



Dondurup kurutma ve solventlerle dehidrasyon işlemlerinin kortikal kemiğin eğme dayanımı ve kalsiyum içeriğine etkileri

Yusuf EMES¹, Mehmet İPEKOĞLU², Hilal HAZNEDAROĞLU³, Halim İŞSEVER⁴,
Serhat YALÇIN¹, Sabri ALTINTAŞ²

¹*İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Fatih, İstanbul;*

²*Boğaziçi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, İstanbul;*

³*Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, İstanbul;*

⁴*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul*

Amaç: Bu çalışmada iki farklı allogreft saklama yöntemi, dondurup kurutma ve solventlerle dehidrasyon işlemlerinin, greft materyalinin mekanik özelliklerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışma planı: Sığır kemiklerinden elde edilen bloklar üç gruba ayrıldı. Gruplardan ilki dondurup kurutma, ikincisi solventlerle dehidrasyon işlemlerine tabi tutuldu. Üçüncü grup kontrol grubu olarak hiçbir işlem görmedi. Tüm örnekler üç nokta eğme testi uygulanarak, grupların eğme dayanımları incelendi ve kalsiyum içerikleri değerlendirildi.

Bulgular: Dondurulup kurutulmuş ve solventlerle dehidrate edilmiş örneklerin dayanım değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı azalma gösterdiği belirlendi. Ayrıca, sadece solventlerle dehidrate edilmiş örneklerin kalsiyum içeriğinin kontrol grubundan anlamlı olarak düşük olduğu bulundu.

Çıkarımlar: Her iki saklama yönteminin, greft materyalinin mekanik özelliklerini azaltması nedeniyle kemiğin eğme dayanımına olumsuz etkileri olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Dondurup kurutma; kemik greftleri; mekanik kuvvet; solvent dehidrasyonu.

Vaskülarize veya non-vaskülarize otojen kemik greftleri, allojenik ve alloplastik kemik greftlerinin de içinde bulunduğu kemik greftleri yüz ve çene bölgesinde oluşan defektlerin rekonstrüksiyonunda sıklıkla kullanılmaktadır.^[1]

Bir kemik parçası vücuttan ayrıldıktan hemen sonra, kanlanma yetersizliğine bağlı olarak, kemik hücrelerinin canlılığında azalma başlar.^[2] Hücre canlılığı in vitro sağlanabiliyor olsa bile, minerallerin dokudan çevredeki ortama geçmesine bağlı olarak kemiğin mekanik özelliklerinde de bir azalma görülür. Greftin kesilmesinde kullanılan yöntemlerin de mekanik özelliklerde düşüşe neden olabilecek bir

yeniden şekillenme olayını tetikleyebilir olabileceği düşünülmektedir.^[2,3] Bunu önlemek için, kemik dokusu homeostaz durumunda saklanmalıdır.

Allojenik bir kemik greft malzemesinin raf ömrünü uzatmak mümkündür, ancak bu işlemde kullanılacak yöntemin kemiğin mekanik özelliklerini ve alıcı bölge ile entegrasyonunu etkilememesi gerekmektedir.^[1,2]

Bu çalışmada, sıklıkla kullanılan dondurup kurutma ve solventlerle dehidrasyon saklama yöntemlerinin kemik greftinin mekanik özelliklerine ve kalsiyum içeriğine etkileri incelenmiştir.

Gereç ve yöntem

Çalışmada, 1 ila 2 yaş aralığında, ağırlıkları 250 ila 400 kg arasında değişen erkek sığırlardan alınan 14 adet humerus kemiğinden hazırlanan, 50x7x5 mm boyutlarında 72 adet kemik bloku kullanıldı. Dikdörtgen kesitli kemik blokları, blokların uzun eksenleri humerus diyafizinin anterior bölgesinden elde edilecek şekilde kesildi. Yirmi beş adet kemik bloku dondurup kurutma işlemine tabi tutuldu. Kemik bloklarının dondurulup kurutulması bir Virtis Freeze-Dryer (Biopharma Process Sytems, Birleşik Krallık) cihazı ile gerçekleştirildi. Örnekler önce -30°C'ye kadar soğutuldu, ardından vakum altında 24 saat içinde ısı 15°C'ye yükseltilecek şekilde süblimleşen suyun kemikten çıkarılması sağlandı. On dokuz adet kemik bloğu Tutoplast® (Tutogen Medical GmbH, Almanya) laboratuvarlarında solventlerle dehidrate edildi. Örnekler, sırasıyla, %10 NaCl, aseton, %0.9 NaCl, H₂O₂ ve tekrar aseton ile işleme tabi tutuldu. Yirmi sekiz kemik ise kontrol grubu olarak hiçbir işleme tabi tutulmadı.

Tüm örnekler, rehidrasyon amacıyla 30 dk. serum fizyolojikte bekletildikten sonra üç nokta eğme testine tabi tutuldu. Çalışmada 1186 model bir Instron (Instron Corp., Canton, MA, ABD) cihazında, ASTM F417 (American Society for Testing and Materials, US) standardına uygun olarak 1 mm/dk. yüklenme hızı ile üç nokta eğme testi gerçekleştirildi.

Dayanım hesaplaması aşağıdaki formüle göre yapıldı:

$$O_k = (3 \times F \times L) / (2 \times w \times t^2)$$

O_k : Kırılma anındaki gerilim

F : Kuvvet

L : Örnek uzunluğu

w : Örnek genişliği

t : Örnek yüksekliği

Mekanik teste tabi tutulan tüm örneklerden birer parça alınarak, bir atomik absorpsiyon spektrofotometresi (Spectra AA-200) ile kalsiyum ve magnezyum içerikleri ölçüldü. Porselen krozeler (Halden-Wagner, 101-40) 110°C'de 1 saat kurutuldu ve tartıldı. İçine yaklaşık 0.05 g kemik örneği konuldu ve tekrar 110°C'de 1 saat bekletilerek tartıldı. Böylece örnek kemik ağırlığı tespit edildi. Daha sonra kemikler, kroze içinde, bir kül fırını kullanılarak (Heraeus M 11) 750°C'de 1.5 saat ısı işleme tabi tutuldu. Bunun takiben, küller 15 ml konsantre HNO₃ içinde çözüldü, destile su ile yıkanarak süzülme ve balon jö-

ye aktarıldı. Kroze içerisindeki süspansiyon destile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Örnekler spektrofotometreye yerleştirilmeden önce 1:50 oranında seyreltilti. Bu amaçla hazırlanmış olan Ca örneğinden 1 ml alınarak destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Her örnek üçer kere analiz edilerek bu değerlerin ortalaması alındı. Mineral içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$X = (X_C \times V \times SF) / M$$

X : Mineral içeriği (mg/g)

X_C : Atomik absorpsiyon spektrofotometresinde okunan konsantrasyon değeri (mg/l)

V : Örnek hacmi (= 100 ml)

SF : Seyreltme faktörü (= 50)

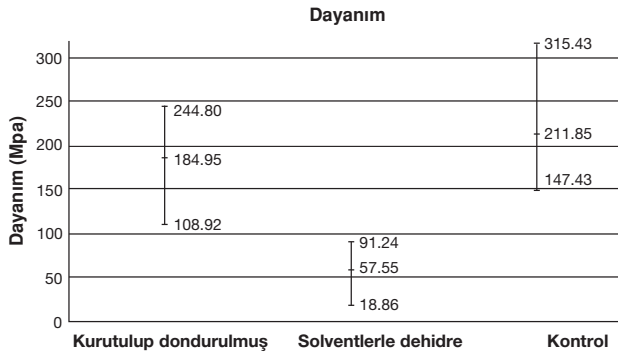
M : Örnek ağırlığı (g)

İstatistiksel değerlendirmede tek yönlü varyans analizi (*one-way ANOVA*) kullanıldı. İstatistikler SYSTAT 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak düzenlendi.

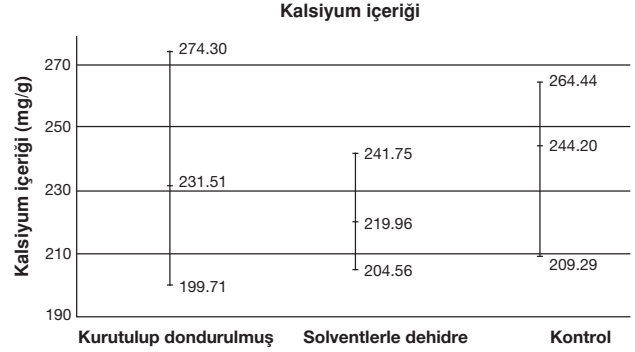
Bulgular

Dondurulup kurutulmuş gruptaki örneklerin üç nokta eğme deneyinde saptanan mukavemet değerlerinin ortalaması 184.95 MPa bulundu (Şekil 1). Yapılan mineral içeriği ölçümünde, bu grubun kalsiyum değeri ortalaması 231.51 mg/g idi (Şekil 2). Yine, solventlerle dehidrate edilen örneklerin üç nokta eğme deneyinde saptanan mukavemet değerlerinin ortalaması 57.55 MPa bulundu (Şekil 1). Yapılan mineral içeriği ölçümünde, söz konusu grubun kalsiyum değeri ortalamasının 219.96 mg/g olduğu görüldü (Şekil 2). Kontrol grubundaki örneklerin üç nokta eğme deneyinde saptanan mukavemet değerlerinin ortalaması 211.85 Mpa, kalsiyum değeri ortalaması 244.20 mg/g olarak elde edildi (Şekil 1 ve 2).

Dayanım değeri için gruplar arası fark anlamlı bulundu (p<0.001). Gruplar karşılaştırıldığında, dondurulup kurutulmuş örneklerin dayanım değerlerinin, solventlerle dehidrate edilmiş ve kontrol grubundaki örneklerle göre farkı anlamlı bulundu (p<0.05). Kurutulup dondurulan grupta kontrol grubuna göre %12.7 azalma mevcuttu. Solventlerle dehidrate edilmiş örneklerin de aynı şekilde, dondurulup kurutulmuş örneklerle ve kontrol grubuna göre farkı anlamlı bulundu (p<0.05). Solventlerle dehidrate edilen grupta kontrol grubuna göre %72.84 azalma görülmekteydi (Şekil 1, Tablo 1).



Şekil 1. Grupların eğme dayanımı değerlerinin karşılaştırması.



Şekil 2. Grupların kalsiyum içeriği değerlerinin karşılaştırması.

Grupların kalsiyum içeriklerinin istatistiksel değerlendirilmesinde, solventlerle dehidrate edilmiş kemik örneklerinin kalsiyum içerikleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Bu grupta kontrol grubuna göre %9.92 azalma vardı (Şekil 2, Tablo 2). Dondurup kurutulmuş örneklerin kalsiyum içeriklerinin solventlerle dehidrate edilmiş ve kontrol grubu örneklerine göre farkı anlamlı bulunmadı ($p = 0.06$).

Tartışma

Liyofilizasyon olarak da bilinen dondurup kurutma (*freeze drying*) işlemi, kemiği -80°C 'de derin dondurduktan sonra güçlü bir vakum oluşturup, sıcaklığı yükseltirken suyun süblimleşmesinin sağlanmasıdır. İşlem, kemik içindeki nem oranı %5'in altına indiği zaman sona ermektedir. Dondurup kurutulmuş kemik, oda sıcaklığında 5 yıl boyunca saklanabilmektedir.^[4] Ayrıca bu işlemin kemiğe en az et-

ki ile sudan arındırmayı gerçekleştirdiği bildirilmektedir.^[5] Dondurup kurutma işleminin kemiğin mekanik özelliklerine etkileri farklı araştırmacılar tarafından çeşitli yöntemler kullanılarak incelenmiştir.^[1,6-9] Bu araştırmacıardan kimi liyofilizasyonun kemiğin dayanımını azalttığı sonucuna varırken,^[9,10] kimi de bu yöntemin kemikte bir değişikliğe yol açmadığını bildirmiştir.^[7] Kansellöz kemiğin kortikal kemiğe göre liyofilizasyondan daha az etkilendiği düşünülmektedir.^[2]

Eğme kuvvetlerinin özellikle mandibulanın anterior gövdesi, simfiz bölgesi ve kaninler bölgesinde etkinliği saptanmış olduğundan, çalışmada dondurup kurutulmuş örnekler üç nokta eğme testi uygulanmıştır.^[6,11]

Bu çalışmada, dondurulup kurutulmuş örneklerin eğme dayanımında kontrol grubuna göre %12.7 oranında azalma saptanmıştır. Bu sonuç, Pelker ve ark.'nın dondurulup kurutulmuş kemiğin eğme daya-

Tablo 1. Grupların eğme dayanımlarının karşılaştırması.

Dayanım	N	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	%95 güven aralığı		Minimum	Maksimum
					En düşük	En yüksek		
Kurutulup dondurulmuş	25	184.95	28.88	5.78	173.03	196.87	108.92	244.80
Solventlerle dehidrate	19	57.55	20.83	4.78	47.51	67.58	18.86	91.24
Kontrol	28	211.85	47.14	8.91	193.58	230.13	147.43	315.43
Toplam	72	161.79	72.95	8.60	144.65	178.93	18.86	315.43

ANOVA

Dayanım	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig
Gruplar arası	290,057.30	2	145,028.65	113.97	.000
Grup içi	87,806.27	69	1,272.56		
Toplam	377,863.60	71			

nımında saptadıkları %10 ila 45 aralığındaki azalma bulguları ile uyumludur.^[7] Genel olarak liyofilize kemiğin rehidrasyon sonrası mekanik özelliklerinde azalma görüldüğü kabul görmektedir.^[4,9,10] Rehidre edilmiş liyofilize kemikte görülen dayanım azalmasının nedeninin, kemiğin rehidre olması sırasında oluşan mikro çatlaklara^[12] veya kolajen bağlardaki kimyasal değişikliklere bağlı olabileceği öne sürülmüştür.^[6] Bu çalışmada kolajen içeriğine yönelik bir inceleme yapılmamasına rağmen, Voggenreiter ve ark.'nın bildirdiği gibi rehidrasyon sonrası meydana gelen mikro çatlakların dayanımdaki bu azamaya neden olabileceği düşünülmektedir.^[12]

Kemiğin mekanik özellikleri ile doğrudan ilişkili parametrelerden biri de kemiğin mineral, özellikle de kalsiyum içeriğidir.^[13,14] Yaptığımız çalışmada dondurulup kurutulmuş örneklerde, mekanik dayanımda görülen azalma ile kıyaslandığında, kalsiyum içeriğindeki azalma çok düşük kalmaktadır. Bunun kemiğin kolajen yapısı veya bütünlüğünde meydana gelen değişikliklere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Garnero ve ark. kemiğin kolajen bağlantılarının kemiğin mekanik özelliklerine, mineral içeriğinden bağımsız olarak etki ettiğini bildirmişlerdir.^[15] Bu da yukarıdaki varsayımızla uyumluluk göstermektedir.

İlk olarak Tutoplast® (Tutogen Medical GmbH, Almanya) tarafından geliştirilmiş olan solventlerle dehidrasyon tekniği daha yeni bir saklama yöntemi olup, dokunun hücrelerden ve parçacıklardan çözümler kullanılarak temizlenmesi işlemidir.^[16] Bu işlem sırasında hücreler hipertonic tuz solüsyonları ile parçalanmakta, virüsler ve prionlar hidrojen peroksit ile elimine edilmekte ve doku aseton solüsyonları ile

dehidrate edilmektedir. Solventlerle dehidrate edilmiş kemiğin mekanik özelliklerine dair literatürde çok az çalışma vardır. Kessler ve ark. solventlerle dehidrate edilmiş kemiğin dayanımında azalma saptamışlar, ancak bu azalmanın dehidrasyondan çok sterilizasyon işlemine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir.^[17] Bizim çalışmamızda ise örneklere bir sterilizasyon işlemi yapılmadığı için, solventlerle dehidrate edilmiş örneklerin dayanımlarındaki azalmanın sterilizasyona bağlı olduğu düşünülmemektedir.

Hidrojen peroksit solventlerle dehidrasyon işleminde kullanılan kimyasal ajanlardan biridir ve -OH iyonları salınımı yapmaktadır. Diş hekimliğinde de sıklıkla kullanılan hidrojen peroksitin salınımını yaptığı -OH iyonlarıyla proteinlerin peptid zincirlerinin yapısını değiştirdiği ileri sürülmektedir.^[18] Hidrojen peroksitin, asidik pH değerine sahip olması nedeni ile de sert dokularda poroziteye neden olabileceği düşünülmektedir.^[19] Hidrojen peroksitin kemik dokusuna etkileri üzerine çok az çalışma bulunmaktadır. Moseley ve ark.^[20] sığır alveolar kemiği üzerindeki çalışmalarında hidrojen peroksitin kemikte amino asit yapısında ve proteoglikanların prolin seviyelerinde değişikliğe yol açtığını saptamış, Chng ve ark.^[19] %30'luk hidrojen peroksitin dentin dokusunun mekanik özelliklerinde düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir.

Hidrojen peroksitin kemiğin eğme dayanımı açısından önemli bir bileşeni olan kolajen üzerine etkilerine dair literatürde bir bilgi bulunmamaktadır. Dehidrasyon işleminde kullanılan aseton da kemiğin mekanik özelliklerine etkileri açısından fazlaca incelenmiştir. Ancak asetonun, temas halinde cilt ve müköz

Tablo 2. Grupların kalsiyum içeriklerinin karşılaştırması.

Kalsiyum	N	Ortalama	Standart sapma	Standart hata	%95 güven aralığı		Minimum	Maksimum
					En düşük	En yüksek		
Kurutulup dondurulmuş	25	231.51	19.72	3.94	223.37	239.65	199.71	274.34
Solventlerle dehidrate	19	219.96	9.39	2.21	215.29	224.63	204.56	241.75
Kontrol	28	244.20	14.54	3.53	235.58	250.53	209.29	264.44
Toplam	72	231.32	17.89	2.31	226.70	235.94	199.71	274.34

ANOVA

Kalsiyum	Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig
Gruplar arası	4,667.07	2	2,333.54	9,358	.000
Grup içi	14,213.00	57	249.35		
Toplam	18,880.07	59			

membranlarda kurumaya ve çatlamaya neden olabilen ileri derece toksik bir ajan olduğu bilinmektedir.^[21]

Hoffmeister ve ark. dekolajenize kemiğin mekanik özelliklerinde azalma saptamışlardır.^[22] Bu çalışmamızda ise örneklerin kolajen içeriklerinin saptanmasına yönelik bir inceleme yapılmamıştır.

Yürütülen çalışmada, solventlerle dehidrate edilmiş gruptaki kalsiyum içeriği, kontrol grubuna göre aradaki fark anlamlı bulunmuş, ancak dondurulup kurutulmuş grupla aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu nedenle, solventlerle dehidrate edilmiş kemik bloklarındaki ileri derece dayanım kaybının, sadece inorganik matristeki bu değişime bağlı olmadığı düşünülmekle birlikte, bunun nedeninin saptanabilmesi için kolajen içeriği ile ilgili ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, aseton ve hidrojen peroksitin de ayrı ayrı kemiğin porozitesine ve kolajen içeriğine etkilerinin incelenmesinde fayda olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada kullanılan yöntemlerin sınırları içerisinde, kullanılan her iki yöntemin de kortikal kemiğin eğme dayanımında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Kemiğin mekanik dayanımının önemli olduğu osteointegrasyon öncesi dönemde, bu konu göz önünde bulundurulmalıdır.

Teşekkür

Dr. İrem AKTAŞ ve Yusuf Ziya YILMAZ'a çalışmaya olan katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Çıkar Örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

- Nather A, Thambyah A, Goh JCH. Biomechanical strength of deep-frozen versus lyophilized large cortical allografts. *Clin Biomech* 2004;19:526-33.
- Martin RB, Sharkey NA. Mechanical effects of post-mortem changes, preservation, and allograft bone treatments. In: Cowin SC, editor. *Bone mechanics*. CRC Press: Boca Raton, FL: 2001.
- Ekici, B. Determination of mechanical strength distribution of bovine femur. [PhD thesis in Turkish] Istanbul: Boğaziçi Üniversitesi; 1991.
- Eastlund T. Tissue bank support for orthopedic surgery. In: Brecher ME, Jefferies LC, editors. *Orthopedic transfusion therapy*. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 1995.
- Shimp L. Heat resistance of allograft tissue. *Cell Tissue Bank* 2008;9:259-66.
- Kang JS, Kim NH. The biomechanical properties of deep freezing and freeze drying bones and their biomechanical changes after in-vivo allograft. *Yonsei Med J* 1995;36:332-5.
- Pelker RR, Friedlander GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CM. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res* 1984; 1:405-11.
- Triantafillou N, Sotiropoulos E, Triantafillou J. The mechanical properties of the lyophilized and irradiated bone grafts. *Acta Orthop Belg* 1975;41:35-44.
- Brochers RE, Gibson LJ, Burchardt H, Hayes WC. Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials* 1995;16:545-51.
- Currey JD. The effects of drying and re-wetting on some mechanical properties of cortical bone. *J Biomech* 1988;21:439-41.
- Tams J, van Loon JP, Rozema FR, Otten E, Bos RR. A three-dimensional study of loads across the fracture for different fracture sites of the mandible. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1996;34:400-5.
- Voggenreiter R, Ascherl R, Blümel G, Schmit-Neuerburg KP. Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. A scanning electron microscope study. *Arch Orthop Trauma Surg* 1994;113:294-6.
- Currey JD, Brear K, Ziopoulos P. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *J Biomech* 1995;29:257-60.
- Schaffler MB, Burr DB. Stiffness of compact bone: effects of porosity and density. *J Biomech* 1988;21:13-6.
- Garnero P, Borel O, Gineyts E, Duboeuf F, Solberg H, Boussein ML, et al. Extracellular post-translational modifications of collagen are major determinants of biomechanical properties of fetal bovine cortical bone. *Bone* 2006;38:300-9.
- Dayı E, Aslan M, Şimşek G, Yılmaz AB. The effects of bone chips dehydrated with solvent on healing bone defects. *J Int Med Res* 2002;30:168-73.
- Kessler S, Mayr-Wohlfart U, Ignatius A, Puhl W, Claes L, Günther KP. Solvent dehydrated bone transplants to bridge segmental bone defects: histomorphological and biomechanical investigations in an animal model. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121:472-5.
- Kawamoto K, Tsujimoto Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. *J Endod* 2004;30:45-50.
- Chng HK, Palamara JEA, Messer HH. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on biomechanical properties of human dentin. *J Endod* 2002;28:62-7.
- Moseley R, Waddington RJ, Embery G, Rees SG. The modification of alveolar bone proteoglycans by reactive oxygen species in vitro. *Connect Tissue Res* 1998;37:13-28.
- Dietz D. NTP technical report on the toxicity studies of acetone in F344/N rats and B6C3F1 mice (Drinking Water Studies) (CAS No. 67-64-1). *Toxic Rep Ser* 1991;3:1-38.
- Hoffmeister BK, Whitten SA, Kaste SC, Rho JY. Effect of collagen and mineral content on the high-frequency ultrasonic properties of human cancellous bone. *Osteoporos Int* 2002;13:26-32.