



TIPTEKNO'17

TIP TEKNOLOJİLERİ KONGRESİ

12-14 Ekim 2017 / TRABZON

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Prof.Dr. Osman Turan Kongre Merkezi



Biyomedikal ve Klinik
Mühendisliği Derneği



Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü

Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

Kontrol Edilebilir Porozite ve Mekanik Özelliklere Sahip β -TCP Blok Greftlerin Geliştirilmesi

Development of β -TCP Block Grafts with Tunable Porosity and Mechanical Properties

Emine Afra Demirci¹, Metehan Atagür^{1,2}, Ozan Karaman^{1,2*}

¹Bonegraft Biyolojik Malzemeler Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Ege Üniversitesi Sit İdege Teknoloji Geliştirme Bölgesi A.Ş. İzmir, Türkiye

²Mühendislik Fakültesi, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi İzmir, Türkiye

a.demirci@bonegraft.com.tr

Özetçe— Kemik doku mühendisliği alanında, yüksek mekanik dayanıma sahip, osteoprogenitör hücrelerin osteojenik farklılaşmasını indükleyici ve mikro ölçekte kompakt kemiğin yapısına biyobenzer kemik ikamelerinin üretim gereksinimi günümüzde halen devam etmektedir. Bu çalışma kapsamında, porluluk, radyopaklık ve mekanik özellikleri kontrol edilebilen çubuk, blok ve silindirik şekilde beta trikalsiyum fosfat (β -TCP) tabanlı sentetik kemik greftlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler — Biyomedikal mühendisliği, Kemik doku mühendisliği, Sentetik Kemik Greftleri, β -TCP

Abstract—In the scope of bone tissue engineering, there has still been great amount of demand on synthetic bone graft that induces differentiation of osteoprogenitor cells by cell-matrix interaction at the nanoscale as well as mimicking micro assembly of compact bone while providing high mechanical strength. In this study, we aimed to develop synthetic bone grafts based on beta-tricalcium phosphate (β -TCP) in the form of rod, block and cylinder with tunable porosity, radiopaque and mechanical properties.

Keywords — Biomedical engineering, Bone tissue engineering, Synthetic Bone Grafts, β -TCP

I. GİRİŞ

Günümüzde hasarlı sert dokunun onarımı için doku nakli uygulamaları kemik kanseri, iskelet travması ve enfeksiyona bağlı kemik kayıpları, kemik kırıkları ve doğuştan yüz ve kafatası kemiklerdeki biçimsel bozuklukların tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ototreftler altın standartlara sahip olmasına rağmen doku alınan bölgede meydana gelen hasar ve sınırlı greft bulunabilirliği [1], allogreftlerde ise immün sistem yanıtı oluşma riski gibi sınırlayıcı faktörlerden dolayı [2] doku mühendisliği teknikleriyle üretilen sentetik kemik greftlerine olan ilgi her geçen gün artmaktadır. β -

triskalsiyum fosfat (β -TCP), hidroksiapatit (HA) ve kalsiyum sülfat dahil olmak üzere birçok biyoseramik materyal yaygın olarak kemik ikame maddeleri hem blok hemde granül formunda kullanılmaktadır. Granül formlar periodontal kemik defektlerinde kullanılırken, blok formları oral ve maksillofasiyal cerrahide daha çok tercih edilmektedir [3-5].

Hidroksiapatitin doku uyumu ve yüksek kemiğe bağlanma kabiliyeti olmasına rağmen uzun süren biyolojik parçalanımı yeni kemik oluşum oranına kıyasla nispeten yavaş kalmaktadır. Pek çok uygulamada HA iyi klinik sonuçlar vermesine karşın bazı komplikasyonlar da bildirilmiştir [6]. Çalışmalarda vücut içinde neredeyse hiç emilim göstermediği ve uzun süre yabancı madde olarak kaldığı belirtilmiştir. Öte yandan biyouyumlu diğer seramik olan β -tri kalsiyum fosfatın (β -TCP) HA'ya göre daha yüksek degradasyon hızı vardır. Yüksek osteokompatibiliteye ve mekanik dayanıma sahip olması nedeniyle β -TCP son yıllarda en çok tercih edilen greft malzemesi olmuştur [7].

β -TCP tabanlı kemik greftlerinin dental, maksillofasiyal ve ortopedik cerrahide en yaygın kullanılan formu granül formu olmasına rağmen özellikle oral ve maksillofasiyal cerrahisinde sinüs yükseltme ve alveolar kret augmentasyonunda ve ortopedi cerrahisinde epifizik defektlerin doldurulması, anterior intersomatik füzyon ve tibia plağın sıkıştırılması sırasında epifizik kemik boşluklarının doldurulması işlemlerinde farklı boyutlarda blok, çubuk ve silindirik kemik greftlerinin uzun dönem kemik yenilenmesini daha etkin gerçekleştirdiği raporlanmıştır[8-9].

Bu çalışma kapsamında ülkemizde üretimi yapılmayan, geliştirilen üretim yöntemiyle porluluk, radyopaklık ve mekanik özellikleri kontrol edilebilen β -TCP tabanlı çubuk kemik greftlerinin prototip çalışmaları yapılmıştır.

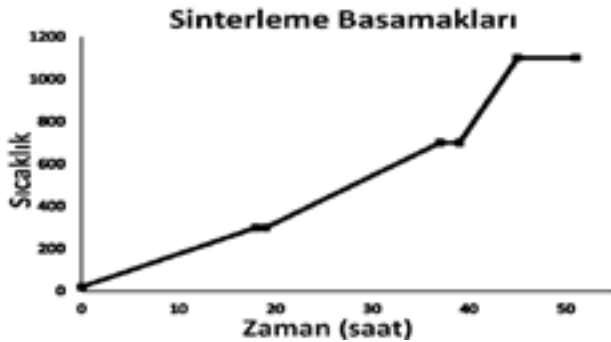
Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

II. MATERYAL VE YÖNTEM

β -TCP sentezi kimyasal çöktürme yöntemi ile yapılmıştır. Kalsiyum/Fosfat (Ca/P) 1.5 olacak şekilde 0.2 M Diamonyum Fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) ve Kalsiyum Nitrat Tetrahidrat çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Amonyum çözeltisi üzerine kalsiyum çözeltisi damla damla konulmuştur ve Amonyum Hidroksik kullanılarak pH=8'e eşitlenmiştir. Süzme ve kurutuma işlemi sonrası tozlar 5°C/dk ısıtma hızıyla 12 saat boyunca sinterlenmiştir.

Blok greft yapımı için por yapıcı ajan olarak polietilen seramik bağlayıcı ajan olarak polivinil alkol çözeltisi (%10 w/v) kullanılmıştır. %50 (w/w) por yapıcı ajan konsantrasyonları kullanılmıştır. Öncelikle belirtilen miktarlarda β -TCP ve polietilen tozları katı formda karıştırılmıştır. Daha sonra %10'luk PVA solüsyonu %50 w/v oranında karışıma eklenmiştir. Özel karıştırıcı kullanılarak eklenen malzemeler homojen seramik hamur şeklini Alana kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan seramik hamurlar Teflon kalıpları içine yerleştirilerek manuel pres ile sıkıştırılmış ve seramik moleküllerinin birbiri ile teması sağlanmıştır. Kalıplardan çıkarılan hamurlar 60°C'de 3 saat etüvde kurutulmuştur. Kurutulan blokların sinterlenmesi için şekil 1 de gösterilen basamaklar kullanılmıştır.



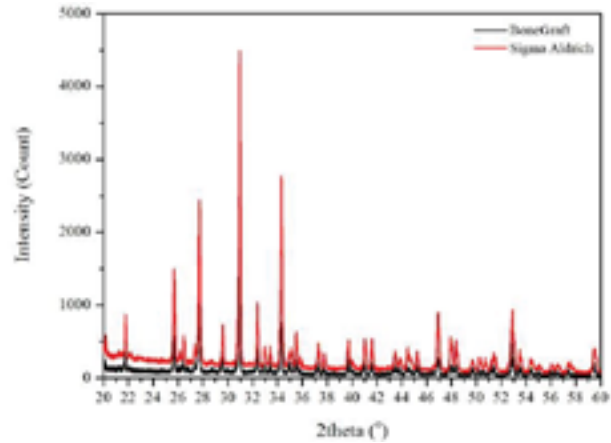
Şekil 1. β -TCP tozlarının sinterleme basamakları.

Sentezlenen β -TCP tozlarının kristalografik yapıları X Ray Difraktometre (XRD)(Panalytical Empyrean) analizi yapılarak belirlenmiştir. Veriler 10°C-60°C 2 θ açılı aralığında toplanarak değerlendirilmiştir. Hazırlanan blok greftlerin üç boyutlu (3D) karakterizasyonu için, tüm bloklar μ -CT görüntüleme cihazı (Scanco Medical AG, Bassersdorf, İsviçre) kullanılarak tarandı ve analizler gerçekleştirildi. Ölçümler 3 boyutlu görüntü dizilerinde 30 mm izotropik voksel boyutunda saklandı. Sinterlenmiş olan greftlerin yüzey morfolojileri, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) (Carl Zeiss 300VP, Almanya) kullanılarak incelenmiştir. Mekanik dayanımın belirlenmesi için tek eksenli basma testleri, paralel yüzümlü numuneler ile Shimadzu AG-IS10kN (Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) test makinası ile gerçekleştirilmiştir. Testler oda koşullarında baskı yüzeyine dik bir şekilde, 1 mm/dk çene hızıyla yapılmıştır. Test mekanik değerlerin

tutarlılığını sağlama amacıyla 6 adet numunede tekrarlanmıştır. Standart sapmalar göz önüne alındığında maximum ve minimum değerlerin dışında kalan test numuneleri ihmal edilmiştir.

III. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sentezlenen β -TCP tozlarının XRD grafikleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Fazların maksimum pik yaptığı 2 θ değerleri JCPDS (Toz Kırınım Standartları Ortak Komitesi) veri tabanı ile eşleştirilerek tanımlanmıştır. BoneGraft markalı ürünün XRD dataları incelendiğinde maksimum pik dereceleri sırasıyla 27,77 (214), 31,03 (210), 34,37 (220) olan JCPDS 090169 kart numarasına sahip whitlockite ile uyumlu olduğu görülmüştür. B-TCP ve whitlockite benzer XRD profillerine sahip olduğu için [1,2] veriler, % 100 kristalin β -TCP'den elde edilen bir ticari ürünle karşılaştırılmıştır. (üretici açıklamasına göre \geq % 98 beta faz bazında, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, ABD). Sigma Aldrich ve BoneGraft markalı numunelerin XRD grafikleri detaylı olarak incelendiğinde piklerin kusursuz bir şekilde uyumlu olduğu görülmektedir.

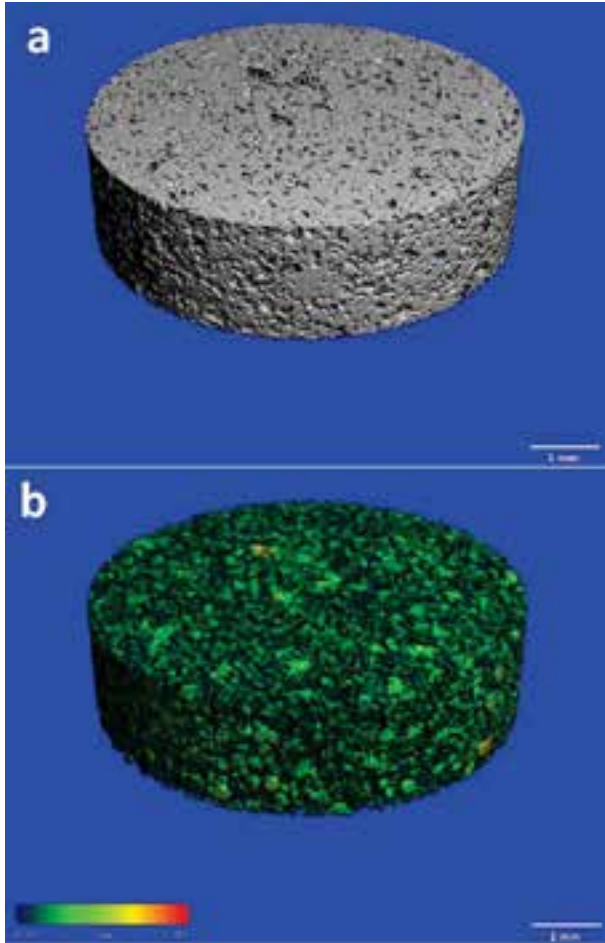


Şekil 2. Bonegraft bünyesinde üretilen ve ticari olarak satılan β -TCP tozlarına ait XRD grafiği

Yapılan μ -CT analizi sonucunda üretilen blok greftlerin yaklaşık olarak %52 porluluğa sahip olduğu ve por çapları ortalamasının 63.5 μ m (SD \pm 2.7) olduğu raporlanmıştır. Üç boyutlu (3B) analiz sonucunda 5-200 μ m arasında porların homojen bir şekilde bulunduğu Şekil 2 de açıkça görülmektedir.

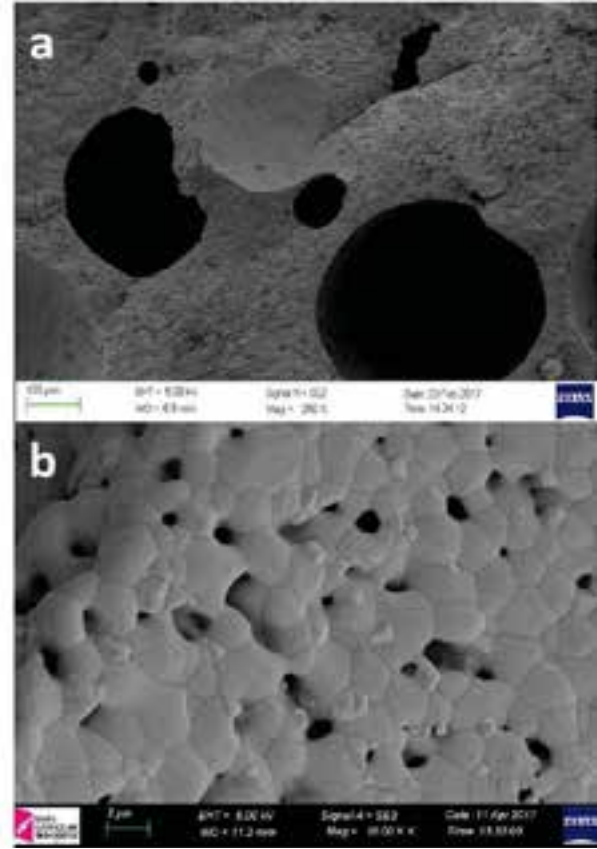
Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B



Şekil 3. (A) Blok greftlerin 3 boyutlu µ-CT analizi, (B) µ-CT analizi sonucu por dağılımları.

Şekil 3'teki SEM görüntüler incelendiğinde numunenin gözenekli bir yapıya sahip olduğu ve bu yapının numune geneline yayılmış olduğu µ-CT analizi ile birlikte desteklenmiştir. Ayrıca yine görüntülerden, büyük gözenek yapılarının yanında daha küçük ve birbirleri ile bağlantıya sahip olan göreceli daha küçük gözenek yapılarının varlığı açıkça görülmektedir. Hücre tutunması ve gelişimi göz önünde bulundurulduğunda, yapının gözenekli olmasının ve birbirlerine temas halinde gözeneklerinin bulunmasının hücre tutunmasının ve gelişimini arttırdığı literatürde yapılan çalışmalarda açıkça dile getirilmiştir [2].



Şekil 4. (A) (B) Üretilen greftlerin SEM görüntüleri

Üretilen blok greftlere ait basma deneyi sonucunda elde edilen veriler Tablo 1'de gösterilmektedir. Tablo 1'deki veriler incelendiğinde gözenekli yapıdaki blok greftlerin ortalama mukavemet ve modül değerlerinin literatürde yapılan çalışmalarda elde edilen veriler ile uyumluluk göstermektedir. Tablo 2'den de görüleceği üzere doğal süngerimsi kemiğin basma mukavemeti değeri 1,9 MPa civarındadır. Analizi yapılan ürünün mukavemet değerinin ($3,08 \pm 0,15$ MPa) bu değer üzerinde olduğu ve gözenekli yapısının yanında mekanik özellikler açısından da doğal süngerimsi kemiğin özelliklerini karşılayabildiği görülmektedir [10].

Numune	Basma Mukavemeti (MPa)
β-TCP	3,27
	2,90
	3,09
ORTALAMA	3,08±0,15

Tablo 1. Bonegraft bünyesinde üretilen greftlerin basma testi sonuçları



Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

Malzeme	Basma Mukavemeti (MPa)
Trabeküler Kemik	150
Süngerimsi Kemik	1,9
Hidroksiapatit (HA) Yoğun	350-450
Hidroksiapatit (HA) Gözenekli (%40)	60-120
Hidroksiapatit (HA) (%80)	0,5-5
Trikalsiyum Fosfat (TCP) Yoğun	120
Trikalsiyum Fosfat (TCP) Gözenekli (%50)	13

Tablo 2. Doğal kemiğin ve bazı kalsiyum fosfat tabanlı malzemelerin basma mukavemeti değerleri

Çalışmanın bir sonraki basamağında üretilen Blok Greftlerin in-vitro degradasyon, sitotoksosite ve genotoksosite testlerinin yapılması planlanmaktadır. Ayrıca farklı oranlarda PE içeren greftlerin porluluk ve mekanik özelliklerinin karakterizasyonları ve ISO 5833 standartlarına uygun mekanik özelliklere sahip ve ulaşılabilecek en yüksek porlulukta blok kemik greftlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarımız devam etmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Laurencin, C.T., M. Attawia, and M.D. Borden, Advancements in tissue engineered bone substitutes. Current Opinion in Orthopaedics, 1999. 10(6): p. 445-451.
- [2] Zhang, X., Preparation and characterization of calcium phosphate ceramics and composites as bone substitutes. 2007: University of California, San Diego.
- [3] Boyne, P.J., Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties. The Journal of the American Dental Association, 1969. 78(4): p. 767-776.
- [4] MURAI, M., et al., Effects of different sizes of β -tricalcium phosphate particles on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. Dental materials journal, 2006. 25(1): p. 87-96.
- [5] Yamada, Y., K. Nanba, and K. Ito, Effects of occlusiveness of a titanium cap on bone generation beyond the skeletal envelope in the rabbit calvarium. Clinical oral implants research, 2003. 14(4): p. 455-463.
- [6] Uemura, T., et al., Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. Biomaterials, 2003. 24(13): p. 2277-2286.
- [7] Zhang, X., et al., Restoration of critical-sized defects in the rabbit mandible using autologous bone marrow stromal cells hybridized with nano- β -tricalcium phosphate/collagen scaffolds. Journal of Nanomaterials, 2013. 2013: p. 15.
- [8] Jackson, I.T., G. Helden, and R. Marx, Skull bone grafts in maxillofacial and craniofacial surgery. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1986. 44(12): p. 949-955.

- [9] Kent, J.N., et al., Hydroxylapatite alveolar ridge reconstruction: clinical experiences, complications, and technical modifications. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1986. 44(1): p. 37-49.
- [10] Thompson I, Hench L. Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine. 1998;212(2):127-36.