

Dekalsifiye edilmemiş kemik, diş, metalik ve seramik implantları çevre yumuşak dokularla birlikte inceleme yöntemi

Testere-zımpara yöntemi

Dr. Gülseren Engin* Dr. Karl Donath**

ÖZET

Testere-Zımpara yöntemi ile dekalsifiye edilmemiş kemik, diş, metalik ve seramik implantlar, metalik dolgu, kron vb. çevre yumuşak dokuyla birlikte histopatolojik olarak incelenebilmektedir. Böylece daha önce inlenemeyen çeşitli hastalıklar ve implantlara karşı gelişen dokuların tepkileri gözlenebilmektedir.

Bu makalede, Hamburg Üniversitesi Tıp Fakültesi Oral Patoloji Bölümünde kurulmuş özel laboratuarda izlenen Testere-Zımpara yöntemi anlatılmıştır.

Dentin ve mine içeren odontogen tümörler, diş ve kemik materyelleri histopatolojik olarak incelenebilmek için önce dekalsifiye edilirler; ancak dekalsifikasyon uzun zaman gerektirir ve özellikle diş, odontogenik tümörler ve büyük kemik (Pelvis, femur, vb.) parçalarında iyi sonuç elde edilemeyebilir. Dekalsifikasyon işlemi sırasında yumuşak doku zedeleneyeceği için, sert dokudan sıyrılıp ayrı takibe alınır. Bu nedenle sert ve yumuşak dokunun birbiri ile ilişkisini görmek güçtür. Ayrıca metalik dolgular, kron veya köprüler dekalsifiye edilemezler. Seramik ve metalik implantlar içeren kemiklerde dekalsifikasyon yetersizdir.

Gelişen tıp dünyasında implantlar ve protezler giderek önem kazanmaktadır. Bu konuda çeşitli araştırmalar yapılmaktadır; ancak bu araştırmaların sağlıklı sonuçlara ulaşabilmesi için, kullanılan implant ve protezlerin dokuda meydana getirdiği değişikliklerin gözlenmesi gerekir. Bunların yanı sıra kimi araştırmacılar, araştırmaları gereği kemiği dekalsifiye etmeden incelemek istemektedirler.⁴ İşte bu nedenlerle çeşitli araştırmacılar kemik ve benzeri sert dokuları dekalsifiye etmeden inceleme yöntemlerini araştırmışlardır.

Testere-zımpara yöntemi ile dekalsifiye edilmemiş kemiklerin incelenmesi fikri yeni değildir. 1958'de Forst, 1964'te Eger, 1974'te Smith ve Karagianes, 1979'da Düker gibi araştırmacılar bu yönteme başvurmuşlar; ancak tatmin edici sonuçlar elde edememişlerdir.² 1977'de Gross ve Strunz, dekalsifiye edilmemiş kemik ve dişleri 50-200 µm kalınlığında kesitler halinde testere ile kesip incelediler. Bununla birlikte bu kesitlerin derin ve ince yapısı boyanamadığından incelemeler yeterli olmadı.

Ayrıca çeşitli araştırmacılar değişik yöntemleri araştırdılar. 1955'te Woodruff ve Norris⁴ insan ve fare kemiklerini Butyl ve Ethylmethacrylat'ın 1/1'lik karışımına koydular. Yaeger (1958),⁶ 12 haftalık farelerin uzun kemiklerini, aynı karışımda tutarak 4 µm'luk kesitler hazırladı. Stiglitz, (1964) insan dişlerinin, yetişkin köpek mandibulasının ve erişkin insan pelvisinin yüksek ısı ve basınç altında daha çabuk takip edildiğini bildirdi. Burkhardt (1966, 1970), myelotomi preparatlarından yarı inceltilmiş kesitler yapan bir metod geliştirdi. Kummermehr (1971), kalsiyum depolanması değişikliklerini incelemek için, işaretleme kalsiyum verilmiş sıçanlarda kemiklerin Methacrylat'a gömülerek incelenebileceğini bildirdi. Zambarnard ve arkadaşları (1969), patolojinin rutin çalışması içinde⁴ ultraviyole ışığı ile polimerizasyondan söz ettiler.

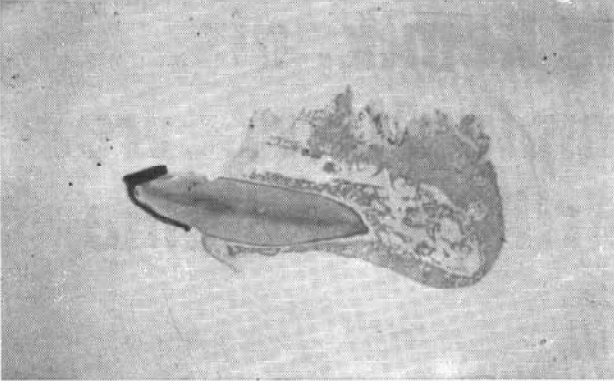
Dehidratasyon ve materyalleri sert plastiğe (Methyl Methacrylate) gömülmesi konusunda ilk Schenk'in (1965) bildirdiği yöntemi¹ 1970'de Delling ve Zieger geliştirmiştir. Bu konuda 1971'de Hindringer ve Bussing, 1972'de yine Delling^{1,2,3} ve 1980'de Schönfeldt ve Bossmann çeşitli çalışmalar yapmıştır.²

1982'de Donath ve Breuner yeni bir yöntem olarak Testere-Zımpara metodunu tariflemişlerdir.² 1985'te Donath bu yöntemi daha da geliştirerek tanıdaki önemini vurgulamıştır.³

Testere-Zımpara yönteminin en son geliştirilmiş şekli, halen Uni-Klinik Eppendorf (Hamburg)'ta Donath ve Del-

* Uni-Klinik Eppendorf - HAMBURG

** Uni-Klinik Eppendorf - HAMBURG Oral Patoloji



Resim 1: Metal kaplamalı diş, gingiva ve kemik (Toluidin boyası).

ling tarafından, oral ve kemik patolojisinde rutin olarak kullanılmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Testere Makinası; Hayvan ve insanlardan biyopsi ve otopsilerle alınan kemik; diş ve implant içeren çene kemikleri veya diğer sert dokular önce 1 cm.'den daha büyük olmamak koşuluyla kesilmektedir. Daha büyük materyellerde plastiğin emilmesi süreci uzayacak, bu da zaman kaybına neden olacaktır.

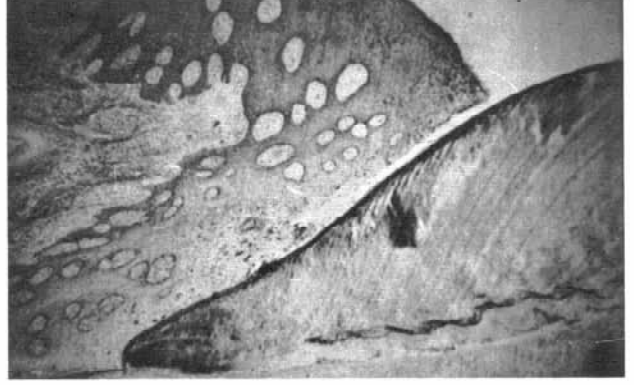
Kesme işlemi için, tahta kesmede kullanılan bant testerenin geliştirilmiş bir modeli kullanılmaktadır. Piyasada bu amaç için yapılmış pek çok testere çeşitleri mevcuttur; ancak bizim kullandığımız EXAKT marka testere hem daha ucuz hem de daha kullanışlıdır. Bu testerede, bant testere bıçağı elmas tabakasıyla kaplanmıştır. Ayrıca soğutma sistemi vardır. Bu sistemle hem elmas tabakanın zedelenmesi önlenir. Hem de kesit yüzünün temiz kalması sağlanır. Plastik bloklar, basınç veya vakumla tutulurlar ve bıçağa paralel olarak hareket ederler.

Bu testerenin diğer bir avantajı da hem tespit olmuştur materyellerin kesitinde, hem de plastik bloklardan yapılan kesitlerde mikrotom gibi kullanılabilmesidir. Ayrıca ıslak ve kuru kesitlerde de kullanılabilir.

Fiksasyon, dehidratasyon ve gömme: Bunlar, takibeden safhalarda rutin boyama, enzim histokimyası ve immünohistokimya gibi kullanılmak istenen yöntemlere bağlı olarak yapılır. Örneğin, immünohistokimya isteniyorsa sıcakta bozulacağından, fiksasyon buz dolabında yapılır.

Kesilen dokular fiksasyon için %4'lük formalin içine konur. Küçük parça ise 24 saat yeterlidir. Büyük parçalarda 3-4 gün beklemek gerekir. Fiksasyondan çıkarılan kapsüller soğuk su dolu bir kaba alınıp %70 ve %80'lik alkollerde 1/2-1 saat kadar bekletilir.

Dehidratasyondan çıkarılan materyeller Methacrylic acid hydroxyethylester ile muamele edilir. Bu sırada kullanılan alet ototeknikona benzer; ancak buzdolabındadır ve bir bilgisayar sistemi ile otomatik olarak çalışır. Bura-



Resim 2: Diş ve gingivanın görünümü (Levialaczko boyası).

da methacrylic acid hydroxyethylester'in %100'lük solüsyonu kullanılır. Bunun için 100 ml. Methyl Methacrylat (MMA); 20 ml. Nonylphenol-polyglycoether acetat; 2 ml. Dibutylphtalat; 5 gr. Benzoylperoxid karışımı hazırlanır.¹ Buna hemen katalizatör (Benzoylperoxid) eklenir. Zamansız polimerizasyondan korumak için 4°C altında bekletilir. Bu işlemler için kemik materyelinin 30-50 misli volumde MMA kullanılmalıdır. Çene kemiği materyallerinde 24 saat, büyük kemik parçalarında 3-4 gün tutmak gerekir.

Kapsüller daha sonra vakumla çalışan exikatöre alınır. Burada da MMA konmuş bir kaba konur. Bu kap ışıktan korunmak için alüminyum folye ile sarılmıştır. Ayrıca exikatörün üzerine bir kutu geçirilip, ışığın geçmesi önlenir. Çünkü MMA ışık ve ısıda polimerize olarak sertleşir. Bu zamansız polimerizasyonu engellemek gerekir. Burada 1-2 saat kalan materyaller MMA'yı emerler. Daha sonra jelatin kapsüllerle blokama yapılır. Bu blokamanın parafin bloklemesinden tek farkı numara yazılı kağıdın diklemesine yana ve dışarıdan okunacak şekilde yerleştirilmesidir. Burada parafin yerine MMA kullanılır. Ayrıca tüm işlemler sırasında eldiven kullanmayı ihmal etmemelidir.

Jelatin kapsüller Histolux denilen bir alete yerleştirilir. Bu aletin özelliği belli sürelerle sarı ve mavi ışık vererek blokları belli ısıda tutup yavaş yavaş polimerizasyonu sağlamaktır. Kimi zaman aynı işleme tabi tutulan materyellerde anlaşılamayan nedenlerle (Benzoylperoxid dağılımı, alkol kalıntısı, hava kabarcığı gibi nedenlerle) farklı polimerizasyon görülebilir.¹

Sarı ışıktaki 2, mavi ışıktaki 8 saat kalan bloklar çıktığında pürüklü ve yapışkandır. Bundan sonra zımparalama yöntemine geçilir.

Zımparalama: EXAKT ünitesinde bulunan zımparalama aletinde kumlu zımpara kağıtları kullanılır. Burada önce bloğun pürlüğü ve yapışkanlığı giderilir. Her iki yüzey birbirine paralel hale getirilirken kesit yüzeyi üzerindeki fazlalık plastik zımpara ile alınır.

Büyük bir lam alınır ve iki taraflı yapıştırıcı bantla blok, kesit yüzeyi altta kalmak üzere lama yapıştırılır. Yine bu-

yük ama pleksiglas bir lam alınır. Cyanoacrylate ile bloğun diğer yüzüne yapıştırılır. Bu yapıştırma işlemi "Vakumlu ve basınçlı yapıştırıcı alet" ile yapılır. Pleksiglas lam bloğa sıkıca yapıştıktan sonra yapıştırıcı bant açılır, lam çıkarılır ve bloğun kesit yüzü ortaya çıkar.

Mitutoyo ölçme aleti ile bloğun kalınlığı birkaç yerden birden ölçülür. Arada 3 µm'dan fazla fark varsa Exakt-Mikroschleif sistem denilen aletle bu fazlalıklar zımparalanarak giderilir. Bu arada sürekli ölçüm yapılır.

Normal boyutlarda bir lam alınır ve kalınlığı iki yandan ölçülür. Yapıştırıcı Technovit 7210 VLC ile bloğun kesit yüzüne yapıştırılır. Bu yapıştırma sırasında da Exakt Präzisions-Klebedresse aleti kullanılır.

Aletten çıkan çift camlı materyel tekrar ölçülür. Bütün bu ölçümler daha sonra yapacağımız kesidin kalınlığını saptamak için önemlidir.

Elmas kaplamalı bant testerede, lamaların, bloğun ve yapıştırıcının kalınlıkları da göz önüne alınarak yaklaşık 200-300 µm'luk kesit yapılır. Kesit, küçük lam üzerinde kalır. Bu, yeniden ölçülüp Exakt-Mikroschleif sistemde 40 µm'a kadar zımparalanır. 40 µm'a ulaşıncaya parlatma yapılır.

Parlatma da aynı aletle yapılır ama daha farklı zımpara kağıdı kullanılır ve kısa sürelidir. Bundan sonra preparatlar boyanmaya hazırır.

Boyama: Boyamadan önce %30'luk H₂O₂'den %10'luk solüsyon hazırlayıp preparatlar 5 dakika batırılıp çıkarılır. Biraz akan suda yıkandıktan sonra kurulanır. Bundan sonra rutin ya da özel herhangi bir boya kullanılabilir. Biz rutin çalışmalarda Toluidin veya Levailaczko boyasını kullanıyoruz.

Toluidin boyası için preparatların toluidinde 15 dak. bekletildikten sonra yıkanması yeterli olmaktadır.

Levailaczko boyası için önce preparatlar Levailaczko I boyasında 5 dakika bekletilir. Akar suda biraz yıkandıktan sonra kurulanır. Levailaczko II'de 10-15 sn. tutulup çıkarılır. Yıkanır ve kurulanır. Kapatmadan önce preparatlar

bir gece açıkta bekletilmelidir. Ertesi gün Eukitt ile lamellenir.

TARTIŞMA

Testere-Zımpara yönteminin yeni olmadığını ve çeşitli araştırmacılar tarafından çeşitli şekillerde denendiğini; ancak yeterli sonuç alınmadığını belirtmiştik.² Donath'ın geliştirdiği ve halen laboratuvarımızda kullanılmakta olan yöntem, histopatolojik incelemelerde başarılı sonuçlar vermektedir. Kesitlerde en ince detayları da görmek mümkün olmaktadır. Ayrıca bu yöntemle aşağıda belirtilen durumların da incelenmesi mümkün olmaktadır.

- 1- Diş gelişmesi
- 2- Dişin gelişme bozuklukları
- 3- Regresiv diş değişiklikleri
- 4- Dental karies
- 5- Periodontium hastalıkları
- 6- Çene kemiğinin metalik ve seramik implantları
- 7- Mine üreten odontojenik tümörler
- 8- Tümör invazyonu gösteren çene kemiği (özellikle mandibula)

Bu listedeki materyelleri dekalsifiye edip klasik yöntemlerle incelemek mümkün değildir; ancak Testere-Zımpara yöntemiyle incelenebilir. Ayrıca dekalsifikasyon için geçen uzun zamandan kazanılmaktadır. Bunlardan başka plak ve karielerin; plak ve periodontitislerin; kron, çerçeve ve zarflamaların,⁵ aynı zamanda tümör invazyonu içeren kemiklerinin incelenmesi mümkün olmaktadır. Özellikle implantların dokuda oluşturdukları etkiler ancak bu yöntemle gözlemlenebilmektedir.

SONUÇ

Testere-Zımpara yöntemi özel bir laboratuvar ve deneyimli personel gerektirmektedir. Bu alt yapı oluştuktan sonra rutin işler hiç de zor değildir. Yukarda sayılan yarırları göz önüne alınarak, tıptaki gelişmeleri yakından izleyen ülkemizde en kısa zamanda böyle bir laboratuvarın kurularak çalışmaya başlayacağını umuyoruz.

KAYNAKLAR

- 1 Über eine vereinfachte Metacrylateinbettung für unentkalkte Knochen-Schnitte, DELLING G. Beitr. Path. Bd. 145, 100-105 1972
- 2 A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues., DONATH K., BREUNER G. Journal of. Oral Pathology 11: 318-326 1982
- 3 The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. The Säge-Schliff (Sawing and grinding) technique, DONATH K. Path. Res. Pract. 179, 631-633 1985
- 4 Schnelleinbettung unentkalkter Knochen von Mäusen für autoradioğrafische Untersuchungen kurzleibiger wasserlöslicher isotope durch ein Kontaktverfahren mit AR 10 Strippingfilm, HINDRINGER B., BÜSING G. Histochemie 26, 333-342 1971
- 5 The mechanism of pocket formation, TAKATA K., DONATH K. J. Periodontol April V: 59, N: 4 215-221 1988