

BİOCORAL UYGULANAN KEMİK DEFEKTLERİNDE İYİLEŞMENİN RADYONÜKLİT VE HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Necla Timoçin*, Ayfer Kaynar**, Settar Öztürk***, Ayşe Sungur****, Misten Demiryont*****

Yayın kuruluna teslim tarihi: 6. 1. 1993

**HEALING EFFECT OF BİOCORAL IN
EXPERIMENTALLY PREPARED
BONE CAVITIES: Radionuclide and Histopathologic
Study**

ABSTRACT

Biocoral is a resorbable bone substitute, made from natural coral exoskeleton which is transformed to resorbable porous Hydroxyapatite form by hydrothermal methods. In this study, effects of this graft material on different stages (1. 2. 3. weeks) of bone healing have been investigated experimentally on an animal model using Tc-99m-MDP. Absorbed activity by experimentally created bone defects with and without BİOCORAL have been measured with "Gama Counting System". At the same stages of healing period, histopathological examinations were also done. It was found that activity absorption in the biocoral implanted group is higher than of the control group. Histopathologic changes at 1st. 2nd. and 3rd. weeks of implantation revealed fast and intensive bone induction in the biocoral group, as compared to control group.

Key words: Biocoral, bone healing, Tc99m-MDP,

ÖZET

Biocoral, mercan eksoiskeletinin hidrotermal yollarla rezorbe olabilen Hidroksiapatite dönüştürülmesiyle elde edilen doğal bir graft materyalidir. Söz konusu materyalin kemik iyileşmesinin belirli safhalarındaki etkileri hayvan modellerinde deneysel olarak incelendi. Oluşturulan kemik defektlerindeki Tc-99m-MDP tutunumu "Gama Sayıcı Sisteminde" kantitatif olarak incelendi. Biocoral implante edilen kemiklerle kontrol gruplarındaki kemik iyileşmesi, uygulamanın 1.2. ve 3. haftasında histopatolojik olarak incelendi. Çalışmanın sonucunda, deney gruplarındaki aktivite tutunumunun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulundu. Histopatolojik incelemelerde ise deney gruplarındaki kemik yapımının kontrol gruplarına göre "iyi" olduğu görüldü.

Anahtar sözcükler: Biocoral, kemik iyileşmesi.

GİRİŞ

Patolojik gelişimlerin çıkartılmasıyla oluşan kemik defektleri ve bunların büyüklükleriyle doğru orantılı olarak ortaya çıkan estetik veya fonksiyonel bozukluklar, çeşitli biyomateryallerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Uzun yıllar, kemik defektlerinde kullanılan materyallerin çevresinde oluşan fibröz kapsülün, kemiğin bir reaksiyonu olarak meydana geldiği düşünülmüş (6), ancak 60'lı yılların sonuna doğru yapılan çalışmalarda uygulanan biyomaterya-

lin kimyasal yapısının kemiğin inorganik yapısına benzediği durumlarda söz konusu kapsülün oluşmadığı görülmüştür (7). Temelde biyomateryal uygulamasında asıl amaç; 1) kemik hücresiyle materyal arasındaki bağlantının sağlanması, 2) hızlı ve homojen bir kemik yapımında gerekli osteoindüksiyonu, yani uygulanan materyalin alıcı yönünde kemik oluşumunu sağlayabilmesidir.

Kelime anlamıyla biyomateryaller, dokuların kendi üzerinde oluşmasına ve bağlanmasına olanak

* Prof. Dr. İ.Ü. Diş Hek. Fak. Ağız, Diş, Çene Hast. Cer. Anabilim Dalı Başk.

** Dr. İ.Ü. Diş Hek. Fak. Ağız, Diş, Çene, Hast. Cer. Anabilim Dalı

*** Doç. Dr. İ.Ü. Tıp Fak. Temel Bilimler Patoloji Anabilim Dalı

**** Dr. Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi Radyofarmasötik Bölüm Başk.

***** Prof. Dr. İ.Ü. Tıp Fak. Temel Bilimler Patoloji Anabilim Dalı

veren maddelerdir. Bu konuda yapılan öncü çalışmalar, Ca ve PO₄ yapısındaki materyalle kemik dokusu arasında kurulan mekanik bağlantı kuvvetinin, kemik dokusunun kendi arasında kurduğu kemiksel bağlantıya eşit, bazen de fazla olduğunu bildirmektedir (15). Ayrıca, biyomateryalle kemik arasında oluşan bağlantının kemik iyileşmesi sırasında görülen "Yeni Kemik" yapısında olduğu ve oluşum mekanizmasının ektojik mineralizasyona benzediği görülmüştür (2). Bu konudaki ileri tekniklerle yapılan araştırmalar ise, kemik hücresi ile biyomateryal arasındaki bağlantının kurulmasındaki ilk ve kritik aşamanın, osteoblastlar tarafından sentezlenen kollagen fibrillerle apatit kristallerinin birleşmesi olduğunu ileri sürmektedir (5,21).

Konu, osteoindüksiyon yönünden ele alındığında ise yeni kemik yapımının kemik defektini bölen inorganik köprülerle başladığı ve bu yapılanmanın temelde otojen olduğu görülür (1). Sözkonusu bölünmenin oluşmadığı geniş defektlerde ise, kemik yapısıyla uygunluk gösteren biyomateryaller "Space Filler" (Boşluk doldurucu) olarak bu işi üstlenirler (12).

Bir kemik defektindeki iyileşmenin ilk aşaması pıhtı oluşumudur. Oluşan bu pıhtı ilk birkaç haftada osteojenik özelliği olan granülasyon dokusuna, daha sonra da yeni kemik dokusuna dönüşür. İyileşmenin tamamlanması ise endosteum veya kemik iliğinden differansiye olan osteoblastlarla sağlanır (21). İyileşme sürecinin tam olamadığı çok geniş defektlerde, boşluğun sikatrissel bağ dokusu ile dolduğu ve kemik iyileşmesinin yıllar sonra bile tam olarak sağlanmadığı, özellikle, hem iç hem de dış korteksin ortadan kalktığı büyük kemik defektlerinde kavitenin fibrotik doku ile dolduğu deneysel olarak bildirilmiştir (11).

Maksilla ve mandibulada lokalize, geniş patolojilerin neden olduğu kemik kayıplarının yanında, protetik uygulamalarda sorun yaratan fizyolojik alveol rezorpsiyonu, kronik inflamasyon sonucunda dişlere destek olan alveol kemiğinin yıkımı gibi durumların cerrahi tedavilerinde kullanılan biocoral 70'li yıllarda Fransa'da bir grup araştırmacı tarafından ortaya atılmış, poröz yapıda doğal bir materyaldir. Mercan kolonilerinden elde edilen bu madde, osteoblastların salgıladığı osteoid madde gibi, mercanları oluşturan calicoblastların sentezlediği kalkerli bir yapıdır. Kimyasal olarak; 1) Kristalizasyon döneminde ortama karışmış olan organik faz, 2) Kalsiyum karbonat yapısındaki aragonit kristallerinin oluşturduğu mineral faz, 3) Metal iyonları, aminoasitler, eser elementler ve pigmentlerden oluşur (8). Materyalin en önemli özelliği, kemik yapımını uyarması yanında, rezorbe olarak yerini kemiğe bırakmasıdır (4).

Bildirilen başarılı deneysel ve klinik uygulamaları nedeniyle (8,9), bu çalışmada eksperimental olarak oluşturulan kemik defektlerindeki iyileşmeyi Biocoral uygulanan kemik defektleriyle karşılaştırmayı amaçladık. Karşılaştırmayı yaparken, radyonüklit ve histopatolojik yöntemlerden yararlandık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 24 adet, yaklaşık 200 g. ağırlığında, genç, erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Denekler kg. başına 50 mg. olarak hesaplanan intraperitoneal pentotal anestezisi ile uyutuldu ve yüzüstü pozisyonda sabitlendikten sonra bacağın femur hizasında yapılan 1 cm. uzunluğundaki ensizyonlarla kemiğe ulaşıldı. Her iki bacakta, düşük devirli mikromotor kullanılarak, serum fizyolojik soğutması altında ve ince çelik fissür frezlerle oluşturulan 0.2 cm. çapındaki kemik defektleri işlem sonunda serum fizyolojikle yıkandı. Sol taraf kontrol grubu olarak boş bırakılırken, sağ taraf BİOCORAL granülleri ile dolduruldu. Ameliyat yarası 4/0 atravmatik prolen iplik kullanılarak matriks dikişle kapatıldı.

Deneklere, uygulamanın 1.2. ve 3. haftasında Metilen Diposfanat (MDP) 1µ Ci Tc-99m ile işaretlenerek enjekte edildi. Enjeksiyon aktivitesi 6µ Ci/0.1 ml. olarak ayarlandı. İntravenöz uygulama kuyruk veninden yapıldı ve radyoaktivitenin kemik dokusu tarafından tutulmasını sağlamak için yaklaşık 2.5-3 saat beklenildi. Oluşturulan kemik defektlerindeki aktif tutunmayı ölçebilmek amacıyla hayvanlar aşırı dozda eterle öldürülerek femurları çıkartıldı. Tüm yumuşak dokularından ayrıldıktan sonra kemikteki aktivite kantitatif olarak değerlendirildi.

Deney ve kontrol gruplarına ait kemik defektlerindeki aktivite tutunum deneyi ÇNAEM (Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi) Radyofarmasötik bölümünde yapıldı. MDP'nin kalite kontrolü ITLC (Instant-Thin-Layer-Chromat.) ile sağlandı (GELMAN Marka). Çözelti olarak MEK (Metil-Etil-Keton) ve Na Ac (Sodyum asetat) kullanıldı. MEK ile yapılan deneyde Rf=0 da Tc-99 m-MDP, Rf=1 de serbest bağlanmamış TcO₄ görüldü. NaAc kromatografisinde ise Rf=1 de Tc-99m-MDP görüldü. Hazırlanan radyofarmasötüğün işaretleme veriminin kullanım amacına uygun olduğu (% 99) bu yöntemle belirlendi.

Kemik defektlerinin uygulamanın 3. haftası sonundaki görüntüleri İ.Ü. Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Ana Bilim Dalında incelendi. Kuyruk veninden girilerek 0.5µCiTc 99 m-MDP verilmiş olan hayvanların

posterior pozisyonda ve üçüncü saat sonundaki görüntüleri GAMA ORBITER CAMERA ile (7500 Di- gitrakt) 250.000 statik sayımda incelendi.

Çıkarılan kemikler, 48 saat süreyle formolde fikse edildikten sonra ve formik asitte dekalsifiye edildi. Parafin bloklama işleminden sonra kesitler yapılarak hematoxilen- eosin ile boyandı (İ.Ü. Tıp Fak. Nöroloji A.B.D. Patoloji Birimi) Hazırlanan kesitlerin histopatolojik tetkikleri İ.Ü. Tıp Fak. Temel Bilimler Patoloji Biriminde yapıldı.

BULGULAR

Uygulamanın 1.2. ve 3. haftasına ait aktivite ölçümleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Tablodan da anlaşılacağı gibi, deney grubuna ait kemik defektindeki aktivitenin kontrol grubuna göre arttığı görülmekle birlikte bu artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 1.

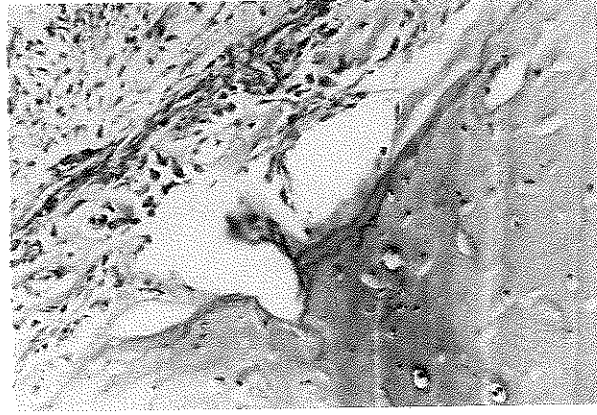
Kemik İyileşmesinin 1.2.3. Haftasında Deney ve Kontrol Gruplarındaki Aktivite Düzeyleri

%A/g	1. Hafta D.	1. Hafta K.
Ort. Aktivite	3.43	2.92
Std. Sap.	0.88	0.59
Anlamlılık	0.048	0.048
%A/g	2. Hafta D.	2. Hafta K.
Orta Aktivite	10.57	8.1
Std. Sap.	4.88	4.36
Anlamlılık	0.021	0.021
%A/g	3. Hafta D.	3. Hafta K.
Ort. Aktivite	4.4	2.81
Std. Sap.	1.5	1.21
Anlamlılık	0.064	0.064

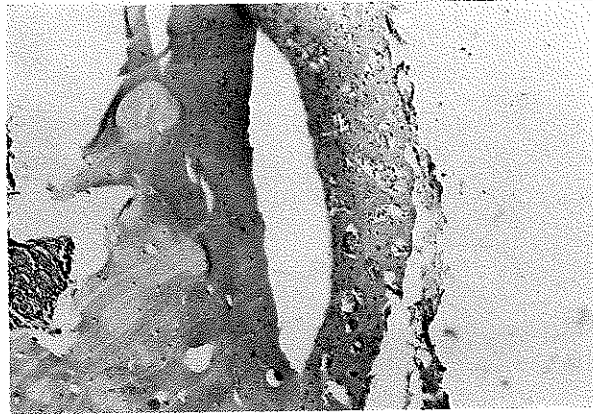
Deneklerin 1.2. ve 3. hafta sonunda ORBİTAL kamera ile yapılan sintigrafik analizlerinde deney ve kontrol grubu arasında aktivite açısından anlamlı bir fark olmadığı, ancak kemik defektlerinin istenilen lokalizasyonda bulunduğu görüldü.

Deney ve kontrol grupları histopatolojik olarak karşılaştırıldığında ise şu sonuçlar elde edildi; deney ve kontrol gruplarının birinci hafta sonunda yapılan kesitlerin incelemelerinde; nekrotik kemik trabekülleri, lenfosit ve plazma hücreleri, polimorf nüveli lökositler, yer yer genç mezankim hücrelerinden oluşan bağ dokusu izlenmekteydi. (Resim 1,2) İkinci hafta sonunda yapılan kesitlerin incelemelerinde ise; bağ

Resim 1:
Birinci hafta sonunda Biocoral uygulanan bölgede yeni oluşmaya başlayan kemik yapımı, diğer tarafta normal kemik dokusu (H.E.*310).

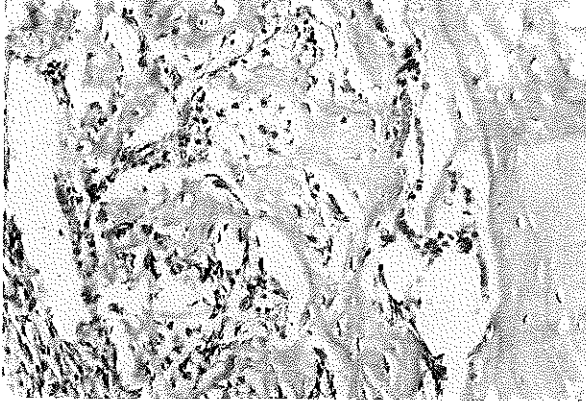


Resim 2:
Birinci hafta kontrol grubunda kompakt kemik dokusu ve iltihabi reaksiyon (H.E. 125).

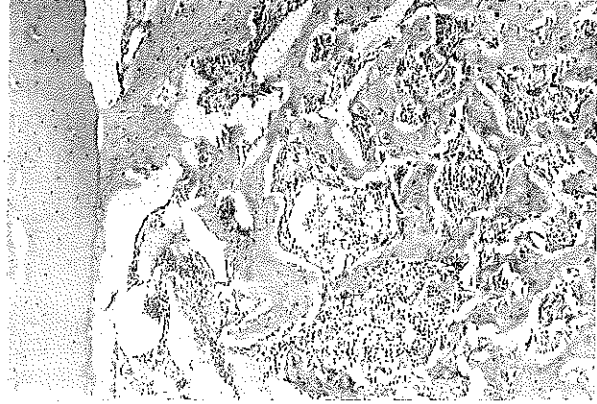


dokusu içinde osteoblast ve osteositleri içeren, yeni kemik yapımının bulunduğu izleniyordu. Kontrol grubuna ait örneklerde yer yer başladığı görülen yeni kemik yapımına karşılık, deney grubuna ait örneklerde biomateryalin çevresinde düzgün ve yoğun bir şekilde dizilmiş osteositler ve yeni kemik yapımı görülmekteydi. Ayrıca her iki grupta periost altında yer yer yeni kemik yapımının sürmekte olduğu dikkat çekiyordu. (Resim 3,4) Üçüncü hafta sonunda yapılan kesitlerin incelemelerinde ise; deney grubunda çok daha yoğun olmak üzere, bağ dokusu içinde osteoblastların çevrelediği yeni kemik trabeküllerinin oluştuğu görülmüyordu. (Resim 5,6)

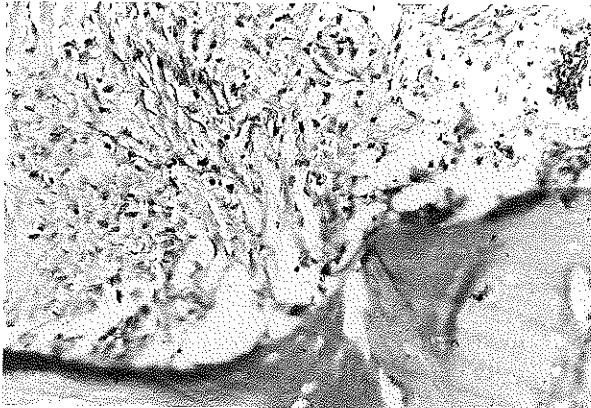
Resim 3:
İkinci hafta deney grubunda kompakt kemik dokusu ve belirginleşen kemik yapımı (H.E.*310).



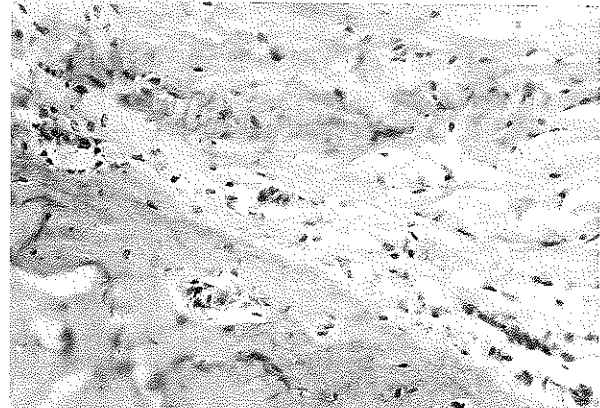
Resim 5:
Üçüncü hafta deney grubunda kompakt kemik ve ilik içine doğru iyice belirginleşen yeni kemik dokusu (H.E.*310).



Resim 4:
İkinci hafta kontrol grubunda belirginleşen fibrosit, fibroblast ve daha az sayıda mononükleer hücrelerden oluşan iltihabi reaksiyon. (H.E.*500).



Resim 6:
Üçüncü hafta sonunda kontrol grubunda azalan mononükleer hücreler, belirginleşen fibröz doku ve kısmen hyalinize fibröz doku reaksiyonu (H.E.*500).



TARTIŞMA

Kemik dokusundaki değişikliklerin izlenmesindeki diagnostik yöntemlerden biri de ilgili bölgedeki hücresel aktivitenin ölçülmesidir. Bu ölçümü yapabilmek için radyoaktif maddenin osteoblastlar tarafından tutularak kemiğin aktif hidroksilapatit kristaline kimyasal yolla adsorbe olması gereklidir. Sözkonusu adsorpsiyon intravenöz yolla verilen radyofarmasötüğün göreceli olarak hızlı metabolizması, yani hızlı kan akışı olan bölgede tutunmasıyla sağlanır (3). Çalışmamızda oluşturduğumuz kemik defektlerindeki aktivite artışı kalitatif olarak orbital kamera ile görüntülendi. Sağ ve sol bacakta, defekti oluşturduğumuz yere rastlayan bölgede artan aktif madde tutunumu sözkonusu bölgelerde yeni kemik yapımının var-

lığı ortaya koymakla birlikte, 1.2. ve 3. haftalarda sağ ve sol taraf görüntüleri arasında farkın anlamlı bulunmayışı defektlerin boyutlarının küçük oluşuna bağlanabilir.

Sağ ve sol taraf kemiklerinde tutulan aktif Tc99m-MDP kantitatif olarak NaI dedektörlü NUCLEUS marka gama sayım sisteminde ölçülerek tayin edildi. Tc99m-MDP'nin defektlerin bulunduğu bölgede tutunmuş olması bölgesel enflamasyona bağlı olarak artan metabolizmanın ve hipereminin ortaya çıktığını göstermektedir. Ayrıca, Tc 99m-MDP'nin yeni kemik yapımının olduğu bölgelerde tutulduğu gözönüne alınarak incelenen kemik defektlerinde enflamasyonun yanında yeni kemik yapımının olduğu ileri sürülebilir (16). Deney ve kontrol gruplarındaki aktivite

düzeyi kantitatif olarak karşılaştırıldığında, anlamlı bulunmamıştır. Bu durum deneyde kullanılan grubun küçük oluşuna bağlanabilir.

Rekonstrüktif cerrahide kullanılan otojen kemik greftleri kemiğin nonimmunojenik matriks'inin kullanımını esasına dayanmaktadır. Böylece graft materyalinin bir kısım hücreli yapısı ve moleküler komponentleri varlığını korumaktadır. Bununla birlikte otojen kemik greftlerinin nekroz, sınırlı damarlanma, greftin alıcı bölgesine yerleştirilmesindeki güçlükler, yüksek infeksiyon riski ve en önemlisi iyileşme döneminde ve sonrasında görülen rezorbsiyonlar olmak üzere çeşitli dezavantajları vardır (18). Buna karşılık kemiğin inorganik yapısına benzeyen çeşitli biyomateryaller kullanım kolaylıkları ve otojen greftlerin neden olduğu riskleri taşımamaları nedeniyle bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Yapılan çalışmalarda, lokal büyüme ve morfogenetik faktörlerin ekstrasellüler matrikste bulunduğu savunulmuş ve osteoindüksiyonu sağlayan bu faktörlerin etkisiyle stem hücrelerinin inorganik HA yapıya tutunduğu (Kemotaksik), değişerek kıkırdak ve kemik hücresine dönüştüğü ve kalsifiye olduğu bildirilmiştir (10,17,20). Son yıllarda üzerinde çok durulan konulardan biri de mercanların kalsiyum karbonat esaslı exoskeletlerinin hidrotermal değişimle rezorbe olabilen poröz HA dönüştürülmesi ve elde edilen biyomateryalin osteoindüktif kalitesidir (13). Ortopedik

çalışmalarda, materyalin bu özellikleri incelenmiş ve sözkonusu poröz HA'nın osteoindüktif kalitesi belirlenmiştir (14). Çalışmamızdaki örnekler ait kesitlerin histopatolojik analizlerinde, özellikle poröz HA'nın (Mercan'dan) kesitlerin hazırlanması sırasında eridiği ve kalan boşluğun etrafında yoğun biçimde osteoblast ve osteositlerin bulunduğu yeni kemik yapımı görülmekteydi. Yeni kemik yapımının deney gruplarında yer yer medullayı dolduracak derecede yoğunlaşması, kullanılan biyomateryalin osteoindüksiyonu olumlu yönde etkilediğini düşündürmektedir. Kontrol gruplarında korteksin hemen altında ve periost dışında görülen kemik yapımı hızlı gelişmemekte ve korteks dışındaki gelişim ise travmaya bağlı bir periost reaksiyonu olarak karşımıza çıkmaktadır. Kısaca; deney gruplarında 1. hafta içinde iltihabi reaksiyon, ikinci ve üçüncü haftalarda ise bu bölgelerde görülen yoğun yeni kemik yapımı bu konuda daha önce yapılan çalışmalarla da uygunluk göstermektedir (13,14,19, 21).

Sonuç olarak; kemik defektlerinde uygulanan BIOCORAL'in çevresinde kontrol grubuna göre "iyi" sayılabilecek gelişme olduğu histopatolojik, radyonüklit yöntemlerle gösterilmiş olmakla birlikte osteoindüksiyonu sağladığı düşünülen faktörlerin, "Biocoral uygulanan kemiklerdeki düzeyinin nasıl etkilenebileceği?", sorusunun cevabı aranmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Boyne, P.J.: Possibilities of stimulating bone reconstruction and regeneration by use of graft materials. *In Proceedings of 8th. Int. Conference on Oral Surg.* 1985: 584-90. Quintessenz Verlag-GMBH BERLİN 1987.
2. Clark, A.E., Hench, L., Paschall, H.A.: The influence of surface chemistry on implant interface histology. *J. Biomed. Mat. Res.* 1974 Symp. Materials for Reconstructive Surg. Clemson Univ.
3. Clinton, M.H., Witcofski, R.: Radiopharmaceuticals for skeletal and renal imaging. *In Nuclear Pharmacy.* 1986 Clinton-Witcofski, Lea-Febiger Berlin.
4. Guillemin G., Patat, J.L., Fournie, J., Chetail, M.: The use of coral as a bone grafts substitute. *J. Biomed. Mater. Res.* 1987 21: 557-67.
5. Hench, L.: Bioactive ceramics *Ann. New York Acad. Sci.* 1988 523: 54-71.
6. Hench, L., Paschall, H.A.: Histo-chemical responses at a biomaterials interface. *J. Biomed. Mater. Res.* 1974 5: 49-64.
7. Hench L., Splinter, B.J., Greenlee, T.K., Allen, W.C.: Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mat. Res.* 1971 2: 117-41.
8. Issahakian, S., Ouhayoun, J., Guillemin, G., Patat, J.L.: Le Corail Madre'poraire. *L'information Dentaire* 1987 24: 2123-32.
9. Klinge, B., Alberius, P., Isaksson, S., Jönsson, J.: Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic HA ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1992 50: 241-49.
10. Luyten, F.P., Cunningham, N.S.: Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiary bone differentiation. *J. Biol. Chem.* 1989 264: 1377-86.
11. Mac Intyre, D.R., Speculand, B.: Autogenous bone grafting for persistent maxillary cyst cavities. *Br. Dent. J.* 1983 155: 273-77.

12. Mitchell, R.: An evaluation of bone healing in cavities in the jaws implanted with a collagen matrix. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1992 30: 180-82.
13. Ouhayoun, J.P., Issahakian, S., Patat, J.L., Guillemin, G., Shabana, A.H.M., Sawaf, H.M., Forest, N.: Histological evaluation of alloplastic grafting in an animal closed model. *J. Dent. Res.* 1989 4(68)-275 Abs.
14. Ouhayoun, J.P., Issahakian, S., Patat, J.L., Guillemin, G., Shabana, A.H.M., Sawaf, H.M.: Influence of biomaterials on the healing pattern of bony defects in miniature pig mandible. *J. Dent. Res.* 1989 68: 1244, Special issue.
15. Piotrowski, G., Hench, L., Allen, W., Miller G.: Mechanical studies of the bone. Bioglass interfacial bond. *J. Biomed. Mater. Res.* 1975 9: 47-61.
16. Powers Thomas, A.: Bone imaging. *In Nuclear Medicine.* Martin Sandler, William-Wilkins London, 1985.
17. Reddi, A.H.: Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Cell. Rel. Res.* 1981 1: 209-11.
18. Ripamonti, U.: The induction of bone in osteogenic composites of bone matrix and porous HA replicas. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1991 49: 817-30.
19. Timoçin, N., Oral, C., Soley, S., Olgaç, V.: Banka kemiğinin kemik defekti iyileşmesi üzerine olan etkisinin deneysel olarak araştırılması. *İ.Ü. Diş Hek. Fak. Derg.* 1992 26(3): 115-18.
20. Urist, M.R.: Bone; Formation by autoinduction. *Science* 1965 159: 893-99.
21. Vargervik, K.: Critical Sites For New Bone Formation. *In Bone Grafts and Bone Substitutes.* Habal-Reddi. Saunders Philadelphia, 1992.

Yazışma adresi

Prof. Dr. Necla Timoçin
İ. Ü. Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve
Cerrahisi Anabilim Dalı
34390 Çapa - İstanbul