



Bir cam-seramik biyomalzemenin üretimi, tanımlanması ve biyolojik etkilerinin canlı-dışı ve canlı-içi ortamda değerlendirilmesi

Production and characterization of a glass-ceramic biomaterial and in vitro and in vivo evaluation of its biological effects

Taşkın CEYHAN,¹ Volkan GÜNAY,² Ahmet ÇAPOĞLU,³ Hakan SAYRAK,⁴ Çetin KARACA⁵

¹Özel Çevre Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü; ²TÜBİTAK-MAM Malzeme Enstitüsü; ³Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Seramik Bilimi ve Mühendisliği Bölümü; ⁴İstanbul Paşabahçe Devlet Hastanesi Patoloji Kliniği; ⁵İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi

Amaç: Cam-seramikler kemik yerine kullanılabilen, genellikle sol-jel yöntemiyle elde edilen biyomalzemelerdir. Kemik dokusu ile organik bağlarla bütünleşmesi (osteointegrasyon) önemli özellikleridir. Bu çalışmada bir biyocam-seramik üretilerek, yapısal özellikleri ve canlı-dışı (*in vitro*) ve canlı-içi (*in vivo*) biyolojik etkileri değerlendirildi.

Çalışma planı: Sol-jel toz sentezi yöntemiyle, tetraetilortosilikat, dibütilfosfat, magnezyum ve kalsiyum nitrat kullanılarak, $30\text{SiO}_2-17\text{MgO}-53\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ formülüne yakın cam seramik elde edildi. Örnekler 1100 °C'ye kadar sıcaklık uygulanarak, mikroyapıları ve oluşan kristal fazlar taramalı elektron mikroskobu ve X-ışını kırınımı (difraksiyon) (XRD) ile incelendi. Canlı-dışı test için, cam-seramik örnekleri 10, 30 ve 40 gün süreyle, plazma içindeki iyonları içeren yapay vücut sıvısı (YVS) içinde bekletildi. Daha sonra, XRD ile incelendi. Son olarak, canlı-içi test için örnekler Sprague-Dawley türü sıçanların tibia kemiklerine gömülerek kemik dokusu ile 4, 6 ve 8 haftalık sürelerde bütünleşmesi incelendi.

Sonuçlar: Üretilen cam-seramikte sıcaklık artmasıyla kristal fazların büyüdüğü görüldü. Yapay vücut sıvısı içinde 10 gün bekletilmiş örneklerde XRD'de değişiklik olmazken, 30 ve 40 gün bekletilen örneklerin 2. ve 3. derece kristal evrelerinde hidroksiapatit kristal oluşumu gözlemlendi. Canlı-içi deney sonuçları, cam-seramiğin kemiksi dokunun yerini almaya ileri derecede yatkın olduğunu ve sekiz hafta içinde kemik ile bütünleştiğini gösterdi.

Çıkarımlar: Ürettiğimiz cam-seramik yüzey-reaktif ve ortopedide kemik yerini tutucu malzeme olarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Biyouyumlu malzeme; seramik; cam; toz; sıçan; yüzey özellikleri.

Objectives: Glass-ceramics are biomaterials that are usually produced by the sol-gel technique and can be used as a substitute for bone. One important feature of glass-ceramics is osteointegration with bone tissue. This study was designed to produce a glass-ceramic and evaluate its structure and *in vitro* and *in vivo* biological effects.

Methods: With the sol-gel method, a glass-ceramic was synthesized in the form of $30\text{SiO}_2-17\text{MgO}-53\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ using tetraethylorthosilicate, dibutyl phosphate, magnesium, and calcium nitrate. Glass-ceramic gel samples were sintered at temperatures up to 1100 °C and their microstructure and phases were examined by the X-Ray diffraction (XRD) technique and scanning electron microscopy. For *in vitro* tests, the samples were immersed in a simulative body fluid (SBF) for 10, 30, and 40 days to be analyzed by XRD. For *in vivo* tests, the samples were placed in tibial metaphyses of Sprague-Dawley rats for 4, 6, and 8 weeks for histological evaluation of osteointegration.

Results: As the temperature increased, growth of crystal phases was noted. While XRD analysis showed no change in samples that were kept in SBF for 10 days, hydroxyapatite crystals were seen after 30 and 40 days of SBF treatment in the second and third degree of crystal phases. *In vivo* test results showed that the glass-ceramic possessed a high tendency to replace osteoid bone tissue, with full osteointegration at eight weeks.

Conclusion: The glass-ceramic produced has a high surface reactivity and can be used as a bone substitute material.

Key words: Biocompatible materials; ceramics; glass; powders; rats; surface properties.

Yazışma adresi / Correspondence: Dr. Taşkın Ceyhan, Özel Çevre Hastanesi, Cemal Sair Sok., No: 2, 34394 Mecidiyeköy, İstanbul.
Tel: 0212 - 274 69 25 Faks: 0212 - 275 94 26 e-posta: tceyhan@tnn.net

Başvuru tarihi / Submitted: 12.02.2007 **Kabul tarihi / Accepted:** 05.09.2007

XVIII. Milli Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi'nde sözel olarak sunulmuştur (18-23 Ekim 2003, Grand Cevahir Kongre Merkezi, İstanbul). SICOT/SIROT 2002 XXII. Dünya Kongresi'nde sözel olarak sunulmuştur (23-30 Ağustos, 2002, San Diego, California, ABD).

©2007 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği / ©2007 Turkish Association of Orthopaedics and Traumatology

Biyomalzemelerin önemli bir bölümünü oluşturan seramikler canlı doku ile ilişkileri yönünden eylemsiz (inert) olanlar (Al_2O_3), emilenler (resorbe olanlar) (Ca_3PO_4 , hidroksiapatit) ve yüzey-tepkili (reaktif) (cam-seramik, cam) olanlar şeklinde sınıflandırılabilir.^[1] Yüzey-tepkililik, yüzeyinde Ca, P element değişimi yapma ve hidroksiapatit (HA) kristalleri oluşturma özelliğidir.^[2] Yüzey-tepkili seramikler genellikle ergitme, seramik işlemleri veya sol-jel yöntemiyle üretilmektedir.^[2] Sol-jel ismi İngilizce “solution-gelation” sözcüklerinin birinci hecelerinin birleştirilmesinden çıkmıştır; çözeltiliye alma-pelteleştirme (jelleştirme) yöntemidir. Çeşitli metal-alkoksitler, metal tuzları, alkol ve karbon içeren (organik) çözücüler ve suyun kullanıldığı sol-jel yöntemi, toz şeklinde kullanılacak yüzey tepkili seramikler için en uygun üretim yöntemlerinden biridir.^[3] Tozların içerdikleri kristal fazlarının boyutları nanometre seviyelerinde tutulabilmektedir. Tüm bu özellikler hem üretim, hem daha sonra uygulanan ısı işlemler sırasında kazanılabilmektedir. Cam-seramikler canlı kemiğine yerleştirildiğinde, vücuda zarar vermemekte ve kemik dokusu ile bütünleşmektedir. Bu aynı zamanda biyouyumluluğunun da göstergesidir.

Isıyla birleştirilmiş (sinterlenmiş) seramikler yanında toz halinde olanlarının da kemik yerini tutan malzeme olarak kullanılması düşünülmüştür. Yurtdışında olduğu gibi yurtiçinde de birçok seramik malzeme bilimcisi ürettiği malzemenin biyolojik etkilerini merak etmektedir. Malzemeyi üreten grubun malzemenin özelliklerini ve biyolojik etkilerini tanımlaması şarttır. Üretilen malzemenin doku ile etkileşiminde üstünlük ve farklılığının saptanması için kansıvı (plazma) benzeri sıvı ve fibroblast, osteoblast gibi çeşitli hücrelerle canlı-dışı (*in vitro*), hayvan modellerinde ise canlı-içi (*in vivo*) denemesi gerekmektedir.

‘Biyouyumluluğun incelenmesi’ bilimi (disiplini) ülkemizde üzerinde az çalışılan bir alandır. Çalışmamızın özelliği, Türk seramikçiler tarafından ortopedide kullanım amaçlı üretilen cam-seramiğin biyouyumluluğunun, kemik dokusunu tanıyan cerrahi deneyimi olan bir ekiple, çoklubilim (multidisipliner) anlayışla incelenmesidir. Bu çalışmada, belirtilen gerekçelerle ortopedik cerrahide kullanım için, sol-jel yöntemiyle ağırlıkça (%30 SiO_2 -17MgO-53 Ca_3PO_4) formülünde cam-seramik tozları üretmek, özelliklerini belirlemek ve biyolojik etkilerini canlı-dışı ve canlı-içi testlerle incelemek amaçlandı.

Gereç ve yöntem

Cam-seramiğin hazırlanması

Ağırlıkça %30 SiO_2 -17MgO-53 Ca_3PO_5 hedef yapısında cam-seramik tozunun hazırlanması için, SiO_2 kaynağı olarak sıvı TEOS [tetra etil ortosilikat - $Si(C_2H_5)_4$], P_2O_5 kaynağı olarak dibütilfosfat ($C_{12}H_{27}O_4P$), MgO ve CaO kaynağı olarak Ca-nitrat ($Ca(NO_3)_2$) ve Mg-nitrat ($Mg(NO_3)_2$) tuzları kullanıldı. Yüzde ağırlıkları en son toz ağırlıklarıdır. Ayrıca, distile su, etanol katalizörler (0.1 normal hidroklorik asit ve asetik asit), TEOS, $Mg(NO_3)_2$ ve $Ca(NO_3)_2$ ile uygun molaritelerde oda sıcaklığında ve manyetik karıştırıcı kullanılarak hazırlandı. Berrak çözeltilinin, daha sonra 40 °C’de etüvde tutularak hidroliz ve polimerizasyon tepkimeleri sonucu pelteleşmesi ve yavaş kuruması sağlandı. Hazırlanan peltenin kireçlendirilmesi (kalsinasyon) işlemleri, elektrikli fırında 100, 500, 900 ve 1100 °C sıcaklıklarda bir saat tutularak ve fırın içinde soğutularak gerçekleştirildi. Kireçlendirme, seramikte kristal yapının çeşitlendirilmesini, çoğaltılmasını ve sınırı aşan sıcaklık uygulamasından sonra -bizim örneğimiz için 1400 °C- kristal yapının kaybolarak cam haline gelmesini sağlamaktadır. Kireçlendirilen pelte (jel) parçaları havanda hafifçe öğütüldü, toz haline getirilerek özelliklerinin tanımlanması işlemlerinde ve canlı-içi, canlı-dışı testlerde kullanıldı.

Cam-seramiğin özelliklerinin belirlenmesi

Malzemenin özelliklerinin belirlenmesinde kimyasal çözümlenme için yarı-niceliksel X-ışını-floresan dalga boyu ölçüm yöntemi (spektrometre) (XRF) (Philips, PW 2404 WDXRF, Japonya); evre çözümlenmeleri için X-ışını kırınım (difraksiyon) (XRD) (Shimadzu, XRD-6000, Japonya) ve mikroyapı incelemeleri ve çözümlenmeler için taramalı elektron mikroskobu (SEM/EDS, SEM-6335F, JEOL, Japonya) kullanıldı.

Cam-seramik tozlarında yapılan XRD çalışmaları 2 teta tarama açısının 0-70° olduğu aralıkta yapıldı. Elektron mikroskobu incelemesi için malzeme üzerinde herhangi bir işlem yapılmadı. Tekniğin gereği örneklerin yüzeyi altın kaplandı ve daha sonra incelendi. Toz halinde olan cam-seramiğin mekanik özellikleri incelenmedi.

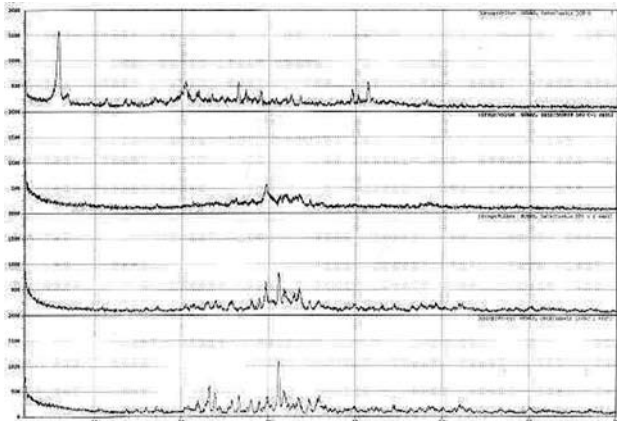
Canlı-dışı test yöntemi: Kansıvı içindeki iyonları (mol mm^{-1} olarak: Na^{+142} , K^{+5} , $Ca^{+2.5}$, Mg^{+2} , $Cl^{-147.8}$, HCO_3^{-2} , HPO^{-1} , SO_4^{-5}) eşit ağırlıkta içeren yapay vücut sıvısı (YVS) kullanım için hazırlandı (Bifarma, Türkiye). Hazırlanmış cam-seramiklerden alı-

Tablo 1. X-ışını-floroskopi ile yapılan kimyasal çözümlemede hedeflenen ve gerçekleşen sonuçlar

Bileşen	Hedef (% Ağırlık)	Ölçülen (% Ağırlık)
SiO ₂	30	28
MgO	17	15
CaO	28.73	38
P ₂ O ₅	24.27	18

nan ve 100, 500, 900 ve 1100 °C'ye kadar kireçlendirilen örnekler YVS içinde 10, 30 ve 40 gün bekletildi. Daha sonra, kristal değişikliklerinin ve Ca, P ve HCA (hidroksi karboksit apatit) içeren kristallerin saptanması için XRD ile incelendi.

Canlı-içi test yöntemi: Etik Kurul izni ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Yetiştirme Merkezi çalışma düzeyine uygun olarak, sol-jel yöntemiyle hazırlanan, 900 °C'de kireçlendirilmiş toz cam-seramik örnekler, beşli gruplara ayrılmış 20 adet Sprague-Dawley türü sıçanın sağ ve sol ekstremiteleleri proksimal tibia metafizleri içine yerleştirildi. Bunun için, 900 °C'de ısıtıldığında ve YVS ile muamele sonrası en fazla hidroksiapatit kristali içeren, yani yüzey-tepkime özelliği fazla olan örnekler seçildi. Toz halinde olan seramik, ince oyucu uçlarla 3.5 mm³'lük alanlara (1.5x1.5x1.5 mm) yerleştirildi. Sıçanların yaşamı 2, 4, 6 ve 8 hafta sonra sonlandırıldı ve tibia proksimal metafizleri cerrahi olarak çıkarıldı. Malzeme içeren kemikler, tamponlanmış formalin solüsyonunda tespit edildi, formik asit ile yumuşatıldıktan sonra, derecesi gittikçe artan alkollerle suyu alınarak parafin içine gömüldü ve 5-10 µm kalınlığında kesitler hazırlandı. Hematoksilin-eozin (H-O) ile boyanarak ışık mikroskobu ile incelendi (Olympus Bx50, Japonya).

**Şekil 1.** Farklı sıcaklıklarda (100 °C, 500 °C, 900 °C ve 1100 °C) ısıtılma tabii tutulan camseramiklerin X-ışını difraksiyon diyagramları.**Tablo 2.** X-ışını-floroskopide 500 °C'de ısıtılma tabii tutulan örnekte ana bileşenlerin kimyasal dağılımı

Oksit	% Ağırlık
SiO ₂	34.15
MgO	18.59
CaO	32.57
P ₂ O ₅	15.61

Kesitlerde 100 °C'de bekletilerek kurutulan cam-seramiklerin canlı kemik dokusu ile etkileşimi zamanla bağlı olarak incelendi.

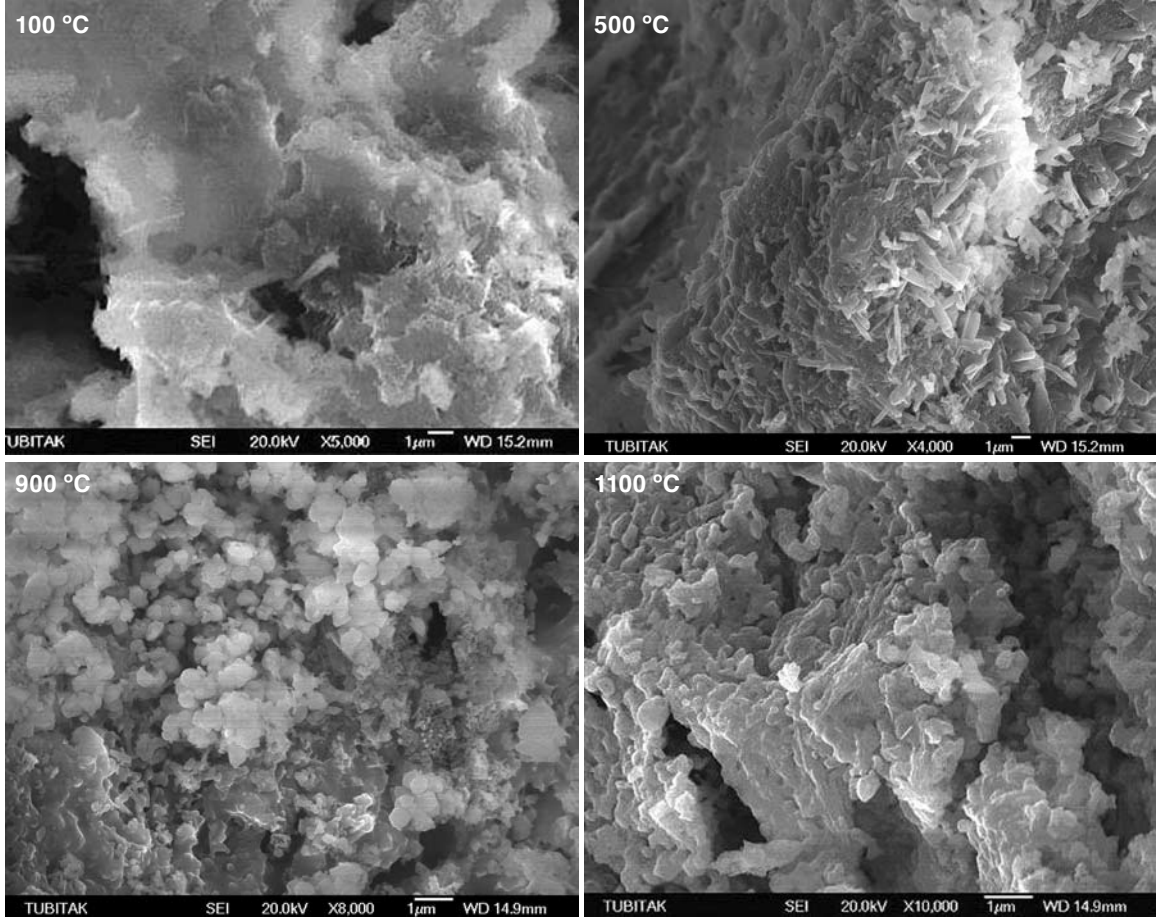
Sonuçlar

Üretim sonrası XRF ile yapılan kimyasal çözümlemede, hedeflenen formülden sapmalar olduğu gözlemlendi. Hedeflenen ve gerçekleşen sonuçlar Tablo 1'de, örnek olarak, 500 °C'de ısıtılan örneğin XRF ile çözümleme sonucu Tablo 2'de gösterildi. XRD çözümlemesinde, cam-seramik örneklerinin artan kireçlendirme sıcaklıklarıyla birlikte, XRD piklerinin boyutlarında büyümeler gözlemlendi (Şekil 1). XRD diyagramlarına göre tanımlanan evreler Tablo 3'de gösterildi.

Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan mikroyapı ve element çözümlemeleri, sistemde element dağılımının aynı olduğunu ve pelte tozlarının genelde nanometre boyutlarında çok küçük kristallerden oluştuğunu gösterdi. Mikroyapı fotoğrafları incelendiğinde, artan sıcaklıkla birlikte yeni fazlar oluştuğu veya oluşan fazların boyutlarının arttığı görüldü. Değişik kristallerin şekil olarak da farklılaştığı gözlemlendi (Şekil 2 a-d).

Tablo 3. X-ışını difraksiyon diyagramlarına göre tanımlanan fazlar

Sıcaklık (°C)	Fazlar
100	1. Saponit - Ca _{0,2} Mg ₃ (Si, Al) ₄ O ₁₀ (OH) ₂ ·4H ₂ O 2. Monohidroksit - CaCO ₃ ·H ₂ O
500	1. Kalsit - CaCO ₃ 2. Montisellit - CaMgSiO ₄ 3. Farringonit - Mg ₃ (PO ₄) ₂
900	1. Akermanit - Ca ₂ MgSi ₂ O ₇ 2. Kuvars - SiO ₂ 3. Farringonit - Mg ₃ (PO ₄) ₂ 4. Montisellit - CaMgSiO ₄
1000	1. Akermanit - Ca ₂ MgSi ₂ O ₇ 2. Farringonit - Mg ₃ (PO ₄) ₂ 3. Montisellit - CaMgSiO ₄ 4. Kuvars - SiO ₂ 5. Kalsit - CaCO ₃



Şekil 2. Farklı sıcaklıklarda (100 °C, 500 °C, 900 °C ve 1100 °C) ısıl işleme tabi tutulan camseramiklerin taramalı elektron mikroskopunda mikroyapı görüntüleri.

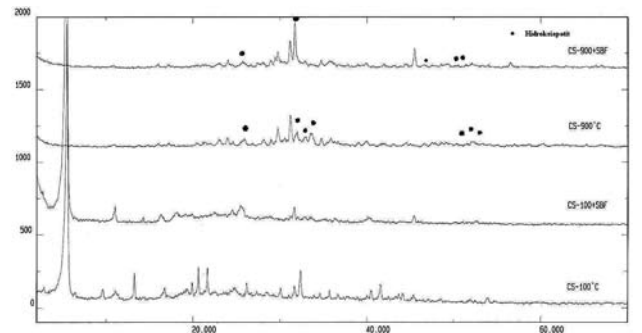
Mikroyapıların incelenmesinde, 100 °C'de oldukça gevşek bir yapı gözlenirken, artan sıcaklıkla birlikte sistemde çubuksu yapılar oluştuğu, özellikle 900 ve 1100 °C'lerde toplatırmanın (sinterlenme) başladığı gözlenebilmektedir. Her iki durumda da nanometre boyutlarında taneciklerin/kristallerin oluşumundan bahsedilebilir. Bu hem geniş yüzey alanı, hem de yüksek tepkisellik anlamına gelmektedir.

Canlı-dışı test sonuçları

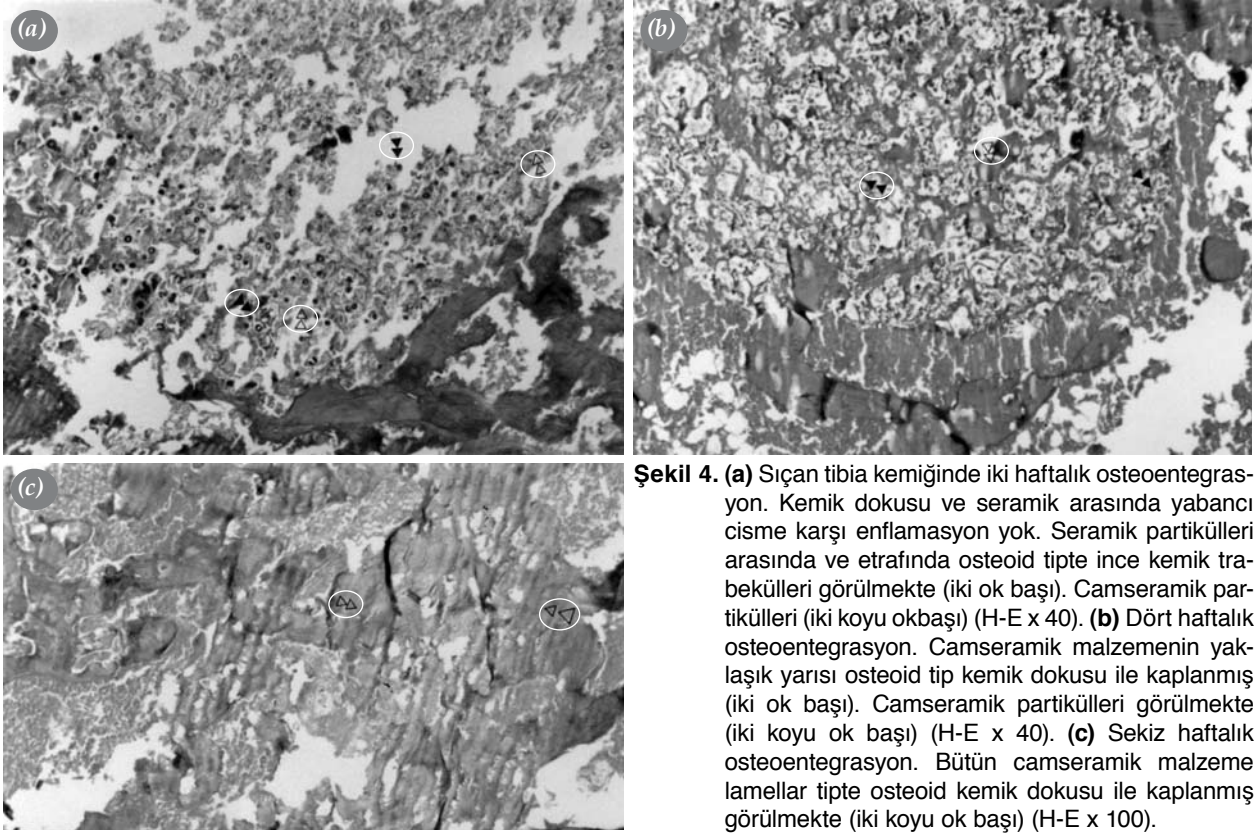
Yapay vücut sıvısı içinde 10 gün bekletilen tozların faz oluşumunda ve mikro yapılarında kayda değer değişimler gözlenmedi. Bu durum, 10 günlük canlı-dışı deney süresinin herhangi bir tepkime oluşumu için yeterli olmadığıyla açıklanabilir. Fakat, 30 ile 40 gün bekletilen örneklerde aynı cihaz ayarlarıyla çekilen XRD diyagramlarında, ana fazlarda olmasa da ikinci ve üçüncü derece fazlarda hidroksiapatit kristallerinin bulunması, tanecik yüzeylerinde Ca, P element değişimi ve HA kristalleri oluşması, cam-seramiğin yüzey-tepkili olduğunu göstermektedir (Şekil 3).

Canlı-İçi test sonuçları

Kemiğe yerleştirildikten iki hafta sonra alınan kesitlerde malzemeye bitişik ince olgunlaşmamış kemik trabeküllerinin olduğu görüldü. Cam-seramik malzeme ile ince katmanlı (lamellar) kemik dokusu arasında yabancı cisme karşı olabilecek enflamatuvar tepkime ve fibröz doku görülmedi (Şekil 4a). Histolojik incelemede, dört haftalık örneklerde, konulan cam-



Şekil 3. 100 °C ve 900 °C'de yapay vücut sıvısı ile muamele sonrası X-ışını difraksiyon diyagramlarında ki değişikliklerin karşılaştırmalı gösterilmesi.



Şekil 4. (a) Sıçan tibia kemiğinde iki haftalık osteoentegrasyon. Kemik dokusu ve seramik arasında yabancı cisme karşı enflamasyon yok. Seramik partikülleri arasında ve etrafında osteoid tipte ince kemik trabekülleri görülmekte (iki ok başı). Camseramik partikülleri (iki koyu okbaşı) (H-E x 40). (b) Dört haftalık osteoentegrasyon. Camseramik malzemenin yaklaşık yarısı osteoid tip kemik dokusu ile kaplanmış (iki ok başı). Camseramik partikülleri görülmekte (iki koyu ok başı) (H-E x 40). (c) Sekiz haftalık osteoentegrasyon. Bütün camseramik malzeme lamellar tipte osteoid kemik dokusu ile kaplanmış görülmekte (iki koyu ok başı) (H-E x 100).

seramik tozun yarısı katmanlı ve sünger tipte kemik ile yer değiştirmiş ve çevrilmiş bulundu (Şekil 4b); sekiz haftalık örneklerde ise konulan bütün malzeme katmanlı kemik dokusu ile yer değiştirmişti (Şekil 4c). Bütün kesitlerde gözlenen kemik iliğinin kırmızı görünümünün -yalancı eozin boya görünümü- uzun süre kuvvetli asitle yumuşatmaya bağlı olarak oluştuğunu belirtebiliriz. Kemiksi dokunun zamanla çoğalması, yayılması ve arada fibröz bir dokunun oluşması, seramik taneciklerinin zamanla entegre olarak azalması önemli bir bulgudur.

Tartışma

Sol-jel yöntemi, tane boyutlarının, şeklinin ve yüzey alanının kontrol edilebilmesi nedeniyle toz yapımı için en uygun yöntemlerden biridir. Genelde oda sıcaklığında ve çok basit şartlarda çalışıldığı için kolay, hızlı ve ekonomik bir yöntemdir; moleküler seviyede karışım sağlanması nedeniyle, alışılmış yöntemlerle üretilmesi çok zor olan kompozisyonların yapımı başarıyla gerçekleştirilebilmektedir. Kimyasal saflığın yanında istenilen boyut ve biçimde tozlar üretilebildiği için biyolojik etkileri de kontrol edilebilmektedir. Tanecik veya toz halinde oluşu gibi biçimsel özellikleri cam-seramiğin biyolojik etkilerini değiştirebilir.

Sol-jel yöntemiyle, yüksek derecede gözenekli yapıya sahip seramik elde edilmekte, ergitme yöntemiyle elde edilen camlara nazaran daha biyoaktif camların sentezi mümkün olmaktadır.^[4,5]

Tablo 1'de görüldüğü gibi formülde sapmalar genelde CaO ve P₂O₅ bileşenlerinde olmaktadır. Burada başlangıçta kullanılan kimyasallar etken olabilir. Bu üretimde amaç tamamen stokiyometrik bir formül elde etmek olmadığı için, elde ettiğimiz cam-seramik formülü çalışma amacımıza uygun bulunmuştur.

Çalışmamızda sol-jel yoluyla hazırlanan cam-seramiklerin kristallendirilmesi için, artan sıcaklıklarda ısıl işlemler uygulanmıştır. Elektrikli fırınlarda yapılan ısıl işlemlerde bekleme süresi bir saat olarak uygulanmıştır. Başlangıçta 100 °C'de incelenen örnek diyagramında görülen yüksek doruk, daha sonra sıcaklık artırıldığında yok olmuştur. Bu durum seramik içindeki organik çözücülerden kaynaklanmaktadır.

Artan sıcaklık uygulaması ile cam-seramik örneğimizin içinde oluşan kristal fazların büyüdüğü, genişlediği ve sınırlarının daha belirgin olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).

Cam-seramiğin 900 °C'de ısıtıldığında YVS içindeki iyonlarla etkileşime girerek hidroksiapatit ve diğer kristalleri oluşturması, hidroksiapatit kristallerinin büyümesi yüzey tepkililiğinin yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 3), bu özellikleri cam-seramiği canlı-içi modelde kullanmamızın da nedenidir.

Biyoaktif silika (SiO₂) içeren cam ve cam-seramikler için yapılan araştırmaların sonuçları, kristal halde olmayan (amorf) veya kristal faz halinde bulunan SiO₂'nin çözünebilir olması nedeniyle kalsiyum ve fosfor bakımından zengin yüzey tabakanın oluşumunu artırdığını desteklemektedir.^[3] Cam-seramikler, içindeki silika ve yüzeylerinde oluşan Si-OH grupları sayesinde temas ettiği sıvı ile (YVS, kansıvı) iyon değişimi yapmakta, hidroksiapatit oluşturarak canlı kemik dokusu ile bağlantı kurmaktadır.^[1] Çözünebilir silikanın önemi, birçok yazar tarafından belirtilmiş, silikadan zengin tabakanın apatit çekirdeklenmesi için önemli birer odak oldukları belirtilmiştir.^[4,6-8] Malzeme içindeki çeşitli oksitlerin çözünebilirliği fazla olduğunda, biyoaktiviteden sorumlu yüzey tabakanın oluşması kolaylaşmaktadır.^[3]

Cam-seramik içindeki apatit fazında kalsiyum ve fosforun olması, yüzey apatitinin çökmesini önlemektedir.^[9]

Cam-seramikler, ideal biyolojik etkinin bulunması için kolay ve çabuk canlı-dışı testlerle kontrol edilebilir. Kansıvısı içindeki iyonları içeren YVS, ilk hazırlanan bir test malzemesi olup cam-seramik yüzey tepkililiğinin tayininde çok kullanılan bir test aracıdır. Diğer bir canlı-dışı test de, cam-seramiğin fibroblast, osteoblast gibi hücrelerin şekillerine ve sayısına etkisinin araştırılmasıdır. İnsan osteoblastları kullanılarak yapılan canlı-dışı kültür testlerinde, biyoaktif camlardan kritik yoğunlukta ayrılan silisyum iyonlarının büyüme faktörü proteinlerini düzenlediği ve osteoblast büyümesini artırdığı saptanmıştır.^[10] Çalışmamızda osteoblastik hücreleri kullanmamış olmakla birlikte, bir sonraki çalışmamızda kullanmayı planlıyoruz.

Yüzey-tepkili cam-seramikler, kemik yerini tutucu olarak kullanılma özelliği ve kemik ile bağ oluşturma özellikleri nedeniyle ayrıntılı olarak incelenmiştir.^[8] Doğal cam-seramikler de kemiğe bağlanabilirler.^[7,8,11] Doğal cam-seramiklerde bulunan oranlarda SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O içeren formüllerle üretilen cam sistemleri biyoetken davranış gösteren ilk cam-seramik olmuşturlar.^[9,11-13]

Malzemelerin biyoyuymluğu, hayvanlarda ve gönüllü insanlarda yapılan testlerde değerlendirilmektedir. Çalışmamızda, seçtiğimiz cam-seramik örneğinin sıçan kemiği ile osteoentegrasyonu, enflamasyon ve fibröz doku olmadan ilerleyici şekilde olmuştur. Diğer önemli bir nokta, iki ile sekiz haftalık kesitlerin hazırlanma sürecinde mikrotom ile kesilirken karşılaşılan dirençtir. Cam-seramik canlı kemik dokusu ile etkileştiğinde sertleşmektedir.

Seramikteki hidroksiapatit kristalleri, kemiksi aradoku oluşurken alkalen fosfataz enzimi aktivitesi ile kemiğin inorganik kısmının oluşturulmasında kullanılmaktadır. Mor boyalı kemiksi doku alanlarının (Şekil 4) zamanla genişlemesi, seramik taneciklerinin azalması daha fazla seramiğin yapıda kullanıldığını göstermektedir.

Kemik kesitlerinin histolojik incelemelerinde hücrelerin nicel ve nitel çözümlene sonuçlarını elimizde olmayan nedenlerle veremedik. Testere mikrotom ile kesitleri yumuşatmadan hazırladıktan sonra, bilgisayar programlı mikroskop ile hücrelerin biçimlerini ve sayımlarını ayrıntılı şekilde vermemiz mümkün olacaktır. Kesitleri daha sık süreçlerde alarak, zamana bağlı değişimleri ayrı bir histolojik çalışmada incelemenin mümkün olacağını düşünüyoruz.^[14]

Ürettiğimiz cam-seramiğin konulduğu anda gerekli sertlikte olmayışı, bükülme ve ağırlığa dayanıksız oluşu eksik taraflarıdır. Fakat, yerleştirildikten sonra kemik ile etkileşimi sonrası sertleşmesi, kemik ile fibröz doku olmadan bütünleşmesi önemli bir özelliktir. İçinde organik madde içermemesi nedeniyle allogreflere, yüzey-tepkili olması ise trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatit seramiklere üstünlüğüdür.

Literatürde, yüzey-tepkililik tayini YVS ile etkileştirmeye yapılmaktadır. Canlı-dışı bulgularımız literatür ile uyumludur. Son zamanlarda cam-seramiklerin hücre çoğaltıcı biyolojik etkileri için osteoblastlarla çalışılmaktadır. Osteoblastların hayvanlardan temin yöntemi için yaptığımız iki çalışma yayımlanmıştır.^[15,16] Bundan sonraki çalışmamızda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümü ile yapılan protokol gereği insan osteoblastları kullanılacaktır. Canlı-içi incelememiz çalışmamızın önemli bir farklılığını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, canlı-dışı ve canlı-içi test sonuçlarına göre ürettiğimiz cam-seramiğin kemik dokusu ile bütünleşme özellikleri vardır ve dünyadaki di-

ğer örnekleri gibi biyomalzeme olarak kullanılması mümkündür. Özelliklerini ve biyolojik etkilerini tanımladığımız cam-seramiğin kemik yerini tutucu -biyocam-seramik- olarak kullanımı mümkün görünmektedir. Hazırladığımız biyocam-seramik malzemenin, arzu edildiği durumlarda diğer sert malzemelerle karıştırılarak kompozit olarak hazırlanması değerini daha da artıracaktır.

Kaynaklar

1. Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses. *J Biomed Mater Res* 2001;58:734-40.
2. Hench LL, West JK. Biological applications of bioactive glasses. *Life Chem Rep* 1996;13:187-241.
3. Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MH. Surface modifications of a glass and a glass-ceramic of the MgO-3CaO. P2O5-SiO2 system in a simulated body fluid. *Biomaterials* 1995;16:849-54.
4. Kokubo T, Kushitani H, Ohtsuki C, Sakka S, Yamamuro T. Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramic with a simulated body fluid. *J Mater Sci Mater Med* 1992; 3:79-83.
5. Pereira MM, Clark AE, Hench LL. Effect of texture on the rate of hydroxyapatite formation on gel silica surface. *J Am Ceram Soc* 1995;78:2463-8.
6. Ebisawa Y, Kokubo T, Ohura K, Yamamura T. Bioactivity of CaO.SiO2-based glasses: invitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med* 1990;1:239-44.
7. Li P. In vitro and in vivo calcium-phosphate induction on gel oxides [PhD Thesis]. Leiden University, The Netherlands, 1993.
8. Hench LL. Bioceramics: from concepts to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74:1487-510.
9. Kokubo T. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. *J Non-Cryst Solids* 1990;120:138-51.
10. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;276:461-5.
11. Ogino M, Hench LL. Formation of calcium phosphate films on silicate glasses. *J Non-Cryst Solids* 1980;38-39:673-8.
12. Vogel W, Holand W. The development of bioglass ceramics for medical applications. *Angew Chem Int Ed* 1987; 26:527-44.
13. Gross U, Brandes J, Strunz V, Bab I, Sela J. The ultrastructure of the interface between a glass ceramic and bone. *J Biomed Mater Res* 1981;15:291-305.
14. Ceyhan T, Gülçubuk A, Sayrak H, Karaca Ç. Polietilen glikol tereftalatın biyouyumluğunun in vivo sıçan kemik modelinde histolojik olarak incelenmesi. *Eklemler Hastalıkları ve Cerrahisi* 2007;18:33-8.
15. Bilir A, Ceyhan T, Altinoz MA, Guneri AD, Bayrak I, Altug T. Culturability of osteoblast cells extracted from mature and fetal BALB/c mice calvaria. [Article in Turkish] *Acta Orthop Traumatol Turc* 2000;34:389-95.
16. Ceyhan T, Bilir A, Karaca C. Culturability of rat bone marrow stromal cells and evaluation for osteoblastic formation. [Article in Turkish] *Acta Orthop Traumatol Turc* 2006;40:67-71.