

# TAVŞANLARDA LİYOFİLİZE HETEROLOG KOLLAJEN, BONE-WAX VE OKSİTLENMİŞ REJENERE SELÜLOZUN KEMİK İYİLEŞME HIZINA ETKİLERİ

Serhat ÖZBEK\*, Zeynep KAHVECİ\*\*, Ramazan KAHVECİ\*, Mesut ÖZCAN\*, Şahin SIRMALI\*\*

\* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi A.D., \*\* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D., BURSA

## ÖZET

Kafatası kemiği gibi yassı kemiklerde kemik defekti oluştuğunda, bu defekt intramembranöz kemikleşme ile onarılmaktadır. Intramembranöz kemikleşme ise periost altındaki multipotent mezotelyal hücreler ve defekt kenarlarındaki osteoprogenitör hücreler sayesinde gerçekleşmektedir.

Bu çalışmada, tavşanlarda yeni kemik oluşumuna liyofilize heterolog kollajen (LHK), oksitlenmiş rejenere selüloz (ORS) ve bone-wax'ın etkileri araştırıldı. 16 adet tavşanın ketamin rompun anestezisini takiben frontoparietal alandaki tüyleri temizlendi ve frontal alandan parietal alana uzanan orta hat insizyonu ile kafatası ekspozite edildi. Cilt flepleri, subperiosteal planda, her iki yana disekt edildi. Orta hattın her iki tarafında, ikişer adet, 2 cm. çaplı monokortikal kemik defekti oluşturuldu. Bu defektlerin üç tanesi sırasıyla liyofilize heterolog kollajen, oksitlenmiş rejenere selüloz ve bone-wax ile doldurulurken bir tanesi kontrol amacıyla boş bırakıldı. Periostla birlikte cilt primer kapatıldı. 21., 45., 120. ve 180. günlerde 4 adet tavşandan kesitler alınarak, dekalsifikasyon ve boyamayı takiben histolojik inceleme yapıldı. Sonuç olarak LHK ve ORS uygulanan kemik defektlerinde, kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında, yeni kemik oluşumunun hızlandığı gözlenirken, bone-wax uygulanan kemik defektinde yeni kemik oluşumunun geciktiği görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Kemik oluşumu, kollajen, selüloz, bonewax.

## SUMMARY

**The effects of lyophilized heterologous collagen, bone-wax and oxidized regenerated cellulose on bone healing in rabbits.**

When a bone defect is created on cancellous bone such as calvarium, this defect is repaired by intramembranous ossification, which is the function of the multipotent mesothelial cells located on the undersurface of the periosteum and the osteoprogenitor cells of the defect rim.

In this research, the effects of lyophilized heterologous collagen (LHC), oxidized regenerated cellulose (ORC) and bone-wax on bony regrowth, in the rabbit, were studied. 16 rabbit heads were studied. After ketamine, rompun anesthesia, 16 rabbit heads were shaved and with a midline incision, extending from the parietal area to the frontal region, the calvarium was exposed. Flaps were then developed laterally in a subperiosteal plane. Four paramidline monocortical defects of 2 cm. in diameter were created. While three of the defects were filled with heterologous collagen, oxidized regenerated cellulose and bone-wax respectively, the fourth one was remained unfilled as a control. Periosteum and skin were sutured together. On 21st, 45th, 120th and 180th days, after decalcification and staining, histologic sections of 4 rabbits were examined under light microscopy. As a result, it was observed that, LHC and ORC accelerated bony regrowth when compared with the control defect, whereas the bone-wax retarded it.

**Key Words:** Bone regeneration, collagen, cellulose, bone-wax.

Kraniumda travmatik veya cerrahi olarak monokortikal kemik defekti oluşturulduğunda, bu defektin defekt kenarlarındaki osteoprogenitör hücreler ve periost-kemik arayüzeyinde bulunan multipotent mezotelyal hücreler tarafından onarıldığı bilinmektedir<sup>1,2</sup>. Bu ara yüzeydeki hücre tabakasına kambiyum tabakası denilmektedir ve izole edilirken kemik tarafı iyi diseke edilmezse, osteoblastları oluşturacak mezotelyal hücrelerin kemikte kalacağı ve periostun yeni kemik oluşumunu sağlayamayacağı söylenmektedir<sup>3</sup>. Periostun belirli şartlarda yeni kemik oluşturabileceği Skoog tarafından da yayınlanmıştır. Skoog bu çalışmada "surgicel" (oksitlenmiş rejener selüloz) kullanmış ve bu maddenin periosta bir destek sağlarken aynı zamanda da bünyesinde yeni kemik oluşumuna izin vererek etkili olduğunu bildirmiştir<sup>4</sup>. Ayrıca konjenital yarık maksillada periostal flepler kullanarak bu gözlemini klinik uygulamaya sokmuştur. Daha sonra bu yöntem 1980'lerde Latham tarafından geliştirilmiştir<sup>5</sup>.

Periosttan yeni kemik oluşumunu hızlandırmak amacıyla birçok dolgu maddesi denenmiştir. Thaller ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarda, periost devamlılığı sağlandığı takdirde kemik defektinin kendiliğinden onarılabilirdiğini ancak hidroksiapatitin bunu bir miktar hızlandırdığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, bone-wax ve gelfoam yavaşlatıcı materyaller olarak bulunmuşlardır<sup>2</sup>.

Çalışmamızda kullandığımız liyofilize heterolog kollajen sığır aşil tendonundan elde edilmiştir ve tip I kollajen içermektedir. Öngörülen etkileri arasında:

1) Yapısındaki glisin, hidroksprolin ve sodyum tuzları ile yeni oluşacak kemik dokuya materyal kaynağı olabilmesi<sup>6</sup>,

2) Stereometrik yapısıyla yeni oluşan bağ-dokusuna destek sağlayabilmesi<sup>6</sup>,

3) İntrensek pıhtılaşma mekanizmalarıyla etkileşerek pıhtılaşmaya yol açabilmesi<sup>6</sup>,

4) Periosta destek sağlayabilmesi<sup>4</sup> ve büyüme faktörleriyle etkileşerek onların ortamda artmasını sağlayabilmesi<sup>6</sup> sayılabilir.

Oksitlenmiş rejener selüloz pıhtılaşmayı kolaylaştırmakta ve yapısı içinde yeni kemik oluşum odaklarının oluşmasına izin vermektedir<sup>4</sup>.

Bone-wax'ın mekanik tamponat etkisiyle kanamayı durdurduğu, 1892 yılında, Horsley tarafından bildirilmiştir.

Ayrıca ortamdan çok geç kaybolduğu için mekanik engel oluşturarak yeni kemik oluşumunu geciktirdiği bildirilmiştir<sup>2</sup>.

Bu çalışmada, yukarıda adı geçen biyomateryellerin, monokortikal kemik defektlerinde yeni kemik oluşumuna etkileri, kontrol gurubu ile karşılaştırılarak, araştırılmıştır.

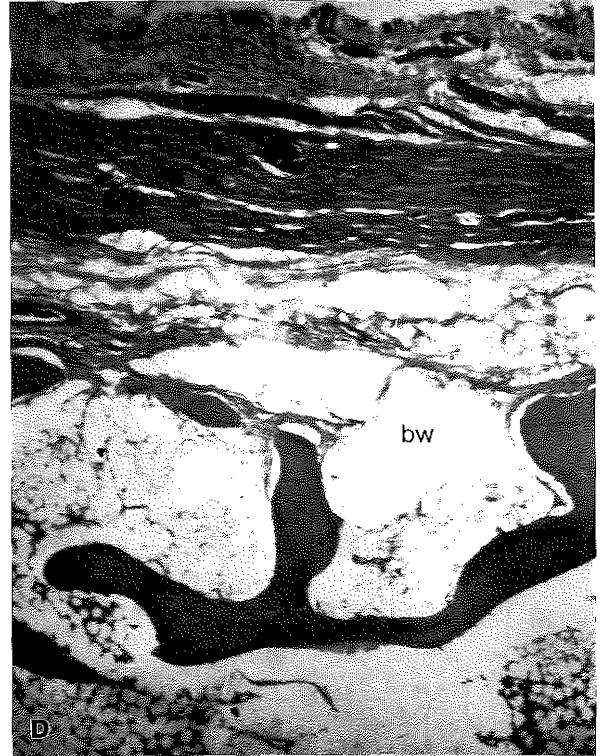
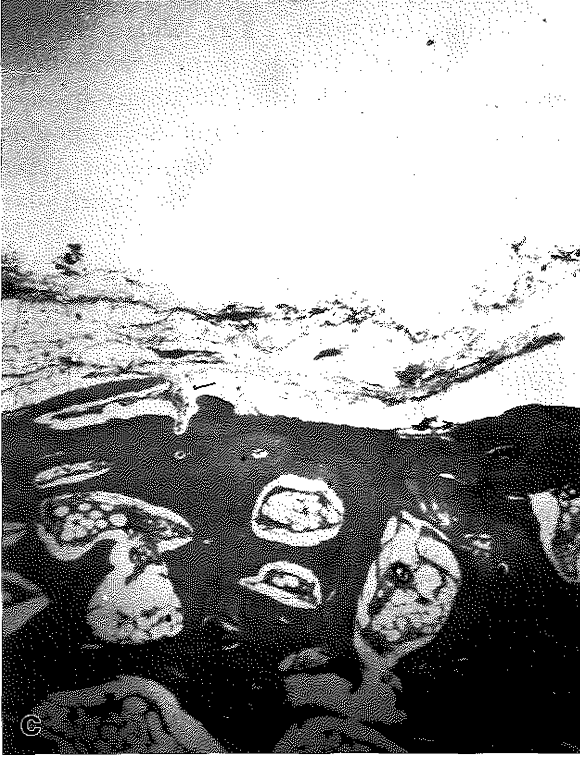
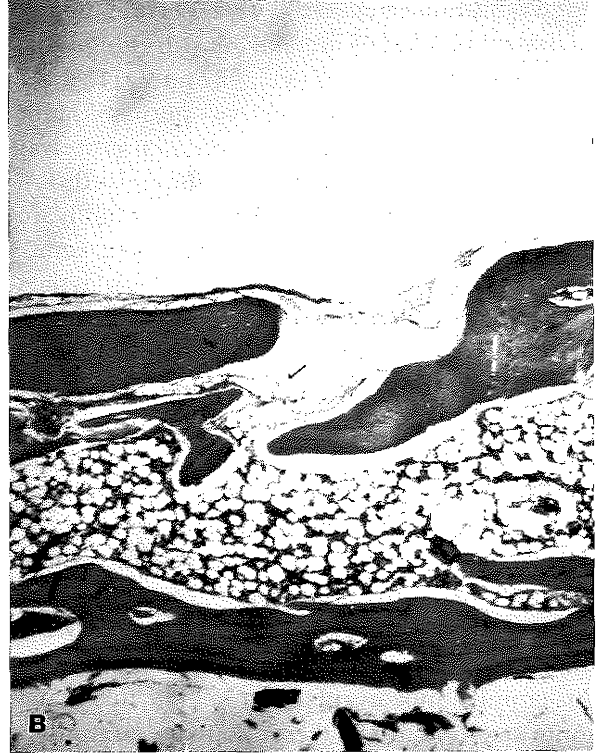
## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda yaşları 2-3 ay, kiloları 2,5-3 kg. arasında değişen, 16 adet Yeni Zelanda türü beyaz tavşan kullanılmıştır. Tavşanları standart laboratuvar koşullarında, Helsinki Sözleşmesi'ne uygun olarak muhafaza edilmişlerdir. Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından uygulanmıştır.

Ketamin - rompun anestezisini takiben tavşanın frontoparietal bölgesindeki tüyler temizlenmiştir. Daha sonra, bu bölgede, orta çizgide 6-7 cm.lik bir cilt, ciltaltı, periost insizyonu yapılmış ve heriki tarafa cilt flepleri, periostla birlikte, diseke edilmiştir. Orta çizginin heriki tarafında, drill ile, ikişer adet 2 cm. çapında, toplam 4 adet monokortikal kemik defekti oluşturulmuştur. Sağ tarafta üstteki defekte heterolog kollajen ped, alttakine bone-wax, sol tarafta ise alttakine oksitlenmiş rejener selüloz yerleştirilirken üstteki kemik defekti kontrol amacıyla boş bırakılmıştır. Daha sonra cilt ve periost birlikte 4/0 ipek dikiş ile primer olarak kapatılmıştır. 21., 45., 120. ve 180. günlerde dördür adet tavşan yüksek doz pentotal ile sakrifiye edilmişler ve çalışılan bölgedeki kemik parça alınarak nötral formalin içerisine konmuştur. Formik asit ile dekalsifikasyonu takiben dört bölgeden de histolojik kesitler alınmış ve hematoksilen - eozin ve bir kollajen boyası olan Masson-Trikrom ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir.

## SONUÇLAR

21. günde alınan histolojik kesitlerin incelenmesi sonucunda, dört defekte de yeni kemik oluşumu net olarak saptanamadı, bone-wax'ın kaybolmayarak defekt bölgesinde



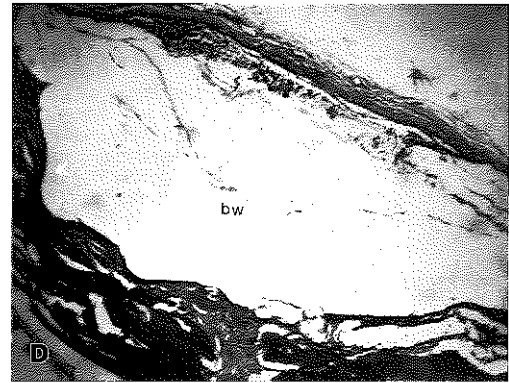
**Şekil 1 a:** Kemikleşme odakları ve yeni oluşan ince kemik spikülleri (okla işaretli) (45.gün) (H&E) (X 160) (Kollajen). **b:** Bağ dokusunda artış, kemik oluşum odakları ve ince kemik spikülleri (okla işaretli) (45. gün) (H&E) (X 160) (Selüloz). **c:** Bağ dokusu artışı ve çok belirgin olmamakla beraber yeni kemik oluşumu (okla işaretli)(X 160) (kontrol). **d:** Ortamdan kaybolmayan bone-wax (bw). Bağ dokusu artışı dışında belirgin bir onarım işlevi gözlenmiyor (45.gün ) (H&e) (X 160) (Bone-wax).

kaldığı görüldü.

45. gün alınan kesitlerde, heterolog kollajen (Şekil 1a) ve rejener selüloz (Şekil 1b) uygulanan defektlerde yeni kemik oluşum odakları, bağ dokusunda artış ve oluşan ince kemik spikülleri gözlenirken, kontrol defektinde (Şekil 1c) henüz kemikleşmenin yeni, yeni başladığı görülmekteydi. Bone-wax uygulanan tarafta ise bone-wax'ın kaybolmadığı ve yeni

kemik oluşumunun başlamadığı gözlenmekteydi (Şekil 1 d).

120. gün makroskopik olarak baktığımızda

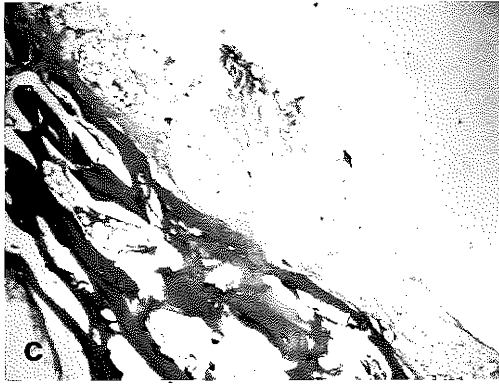
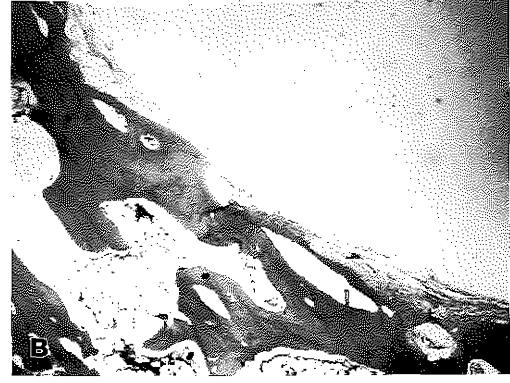
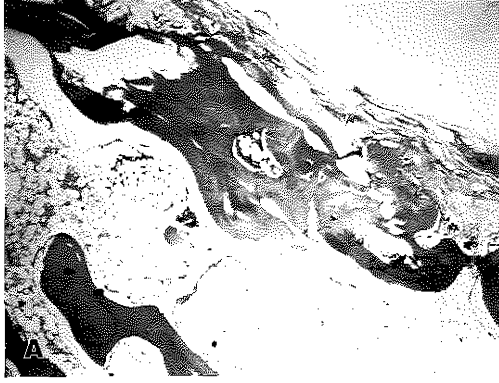


**Şekil 2 a:** Yüzeğe yakın kısımda genişlemiş ve kısmen olgunlaşmış kemik spikülleri. Yeni kemik oluşumu devam ediyor (120. gün) (H&E) (X 160) (Kollajen). **b:** Şekil 2 a' dakinden daha ince ve daha az olgunlaşmış yeni kemik dokusu. Yüzeğe yoğun yeni kemik oluşumu (120. gün) (H&E) (X 160) (selüloz). **c:** Şekil 1 a ve 1 b' dekilere benzer şekilde yeni kemik oluşum odakları ve ince kemik spikülleri (120. gün) (H&E) (X 320) (Kontrol). **d:** Defekti dolduran bone-wax (bw) ve yüzeğe yetersiz onarım işlemi. (120. gün) (H&E) (X 160) (bone-wax).

bone-wax uygulanan taraf haricinde, defektlerin onarılarak belli belirsiz hale geldiği gözlemlendi. Mikroskopik düzeyde ise kollajen kullanılan tarafta (Şekil 2a) belirgin olmak üzere selüloz kullanılan tarafta da (Şekil 2b) belirgin olmak üzere yeni oluşan kemik spiküllerin çoğaldığı ve genişlediği görüldü. Kontrol tarafında da yeni kemik oluşum odaklarının yaygınlaştığı, yer, yer ince kemik spiküllerin oluştuğu görülmekteydi (Şekil 2c). Bu görüntü kollajen ve selüloz kullanılan taraflardaki 45. gün görüntüsüne

benzemektedir. Bone-wax'ın ise halen ortamda kaldığı saptandı, etrafında ise bir miktar yeni kemik oluşumu izlenmekteydi (Şekil 2d).

180. gün makroskopik olarak ise kollajen ve selüloz kullanılan defektlerin tama yakın onarıldığı, ancak yeni kemik oluşumunun devam ettiği görülmekteydi (Şekil 3a ve b). Kontrol amacıyla kullanılan defektde onarımın henüz tamamlanmadığı, buna karşın kemik spiküllerinin kalınlaşmaya başladığı ve yeni kemik oluşum odaklarının yaygınlaştığı



Şekil 3 a: Defekt tama yakın onarılmış, olgunlaşma devam ediyor (180.gün) (H&E) (X 160) (Kollajen). b: Şekil 3 a ile benzer görüntü. (180.gün)(H&e) (X 160) (Selüloz). c: Onarım tamamlanmamış. Yeni kemik oluşumu ve oluşan kemik spiküllerinin olgunlaşması devam ediyor (180. gün) (H&E) (X 160) (Kontrol). d: Halen kaybolmayan bone-wax (bw) ve etrafında henüz ilk aşamalarda olan onarım çabaları (180. gün) (H&e) (X 160) (Bone-wax).

izlenmekteydi (Şekil 3 c). Bone-wax uygulanan tarafta ise bone-wax'ın varlığını sürdürdüğü ve etrafındaki az miktardaki rejeneratif olayların sürmekte olduğu görüldü (Şekil 3 d).

### TARTIŞMA

Travmatik, konjenital veya cerrahi kemik defektlerinde onarımın hızlı olması hastaya ve doktoruna birçok faydalar sağlayacaktır. Bu nedenle bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada da amaç değişik biyomateryallerin yeni kemik oluşum hızına etkilerini araştırmak olmuştur.

Bilindiği gibi kafatası gibi yassı kemiklerde bir defekt oluştuğunda bu defekt kemik-periost arayüzeyinde bulunan multipotent mezotelyal hücreler ve defekt kenarlarında bulunan osteoprogenitör hücreler tarafından onarılmaktadır. Osteoprogenitör hücreler

diploe mesafesinde ve kemik iliğindeki damarların çeperinde bulunmaktadır<sup>2</sup>. Bu hücrelerin faaliyetlerini hızlandırmak amacıyla, bu çalışmada, liyofilize heterolog kollajen ve oksitlenmiş rejener selüloz kullanılmış ve kontrol amacıyla boş bırakılan defekt ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca daha önceki yayınlarda yeni kemik oluşumunu yavaşlattığı ileri sürülen bone-wax'ın etkisi de araştırılmıştır.

Heterolog kollajenin çeşitli doku onarımlarına bazı yollardan yardımcı olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar arasında ortamda amino-asit kaynağı olarak davranması, büyüme

faktörlerinin ortamda yoğunlaşmasını sağlaması, yeni oluşacak bağ dokusuna iskelet fonksiyonu yapması ve pıhtılaşmayı hızlandırması sayılabilir.

Yaptığı bir çalışmada Skoog, kemik defekti oluşturmuş, bu defekte oksitlenmiş rejenere selüloz yerleştirmiş ve periostu kapatmıştır. Yeni kemik oluşumunu periostun gerçekleştirdiğini görmüş, selülozun da periosta destek sağladığını, yapısında pıhtılaşmaya yol açarak bu pıhtı içinde yeni kemik oluşum odaklarının gelişmesine olanak sağladığını ve bu yolla da onarım hızını arttırdığını ileri sürmüştür 4. Yeni kemik oluşumunu yavaşlatan bone-wax'ın da periosta mekanik destek sağladığı düşünülürse, mekanik desteğin tek başına anlamlı bir katkı sağlayamadığı söylenebilir.

Bone-wax mekanik etkisiyle kanamayı durduran bir biyomateryal olarak bilinmektedir. Howard ve Kell tavşanlarda tibial defekt yaratarak bone-wax'ın yeni kemik oluşumu üzerine etkilerini araştırmış ve yeni kemik oluşumunu hemen, hemen tamamen inhibe ettiğini görmüşlerdir 7. Brightmore bone-wax'ın kemik iyileşmesi için gerekli elemanlara karşı fiziksel bariyer oluşturarak iyileşmeyi geciktirdiği yolunda kanıtlar elde etmiştir 8. Ayrıca Geary ve Frantz wax partiküllerinin fiziksel bariyer etkisiyle birlikte monosit, fagosit ve makrofajların ortama gelmesine yol açan bir yabancı cisim reaksiyonuna da yol açtığını göstermişlerdir 9. Bu çalışmada da bone-wax'ın ortamdaki kaybolmayarak yeni kemik oluşumunu engellediği görülmüştür.

Bu çalışmada ayrıca heterolog kollajen ve selülozun yeni kemik oluşumunu benzer şekilde hızlandırdığı görülmüştür. Bu ortak etki herikisinin de yabancı cisim reaksiyonuna yol açarak savunma hücrelerini ortama çekmesi ve bu sayede onarımın ilk aşamalarından olan debrisin ortamdaki temizlenmesini hızlandırarak onarım hızını arttırdıkları düşünülebilir. Bone-wax da yabancı cisim reaksiyonuna yol açar ama ortamdaki kaybolmaması onarımı geciktirmektedir.

Bu gözlemleri toplarsak diyebiliriz ki;

1) Yabancı cisim reaksiyonuna yol açarak savunma hücrelerini onarımın yapılacağı

bölgeye çekici ve böylece debrisin erken uzaklaştırılmasına yol açan,

2) Daha sonra onarımı gereken dokunun yapısına katılan veya organizma tarafından fagositöz veya enzimatik işlev ile erken dönemde ortamdaki temizlenebilen biyomateryaller onarım işlemini hızlandırabilirler.

Bu çıkarıma kesinlik kazandırabilmek için daha çok sayıda biyomateryalin birbiriyle karşılaştırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak kollajen ve selülozun, kontrol ile karşılaştırıldığında, yeni kemik oluşum hızını arttırdıkları, bone-wax'ın ise gecikmeye yol açtığı görülmüştür. Tüm bu biyomateryallerin, onarım işleminin, hücresel düzeyde etkilerinin tam olarak anlaşılabilmesi için kantitatif ve ileri ultrastrüktürel çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın sonuçları göstermektedir ki, yarık maksilla ve kemik grefti donör alanları gibi, onarımın hızlı olmasını istediğimiz kemik defektlerinde, defekti heterolog kollajen veya selüloz ile doldurmak faydalı olabilecektir. Ama egzositoz eksizyonu gibi, yeni kemik oluşumunun istenmediği veya yavaş oluşmasının istendiği durumlarla karşılaşırsa, defekte bone-wax yerleştirilmesi uygun olabilecektir.

*Dr. Serhat ÖZBEK*

*Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi*

*Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı*

*Görükle 16059 BURSA*

#### KAYNAKLAR

1. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.: Basic Histology, 8. edition, Appleton-Lange, Connecticut, 1995, 132-147.
2. Thaller, S.R., Kim, J.C., Kawamoto, H.K.: Calvarial bone graft donor site: A histological study in a rabbit model. Annals of Plastic Surgery, 23:390, 1989 (Volume 5)
3. Ritsila, V., Alhopuro, S., Rintala, A.: Bone formation with free periosteum. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 6:51, 1972
4. Skoog, T.: The use of periosteum and surgical for bone restoration in congenital clefts of the maxilla. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 1:113, 1967
5. Latham, R.A.: Orthopedic advancement of the cleft maxillary segment. A preliminary report.

- Cleft Palate J., 17:227, 1980.
6. Del Guercio, R., Niglio, A., Miranda, R., Del Guercio, M., Siciliano, G.: Terapia topica delle ulcere venose con collagene eterologo. Beghe, F., Mian, M., Palmieri, B., Congresso Collogeno E Cicatrizzazione-realta e prospettive terapeutiche svotosi a Istanbul 22-25 Marzo 1990.
  7. Howard, T., Kelly, R.: The effect of bone wax on the healing of experimental rat tibial lesions. Clin. Orthop. 63: 226, 1969.
  8. Brightmore, T.: Hemostasis and healing following median sternotomy. Br. J. Surg. 62:152, 1975.
  9. Geary, J., Frantz, V.: New absorbable hemostatic bone wax: experimental and clinical studies. Am. Surg. 132: 1128, 1954.