

Deproteinize Kemik Grefti (BIO-OSS®)'nin Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisinin Deneysel Olarak İncelenmesi

An Experimental Evaluation Of The Effect Of Deproteinized Bovine Bone Mineral (BIO-OSS®) On Bone Healing

Süleyman BOZKAYA*, İnci KARACA**, Tülin OYGÜR***, Emre BARIŞ***

Özet

Amaç: Bu çalışma deproteinize kemik greftinin mandibulada oluşturulan çeşitli boylardaki bikortikal kemik defektlerine uygulanmasının oluşturduğu etkilerin histopatolojik olarak incelenmesi ve kobay modelinde mandibuler kritik boyut defekti miktarının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve yöntem: 24 adet kobayın deney hayvanı olarak kullanıldığı çalışmada denekler her grupta 8 adet olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. Deneklerin mandibularlarında her segmentte 2'şer adet olacak şekilde 1. grupta 3 mm çapında, 2. grupta 4 mm çapında ve 3. grupta 5 mm çapında bikortikal defektler açılmıştır. Her segmentte açılan defektlerden birisine Bio-Oss uygulanmış, diğer defekt kontrol amacı ile boş bırakılmıştır. 4., ve 8. haftaların sonunda alınan örnekler histopatolojik olarak incelenmiştir.

Bulgular: Deproteinize kemik grefti uygulanan defektlerde yeni kemik yapımının kontrol grubuna göre daha üstün olduğu; 3 mm çapındaki defektlerde spontan olarak iyileşme gözlenirken 4 mm ve 5 mm çapındaki defektlerde spontan iyileşmenin defekti dolduracak kadar olmadığı görülmüştür. 3 mm'lik defektler ile 4 mm ve 5 mm'lik defektlerdeki iyileşme miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

Sonuç: Sonuç olarak kullanılan anorganik sığır kemiği materyalinin biyoyumlu, yeni kemik yapımını aktive eden ve maksillofasiyal rekonstrüksiyonlarda kullanılabilir yararlı bir materyal olduğu; kobaylarda mandibulada 4 mm çapındaki bikortikal defektlerin kritik boyut defekti olarak kabul edilebileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Deproteinize kemik grefti, kritik Boyut Defekti, mandibuler bikortikal defekt

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the osseous regenerative capacity of deproteinized bone graft in different size mandibular bicortical bone defects and to investigate the dimension of mandibular critical size defect in guinea pigs model.

Material and methods: 24 guinea pigs were used in this study and they were divided into three groups with eight animals in each. Two bicortical defects were created in the each segment of the mandible; in group 1, 3 mm diameter; in group 2, 4 mm diameter and in group 3, 5 mm diameter defect were created. Bio-Oss was applied in one defect of each segment and the other defect was left untreated for control. The animals were sacrificed at 4. and 8 weeks postoperatively for histopathological examination of the defect sites.

Results: Promoted new bone formation was observed in the defects that deproteinized bone grafts applied in comparison with control group. While spontaneous bone healing was observed in 3 mm diameter defects, 4 mm and 5 mm diameter defects did not show totally spontaneous bone healing. There were statistical differences between the bone formation in the 3 mm defects with 4 mm defects and 5 mm defects (p<0.05).

Conclusion: In conclusion, this study has shown that anorganic bovine bone is biocompatible, induce new bone formation and can be used for unimpeded bone healing in oral and maxillofacial reconstruction. In addition 4 mm diameter mandibular bicortical defects can be accepted as critical size defect in guinea pigs.

Key Words: Deproteinized bone graft, critical size defect, mandibular bicortical defect.

* Arş. Gör. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A.D., Ankara

** Prof. Dr. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A.D., Ankara

*** Prof. Dr. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji B.D., Ankara

**** Arş. Gör. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji B.D., Ankara

Ağız ve çeneler bölgesinde; çeşitli sebeplerle oluşan defektlerin eski anatomik formuna kavuşturulması ve yitirilen fonksiyonların yeniden kazandırılması oral ve maksillofasiyal cerrahinin temel hedeflerinden birisidir¹⁻³. Bu kemik defektlerinin bir bölümü, kemiğin kendini tamir edebilme yeteneği ile onarılırken bir kısım büyük kemik defektlerinde, kemik dokusunun onarılmasını desteklemek veya tamamen iyileşmelerini sağlamak amacıyla otojen, homojen, heterojen ve alloplastik kaynaklı çeşitli kemik greft materyalleri veya alloplastik materyaller kullanılmaktadır³. Otojen kemik greftlerinin ikinci bir cerrahi prosedür gerektirmesi, postoperatif morbiditenin yüksek olması, donör alanlarda kemik dokunun zayıflaması, istenilen miktarda elde edilememesi gibi önemli dezavantajları sebebiyle bunlara alternatif olarak allogreftler ve heterogreftler geliştirilmiştir⁴⁻⁷.

Heterojenik kemik greftlerinin insanlarda kullanılması ile ilgili çalışmalar uzun süreden beri devam etmektedir⁸. Bu amaçla kullanılan greft materyali çoğunlukla sığır kemiğidir⁹. 1960'lı yıllarda heterogreftlerin kullanılması popüler olmasına rağmen sığır kemiğinden elde edilen greftlerin transplantasyonundan sonra otoimmün hastalık gelişen hastaların rapor edilmesi nedeniyle kullanımı azalmıştır. Dikkatli bilimsel değerlendirmeler ve deproteinizasyon işleminin daha iyi yapıldığı metotların geliştirilmesi sonucunda 1990'larda bu ürünler sektörde yeniden yerini almış ve kullanıma girmiştir. Bu süreç içerisinde materyalin antijenik özellikleri azaltılmış ve böylece kemiğin organik komponentinin tamamen uzaklaştırılarak, uygulandığı dokuda daha kabul edilebilir olması sağlanmıştır¹⁰. Bu greft materyallerinden biri olan Bio-Oss'un tüm protein yapıların uzaklaştırılmış olması nedeniyle osteokondüktif bir materyal olduğu belirtilmektedir¹¹⁻¹³.

Kemiğin tamamen deproteinize edilmesiyle elde edilen Bio-Oss®, karbonat apatit içeren anorganik sığır kemiğinden oluşan doğal bir greft materyalidir^{7,10,13,14}. Morfolojik olarak doğal bir yapısı olduğu^{8,10,13-15}, kemik ile karşılaştırıldığında daha geniş bir iç yüzeye ve poröziteye, kemik ile benzer kristal yapıya^{10,11,14,16}, elastikiyete^{10,11,14}, kimyasal bileşime^{8,10,13,14} ve kalsiyum/fosfor oranına sahip olduğu gösterilmiştir¹⁶. Bu özellikleri nedeniyle Bio-Oss, son yıllarda kemik greft materyali olarak periodontoloji ve maksillofasiyal cerrahi dallarında geniş kullanım alanları bulmuştur. Maksillofasiyal cerrahide sinüs liftingde, alveoler kret yükseltme işlemlerinde, dişler ve implantların çevresindeki defektlerin tedavisinde, mandibula ve maksilla rekonstrüksiyonunda, çekim soketlerinin doldurulmasında kullanılmaktadır¹⁶⁻¹⁸.

Günümüze kadar yapılan bir çok deneysel ve klinik çalışma Bio-Oss'un kemik defektlerinde, çeşitli amaçlar için kemik dokusu yerine geçebilecek bir greft olarak

kullanılabileceğini göstermekle birlikte^{4,10,12,13,16,19-28} kemik iyileşmesine bir katkısının olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır^{8,9,14,29-31}.

Kemiğin kendini tamir edebilme yeteneği evrim süreci ile ters orantılı olduğundan hayvanlarda oluşturulan yara modelinden elde edilen deneysel sonuçları karşılaştırmak son derece güçtür^{32,33}. Yeni kemik greft materyallerinin değerlendirilmesi için seçilen hayvan modelleri çoğunlukla immatür, karakteristik olarak yüksek osteogenezis potansiyeli olan az evrimsel gelişim göstermiş türlerden oluşmaktadır. Bu nedenle herhangi bir greft veya implant uygulanmayan ve kontrol olarak seçilen deneysel yaralar sıklıkla spontan olarak iyileşmektedir^{1,3}. Bir kemik defektinde gerçekleşecek iyileşme miktarı, büyük oranda defektin büyüklüğüne bağlıdır. Bu nedenle iyileşmenin değerlendirilmesi için kullanılan deneysel kemik yarası, spontan iyileşmeye engel olacak kadar büyük olmalıdır. Bu noktada bir implant veya greftin osteojenik potansiyeli tam olarak değerlendirilebilir³.

Bu özelliklere sahip deneysel kemik yarası Kritik Boyut Defekti (KBD) olarak adlandırılmaktadır ve osteojenik materyallerin değerlendirilmesinde standart bir model olarak Hollinger ve Kleinschmidt³² tarafından önerilmiştir. KBD, türlere ve ilgili bölgeye göre farklı olmak üzere hayat boyunca spontan olarak iyileşemeyecek en küçük intraosseöz yara olarak tanımlanabilir^{1-3, 34,35}. Bununla birlikte pek çok çalışmada sürenin sınırlı olması ve hayvanın tüm hayatı boyunca sürdürülememesinden dolayı hayvan araştırmalarında KBD, çalışma süresi boyunca iyileşemeyen defektleri ifade etmektedir³.

Kemiklerde sık karşılaşılan bir komplikasyon olan iyileşmeme durumunu, hayvanlarda deneysel olarak oluşturmak için iki teknik ortaya konulmuştur. Bunlardan birincisi; osseöz rejenerasyonun engellenmesi veya azaltılması yoluyla iyileşmeyen defektler oluşturmaktır. İkincisi ise; doğal osseöz süreçler ile iyileşemeyecek kadar büyük bir kemik defektinin oluşturulması ile gerçekleştirilebilir. Bu ikinci durum KBD'ne bağlı iyileşmeme olarak tanımlanmaktadır^{1,3,32,33}.

KBD çalışmalarının yapıldığı anatomik bölgeler kalvarya, mandibula ve tibia gibi uzun kemiklerdir^{32,33}. Ancak nazal kemik gibi bu bölgelerin dışındaki anatomik bölgelerde yapılmış çalışmalar da mevcuttur³⁶. KBD'nde kemik iyileşmesi sadece osteojenik teknik ve materyallerin varlığında gerçekleşebilmektedir^{3,6,32}. Hayvan modelleri kullanarak kontrol gruplarının standart hale getirildiği KBD kavramı, yeni bir greft materyalinin ve maksillofasiyal bölgede kullanılacak kemik greft materyallerinin etkinliğinin, insanlarda kullanılmaya başlamadan önce değerlendirilmesi için uygun bir modeldir^{3,32,36}.

Deproteinize kemik greft materyali olan Bio-Oss'un çeneler bölgesinde oluşturulan çeşitli büyüklüklerdeki

bikortikal kemik defektlerine uygulanmasının oluşturduğu etkilerin histopatolojik yönden karşılaştırmalı olarak incelenmesi, bu tip defektlerde bu greftin olası yararlarının ve kobay hayvan modelinde mandibula bölgesi için kritik boyut defekti boyutunun araştırılması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma T. C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarı ile Gazi Üniversitesi Dışhekimliği Fakültesi Oral Patoloji Bilim Dalı'nda yürütüldü. Uygulanacak tedavi protokolü T. C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Komitesi tarafından onaylanmıştır. T. C. Şap Enstitüsü'nden temin edilen 6 aylık, 400-500 gram ağırlığında 24 adet erkek kobay deney hayvanı olarak kullanıldı.

Çalışmada; deproteinize kemik greft materyali olarak Bio-Oss (Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland) kullanıldı. Greft materyallerinin uygulama yeri olarak deneklerin alt çenelerinin angulus bölgeleri seçildi. Bu bölgelerde her iki segmentte 2'şer tane olmak üzere 24 kobayda toplam 96 defekt açılması planlandı.

Deney hayvanları her grupta 8 adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. 1. gruptaki deney hayvanlarına 3 mm çapında, 2. gruptaki deney hayvanlarına 4 mm çapında ve 3. gruptaki deney hayvanlarına da 5 mm çapında bikortikal defektler açılması ve bütün gruplarda her segmentte açılacak defektlerden birisi boş bırakılırken diğerine Bio-Oss uygulanması planlandı.

Deneklerin anestezileri sağlandıktan sonra operasyon bölgeleri traş edilerek, insizyon öncesi yüzey dezenfeksiyonu sağlandı. Bunu takiben cerrahi prensipler altında mandibula alt kenarının 0,5 cm üzerinden yatay bir insizyon yapılmasını takiben cilt, cilt altı ve fasya geçildikten sonra karşılaşılan kas engeli künt diseksiyonla geçilerek mandibulaya ulaşıldı. Uygun ekartasyon yapıldıktan sonra açığa çıkan kemik üzerinde 3, 4, veya 5 mm çapındaki cerrahi ront frezler kullanılarak 125 W güç ve 4000 devir / dakika turla serum fizyolojik perfüzyonu altında sağ ve sol alt çenelerde angulus

bölgesinde bazise yakın kısımda 0.5 cm aralıklı olacak şekilde 2'şer adet bikortikal standart kemik defekti oluşturuldu. Defekt bölgeleri doku debrislerini ve olası yabancı cisimleri uzaklaştırmak için yıkayıp kanama kontrolü yapıldı. Her denekte açılan defektlerden daha önde yer alana uygulama kolaylığı ve rehidratasyon amacıyla steril %0.9 serum fizyolojik solüsyonu içinde steril kapta bekletilen Bio-Oss yerleştirildi. (Resim 1). Diğer defekt kontrol amacıyla boş bırakıldı. Çalışma bölgesinde son kontroller yapıldıktan sonra kas ve cilt altı dokular 4/0 poliglaktin 910 suture materyali (Vicryl, Ethicon Limited) ile, cilt ise 3/0 ipek suture materyali (Boz ipek, Orhan Boz Tıbbi Malzeme ve San. A.Ş.) ile primer olarak kapatıldı. Aynı işlemler deneklerin diğer taraftaki çenelerine de uygulandı.

Postoperatif dönemde ayrı kafeslerde rutin diyet uygulaması yapılan denekler 4., ve 8. haftaların sonunda her gruptan rastgele seçilme 4'er adet olmak üzere yüksek dozda IM tiyopental sodyum (Pentothal Sodium 1 gr, Abbott Lab. A.Ş.) enjeksiyonu ile öldürüldü. Deney bölgesi olan mandibula çıkarıldı. Etrafındaki tüm yumuşak dokular uzaklaştırıldıktan sonra defektlerin bulunduğu kısımlar, çevrelerinde sağlıklı kemik doku bölümü bırakılacak şekilde uygun aletlerle ayrılarak % 10'luk tampionlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Akar suda formalinden kurtarıldıktan sonra % 10'luk formik asit içinde günlük yumuşama kontrolü ile dekalsifiye edildi. Dereceli alkol seviyelerinden geçirilerek ksilende şeffaflaştırılan örnekler parafine gömüldü. Parafin bloklarından Leica SM 2000R mikrotomu ile 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilin-Eozin (H.E.) boyası ile boyandı. Elde edilen preparatlar, Nikon Eclipse E-600 (Nikon Corp., Tokyo, Japan) ışık mikroskopunda incelenerek Nikon Coolpix 5000 (Nikon Corp., Tokyo, Japan) dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı.

Histopatolojik incelemelerde, kullanılan tüm materyaller biyoyoumluluk kriterleri, yeni kemik oluşturma potansiyelleri ve rezorbe olabilme durumları yönünden değerlendirildi. Kontrol amacı ile boş bırakılan defektlerdeki yeni oluşan kemik miktarının ölçülmesi için elde edilen kesitlerden alınan (x 20) büyümedeki histopatolojik

Resim 1: Alt çenede oluşturulan 3 mm, 4 mm ve 5 mm çapındaki bikortikal kemik defektlerinden birisi boş bırakılırken diğerine deproteinize kemik grefti (Bio-Oss) uygulanmış hali.



fotoğraflardan yararlanıldı. Defekt bölgesinde yeni oluşan kemik miktarı yüzdesi; bu fotoğraflar üzerinde belirlenen defekt bölgesindeki yeni kemiğin doğrusal boyutunun, başlangıçtaki defektin doğrusal boyutuna oranına dayanılarak **(Yeni Kemiğin Doğrusal Boyutu / Başlangıç Defektinin Doğrusal Boyutu) x 100** olarak hesaplandı.

Gruplar arasında fark olup olmadığını saptamak için istatistiksel analiz olarak Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Post-Hoc test olarak Scheffé Testi kullanılmış olup p değeri 0.05'ten küçük ($p < 0,05$) olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Deneysel çalışma süresince kobayların; uygulanan cerrahi işlemleri iyi tolere ettiği, mandibulada açılan defektlerin çiğneme ve beslenme açısından herhangi bir olumsuzluk yaratmadığı, operasyonlara bağlı herhangi bir enfeksiyonun gelişmediği ve intra veya postoperatif ölüm olmadığı gözlemlendi. Çalışmanın 4. ve 8. haftalarda yapılan histopatolojik incelemeleri, her biri 3 mm, 4 mm ve 5 mm'lik bikortikal defektler içeren Kontrol grubu ve Deproteinize Kemik (Bio-Oss) grubu olacak şekilde 2 alt grupta değerlendirildi.

Kontrol Grubu

3 mm, 4 mm ve 5 mm çapındaki kontrol amacıyla boş bırakılan defektlerde, defekt büyüklüklerine bağlı olarak periferdeki osteoid yapımında bazı farklılıklar saptandı.

4. Hafta

3 mm'lik defektler: Defekt alanının ortalama % 75 ($2,26 \pm 0,18$ mm) bölümünün yeni oluşan spongiyöz yapıdaki kemik doku ile dolduğu geri kalan % 25 kısmının ise fibrotik doku ve çizgili kas dokusu ile dolu olduğu izlendi (Resim 2).

4 mm'lik defektler: Defekt periferinden merkeze doğru ilerlemiş yeni kemik dokusu oluşumu ile birlikte defekt merkezinin fibrotik doku ve kas dokusu ile dolduğu izlendi. Defektin % 53 ($2,11 \pm 0,11$ mm) oranda yeni kemik dokusu ile, % 47 oranda da fibrotik doku ile dolu olduğu görüldü (Resim 3).

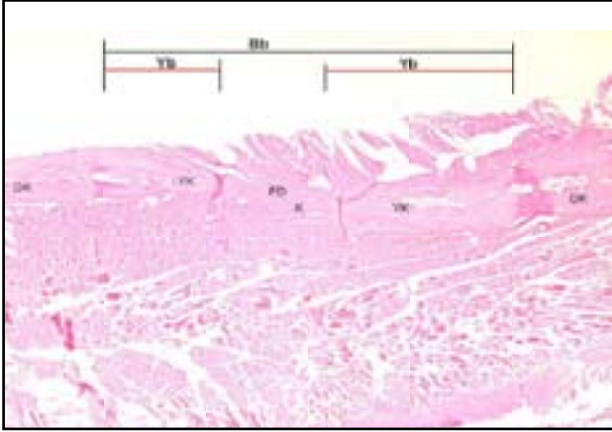
5 mm'lik defektler: Defekt bölgesinin ortalama % 40 ($1,98 \pm 0,18$ mm) oranda yeni kemik doku % 60 oranda ise fibrotik doku ile dolduğu izlendi (Resim 4). Kontrol grubunda 4. hafta sonunda; farklı büyüklükteki defektlerde gözlenen iyileşme miktarlarının istatistiksel olarak karşılaştırması **Tablo 1**'de gösterilmiştir. Bi-

Tablo 1: Çeşitli boylarda oluşturulan defektlerdeki iyileşme miktarı ve karşılaştırmalı analizi (ortalama \pm standart sapma ve p değerleri).

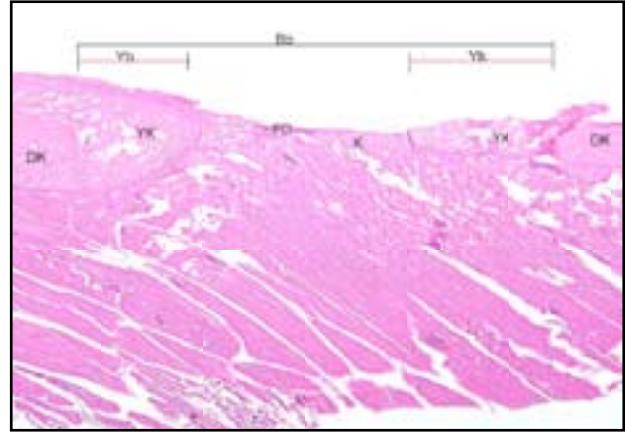
4. Hafta	Yeni Oluşan Kemik Miktarı (mm) (Ortalama \pm SD)	ANOVA p - değeri	Post-Hoc Scheffe testi p- değeri	
3 mm defekt grubu	$2,26 \pm 0,18$	0,012*	3 mm-4 mm 0,218 3 mm-5 mm 0,012*	
4 mm defekt grubu	$2,11 \pm 0,11$		4 mm-3 mm 0,218 4 mm-5 mm 0,339	
5 mm defekt grubu	$1,98 \pm 0,18$		5 mm-3 mm 0,012* 5 mm-4 mm 0,339	
8. Hafta				
3 mm defekt grubu	$2,99 \pm 0,75$		0,000*	3 mm-4 mm 0,000* 3 mm-5 mm 0,000*
4 mm defekt grubu	$2,35 \pm 0,13$			4 mm-3 mm 0,000* 4 mm-5 mm 0,376
5 mm defekt grubu	$2,25 \pm 0,18$		5 mm-3 mm 0,000* 5 mm-4 mm 0,376	

Gruplar arasındaki fark ANOVA kullanılarak analiz edilmiştir. Bilateral karşılaştırma için Scheffe Testi kullanılmıştır.

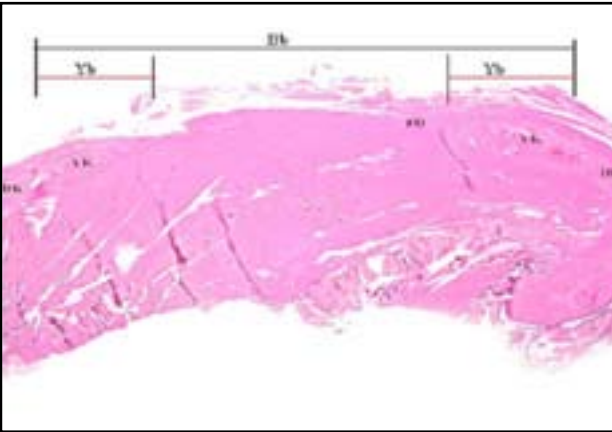
* $P < 0.05$



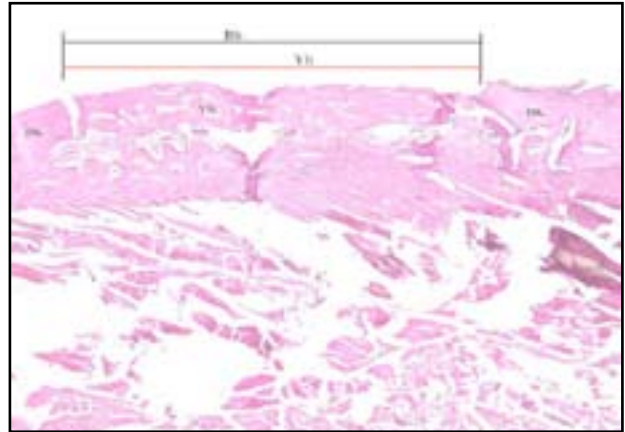
Resim 2: 4. hafta 3 mm'lik kontrol grubunda, doğal kemik (DK), defekt alanında oluşan spongiyöz yapıdaki yeni kemik doku (YK), fibrotik doku (FD) ve çizgili kas dokusu (K) izlenmektedir (H.E., x 20). Bb: Başlangıç defektinin doğrusal boyutu, Yb: Yeni kemiğin doğrusal boyutu.



Resim 3: 4. hafta 4 mm'lik kontrol grubunda, doğal kemik (DK), defekt periferinden merkeze doğru ilerlemiş yeni kemik dokusu (YK), defektin fibrotik doku ve kas dokusu (K) ile dolumu izlenmektedir (H.E., x 20). Bb: Başlangıç defektinin doğrusal boyutu, Yb: Yeni kemiğin doğrusal boyutu.



Resim 4: 4. hafta 5 mm'lik kontrol grubunda, doğal kemik (DK), defekt alanındaki yeni kemik doku (YK) ve fibrotik doku (FD) izlenmektedir (H.E., x 20). Bb: Başlangıç defektinin doğrusal boyutu, Yb: Yeni kemiğin doğrusal boyutu.



Resim 5: 8. hafta 3 mm'lik kontrol grubunda, doğal kemik (DK) ve defekt bölgesini dolduran spongiyotik yeni kemik doku (YK) izlenmektedir (H.E., x 20). Bb: Başlangıç defektinin doğrusal boyutu, Yb: Yeni kemiğin doğrusal boyutu.

lateral karşılaştırmada 3 mm'lik defektler ile 5 mm'lik defektler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p < 0.05$); 3 mm'lik defektler ile 4 mm'lik defektler ve 4 mm'lik defektler ile 5 mm'lik defektler arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

8. Hafta

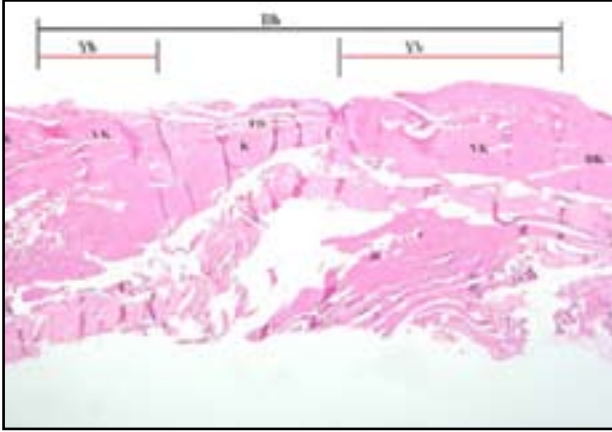
3 mm'lik defektler: Defekt bölgesinin hemen hemen tamamının ($2,99 \pm 0,75$ mm) spongiyotik yeni oluşan kemik dokusu ile dolu olduğu görüldü (Resim 5).

4 mm'lik defektler: Defektin % 41 orta kısmının çizgili kas dokusu ve fibrotik doku ile dolduğu, % 59 ($2,35 \pm 0,13$ mm) kısmının ise yeni kemik trabekülleri ile dolduğu görüldü (Resim 6).

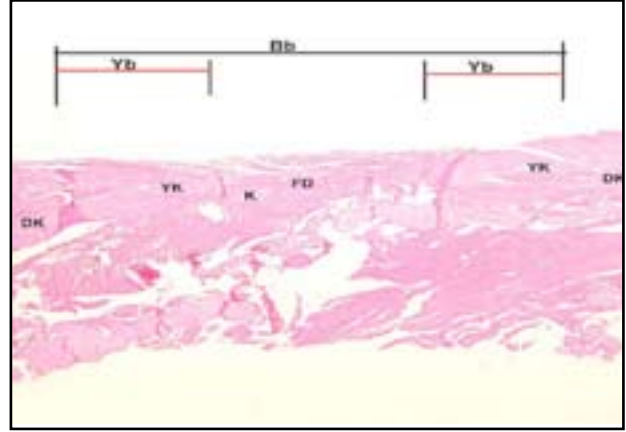
5 mm'lik defektler: Defektin % 45 ($2,25 \pm 0,18$

mm) kısmının matürleşmeye giden yeni kemik doku ile, % 55 kısmının ise fibrotik doku ile dolu olduğu izlendi (Resim 7).

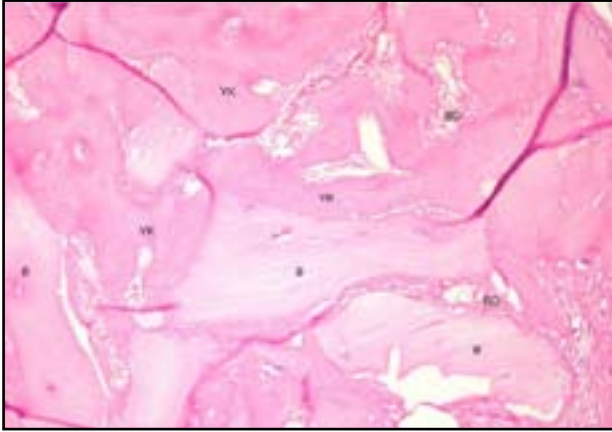
Kontrol grubunda 4. haftadan 8. haftaya doğru yeni kemik oluşumu açısından olumlu bir gelişme sürdüğü görüldü. 8. hafta sonunda 3 mm çapındaki defektlerin yeni oluşan kemik dokusu ile tam olarak dolduğu ancak 4 mm ve 5 mm çapındaki defektlerde değişen oranlarda iyileşmeyen kemik bölümleri olduğu saptandı. Kontrol grubunda 8. hafta sonundaki bilateral karşılaştırmada; 3 mm'lik defektlerdeki ile 4 mm ve 5 mm'lik defektlerdeki iyileşme miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p < 0.05$); 4 mm'lik defektlerdeki ile 5 mm'lik defektlerdeki iyileşme miktarları arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).



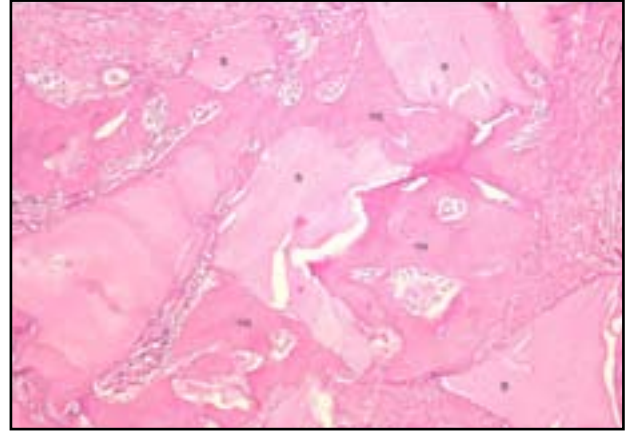
Resim 6: 8. hafta 4 mm'lik kontrol grubunda, doğal kemik (DK), defektin orta kısmını dolduran çizgili kas dokusu (K) ve fibrotik doku (FD), oluşan yeni kemik doku (YK) izlenmektedir (H.E., x 20). Bb: Başlangıç defektinin doğrusal boyutu, Yb: Yeni kemiğin doğrusal boyutu.



Resim 7: 8. hafta 5 mm'lik kontrol grubunda, doğal kemik (DK), fibrotik doku (FD), kas dokusu (K) ve yeni kemik doku (YK) izlenmektedir (H.E., x 20). Bb: Başlangıç defektinin doğrusal boyutu, Yb: Yeni kemiğin doğrusal boyutu.



Resim 8: 4. hafta Bio-Oss grubunda, materyal (B) çevresinde direkt temastaki yeni kemik dokusu (YK), ve partiküller arası fibrosellüler bağ doku (BD) izlenmektedir (H.E., x 100).



Resim 9: 8. hafta Bio-Oss grubunda, varlığını koruyan Bio-Oss materyali (B) ve kısmen lamellar karakter alan yeni kemi dokusu (YK) izlenmektedir (H.E., x100).

Deproteinize Kemik (Bio-Oss) Grubu

Bu grupta; defekt büyüklüğünün, yeni kemik oluşumunda farklılık yaratmadığı ve farklı büyüklükteki defektlerin, inceleme periyotlarında benzer histolojik bulgular gösterdiği izlendi.

4. Hafta: Materyal çevresinde yeni kemik varlığının yanı sıra bazı partiküllerde veya aynı partikülün diğer kenarında osteoklast tipi dev hücre temasının izlendiği, partiküller arası dokunun fibrosellüler bağ doku karakterinde olduğu görüldü. Materyalin, varlığını korumakla beraber materyal periferinde osteoid yapımının olduğu görüldü (Resim 8). Örneklerin çoğunda ağırlıklı olarak kemik üretiminin öne çıktığı izlenmekle beraber bazı örneklerde materyal parçalarının matürasyon gösteren ve partiküller ile direkt temasta olan trabeküler yeni ke-

mikle tamamen çevrelenmiş durumda olduğu ve defekt alanını doldurduğu görüldü.

8. Hafta: Materyalin varlığını koruduğu ve defektlerin tam olarak dolmuş olduğu, partiküllerin oluşan yeni kemik dokusu aracılığı ile birbirlerine bağlandığı görüldü. Partikül ile temastaki yeni kemiğin kısmen lamellar karakter aldığı izlendi. Yumuşak dokuya kaçan partiküllerin fibröz doku ile çevrelediği ama bazılarında osteoklast tipi dev hücre temasının devam ettiği görüldü (Resim 9).

Bio-Oss uygulanan grupta 4. haftadan 8. haftaya doğru yeni kemik oluşumunda olumlu bir gelişme olduğu, 8. haftanın sonunda, oluşturulan defektlerin materyal partikülleri ve bu partiküller ile oldukça fazla miktarda direkt temas gösteren yeni kemik dokusu ile tamamen dolduğu izlendi. Tüm inceleme dönemlerinde partikülle-

rin, rezorpsiyon belirtisi olarak kabul edilen osteoklast tipi dev hücreler ile temasının olduğu görüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm inceleme dönemlerinde yeni kemik oluşumunun Bio-Oss materyali uygulanan grupta çok daha iyi olduğu gözlemlendi.

Deney gruplarının hiçbirinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yabancı cisim reaksiyonu bulguları ve greft materyalleri ile yeni oluşan kemik dokusu arasında belirgin fibröz doku alanları izlenmedi. Bio-Oss örneklerinde; 8 haftalık inceleme döneminin sonunda; osteoklastik aktivite ile rezorpsiyonu işaret eden, partiküller ile temas halinde osteoklast benzeri dev hücrelerin varlığı görüldü ve tüm Bio-Oss örneklerinde kavitelelerin bu materyal veya materyale ait boşlukları içerdiği izlendi.

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalar, doğal kaynaklı greft materyallerinin önemli dezavantajları olan immünolojik reaksiyonlar oluşturma ve viral patojenlerin transferi problemlerini elimine etmek için geliştirilen bazı özel yöntemlerle heterogreft veya allogreft formunda semisentetik greft materyalleri elde edilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır^{37,38}. Bu gelişmeler doğrultusunda antijenik özellikleri ortadan kaldırılarak uygulandığı doku ile biyolojik uyum elde edilen, tüm protein yapıların uzaklaştırılmış olmasıyla da osteokondüktif etki gösteren deproteinize kemik greftleri önem kazanmış ve bir çok çalışmaya konu olmuştur^{4,8,10-13,20}.

Kemik iyileşmesinin değerlendirilmesi için kullanılan deneysel kemik yarasının, spontan iyileşmeye engel olacak kadar büyük olması gerektiği bildirilmektedir³. Bir implant veya greftin osteojenik potansiyelini tam olarak değerlendirebilmek için çalışmaların; türle ve ilgili bölgeye göre farklı olmak üzere KBD'nde yapılması büyük önem taşımaktadır^{1-3,34,35}. Bu nedenle çalışmamızın, kritik boyut defektleri üzerinde yürütülmesi planlanmıştır.

Enfeksiyonun olmadığı, stabilize defektlerin bulunduğu optimum deneysel şartların varlığında kemikteki tamirin kalitesi ve miktarı; hayvanın türü, yaşı, defektin anatomik lokalizasyonu, defektin büyüklüğü ve periostun sağlam olup olmaması gibi faktörler tarafından etkilenebilmektedir^{1,6}.

Yapılan literatür taramasında köpek mandibulaları hariç diğer türlerin mandibulalarında KBD'nin tanımlanması ile ilişkili çok az çalışmaya rastlanmıştır. Mandibulada KBD; ratlar, tavşanlar, köpekler ve maymunlar olmak üzere 4 hayvan modelinde tanımlanmıştır^{2,3,6,32,33}. Ancak literatürde, kobayların mandibulalarında KBD ile ilgili bir çalışma bulunmaması ve dolayısıyla kemik greft materyallerinin etkinliğinin böyle bir model üzerinde daha önce incelenmemiş olması sebebiyle deney hayvanı olarak kobaylar seçilmiştir.

İmmatür deney hayvanlarında osseöz defektlerin iyileşmesinin; matür olan hayvanlardaki tamir olayından daha aktif olarak gerçekleştiği ve bu nedenle kemik greft materyalleri için gerçek değerlendirmenin matür hayvanlarda yapılması gerektiği belirtilmektedir^{32,33,35}. Bu çalışmada daha önce yapılan araştırmalarda²² iskeletsel olarak matür olduğu gösterilen 6 aylık kobaylar kullanılmıştır.

Onkolojik cerrahide en fazla rezeke edilen fasiyal kemik olan mandibula; maksillofasiyal işlemlerde, kemik devamlılığı ve fonksiyonun restorasyonu için kemik greftlerinin en sık gerektiği bölgedir. Kabul edilebilir fonksiyonel ve estetik sonuçların sağlanmasında devamlılığı olmayan mandibuler defektlerin tedavisi, mandibulanın konuşma, çiğneme ve yutkunma sırasında sürekli hareket etmesi ve kişinin görüntüsüne katkıda bulunan konturlarının korunmasız olması nedeniyle oldukça zordur. Maksillofasiyal bölgede herhangi bir greft materyalinin maksimum etkinliğinin değerlendirilmesi, greft materyalinin mandibulayı rekonstrükte etme yeteneğine dayanmaktadır^{3,19,32}. Bu nedenlerle çalışmanın yapılacağı bölge olarak mandibula seçilmiştir. Küçük deney hayvanlarının mandibulasında, cerrahi olarak bölgeye ulaşmanın sınırlı olması nedeniyle devamlılığı olmayan bir defekt oluşturmak çok zor olduğu için sadece mandibuler ramus bölgesinde bikortikal defektler oluşturmak suretiyle KBD meydana getirilebilir^{3,32,33}. Bu nedenle çalışmamızda, deney hayvanlarının mandibulalarında bikortikal defektler oluşturulması ve kritik defekt boyutunun büyüklüğünü saptamak amacıyla bu defektlerin farklı çaplarda açılması (3 mm, 4 mm ve 5 mm) planlanmıştır.

KBD kavramının araştırıldığı çalışmalarda, yeni oluşan kemik doku miktarının ölçülmesinde ve oluşturulan defektlerin KBD olup olmadığının değerlendirilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmakta olup bunlar makroskobik değerlendirme, histomorfometrik ölçüm, histolojik değerlendirme, radyomorfometrik ölçüm, Scanning Electron Mikroskopisi (SEM), ve görüntü analiz yöntemleridir^{1,5,33,35}.

Bosch ve arkadaşları¹, ratların kalvaryalarında oluşturdukları 5 mm çapındaki defektlerin bir kısmını çeşitli osteopromotif teknikler (politetrafloroetilen veya kollajen membran, demineralize kemik matriksi, hidroksilapatit veya kemik çipsi) kullanarak bir kısmını da kontrol amacı ile boş bırakmışlar ve 6. ve 12. ayda histopatolojik olarak incelemişlerdir. Deneklerdeki kemik oluşumu miktarını ölçmek için makroskobik muayene ve histolojik mikroskobik değerlendirme yöntemlerini kullanmışlardır. Gosain ve arkadaşları³⁵, kobay modelinin kalvaryasında KBD kavramını inceledikleri çalışmalarında, oluşturulan defektlerde yeni oluşan kemik doku miktarının hesaplanması için iki yöntem kul-

lanmışlardır. Bu yöntemlerden birincisinde kesitlerde, defekt bölgesindeki yeni kemiğin doğrusal boyutunun, başlangıçtaki defektin doğrusal boyutuna oranının yüzdesi [(Yeni Kemiğin Doğrusal Boyutu/Başlangıç Defektinin Doğrusal Boyutu)x100] kullanılmıştır. İkinci yöntemde ise kesitlerdeki yeni oluşan kemik dokusu alanının, başlangıçtaki defekt alanına oranının yüzdesi [(Yeni Kemik Alanı/Başlangıç Defekt Alanı)x100] kullanılmıştır.

Bu çalışmada kontrol grubundan elde edilen kesitlerde, yeni oluşan kemik miktarı yüzdesi; Gosain ve arkadaşları'nın³⁵ kullandığı yöntemlerden biri seçilip; fotoğraflar üzerinde belirlenen defekt bölgesindeki yeni kemiğin doğrusal boyutunun, başlangıçtaki defektin doğrusal boyutuna oranına dayanılarak, [(Yeni Kemiğin Doğrusal Boyutu / Başlangıç Defektinin Doğrusal Boyutu) x100] olarak hesaplandı. Greft uygulanan gruplarda ise yeni kemik oluşumu, sadece histopatolojik olarak değerlendirildi.

Kontrol grubunda oluşturulan defektlerden elde edilen kesitlerin değerlendirilmesi sonucunda; 4. haftadan 8. haftaya doğru kemik iyileşmesinde olumlu bir gelişme olduğu görülmekle birlikte defekt büyüklüklerine bağlı olarak periferdeki osteoid yapımında farklılıklar olduğu saptandı. 4. hafta döneminde her üç farklı büyüklükteki defektlerde, defekt periferinden merkeze doğru ilerlemiş yeni kemik dokusu oluşumunun gözlenmiş olması ve 8. hafta sonunda 3 mm'lik defekt oluşturulan örneklerin tamamen yeni oluşan kemik ile dolmuş olması literatür bilgileri ile uyumludur³⁹. Sekizinci hafta döneminde özellikle 4 mm ve 5 mm çapında defekt oluşturulan örneklerden elde edilen kesitlerde; defekt periferinden başlayan ve defekt merkezine doğru yeni kemik yapımının olduğunun ancak defekt merkezinde fibröz dokunun bulunduğu görülmesi literatür bilgileri ile uyumluluk göstermektedir^{14,35,39}.

Kontrol grubunun incelenmesinden elde edilen histopatolojik bulgular ve istatistiksel verilere dayanılarak koyalarda mandibula bölgesinde yapılacak deneysel çalışmalarda bu bölgede oluşturulması gereken ve deney süresi boyunca spontan olarak iyileşmeyen en küçük intraosseöz yaranın (KBD) 4 mm veya daha fazla olması gerektiği sonucuna varılmıştır ($p=0,376$).

Bu çalışmada kullanılan greft materyali olan Bio-Oss ile yapılan bazı çalışmalarda⁹, bu materyale karşı inflamatuvar reaksiyon geliştiği; bir kısım çalışmada ise^{4,10,11,13,16,19-22,24,26} böyle bulgular görülmediği belirtilmektedir. Tüm gruplarda yapılan histopatolojik incelemelerde; kullanılan materyale karşı herhangi bir inflamatuvar veya yabancı cisim reaksiyonunun oluşmadığı ve materyallerin tümünün doku ile çok iyi uyum gösterdiği bu çalışmanın sonuçları, bu konuda olumlu sonuç bildiren literatür bulgularını destekler niteliktedir^{4,10,11,13,19,21,22,24,27,38}.

Mekanik özellikleri doğal kemikten önemli derecede farklı olan ve uzun süre kalması çevresindeki dokunun fonksiyonunu tehlikeye atacak materyallerde, greft materyalinin rezorbe olabilmesi bir avantajdır. Bununla birlikte rezorpsiyonun, kemik ile greft materyali birleşmesinin gerçekleşmesinden önce olması istenmemektedir⁷. Bu nedenle kemik greft materyallerinin yavaş rezorbe olması kemik matürasyonu için gerekli zamanı sağlaması açısından olumlu bir özellik olarak bildirilmektedir²⁸.

Özellikle heterojenik greft materyallerinde rezorpsiyonun mekanizması ve miktarının anlaşılması önemli bir konudur^{4,40}. Bu çalışmada kullanılan Bio-Oss ile yapılan çalışmalarda, materyalin rezorbe olup olmadığı konusunda çelişkili görüşler vardır. Bazı çalışmalarda materyalin uygulanmasını takiben rezorpsiyon bulguları görülmediği^{26,41}, bazılarında parsiyel olarak rezorpsiyon görüldüğü^{9,13,40,42} bazılarında ise materyalde yoğun bir rezorpsiyon görüldüğü^{14,33,34} bildirilmektedir. Valentini ve arkadaşları tarafından insanlarda yapılan çalışmalarda^{26,41}, sinüs lifting işlemlerini takiben 6. ayda alınan biopsilerde Bio-Oss granülleri etrafında yeni kemik yapımı bulguları olduğu, 12. ayda ise yeni lamellar kemik oluşumu gözlemlendiği ve greft materyalinin rezorbe olmadığı histolojik olarak gösterilmiştir. Tadjoedin ve arkadaşları'nın¹³, maksiller sinüs lifting operasyonlarında değişik oranlarda otojen kemik grefti ve deproteinize sığır kemiğinin (Bio-Oss) karıştırılarak uygulanmasını takiben 5.-8. aylarda alınan örneklerle yaptıkları histopatolojik incelemelerde deproteinize sığır kemiği partiküllerinin yüzeyindeki çukurlarda osteoklastların bulunduğunu ve bu durumun deproteinize sığır kemiğinin osteoklastik aktivite ile rezorpsiyonunu düşündürdüğünü vurgulamışlardır.

Aaboe ve arkadaşları⁴³, tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, Bio-Oss partiküllerinin yüzeyinde rezorpsiyonu düşüren kesik koni şeklinde bulgular ve osteoklastların izlenmemesine rağmen bazı partiküllerin merkezinde ve partiküllerin yüzeyindeki lakünlerde yeni kemik oluşumu nedeniyle erken rezorpsiyon bulgularının görüldüğünü bildirmişlerdir. Pinholt ve arkadaşları⁹ tarafından ratların premaksilla ve abdominal kasında yapılan çalışmada da Bio-Oss partiküllerinin kısmen rezorbe olduğu gösterilmiştir.

Merx ve arkadaşları'nın keçiler üzerinde yaptıkları 3 ayrı deneysel çalışmada^{14,30,31}; Bio-Oss ile doldurulan defektlerin radyografik değerlendirmesinde 3. haftada 6. haftadan daha radyopak olduğu; 12. haftada Bio-Oss ile doldurulan defekt bölgesindeki dokunun mineralizasyonunda azalma olduğu; 24. haftada defekt bölgesini dolduran mineralize dokunun daha da azaldığı; bunun da implant materyalinin rezorbe olduğunu düşündürdüğü belirtilmiştir. Araştırmacılar histolojik

incelemeler sonucunda; Bio-Oss partiküllerinin multi-nükleer osteoklast benzeri hücreler tarafından rezorbe edildiğini gözlediklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada 8 haftalık inceleme döneminin sonunda Bio-Oss partikülleri ile temas halinde osteoklast benzeri dev hücrelerin varlığı, materyalin potansiyel olarak osteoklastik aktivite ile rezorpsiyonunu düşündürmüş ve tüm Bio-Oss örneklerinde kaviterin bu materyal veya materyale ait boşlukları içerdiği görülmüştür. Bu bulgu, Bio-Oss ile yapılan çalışmalarda 9 ayın sonunda bile uygulandığı bölgelerde materyalin bulunduğunu bildiren literatür bilgileri ile uyum göstermektedir^{4,20,28}.

Kemik hücrelerinin greft yüzeyine bağlanması için zorunlu ön safha olan biyolojik apatit yığılımı gerçeğine dayanılarak, yüzeylerinde biyolojik apatit bulunan greft materyallerinin; kemik dokusu ile daha hızlı birleşme gösterdiği, yapısındaki kanalcıklar nedeniyle kemik dokusunun bu kanalcıkların içine doğru büyümesine olanak sağladığı ve yeni kemik yapımını stimüle ettiği bildirilmektedir^{4,7,11,20,26,27,41,42}. Bizim çalışmamızda da doğal kemik minerali olan Bio-Oss materyalinin 4. haftanın sonunda kemik oluşturan hücreler ve yeni oluşan kemik ile hızlı bir birleşme göstermesi ve aynı zamanda iyileşme miktarının kontrol defektlerine göre daha fazla olması bu literatür bilgilerini destekler görünmektedir.

Yapılan çalışmalarda Bio-Oss'un, uygulandığı kemik doku ile iyi birleşme gösterdiği ve inflamatuvar reaksiyona neden olmadığı ve aynı zamanda greft partiküllerinin yüzeyi ile yeni oluşan kemik arasında oldukça fazla direkt temas sağladığı gösterilmiştir²². Bu çalış-

mada da Bio-Oss uygulanan deneklerden elde edilen kesitlerin histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda; 4. haftadan 8. haftaya doğru yeni kemik oluşumunda olumlu bir gelişme olduğunun görülmesi literatür bilgileriyle^{24,30,38} ve bu konuda yapılan pek çok çalışma sonuçlarıyla^{11,25,26,28,41,42} uygunluk göstermektedir.

Richardson ve arkadaşları¹⁶, Bio-Oss'un, defekt bölgesine kolay taşınabilmesi, defekte kolayca doldurulabilmesi, kanamanın olduğu defektlerde bile defekte yerleştirilen materyalin adezyon gösterebilmesi ve yumuşak dokunun kapatılmasından sonra yumuşak dokunun defekt bölgesine dolmasını engelleyerek defekti koruduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da kullanılan Bio-Oss materyalinin yerleştirildikten sonra bölgede stabil bir şekilde kaldığı ve yumuşak dokunun defekt bölgesine dolmasını önleyerek fibröz iyileşmeye engel olduğu görülmüştür.

Deproteinize kemik uygulanan örneklerde 8. hafta sonunda elde edilen bulgular; doğal kemik minerali içeren greft materyallerinin, kemik dokusu ile hızlı birleşme gösterdiğini, kemik hücrelerinin yapışması için bir matris görevi yaptığını bildiren literatür bilgilerine uymaktadır^{4,7,10,11,20,26,27,41,42}. Herhangi bir greft kullanılmayan defektlerde ise 3 mm'lik defektlerin spontan olarak tamamen iyileşme gösterirken 4 mm ve 5 mm'lik defektlerin tamamen iyileşmediği görülmüştür. Bu nedenle kobay modelinde mandibula bölgesi için 4 mm veya daha büyük bikortikal defektlerin KBD olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

Kaynaklar

1. Bosch C., Melsen B., Vangervik K.: Importance of the Critical-Size Bone Defect in Testing Bone-Regenerating Materials. *J. Craniofac. Surg.*, 9(4): 310-6, 1998.
2. Lemperle S.M., Calhoun C.J., Curran R.W., Holmes R.E.: Bony Healing of Large Cranial and Mandibular Defects Protected from Soft-Tissue Interposition: A Comparative Study of Spontaneous Bone Regeneration, Osteoconduction, and Cancellous Autografting in Dogs. *Plast. Reconstr. Surg.* 101(3); 660-72, 1998.
3. Schmitz J.P., Hollinger J.O.: The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. *Clin. Orthop.* 205: 299-308, 1986.
4. Artzi Z., Tal H., Dayan D.: Porous Bovine Bone Mineral in Healing of Human Extraction Sockets. Part 1: Histomorphometric Evaluations at 9 Months. *J. Periodontol.* 71(6): 1015-23, 2000.
5. Clokie C.M., Moghadam H., Jackson M.T., Sandor G.K.: Closure of Critical Sized Defects with Allogenic and Alloplastic Bone Substitutes. *J. Craniofac. Surg.* 13(1): 111-23, 2002..
6. Dahlin C., Sandberg E., Alberius P., Linde A.: Restoration of Mandibular Nonunion Bone Defects. An Experimental Study in Rats Using an Osteopromotive Membrane Method. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 23(4): 237-42, 1994.
7. Spector M.: Anorganic Bovine Bone and Ceramic Analogs of Bone Mineral as Implants to Facilitate Bone Regeneration. *Clin. Plast. Surg.* 21(3): 437-444, 1994.
8. Stassen L.F., Hislop W.S., Still D.M., Moos K.F.: Use of Anorganic Bone in Periapical Defects Following Apical Surgery: A Prospective Trial. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 32(2): 83-5, 1994.
9. Pinholt E.M., Bang G., Haanaes H.R.: Alveolar Ridge Augmentation in Rats by Bio-Oss. *Scand. J. Dent. Res.* 99(2): 154-61, 1991.
10. Kasabah S., Simunek A., Krug J., Lecaro M.C.: Maxillary Sinus Augmentation with Deproteinized Bovine Bone (Bio-Oss) and Impladent Dental Implant System. Part II. Evaluation of Deproteinized Bovine Bone (Bio-Oss) and

- Implant Surface. *Acta Medica. (Hradec Kralove)*. 45(4): 167-71, 2002.
11. Hurzeler M.B., Kohal R.J., Naghshbandi J., Mota L.F., Conradt J., Hutmacher D., Caffesse R.G.: Evaluation of a New Bioresorbable Barrier to Facilitate Guided Bone Regeneration Around Exposed Implant Threads. An Experimental Study in the Monkey. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 27(4): 315-20, 1998.
 12. Piattelli A., Degidi M., Di Stefano D.A., Rubini C., Fioroni M., Strocchi R.: Microvessel Density in Alveolar Ridge Regeneration with Autologous and Alloplastic Bone. *Implant Dent.* 11(4): 370-5, 2002.
 13. Tadjoedin E.S., De Lange G.L., Bronckers A.L., Lyaruu D.M., Burger E.H.: Deproteinized Cancellous Bovine Bone (Bio-Oss) as Bone Substitute for Sinus Floor Elevation. A Retrospective, Histomorphometrical Study of Five Cases. *J. Clin. Periodontol.* 30(3): 261-70, 2003.
 14. Merckx M.A., Maltha J.C., Freihofer H.P., Kuijpers-Jagtman A.M.: Incorporation of three types of bone block implants in the facial skeleton. *Biomaterials.* 20(7): 639-45, 1999.
 15. Stephan E.B., Jiang D., Lynch S., Bush P., Dziak R.: Anorganic Bovine Bone Supports Osteoblastic Cell Attachment and Proliferation. *J. Periodontol.* 70(4): 364-9, 1999.
 16. Richardson C.R., Mellonig J.T., Brunsvold M.A., McDonnell H.T., Cochran D.L.: Clinical Evaluation of Bio-Oss: A Bovine-Derived Xenograft for the Treatment of Periodontal Osseous Defects in Humans. *J. Clin. Periodontol.* 26(7): 421-8, 1999.
 17. Carmagnola, D., Berglundh, T., Lindhe, J.: The Effect of a Fibrin Glue on the Integration of Bio-Oss with Bone Tissue. A Experimental Study in Labrador Dogs, *J. Clin. Periodontol.*, 29(5), 377-83. (2002).
 18. Hallman M., Lundgren S., Sennerby L.: Histologic Analysis of Clinical Biopsies Taken 6 Months and 3 Years after Maxillary Sinus Floor Augmentation with 80% Bovine Hydroxyapatite and 20% Autogenous Bone Mixed with Fibrin Glue. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 3(2): 87-96, 2001.
 19. Araujo M.G., Sonohara M., Hayacibara R., Cardaropoli G., Lindhe J.: Lateral Ridge Augmentation by the Use of Grafts Comprised of Autologous Bone or a Biomaterial. An Experiment in the Dog. *J. Clin. Periodontol.* 29(12): 1122-31, 2002.
 20. Artzi Z., Tal H., Dayan D.: Porous Bovine Bone Mineral in Healing of Human Extraction Sockets: 2. Histochemical Observations at 9 Months. *J. Periodontol.* 72(2):152-9, 2001.
 21. Camargo P.M., Lekovic V., Weinlaender M., Nedic M., Vasilic N., Wolinsky L.E., Kenney E.B.: A controlled Re-entry Study on the Effectiveness of Bovine Porous Bone Mineral Used in Combination with a Collagen Membrane of Porcine Origin in the Treatment of Intrabony Defects in Humans. *J. Clin. Periodontol.* 27(12): 889-96, 2000.
 22. Fukuta K., Har-Shai Y., Collares M.V., Lichten J.B., Jackson I.T.: Comparison of Inorganic Bovine Bone Mineral Particles with Porous Hydroxyapatite Granules and Cranial Bone Dust in the Reconstruction of Full-Thickness Skull Defect. *J. Craniofac. Surg.* 3(1): 25-9, 1992.
 23. Lekovic V., Camargo P.M., Weinlaender M., Vasilic N., Aleksic Z., Kenney E.B.: Effectiveness of a Combination of Platelet-Rich Plasma, Bovine Porous Bone Mineral and Guided Tissue Regeneration in the Treatment of Mandibular Grade II Molar Furcations in Humans. *J. Clin. Periodontol.* 30(8): 746-51, 2003.
 24. Skoglund A., Hising P., Young C.: A Clinical and Histologic Examination in Humans of the Osseous Response to Implanted Natural Bone Mineral. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 12(2):194-9, 1997.
 25. Su-Gwan K., Hak-Kyun K., Sung-Chul L.: Combined Implantation of Particulate Dentine, Plaster Of Paris, and a Bone Xenograft (Bio-Oss) for Bone Regeneration in Rats. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 29(5): 282-8, 2001.
 26. Valentini P., Abensur D., Densari D., Graziani J.N., Hammerle C.: Histological Evaluation of Bio-Oss in a 2-Stage Sinus Floor Elevation and Implantation Procedure. A Human Case Report. *Clin. Oral Implants Res.* 9(1): 59-64, 1998.
 27. Van Steenberghe D., Callens A., Geers L., Jacobs R.: The Clinical Use of Deproteinized Bovine Bone Mineral on Bone Regeneration in Conjunction with Immediate Implant Installation. *Clin. Oral Implants Res.* 11(3): 210-6, 2000.
 28. Zitzmann N.U., Scharer P.: Sinus Elevation Procedures in the Resorbed Posterior Maxilla. Comparison of the Crestal and Lateral Approaches. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85(1): 8-17, 1998.
 29. Carmagnola D., Berglundh T., Araujo M., Albrektsson T., Lindhe J.: Bone Healing Around Implants Placed in a Jaw Defect Augmented with Bio-Oss. An Experimental Study in Dogs. *J. Clin. Periodontol.* 27(11): 799-805, 2000.
 30. Merckx M.A., Maltha J.C., Freihofer H.P., Kuijpers-Jagtman A.M.: Incorporation of Particulated Bone Implants in the Facial Skeleton. *Biomaterials.* 20(21): 2029-35, 1999.
 31. Merckx M.A., Maltha J.C., Freihofer H.P.: Incorporation of Composite Bone Implants in the Facial Skeleton. *Clin. Oral Implants Res.* 11(5): 422-9, 2000.
 32. Hollinger J.O., Kleinschmidt J.C.: The Critical Size Defect as an Experimental Model to Test Bone Repair Materials. *J. Craniofac. Surg.* 1(1): 60-8, 1990.
 33. Kleinschmidt J.C., Hollinger J.O.: Animal Models in Bone Research in " Bone Grafts & Bone Substitutes ", (Mutaz

- H.B., Reddi A.H. ed.) Vol: 13, 133-146, W.B. Saunders Company, Pennsylvania, Philadelphia, 1992.
34. Clark A.E.: Re: Comparison of Porous Bone Mineral and Biologically Active Glass in Critical-Sized Defects (68,1043-1053.1997) J. Periodontol. 69(11): 1312-4, 1998.
35. Gosain A.K., Song L., Yu P., Mehrara B.J., Maeda C.Y., Gold L.I., Longaker M.T.: Osteogenesis in Cranial Defects: Reassessment of the Concept of Critical Size and the Expression of TGF-Beta Isoforms. Plast. Reconstr. Surg. 106(2): 360-72, 2000.
36. Toung J.S., Ogle R.C., Morgan R.F., Lindsey W.H.: Repair of a Rodent Nasal Critical-Size Osseous Defect with Osteoblast Augmented Collagen Gel. Laryngoscope. 109(10): 1580-4, 1999.
37. Constantino P.D., Friedman C.D.: Soft Tissue Augmentation and Replacement in the Head and Neck. Otolaryngol. Clin. North Am. 27(1): 1-12, 1994.
38. Çılbır Ö.: Pyrost, Demineralize Kemik Ve Solvent Dehidrate Kemik Greftlerinin Membranlı Ve Membransız Kullanımının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız,Diş,Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A.D., Ankara 1999.
39. Schmitt J.M., Buck D.C., Joh S.P., Lynch S.E., Hollinger J.O.: Comparison of Porous Bone Mineral and Biologically Active Glass in Critical-Sized Defects. J. Periodontol. 68(11): 1043-53, 1997.
40. Orsini G, Scarano A, Degidi M, Caputi S, Iezzi G, Piattelli A: Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss particles in sinus augmentation. Oral Dis. 13(6):586-93, 2007
41. Valentini P., Abensur D., Wenz B., Peetz M., Schenk R.: Sinus Grafting with Porous Bone Mineral (Bio-Oss) for Implant Placement: A 5-Year Study on 15 Patients. Int. J. Periodontics Restorative Dent. 20(3): 245-53, 2000.
42. Hammerle C.H., Chiantella G.C., Karring T., Lang N.P.: The Effect of a Deproteinized Bovine Bone Mineral on Bone Regeneration Around Titanium Dental Implants. Clin. Oral Implants Res. 9(3): 151-62, 1998.
43. Aaboe M., Pinholt E.M., Hjorting-Hansen E.: Unicortical Critical Size Defect of Rabbit Tibia is Larger than 8 mm. J. Craniofac Surg. 5(3): 201-3, 1994.

Yazışma Adresi:

Dr. Dt. Süleyman Bozkaya
Necatibey Cad., Park Apt. No: 96/ 8 06570 Maltepe / ANKARA
Tel : +90 312 203 43 33
Fax : +90 312 223 92 26
E-mail : sbozkaya@superonline.com