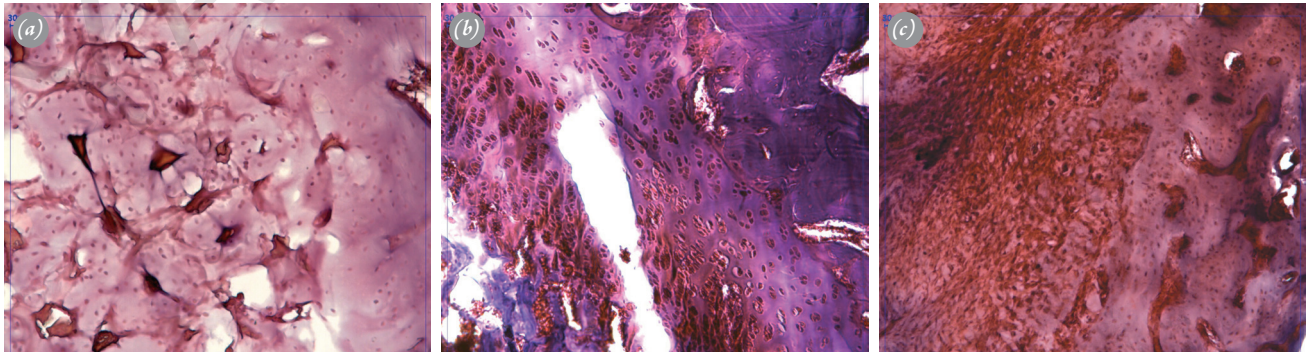
Greft inkorporasyon skorları açısından gözlenen farkın, KPE grubunda daha yüksek olduğu şeklinde anlamlı olduğu gözlemlendi ( $p=0.002$ ) (Şekil 4b).

### Tartışma

Kemik greftleri ve greft yerini tutan maddelerin üretimindeki en önemli sorun, hammadde elde edilmesin-

deki sorunlardır. Bir diğer önemli sorun ise greftin hazırlanması sürecinde uygulanan yüksek teknoloji işlemlere rağmen hastalık geçişi ihtimalinin sifira indirgenememesidir. At kaynaklı KPE'nin geliştirilmesindeki amaç; bu taşıyıcı hastalık ihtimalini mümkün olan en düşük seviyede tutarak ucuz, hammadde temin sorunu yaşanmayan bir biyomateryal elde edilmesidir.

Genel olarak at kaynaklı KPE, içerdiği büyüme faktörleri nedeniyle osteoindüktif etki göstermektedir. At kaynaklı KPE'nin rat kemik iliği hücre kültüründe erken dönemde osteoblastik farklılaşma ve artmış alkalen fosfataz aktivitesi gösterilmiştir. Ek olarak içerdiği TGF- $\beta$ 1, BMP-7, BMP-2 ve IGF-1 ve kısmen muhtemel VEGF ile proliferasyonu ve matris kalsifikasyonu-

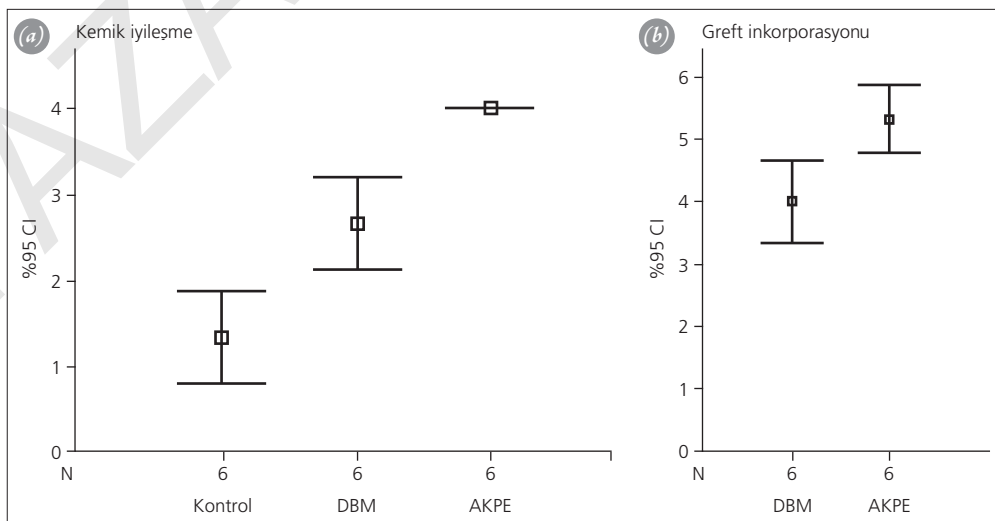


**Şekil 3.** (a) Kemik protein ekstresi. Lamellar kemik yapısı bölgesel sirküler karakter gösteriyor. (b) demineralize kemik matrisi. Kemik öncülü kıkırdak dokusu ve aralarda kemikleşmiş kıkırdak dokuları. (c) Kontrol grubu. Düzensiz kollajen lifleri, fibroblastlar ve komşuluğunda düzgün kemik lamelleri (normal doku). [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

na yol açmaktadır.<sup>[11,16]</sup> Bir diğer çalışmada rat ektojik kemik oluşumu modelinde, at kaynaklı KPE, BMP-2 ve TGF- $\beta$ 'nin osteoblastik farklılaşma ve proliferasyon üzerindeki etkinliği karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada BMP-2'nin proliferasyon açısından daha etkin olduğu, at kaynaklı KPE ve TGF- $\beta$ 'nin (KPE'nin ana büyüme faktörü) osteoblastik farklılaşma açısından benzer etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.<sup>[17]</sup>

Bu çalışmada at kaynaklı KPE'nin, dokuda herhangi bir taşıyıcı ve aracı olmaksızın stabil kaviter kemik defekti modelindeki etkinliğini araştırdık. Literatürde farklı taşıyıcılar aracılığıyla at kaynaklı KPE kullanılarak yeni kemik oluşumunu değerlendiren deneysel çalışmalar genel olarak otogreft ve allogreftler ile benzer radyolojik ve histolojik sonuçlar bildirmiştir (Tablo 3). Titanyum kafes kullanılan domuz interbody füzyon modelinin kullanıldığı bir çalışmada 100 mg/cc dozunda at kaynaklı KPE ile üçüncü ay sonunda otogreft ile benzer histolojik ve radyolojik sonuçlar bildirilmiştir.<sup>[18]</sup> Başka bir çalışmada seramik dolgu materyalinin taşıyıcı olarak kullanıldığı bir çalışmada 20 mg/cc dozunda at kaynaklı KPE ile fibröz doku olmaksızın yeni kemik dokusu elde edilmiştir.<sup>[19]</sup> PEEK kafes ile domuz interbody füzyon modelinin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise 8 hafta sonunda 35 mg/cc at kaynaklı KPE, otogreft ve BMP-2'nin osteojenik açıdan benzer metabolik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamızın bulgularına zıt olarak at kaynaklı KPE ile belirgin endokondral osifikasyon gözlenmiştir.<sup>[20]</sup> Ancak bir diğer çalışmada ise BMP, at kaynaklı KPE ve otogreftin karşılaştırıldığı bir sonlu eleman çalışmasında ise farklı trabeküler dizilim özellikleri bildirilmiştir. Bu çalışmada

BMP ile benzer sonuçlar veren at kaynaklı KPE ve otogreftten daha olgun bir kemik dokusu elde edilmiştir.<sup>[21]</sup> Bu bulgulardan farklı olarak bir diğer çalışmada ise keçi mandibulasında yapılan bir defekt modelinde ise 35 mg/cc dozunda at kaynaklı KPE ile santral yerleşimli yeni kemik oluşumu elde edilmiş olup kontrol grubundan daha etkili olmadığı bildirilmiştir. Bu durumun, içerdiği büyüme faktörlerinin neden olduğu aşırı ödem ve defekt üzerine sütüre edilen biyomembranın hücre migrasyonuna engel olmasına bağlanmıştır.<sup>[22]</sup> Koyun proksimal humerusunda karboksimetil selüloz aracılığıyla 20 mg/cc dozunda at kaynaklı KPE ile başarılı sonuç bildirilmiştir.<sup>[23]</sup> Bir diğer çalışmada ise koyun femurunda kritik boyutta defekt modelinde hidroksiapatit- $\beta$  trikalsiyum fosfat-poli-D-laktik asit implant aracılığıyla 100mg/cc at kaynaklı KPE ile allogreft ile benzer mekanik ve histolojik yeni kemik oluşumu elde edilmiştir.<sup>[24]</sup> Bir diğer çalışmada ise 20 mg/cc dozunda at kaynaklı KPE ile hidroksiapatit kaplı implant osteointegrasyonu modelinde yüksek oranda osteointegrasyon ve düşük fibröz enkapsülasyon ile sonuçlanmıştır.<sup>[25]</sup> Çalışmamızda yaklaşık 67 mg/cc dozunda at kaynaklı KPE defekte yerleştirildi. Defekt üzerindeki periost ve fasya dikilerek çözülme ve ektojik dokuya yayılma engellendi. Önceki çalışmalarda histolojik değerlendirme genel olarak 6–16 haftalar arasında gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla çalışmamızın sonlandırılması süresinin literatür ile uyumlu ve karşılaştırılabilir olduğu söylenebilir. Çalışmamızda, at kaynaklı KPE ile benzer osteoindüktif özelliklere sahip demineralize kemik matriksinden ve kontrol grubundan daha yüksek kemik oluşum skorları elde edilmiştir. Her ne kadar önceki çalışmalarda geniş bir doz aralığında etkin sonuçlar



**Sekil 4.** (a) At kaynaklı kemik protein ekstraktı ile anlamlı derecede yüksek kemik iyileşme skorları (%95 güven aralığı). (b) At kaynaklı kemik protein ekstraktı ile anlamlı derecede yüksek greft inkorporasyon skorları (%95 güven aralığı).

**Tablo 3.** Literatürdeki at kaynaklı KPE ile diğer kemik greft veya greft alternatiflerini karşılaştıran daha çalışmaların özeti.

Yazar (yıl)	Model (kemik)- taşıyıcı	Konsantrasyon	Sonuç
Li ve ark. (2007) <sup>[18]</sup>	Domuz (interbody füzyon) Titanyum kafes	100 mg/cc	Otogreft ile benzer sonuç
Baas ve ark. (2008) <sup>[19]</sup>	Köpek (kemik defekti) Titanyum implant+βTCP granül	20 mg/cc	Allogreft'ten daha başarılı
Foldager ve ark. (2008) <sup>[20]</sup>	Domuz (interbody füzyon) PEEK kafes	35 mg/cc (yaklaşık)	Otogreft ile benzer sonuç
Foldager ve ark. (2008) <sup>[21]</sup>	Domuz (interbody füzyon) PEEK kafes	35 mg/cc (yaklaşık)	Otogreft ile benzer sonuç (BMP'den zayıf)
Nienhuijs ve ark. (2010) <sup>[22]</sup>	Keçi (mandibula defekt) taşıyıcısız KPE/ KPE+βTCP granül	35 mg/cc	KPE, βTCP granülün etkisini arttırmış. Kontrol grubu daha fazla kemik ile rejenere olmuş. Etkin bir kemik defect doldurucu.
Jensen ve ark. (2010) <sup>[23]</sup>	Koyun (proks. humerus defekt) KPE+ carboksümetil selüloz kollajen +otolog kan / taşıyıcısız	20 mg/cc	Otogreft ile benzer sonuç.
Ding ve ark. (2012) <sup>[24]</sup>	Koyun (distal femur defekt) Poli(D-L) laktik asit ile güçlendirilmiş hidroksiapatit-β+KPE / titanyum implantı	100 mg/cc	KPE ile daha düşük fibröz enkapsülasyon daha iyi 'pull-out' direnci.
Baas ve ark. (2012) <sup>[25]</sup>	Köpek (proks. tibia defekt) Titanyum implant tespiti; KPE'li/ KPE'siz	20 mg/cc	

bildirilmişse de (20–100 mg/cc) klinik uygulama öncesi optimal dozun belirlenmesi için bir doz ayarlama çalışması yapılmalıdır. Çalışmamızda gruplar arasında beklenenin üzerinde fark gözlenmiştir. Bu farkın at kaynaklı KPE'deki büyüme faktörlerinin daha yüksek konsantrasyonda olması ve demineralize kemik matriksindeki diğer matriks proteinlerinin osteojenezi engellemesi veya yabancı cisim reaksiyonu sonucu olduğu düşünülmüştür.

Yapılmış çalışmalarda farklı taşıyıcılar (titanyum mesh, kafes, PLLA implant), scaffold implantlar (βTCP, karboksümetil selüloz-kollajen), sentetik yamalar ve işaretler (Kirschner teli) kullanılmıştır. Bu maddelerin tümü yabancı cisim veya enflamatuvar reaksiyon ile osteojenezi engelleyebilir. Bu etki mineralize kollajenin taşıyıcı olarak kullanıldığı bir çalışmada at kaynaklı KPE ile osteojenezin inhibe olması şeklinde bildirilmiştir.<sup>[14]</sup> Çalışmamızda defekt bölgesini fasya ve periost ile doğrudan diktığımız için ve defekt bölgesinin histolojik değerlendirilmesinde defekt bölgesini belirlemek için anatomik noktalar kullanıldığından bahsi geçen taşıyıcılar ve işaret amaçlı kullanılan implantların sonuçları etkileyi etkilerinden kaçınmış olduk.

Bir diğer etkili osteoindüktif biyomateryal ise rekombinant insan kemik morfojenik proteini-2'dir (rhBMP-2). Her ne kadar bildirilmiş ve potansiyel komplikasyonlarından ötürü rhBMP-2'nin rutin kullanımını tartışmalı olsa da,<sup>[25]</sup> hem histolojik hem de radyolojik olarak osteojenik fonksiyon açısından rhBMP-2 ile daha başarılı sonuçlar bildirilmiştir.<sup>[17,20,21]</sup> Yüksek maliyeti ve komplikasyonlarından dolayı rhBMP-2 çalışmamızın ilgisi dışında tutulmuştur.

Bu çalışmanın en önemli bulgusu at kaynaklı KPE ile primer kemik iyileşmesi, demineralize kemik matriksi ile endokondral osifikasyon elde edilmesi ve kontrol grubunda fibröz kaynama elde edilmesi olarak özetlenebilir. Bu bulgu, literatürdeki bazı çalışmalardan farklılık göstermiştir.<sup>[17,18]</sup> Bu durumun nedeni olarak farklı doz ve modellerin kullanımı düşünülmektedir. Ancak Nienhuijs ve ark. elde ettikleri matür sentral kemik oluşumu, bulgularımızla uyum göstermektedir.<sup>[22]</sup> Bir diğer önemli bulgu ise at kaynaklı KPE ile DKM'ye kıyasla daha matür bir kemik dokusunun elde edilmesidir. Bu bulgu da önceki çalışmalarda bildirilen at kaynaklı KPE'nin artmış hücre farklılaşması ve artmış kemik döngüsüne neden olarak kaynama sürecini kısaltması bulgusu ile uyum göstermektedir.<sup>[19]</sup>

Çalışmamızın zayıf yönleri histolojik bulguların radyolojik olarak mikro-tomografi ve biyomekanik olarak doğrulanamaması olarak sıralanabilir. Literatürdeki diğer çalışmalar genelde yeni kemik oluşumunu radyolojik olarak ve trabekülasyon yüzdesi şeklinde değerlendirmiştir. Bu çalışmalardaki histolojik çalışmaların büyük kısmının radyolojik bulgular ile uyumlu olmasından dolayı elde ettiğimiz verilerin yeni kemik oluşumu açısından hala değerli olduğunu düşünmekteyiz. At kaynaklı kemik protein ekstresinin osteoindüktif amaçla insanda yaygın olarak kullanılması için klinik etkinlik çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Tavşan kaviter kemik defekti modelinde at kaynaklı kemik protein ekstresi (KPE) ile insan kaynaklı demineralize kemik matriksine (DKM) kıyasla daha başarılı yeni kemik oluşumu gözlenmiştir. At kaynaklı KPE (Colloss-E), yapısal desteğin gerekmediği durumlarda

kaviter kemik defekti tedavisinde alternatif bir kemik grefti olarak kullanılabilir. Her ne kadar mevcut literatür başarılı sonuçlar bildirmiş olsa da, rutin klinik kullanım öncesi gerek *in-vitro* (insan hücre kültürü) gerekse *in-vivo* doz ayarlama ve güvenlik çalışmaları yapılması gerekmektedir.

**Çıkar örtüşmesi:** Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

## Kaynaklar

- Li H, Zou X, Woo C, Ding M, Lind M, Bünger C. Experimental anterior lumbar interbody fusion with an osteoinductive bovine bone collagen extract. *Spine (Phila Pa 1976)* 2005;30:890–6.
- Walboomers XF, Jansen JA. Bone tissue induction, using a COLLOSS-filled titanium fibre mesh-scaffolding material. *Biomaterials* 2005;26:4779–85.
- Huffer WE, Benedict JJ, Rettenmaier R, Briest A. Osteoinduction with COLLOSS, COLLOSS E, and GFm. *Adv Exp Med Biol* 2006;585:87–100.
- Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction. *J Cell Physiol* 2000;184:207–13.
- Mundy GR. Osteoblasts, bone formation and mineralization. In: Fogelman I, ed. *Bone Remodeling and Its Disorders*. London: Martin Dunitz 1995:17–38.
- Bertagnoli R. Osteoinductive bone regeneration substance Colloss in spinal fusion. *Eur Spine J* 2002;11:189–90.
- Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. Lumbar intertransverse-process spinal arthrodesis with use of a bovine bone-derived osteoinductive protein. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1404–17.
- Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felszeghy E, et al. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2004;25:5387–93.
- Lasmézas CI. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech* 2003;22:23–36.
- Williams ES, Miller MW. Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals: origin, transmission and risk factors. *Rev Sci Tech* 2003;22:145–56.
- El-Sabban ME, El-Khoury H, Hamdan-Khalil R, Sindet-Pedersen S, Bazarbachi A. Xenogenic bone matrix extracts induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2007;2:383–90.
- Nienhuijs ME, Walboomers XF, Merckx MA, Stoelinga PJ, Jansen JA. Bone-like tissue formation using an equine COLLOSS E-filled titanium scaffolding material. *Biomaterials* 2006;27:3109–14.
- Li H, Springer M, Zou X, Briest A, Bünger C. Ectopic bone induction by equine bone protein extract. *Adv Exp Med Biol* 2006;585:393–402.
- Nienhuijs ME, Walboomers XF, Gelinsky M, Stoelinga PJ, Jansen JA. The evaluation of mineralized collagen as a carrier for the osteoinductive material COLLOSS®E, *in vivo*. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:1683–90.
- Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A:803–16.
- Nienhuijs ME, Poulsen K, van der Zande M, Briest A, Merckx MA, Stoelinga PJ, et al. Analytical assessment of the osteoinductive material COLLOSSE. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;89:300–5.
- van der Zande M, Walboomers XF, Briest A, Springer M, Alava JI, Jansen JA. The effect of combined application of TGFbeta-1, BMP-2, and COLLOSS E on the development of bone marrow derived osteoblast-like cells *in vitro*. *J Biomed Mater Res A* 2008;86:788–95.
- Li H, Zou X, Springer M, Briest A, Lind M, Bünger C. Instrumented anterior lumbar interbody fusion with equine bone protein extract. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007;32:126–9.
- Baas J, Elmengaard B, Bechtold J, Chen X, Søballe K. Ceramic bone graft substitute with equine bone protein extract is comparable to allograft in terms of implant fixation: a study in dogs. *Acta Orthop* 2008;79:841–50.
- Foldager C, Bendtsen M, Zou X, Zou L, Olsen AK, Munk OL, et al. ISSLS prize winner: positron emission tomography and magnetic resonance imaging for monitoring interbody fusion with equine bone protein extract, recombinant human bone morphogenetic protein-2, and autograft. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008;33:2683–90.
- Foldager C, Bendtsen M, Nygaard JV, Zou X, Bünger C. Differences in early osteogenesis and bone micro-architecture in anterior lumbar interbody fusion with rh-BMP-2, equine bone protein extract, and autograft. *Bone* 2009;45:267–73.
- Nienhuijs ME, Walboomers XF, Briest A, Merckx MA, Stoelinga PJ, Jansen JA. Healing of bone defects in the goat mandible, using COLLOSS E and beta-tricalciumphosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;92:517–24.
- Jensen J, Foldager CB, Jakobsen TV, Søballe K, Bünger C, Baas J. Use of carboxymethyl cellulose and collagen carrier with equine bone lyophilisate suggests late onset bone regenerative effect in a humerus drill defect—a pilot study in six sheep. *Open Orthop J* 2010;4:181–7.
- Ding M, Røjskjær J, Cheng L, Theilgaard N, Overgaard S. The effects of a novel-reinforced bone substitute and Colloss®E on bone defect healing in sheep. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012;100:1826–35.
- Baas J, Jakobsen T, Elmengaard B, Bechtold JE, Søballe K. The effect of adding an equine bone matrix protein lyophi-

- lisate on fixation and osseointegration of HA-coated Ti implants. *J Biomed Mater Res A* 2012;100:188–94.
26. Williams BJ, Smith JS, Fu KM, Hamilton DK, Polly DW Jr, Ames CP, et al. Does bone morphogenetic protein increase the incidence of perioperative complications in spinal fusion? A comparison of 55,862 cases of spinal fusion with and without bone morphogenetic protein. *Spine (Phila Pa 1976)* 2011;36:1685–91.

YAZARIN ÇEVİRİSİ