



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 1

13 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon A

Enjekte Edilebilir Kemik Greftlerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu Development and Characterization of Injectable Bone Substitutes

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

¹ Bonegraft Biyolojik Malzemeler Sanayi ve Ticaret A.Ş.

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

² Mühendislik Fakültesi, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi İzmir, Türkiye

a.demirci@bonegraft.com.tr

Özetçe— Yakın geçmişte ilk enjekte edilebilir kemik greftlerinin kullanıma sunulmasının ardından son yıllarda ticari ürünlerin sayısında çarpıcı bir artış meydana gelmiştir. Yüksek su tutma özelliğindeki hidrojel ile kalsiyum fosfat tabanlı seramik kompozitleri olarak geliştirilen enjekte edilebilir kemik ikameleri özellikle ortopedi ve maksillofasial uygulamalarda popülerlik kazanmıştır. Enjekte edilebilir kemik greftleri, kemik dokusunu destekler, implantasyondan sonra sağlıklı doku tarafından emilerek, kemik dokusunda yenilenmeyi sağlar. Bu çalışma kapsamında cerrahi uygulama sırasında karıştırma gerektirmeyen sentetik enjekte edilebilir kemik greftlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler — Biyomedikal mühendisliği; Kemik doku mühendisliği; Enjekte Edilebilir Kemik Greftleri; Hidrojel; β -TCP

Abstract— In the late years, a dramatic increase in the number of commercial products has emerged in recent introduction of first injectable bone grafts. Bone substitutes developed as highly water retained hydrogel structures and calcium phosphate based ceramic composites have gained popularity especially in orthopedics and maxillofacial applications. These injectable bone grafts support bone tissue, which is absorbed by healthy tissue after implantation, allowing bone tissue regeneration. The aim of this study was to develop synthetic injectable bone grafts that do not require mixing during surgical application.

Keywords — Biomedical engineering; Bone tissue engineering; Injectable Bone Graft; Hydrogel; β -TCP

I. GİRİŞ

Artan nüfus yaşlanmasından ötürü, osteoporoz giderek artan oranda kemik kırığına yol açan yaygın bir tıbbi problem haline gelmektedir [1]. Mevcut ortopedik implant malzemelerinin önemli bir dezavantajı, sinterlenmiş katı ve sert formda olmalarıdır. Bu durum cerrahın uygulama sırasında cerrahi alanda greft malzemesinin istenilen şekilde

getirmesini güçleştirmektedir. Dolayısıyla oluşan kemik kaybı, sağlıklı çevre dokularda travma ve cerrahi sürenin uzaması gibi olumsuzluklara neden olmaktadır [2,3]. Minimal invaziv cerrahi yöntemlerin geliştirilmesi ile doğrudan enjekte edilebilir biyomalzemelere ihtiyaç duyulmaktadır. İdeal sentetik kemik greftleri enjekte edilebilir, elle şekil verilebilir olmalıdır ve vücut sıvıları ve hücreler tarafından bozunurken, kemik tutunmasını ve yeni kemik oluşumunu desteklemelidir [4,5].

Son zamanlarda, enjekte edilebilir kalsiyum fosfat tabanlı greftler, kemiğin mineral fazı ile benzerliği ve in-situ mineralizasyonu desteklemesinden dolayı umut vaat edici kemik greftleri olarak kabul edilmektedir [6]. Kalsiyum fosfat tabanlı kemik greftleri toksik etki göstermez, biyolojik olarak uyumludur, vücut içinde reaksiyonu tetiklemez ve en önemlisi biyoaktif davranış sergileyerek sağlıklı kemiğin yeniden şekillendirilmesine ve entegre olmasına yardımcı olur. Kalsiyum Fosfatların en önemli kısıtlayıcı özelliklerinden biri ise kırılma yapısı ve zayıf mekanik mukavemetinin olmasıdır bu da granül ve blok formdaki greftlerin uygulama alanını daraltan önemli bir etkidir [7-8].

Mevcut kısıtlamaların önüne geçilmesi adına kalsiyum fosfat tabanlı greftlere taşıyıcı ajan olarak polimerik katkı malzemeleri, amino salisilik asit, fosforile kitosan kullanımı yaygın araştırma konusudur. Bunların arasında en umut vaat edici ajan hidrojel yapısına sahip olan sentetik polimerlerdir. Polimer seramik kompoziti macun olarak kemik defekti içine verilerek boşluğun tam doldurulmasına olanak sağlar. Bu şekilde, blokların veya granüllerin pratik dezavantajlarının çoğunun üstesinden gelinebilir [9-11].

Bu çalışma kapsamında cerrahi uygulama sırasında ekstra karıştırma gerektirmeyen β -TCP-Hidrojel tabanlı kemik greftlerinin prototip çalışmaları yapılmıştır.



Biyomalzeme 1

13 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon A

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.

Hidrojel yapısının elde edilmesi için selüloz tabanlı polimer kullanılmıştır. %2'lik viskoz polimer çözeltisi elde edildikten sonra belirli oranda β -TCP tozu ile özel bir karıştırıcıda karıştırılmış ve macun kıvamı elde edilmiştir. Elde edilen macun enjektörlere doldurulmuş ve buhar ile sterilite edilmiştir.

Jellerinin viskozitesi 22 °C'de bir Vibro Viskometre (SV 100, A & D Company, Ltd, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler, viskozite değerleri sabitlenene kadar kaydedilmiştir.

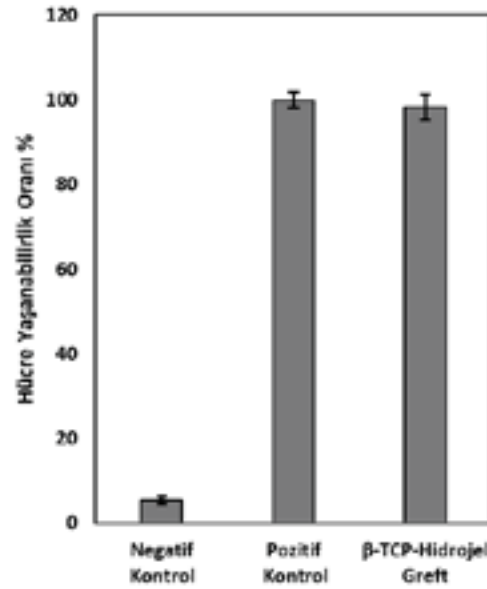
Üretilen enjekte edilebilir kemik greftlerinin biyolojik etkisi ISO 10993-5 Standardına uygun olarak test edilmiştir. Test numunesinin biyolojik etkisi L929 fare fibroblast hücre kültüründe numune ekstratı kullanılarak değerlendirilmiştir. Ekstrat Çözgeni olarak Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich), ve %10 Fötal Sığır Serum (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco, Grand Island, US) katkıları kullanılmıştır. Monolayer hücre tabakasının üzerine numune ekstratı, pozitif ve negatif kontrol eklendikten sonra 37°C, %5 CO2 içeren ortamda 24 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak toksik etkiye sahip Lateks, negatif kontrol olarak toksik etkisi bulunmayan Yüksek Yoğunluklu Polietilen (HDPE) kullanılmıştır. Daha sonra kuyulara %10 MTT (Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit -Invitrogen) içeren MEM eklenerek 3 saat inkübe edildi ve süre sonunda kuyulardaki besi ortamı DMSO ile değiştirilerek homojen dağılması için çalkalıcıda 5 dakika bekletildi. Biyolojik etki 570 nm dalgaboyunda spektrofotometrede (Synergy™ HTX, BioTek, Winooski, VT, USA) değerlendirildi. Yaşanabilirlik hesaplanarak ürünün hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirildi.

Genotoksiste analizi için in vitro mikronükleus analizi, 3 sağlıklı, genç, sigara kullanmayan vericilerinden elde edilen periferik kan lenfositleri ile gerçekleştirildi. Kan hücreleri, 20 ug / mL PHA (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) ile desteklenmiş hücre kültürü ortamı ile 37 ° C ve % 5 CO2 içeren ortamda kültüre edildi. 24 saat sonunda hücre kültürü ortamı uzaklaştırılarak hücreler 48 saat boyunca 5 mL numune ekstratı, pozitif ve negatif kontrol içeren ortamda inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Mitomisin C, Negatif Kontrol olarak Taze besi ortamı kullanılmıştır. Kültür süresinin 44. saatinde kültür

tüplerine 6 µg / mL sitokalazin B (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) eklenmesi yapılmıştır. 72 saat sonunda hücreler mikroskop lamalarına sabitlenerek Giemsa boyaması yapılmıştır. Mikronükleus sayısı, 1000 hücre / slaytta mikroskopik olarak analiz edilmiştir.

III. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

β -TCP-Hidrojel tabanlı elle şekil verilebilir macun kıvamındaki greftlerin buhar sterilizasyon öncesi viskozite değeri 83.9 ± 2.4 mPas olarak kaydedilmiştir. Sterilizasyon sonrası değerleri 81.4 mPa s (± 1.9) olarak kaydedilmiştir. Bu değerler doğrultusunda buharlı sterilizasyonun hidrojinin yapısında değişiklik meydana getirmediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 1. Sitotoksiste Testi Sonuçları

Şekil 1'de görülen sitotoksiste testi sonuçlarında Pozitif Kontrol 100 olarak alındığında, hücre üzerinde toksik etki beklenen negatif kontrolde yaşanabilirlik oranı %5 olarak görünürken üretilen enjekte edilebilir greftlerde bu oran %98 civarlarındadır. Üretilen greft malzemelerin sitotoksik etkisi olmadığı ve hücre ölümüne yol açmadığı belirlenmiştir.

Genotoksiste analizinde hücredeki genetik materyaldeki hasarın belirlenmesi için mikronükleus testi yapılmıştır. Genetik hasarın oluşması durumunda tam çekirdek bölünmesi gerçekleşmemekte ve hücre çekirdeğinin yanında mikronükleusların varlığında saptanmaktadır. Tablo 1'de gösterilen sonuçlarda üretilen greftlerin mikronükleus yüzdesi istenilen aralıkta olduğu (>5) görülmektedir. Bunun sonucunda malzemenin genotoksik etkisi olmadığı görülmüştür.



Biyomalzeme 1

13 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon A

Detaylar	Mikronükleus Yüzdesi
Enjekte Edilebilir Kemik Grefti	4.2%
Negatif Kontrol	2.3%
Pozitif Kontrol	36%

Tablo 1. Genotoksisite Testi Sonuçları

Çalışmanın bir sonraki basamağında üretilen Enjekte edilebilir β -TCP-Hidrojel tabanlı kemik greftlerinin degradasyon testinin yanı sıra in-vivo testlerine de başlanması hedeflenmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Bohner, M., et al., Theoretical and experimental model to describe the injection of a polymethylmethacrylate cement into a porous structure. *Biomaterials*, 2003. 24(16): p. 2721-2730.
- [2] Daculsi, G., Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials*, 1998. 19(16): p. 1473-1478.
- [3] Lewis, G., Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: State-of-the-art review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2006. 76(2): p. 456-468.
- [4] Heary, R.F., et al., Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. *Neurosurgery*, 2002. 50(3): p. 510-517.
- [5] Tomford, W.W., Bone allografts: past, present and future. *Cell and tissue banking*, 2000. 1(2): p. 105-109.
- [6] Bohner, M., U. Gbureck, and J. Barralet, Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials*, 2005. 26(33): p. 6423-6429.
- [7] Friedman, C.D., et al., Hydroxyapatite cement: II. Obliteration and reconstruction of the cat frontal sinus. *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*, 1991. 117(4): p. 385-389.
- [8] Shindo, M.L., et al., Facial skeletal augmentation using hydroxyapatite cement. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 1993. 119(2): p. 185-190.
- [9] Sanchez-Sotelo, J., L. Munuera, and R. Madero, Treatment of fractures of the distal radius with a remodelable bone cement. *Bone & Joint Journal*, 2000. 82(6): p. 856-863.
- [10] Wang, X., et al., Influence of anti-washout agents on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2007. 81(2): p. 410-418.
- [11] Wang, X., J. Ye, and H. Wang, Effects of additives on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate bone substitute material. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2006. 78(2): p. 259-264.