

SEGMENTER DEFEKT İÇEREN UZUN KEMİK KIRIKLARININ TEDAVİSİNDE KULLANILAN GÖZENEKLİ HİDROKSİAPATİT VE KALSİYUM FOSFAT SERAMİK BLOKLARININ IN VIVO UYUMLULUĞU

Cenk BALÇIK*, **Alpaslan ŞENKÖYLÜ****, **Nurşen KOÇ*****, **Muharrem
TİMUÇİN*****, **Petek KORKUSUZ******, **Feza KORKUSUZ****

ÖZET

Amaç: Kemik kaybı ile beraber olan segmenter kırıklar trafik veya iş kazaları gibi yüksek enerjili travmalar sonucu yaygın olarak görülmektedir. Bu durumların bazılarında atrofik kaynama yokluğu gelişmekte ve etkilenen bölgenin mekanik ve biyolojik olarak uyumlu kemik dolgu implantları ile doldurulması gerekmektedir. Hidroksiapatit (HA) bazlı kemik implantların osteokondüktif özelliklere sahip olmalarından dolayı, segmenter kemik kayıplarının tedavisinde kullanılmaları üzerine araştırmalar sürmektedir. Çalışmanın amacı, kemiğe bağlanma kapasitesi yüksek olan trikalsiyum fosfat (TCP) ile HA kompozitinin segmenter kemik kayıplarının iyileşmesi sırasındaki biyouyumluluğunu araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Tavşan tibia segmenter kayıp modelinde kullanılmak üzere %60 HA ve %40 TCP'den oluşan, içinde 100-300 mm çapında mikrogözeneklerin birbirlerine bağlandığı, silindirik şekilde kompozit implantlar üretilmiştir. TCP etkisini karşılaştırmak amacıyla aynı geometri ve mikrodelik yapısına sahip saf HA'dan oluşmuş implantlar kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hazırlanan implantlar 3 aylık tavşan tibialarının 1/3 orta bölgesinde yaratılan 1 cm uzunluğundaki segmenter kemik kayıplarına yerleştirilmiştir. Implantların patolojik uyumluluğu 1. ve 2. ayın sonunda alınan örneklerde incelenmiştir.

Sonuçlar: Kullanılan HA-TCP kompozit ve HA implantların yüzeyinde 1 ayın sonunda fibröz kapsülün oluştuğu ve bu kapsülden mikrogözenekli yapının içine doğru bağ dokusunun ilerlediği saptanmıştır. İki ay sonra bağ dokusunun yerini yeni kemik dokusuna bıraktığı gözlenmiştir. Histolojik incelemede yabancı cisim doku yanıtının belirleyicisi olan fagositlere rastlanmamıştır.

Çıkarımlar: Yapılan in vivo çalışmaların sonucunda HA ve HA-TCP seramiklerin doku uyumluluğu saptanmış olup bunların uzun kemik segmenter defektlerinin iyileşmesinde güvenle kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Segmenter Kemik Defekti, Hidroksiapatit, Trikalsiyum Fosfat, Biyouyumluluk.*

SUMMARY

IN-VIVO COMPATIBILITY OF HYDROXYAPATITE AND TRICALCIUM CERAMIC COMPOSITES USED IN SEGMENTAL BONE DEFECT HEALING

Purpose: Segmental bone loss is frequently seen after high energy trauma. In such cases, atrophic non-union occurs and there is a need for mechanical and biological restoration of the defect location. Bone implants composed of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) have good osteoconductive properties and their use in segmental defect healing is under investigation. The aim of this study was to search the biocompatibility of porous ceramic implants of HA and TCP in segmental defect healing.

Material and Methods: Composite ceramics implants of 60 %HA and 40 %TCP consisting of interconnected porous structure were produced in cylindrical shapes to be used in the rabbit tibiae. Same-structured pure HA implants were also produced as for control. Prepared ceramic implants were placed into a 1.0 cm long segmental defect created in the mid 1/3 of the rabbit tibia. Fixation was provided by an intramedullary K-wire only. Compatibility of implants was histologically evaluated through ceramic samples collected at the end of one and two months.

* Başkent Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Ankara.

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

*** Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, 06531 Ankara.

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

Results: Fibrous encapsulation was observed in both composite and HA ceramics. In one month, connective tissue ingrowth into the pores of the implants was observed. At the end of the second month, the connective tissue was completely replaced with woven bone tissue. Phagocytes were not observed in any time point.

Discussion: In the early stages of the in vivo experiments, HA and TCP ceramics presented excellent biocompatibility. In conclusion, both types of implants were observed to have great potential for the healing of segmental defects in long bones.

Key Words: *Segmental Defect, Hydroxyapatite, Tricalcium Phosphate, Biocompatibility.*

GİRİŞ

Segmenter kemik kayıplarının iyileşmesi ve kemiğin kırık öncesi fonksiyonlarına kavuşması ortopedi dünyasında halen büyük bir problem olarak gözükmektedir^{1,2}. Bu tip lezyonlarda kaynamama sıkça görülen bir problemdir. İdeal tedavi yöntemi olarak bilinen autografların bu tip kırıklar için yeteri miktarda elde edilememesi ve donör bölgede morbidite görülmesi sebebiyle, alternatif kemik dolgu maddesi arayışları yoğunlaşmıştır³. Kalsiyum fosfat bazlı sentetik seramikler içinde yer alan hidroksiapatit [$HA, Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] ve tri-kalsiyum fosfat [$TCP, Ca_3(PO_4)_2$] kemik dokusuyla kuvvetli bağ oluşturan osteokondüktif materyeller olduklarından dolayı, segmenter kemik kayıplarının iyileşmesinde kullanılabilme potansiyeline sahiptirler³⁻⁸.

Kemik dolgu maddesi olarak kullanılan kalsiyum fosfat bazlı seramik protezlerin ideal dayanıklılık ve osteokondüktif yapıları üzerinde araştırmalar devam etmektedir. Sentetik seramikler protezlerin dayanıklılıkları kristal yapının düzenlenmesi ve kullanılan maddelerin katı hallerindeki partikül boyutlarının ayarlanması yoluyla geliştirilebilir^{9,10}. Osteokondüktif özellikleri ise elde edilen protezlerin gözenek yapısına sahip kılınması ile artırılır. Tri-kalsiyum fosfat eklentisi, hidroksiapatite oranla daha hızlı biyolojik parçalanmaya neden olduğundan, seramik protezlerin osteoindüktif özelliklerini daha artırıcı nitelik taşır.

HA ve TCP bazlı seramiklerin uzun kemik segmenter kayıpları için kullanılırken, mekanik yetersizlik nedeniyle sabit plaklar veya eksternal fiksatörler ile birlikte uygulanmış ve bu da defekt bölgenin iyileşmesi için gerekli olan mekanik uyarıları engellemiştir^{11,12}. İyileşme süresinin artırılabilmesi için seramik fiksasyonunda kullanılan yöntemin mekanik uyarılara

engel olmaması tercih edilmektedir. Bu amaçla kullanılan dayanıklı HA ve TCP bazlı seramik implantasyonun in-vivo biyouyumluluk özelliklerini araştırmak, tedavinin uzun dönemli başarısı açısından büyük önem taşır.

Segmenter kemik kaybı bölgesine binen mekanik yüklenme intramedüller Kirschner ile sağlanabilir mi? Bunun sonucunda seramiğe binen yükün yeni kemik oluşumunu arttırdığı ve seramiğe karşı oluşan inflamatuvar yanıt histolojik olarak gösterilebilir mi?

Bu çalışmada, tavşan tibialarının orta 1/3 bölgesinde oluşturulan segmenter kayıpların tedavisi amacıyla intramedüler çivi ile desteklenen saf HA ve %60 HA + %40 TCP'den oluşan kompozit seramiklerin biyouyumluluğu birinci ve ikinci ay sonunda alınan doku örnekleriyle araştırılmış, seramiklerin gözenekli yapısı içine kemik dokusu ilerlemesi değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE METOD

Seramiklerin Hazırlanması

İki farklı kompozisyondaki seramikleri hazırlamak için HA ve TCP tozları literatürde belirtilen kimyasal yöntemle elde edilmiştir¹³. Bu yöntem kısaca çözelti içerisindeki kalsiyum ve fosfat iyonlarının amorf kalsiyumfosfat tanecikleri şeklinde çökeltmesi ve bunu takiben tanecikleri 900°C'a kadar ısıtıp kristal yapı kazandırma işlemlerinden oluşmaktadır. Seramik teknolojisinde "slip döküm süreci" olarak bilinen yöntem temel alınarak kemik dokunun özelliklerini yansıtan gözenekli seramik yapısı elde edilmiştir¹⁴. Seramiklerin içine doğru doğal kemik ilerlemesine olanak verecek gözenekli yapının elde edilmesi amacıyla boyutları 100 mm ile 300 mm arasında olan polimetilmetakrilat (PMMA) tanecikleri seramik hacminin %60'ini oluşturacak şekilde seramik asıltıya eklenmiştir. Döküm işleminden sonra ham seramiklerden PMMA'ın ayrışması fırın içerisinde 500°C ısıda sağlanmış ve oluşan gözenekli seramik yapının 1075 -1175°C arasında sertleşmesi yöntemiyle son şeklini alması tamamlanmıştır.

Tavşan tibiasının boyutlarına uygun silindirik kalıplar içerisinde hazırlanan seramiklerde, çapları 100 mm ile 300 mm arasında olan gözenekler ile ana makroporoz yapının elemanlarını bağlama görevini üstlenen, ve boyutları 20 mm ile 40 mm arasında değişen destekleyici gözenekli yapı oluşturulmuştur. İntramedüler çivi fiksasyonuna uygun olması amacıyla silindirik seramik implantların içerisine 2.5 mm çapında delik açılmıştır. Seramikler 1 cm uzunluğunda parçalar halinde kesildikten sonra %60 HA + %40 TCP kompozit ile tamamı HA olan sentetik kalsiyum fosfat bazlı gözenekli implantlar in vivo testler için kullanılmıştır.

In Vivo Testler

Ağırlıkları 1910 ± 187 g olan dört tane dört aylık dişi deney tavşanı (Tarım ve Köy İşleri Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Ankara), seramiklerin biouyumluluğunu in vivo testlerle değerlendirmek üzere kullanılmışlardır. Deney boyunca seçilen tavşanlar ODTÜ Mühendislik Bilimleri Hayvan Laboratuvarında sabit $21 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ve %50 (± 10) nemli ortamda tutulmuşlardır. Yapay gün/gece ortamı 12 saatlik devreler halinde floresan aydınlatmasıyla sağlanmıştır. Kafesler içerisine yerleştirilen tavşanlar yeterli miktarda su ve yem ile beslenmişlerdir. Bütün uygulamalar Helsinki Hayvan Hakları ve Türk Veteriner Hekimliği Deontoloji Yönetmeliğinin 6343/2 maddesi ile uyumludur¹⁵.

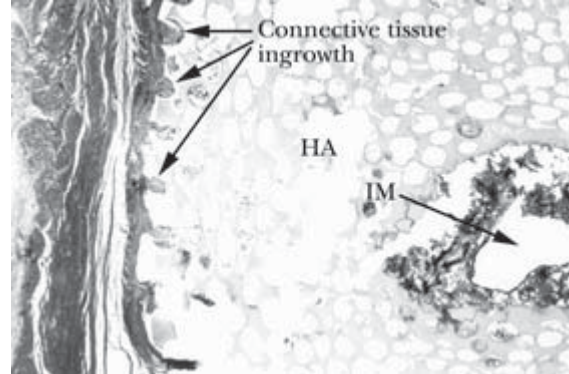
Ameliyat sırasında Ketamin HCl (35 mg/kg) ve Xylazinden (5 mg/kg) oluşan anestezi intramuskular olarak hayvanlara enjekte edilmiştir. HA+TCP kompozit seramikleri için tavşanın sol tibiasının orta kısmı, HA seramikleri için ise tavşanın sağ tibiasının orta kısmı traş edilip, tüm arka ayak betadine solüsyonuyla temizlenmiştir. Kruris anterioru boyunca uzunlamasına kesi yapılmış, ardından periost da uzunlamasına açılarak periost elevatörleriyle tibianın orta kısmı ortaya çıkarılmıştır. Tibianın orta 1/3 kısmından 1 cm uzunluğundaki bölge işaretlenmiş ve osteotomi uygulanarak segmenter tibia parçası çıkarılmıştır. Tibianın seramiklerle temas edecek kesik yüzeyleri zımparalanarak düzeltilmiştir. Çapı 2 mm olan Kirschner teli tibianın distalinden proksimaline doğru retrograd doğrultuda intrameduller olarak yerleştirilmiştir. Seramik protezin yerleştirilmesinden ve kemiğin aligmanının ayarlanmasından sonra Kirschner teli tibianın proksimaline doğru deformite yapmayacak şekilde ilerletilmiştir. Tavşan topuğunun dışarısında kalan Kirschner teli kesilmiştir. Periost ve cilt altı 3/0 Vycril®, cilt 4/0 Prolene® ile kapatılmıştır. Hem yaranın korunması, hem de kemik uzunluğu boyunca sabitlenmesine destek olması amacıyla Soft Cast® ile uzun bacak sirküler alçı tespiti uygulanmıştır. Ameliyat sonrası antibiyotik ve analjezik olarak 50 mg/kg Cefazolin® ve 20 mg/kg Tiltolil® intramuskuler olarak uygulanmıştır.

Birinci ve ikinci ayın sonunda implantasyon bölgesinden çıkarılan örnekler %10 formalin (ph 7.0) içerisinde analiz başlangıcına kadar tesbit edilmiştir. Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat içeren kemik örneklerinin dekalsifikasyonunda 300 ml ethanol, 50 g kloralhidrat, 670 ml distile su ve 30 ml %70'lik nitrik asit karışımından oluşan De Castro çözeltisi kullanılmıştır. Örnekler parafin içerisine gömülmeden

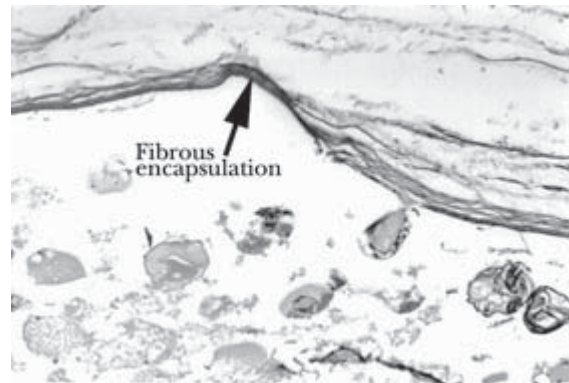
önce değişen derecelerde etanol solüsyonları ile dehidrate edilmişlerdir. Kalınlıkları 5-7 mm olan kesitler hematoksilin eosin ve Masson trikrom ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir.

BULGULAR

İmplantasyon bölgesindeki hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfatın kemik dokusuyla ve kemik iliğiyle etkileşimi incelenmiştir. Bir ve iki aylık örneklerin incelen kısımlarında yabancı cisim reaksiyonuna ait fagosit hücrelerin görülmemesi, kullanılan seramiklerin biouyumluluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. Bir ay sonunda alınan örneklerde yapılan inceleme sonucunda seramik dış yüzeyinden içerisine doğru gevşek bağ dokusu oluşumları gözlenmiştir (Şekil 1). Seramiklerin iç kısımlarına çevre dokunun ilerlediği ancak yüzey altı gözenekli bölgenin doku tarafından tamamıyla infiltre edilmediği saptanmıştır. Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfata yakın kortikal tibianın etrafında ince kıkırdak yapıların oluştuğu izlenmiştir. Kemik dokusu ile teması olmayan seramik implant yüzeyleri içi şeklindeki fibroblastlardan oluşan ince fibröz doku ile sarılı olduğu görülmüştür (Şekil 2).

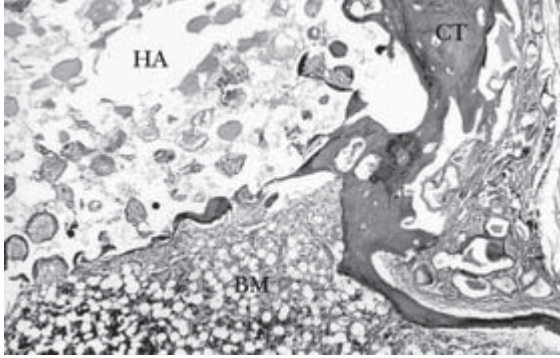


Şekil 1: Bir ay sonunda bağ dokusunun kompozit seramik içine ilerleyişi (HA:hidroksiapatit, IM: İlik ; MT, x 4).



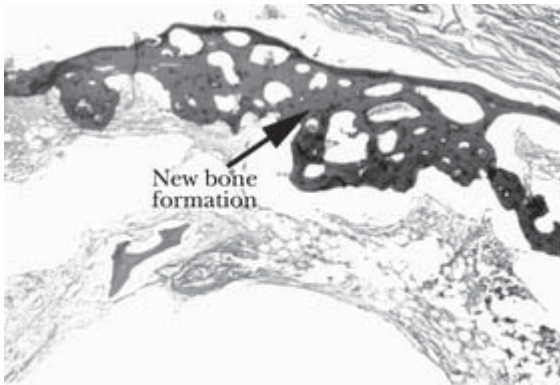
Şekil 2: Hidroksiapatit yüzeyinin fibrillerle birlikte fibroblast katmanları (Fibrous encapsulation) ile kaplanması. (HE, x 10).

İkinci ayın sonunda HA'in çevresinin fibröz kapsül ile sarıldığı ve kortikal tibianın seramiğe yakın tarafında kalınlaşmış periosteum ile sarılı ince kemik dokusunun oluştuğu saptanmıştır (Şekil 3). Seramik



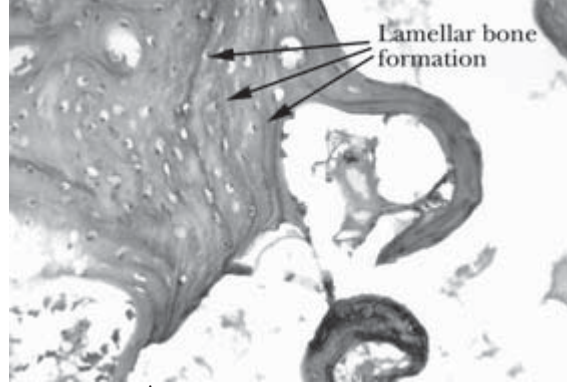
Şekil 3: Hidroksiapatit (HA), kemik iliği (BM) ve bağ dokusunun (CT) ikinci ay sonunda elde edilen görüntü. (HE, x 4).

içine doğru ilerleyen bağ dokusunun yerini kemik matriksine bıraktığı izlenmiştir. Oluşturulan defektin büyüklüğü ve Kirschner telinin kemik iliği tarafında yaptığı mekanik aşındırma, kortikal kemikle seramiğin birebir temas ettiği yüzeyi azalttığı için, bunun kemik iyileşmesini sınırladığı gözlenmiştir. Yeni kemik spekülünün HA üzerinde büyüdükleri dikkat çekmiştir. Nitekim yeni eklenen kemik matriks sınırında sement çizgilerine sıklıkla rastlanmıştır. implantasyon bölgesinde kemik iliğinin iyileşmesinin kortikal kemiğe oranla daha hızlı olduğu görülmüştür. İlk ayda oluşan kıkırdak dokusu, ikinci ayın sonunda yerini tamamıyla kemik dokusuna bırakmıştır. Yeni kemik trabeküllerinin seramiğin içine doğru ilerlemesinin ikinci ay sonunda belirginleştiği ve oluşan kemiğin Kirschner teline yakın yüzeyde seramiğe oranla daha fazla hacim kapladığı görülmüştür (Şekil 4). Gözenekli seramik yapısının

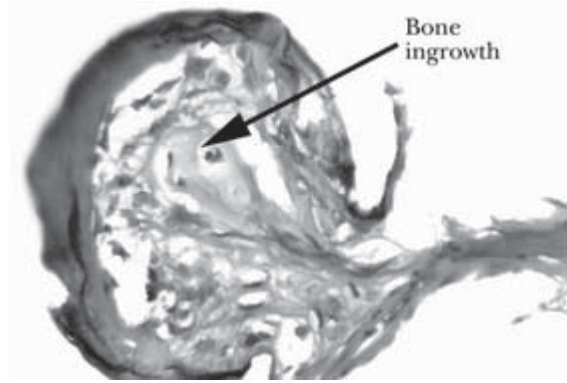


Şekil 4: Kompozit seramiğin Kirschner teli tarafındaki yeni doku oluşumunun (New bone formation) iki ay sonunda ulaştığı durum (HE, x 4).

içerisine lamellar kemik dokusunun da oluşabildiği izlenmiştir. Gözenekli yapının bağlantıları yardımıyla tek bir gözeneğin içinin tümüyle kemik iliği dokusunun buraya büyümesi ile doldurabildiği saptanmıştır (Şekil 5 ve 6).



Şekil 5: İkinci ayda lamellar kemik oluşumunun (lamellar bone formation) poroz HA implantı içine ilerlemesi (HE, x 20).



Şekil 6: İki aylık in-vivo uygulama süresince HA implantının tek bir gözeneğine kemiğin ilerlemesi ve burada büyümesi (Bone ingrowth; HE, x 40).

TARTIŞMA

Kemik dolgusu olarak kullanılması tasarlanan biyomalzemelerin biyouyumluluğunu araştırmak amacıyla, üzerlerinde klinik öncesi yoğun testler uygulanmaktadır. Sentetik malzemelerin inflamasyon aktivitesi, kendilerinin kompozisyon, boyut ve yüzey özellikleriyle alakalıdır¹⁶. Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat materyal olarak osteokonduktif ve biyouyumlu olduklarından, in-vivo olarak uygulandıklarından hemen sonra inflamatuvar yanıt oluşturmazlar. Literatürde operasyon sonrası enfeksiyon yarattığı görülmüşse de, bunun HA ile doğrudan ilgili olduğu saptanmamıştır¹⁷. Protez uygulamalarında kullanılan biyomateryallerinin aşınma sonucu ortaya çıkan partikülleri, inflamasyon ve kemik rezorpsiyonu yarattığı kaygıları

mevcuttur¹⁸. Aşınma sonucunda boyutları 2 mm'den küçük materyal debrileri osteoliz yaratarak, fagositoz sonucu sitokinler çevresinde hücrel tepkime doğururlar. Bizim çalışmamızda, özellikle Kirschner teline yakın bölgelerde ve de tibia ile temas yüzeyine yakın kısımlarda, seramikten aşınma yoluyla kopan irili ufaklı HA ve TCP partiküllerine rastlanmıştır. İncelenen kısımlarda fagositlerin bulunmaması, kullanılan HA ve TCP materyellerinin inflamatuvar yanıt oluşturma kapasitelerinin düşük olduğunu göstermektedir. Bu duruma rağmen, implantasyon süresinin artması, aşınmayı da fazlaştıracığından belirgin inflamasyon gözükmesine neden olur.

Kemiğin seramik içine doğru ilerlemesi sırasında, gözenekli yapının yarık yüzeylerinde stresse bağlı olarak mikrokırıklar yarattığı bilinmektedir¹⁹. Yeni oluşan kırıklar seramiğin osteokondüktif yüzey miktarını arttırmakta, kemik oluşumunun daha fazla HA içine ilerlemesini sağlamakta ve bu bölgelerde HA-kemik arasındaki bağlanmayı artırarak iyileşmeyi hızlandırmaktadır. Mikrokırıkların seramik içerisinde oluşması mekanik olarak kaygı yaratmasının aksine, HA ile olan bağ yapısını kuvvetlendirdiğinden kemik gelişimi için istenilen özelliktir.

Bir ay sonunda kemik yapısı yerine kırıldak yapısının görülmesi, oksijen azlığı gibi uygunsuz mikro-ortam koşulları nedeniyle oluşmaktadır. İkinci ay sonunda kırıldak yapı yerini kemik dokusuna bırakmıştır. İkinci ayda seramiğin gözeneklerinin henüz tamamen dolmadığının izlenmesine karşın 1 yıla ulaşacak bir takipte bu gözeneklerin büyük oranda normal kemik dokusuyla dolması beklenmektedir.

Kemik ilerlemesi sırasında seramiğin içinde yeni çatlaklar oluştuğu saptanmıştır. Gözenek içinde ilerleyen kemik iliğinin akış benzeri bir yapıda büyümesi, seramiğin birbirine bağlı makroporoz yapısının HA'nın osteokondüktif özelliklerini arttırdığı anlamına gelmektedir.

Bu çalışmada, segmenter kemik defektlerinin in-vivo iyileşmesi, ilk aylarda elde edilmiş HA ve TCP bazlı seramik örnekleri histolojik olarak incelenmiştir. Kullanılan seramiklerin kemik hücreleri ile biyoyumlu oldukları görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, üretilen HA ve TCP içeren implantlarının uzun süreli in-vivo uygulamaları için umut vericidir. Çalışmanın devamı olarak daha uzun süreli in-vivo deneyler yapılarak kemik iyileşmesinin biyomekanik testler ile araştırılması planlanmıştır. Autogreft ve allogreftler yerine kullanılabilmesi için seramik kompozitler osteojenik katkı sağlayacak biyoelementlerle desteklenmelidir. Sonuç olarak HA ve TCP içeren seramiklerin osteokondüktif ve

biyoyumluluk derecelerinin uygun olduğuna ve ideal materyal yapısında kullanıldıklarında, segmenter kemik kayıplarının iyileşmesi için gelecekte güvenle kullanılacak potansiyele sahip oldukları görüşüne varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Poss R. Orthopedic knowledge update. Volume 3. Chicago, IL. American Academy of Orthopedic Surgeons, 1990.
2. Tay B, Patel V, Bradford D. Calcium sulfate-and calcium phosphate-based bone substitutes. *Orthop Clin North Am* 1999; 30: 615-622.
3. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *Appl Biomater* 1991; 2: 187-208.
4. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 1981; 157: 259-178.
5. Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J, Meyers L, Sciadini MF. Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res* 1996; 14: 351-369.
6. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mat Res* 2000; 49: 328-337.
7. Zhang C, Wang J, Feng H, Lu B, Song Z, Zhang X. Replacement of segmental bone defects using porous bioceramic cylinders: a biomechanical and X-ray diffraction study. *J Biomed Mat Res* 2001; 54: 407-411.
8. Korkusuz F, Korkusuz P. Kalsiyum hidroskiapatit seramiklerin ortopedide kullanımı. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* 1997; 31: 63-67.
9. Mahan KT, Carey MJ. Hydroxyapatite as a bone substitute. *J Am Podiatr Med Assoc* 1999; 89: 392-397.
10. Carotenuto C, Spagnuolo G, Ambrosio L, Nicolais L. Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications. *J Mater Sci Mater Med* 1999; 10: 671-676.
11. Tiedeman JJ, Connolly JF, Strates BS, Lippiello L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clin Orthop* 1991; 268: 294-302.
12. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotech* 2000; 18: 959-963.
13. Hayek E, Newesely H. Pentacalcium Monohydroxyorthophosphate. *Inorg Syn* 1963; 7: 63-65.
14. Tas AC, Korkusuz F, Timucin M, Akkas N. An investigation of the chemical synthesis and high temperature sintering behavior of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. *J Mat Sci: Mat. Med* 1997; 8: 91-96.
15. Bennett BT. Regulation and requirements. In: Bennett BT, Brown MJ, Schofield JC, eds. *Essentials for animal research: a primer for research personal*. 2nd ed. National Agricultural Library, Beltsville, Maryland, 1994: 1-9.

16. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop* 2000; 371: 10-27.
17. Heise U, Osborn JF, Duwe F. Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. *Int Orthop* 1990; 14: 329-338.
18. Wright TM, Goodman SB (eds): *Implant wear: The future of total joint replacement*. Rosemont, IL. American Academy of Orthopedic Surgeons, 1996.
19. Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, Bianco P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone* 1999; 24: 579-589.