

## ÇEŞİTLİ KEMİK GREFT MATERYALLERİ ÜZERİNE İNSAN DİŞETİ FİBROBLAST ATAŞMANININ İN-VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ\*

### EVALUATION OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST ATTACHMENT ON VARIOUS BONE GRAFT MATERIALS IN-VITRO

GÜLAY TÜTER †, AYŞEN BODUR †, MEHMET YALIM ‡, İSMET GÜRHAN §

#### ÖZET

Biomateryal uygulamalarının başarısında rol oynayan faktörlerden birisi de greft materyalinin konulduğu bölgede primer stabilizasyonun sağlanması ve materyalin açıkta kalmayacak şekilde dişeti tarafından tamamıyla örtülmesidir. Bu nedenle greft materyalinin dişeti bağ dokusu ile biyolojik uyumluluğu primer stabilizasyon açısından büyük önem taşır. Bu çalışmanın amacı; insan dişeti fibroblastlarının 4 farklı kemik greft materyali ile olan biyolojik uyumluluğunun in-vitro olarak değerlendirilmesidir. Araştırmada; biyoaktif cam granüllerden oluşan sentetik bir greft materyali, kalsiyum karbonat yapısında granüllerden oluşan sentetik bir greft materyali, kalsiyum karbonat yapısında jel formunda sentetik bir greft materyali ve dondurulmuş kurutulmuş kemik greft materyali kullanıldı. Aynı kültür kabına deney materyallerinin tümü uygun şekilde yerleştirildi. Bu şekilde 4 adet kültür kabı hazırlandı. Takiben her kültür kabına 1 ml'sinde  $2 \times 10^5$  hücre bulunan vasattan 2 ml konularak % 5 CO<sub>2</sub> % 95 hava içeren ortamda 37 °C'de 2.5 saat süre ile inkübe edildi. Örnekler yüzey tarama elektron mikroskopunda (SEM) incelenerek hücrelerin biomateryaller üzerine olan tutunma özellikleri değerlendirildi. Sonuç olarak; insan dişeti fibroblastlarının tüm greft materyallerine tutunduğu ancak dondurulmuş kurutulmuş kemik grefti grubundaki hücrelerin diğer gruplarda yer alan hücrelere oranla daha fazla yayılım gösterdiği belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** Ataşman, fibroblast, kemik greft materyali, in-vitro

#### SUMMARY

The success of regenerative treatment procedures depends on primer stabilization of graft materials and covering these materials by soft tissues. The biocompatibility between graft material and connective tissue is very important for the primer stabilization. The purpose of this study is to compare the biocompatibility of these materials with human gingival fibroblasts in-vitro. Bone graft materials used in this study are: bioactive glass particles, calcium carbonate granules, calcium carbonate gel and freeze-dried bone graft. Each of these materials were placed in the same culture dish. Four culture dishes were prepared. Then 2 ml medium containing  $2 \times 10^5$  cell/ml was added to dishes. The culture dishes were incubated at 37 °C for 2.5 hours in a humidified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> in air. Scanning electron microscopic (SEM) evaluation showed that human gingival fibroblasts attached to all of these bone graft materials. However, fibroblasts were more spreaded in the freeze dried bone graft materials than other materials.

**Key words:** Attachment, fibroblast, bone graft materials, in-vitro

\* Türk Periodontoloji Derneği 27. Bilimsel Kongresi'nde tebliğ edilmiştir (Mayıs 1997, Antalya)

† Dr. Dt. GÜ Dişhekimliği Fak. Periodontoloji Anabilim Dalı

‡ Doç. Dr. GÜ Dişhekimliği Fak. Periodontoloji Anabilim Dalı

§ Uzman Vet. Dr. Şap Enstitüsü, Hücre Bankası ve Üretim Öncesi Kontrol Laboratuvarı Şefi

#### GİRİŞ

Periodonsiyumu oluşturan dokuların kaybıyla ortaya çıkan inflamatuvar periodontal hastalığın tedavisindeki temel hedef; yalnızca hastalığın ilerlemesini

durdurmak değil, aynı zamanda kaybedilen periodontal dokuların yeniden kazanılması olmalıdır<sup>2</sup>. Bu hedefe yönelik olarak günümüzde çeşitli tedavi metodları uygulanmaktadır. Rejeneratif tedavi metodları içerisinde yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekni-

ği<sup>1,3,4</sup> ve çeşitli kemik greft materyallerinin kullanımı<sup>5,6,7</sup> ön plana çıkmaktadır. Bu iki uygulama ayrı ayrı yapılabildiği gibi kombine olarakta kullanılabilir<sup>8,10,13,20</sup>.

Kemik greft materyalleri diş hekimliğinde şu amaçlarla kullanılmaktadır<sup>11</sup>:

1. Periodontal kemik içi defektlerinde,
2. İmplantlar çevresindeki kemik rezorpsiyonlarında,
3. İmplant yerleştirilmesi esnasında açıkta kalan implant kısmı üzerinde yeni kemik agumentasyonu sağlamada,
4. Periapikal kistlerin cerrahi tedavisinde,
5. İnce alveol kretlerinin agumentasyonunda,
6. Küçük veya büyük çene kemiği kistlerinin tedavisinde,
7. Çekimlerden sonra alveol soketlerinin doldurulmasında.

Greft materyali uygulamalarında istenilen amaca ulaşılmasında materyalin konulduğu bölgenin primer stabilizasyonunun sağlanması oldukça önemlidir. Primer stabilizasyon greft materyalinin yerleştirildiği bölgenin anatomik yapısının yanında, dişeti dokusuyla tamamen örtülmesine ve ağız ortamıyla tüm iyileşme periyodu boyunca ilişkiye girmemesine de bağlıdır. Bu noktada greft materyalinin dişeti bağ dokusu ile olan biyolojik uyumluluğu oldukça önem kazanmaktadır<sup>15</sup>.

Çalışmamızın amacı; çeşitli tipde kemik greft materyalleri üzerine insan dişeti fibroblast ataşmanının in vitro olarak değerlendirilmesidir.

Araştırmamızda, 4 farklı tipde kemik greft materyali kullanılmış olup, bu materyallerin gruplara göre dağılımı şu şekildedir :

1. (Biogren)<sup>12</sup> Silisyum, kalsiyum, sodyum, fosfor'dan meydana gelen 300-355m büyüklüğündeki biyo-

aktif cam granüllerden oluşan sentetik bir greft materyali,

2. (Biocoral 450)<sup>5</sup> Doğal koralde elde edilen kalsiyum karbonat yapısındaki, 450m büyüklüğünde granüllerden meydana gelen bir greft materyali,

3. (Biocoral jel)<sup>5</sup> Doğal koralde elde edilen, kalsiyum karbonat yapısındaki jel formunda sentetik bir greft materyali,

4. (Tutoplast spongiosa mikroçips)<sup>8</sup> Dondurulmuş kurutulmuş kemik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan hücreler ortodontik amaçlı diş çekimi esnasında, hastaların bilgisi dahilinde interdental papillerinden alınan dişeti biyopsilerinden elde edildi. Biyopsileri alınan hastaların sistemik ve periodontal açıdan sağlıklı bireyler olmasına dikkat edildi. Dişeti fibroblastları hücre kültürü için gerekli ortam koşullarında üretildi<sup>19</sup>. Çalışmada 7. Pasaj dişeti fibroblastları kullanıldı.

Deney sırasında kullanılacak olan greft materyalleri Dulbecco's Modified Eagles Medium\*\* (DMEM) (%10 fetal kalf serum içeren DMEM F12) içerisinde 2 dakika bekletildi. Bu arada 1.4 gr. Agaroz\*\* (Tip 7 low gelling) 125 ml distile su ile karıştırılarak 20 dakika süre ile steril edildi. Daha sonra 25 ml serum + 25 ml DMEM karışımı agarozla ilave edildi. Karışım kullanım anına kadar 56 °C de bekletildi. Herbiri üzerinde 2 çukurcuk bulunan steril edilmiş akrilik bloklar, içerisinde 2 ml agaroz bulunan 35 mm kültür kapları içerisine yerleştirildi. Greft materyallerinin yerleştirildiği akrilik blokların hücrelerin üremesi üzerine olumsuz etkilerinin olmadığı daha önceden test edildi.

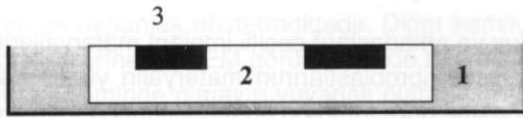
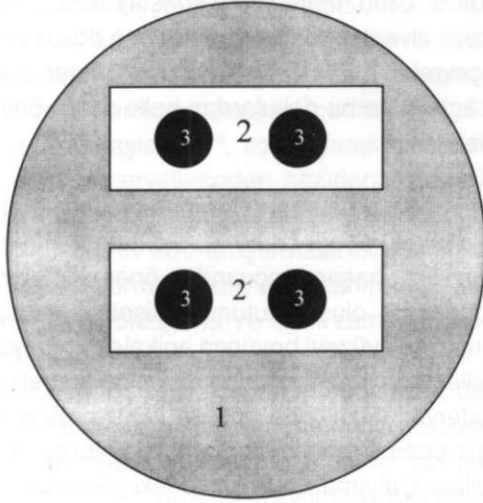
Çukurcuklara greft materyalleri konularak her greft materyalinden 4 ayrı örnek oluşturuldu (Şekil 1). Daha sonra kültür kaplarına 2.10<sup>5</sup>/1 ml hücre bulunan vasatdan 2 ml ilave edildi.

II Oraltronics

¶ Inoteb

# Biodynamics Int.

\*\* Sigma St. Louis, USA



**Şekil 1.** Kültür kabının üstten ve yandan görünüşü.

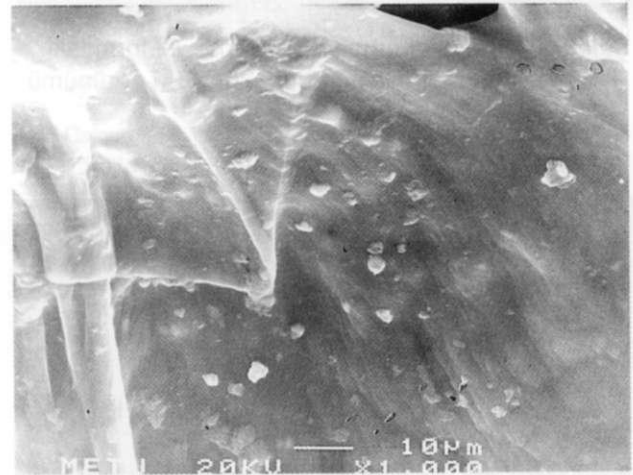
1. İçerisinde Agaroz bulunan 35 mm'lik kültür kabı
2. Akrilik parça
3. Greft materyalinin yerleştirildiği akril içerisinde oluşturulan çukurcuklar

Takiben örnekler 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> %95 havali etüvde 2.5 saat süre ile inkübe edildi. Örnekler bu periyotdan sonra % 2 lik gluteraldehit ile 1 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra da SEM ile (Jeol JSM-6400 Scanning Electron Microscope) değerlendirildi.

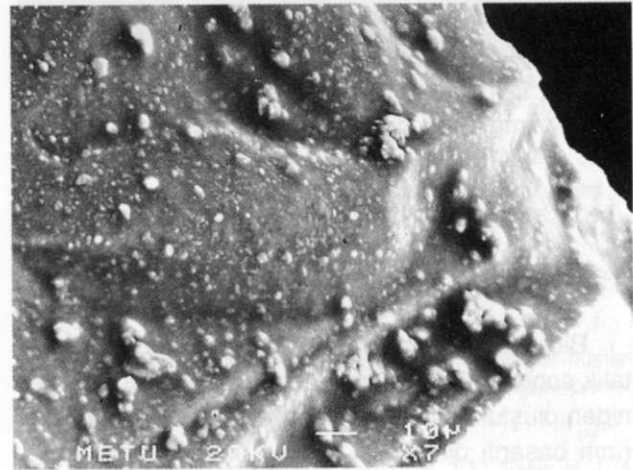
### BULGULAR

Çalışmamızda, farklı yapıdaki greft materyallerine tutunan hücrelerin SEM görüntülerine göre değerlendirilmesi sonucunda, tutunan hücre sayısı açısından gruplar arasında dikkate değer bir farklılık izlenmedi. Ancak gruplar, hücrelerin materyaller üzerinde göstermiş oldukları yayılma özelliklerine göre değerlendirildiğinde; biyoaktif cam granülleri (Şekil 2), kalsiyum karbonat yapısında granül (Şekil 3), ve kalsiyum karbonat yapısında jel (Şekil 4) formundaki kemik greft materyalleri üzerine tutunan hücrelerin yu-

varlak şekilli olduğu izlenirken, dondurulmuş kurutulmuş kemik grefti grubunda (Şekil 5) yer alan hücrelerin diğer gruplardaki hücelere nazaran parmağa benzeyen organelleri vasıtasıyla yüzeyde daha fazla yayılma gösterdiği bulguları. Ayrıca bu gruba ait fibroblastların diğer greft materyallerine tutunan fibroblastlara oranla daha fazla olgunlaştığı ve yüzeylerinde mikroprojeksiyonların gelişmekte olduğu gözlemlendi.

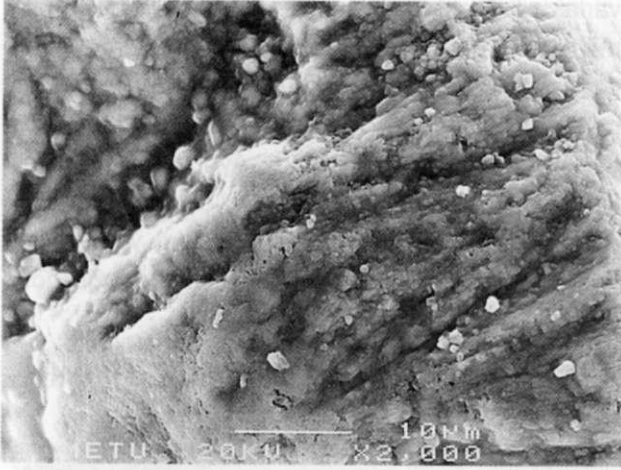


**Şekil 2.** Kalsiyum fosfat yapısındaki greft materyali grubuna ait SEM görünümü (X1000).

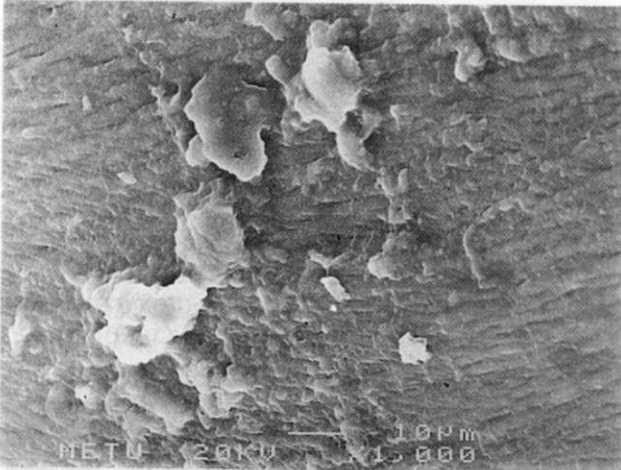


**Şekil 3:** Kalsiyum karbonat yapısında granül formdaki greft materyali grubuna ait SEM görünümü (X700).





Şekil 4: Kalsiyum karbonat yapısında jel formdaki greft materyali grubuna ait SEM görünümü (X2000).



Şekil 5: Dondurulmuş kurutulmuş kemik grefti materyali grubuna ait SEM görünümü (X1000).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Biomateryallerin kullanım amacı periodontal hastalık sonucu kaybedilmiş dento alveolar kemiğin yeniden oluşturulmasıdır<sup>2</sup>. Greft materyali uygulamalarının başarılı olabilmesi için en önemli faktörlerden birisi de greft materyalinin konulduğu bölgede primer olarak stabilizasyonunun sağlanması ve hiç açıkta kalmayacak biçimde dişeti tarafından tamamıyla ör-

tülmesidir<sup>15</sup>. Greft materyali yerleştirilmesi sonrası kök yüzeyi, alveoler kemik ve dişeti bağ dokusu tarafından çevrelenir. Dişeti bağ dokusu primer stabilizasyon açısından bu dokulardan belki de en önemlisidir diyebiliriz.

Dişeti bağ dokusunun greft materyalleri ile erken dönemde oluşturacağı tutunma, biomateryal uygulamalarının klinik başarısı açısından önemlidir. Ayrıca, erken dönemde oluşan tutunma dişetine ait epitel hücrelerinin kök yüzeyi boyunca apikale migrasyonunu engellemede yeterli olmasa da epitel hücrelerinin greft materyali yüzeyinde apikale ilerleyerek materyalin ağız ortamına açılmasını engelleyebileceği düşünülebilir. Çalışmamız farklı tipdeki greft materyallerinin dişeti ile olan biyolojik uyumluluğunun hücre bazında değerlendirilmesi amacıyla in-vitro olarak gerçekleştirilmiştir.

Guy ve arkadaşları<sup>9</sup> çeşitli implant materyallerine insan dişeti fibroblastlarının materyalin yüzey şekli ve doğasına göre tutunma gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan fibroblastlar hangi dokuya ait olursa olsun, kültür ortamına konulduklarında yuvarlak bir yapıya sahiptirler. İdeal üreme şartları sağlandığında öncelikle konuldukları yüzeye tutunmak amacıyla yüzeylerinde mikroprojeksiyonlar oluştururlar bunu takiben gelişimlerini tamamlayarak yuvarlak yapılarını kaybeder ve yayılmaya başlarlar sonunda da iğ şeklinde bir görünüme kavuşurlar<sup>14</sup>. Nitekim çalışmamızda da, hücre sayısı ve inkübasyon süresi tamamen aynı tutulduğu halde, biomateryallere tutunan hücrelerin gösterdikleri gelişimsel özellikler farklılıklar göstermektedir. SEM görüntüleri değerlendirildiğinde, dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti üzerine tutunmuş hücrelerin diğer greft gruplarına ait hücrelere oranla daha fazla yayılma eğiliminde olduğu görülmektedir. Bu farklılık biomateryallerin farklı yapısal özelliklerinden kaynaklanabilir.

Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti periodontal tedavilerde yaygın şekilde kullanılmaktadır<sup>12,16,20,21</sup>.

Çalışmamızda kullanılan greft materyalleri içerisinde tek organik kaynaklı greft materyali dondurul-

muş kurutulmuş kemik allogreftidir. Bu allogreftlerin kullanımını cazip hale getiren en önemli neden yeni kemik oluşturma yeteneğine sahip proteinleri yani kemik morfojenik proteinlerini içermesidir<sup>17</sup>. Shigeyama ve arkadaşlarının<sup>18</sup>, ticari olarak elde edilen kemik greft materyallerinden hazırlanan protein ekstraktlarının biyolojik aktivitelerini saptamak üzere yapmış oldukları in-vitro araştırmalarının sonuçları, protein ekstraktlarının hücre ataşmanını artırma kabiliyetine sahip olduğunu ve aynı zamanda hücrelerin tutundukları yüzeylerde yayılma eğilimlerini arttırdığını göstermiştir. Nitekim araştırmamızda, dondurulmuş-kurutulmuş kemik greft materyali grubunda hücrenin materyal üzerinde tutunmasının yanında diğer gruplara göre daha fazla yayılmaya başlamış olması, bu biomateriyalin diğerlerinden farklı olarak tek allogreft tipde greft materyali olmasına bağlı olabilir. Bu bulgumuz Shigeyama ve arkadaşlarının<sup>18</sup> çalışması ile uygunluk göstermektedir. Diğer kemik greft materyallerine ait SEM görüntülerinde hücrelerin yayılma eğiliminde olmayıp yuvarlak olarak görülmesi, bu greft materyallerinin kemik morfojenik proteinlerini içermemelerinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak greft materyallerinin biyoyumluluğu çeşitli faktörlere bağlı olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızda hücreler sadece tutunma özellikleri bakımından incelenmiştir. Bu yönüyle bakıldığında dondurulmuş kurutulmuş kemik greft materyali diğer greft materyallerine göre dişeti fibroblastlarının tutunması ve gelişmesi açısından daha uygun gözükmektedir. Yalnızca bu sonuçlara göre biyoyumluluğu değerlendirmek yeterli olmayacağından, diğer faktörleri de inceleyen çalışmalara gereksinim olduğu düşüncesindeyiz. Ek olarak çeşitli tipdeki greft materyallerinin biyolojik uyumluluğunun hücre kültürü düzeyinde incelenmesinin yanısıra, bu bulguların klinik olarak yapılacak araştırmalarla desteklenmesinin gerekliliği gözardı edilmemelidir.

#### KAYNAKLAR

1. Becker W, Becker B. Clinical application of guided tissue regeneration: surgical considerations. *Periodontology* 2000. 1: 46-53, 1993.
2. Carranza F.A. Glickman's Clinical Periodontology 7nd ed. W B Saunders Company, USA, 1990.
3. Caton J G, Greenstein G, Zappa U. Synthetic bioabsorbable barrier for regeneration in human periodontal defects. *J Clin Periodontol* 65: 1037-1045, 1994.
4. Cortellini P, Pini-Prato G, Tonetti M. Periodontal regeneration of human intrabony defects with titanium reinforced membranes. A controlled clinical trial. *J Periodontol* 66: 797-803, 1995.
5. Francis J R, Brunsoold M A, Prewett A B, Mellonig J T. Clinical evaluation of an allogenic bone matrix in the treatment of periodontal osseous defects. *J Periodontol* 66: 1074-1079, 1995.
6. Fucini S E, Quintero G, Gher M E, Black B S, Richardson A C. Small versus large particles of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony periodontal defects. *J Periodontol* 64: 844-847, 1993.
7. Galgut P N, Waite L M, Brookshaw J D, Kingston C P. A 4-year controlled clinical study into the use of a ceramic hydroxylapatite implant material for the treatment of periodontal bone defects. *J Clin Periodontol* 19: 570-577, 1992.
8. Garrett S, Bogle G. Periodontal regeneration with bone grafts. *Curr Opin Periodontol* 3:168-177, 1994.
9. Guy S C, McQuade M J, Scheidt M J. In vitro attachment of human gingival fibroblasts to endosseous implant materials. *J Periodontol* 64: 542-546, 1993.
10. Hippolyte M P, Fabre D, Peyrol S. Coral and guided tissue regeneration. Histological aspects. *J Parodontol* 10:279-286,1991
11. Lang N P, Karring T, Lindhe J. Proceeding of the 2nd European Workshop on Periodontology. 1ed Quintessenz Verlag, Berlin, 1997.
12. Mabry T, Yukna R, Sepe W. Freeze dried bone allografts combined with tetracycline in the treatment of juvenile periodontitis. *J Periodontol* 56: 74-81, 1985.
13. Mellonig J T. Autogenous and allogeneic bone grafts in periodontal therapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 3:33-352,1992.
14. Poul J. Cell and Tissue Culture. E&S Livingstone Ltd. London, 1970.
15. Payne J M, Cobb C M, Rapley J W. Migration of human gingival fibroblasts over guided tissue regeneration barrier materials. *J Periodontol* 67: 236-244, 1996.
16. Rummelhart J M, Mellonig J T, Gray J L, Towle H J. A comparison of freeze-dried bone allograft and demineralized freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. *J Periodontol* 60: 655-663, 1989.

17. Schwartz Z, Mellonig J T, Carnes D L Jr, de la Fontaine J, Cochran D L, Dean D D, Boyan B D. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. J Periodontol 67:918-926,1996.
18. Shigeyama Y, D'Errico J A, Stone R, Somerman M J. Commercially prepared allograft material has biological activity in vitro. J Periodontol 66: 478-487,1995.
19. Somerman M J, Archer S Y, Imm G R, Foster R A. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. J Dent Res 67: 66-70, 1988.

**Yazışma adresi**

Doç. Dr. Mehmet YALIM  
GÜ Dişhekimliği Fakültesi  
Periodontoloji Anabilim Dalı  
Emek - 06510 ANKARA

20. Yukna R A. Clinical human comparison of expanded polytetrafluoroethylene barrier membrane and freeze-dried dura mater allografts for GTR of lost periodontal support.I.mandibular molar class II furcations. J Periodontol 63: 431-442, 1992.
21. Yukna R A, Sepe W W. Clinical evaluation of localized periodontosis defects treated with freeze dried bone allografts combined with local and systemic tetracyclines. Int J Periodont Rest Dent 5: 9-21, 1982.