

## HİDROKSİLAPATİTİN YENİ KEMİK YAPIMINA ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

İnci KARACA\*

### ÖZET

Bu çalışma, 30 adet kobay mandibulasında, hidroksilapatitin, normal iyileşmeye bırakılan kontrol kavitelerine göre kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır. Değerlendirmeler 7. 14 ve 28. günlerde yapılmış ve HA'in kemik iyileşmesini olumlu yönde etkilediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Hidroksilapatit, biyomateryal, kemik defekti, kemik iyileşmesi.

### SUMMARY

#### EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF HYDROXYLAPATITE ON BONE FORMATION

This study was undertaken to investigate the bone regeneration in the mandible of 30 guinea pigs implanted with HA in comparison with normal healing bone cavities. Specimens were examined 7, 14 and 28 days after placement of the implant. The findings showed that this material stimulated bone healing i.e. bone regeneration when compared with empty control cavities.

Key Words : Hydroxylapatite, biomaterial, bone defect, bone healing.

(\*) G.Ü. Dişhek. Fak. A.D.Ç.H. ve Cerr. Anabilim Dalı, Dr.

## GİRİŞ

Ağız ve çeneler bölgesinde rezorbsiyon, hastalık, travma ve cerrahi girişimler gibi sebeplerle oluşan kemik defektleri zaman zaman hastaların estetik ve fonksiyonlarını ciddi şekilde tehdit eden bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (1-4). Bu sorunun ortadan kaldırılması için uzun yıllardan beri pek çok doğal (1, 5) ve sentetik (4, 6) greft materyalleri üzerinde çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda doku ile çok iyi uyum sağlayan kalsiyum fosfat grubu seramikler ve bu grup içerisinde trikalsiyum fosfat (TCP) ve hidroksilapatit (HA), deneysel ve laboratuar aşamalarında denenmiş ve klinik kullanıma sunulmuştur (7-9).

Kalsiyum fosfat seramiklerden olan HA  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , yüksek yoğunlukta, rezorbe olmayan pöröz ve non pöröz yapıdadır (10-11). Kalsiyumun fosfata oranı 1,67 olan HA, kemikteki kalsiyum-fosfat ilişkisi ile denk olan tek kalsiyum fosfat seramiktir (9).

Seramiklerle ilgili yapılan çalışmalarda HA'nin ağırlık kazanmasının en büyük nedeni, lokal veya sistemik toksik bir etki yapmaması, enflamasyon ve yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaması ile arada fibröz doku oluşmaksızın kemiğe direk olarak bağlanabilmesidir (4, 9).

HA'nin osteogeneze katkısı üzerinde ise farklı görüşlere rastlanmaktadır :

HA'nin, yeni kemik depozisyonunu hızlandırmada etkili olduğunu bildiren bir çok çalışmanın yanında (9-11), bunu kabul etmeyen araştırmalar da bulunmaktadır (12, 13).

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak oluşturulan kemik kavitelerine uygulanan HA implant materyalinin kontrol kavitelerine göre kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini histolojik olarak incelemektir.

## MATERYAL VE METOD

Araştırmamız H.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi Laboratuvarı ile A.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji Bilim Dalı'nda yürütülmüştür. Deney hayvanı olarak, 5-6 aylık, 500-600 gr ağırlı-

ğında her iki seksten 30 adet kobay kullanılarak, rastgele seçimle 10'ar hayvan içeren 3 grup oluşturulmuştur. Çalışmamızda implant materyali olarak HA seramik implantı (Frialit-HA-granula, 0.5-1,0 mm, Friedrichsfeld GmbH. D-6800 Mannheim 71) kullanılmıştır.

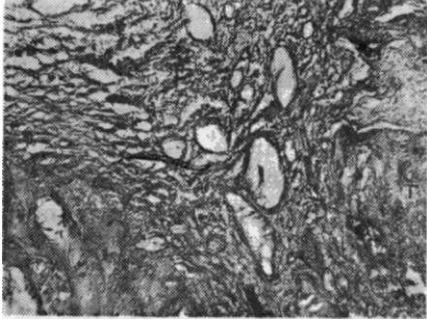
İmplant materyalinin uygulama yeri olarak, deney hayvanlarının alt çenelerinin angulus bölgeleri seçilmiştir. İşlemler sırasında deney hayvanları intraperitoneal olarak 25 mg/kg Nembutal Sodium (Pontobarbital Sodium, Abbott) ile anesteziye edildiler. Deneklerin anesteziyi sağlandıktan sonra operasyon bölgeleri traş edilerek antiseptik solüsyonla silindi. Bunu takiben cerrahi prensipler altında, alt çenelerinde mandibula alt kenarının 0.5 cm üzerinden insizyon yapıldı. Yumuşak doku dekole edilerek, açığa çıkan kemik üzerinde çapı 2 mm olan cerrahi ront frezle 4000 devir/dk. turla, serum fizyolojik altında sağ ve sol çenede birer tane olmak üzere defektler açıldı.

Defektler yıkanıp kanama kontrolü yapıldıktan sonra sağ alt çenedeki defektlere HA partikülleri yerleştirildi. Sol alt çenedeki defektler boş bırakıldı. İnsizyon hattı 3 x 0 ipek iplik ile primer olarak kapatıldı. Deney hayvanları, cerrahi işlemi takip eden 7., 14., ve 28. günde 10'ar adet olmak üzere öldürülerek, alt çene kemikleri önce bütünüyle çıkarıldı. Sonra defektlerin bulunduğu parçalar, etrafında yeterli sağlıklı kemik dokusu kalacak şekilde uygun boyutlarda küçütülerek % 10'luk nötral formalin solüsyonunda tesbit edildiler. Bunu takiben % 5'lik nitrik asitte dekalsifiye edilerek 5-6 um kalınlığında seri kesitleri elde edilen örnekler, Hematoksilin-Eozin ve Mallory-Azan boyama teknikleri ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelendiler.

## BULGULAR

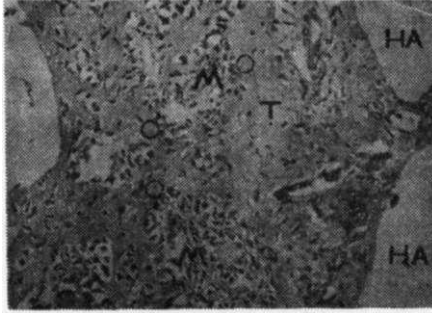
### 7. Gün:

Kontrol Grubu : Defekt bölgesinde kemik komşuluğundaki kavitede fibroblastik hücre proliferasyonu görüldü. Bazı kemik trabeküllerinin periferindeki hücrelerde irileşme ve osteoblastlara dönüşmeye hazırlanan bir aktivite izlendi (Resim 1).

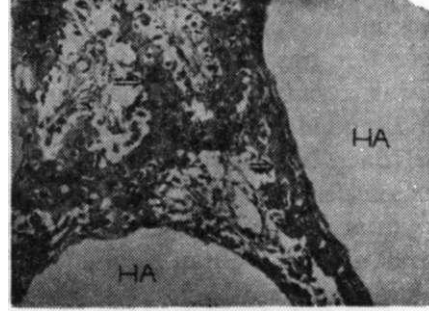


**Resim 1.** 1. gün kontrol grubunda fibroblastik aktivite. F : Fibroblast, T : Kemik trabekülü O : Osteoblast. (H.E.,x 200).

HA Grubu : HA partiküllerine komşu alanlarda hücre proliferasyonunun kontrol grubuna oranla daha yoğun olduğu gözlemlendi. Yeni kemik trabeküllerinin periferinde osteoblastların çoğaldığı ve myeloid dokuda kapillerlerde proliferasyonun başladığı dikkati çekti (Resim 2-3).



**Resim 2.** 7. gün HA grubu. HA : Hidroksilapatit partikül alanları, O : Osteoblast, T: Kemik trabekülü, M : Myeloid doku. (H.E., x 300).

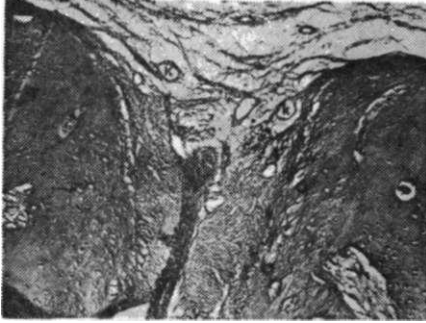


**Resim 3.** 7. gün HA grubunda yeni kemik yapımını işaretleyen bazofil alanlar. HA : Hidroksilapatit partikül alanları, çift-okla : Bazofil alanlar T : Kemik trabekülü (Mallory-Azan, x 350).

#### 14. Gün:

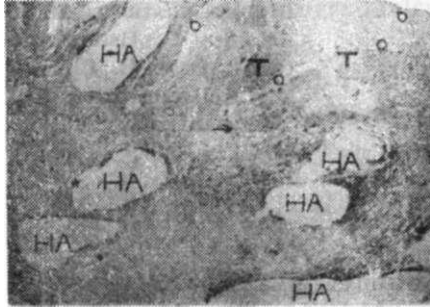
Kontrol Grubu : Kemik trabeküllerinin yenilenmesinin devam ettiği ve hücre proliferasyonunun sürdüğü görüldü. Yeni kemik alanlarında osteoblastik faaliyet mevcut olup, bol proliferere damar

yapılarının varlığı izledi (Resim 4). HA Grubu : Kemik trabekülleri çevresinde osteoblastik aktivitenin, kontrol grubuna oranla daha



**Resim 4.** 14. gün kontrol grubunda yeni kemik alanlarındaki osteoblastik aktivite. T : Kemik trabekülü, O : Osteoblast, Okla : Osteosit, K : Kan damarı (H.E., x 100).

yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi. Yeni kemik trabekülleri içinde genç osteositler ve bol damarlı aktivite gösteren myeloid doku izlendi (Resim 5).

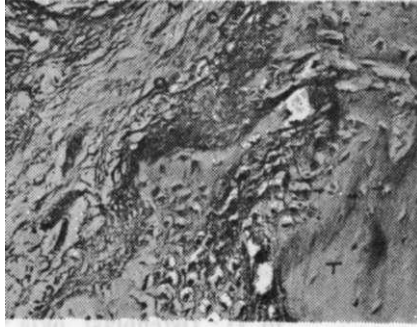


**Resim 5.** 14. gün HA grubunda osteoblastik aktivite HA: Hidroksilapatit partikül alanları, T : Kemik trabekülü, Okla : Osteosit, O : Osteoblast. (H.E., x 200).

#### 28. Gün:

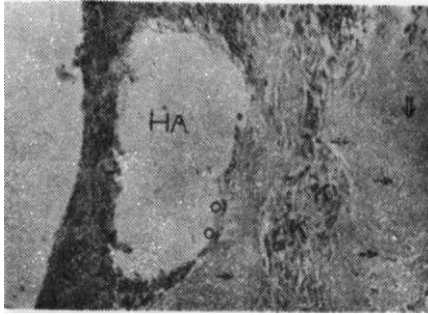
**Kontrol Grubu :** Osteoblastik aktivitenin sürdüğü, myeloid dokuda proliferasyon ve damar çaplarında genişlemeler olduğu izlendi. Kontrol grubu defekt bölgelerinde yeni oluşan kemik dokusunun geniş alanlar kaplamadığı görüldü (Resim 6).

**HA Grubu :** HA partiküllerine bitişik bölgelerde yeni kemik dokusu gözlemlendi. Trabeküller içinde osteoblastlardan dönüşmüş asidofil sitoplazmalı osteositler ve bunların çevresinde, ileride lamel sistemini oluşturmak üzere olgunlaşan kollagen lifler görül-



**Resim 6.** 28. gün kontrol grubu. T : Kemik trabekülü, O: Osteoblast, okla: Osteosit, M : Myeloid doku. (H.E., x 200).

dü. Yeni kemik trabekülleri arasındaki myeloid dokuda bulunan kan damarları, iyi gelişmiş endotelleriyle dikkati çekti (Resim 7).



**Resim 7.** 28. gün HA grubu. HA : Hidroksilapatit partikül alanları, O : Osteoblast, Okla : Osteosit, Çiftokla : Kollagen lifler, K : Kan damarı. (H.E., x 450).

Deney gruplarının hiç birinde iltihabi hücre infiltrasyonu ve yabancı cisim reaksiyonu gösteren bulgulara rastlanmadı. HA İmplant materyalinin, yeni oluşmakta olan kemik dokusuyla tamamen bitişik olduğu gözlemlendi.

## TARTIŞMA

Araştırmacılar uzun yıllardan beri, kemik defektlerinin onarılmasında kısa sürede ve ideal sonuç alabilmek için yeni biomateriyallerin geliştirilmesi üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır (14, 15).

HA seramiklere karşı doku reaksiyonlarını incelemek amacıyla, yapılan çalışmalar, çeşitli klinik gözlemleri, histopatolojik araştırmaları ve çok sayıda vaka bildirilerini içermektedir (6, 12, 13).

Yapılan çalışmalarda, HA implant materyalinin doku ile biyolojik uyumunun çok iyi olduğu önemli ölçüde iltihabi ve yabancı cisim reaksiyonu göstermediği belirtilmiştir (4, 9). Bu çalışmada da, HA grubunda deney süresince herhangi bir iltihabi ve yabancı cisim reaksiyonu görülmemesi ve dokular tarafından iyi tolere edilmesi, bu bulgular ile uyum içindedir.

HA implant materyalinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi çok sayıda araştırma ile incelenmiş ve bazı çalışmalarda bu materyalin yeni reparatif kemiğin birikimi ve bağlanması için uygun ortam hazırladığı, osteokondüktif ve osteofilik olduğu belirtilirken (9-11), bazı araştırmalarda ise osteogeneziste etkili olmadığı ve sadece eksik dokuyu tamir özelliği taşıdığı bildirilmiştir (12, 13).

Uchida ve arkadaşları (16) rat ve tavşanların kafataslarında oluşturdukları defektlere kalsiyum HA uygulamışlar, fakat seramik porları içerisinde çok az yeni kemik oluşumu izlemişlerdir. Ohgushi ve arkadaşları da (17), ratların femoral defektlerine poröz HA uygulamaları sonucunda, HA'in, kemik iliğiyle kombine kullanılmadığında iyileşme potansiyeli olmadığını bildirmişlerdir.

Butts ve arkadaşları (18), mongrel köpeklerinde, alveol kret yükseltilmesi veya interpozisyonel mandibuler implantasyon'u takiben, 2-3 hafta gibi kısa bir sürede poröz HA partikülleri etrafında kemik yapımının başladığını belirtmişlerdir.

Silverberg ve arkadaşları (19), ratlarda, subperiosteal HA uygulamasından 2 hafta sonra, implant materyali çevresinde yeni kemik yapımının başladığını ve önemsiz derecede iltihabi ve yabancı cisim reaksiyonu izlendiğini bildirmişlerdir. Bu değişik sonuçlarda, implant materyali ile sağlıklı, yaşayan kemik dokusu arasındaki direk kontakın çok önemli olduğu düşünülmektedir (20).

Bu çalışmada da HA uygulamasını izleyen, 7. ve 14. günlerde, fibroblastik hücre proliferasyonu ve bol damarlı aktivite gösteren myeloid doku izlendi. 14. gün sonunda, kemik trabekülleri etrafında

#### HİDROKSİLAPATİTİN YENİ KEMİK YAPIMINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

da, yüksek düzeyde osteoblastik aktivite dikkati çekerken, iltihabi hücre infiltrasyonu ve yabancı cisim reaksiyonu bulgularına rastlanmadı.

Klinge ve arkadaşları (20), tavşanların kafataslarında oluşturdukları kemik defektlerine HA uygulanmasının, yeni kemik yapımını hızlandırdığını ve 4 hafta sonunda defekt bölgesinde ve defekt komşuluğundaki periosteal yüzeyde, kemik formasyonu olduğunu ve inflamatuvar hücre cevabının dikkate alınmayacak ölçüde hafif olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da, 28 günlük period sonunda, HA partikülleri çevresinde yeni oluşmakta olan kemik dokusu ve trabeküller içinde osteositler ve bunların etrafında, bol miktarda kollagen lif demetleri görüldü.

Bu çalışmanın sonunda elde edilen histolojik bulgular, HA'in kemik dokusu yapımına elverişli bir ortam hazırlayarak yeni kemik oluşumunu uyardığını ve hızlandırdığını göstermiştir. Bu sonuçların doğrultusunda HA'in, hızlı kemik yapımının gerekli olduğu kemik defektlerinde uygun bir sert doku implant materyali olduğu belirlenmiştir.

#### KAYNAKLAR

- (1) Schaberg SJ, Petri WH, Gregory EW, et al. A comparison of freeze dried allogenic and fresh autologous vascularized rib grafts in dog radial discontinuity defects. J. Oral Maxillofac Surg. 1985; 43: 932-7.
- (2) Kraut RA. Composite graft for mandibular alveolar ridge augmentation: A preliminary report. J. Oral Maxillofac. Surg. 1985, 43 : 856-9.
- (3) Marby TW, Yukna RA, Sepe W. Freeze-dried bone allografts combined with tetracycline in the treatment of juvenile periodontitis, J. Periodontol. 1985, 56 (2) : 74-81.



Inci KARACA, Mustafa TÜRKER, Canan AKBAY

- (4) Frank RM, Klewansky P. et al. Ultrastructural demonstration of the importance of crystal size of bioceramic powders implanted into human periodontal lesions, *J. Clin. Periodontol.*, 1991, 18 : 669-80.
- (5) Pelker RR, Friedlander GE. Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthopedic Clinics of North Am.* 1987, 18 (2) : 235-9.
- (6) Chao SY, Poon CK. Histologic study of tissue response to implanted hydroxylapatite in two patients *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1987, 45 : 359-62.
- (7) Jarcho M, Bölen CH, Thomas MB, et al. Hydroxylapatite Synthesis and characterization in Dense polycrystalline form. *J. Mater. Scien.* 1976, 11 : 2027-35.
- (8) Jarcho M, Salzburg RL., Synthesis and fabrication of B-Tricalcium phosphate (Whitlockite) ceramics for potential prosthetic applications. *J. Mater Scien.* 1979, 14 : 142-50.
- (9) Han T, Carranza FA, Kenney EB, Calcium phosphate ceramic in dentistry. A review of the literature. *J. Western. Soc. of Periodontol. Periodontal Abs.* 1984, 32 (2) : 88-108.
- (10) Jarcho M, Biomaterial aspects of calcium phosphates. *Dent. Clin. North Am.* 1986, 30 (1) : 25-47.
- (11) Jarcho M, Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical Orth. and Related Research.* 1981, 157 (6) : 259-77.
- (12) Beirne OR, Grenspan JS. Histologic evaluation of tissue response to hydroxylapatite implanted on Human mandibles. *J. Dent. Res.* 1985, 64 (9) : 1152-4.
- (13) Froum SJ, Kushner L, Scoop I.W., Stahl SS. Human clinical and histologic responses to durapatite implants in intraosseous lesions-Case reports. *J. Periodontol.* 1982, 53 (12) : 719-25.
- (14) Guillemain G., Patat JL, Fournie J, Chetail M. The use of coral as a bone graft substitute. *J. Biomed Mater Res.* 1987, 21 : 557, 67.
- (15) Kasperk G, Ewers R, Simons B, Kasperk R. Algae-derived (phytogene) Hydroxylapatite. A comparative histological study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1988, 17 : 319-24.
- (16) Uchida A, Nade SML, McCartney ER, et al : The use of ceramics of bone replacement. A comparative study of three different porous ceramics. *J. Bone Joint Surg.* 1984. 66 B2 : 269-85.
- (17) Ohgushi H, Goldberg VM, Çaplan Al : Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand.* 1989, 60 : 334.

HİDROKSİLAPATİTİN YENİ KEMİK YAPIMINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

- (18) Butts TE, Peterson LJ, Ailen CM: Early soft tissue ingrowth into porous block Hydroxyapatite. J. Oral Maxillofac. Surg. 1989, 47 : 4T5.
- (19) Silverberg M, Singh M, Sreekonth S, Gans BJ : Use of Polyglycolic Acid Mesh to Confine Particulate Hydroxylapatite for Augmentation of Bone in the Rat. J. Oral Maxillofac. Surg. 1986, 44 (11) : 877-86.
- (20) Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jönsson J. Osseous Response to Implanted Natural Bone Mineral and Synthetic Hydroxyl,apatite Ceramic in the Repair of Experimental Skull Bone Defects. J. Oral Maxillofac Surg. 1992, 50 : 241-49.