

## SERT DOKU - BİYOMATERYAL ETKİLEŞİMLERİ - 2: KEMİK - SERAMİK VE KEMİK - POLİMER ETKİLEŞİMLERİ

*Feza KORKUSUZ\*, Alpaslan ŞENKÖYLÜ\*, Petek KORKUSUZ\*\**

### ÖZET

Ortopedi ve travmatolojide kemik yerine kullanılan seramikler esas olarak hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP) veya cam kökenlidir. Seramiklerin metallere göre en önemli avantajı, konak doku ile biyolojik etkileşime girebilmesidir. Bu güne kadar seramikler, biyoyumlu ve biyolojik olarak aktif materyaller olarak tanımlanmışlardır. Bunlara karşın son yapılan çalışmalar, kemik iliğine implante edildiklerinde bu materyallerin, hücrel deplesyonun takip ettiği özgün olmayan erken bir inflamatuvar yanıtın oluştuğunu göstermiştir. Cam iyonmerleri medikal alanda kullanılan seramiklerin mekanik özelliklerini ve biyoyumluluğunu geliştirmiştir. Öte yandan, bu seramiklerin nöral dokuya ters etkileri olabilmektedir.

Çimentoların karıştırma sırasında açığa çıkan ısının azaltılması ile biyomekanik özelliklerini değiştirmeksizin biyoyumluluğunu arttırmak için son yıllarda birçok çalışma yapılmıştır. Bunlardan biri kemik çimentosuna (PMMA) HA seramiğinin eklenmesidir. Bu yöntemle çimentoda polimerizasyon ısısı 111°C'den 87°C'ye indirilmiştir. Ayrıca kompresif kuvvet de arttırılmıştır. Kendiliğinden donan kalsiyum fosfat çimentolar (CPC) da enjekte edilebilir formdaki yeni çimentolardır.

Temelde polimerler, kırık fiksasyonu, kemik replasmanı, kırıldak onarımı, bağların ve tendonların fiksasyonu ile kontrollü ilaç salınımı amaçlarıyla kullanılmaktadır. Polimerik implantların klinik uygulamasından sonra doku yanıtını kanıtlayan en önemli belirtiler steril drenaj ve implant çevresindeki osteolizdir. İmplantın boyutları arttıkça oluşan reaksiyonun şiddeti de artar.

Sert doku mühendisliğinin geleceği uygun kompozisyondan oluşan ağ, yerel düzenleyiciler ve osteojenik hücrelerin birleşiminden oluşacaktır. Doku mühendisleri kemiğin elastik ve rijit özelliklerini akıldan çıkarmayarak original dokuya uygun biyokimyasal özellikleri olan bir yapay ağ aramalıdır. Bu arayışta kemiğin mineral özelliklerine yakın biyolojik uyumlu seramiklerin yeri olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Kemik, Seramik, Biyoyum.

### SUMMARY

HARD TISSUE-IMPLANT INTERACTIONS-2:  
BONE-CERAMIC AND  
BONE-POLYMER INTERACTIONS

Ceramics commonly used in orthopedic surgery and traumatology as bone substitutes are of hydroxyapatite (HA), tricalcium phosphate (TCP) and glass origin. The advantage of ceramics over metals is their biological interaction with the implanted host tissue. Ceramics were so far described as biocompatible and biologically active materials. Recent studies, however, indicate that when implanted into the bone marrow, these implants can induce non-specific bone marrow inflammation and cellular depletion. Glass inomers are recently used to improve ceramics mechanical strength. These inomers, on the other hand, may cause adverse effects on neural tissues.

Tissue necrosing heat of bone cement without changing its mechanical properties is trying to be reduced in recent years. Adding HA into the bone cement (PMMA) is a method that can be used for this reason. The biocompatibility of bone cement can also be improved by this method. Polymerization heat of bone cement can be decreased from 111°C to 87°C by adding HA into PMMA. This also increased the compressive strength of the bone cement. Injectable calcium phosphate cement is also a novel development in the field of bone ceramics.

Polimers are mainly used for fracture fixation, bone replacement, cartilage regeneration, ligament and tendon fixation and controlled release of medicine. Following their clinical application, sterile sinus drainage and osteolysis around the implants are signs of tissue response. As the size of these implants increase the tissue reaction towards the implant is suspected to increase.

Hard tissue engineering will rise on the shoulders of appropriate scaffolds, local mediators and osteogenic cells in the near future. Tissue engineers should seek for scaffolds as close as to the bones

\* Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Sağlık ve Rehberlik Merkezi, 06531 Ankara.

\*\* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye 06100, Ankara.

elastic and rigid properties. Bioceramics are materials that mimic the mineral phase of the bone being good candidates as appropriate scaffolds.

**Key Words:** Bone, Seramics, Biocompatibility.

### **Kemik Yerine Geçen Biyomateryaller Olarak Seramikler: Avantajları ve Dezavantajları**

Ortopedi ve travmatolojide kemik yerine kullanılan seramikler esas olarak hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP) veya cam kökenlidir<sup>1,2</sup>. Seramikler (a) hızlı rezorbe olan, (b) yavaş rezorbe olan ve (c) enjekte edilebilenler olarak üç gruba ayrılabilir<sup>3</sup>. Seramik kompozitler kemik iyileşmesini arttırmak için tek başlarına yada osteojenik, osteoindüktif veya osteokondüktif özellikteki başka materyallerle birlikte kullanılabilirler<sup>4-7</sup>. Ayrıca bu seramikler hücreler, büyüme faktörleri<sup>8-11</sup> ile antibiyotikler<sup>12-14</sup> ve anti-kanser ilaçlar<sup>15</sup> için taşıyıcı olarak da kullanılabilirler. Seramiklerin metallere göre en önemli avantajı, konak doku ile biyolojik etkileşime girebilmesidir. Seramik eğer hücre yada büyüme faktörü taşımıyorsa biyoaktivitesi osteokondüktivite ile sınırlıdır. Buna karşın, klinik ve temel araştırmaların sonuçları, bu materyallerin gerçek biyolojik etkilerini anlamak için yetersizdir<sup>16</sup>.

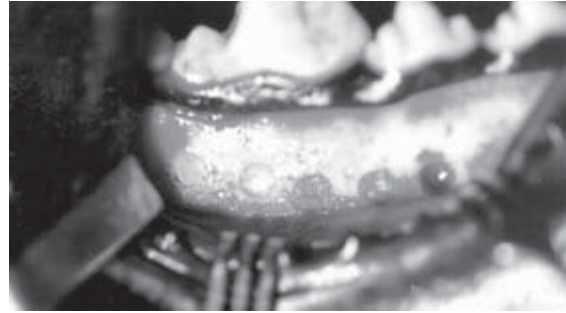
Gözenekli bozunabilir seramiklerin kemiğe implante etmenin temel amacı defektif bölgede doğal doku replasmanını sağlamaktır<sup>17-18</sup>. Seramikle etkileşime giren konak doku implantı zaman içinde orjinal doku ile değiştirmektedir. TCP, HA den daha hızlı bozunmakta ve bu nedenle yük taşımayan bölgelerde kullanılmaktadır. HA ve TCP nin bozunma hızı üreten firmaya, kompozisyonuna, sentezleme ısısına, gözenek yoğunluğuna ve çapına göre değişmektedir. TCP ve HA nın bir yıldaki bozunma oranları sırasıyla %35 ve %1-3 dür<sup>19</sup>. Buna karşın son zamanlarda yapılan bir çalışmada TCP bozunmasının 6 aydan sonra devam etmediğini ve yüklü olmayan seramiğin etrafının fibröz bir zarla çevrildiğini göstermektedir<sup>20</sup>. HA'nın mekanik özelliği TCP ile karşılaştırıldığında daha iyidir. Ancak bükülme ve torsiyonel kuvvetler HA nin kolayca kırılmasına neden olabilmektedir<sup>21</sup>.

Sentetik veya doğal kökenli apatit seramikleri, allojenik kemik granülleri ve kalsiyum karbonat diş hekimliğinde de sıkça kullanılmaktadır. Bir çalışmada<sup>22</sup> mandibulasında defekt oluşturulan köpeklerde bu seramikler karşılaştırılmıştır (Şekil 1). Bu çalışma mercan kökenli doğal apatitin bir haftada osteoblastlarla çevrili gevşek bağ dokusu oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 2). Doğal apatit dört haftada yerinde kemik trabeküllerine bırakarak rezorbe olmuştur. Yeni oluşan Havers kanalları

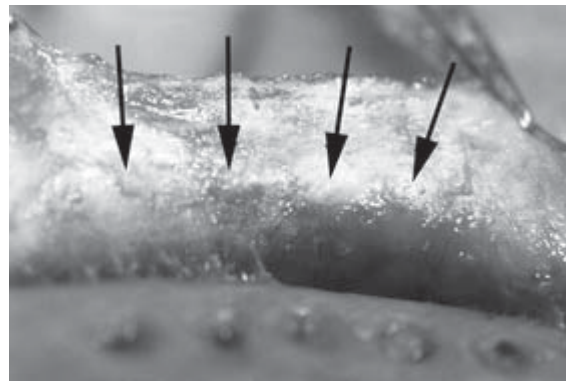
içinde osteoklastlar gözlenmiştir. Doğal apatite karşı yabancı cisim reaksiyonu ve inflamasyon gözlenmemiştir. Bir hafta içinde kalsiyum karbonat tümüyle rezorbe olmuş ve geride granülasyon dokusuyla dolu boşluk bırakmıştır. Boşlukta osteoblastlar da gözlenmiştir. Dört hafta içinde



(a)



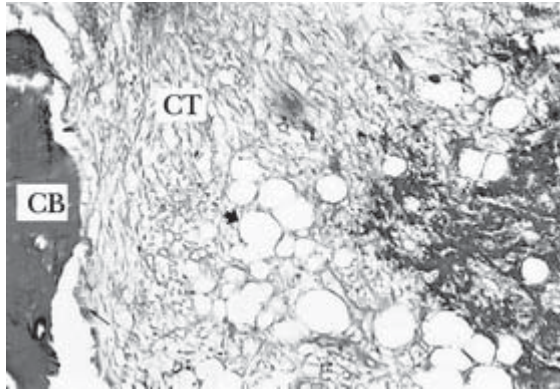
(b)



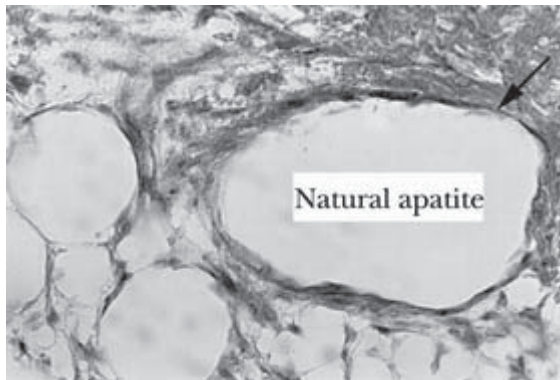
(c)

**Şekil 1:** Soldan sağa: Kontrol, Allojenik Kemik Parçaları, Doğal Apatit, Sentetik Hidroksiapatit ve Kalsiyum Karbonat İmplantasyonu. (a) Mandibulada açık boşluklar, (b) Biyomateryal implantasyonu ve (c) 4. haftadaki makroskopik görünüm. İmplantla temas halinde olan yerlerde periost reaksiyonu dikkati çekmektedir.

granülasyon dokusu yoğun bağ dokusu ile yer değiştirmiştir. Kalsiyum karbonattan elde edilen bulgular mercan apatitine oranla kötüdür. Yoğun bağ dokusu sentetik apatitlerle de oluşmuştur. Ancak osteoblastik aktivite kalsiyum karbonattan daha iyidir. İnce yeni kemik trabekülleri bazı bölgelerde sentetik HA'yi çevrelemiştir. Sentetik HA diğer materyallerle karşılaştırıldığında yabancı cisim reaksiyonu ve osteoklastik aktivite olmaksızın iyi bir kemik iyileşme süreci göstermişlerdir (Şekil 3). Allojenik kemikle doldurulan defektlerde yeni kemik oluşmamıştır. Kemik oluşumu daima implantın periferinden merkezine doğru oluşur. Tüm implantlar osteokondüktif özellik göstermiştir. Mandibulanın kalın kortikal yapısı nedeniyle implanta karşı oluşan doku yanıtı sınırlıdır. En iyi sonuçlar doğal apatiti takiben sentetik apatitle elde edilmiştir (Şekil 4). Allojenik kemik ve kalsiyum karbonat bu iki materyali kemik iyileşmesi açısından takip etmiştir (Şekil 5). Periost içindeki HA partikülleri anlamlı osteoklastik aktiviteye neden olmuştur (Şekil 6)<sup>22</sup>.



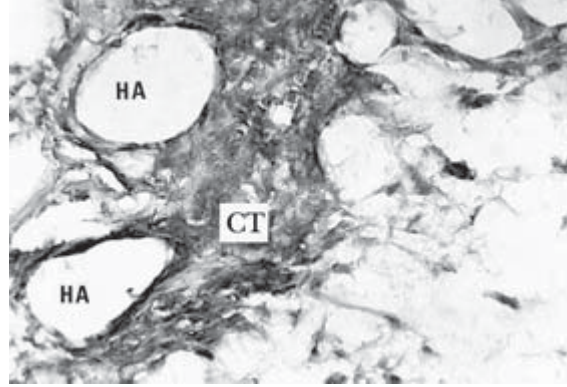
(a)



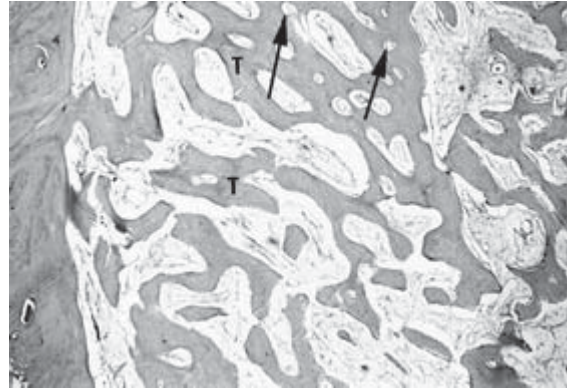
(b)

**Şekil 2:** Mercan kökenli doğal apatit.  
(a) Birinci haftada kortikal kemik (CB) ve implant arasında bağ dokusu (CT). Oklar implanttan arta kalan boşlukları göstermektedir. Masson's Trichrome 40x.  
(b) Fibröz bağ dokusu ile çevrili implant boşlukları. HE 40x.

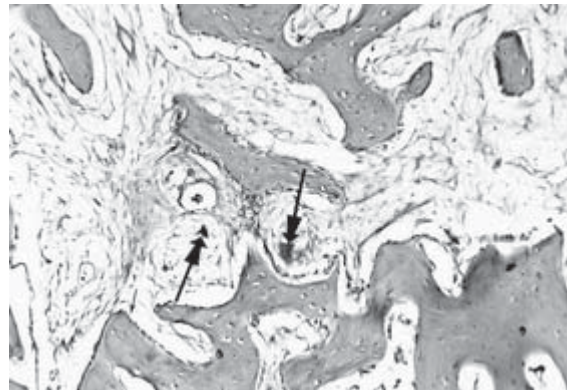
Tavşanlarda gerçekleştirilen farklı bir çalışma mandibulanın kemik iyileşmesinin femurdan daha iyi olduğunu göstermiştir<sup>23</sup>.



**Şekil 3:** Sentetik Hidroksiapatit. Birinci haftada osteoklastlar olmaksızın oluşan iyileşme gözlenmektedir. Yoğun bağ dokusu ile çevrili hidroksiapatit granülleri (CT), HE 400x.

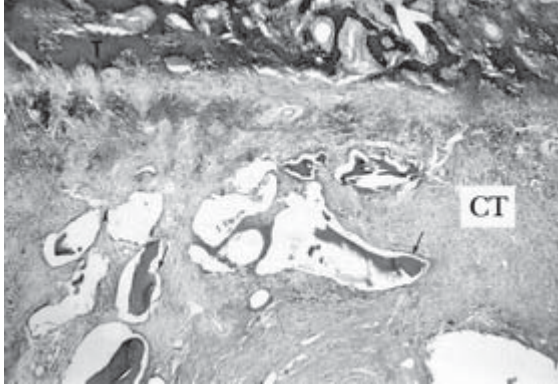


(a)

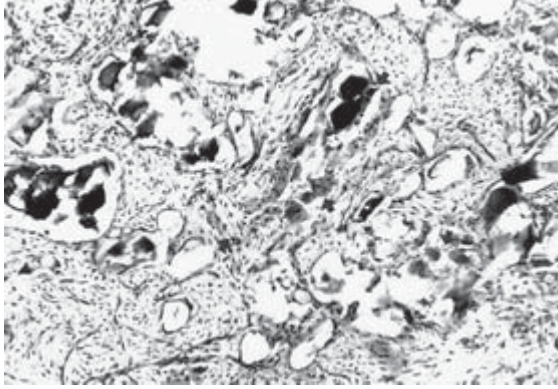


(b)

**Şekil 4:** Sentetik Hidroksiapatit. (a) Dördüncü haftada oluşan yeni kemik trabekülleri. Oklar yeni oluşan Havers kanallarını göstermektedir. HE 40x, (b) Osteoblastlar ve osteoklastlar (oklar) yeni oluşan kemik trabeküllerinin etrafında görülmektedir. HE 10x.



**Şekil 5:** Allojenik kemik parçaları. Yoğun bağ dokusu (CT) yeni kemik trabekülleri ile yakın temas halinde gözlenmektedir. Trichrome 40x.



**Şekil 6:** Periost içindeki hidroksapatit partikülleri anlamlı osteoblastik aktivite ile iç içe görülmektedir. HE 100x.

Bu güne kadar seramikler, biyouyumlu ve biyolojik olarak aktif materyaller olarak tanımlanmışlardır. Toksik değildirler. Seramiği çevreleyen dokuda hücre ölümüne neden olmazlar. Seramiğe karşı oluşan biyolojik yanıt kırık iyileşmesi sürecinin benzeridir. Bu süreç (a) hematoma oluşumu, (b) inflamasyon, (c) neovaskülerizasyon, (d) osteoklastik rezorpsiyon ve (e) yeni kemik oluşumu dönemlerini içerir. Çevre doku, seramik bozdukça yerini alır (Şekil 7). Kemik ile seramik arasında nadiren bir fibröz doku kapsül oluşur<sup>24</sup>. Seramiklerle osteogenezin oluşumunda partikül büyüklüğü önemli bir etmendir<sup>25</sup>. Bunlara karşın son yapılan çalışmalar kemik iliğine implante edildiklerinde bu materyallerin hücrelerde baskılanmayla karakterize özgün olmayan erken bir inflamatuvar yanıtı neden olduğunu göstermiştir (Şekil 8, 9)<sup>26,27</sup>. Bu erken doku yanıtının 14 hafta içinde gerilediği bulunmuştur<sup>28</sup>. Kemik iliği<sup>29</sup> ve yumuşak dokuların<sup>30</sup> seramik implantasyonuna karşı kortikal ve kansellöz kemikten daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Kan hücreleri ve osteoblastlar seramiğe karşı ilk reaksiyon gösteren hücrelerdir<sup>31</sup>.



(a)



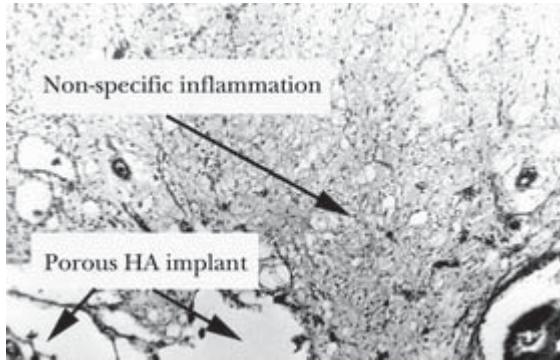
(b)

**Şekil 7:** Tavşan tibiasının medullasına gözenekli HA implantasyonu.

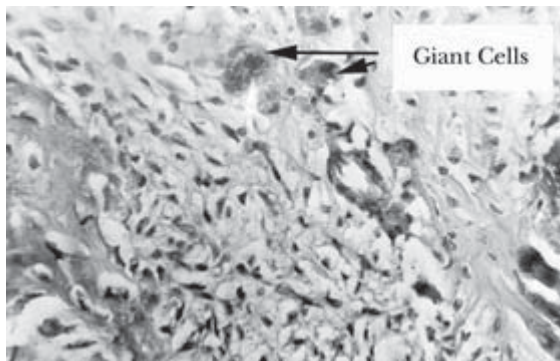
Ayrıca seramikler monositlerle de etkileşime girerler<sup>32,33</sup> ve kemik oluşumu veya rezorpsiyonuna neden olan sitokinler ile proteazların tanımlanması ve salınımını uyarabilirler (Şekil 10)<sup>34</sup>. HA ve TCP implante edildiğinde bölgeye en çok göç eden hücreler makrofajlardır<sup>35</sup>. Bu hücreler H+ salarak seramiğin bozunmasını sağlarlar<sup>35</sup>. Bunun yanında, alüminyum içeren seramikler makrofajların katalaz ve lipid peroksidaz aktivitelerini anlamlı biçimde artırarak serbest radikallerin açığa çıkmasına neden olabilirler. HA partikülleri nedeniyle fibroblastlardan IL-1, IL-6

ve TNF-a salınır. HA partikülleri bu moleküllerin salınımını mediatörlerin transkripsiyon seviyesinde etkiler. Fibroblastların jelatinolitik aktiviteleri de HA partikülleri ile artar<sup>34</sup>. HA in düşük ısıda sinterize edilmesinin toksisteye neden olması nedeniyle yüksek ısıda sinterize edilmektedir<sup>33</sup>. Buna karşın bioaktif seramiklerin üretim metodları toksisite sorunlarının çözümü için halen araştırılmaktadır<sup>36</sup>. Seramiklerin toksisiteleri eriyebilirliklerine de bağlıdır<sup>37</sup>. Doğal seramikler hücrelerin afiniteleri ve proliferere olabilmeleri açısından sentetik olanlardan daha etkilidirler<sup>38</sup>. Mineral tozlarının büyük miktarları alkalin fosfataz ve osteokalsin gibi osteojenik işaretleyicilerin aşağı regülasyonuna neden olurlar (Şekil 11)<sup>39</sup>.

Kemik mineral yoğunluğu HA implantasyonundan sonra aşamalı olarak artar<sup>40,41</sup>. Bunun yanında HA implante edilmiş kemiğin mekanik özellikleri normal kemikten farklıdır. HA implante edilmiş kemiğe kompresyon uygulandığında elde edilen sertlik özellikleri iyileşme süreci boyunca değişmez. Oluşan

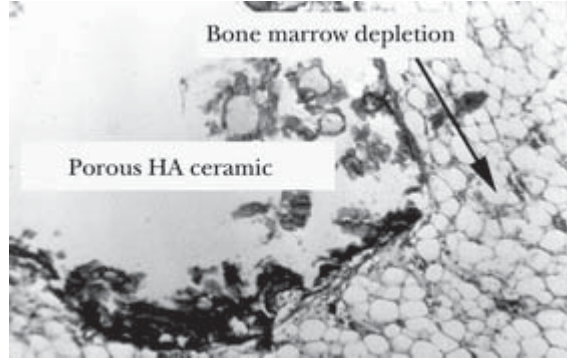


(a)

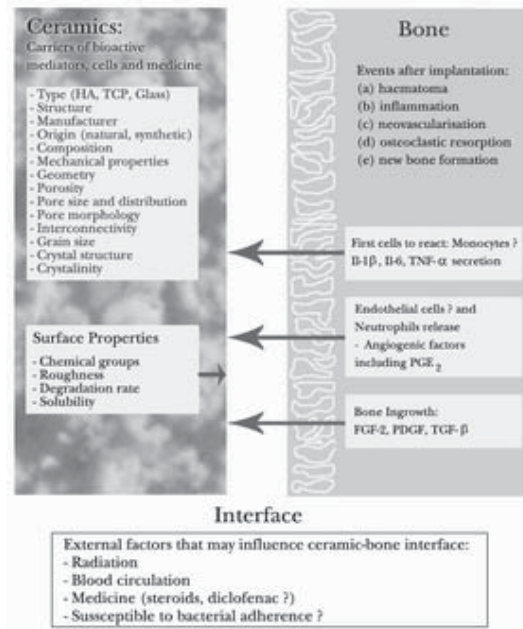


(b)

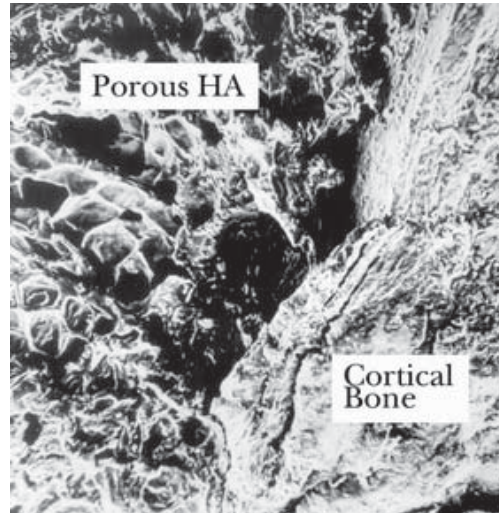
**Şekil 8:** (a) Gözenekli HA implantasyonundan bir hafta sonra kemik iliğinde oluşan özgün olmayan inflamasyon. HE 10x ve (b) İnflamasyon bölgesindeki birkaç dev hücre gözlenmektedir. HE 400x.



**Şekil 9:** Gözenekli HA implantasyonundan iki hafta sonra bölgedeki kemik iliğinde azalma. İliğin yağlı görünümü dikkati çekmektedir. HE 100x.



**Şekil 10.** Seramik implant-sert doku yüzeyi etkileşimi.



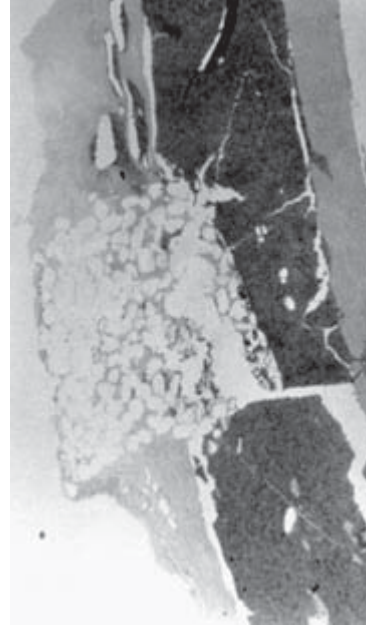
**Şekil 11:** Gözenekli HA örgüsü ve kortikal kemik. SEM 1400x.

kırık paterni HA implante edilmiş ve boş bırakılmış kontrollerde farklıdır. HA implante edilmiş kemikte implantasyon bölümündeki sert alan nedeniyle (longitudinal kırığın engellenmesinden dolayı) kırık uç plaklarda oluşur. Kontrol grubunda ise defekt bölgesinde oluşan zayıf nokta nedeniyle uzunlamasına kırık paterni görülür. Üç nokta eğme testinde HA implante edilmiş kemiklerde artan bir sertlik gözlenir<sup>41</sup>. Bir başka çalışmada HA implantasyonunun torsiyonel sertliği arttırdığı gösterilmiştir<sup>42</sup>. Yük taşıyan kemiklerde segmenter defekte HA ve HA/TCP kompoziti implante edilerek modal analiz değerleri elde edilmiştir<sup>21</sup>. HA ve HA/TCP implante edilen kemikler 18 haftada normal kemiğe göre impakt kuvvetlerinin %30'unu kaybetmişlerdir. Mekanik titreşim analizi sonuçları eğilme testi sonuçlarıyla uyumludur. Yük taşıyan bölgelere implante edilen seramiklerin mekanik test sonuçları, bu tip implantların mekanik özelliklerinin geliştirilmesi gerektiğini göstermiştir<sup>21</sup>.

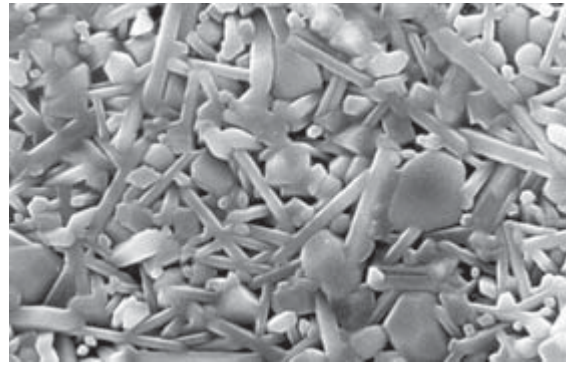
Seramiklerin in vivo osteokondüktif performansları implant ile kemik arasındaki temas yüzeyine bağlıdır (Şekil 12). Mineralizasyon doğrudan implant yüzeyindeki makro- ve mikro-gözeneklerde başlar<sup>43</sup>. Seramiğin mikrogözeneklerinde iğne benzeri kristaller oluşur<sup>44</sup>. Seramik ile kemik arasında var olan 50 mm'den fazla aralık fibröz kapsül oluşmasına neden olur. Ultrastrüktürel bir çalışmada kemik ile seramik arasındaki kollajen lifler gösterilmiştir. Bu lifler zamanla mineralize olmuştur. Ayrıca, 40-600 nm genişliğinde kollajenden yoksun granüler depozisyon da gözlenmiştir<sup>45</sup>. Bir başka SEM çalışmasında bu mineralize olmayan bölge 600 nm olarak ölçülmüştür<sup>46</sup>. İmplant ile kemik arasında oluşan yeni kemik lameller tiptedir<sup>47</sup>. Işık ve lazer tarama mikrokobuyla yapılan bir başka araştırmada HA üzerinde mineralize kemik ile mineralize olmayan bölümünde osteoid gösterilmiştir. Bunun yanında aralıkta ince bir floresan materyal tabakası da gözlenmiştir<sup>48</sup>.

Gözenek içerisine büyümenin gözlenebilmesi için ideal gözenek çapının 100 ile 400 nm arasında olması gerekmektedir<sup>49,50</sup>. Gözenek çapı arttıkça seramiğin mekanik özellikleri azalır. Osteoblastik hücreler HA ile kültüre edildiğinde hücreler seramik yüzeye hızlıca yayılır<sup>51</sup>, ancak 12 saat sonra bu yayılma durur<sup>52</sup>. *In vitro* çalışmaların sonuçları osteoblastik aktivitenin 2 haftada arttığı *in vivo* çalışmalardan farklı olabilmektedir<sup>53</sup>. Yüzeyin pürüzlü olması, seramiğin aktivitesi gibi değişkenler hücre adezyonu, proliferasyonu ve ayrışması için belirleyicidir<sup>54</sup>. Yüzey pürüzü arttıkça hücrelerin seramiğe yapışma oranı artar<sup>55</sup>. Konak dokunun

adaptif yanıtı (Şekil 13) insan ve diğer canlılarda farklıdır<sup>56</sup>. Seramiğin implante edildiği bölgenin kan akımı bu yanıtı önemle etkiler<sup>57</sup>.



**Şekil 12:** Tavşan kemiğinin gözenekli HA implanta periostal ve kortikal adaptasyonu. HE 40x.



**Şekil 13:** Apatit-volastonit cam seramik. Çubuklar seramiğin kendisine, altıgen yapılar ise cam seramiğe aittir. SEM 3000x (Prof. Muharrem Timuçin'in izni ile ODTÜ Metalurji ve Malzeme Bilimleri Bölümü).

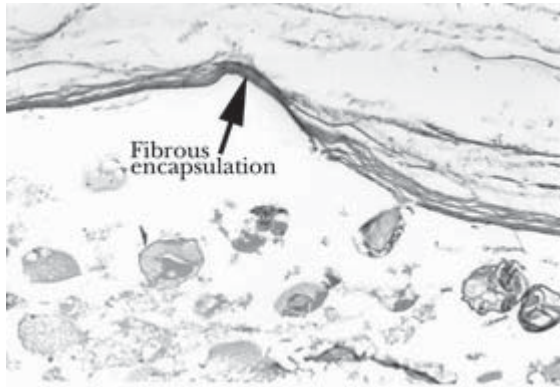
Seramiklere hücre<sup>58-63</sup> veya BMP gibi bioaktif maddelerin eklenesi kemik integrasyonunu artırabilir. Hücre içeren seramik implante edildiğinde hücrenin kökeni iyi belirlenmelidir. Seramiğe implante edilen hücrenin yaşayıp osteointegrasyonu mu arttıracığı yoksa apoptotik sürece mi gireceği bilinmemektedir. Seramik içindeki hücreler konak dokudan da göçedebilir. Ancak çalışmalar osteojenik hücrelerin implanta eklendiğinde seramiğin osteointegrasyonu

arttırdığını göstermiştir<sup>60,64</sup>. Bir başka çalışmada, HA ile osteoblastlar arasında organik ağ ve inorganik mineral olmasına rağmen seramiğin osteoblastların büyümesini önlediği gösterilmiştir<sup>65,66</sup>. Bu çalışmalar hücre ve seramik etkileşimleriyle ilgili daha çok araştırmaya gereksinim olduğunu göstermektedir. Konak doku ile biyomateryal ve transplante edilen hücreler arasındaki etkileşim implantın biyoyumluluğunu belirlemektedir<sup>67</sup>.

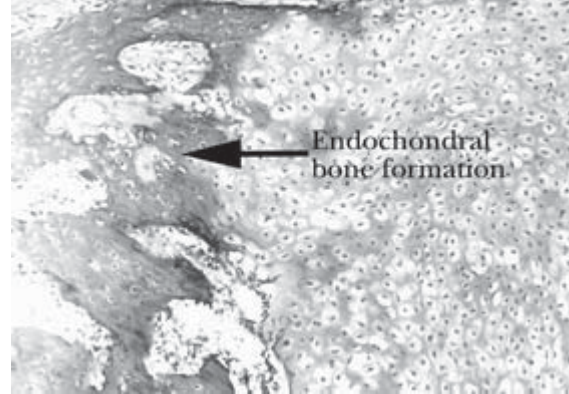
Cam iyonomerleri medikal alanda kullanılan seramiklerin mekanik özelliklerini ve biyoyumluluğunu arttırmıştır. Seramiklerin bu özel tipleri HA ile karşılaştırıldığında osteojenik aktiviteyi arttırdıkları gösterilmiştir<sup>68</sup>. Küçük miktarlardaki cam iyonomerlerinin bile apatit partiküllerini etkili bir biçimde bağlayabildiği bulunmuştur (basılmamış bilgi) (Şekil 14). Cam seramikler HA'e oranla daha hızlı kemik büyümesine neden olmaktadır<sup>69,70</sup>. Cam seramiklerin yüzeyinde oluşan mineralize katlar ile

osteoblastlar arasında doğrudan bağlantı bulunmuştur<sup>71</sup>. Öte yandan bu seramiklerin nöral dokuya yan etkileri olabilmektedir<sup>72</sup>. Bu nedenle omurga cerrahisi gibi nöral dokuya yakın bölgelerde bu seramikler dikkatle kullanılmalıdır. Bir başka çalışmada biyoaktif camların peritoneal makrofajlara ve monositlere toksik olduğu gösterilmiştir<sup>73</sup>. Biyocam partiküllerin TNF- $\alpha$  salınımını ve TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir<sup>73</sup>.

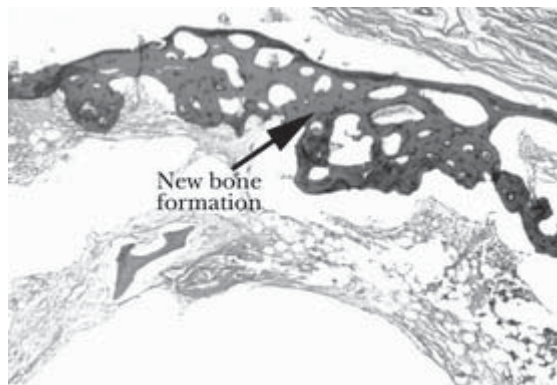
Genelde, seramikler minimal yan etkileri olan biyoaktif materyaller olarak tanımlanmaktadır (Şekil 15). Kemik iliğine implante edildiklerinde inflamasyona neden olurlar. İmplant çevresinde dev hücreler ve makrofajlar nadiren görülür ve bu erken ve özgün olmayan inflamasyon çoğunlukla kronikleşmez. Gözenekli seramiklerde osteointegrasyon ve doku büyümesi oluşur<sup>74</sup>. Seramiğin gözeneklerine doğru olan doku büyümesi daima sınırlıdır ve yeni kemik oluşumu yüzeyden drine doğrudur (Şekil 16).



(a)

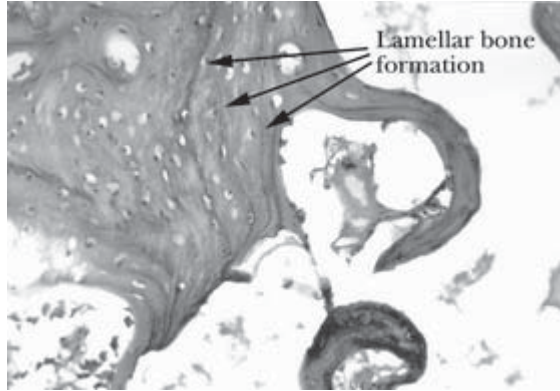


(b)

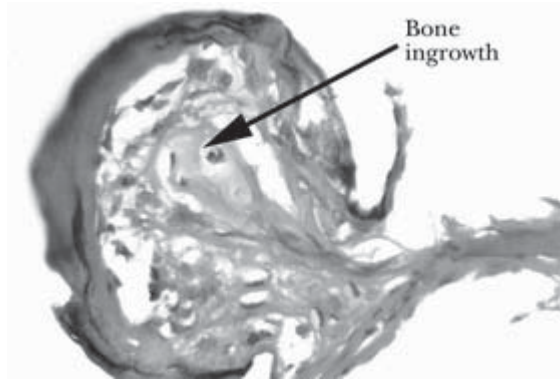


(c)

**Şekil 14:** Tavşan tibiasının yük taşıyan bölümünde oluşturulan 1 cm uzunluğundaki defekte implante edilen gözenekli HA-TCP seramik: (a) Bir haftada oldukça sınırlı bir enkapsülasyon görülmüştür. HE 10x. (b) Bir ay içinde fibröz enkapsülasyon evresinden sonra oluşan endokondral ossifikasyon. HE 100x. (c) İmplant kenarında yeni kemik oluşumu iki ay içinde görülmüştür. HE 40x.

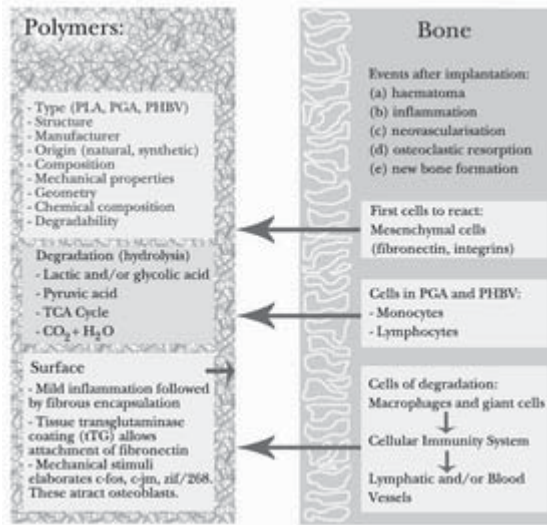


(a)



(b)

**Şekil 15:** Gözenekli HA-TCP seramik yüzeyinde sınırlı kemik büyümesi: (a) Seramik çevresinde sınırlı kemik oluşumu dört ayda görülmüştür. HE 200x. (b) Kompozitin gözneklerinin içine doğru dört ayda ilerleyen kemik dokusu görülmektedir. HE 400x.



**Şekil 16:** Polimer-sert doku yüzeyi etkileşimi.

### Kemik Çimentoları ve Yeni Biyoaktif Çimentolar

Çimentonun karıştırılması sırasında oluşan ısı reaksiyonu biyoyumluluğu belirleyen en önemli etmenlerin başında gelir. Yüksek ısıya neden olan çimentolar doku nekrozu oluşturabilir. Akut inflamatuvar evreden sonra makrofajları ve yabancı cisim dev hücrelerini içeren sinovya benzeri bir zar çimentoyu kaplar. Makrofajların sitoplazmalarında polietilen partiküller gözlenir ve kemik çimento birleşim yerinde IL-1 ile PGE<sub>2</sub> düzeyleri artar. 10 µm çapından küçük titanium ve polimetilmetakrilat (PMMA) partiküllerinin IL-1 ve PGE<sub>2</sub> salgılanmasını arttırarak osteolitik süreci başlattıkları düşünülmektedir<sup>75</sup>. PMMA ayrıca fibroblastlardan serbest radikal salınımına neden olur<sup>76</sup>. PMMA ile aynı ortamda bulunan osteoblastlarda yüksek düzeyde apoptoz gözlenmiştir<sup>77</sup>. Bunun yanında PMMA partikülleri osteoblast ayrışmasını engellemektedir<sup>78</sup>. Baryum sülfat gibi farmasötikler PMMA ya karşı oluşan inflamatuvar yanıtı arttırırlar<sup>79</sup>. Kemik çimentolarındaki hızlandırıcıların değiştirilmesi biyoyumluluklarını geliştirebilir<sup>80</sup>.

Karıştırma sırasında açığa çıkan ısının azaltılması ile biyomekanik özelliklerini değiştirmeksizin biyoyumluluğunu arttırmak için son yıllarda birçok çalışma yapılmıştır<sup>81-83</sup>. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada polimer ağda homojen dağılımı sağlamak için iki farklı molekül ağırlığında HA partikülü ile PMMA karıştırılarak oluşturulan oldukça düşük viskoziteli çimento kompozisyonu hazırlanmıştır<sup>84</sup>. Bu çimentoda polimerizasyon ısısı 111°C den 87°C ye indirilmiştir. Ayrıca çimentonun kompresif kuvvetinin de arttığı gözlenmiştir. HA içeren akrilik kemik çimentosu bilinen çimentodan daha yüksek mekanik kuvvete dayanım göstermiştir<sup>85</sup>. Gelecekte HA içeren akrilik kemik çimentolarının yaygın kullanımı söz konusudur. In vitro çalışmalar da osteoblast benzeri hücrelerin HA içeren PMMA sementlerin yüzeyinde daha iyi büyüyerek farkedilebildiklerini göstermiştir<sup>81</sup>.

Kendiliğinden donan kalsiyum fosfat çimentolar (CPC) enjekte edilebilir formdaki yeni çimentolardır<sup>86-90</sup>. Bu çimentolar inflamatuvar yanıt oluşturmaksızın implantasyondan hemen sonra yaygın kemik oluşumu göstermişlerdir<sup>87</sup>. Kalsiyum fosfat seramiklerinde kemik kolonizasyonu daha erken ve daha hızlı olmaktadır<sup>91</sup>. Polimerler<sup>92</sup>, jelatin<sup>93</sup> ve kollajen<sup>94</sup> eklenerek kalsiyum fosfat seramiklerinin biyoyumluluğu geliştirilebilir. Kitosan ve sitrik asit inflamatuvar yanıtı azaltarak biyoyumluluğu arttırmak için eklenmiştir<sup>95</sup>. TGF-α eklenerek preosteoblastik hücrelerin uyarımı in vitro olarak sağlanabilir<sup>96</sup>. Buna



karşın bir çalışmada partikül büyüklüğüne bağlı olarak CPC partiküllerinin osteoblastları ters etkilediği bulunmuştur<sup>97</sup>. CPC'nin biyomekanik etkinliği ve gözenekli olmayışı nedeniyle yavaş bozunması gibi sorunları araştırmaya halen açıktır.

### Polimerler

Temelde polimerler, kırık fiksasyonu, kemik replasmanı, kırık onarımı, bağların ve tendonların fiksasyonu ile kontrollü ilaç salınımı için kullanılmaktadır. Polilaktitler (PLA), poliglaktitler (PGA) ve polihidroksibütiratlar (PHBV) sert dokusu mühendisliğinde en çok kullanılan polimer tipleridir<sup>98</sup>. Tip, kompozisyon, yüzey, geometrisi, kimyasal yapı, porozite ve bozunma hızı gibi özellikler materyalin kemik doku ile etkileşimini belirler. Hidrofilik polimerler hücre yapışması ve büyümesi için yüzey modifikasyonu gerektirirler<sup>99</sup>. Polimerlerin bozunma hızı in vivo ortamda in vitro ortamdaki daha yavaştır. Polimerle etkileşime giren ilk hücreler genel olarak mezenşim kökenlidir (Şekil 16). Mezenşimal hücreler extraselüler matrikste kollajene tutunabilmek için fibronektini kullanırlar. Fibronektine yüksek oranda bağlanan doku transglutaminazı son yıllarda polimerin biyoyumluluğunu arttırmak için yüzey kaplamalarda kullanılmaktadır<sup>100</sup>. İntegrinler mezenşimal hücrelerde biyolojik yanıtı başlatan küçük extraselüler matriks proteinleridir. Öte yandan proto-onkogenler c-fos, c-jun ve zif/268 mekanik uyarımı takiben osteoblastları uyarırlar<sup>101</sup>. Sert doku-implant etkileşimindeki hücre ve hücreler mekanizmaları takip eden olaylar diğer materyallerle aynıdır. Kültür ortamında laktik asit polimerleriyle ilk etkileşime giren hücreler granüositler, monositler ve lenfositlerdir<sup>102</sup>. Fibröz kapsül oluşumunda başlıca görev alan hücreler fibroblastlardır. Makrofajlar implantın bozunma hızına bağlı olarak 12 haftadan 4 yıla kadar implant çevresinde yer alır<sup>103,104</sup>. Polimerler sinovyum gibi immünolojik olarak daha aktif dokulara yakın olarak implante edildiğinde doku yanıtının şiddeti artabilir<sup>105</sup>. İntraartiküler uygulamalarda uygulama derinliği önemlidir<sup>106</sup>. PGA dan yapılan implantlar inflamatuvar yanıtı başlatır ve bölgeye monosit ve lenfositler göç eder. Monositler bu implantlarla kültüre edildiğinde DNA sentezi artmamakla birlikte MHC-2 antijeni ve IL-2R aktivasyon işaretleyici ekspresyonunda artış gözlenir. Bu bulgular PGA'nın göreceli olarak inert olduğunu ve inflamatuvar mononükleer hücre migrasyonu ile adezyonunu uyardığını gösterir<sup>107</sup>.

Polimerin kemik hücreleriyle etkileşimi daha çok doku kültürlerinde çalışılmıştır. Osteoblastik hücreler kullanılarak yapılan implant toksisite ölçümleri biyoyumluluk testlerinin vazgeçilmez bir parçası

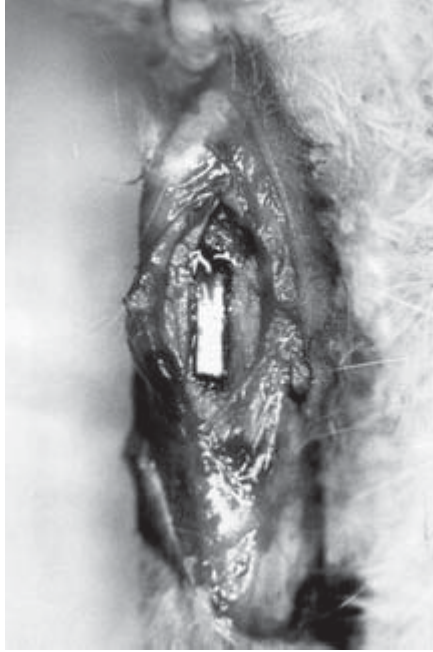
olmuştur. Rat kemik iliği stromal kökenli osteoblastlarında yapılan çalışmalar, polimer partikül konsantrasyonunda artma oldukça hücre sayısı ve mineralizasyonda azalma olduğunu göstermiştir<sup>108</sup>. Bu çalışma polimerik partiküllerin kemiğin yeniden şekillenme sürecini de etkilediğini göstermiştir.

Deneyel ve klinik çalışmalarda polimerlere karşı olan yabancı cisim yanıtı iyi dökümanite edilmiştir<sup>109-110</sup>. Polimerik implant uygulamasından sonra yanıtı kanıtlayan en önemli belirtiler steril drenaj ve implant çevresindeki osteolizdir. Bir çalışmada PLA fiksasyon implantlarıyla ameliyat edilen 2528 hastanın 107'sinde doku yanıtı olduğu bildirilmiştir<sup>110</sup>. Ameliyattan sonra yanıt ortalama 11 haftada ortaya çıkmıştır. Bir olguda PGA implante edildikten tam 4.3 yıl sonra yanıt geliştiği izlenmiştir. Bu doku yanıtları histolojik olarak özgün olmayan doku yanıtıyla karakterizedir<sup>110</sup>.

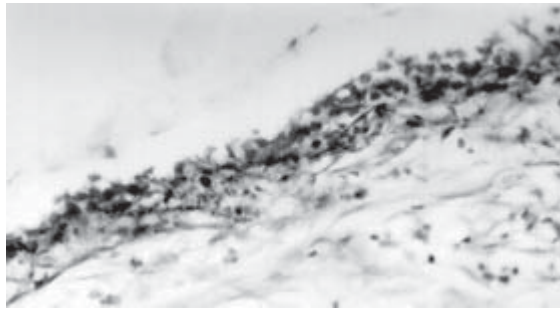
Diş hekimliğinde karşılaşılan bir başka reaksiyon tipi sert dokuyu replase etmek için polimer kullanıldığında oluşan yabancı cisim granülomudur<sup>111</sup>. Ayak cerrahisinde biyobozunur fiksasyon malzemesi kullanılan 27 hastanın ikisinde oluşan özgün olmayan yanıt içi drenaj ve debridmana gereksinim duyulmuştur<sup>112</sup>. Distal radius kırıklarının fiksasyonu için PGA implantları kullanıldığında iyileşme süresi metal kullanılanlardan daha uzun olmuştur<sup>113</sup>. Öte yandan polimerik vidalarla tedavi edilen 83 hastanın hiçbirisinde erken yada geç reaksiyona bağlı drenaj gözlenmemiştir<sup>114</sup>. Biyobozunur rod fiksasyonunda uygun teknik ve postoperatif instabilite çok önemlidir<sup>115</sup>. İmplantın boyutları arttıkça oluşan reaksiyonun şiddeti de artar. 21 erişkin koyun kullanılarak yapılan bir çalışmada polimerik rodlar intramedüller olarak yerleştirilmiş ve 30 ayda histolojik olarak fibröz enkapsülasyon, lenfosit infiltrasyonu ve dev hücrelerle karşılaşılmıştır<sup>116</sup>.

Poli (kaprolakton) (PCL) kemik doku mühendisliğinde kullanılan bir başka polimerdir. PCL ile yapılan çalışmalar kemik iliği hücrelerinin bu implanta karşı ALP aktivite artışı oluşturmadığı gösterilmiştir<sup>117</sup>. PHBV implantlara karşı da yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir (Şekil 17)<sup>118</sup>. PHBV nin çevresini bağ dokusu sarmıştır. Birinci haftada kalın, fibroblast ve mononükleer fagositik hücrelerden zengin bir kapsül polimeri çevrelemiştir (Şekil 18). Dev hücreler sınırlı olarak izlenmiştir. Üç ve altıncı haftalarda fibröz tabaka inceleyerek implantın bazı yerlerinde kemikle ilişkisine izin verecek hale gelmiştir (Şekil 19). Altıncı haftada makrofajların sayısı azalmış ve osteoblastlar makrofaj ile fibroblastların yerini almıştır. Kemiğe uygulandığında doku yanıtına neden olan bir başka

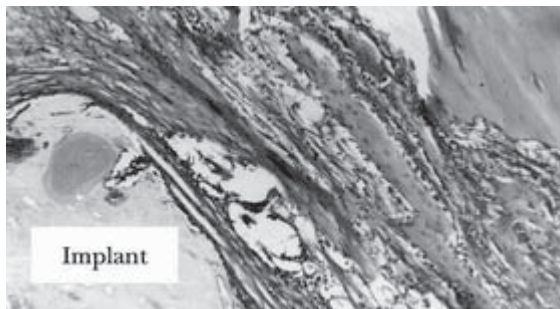
implant da kalsiyum fosfat-jelatin kompozitidir<sup>119</sup>. Polimerlere karşı oluşan doku reaksiyonunun evreleri şu şekilde özetlenebilir: (a) Erken evre: Az sayıda lenfosit içeren ince bağ dokusu kapsülü oluşumu



Şekil 17: Tavşan kemiğine PHBV implantasyonu.



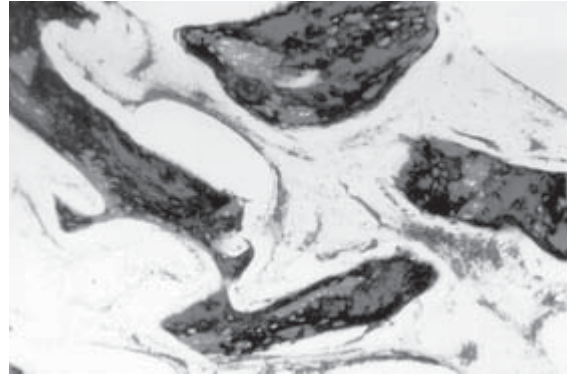
(a)



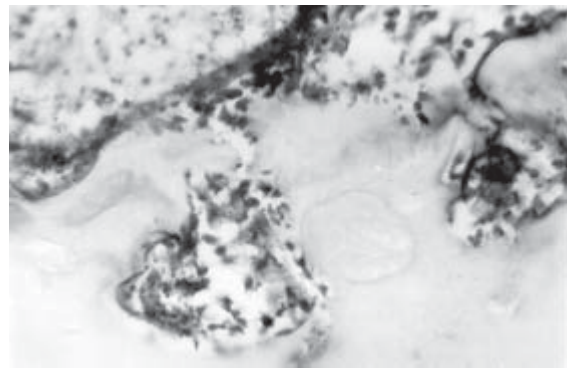
(b)

(Şekil 20), (b) Ara evre: Fibroblast içeren daha yoğun bağ dokusu (Şekil 21), ve (c) Geç evre: Materyal partiküllerinin dev hücreler ve makrofajlarca temizlenmesi (Şekil 22).

Polilaktidlerin yan etkilerini azaltmak için alkali tuzların ve inflamatuvar mediator antikörlerinin materyale eklenmesi önerilmektedir<sup>101</sup>. Eriyebilir tuz dolgusu olarak kalsiyum asetat kullanılması<sup>120</sup> veya propilen fumaratın etilenglikol dimetakrilat ile çapraz bağlanmasının<sup>121</sup> biyobozunur polimerlerin in vivo biyouyumluluğunu arttırdığı gösterilmiştir. Reaksiyonu azaltmak için bir başka öneri de polimere BMP eklenmesidir<sup>122</sup>. Bunun yanında doku reaksiyonu sorununu çözmek için yeni

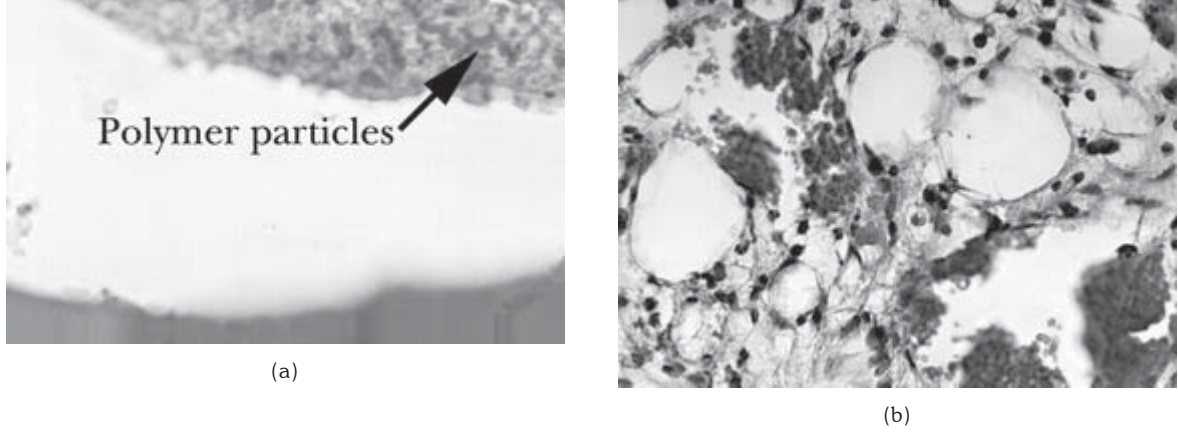


Şekil 19: PHBV polimeri içinde birbirleriyle bağlantılı kemik trabekülleri şeklinde oluşan yeni kemik oluşumu görülmektedir. Massons Trichrome, 400x.

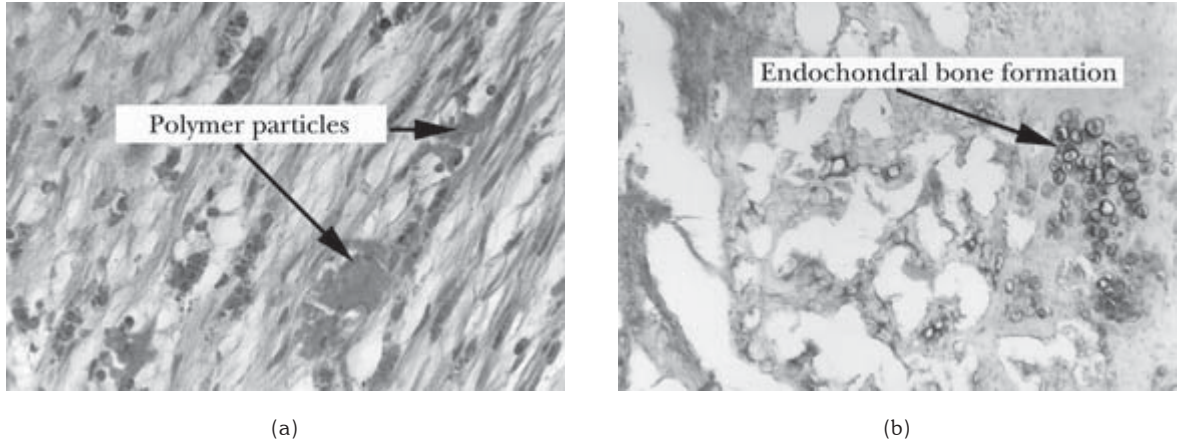


(c)

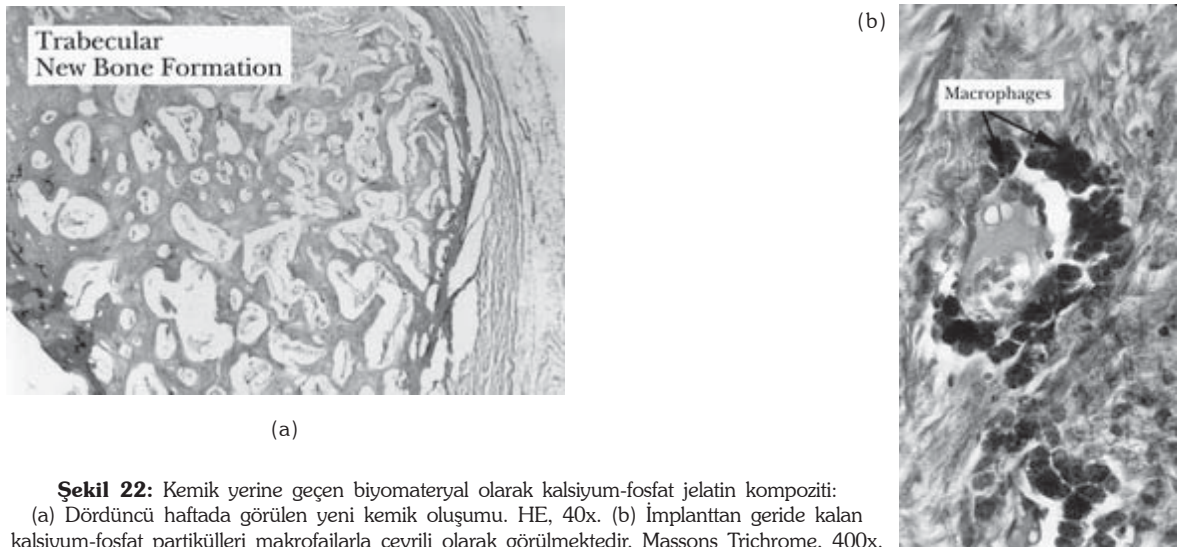
Şekil 18: Gentamisin içeren PHBV implantın fibröz enkapsülasyonu: (a) Birinci haftada implantı kalın ve hücreden zengin bağ dokusu tabakası çevirmişti. Massons Trichrome, 400x (b) İmplantasyonun üçüncü haftasında az sayıda makrofaj halen görülmektedir. HE, 40x. (c) PHBV boşluklarını invaze eden inflamatuvar hücreler. Massons Trichrome, 400x.



**Şekil 20:** Kemik yerine geçen biyomateryal olarak kalsiyum-fosfat jelatin kompoziti: (a) Birinci haftada çevre yumuşak doku içinde bozulan polimer partikülleri. HE, 100x. (b) Polimere karşı oluşan minimal yabancı cisim reaksiyonu izlenmektedir. HE, 100x.



**Şekil 21:** Kemik yerine geçen biyomateryal olarak kalsiyum-fosfat jelatin kompoziti: (a) İkinci haftada daha yoğun bir bağ dokusu ile çevrelenmiş implant. HE, 400x. (b) Üçüncü haftada gözlenen endokondral kemik oluşumu görülmektedir. HE, 100x.



**Şekil 22:** Kemik yerine geçen biyomateryal olarak kalsiyum-fosfat jelatin kompoziti: (a) Dördüncü haftada görülen yeni kemik oluşumu. HE, 40x. (b) İmplanttan geride kalan kalsiyum-fosfat partikülleri makrofajlarla çevrili olarak görülmektedir. Massons Trichrome, 400x.

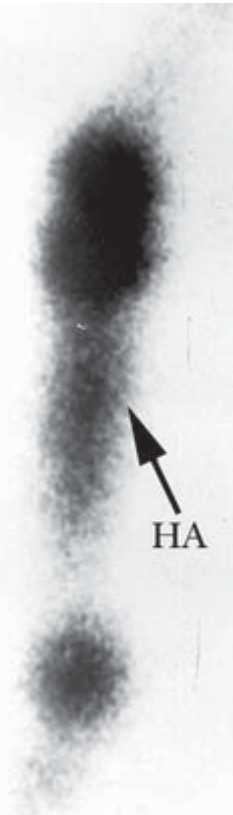
sterilizasyon ve polimerik implant üretim stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir<sup>123,124</sup>. Uzun raf ömrü de polimerlerin biyomekanik ve kimyasal özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır.

Polimerik rod kullanılarak fiksasyon uygulanan olgularda bakteriyel yara enfeksiyonu ve fiksasyon kaybı yüzdesi %4 olarak bildirilmektedir<sup>125</sup>. Biyoyumlulukları arttıkça polimerik implant kullanılan anatomik bölgelerin de çeşidi artmaktadır. Ön çapraz bağ fiksasyonu, kıkırdak ve menisküs tamiri, rotator kılıf tamiri, labrum yırtıklarının tamiri ve giderek artan çeşitteki kırık fiksasyonları bunların arasında sayılabilir<sup>109,126</sup>. Anatomik bölgenin özelliği ve kemik dokunun gereksinimine göre polimerlerin bozunma hızı ayarlanabilmektedir. Bozunabilen polimerlere karşı gelişen temel doku yanıtı fibröz enkapsülasyondur. PHBV gibi biyoyumlu polimerlerde bu enkapsülasyonun oluşma oranı daha düşüktür. Bozunma süreci makrofajlar ve dev hücrelerce yürütülür. Kabul edilebilir doku yanıtını değiştirmeksizin polimerik implantın biyomekanik özelliklerinin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanıdır. İmplantın kimyasal kompozisyonunun asit pH dan normal pH ya değişmesi de biyoyumluluğunu geliştirmektedir.

### Seramik-Polimer Kompozitleri

Seramiklerle polimerlerin avantajları son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarla birleştirilmiştir. Seramik-polimer kompozitleri bazı olgularda kemik yerine geçen biyomateryal olarak kullanılmıştır<sup>104,127-131</sup>. Bunlar ayrıca kemik rejenerasyonu için yapılan gen tedavisi uygulamalarında da kullanılmıştır<sup>132</sup>. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada PCL ile HA kullanılarak oluşturulan elle kolayca şekillendirilebilir bir kompozit ratlarda denenmiştir. Üç ay içinde PCL degrades olurken geride kalan HA partikülleri arasına yeni kemik dokusu büyümesi olduğu gözlenmiştir<sup>133</sup>. Bu kompozitlerde polimer ve seramik kemikteki kollagen ve minerali taklit etmektedir. Bu kompozitlere hücre eklenmesiyle hücreler kendi özelliklerini koruyarak katmanlar halinde çoğalabilmektedirler<sup>134</sup>. Polimer içindeki HA partikülleri hücrelerin yapışması için bir çapa görevi görmektedir<sup>128</sup>. Bunun yanında apatit partikülleri pH'yı fizyolojik aralıkta tutmaktadır. PLA ve PGA implantlarının çevresindeki asit çözünmesi seramiklerle birlikte kullanıldıklarında engellenebilmektedir<sup>129</sup>. Ancak kompozitlerle entegre oldukları halde 24 ayda polimerin degradasyonuna bağlı kuvvetli bir inflamatuvar yanıt da gözlenebilmektedir<sup>104</sup>. Polimer ile seramik arasındaki denge ile oluşan kimyasal olaylar ve hücresel yanıtlar kemik gelişim oranını etkilemektedir<sup>135</sup>.

Sert doku mühendisliğinin geleceği uygun kompozisyonlardan oluşan ağ iskeleti, yerel düzenleyiciler ve osteojenik hücrelerin birleşiminden oluşacaktır<sup>136,137</sup>. Orijinal dokuya yakın bir doku yaratmak ana amaçtır. Doku mühendisleri kemiğin elastik ve rijit özelliklerini akıldan çıkarmayarak orijinal dokuya uygun biyokimyasal özellikleri olan bir ağ aramalıdır. Kemiğin kortikal ve kansellöz bölümlerinin replasmanı birbirinden ayrı düşünülmelidir. Büyüme faktörleri zamana ve doza bağlı olarak etki gösterirler. Dokuya her iyileşme fazına uygun doz ve tipte büyüme faktörü verilmelidir. İmplant edilen bölgedeki hücrelerin büyümeleri ve farklanması iyi tanımlanmalıdır. İmplant edilen tüm materyalin, hücrelerin ve büyüme faktörlerinin etkileri in vivo doku yanıtı ile önenebilir. Radyografi metallerin ve sert dokunun monitörizasyonunda kullanılan klasik bir yöntemdir. Kemik sintigrafisi (Şekil 23), Kemik mineral yoğunluğu, kantitatif bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme gibi yöntemler halen geliştirilmektedir. In vivo fizyolojik değişiklikler MRG kullanılarak görüntülenebilmektedir. İleri MRG teknikleriyle biyobozunur implantlar yakın bir gelecekte görüntülenebilecektir.



**Şekil 23:** HA implante edilmiş tavşan tibiasının (Tc) kemik sintigrafisi. Görüntülenen doku integrasyonunun ve kemik iyileşmesinin kantitatif analizi olasıdır.

## KAYNAKLAR

1. Lemons, JE, 1996. Ceramics: past, present and future. *Bone*. 19: 121S-128S.
2. Koç N, Timuçin M, 1999. Medical ceramics. *Arthroplasty. Arthroscopic. Surgery*. 10: 104-109.
3. Fleming, JE, Cornell CN, Muschler GF. 2000. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop. Clin. North. Am.* 31: 357-374.
4. Uchida A, Nade SML, McCartney ER, Ching W, 1984. The use of ceramics for bone replacement. *J. Bone. Joint. Surg.* 66-B: 269-275.
5. Uchida A, Nade S, McCartney E, Ching W, 1985. Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits. *J. Orthop. Res.* 3: 65-77.
6. Korkusuz F, Korkusuz P, 1997. Calcium hydroxyapatite ceramics in orthopedic surgery. *Acta. Orthopaedica. et Traumatologica. Turcica.* 31: 63-67.
7. Khan SN, Tomin E, Lane JM. 2000. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop. Clin. North. Am.* 31: 389-398.
8. Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K, 1988. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenic protein. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 234: 250-254.
9. Young SW, Andrews A, Muller H, Constanz B, 1991. Induction of fracture healing using fibrous calcium phosphate composite spherulites. *Invest. Radiol.* 26: 470-473.
10. Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, Azimus E, Autefage A, 1993. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials.* 14: 423-429.
11. Noshi T, Yoshikawa T, Dohi Y, Ikeuchi M, Horiuchi K, Ichijima K, Sugimura M, Yonemasu K, Ohgushi H, 2001. Recombinant human bone morphogenic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. *Artificial. Organs.* 25: 201-208.
12. Krajewski A, Ravaglioli A, Roncari E, Pinasco P, Montanari L, 2000. Porous ceramic bodies for drug delivery. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 12: 763-771.
13. Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N, Ono K, 1992. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. *J. Bone. Joint. Surg.* 74-B: 600-604.
14. Korkusuz F, Uchida A, Shinto Y, Araki N, Inoue K, Ono K, 1993. Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites. *J. Bone. Joint. Surg.* 75-B: 111-114.
15. Uchida A, Araki N, Shinto Y, Yoshikawa H, Ono K, Kurosaki E, 1990. The use of hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J. Bone. Joint. Surg.* 72-B: 298-302.
16. Bauer TW, Muschler GF, 2000. Bone graft materials. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 371: 10-27.
17. Block JE, Thom MR, 2000. Clinical indications of calcium-phosphate biomaterials and related composites for orthopedic procedures. *Calcif. Tissue. Int.* 66: 234-238.
18. Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V, 1986. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. *J. Bone. Joint. Surg.* 68-A: 904-911.
19. Yamaguchi K, Hirano T, Yoshida G, Iwasaki K, 1995. Degradation-resistant character of synthetic hydroxyapatite blocks filled in bone defects. *Biomaterials.* 16: 983-985.
20. Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, Kleinheiz J, Meyer U, Joos U, 2002. TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials.* 23: 1689-1695.
21. Balçık C. 2002. Biomechanics of porous ceramic implants used in long bone segmental defect healing. PhD Thesis., Middle East Technical University.
22. Gürmeriç A. 1995. Experimental evaluation of new bone formation using hydroxyapatite, allogenic bone chips, natural coral and calcium carbonate. PhD Thesis., Hacettepe University.
23. Tassery H, Pertot WJ, Camps J, Proust JP, Dejoy J, 1999. Comparison of two implantation sites for testing intraosseous biocompatibility. *J. Endod.* 25: 615-618.
24. Hench LL, Wilson J, 1984. Surface active biomaterials. *Science.* 226: 630-636.
25. Boyan BD, Hummert TW, Den DD, Schwartz Z. 1996. Role of material surface in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials.* 17: 137-146.
26. Schwartz Z, Braun G, Kohavi D, Brooks B, Amir D, Sela J, Boyan B, 1993. Effects of hydroxyapatite implants on primary mineralization during rat tibial healing. *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 1029-1038.
27. Korkusuz F, Uluoğlu Ö. 1999. Non-specific inflammation and bone marrow depletion due to intramedullary porous hydroxyapatite application. *Bull. Hosp. Joint. Diseases.* 58: 86-91.
28. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J, 1992. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 50: 241-249.
29. Lu JX, Gallur A, Flautre B, Anselme K, Descamps M, Thierry B, Hardouin P, 1998. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical and medullary bone sites in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* 42: 357-367.
30. Misiek DJ, Kent JN, Carr RF, 1984. Soft tissue responses to hydroxyapatite particles of different shapes. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 42: 150-160.
31. Lin TC, Su CY, Chang CS, 1997. Stereomorphologic observation of bone tissue response to hydroxyapatite using SEM with the EDTA-KOH method. *J. Biomed. Mater. Res.* 36: 91-97.
32. Goodman SB, Davidson JA, Fornasier VL, 1993. Histological reaction to titanium alloy and hydroxyapatite particles in the rabbit tibia. *Biomaterials.* 14: 723-727.
33. Laquerriere P, Kilian L, Bouchot A, Jallot E, Grandjean A, Guenounou M, Balossier G, Frayssinet P, Bonhomme P. 2001. Effect of hydroxyapatite sintering temperature on intracellular ionic concentration of monocytes. *J. Biomed. Mater. Res.* 58: 238-246.
34. Ninomiya JT, Struve JA, Stelloh CT, Toth JM, Crosby KE. 2001. Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. *J. Orthop. Res.* 19: 621-628.

35. Zhi-dao X, Tong Z, Jing-yuan D, Qi-xing Z, Lan W, Shi-pu L, Chao-ying C, Shi-yuan F. 1994. Macrophages in degradation of collagen/hydroxylapatite (CHA), beta-tricalcium phosphate ceramic (TCP) artificial bone graft. *Chinese Med. J.* 107: 845-849.
36. Taş AC, Korkusuz F, Timuçin M, Akkaş N. 1997. An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite and tricalcium phosphate bioceramics. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 8: 91-96.
37. Ignatus AA, Schmidt C, Kaspar D, Claes LE. 2001. In vitro biocompatibility of resorbable experimental glass ceramics for bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.* 55: 285-294.
38. Guizzardi S, Montanari C, Migliaccio S, Stocchi R, Solmi R, Martini D, Ruggeri A. 2000. Quality assessment of natural apatite in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* 53: 227-234.
39. Midy V, Dard M, Hollande E. 2001. Evaluation of the effect of three calcium phosphate powders on osteoblast cells. *J. Mat. Sci. Mater. Med.* 259-265.
40. Mosheiff R, Klein BY, Leichter I, Chaimsky G, Nyska A, Peyser A, Segal D. 1992. Use of dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) to follow mineral content changes in small ceramic implants in rats. *Biomaterials.* 13: 462-466.
41. Korkusuz F, Karamete K, Irfanoğlu B, Yetkin H, Hastings, GW, Akkaş N. 1995. Do porous calcium hydroxyapatite ceramics cause porosis in bone? A bone densitometry and biomechanical study on cortical bones of rabbits. *Biomaterials.* 16: 537-543.
42. Parsons JR, Ricci JL, Alexander H, Bajpai PK. 1988. Osteoconductive composition grouts for orthopedic use. *Ann. NY. Acad. Sci.* 523: 190-207.
43. Jianguo Z, Xingdong Z, Müller-Mai C, Gross U. 1994. The early host and material response of hydroxyapatite/beta-tricalciumphosphate porous ceramic after implantation into the femur of rats. *J. Mat. Sci. Mater. Med.* 5: 243-251.
44. Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I. 1990. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif. Tissue. Int.* 46: 20-27.
45. deBruijn JD, vanBlitterswijk CA, Davies JE. 1995. Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* 29: 89-99.
46. Krajewski A, Ravaglioli A, Mongiorgi R, Moroni A. 1988. Mineralization and calcium fixation within a porous apatitic ceramic material after implantation in the femur rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* 22: 445-457.
47. deLange GL, dePutter C, deWijfs FLJA. 1990. Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite-bone interface. *J. Biomed. Mater. Res.* 24: 829-845.
48. Piattelli A, Trisi P. 1994. A light and laser scanning microscopy study of bone/hydroxyapatite-coated titanium implants interface. *J. Biomed. Mater. Res.* 28: 529-536.
49. Egli PS, Müller W, Schenk RK. 1988. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 232: 127-138.
50. Tampieri A, Celotti G, Spiro S, Delcogliano A, Franzese S. 2001. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. *Biomaterials.* 22: 1365-1370.
51. Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. 1996. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 32: 481-492.
52. Okamura A, Goto M, Goto T, Yoshinari M, Matsuko S, Katsuki T, Tanaka T. 201. Substrate effects to initial attachment and subsequent behaviour of human osteoblastic cells (Saon-2). *Biomaterials* 22: 2263-2271.
53. Daculsi G, Passuti N, Martin S, Deudon C, Legeros RZ, Raheer S. 1990. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *J. Biomed. Mater. Res.* 24: 379-396.
54. Ducheyne P, Qui Q. 1999. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials.* 20: 2287-2303.
55. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. 2001. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cells adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials.* 22: 87-96.
56. Yang Z, Yuan H, Tong W, Zou P, Chen W, Zhang X. 1996. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. *Biomaterials.* 17: 2131-2137.
57. Kudo M, Matsui Y, Ohno K, Michi K. 2001. A histomorphometric study of the tissue reaction around hydroxyapatite implants irradiated after placement. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 59: 293-300.
58. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. 1989. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. *Acta. Orthop. Scand.* 60: 334-339.
59. Okamura M, Ohgushi H, Tamai S. 1991. Bonding osteogenesis in coralline hydroxyapatite combined with bone marrow cells. *Biomaterials.* 12: 411-416.
60. Frayssinet P, Primout I, Rouquet N, Autefage A, Guilhem A, Bonneville P. 1991. Bone cell grafts in bioreactor. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 2: 217-221.
61. Sempuku T, Ohgushi H, Okumura M, Tamai S. 1996. Osteogenic potential of allogenic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J. Orthop. Res.* 14: 907-913.
62. Bareille R, Lafage-Proust MH, Fauchoux C, Laroche N, Wenz R, Dard M, Amedee J. 2000. Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site. *Biomaterials.* 21: 1345-1352.
63. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. 2000. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature. Biotech.* 18: 959-963.
64. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. 1991. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 269: 274-283.
65. Bagambisa FB, Joos U, Schilli W. 1990. Interaction of osteogenic cells with hydroxyapatite implant materials in vitro and in vivo. *Int. J. Maxillofac. Implants.* 5: 217-226.

66. Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, Liu HC, Hang YS, Lin FH. 1997. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 37: 324-334.
67. Mikos AG, McIntire LV, Anderson JM, Babensee JE. 1998. Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 33: 111-139.
68. Salih V, Georgiou G, Knowles JC, Olsen I. 2001. Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery. *Biomaterials.* 22: 2817-2824.
69. Wolfe LA, Boyde A. 1992. Biocompatibility tests on a novel glass-ceramic system. *J. Appl. Biomater.* 3: 217-224.
70. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H. 1999. Comparative bone ingrowth behaviour in granules of bioceramic materials of various sizes. *J. Biomed. Mater. Res.* 44: 31-43.
71. Sautier JM, Kokubo T, Ohtsuki T, Nefussi JR, Boulekbache H, Oboeuf M, Loty S, Loty C, Forest N. 1994. Bioactive glass-ceramic containing crystalline apatite and wollastonite initiates biomineralization in bone cell cultures. *Calcif. Tissue. Int.* 55: 458-466.
72. Brook IM, Hatton PV. 1998. Glass ionomers: bioactive implant materials. *Biomaterials.* 19: 565-571.
73. Bosetti M, Hench L, Cannas M. 2002. Interaction of bioactive glasses with peritoneal macrophages and monocytes in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 60: 79-85.
74. Gao TJ, Lindholm TS, Kommonen B, Ragni P, Paronzi A, Lindholm TC. 1995. Microscopic evaluation of bone-implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects. *Biomaterials.* 16: 1175-1179.
75. Glant TT, Jacobs JJ, Molnar G, Shanbhag AS, Valyon M, Galante JO. 1993. Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages. *J. Bone. Miner. Res.* 8: 1071-1079.
76. Vale FM, Castro M, Monteiro J, Couto FS, Pinto R, Gao-Toscano-Rico JM. 1997. Acrylic bone cement induces the production of free radicals by cultured human fibroblasts. *Biomaterials.* 18: 1133-1135.
77. Gough JE, Downes S. 2001. Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.* 57: 497-505.
78. Ohsawa K, Neo M, Matsuoka H, Akiyama H, Ito H, Nakamura T. 2001. Tissue response around polymethylmethacrylate particles implanted into bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 54: 501-508.
79. Lazarus MD, Cuckler JM, Schumacher HR, Ducheyne P, Baker DG. 1994. Comparison of the inflammatory response to particulate polymethylmethacrylate debris with and without barium sulfate. *J. Orthop. Res.* 12: 532-541.
80. Deb S, Silvio LD, Vazquez B, San Roman J. 1999. Water absorption characteristics and cytotoxic and biological evaluation of bone cements formulated with a novel activator. *J. Biomed. Mater. Res.* 48: 719-725.
81. Dalby MJ, diSilvio L, Harper EJ, Bonfield W. 2001. Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(methacrylate) cement. *Biomaterials.* 22: 1739-1747.
82. Şerbetçi K, Korkusuz F, Hasırcı N. 2000. Mechanical and thermal properties of hydroxyapatite-impregnated bone cement. *Turk. J. Med. Sci.* 30: 543-549.
83. Yap AU, Pek YS, Kumar RA, Cheang P, Khor KA. 2002. Experimental studies on a new bioactive material: HA Inomer cements. *Biomaterials.* 23: 955-962.
84. Şerbetçi K. 2001. Formulation and biomechanical evaluation of bone cements. PhD Thesis, Middle East Technical University.
85. Şerbetçi K, Orhun S, Korkusuz F, Hasırcı N. 2002. In vivo biocompatibility of hydroxyapatite containing bone cement. *Arthroplasty. Arthroscopic. Surgery.* 13: 259-263.
86. Saito M, Maruoka A, Mori T, Sugano N, Hino K. 1994. Experimental studies on a new bioactive bone cement: hydroxyapatite composite resin. *Biomaterials.* 15: 156-160.
87. Sarkar MR, Wachter N, Patka P, Kinzl L. 2001. First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 58: 329-334.
88. Stelnicki EJ, Ousternout DK. 1997. Hydroxyapatite paste used as an onlay implant for supraorbital and malar augmentation. *J. Craniofac. Surg.* 8: 367-372.
89. Ginebra MP, Fernandez E, deMaeyer EA, Verbeeck RM, Boltong MG, Ginebra J, Driessens FC, Planell JA. 1997. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *J. Dent. Res.* 76: 905-912.
90. Grimandi, G., Weiss, P, Millot, F and Daculsi, G., 1998. In vitro evaluation of a new injectable calcium phosphate material. *J. Biomed. Mater. Res.* 39:660-666.
91. Gauthier O, Goyenvallé E, Bouler JM, Guicheux J, Pilet P, Weiss P, Daculsi G. 2001. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramic versus injectable bone substitute. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 12: 385-390.
92. Simon CG, Khatri CA, Wight SA, Wang FW. 2002. Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft considering of calcium phosphate cement and poly (lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Orthop. Res.* 20: 473-482.
93. Fujishiro Y, Takahashi K, Sato T. 2001. Preparation and compressive strength of alpha-tricalcium phosphate/gelatin gel composite cement. *J. Biomed. Mater. Res.* 54: 525-530.
94. Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Toh T, Yuasa T, Nagayama M, Suzuki K. 1998. Basic properties of calcium phosphate cement containing atelocollagen in its liquid or powder phase. *Biomaterials.* 19: 707-715.
95. Yokoyama A, Yamamoto S, Kawasaki T, Kohgo T, Nakasu M. 2002. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials. *Biomaterials.* 23: 1091-1101.
96. Blom EJ, Klein-Nulend J, Klein CP, Kurashina K, vanWass, MA, Burger EH. 2000. Transforming growth factor-beta1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 50: 67-74.
97. Pioletti DP, Takei H, Lin T, vanLanduyt P, Ma QJ, Kwon SY, Sung KL. 2000. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function. *Biomaterials.* 21: 1103-1114.
98. Hasırcı V, Lewandrowski K, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DJ. 2001. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. *J. Biotech.* 86: 135-150.

99. Deschamps AA, Claase MB, Sleijster WJ, deBruijn JD, Grijpma DW, Feijen J. 2002. Design of segmented poly(ether ester) materials and structures for the tissue engineering of bone. *J. Control. Release.* 78: 175-186.
100. Heath DJ, Christian P, Griffin M. 2002. Involvement of tissue transglutaminase in the stabilization of biomaterial/tissue interfaces important in medical devices. *Biomaterials.* 23: 1519-1526.
101. Böstman, O, Pihlajmaki H. 2000. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation. *Biomaterials.* 21: 2615-2621.
102. Korkusuz F, Korkusuz P, Ekşioglu F, Gürsel I, Hasirci V. 2001. In vivo response to biodegradable controlled antibiotic release systems. *J. Biomed. Mater. Res.* 55: 217-228.
103. Nordstorm P, Pihlajamaki H, Toivonen T, Tormala P, Rokkanen P. 2001. Tissue response to polyglycolide and polylevulactide pins in osteotomized cancellous bone. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 382: 247-257.
104. Ignatus AA, Betz O, Augat P, Claes LE. 2001. In vivo investigation on composites made of resorbable ceramics and poly (lactide) used as bone graft substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.* 58: 701-709.
105. Tegnander A, Engebretsen L, Bergh K, Eide E, Holen KJ, Iversen OJ. 1995. Activation of the complement system and adverse effects of biodegradable pins of polylactic acid in osteochondritis dissecans. *Acta. Orthop. Scand.* 66: 573-574.
106. Koskikare K, Toivonen T, Rokkanen P. 1998. Tissue response to bioabsorbable self-reinforced polylevulactide and polyglycolide pins implanted intra-articularly and directly into the bone on different levels. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* 118: 149-155.
107. Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, Grönblad M, Partio E, Kemppinen P, Rokkanen P. 1990. Immune response to polyglycolic acid implants. *J. Bone. Joint. Surg.* 72-B: 597-600.
108. Wake MC, Gerecht PD, Lu L, Mikos AG, 1998. Effects of biodegradable polymer particles on rat marrow-derived stromal osteoblasts in vitro. *Biomaterials.* 19: 1255-1268.
109. Burkhart SS. 2000. The evolution of clinical applications of biodegradable implants in arthroscopic surgery. *Biomaterials.* 21: 2631-2634.
110. Böstman O, Pihlajmaki H. 2000. Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 371: 216-227.
111. Girard B, Baker G, Mock D. 2000. Foreign body granuloma following placement of hard tissue replacement material. A case report *J. Periodont.* 71: 517-520.
112. Miketa JP, Prigoff MM. 1994. Foreign body reactions to absorbable implant fixation of ostetomies. *J. Foot. Ankle. Surg.* 33: 623-627.
113. Casteleyn PP, Handelberg F, Haentjens P. 1992. Biodegradable rods versus kirschner wire fixation of wrist fractures. *J. Bone. Joint. Surg.* 74-B: 858-861.
114. Bucholz RW, Henry S, Henley MB. 1994. Fixation with bioabsorbable screws for the treatment of fractures of the ankle. *J. Bone. Joint. Surg.* 76-A: 319-324.
115. Ahl T, Dalen N, Lundberg A, Wykman A. 1994. Biodegradable fixation of ankle fractures. *Acta. Orthop. Scand.* 65: 166-170.
116. vander Elst M, Klein CPAT, de Blicke-Hogervorst JM, Patka P, Haarman HJTM. 1999. Bone tissue response to biodegradable polymers used for intra medullary fracture fixation: a long term in vivo study in sheep femora. *Biomaterials.* 20: 121-128.
117. Calvert JW, Marra KG, Cook L, Kumta PN, diMilla PA, Weiss LE. 2000. Characterization of osteoblast-like behaviour of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 52: 279-284.
118. Korkusuz F, Korkusuz P, Ekşioglu F, Gürsel I, Hasirci V. 1999. In vivo response to biodegradable controlled antibiotic release systems. *J. Biomed. Mater. Res.* 55: 217-228.
119. Yaylaoğlu MB, Korkusuz P, Örs Ü, Korkusuz F, Hasirci V. 1999. Development of a calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release. *Biomaterials.* 20: 711-719.
120. Lewandrowski KU, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DJ. 2000. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *Biomaterials.* 21: 757-764.
121. Lewandrowski KU, Gresser JD, Wise DL, Trantolo DJ, Hasirci V. 2000. Tissue response to molecularly reinforced polylactide-co-glycolide implants. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11: 401-414.
122. Andriano KP, Chandrashekar B, McEnery K, Dunn RL, Moyer K, Balliu CM, Holland KM, Garrett S, Huffer WE. 2000. Preliminary in vivo studies on the osteogenic potential of bone morphogenic proteins delivered from an absorbable putty-like polymer matrix. *J. Biomed. Mater. Res.* 53: 36-43.
123. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. 1996. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials.* 17: 93-102.
124. Gogolewski S. 2000. Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury.* 31: S-D28-32.
125. Rokkanen PU, Böstman O, Hirvensalo E, Antero-Makela E, Partio EK, Patiala H, Vainionpaa S, Vihtonen K, Tormala P. 2000. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials.* 21: 2607-2613.
126. An YH, Woolf SK, Friedman RJ. 2000. Pre-clinical evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials.* 21: 2635-2652.
127. Daculsi G, Weiss P, Bouler JM, Gauthier O, Millot F, Aguado E. 1999. Biphasic calcium phosphate/hydrolysoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials. *Bone.* 25: 59S-61S.
128. Rizzi SC, Heath DJ, Coombes AG, Bock N, Textor M, Downes S. 2001. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 55: 475-486.
129. Linhart W, Peters F, Lehman W, Schwartz K, Shilling AF, Amling M, Rueger JM, Epple M. 2001. Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 54: 162-171.
130. Zhang K, Ma Y, Francis LF. 2002. Porous polymer/bioactive glass composites for soft-to-hard tissue interfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 61: 551-563.



131. Matsumoto M, Chosa E, Nabeshima K, Shikinami Y, Tajima N. 2002. Influence of bioabsorbable, unsintered hydroxyapatite/poly-L-lactide composite films on spinal cord, nerve root and epidural space. *J. Biomed. Mater. Res.* 60: 101-109.
132. Laurencin CT, Attawia MA, Lu LQ, Borden MD, Lu HH, Gorum WJ, Lieberman JR. 2001. Poly (lactide-co-glycolide) /hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells. A regional gene therapy approach to bone regeneration. *Biomaterials.* 32: 1271-1277.
133. Şenköylü A, Ural E, Kesenci K, Şimşek A, Ruacan Ş, Fambri L, Migliaresi C, Pişkin E. 2002. Poly (D, L-lactide/*ε*-caprolactone) /hydroxyapatite composites as bone filler: An in vivo study in rats. *Int J Artif Organs.* 25 (12): 1174-1179.
134. Laurencin CT, Attawia MA, Elgendry HE, Herbert KM. 1996. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices. *Bone.* 19: 93S-99S.
135. Schliephake H, Kage, T. 2001. Enhancement of bone regeneration using resorbable ceramics and a polymer-ceramic composite material. *J. Bone. Miner. Res.* 56: 128-136.
136. Niklason LE. 2000. Engineering of bone grafts. *Nature. Biotechnology.* 18: 929-930.
137. Ripamonti U, Tasker JR. 2000. Advances in biotechnology for tissue engineering of bone. *Curr. Pharma. Biotech.* 1: 47-55.