

HİDROKSİ APATİT İÇEREN KEMİK ÇİMENTOSUNUN İN-VİVO BİYUYUMLULUĞU

Kemal ŞERBETÇİ*, **Sibel ORHUN****, **Feza KORKUSUZ*****, **Nesrin HASIRCI******

ÖZET

Amaç: Ortopedi ve travmatolojide yaygın kullanılan akrilik tabanlı kemik çimentolarının biyoyumluluğunun artırılması temel araştırma alanlarından birisidir. Bu araştırmalardan bir bölümü kemik çimentolarının mekanik diğer bir bölümüyse biyoyumluluk özelliklerinin geliştirilmesi doğrultusundadır. Hidroksiapatit (HA) biyoyumluluğu ispatlanmış osteokondüktif özelliklere sahip bir malzemedir. Çalışmanın amacı hidroksiapatit içeren kemik çimentosunun geliştirilerek bu çimentonun biyoyumluluk özelliklerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada ağırlıkça %7 hidroksiapatit partikülleri içeren kemik çimentosu hazırlanmış ve bu çimentonun doku reaksiyonları CMW1 ticari kemik çimentosunun doku reaksiyonları ile karşılaştırılmıştır. In vivo testlerde 3 aylık yerel beyaz tavşan kullanılmıştır. HA içeren kemik çimentosu ve CMW1 kemik çimentosu paravertebral kas içine yerleştirilmiştir. Çimentoların kaslarda oluşturduğu doku yanıtları 1, 3 ve 7 günlerde patoloji örneği alınarak incelenmiştir.

Bulgular: 1, 3 ve 7 günlerde gerçekleştirilen patolojik incelemeler sonucu %7 hidroksiapatit partikülleri içeren kemik çimentosunun ticari form olan CMW1'e oranla ilk 24 saatte daha az doku ödeminin, 3 günde polimorf hücre sayısının ve 7 günde enflamatuvar yanıtın daha az olduğu gözlenmiştir.

Sonuçlar: %7 oranında HA içeren kemik çimentosu CMW1'den biyolojik anlamda daha uyumlu olup gelecekte klinik uygulamada yer bulabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Kemik Çimentosu, Hidroksiapatit, Biyoyumluluk.

SUMMARY

IN VIVO BIOCOMPATIBILITY OF HYDROXYAPATITE CONTAINING BONE CEMENT

Introduction: Improving the biocompatibility of acrylic based bone cements is a current research area in orthopedic surgery and traumatology. One aspect of bone cements is improving their biomechanical properties while the other aspect is the improvement of their biocompatibility. Hydroxyapatite (HA) is a highly biocompatible material known to have osteoconductive properties. The aim of the study is to improve bone cements biocompatibility by adding HA.

Materials and Methods: 7% HA particles containing bone cement was prepared and its tissue reaction was compared to commercially available CMW1 bone cement. Three-month old local albino rabbits were used for in vivo testing. Both HA containing and CMW1 cements were implanted into the paravertebral muscles of the animals. Tissue reaction at muscles were assessed pathologically on day 1, 3 and 7 of implantation.

Results: 7% HA containing bone cement caused less swelling at the tissue on day one. Polymorphonuclear cells were less with HA containing bone cement on day 3 and inflammatory response was less on day 7 with this formulation.

Discussion: 7% HA containing bone cement is more biocompatible than CMW1 bone cement. This formulation can clinically be used in the near future.

Key Words: Bone Cement, Hydroxyapatite, Biocompatibility.

* Dr. (MD&PhD), Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği.

** Uzman Dr., Sağlık Bakanlığı Ankara Acil Yardım ve Travmatoloji Hastanesi Patoloji Uzmanı.

*** Prof. Dr., Orta Doğu Teknik Üniversitesi Sağlık ve Rehberlik Merkezi.

**** Prof. Dr., Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü.

GİRİŞ

Kalsiyum hidroksiapatit, genel olarak anılan adıyla hidroksiapatit (HA), inorganik kimyada kalsiyum fosfat florid hidroksi klorid [$Ca_{10}(PO_4)_6(F, OH, Cl)_2$] olarak tanımlanır. HA kemik ve dişlerin mineral fazını oluşturan biyouyumluluğu ispatlanmış ve osteoindüktif temel inorganik malzemedir. Sentetik olarak edinilen HA osteokondüktif özellikleri nedeniyle kemiğe uygulandığında dokuyla oldukça kuvvetli bir şekilde birleşir¹⁻⁴.

Akrilik tabanlı kemik çimentoları ortopedi ve diş hekimliğinde 30 yıldan uzun bir süredir kullanılmaktadır⁵. Akrilik tabanlı kemik çimentolarının geliştirilmesi için üzerinde çalışılan konulardan birisi de çimentonun biyouyumluluğunu arttırmak için içerisine HA eklenmesidir^{2-4,6-13}.

Çalışmalarımızda kemik çimentosu içerisine eklenen HA'nın çimentonun akışkanlığını belirgin olarak arttırdığı saptanmıştır¹⁴. HA in çimento hamuru içerisinde uygun şekilde ve homojen dağılımını sağlamak için öncelikle çok düşük viskoziteli kemik çimentosunun geliştirilmesi gerekmektedir. %7 HA içeren kemik çimentosunun optimum termal ve mekanik özelliklere sahip olduğu saptanmıştır. HA içeren kemik çimentosunun ticari formu olan kemik çimentolarına oranla biyouyumluluğunun yüksek olacağı varsayılmaktadır. Çalışmanın amacı hidroksiapatit içeren kemik çimentosunun geliştirilerek bu çimentonun biyouyumluluk özelliklerini araştırmaktır.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Metilmetakrilat (MMA) monomeri Merck firmasından satın alınmıştır. İki ayrı çeşit polimetilmetakrilat (PMMA) (Molekül ağırlıkları 120,000 ve 15,000), Benzol peroksit (BPO) ve N-N dimetilparatoluidin (DMPT) Aldrich firmasından satın alınmıştır: Hidroksiapatit Riedel-de Haen firmasından satın alınmıştır. CMW1 kemik çimentosu Hipokrat A.Ş. tarafından temin edilmiştir.

Kemik Çimentosunun Hazırlanması

Önceden hazırlanmış olarak alınan PMMA partikülleri su soğutmalı elektrikli bir öğütücüde (Tekmar®, JankeBcKunkel GMBH CO. KG) öğütüldükten sonra otomatik bir elekten (Endecotts

Octagon 200 test sieve shaker, Lombard Road London SW 193BR, England) geçirilerek çapları 50-150 mikron arasında olan PMMA partikülleri elde edilmiştir: Bu partikül çap aralığı önceki çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlar baz alınarak tayin edilmiştir. PMMA partiküllerinin boyutlarının ölçümü bilgisayar kontrollü partikül analiz cihazında (Malvern™ Mastersizer particle size analyzer, Malvern instruments ltd., Spring Lane South, Worcestershire WR141AT, UK) gerçekleştirilmiş ve ortalama partikül boyutu 95 μ m olarak ölçülmüştür.

Kemik çimentosu hazırlanmasında ticari CMW1 çimentosu kompozisyonuna yakın bir kompozisyon kullanılmıştır (Tablo I). Kendi ürettiğimiz kemik çimentosunda CMW1 çimentosundan farklı olarak askorbik asit, hidrokinon ve baryum sülfat kullanılmamıştır (Tablo II).

Kemik çimentosunun toz ve sıvı kısımları hazırlanıp kapalı kaplarda oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra kullanılmıştır. Aynı sıcaklık eşitlemesi CMW1 kemik çimentosu için de yapılmıştır. Çimento hamuru her iki kompozisyon için de polietilen bir kap içerisinde yine polietilen bir spatül kullanılarak manuel olarak hazırlanmıştır.

Tablo I: **CMW1 Ticari Kemik Çimentosunun Kimyasal Kompozisyonu**

Toz Kısım	
PMMA	%88.8
BPO	%2.1
Ba ₂ SO ₄	%9.1
Sıvı Kısım	
MMA	%98.2
DMPT	%0.81
Etanol.....	%0.94
Askorbik Asit	%0.02
HQ	15-20 ppm

Tablo II: **C1 Kemik Çimentosunun Kimyasal Kompozisyonu**

Toz Kısım	
Yüksek Molekül Ağırlıklı PMMA	%66
Düşük Molekül Ağırlıklı PMMA.....	%22
BPO	%1
Hidroksiapatit (HA)	%11
Sıvı Kısım	
MMA	%99.2
DMPT	%0.8

Karıştırma frekansının her iki kompozisyon için de 1 s^{-1} olmasına özen gösterilmiştir.

İn-vivo Test Yöntemi

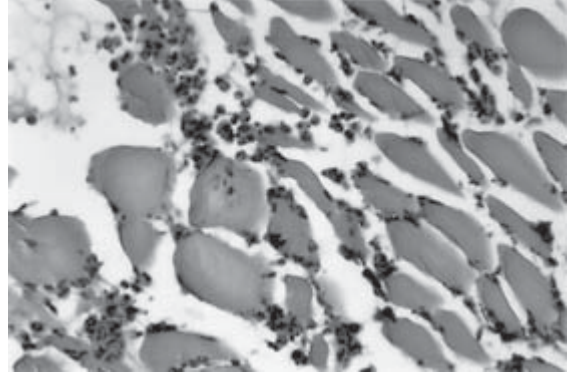
İn-vivo testlerde ağırlıkları 2000-2500 g arasında olan üç adet üç aylık erkek albino deney tavşanı (tarım ve Köy İşleri Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Ankara) kullanılmıştır. Anestezi için intramusküler ketamin (100 mg/kg) ve xylazin (5 mg/kg) kullanılmıştır. Anestezi sonrası tavşanların sırt kısımları traş edildikten sonra betadine solüsyonla temizlenmiştir. Tavşanların sırt kısımlarında paravertebral kasların hizasında iki adet solda ve iki adet de sağda olmak üzere her tavşanda toplam dört adet simetrik 0.5 cm genişliğinde 1.5 cm derinliğinde kas içine uzanan cepler oluşturulmuştur. Her cep oluşturulduktan hemen sonra kemik çimentosunun toz ve sıvı kısımları karıştırılıp hamur haline getirilmiş ve kas içerisine yaklaşık 0.3 ml çimento hamuru yerleştirilip sertleşmeden hemen önce cilt altı 3-0 Vicryl® ve cilt dokuları 3-0 ipekle kapatılmıştır. Kendi hazırladığımız kemik çimentosu sırtın sol tarafındaki doku ceplerine, CMW1 kemik çimentosu ise sırtın sağ tarafındaki doku ceplerine yerleştirilmiştir. Tavşanlar bağımsız kafeslerde yeterli su ve yem ile beslenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler Türk Veteriner Hekimliği Deontoloji Yönetmeliğinin 6343/2 maddesi ve Helsinki Hayvan Hakları duyurusuyla¹⁵ uyumludur.

Birinci tavşanın sırtındaki çimento numuneleri implantasyondan 24 saat sonra çıkartılmıştır. Diğer tavşanların sırtlarındaki numuneler ise üç gün ve bir hafta sonra çıkarılmıştır. Çıkarılma işleminden sonra tavşanların canlılığı korunmuş ve başka deneylerde kullanılması sağlanmıştır. Anestezi sonrası kemik çimentosu numuneleri çevrelerinde yaklaşık üç milimetre kalınlığında doku içerecek şekilde çıkartılarak patolojiye aktarılmıştır.

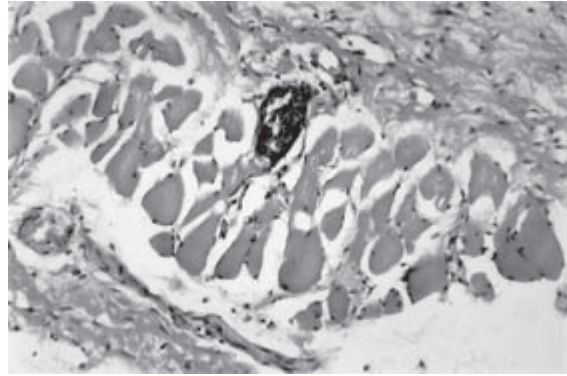
Alınan ve merkezlerinde sertleşmiş kemik çimentosu örnekleri olan doku numuneleri patoloğun ön bilgisi olmaksızın tarafsız inceleme yapabilmesi için rastgele numaralandırılmıştır. Örnekler %10 formalin içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Kemik çimentolarının etrafındaki yumuşak doku ve kas dokuları parafin bloklara alınıp 5 mm kalınlıkta kesitler elde edilmiştir. Kesitler HE ile boyanmıştır.

BULGULAR

24 saat sonra alınan doku numunelerinin patolojik inceleme sonuçları: Bütün örneklerde hem bağ

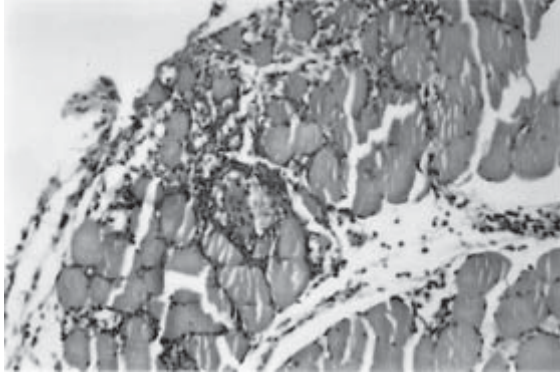


Şekil 1: CMW1 implante edilen dokunun 24 saat sonraki patolojik inceleme görüntüsü (H&E x 400).

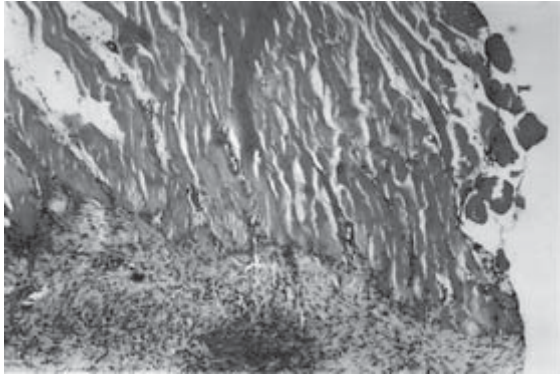


Şekil 2: HA içeren kemik çimentosu implante edilen dokunun 24 saat sonraki patolojik inceleme görüntüsü (H&E x 200).

hem kas dokusunda ödem belirgindir. Kemik çimentosuna komşu olan bölgelerde özellikle polimorfonükleer lökositler olmak üzere inflamatuvar hücreler ve nekrotik doku debris mevcuttur. Polimorfonükleer lökositlerin yanısıra eozinofil hücreler de mevcuttur. Kemik çimentosuna komşu olmayan kas dokusu içerisinde polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu daha azdır. Kanama alanları kemik çimentosuna komşu olan bölgelerde bulunmaktadır. CMW1 implante edilmiş dokularda inflamasyon orta düzeyde ve difüzdür (Şekil 1). HA içeren kemik çimentosu implante edilmiş dokularda inflamasyon yaygın olmamakla birlikte polimorfonükleer lökosit ve eozinofil hücrelerin olarak toplandığı çok küçük odak alanlar gözlenmiştir. Bu alanların çevresindeki kas dokusunun az da olsa dejenere olduğu saptanmıştır (Şekil 2). Her iki durumda da eozinofil hücrelerin normalden fazla olması dikkate değerdir. Bu bulgular yabancı cisim doku yanıtından farklı olarak doku hasarı sonucu oluşan akut inflamatuvar



Şekil 3: CMW1 implante edilen dokunun 72 saat sonraki patolojik inceleme görüntüsü (H&E x 200).



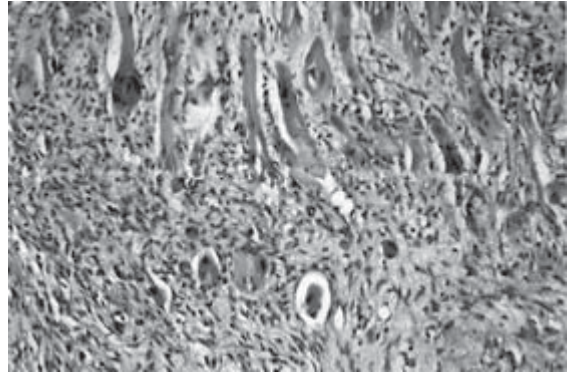
Şekil 4: HA içeren kemik çimentosu implante edilen dokunun 72 saat sonraki patolojik inceleme görüntüsü (H&E x 100).

yanıt görünümündedir. Her iki taraftaki inflamasyonlar karşılaştırıldığında CMW1 kemik çimentosu implante edilmiş dokulardaki reaksiyon şiddetinin HA içeren kemik çimentosu implante edilmiş dokulardaki reaksiyona oranla şiddetli olduğu gözlenmiştir.

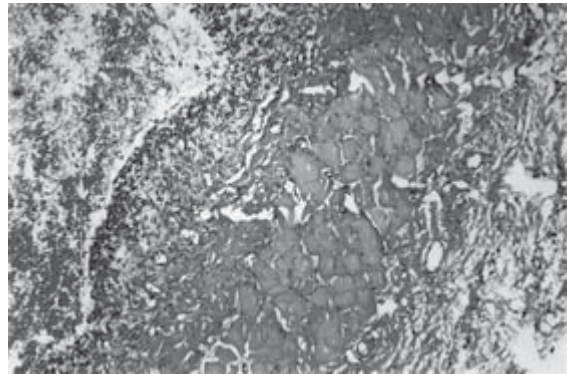
Üç gün sonra alınan doku numunelerinin patolojik inceleme sonuçları: Bütün örneklerde mevcut olan doku ödemi 24 saatte elde edilen örneklerdekinden fazladır. Ödem bütün alanlarda kas liflerini birbirinden ayırmıştır. Polimorfonükleer lökositler bulunmakla birlikte lenfosit ve plasma hücrelerinin sayısı artmıştır. Bağ dokusu içerisinde yer yer trombotik ince damarlar gözlenmektedirler. Her iki grubun inflamatuvar yanıtları karşılaştırıldığında HA içeren kemik çimentosu ve CMW1 implante edilmiş dokular arasında belirgin farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3-4).

Bir hafta sonra alınan doku numunelerinin patolojik inceleme sonuçları: Bu doku örnekleri

karşılaştırıldığında gruplar arasındaki doku yanıtı açısından belirgin farklılıklar gözlenmiştir. CMW1 implante edilen bölgelerde aktif bağ dokusu kas dokusunun bütünlüğünü önemli oranda bozmuştur. CMW1 çimentosuna komşu alanların genelinde yaygın mikrokalsifikasyonlar ve çok sayıda multinükleer yabancı cisim dev hücreleri gözlenmiştir. Bu bulgular CMW1 implante edilen dokularda yaygın ve şiddetli yabancı cisim yanıtını göstermektedir (Şekil 5). HA içeren kemik çimentosu implante edilen dokularda bağ dokusu vaskülaritesinde artış saptanmıştır. Mikroskobik bulgular dokuların hafif inflamatuvar yanıtının göstergesidir. Kas dokusu içerisinde çok az ödemin ve fibröz doku infiltrasyonu saptanmıştır. HA içeren kemik çimentosu çevresinde ince bir granülasyon dokusu tabakası izlenmektedir. Bu doku çimentosu çevrelemeye çalışmaktadır: Örneklerde çok daha az yabancı cisim dev hücresine rastlanmıştır. Genel bir değerlendirme yapıldığında HA içeren kemik çimentosu implante edilen dokulardaki vasküler



Şekil 5: CMW1 implante edilen dokunun bir hafta sonraki patolojik inceleme görüntüsü (H&E x 200).



Şekil 6: HA içeren kemik çimentosu implante edilen dokunun bir hafta sonraki patolojik inceleme görüntüsü (H&E x 100).

proliferasyon, fibroblast proliferasyonu ve inflamatuvar hücreler yabancı cisim yanıtından çok kronik inflamatuvar yanıtı andırmaktadır.

TARTIŞMA

Belirgin yabancı cisim yanıtı birinci haftanın sonunda ortaya çıkmış olup HA içeren kemik çimentosu implante edilen olgularda çok hafif düzeyde, CMW1 implante edilen dokularda çok daha şiddetlidir. Bu sonuç HA içeren kemik çimentosunun CMW1 kemik çimentosuna oranla daha biyouyumlu olduğu yönünde güçlü bir kanıttır. Bu sonucun kesinlik kazanabilmesi için her iki kemik çimentosunun kemik dokusundaki etkilerinin inceleneceği uzun süreli çalışmalara gerek vardır. Gerçekleştirilen çalışmada damarlanması fazla olduğundan implantasyon alanı olarak kas dokusu seçilmiştir. Gelecek çalışmalarda implantasyonun kemiğe yapılarak HA içeren çimentonun emikten ayrılma dayanıklılığına bakılması planlanmıştır. Sonuç olarak %7 oranında HA içeren kemik çimentosunun CMW1'den biyolojik anlamda daha uyumlu olduğu ve gelecekte klinik uygulamada güvenle kullanılabilirliği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Dai KR, Liu YK, Park JB, Clark CR, Nishiyama K, Zheng ZK. Bone-particle-impregnated bone cement: an in vivo weight-bearing study. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 141-56.
2. Giunti A, Moroni A, Olmi R, Vicenzi G. Composite acrylic cement with added hydroxyapatite: a study of the polymerization temperature. *Ital J Orthop Traumatol* 1983; 9: 369-375.
3. Castaldini A, Cavallini A. Setting properties of bone cement with added synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials* 1985; 6: 55-60.
4. Dandurand J, Delpech V, Lebugle A, Lamore A, Lacabanne C. Study of the mineral-organic linkage in an apatitic reinforced bone cement. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 1377-1384.
5. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg* 1960; 43B: 28-30.
6. Park HC, Liu YK, Lakes RS. The Material Properties of Bone-Particle Impregnated PMMA. *J Biomech Eng* 1986; 108: 141-148.
7. Mongiorgi R, Valdre G, Giardino R, Maggi G, Prati C, Bertocchi G. Thermodynamical aspects of the polymerization reaction of PPMA cement mixed with phosphatic mineral phases. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1993; 69: 365-372.
8. Deb S, Braden M, Bonfield W. Water absorption characteristics of modified hydroxyapatite bone cements. *Biomaterials* 1995; 16: 1095-100.
9. Yang JM, Lu CS, Hsu YG, Shih CH. Mechanical properties of acrylic bone cement containing PMMA-SiO₂ hybrid sol-gel material. *J Biomed Mater Res* 1997; 38: 143-54.
10. Kwon SY, Kim YS, Woo YK, Kim SS, Park JB. Hydroxyapatite impregnated bone cement: in vitro and in vivo studies. *Biomed Mater Eng* 1997; 7: 129-40.
11. Morita S, Furuya K, Ishihara K, Nakabayashi N. Performance of adhesive bone cement containing hydroxyapatite particles. *Biomaterials* 1998; 19: 1601-6.
12. Yang JM, Li HM, Yang MC, Shih CH. Characterization of acrylic bone cement using dynamic mechanical analysis. *J Biomed Mater Res* 1999; 48: 52-60.
13. Vallo CI, Montemartini PE, Fanovich MA, López JMP, Cuadrado TR. Polymethylmethacrylate-based bone cement modified with hydroxyapatite. *Biomed Mater Res* 1999; 48: 150-158.
14. Şerbetçi K. Formulation and biomechanical evaluation of bone cements. *Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi*, 2001.
15. Bennett BT. Regulation and requirements. In: Bennett BT, Brown MJ, Schofield JC, eds. *Essentials for animal research: a primer for research personnel*. 2nd ed. National Agricultural Library, Beltsville, Maryland, 1994: 1-9.