



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2021; 35 (1): 01 - 06
http://www.fusabil.org

Hidroksiapatit Esaslı Biyoseramik Malzemelerin İn vitro ve İn vivo Biyouyumluluklarının Belirlenmesi *

Mustafa KÖM ^{1, a}
Okan ERKMEN ^{2, b}
Eren POLAT ^{1, c}
Ömer KAYGILI ^{3, d}
Yesari ERÖKSÜZ ^{4, e}

¹ Firat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Cerrahi Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Tarım ve Orman Bakanlığı,
Elazığ İl Müdürlüğü,
Elazığ, TÜRKİYE

³ Firat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Fizik Bölümü,
Elazığ, TÜRKİYE

⁴ Firat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0001-5026-9559

^b ORCID: 0000-0002-9461-3996

^c ORCID: 0000-0002-3999-1310

^d ORCID: 0000-0002-2321-1455

^e ORCID: 0000-0001-5962-8810

Büyük kemik defektleri kendiliğinden iyileşmesi mümkün olmayıp greftlenmesi gerekir. Bu çalışmada tarafımızdan üretilen hidroksiapatit (HAp) esaslı biyoseramik malzemelerin in vitro ve in vivo biyouyumluluklarının belirlenmesi amaçlandı.

İn vivo deneyleri için her grupta 7 hayvan olacak şekilde 3 gruba ayrılan 42 adet Sprague Dawley ratları kullanıldı. Ratların genel anestezi altında proksimal tibianın medial bölgesinde ikişer adet 2 mm'lik drille kemik defekti oluşturuldu. Oluşturulan defektlere 1. gruptaki olgulara kontrol grubu, 2. gruptaki olgulara ise tarafımızca üretilen alternatif HAp kemik greftleri ile dolduruldu. Üçüncü gruptaki olgulara da ticari hidroksiapatit greftleri dolduruldu. Daha sonra operasyon bölgesi rutin cerrahi kuralara uygun olarak kapatıldı. Bütün ratlar postoperatif 14. ve 28. günlerde sakrifiye edildi. Histopatolojik değerlendirmelerde üretilen HAp implantın kemikleşme sürecinde olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, üretilen HAp kemik grefti olarak kullanılabilirliği uzun süreli ve detaylı araştırmalar ile ortaya konulması yararlı olacağı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Hidroksiapatit, kemik defekti, rat

Determination of In vitro and In vivo Biocompatibility of Hydroxyapatite Based Bioceramic Materials

The reconstruction of large bone defects can not self-repair and needs bone grafts. It was aimed at investigating in vitro and in vivo biocompatibility of hydroxyapatite (HAp) based bioceramic materials that we produced.

In this study, 42 Sprague dawley rats were used for in vivo study. Rats divided into 3 groups equally. After general anesthesia, rats were drilled 2 defect of 2 mm on the upper proximal metaphysis of tibia. In the first group bone defect were left to heal by themselves without using any material. Bone defect were reconstructed with HAp material in the second group. Third group were filled with commercial HAp. Operation wounds were closed using routine surgery. The rats were sacrificed at the postoperative of 14th or 28th days. Histopathologically, It was observed that the HAp produced was in the ossification process.

As a result, we need long term and more detailed examinations for evaluation of hydroxyapatite based bioceramic materials.

Key Words: Hydroxyapatite, bone defect, rat

Giriş

Kemik defektleri iskelet sistemi cerrahisinin en önemli problemlerinden biridir. Konjenital anomaliler, travma, tümör rezeksiyonları, enfeksiyonlar ve kırıklar kemik defektlerinin nedenleri arasında sayılmaktadır. Konjenital ve edinisel kemik defektlerinin tamirinde, kemik grefti uygulamaları sıklıkla başvurulan yöntemlerden biridir. Kemik grefti uygulamalarında en iyi sonuçlar otojen kemik greftleri ile elde edilir (1-6).

Günümüzde, kemik defektlerinin onarımında, otojen kemik greftleri altın kuraldır. Ancak ikinci operasyona ihtiyaç duyulması, operasyon süresini ve travmanın artması, morbidite ve greft miktarının sınırlı olması gibi dezavantajları mevcuttur. Otojen kemik greftleri, kan kaybının artması, enfeksiyon, hastanın normal yaşama geç dönmesi ve hastanede kalış süresinin uzaması gibi sorunları da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle kemik yerine geçebilecek maddelerin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Doğal ve sentetik hidroksiapatitler, trikalsiyum fosfat, kollajen, seramikleri, demineralize kemik matriksleri, polimerler, allojenik veya ksenojenik implantlar gibi kemik yerine geçebilen materyaller oldukça sık olarak kullanılmaktadır. Kullanıma girmiş, farklı köken ve yapıya sahip birçok implant materyali mevcut olmasına rağmen her bir materyalin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Günümüzde ideal kemik grefti materyalleri konusundaki çalışmalar devam etmektedir (6-12).

* Bu çalışma, Okan ERKMEN'nin yüksek lisans tezinden özetlenmiş olup, Firat Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince (FÜBAP) desteklenmiştir (Proje No: VF14.24).

Geliş Tarihi : 20.10.2020
Kabul Tarihi : 11.11.2020

Yazışma Adresi Correspondence

Mustafa KÖM
Firat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Cerrahi Anabilim Dalı,
Elazığ – TÜRKİYE

mkom@firat.edu.tr

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.03.2014 tarihli (2014/8 toplantı sayısı ve 79 numaralı karar) toplantısında alınan etik kurul onayı ile başlandı. Bu çalışmada, başlangıçta HAP üretimi ve katkılanması için gerekli olan kimyasal sarf malzemeleri ve makine teçhizatları temin edildi. Daha sonraki süreçte malzemelerin sentezi, karakterizasyonu, *in vitro* ve *in vivo* biyoyumluluklarının belirlenmesi sağlandı.

Biyomalzemelerin Sentezi: Hidroksiapatit (HAP) numunelerinin sentezlerinde kalsiyum nitrat tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich), diamonyum hidrojen fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Sigma-Aldrich) ve fosfor pentoksit (P_2O_5 , Merck) kimyasalları kullanıldı.

Çözücü olarak saf su kullanılan HAP'in sentezi şu şekildedir: 100 mL'lik 50 mmol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinin içerisine 100 mL'lik 30 mmol $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltisi damla damla ilave edilerek, yeni bir çözelti elde edildi. Bu çözelti, bir manyetik karıştırıcı yardımıyla 80°C'de 3 saat karıştırıldı. Elde edilen karışım, 130°C'deki etüv içerisinde 24 saat kurutuldu. Kurutulan numune, porselen kroze içine dökülerek kül fırınında 900°C'de 3 saat kalsine (ifade doğru mu, yoksa kalsifiye mi) edildi ve beyaz renkte HAP tozu elde edildi.

Çözücü olarak etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) kullanılan HAP'in sentezi şu şekildedir: 100 mL'lik 50 mmol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinin içerisine 100 mL'lik 15 mmol P_2O_5 çözeltisi damla damla ilave edilerek, yeni bir çözelti elde edildi. Daha sonra, yukarıda belirtilen prosedürün aynısı takip edilerek suretiyle diğer bir HAP numunesi üretildi.

Karakterizasyon İşlemleri

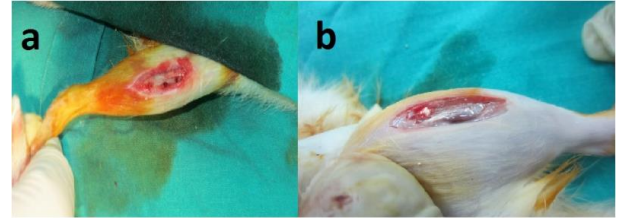
XRD Analizi: Biyomalzemelerin X-ışını kırınımı desenleri, Bruker D8 Advance marka X-ışını kırınım ölçer ile 0.02° tarama hızında $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=0.15406$ nm) radyasyonu kullanılarak kaydedilmiştir. XRD sonuçları kullanılmak suretiyle numunelerin kristal yapıları, ortalama kristal büyüklükleri ve mevcut faz yapıları belirlendi.

In vitro Biyoyumluluk Testi: Biyomalzemelerin *in vitro* biyoyumluluğu yapay vücut sıvısında (SBF) belirlendi. Bunun için Kokubo metoduna göre SBF çözeltisi hazırlanarak, 36.5 °C'deki etüvde bu çözelti içinde numuneler 28 gün bekletildi. 14. ve 28. günlerde bu çözümlerden çıkarılan biyomalzemelerin yapay vücut sıvısında maruz kaldıkları fiziksel ve kimyasal değişiklikler yukarıda adı geçen karakterizasyon işlemleri tekrarlanarak kontrol edildi.

In vivo Biyoyumluluk Testi

Deney Hayvanlarına Uygulanması: Bu çalışmada biyomalzemenin *in vivo* biyoyumluluk deneyleri Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 26.03.2014 tarihli, 2014/8 toplantı sayısı ve 79 numaralı karar sayısı ile yapıldı.

Bu çalışmada 42 adet Sprague Dawley ratlar kullanıldı. Ratlar rastgele eşit üç gruba ayrıldı. Ratlara operasyon öncesi 10 mg/kg dozunda xylazine hydrochloride (Rompun® 23.32 mg/mL, Bayer, İstanbul) ve 40 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketazol® 10 mL, İnterhas, Ankara) intramusküler yolla verilerek anesteziye alındı. Operasyon bölgesinin tıraş ve dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra, ratların sol tibia bölgesi genel cerrahi kurallarına uygun olarak ortaya çıkarıldı. Ratların sol bacaklarının proksimal tibiasının medial bölgesinde 2.0 mm'lik drille ikişer adet kemik defekti oluşturuldu (Şekil 1a). Birinci gruptaki olgularda oluşturulan defektlere herhangi bir kemik grefti doldurulmadı ve kontrol grubu olarak değerlendirildi. İkinci gruptaki olgularda ise oluşturulan defektlere tarafımızca üretilen alternatif kemik greftleri ile dolduruldu (Şekil 1b). Üçüncü gruptaki olgularda oluşturulan defektlere ise ticari hidroksiapatit (0.3-0.6 mm 1 g Idrossilappatite AT®, Monous Padova) greftleri ile dolduruldu. Daha sonra operasyon bölgesi rutin cerrahi kurallara uygun olarak kapatılarak, ratların sol bacakları pansumanla korundu.



Şekil 1. Tibia'nın proksimalinde oluşturulan kemik defekti (a), Kemik greftinin defektli bölgeye yerleştirilmesi(b)

Postoperatif Bakım: Ratlara postoperatif olarak oluşabilecek enfeksiyonlara karşı 5 gün boyunca subkutan yolla antibiyotik (Baytril K, 2x1) uygulaması yapıldı. Ağrı kontrolüne yönelik ise subcutan yolla 0.07 µg/kg dozunda fentanil sitrat (Fentanil 0.07 µg/kg, 2x1) uygulandı. Ratlar 28 gün boyunca standart kafeslerde, standart yemler kullanılarak ad-libitum olarak beslendi.

Ötenazi: Her üç gruptaki ratların yedişer tanesi postoperatif 14. günde, diğer yedişer tanesi ise postoperatif 28. günde CO₂ solutarak ötenazi edildi. Alınan kemik dokusu örneklerinin incelenmesi amacıyla Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi. Dokuların histopatolojik değerlendirilmeleri yapıldı.

Patolojik Değerlendirmeler: Kemik örneklerinde oluşturulan defekt alanı çini mürekkebiyle işaretlendikten sonra %10 tamponlu formalin çözeltisinde tespit edilerek, %10 dekalsifikasyon çözeltisinde (Cal-Ex, Fischer Scientific, ABD) dekalsifiye edildi. Doku örnekleri rutin işlemlerden geçirilip parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan bloklardan elde edilen 5 mm kalınlığındaki kesitler hematoksilin-eozin ile boyandı (H&E). Defekt sahasında fibroblastlar, kıkırdak hücreleri ve kemik hücreleri gibi yeni oluşan dokular, ışık mikroskobu altında hücre tiplerine göre değerlendirildi.

Biyomalzeme implantı olarak uygulanan kemik dokuları alınarak %10'luk formaldehit çözeltisinde 24 saat bekletildi. Kemik dokusu nitrik asit ile yapılan dekalsifikasyon işleminden sonra parafin bloklarına gömüldü. Dokuların 3-5 µm kalınlığında kesitleri alınmasından sonra, H&E ile boyanarak gruplar hakkında bilgisi olmayan bir patolog tarafından değerlendirildi. Biyomalzeme ile kemik dokusu arasındaki reaksiyonların varlığı, zaman içerisinde kemik dokusuna dönüşümü ve osteoblastik aktiviteleri değerlendirme kriterleri olarak kabul edildi.

Bulgular

Klinik Bulgular: Klinik olarak tüm gruplardaki olgularda operasyon bölgesi yaralarının normal iyileştiği, postoperatif 14. ve 28. günlerde herhangi bir enfeksiyona veya tibia defektlerine bağlı herhangi bir kırık olgusuna rastlanmadı. Çalışma boyunca deneklerin hepsinin operasyonları iyi bir şekilde tolere ettiği ve çalışma sonuna kadar hiçbir deneğin ölmediği tespit edildi.

Ratların postoperatif dönemde anesteziden kaynaklı hiçbir komplikasyonla karşılaşmadan uyanıp normal fonksiyonlarına döndükleri görüldü. Postoperatif dönem ve çalışma boyunca yapılan kontrollerde herhangi bir komplikasyonla karşılaşılmayan deneklerin diğişleri 10. günde alındı.

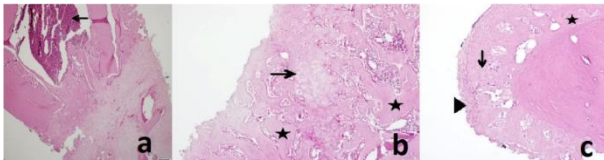
Makroskobik Bulgular: Yapılan makroskobik incelemelerde, ratların tibia kemikleri üzerinde defekt oluşturulan bölgelerinde iyileşme sürecinin normal olduğu tespit edildi. Oluşturulan defektlerin sınırlarının belli olduğu ve yerleştirilmiş implantların ise orijinal kalınlığında olduğu tespit edildi.

Histopatolojik Bulgular

Ondört Günlük Grupların Histopatolojik Bulguları: Kontrol grubunun 14. gününde yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda; kemikle çevrili kanama alanları görüldü (Şekil 2a).

Deney grubunun 14. gününde yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda; belirgin kırık dokusu ile etrafında yeni oluşan kemik dokusu tespit edildi. (Şekil 2b).

Ticari hidroksiapatit greftlerin kullanıldığı gruptaki ratların 14. günde yapılan histopatolojik incelemeleri sonucunda; kırık dokusu ve bağ dokusu ile yer yer kemik dokusu alanları tespit edildi (Şekil 2c).



Şekil 2. Çalışmanın 14. gününde kontrol grubu (a), deney grubu (b) ve ticari greft uygulanan gruptaki ratların histopatolojik bulguları (c)

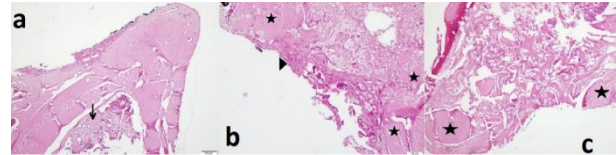
Yirmisekiz Günlük Grupların Histopatolojik Bulguları:

Kontrol grubunun 28. gününde yapılan histopatolojik incelemelerde lameller kemikle çevrili yeni oluşan kemik dokusu alanları görüldü (Şekil 3a).

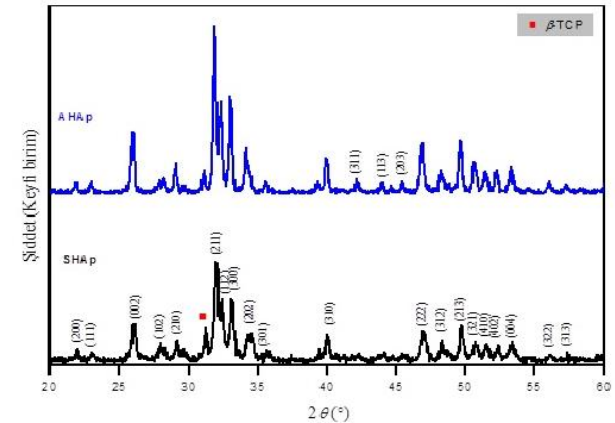
Deney grubunun 28. gününde yapılan histopatolojik incelemelerde, kemik dokusu ve yer yer bağ dokusu alanlarının görüldüğü tespit edildi (Şekil 3b).

Ticari hidroksiapatit greft uygulanan gruptaki ratların 28. günde yapılan histopatolojik incelemelerinde belirgin kemik dokusu trabeküler alanların olduğu tespit edildi (Şekil 3c).

XRD Sonuçları: Alkolün çözücü madde olarak kullanılması sonucu üretilen numune (AHAp) ile saf suyun çözücü madde olarak kullanılması sonucu sentezlenen numune (SHAp) için elde edilen XRD desenleri Şekil 4'de belirtildi. Her iki numune için de görülebileceği üzere ana faz hidroksiapatittir ve bu faza ilave olarak beta trikalsiyum fosfat ikincil fazının oluşumu da tespit edilmektedir.



Şekil 3. Çalışmanın 28. gününde kontrol grubu (a), deney grubu (b) ve ticari greft uygulanan gruptaki ratların histopatolojik bulguları (c)



Şekil 4. Üretilen hidroksiapatit numunelerine ait XRD desenleri

Hezagonal yapıdaki hidroksiapatite ait örgü sabitleri (a ve c),

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (5.1)$$

denklemini yardımıyla bulunabilir [Cullity, B.D., 1978. Elements of X-ray diffraction, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts]. Denklem (5.1),

(300) ve (002) düzlemleri için yeniden düzenlenirse a ve c örgü sabitleri sırasıyla,

$$a = 2\sqrt{3}d_{300} \quad (5.2)$$

$$c = 2d_{002} \quad (5.3)$$

şeklinde elde edilir. Bu denklemler kullanılarak örgü sabitleri (a ve c) hesaplanabilir. Bulunan örgü sabitleri yardımıyla birim hücre hacmi (V),

$$V = 0,866a^2c \quad (5.4)$$

bağıntısından yararlanarak bulunabilir. SHAp için $a=0.9362$ nm, $c=0.6818$ nm ve $V=0.5175$ nm³ olarak hesaplandı. AHAp içinse $a=0.9418$ nm, $c=0.6885$ nm ve $V=0.5289$ nm³ bulundu. Sentez sırasında kullanılan çözücünün üretilen numunelerin kristal yapı parametreleri üzerinde etkisi gözlemlendi. X-ışını kırınımı sonuçları kullanılarak numunelerin kristal büyüklüklerini, Scherrer denklemi olarak bilinen

$$D = \frac{0,9\lambda}{B_{\frac{1}{2}} \cos \theta} \quad (5.5)$$

bağıntısı yardımı ile hesaplamak mümkündür. Burada $B_{\frac{1}{2}}$ ise yarı pik genişliğidir. D değeri SHAp için 27.01 nm ve AHAp için 33.12 nm olarak hesaplanmıştır. HAp numuneleri için kristalleşme derecesi (X_c),

$$X_c \approx 1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}} \quad (5.6)$$

bağıntısı ile hesaplanabilir (12). Burada $V_{112/300}$ (112)

ve (300) yansımaları arasındaki çukurun şiddeti ve I_{300} ise (300) düzlemine ait yansımanın şiddetidir. X_c değeri SHAp için %75.6 ve AHAp için %91.7 olarak bulundu.

Tartışma

Kemik doku yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip olmasına rağmen büyük kemik defektleri sonucunda non-union, fibröz doku oluşumu ve pseudoartroz gibi komplikasyonlarla karşılaşılabilir. Kemik defektlerinin onarılması için otojen kemik greftleri, biyoseramikler ve sentetik bileşikler kullanılmaktadır (1-3).

Otojen greftlerin, osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklere sahip olması ve vücudun reddetme ihtimalinin olmaması sebebiyle büyük kemik defektlerinde başarı şansı en çok olan yöntemdir. Otojen kemik greftlerinin dezavantajları dolayısı ile kemik defektlerinin onarımında allogreftler, ksenogreftler, alloplastik materyallerin

alternatiflerinin kullanımı olanakları araştırılmaktadır. Bu çalışmada bu alternatiflere bir seçenek oluşturmak amacıyla tarafımızdan üretilen HAp bir implant materyalinin etkinliğini araştırmak amaçlandı.

Kemik dokusunda oluşan defektler, kemik dokusuna yapılan operasyonlar sonucu her zaman kendiliğinden iyileşmeyebilir (1, 3, 13). Kritik boyutlu kemik defektleri, canlının yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşmeyeceği kemik defektleri anlamına gelir. Kemik dokudaki bir yaralanmanın kritik boyutta olup olmamasını; canlının yaşı, cinsiyeti, türü, genel sağlık durumu, defektin lokalizasyonu ve derinliği gibi etkenler belirler. Birçok araştırmacı (10, 14-16) kritik boyutlu kemik defektleri konusunda hayvan türlerine çeşitli görüşler bildirmişlerdir. Hollinger ve ark. (17), rat kemiklerinde 8 mm çapındaki kemik defektlerinin postoperatif 13. ayda hala kendiliğinden iyileşmediğini bildirmişlerdir. Mulliken (18), ve Glowacki (19), ratların pariyetal kemiklerinde oluşturdukları 2 mm' lik defekte 6. ayın sonunda ideal bir iyileşme bulamadıklarını bildirmişlerdir. El-Rashidy (20), kemik iyileşmesini takiben defekt bölgesinin spontan bırakılmasıyla bölgenin hızla bağ dokusu ile dolması sonucunda iyileşmenin olumsuz etkileneceğini bildirmiştir. Sergeeva ve ark. (21), birçok biyomateryallerin osteogenezis üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, kemik defektlerine değişik greft materyalleri ile boş bırakılan kontrol grubunun postoperatif 60. günde histopatolojik incelemelerinde; kontrol grubunda kemik iyileşmesinin oldukça zayıf olduğunu ve kısmi bir fibrotik iyileşme gözlediklerini; kemik grefti yerleştirilen gruplarda belli oranda osteogenezisin olduğunu bildirmişlerdir. Cestari ve ark. (22) kafatasındaki 9.5 mm çapındaki defektlere sıgır kaynaklı blok greft uyguladıkları grup ile kontrol grubunu karşılaştırmak amacıyla yaptıkları araştırmalarında; blok greftin çevredeki yumuşak dokunun defekt bölgesine çökmesinin engellendiği ve iyileşmenin erken döneminde greftli grupta kontrol grubuna göre daha fazla kan desteği sağlandığı belirlenmiştir. Bu çalışmada da kritik boyutlu kemik defektleri oluşturmak amacıyla tibia kemiğine 2.0 mm çapında defektler oluşturuldu. Bu çalışmada da diğer literatürleri destekleyecek şekilde, kontrol grubunda, kemik grefti kullanılan diğer iki gruba göre daha az yeni kemik oluşumu olduğu tespit edildi.

Yapılan bu çalışmada, defekt oluşturulan kemik alanında Hematoksilen ve Eosin boyama yapılarak gruplar arasında fibrozis, yabancı cisim ve primer kemik dokusu oluşumu histopatolojik olarak değerlendirildi. Deneysel çalışmalar (1-3, 13, 22) gözden geçirildiğinde histopatolojik değerlendirme dönemlerinin farklı olduğu görülmektedir. Kemikleşmenin 1-2. haftadan itibaren başladığı, 6-8. haftalarda defektlerin re-organize olarak dolduğu bildirilmektedir. Yapılan bu çalışmada olguların postoperatif takip süresi 2 ve 4 hafta olarak seçilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar yeni kemik oluşumu ve anjiogenezis için 4 haftalık sürenin ideal olduğu bildirilmiştir (14, 23-27). Yapılan bu çalışmada da bu durumdan yola çıkarak çalışmayı 28. günde sonlandırılması tercih edildi.

İdeal kemik greftlerinde oluşan defekte belirli bir süre varlığını koruması, kemik yapımını desteklemesi,

yeni kemik yapımı esnasında aşamalı olarak rezorbe olması, kemik yeterli stabiliteyi sağlaması ve kemik yapıya ulaştığında ortamda artıkları kalmaması tercih edilir (1, 3, 14, 23-28). Hidroksiapatit malzemelerdeki in vivo etkinlik kimyasal bileşimlerine, kristal yapılarına, vücut sıvılarında stabilitesini korumasına ve rezorbsiyon karakterine bağlıdır. Kullanılmakta olan HAp kemik greftlerinin çoğu kemik içinde varlığını sürdürmekte ve kemiğin tümüyle rejenerasyonu engellemektedir. Bu durum ileri aşamalar için biyomekanik bir risk oluşturmaktadır. Hidroksiapatit greft materyallerinin kimyasal bileşimi insan kemiğinin doğal yapısı ile benzerlikler taşımaktadır. Bu greftlerin poröz yapısı ve partikül büyüklüğü rezorbe olma derecesini etkilemesine rağmen, kemikle bağlantı oluşturmasını engellemektedir. Greftlerin partikül büyüklükleri aktif rezorpsiyon mekanizmasını etkilemektedir. Mikropartiküller osteoklastlar tarafından rezorbe edilebilirken, 0.1-0.3 mm'den daha büyük partiküllerin bu hücreler tarafından rezorpsiyonu azalmaktadır. 1-3 mm büyüklüğündeki partiküller ise rezorbe olmamaktadır (3, 8, 9, 28, 29).

Greftlerin por büyüklükleri de kemik oluşumunda önemli bir etkidir. Por büyüklüğünün 300 X_m'den daha

büyük olduğu durumlarda yeni kapiller ve kemik oluşumu artmaktadır. Por büyüklüğünün 100 X_m'den daha küçük olması durumunda greftin uygulandığı bölgeye hücreler ve kapillerler ulaşamayacağı için yeni kemik yapımı gerçekleşemez (29, 30-33).

Optimum kemik rejenerasyonunun gerçekleşmesi için minimum por büyüklüğünün 200-400 X_m olması gerektiği bildirilmiştir. Yeterli damarlaşma, osteokondüksiyon ve mineralize doku oluşumunun gerçekleşmesinin ancak bu şekilde olabileceği ileri sürülmüştür. Zhang ve ark. (30)'nın tavşanlarda yaptıkları bir çalışmada optimum osteokondüksiyon için por büyüklüğünün 300 X_m olması gerektiği ileri sürülmüştür. Yapılan bu çalışmada partikül büyüklüğü 0.6 mm olan, %50 poroziteye sahip HAp greft materyalleri kullanıldı.

Sonuç olarak, elde edilen histopatolojik bulgular ışığında; üretilen HAp greft materyalinin büyük kemik defektlerinin olduğu durumlarda uygulanabilirliğinin olduğu fakat bu greftlerinin rutin olarak kullanılabilirliğinin saptanması amacıyla uzun süreli ve detaylı klinik, fizyolojik, patolojik ve toksikolojik çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı kanısına varıldı.

Kaynaklar

- Can HN. Tavşanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerinde Değişik Greft Materyalleri ve Trombositten Zengin Fibrin'in Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2013.
- Durmuş AS, Çeribaşı AO, Can HN. Effects of coral and demineralized bone matrix on bone healing. FÜ Sağ Bil Vet Derg 2016; 30: 131-136.
- Fırat Öztöpalan D, Durmuş AS. Biyoaktif cam ile mineralize ve demineralize kemik matriksinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin radyolojik olarak karşılaştırılması. FÜ Sağ Bil Vet Derg 2018; 32: 1-5.
- Frost H. The biology of fracture healing. Part I. Clin Orthop Rel Res 1989; 248: 283-293.
- Frost H. The biology of fracture healing. Part II. Clin Orthop Rel Res 1989; 248: 294-309.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology I: Structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. Instructional Course Lectures 1996; 45: 371-386.
- Junqueira L.C, Carneiro J. Basic Histology. 10th Baskı, New York: McGraw-Hill, 2003.
- Kaygılı Ö. Sol Jel Metodu ile Üretilen Hidroksiapatit Esaslı Biyoseramik Malzemelerin Mikroyapı ve Fiziksel Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
- Kayalı ES. Ticari İnert Cam Katkılı Hidroksiapatit-alümina ve Hidroksiapatit-zirkonya Kompozitlerinin Üretimi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014.
- Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, et al. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. PNAS 2010; 107: 13614-13619.
- Zhang JC, Lu HY, Lv GY, et al. The repair of critical-size defects with porous hydroxyapatite/polyamide nanocomposite: An experimental study in rabbit mandibles. Int J Oral Maxillofac Surg 2010; 39: 469-477.
- Landi E, Tampieri A, Celotti G, Sprio, S. Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites. J Eur Ceram Soc 2000; 20: 2377-2387.
- Chang BS, Lee CK, Hong KS, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. Biomaterials 2000; 21: 1291-1298.
- Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. J Craniofacial Surg 2002; 13: 231-239.
- Develioğlu H. Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2003; 6: 60-63.
- Liu FZ, Wang DW, Zhang YJ, et al. Comparison of rabbit rib defect regeneration with and without graft. J Mater Sci. Mater Med 2017; 28: 2-6.
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. J Craniofac Surg. 1990; 1: 60-68.
- Mulliken JB, Glowacki J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. Plast. Reconstr Surg 1980; 65: 553-560.
- Glowacki J, Kaban LB, Murray JE, Folkman J, Mulliken JB. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. Lancet 1981; 2: 959-962.
- El-Rashidy AA, Roether JA, Harhaus L, Kneser U, Boccaccini AR. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models. Acta Biomater 2017; 62: 1-28.

21. Sergeeva NS, Sviridova IK, Frank GA, et al. Criteria of biocompatibility of materials for bone defect repair. *Bull Exp Biol Med.*2014;157: 689-694.
22. Cestari TM, Granjeiro JM, De Assis GF, Garlet GP, Taga R. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model. *Clin Oral Implants Res* 2009; 340-350.
23. Alberius P, Johnell O. Repair of Membraneous Bone Fractures and Defects in Rats. *J Cranio Maxillofacial Surg* 1991; 19: 15-20.
24. Schmid J, Walkkamm B, Hammerle CH, Gogolewski S, Lang NP. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res* 1997; 8: 244-248.
25. Herron S, Thordarson DB, Winet H, Luk A, Bao JY. Ingrowth of bone into absorbable bone cement: An in vivo microscopic evaluation. *Am J Orthop* 2003; 32: 581-584.
26. Huang YH, Jakus AE, Jordan SW, et al. Three-dimensionally printed hyperelastic bone scaffolds accelerate bone regeneration in critical-size calvarial bone defects. *Plast Reconstr. Surg* 2019; 143: 1397-1407.
27. Lee JE, Bark CW, Quy HV, et al. Effects of Enhanced Hydrophilic Titanium Dioxide Coated Hydroxyapatite on Bone Regeneration in rabbit Calvarial Defects. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 36-40
28. Hamidabadi HG, Shafaroudi MM, Seifi M, et al. Repair of critical-sized rat calvarial defects with three-dimensional hydroxyapatite-gelatin scaffolds and bone marrow stromal stem cells. *Med Arch* 2018; 72: 88-93.
29. Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J* 2016; 98-B(1 Suppl A): 6-9.
30. Zhang JC, Lu HY, Lv GY, Mo AC, Yan YG, Huang C. The repair of critical-size defects with porous hydroxyapatite/polyamide nanocomposite: An experimental study in rabbit mandibles. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010; 39: 469-477.
31. Sanz M, Vignoletti F. Key aspects on the use of bone substitutes for bone regeneration of edentulous ridges. *Dent Mater* 2015; 31: 640-647.
32. Sanchez de Val JE, Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, et al. Physical properties, mechanical behavior, and electron microscopy study of a new α -tcp block graft with silicon in an animal model. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100: 3446-3454.
33. Zheng H, Bai Y, Shih MS, et al. Effect of a β -TCP collagen composite bone substitute on healing of drilled bone voids in the distal femoral condyle of rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2014;102: 376-383.