Osteoporotik sıçanlarda hyaluronik asitin dentin greftiyle kortikal kemik defektlerinde kemik iyileşmesine etkisinin değerlendirilmesi

Evaluation of the effect of hyaluronic acid on osteoporotic rat bone healing in cortical bone defects with dentin graft

Uğur Mercan^{1*}, Merve Çakır², Deniz Gökçe Meral³

¹ İstanbul Okan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, **Orcid**¹: 0000-0003-4935-673X

² İstanbul Okan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, **Orcid**²: 0000-0002-4340-0309

³ İstanbul Okan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, **Orcid**³: 0000-0003-3621-5890

Atıf/Citation: Mercan, U., Çakır, M. & Meral, D.G. (2020). Osteoporotik sıçanlarda hyaluronik asitin dentin greftiyle kortikal kemik defektlerinde kemik iyileşmesine etkisinin değerlendirilmesi. Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 41(2), 121-129.

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı, osteoporotik sıçanlarda kortikal kemik defektlerinde hyaluronik asit ve dentin greftinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

Yöntem: Çalışmada 24 adet erişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlara bilateral ovariectomi yapılmış, altı hafta sonunda osteoporotik olarak kabul edilen sıçanlar, üç gruba ayrılmıştır. Grup D, Grup D-HA ve Grup C. Her hayvanın kalvarium'unda 5 mm çapında kritik boyutta bir defekt oluşturulmuştur. Defektler D grubunda; dentin grefti ile, D-HA grubunda; dentin grefti ve hyaluronik asit ile doldurulmuş, kontrol grubunda (C grubu) ise boş bırakılmıştır. Bütün hayvanlar 28. günde sakrifiye edilmiştir. Her defekt bölgesinde yeni kemik oluşumu; hematoksilen ve eozin, BMP2, TGFβ ve osteopontin seviyelerine göre hem histolojik hem de immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Histolojik olarak grup D ve grup D-HA, grup C'den anlamlı olarak daha fazla yeni kemik oluşumu göstermiştir. İmmünohistokimyasal olarak; TGFβ ve osteopontin seviyeleri Grup D-HA'da anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. BMP2 seviyeleri D grubu ve D-HA grubu arasında anlamlı farklılık göstermemiştir.

Sonuç: Dentin grefti ve hyaluronik asitle birlikte dentin greftinin osteoporotik kemiklerde yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: dentin grefti, hyaluronik asit, osteoporoz

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of hyaluronic acid and dentin graft on bone healing of critical-sized cortical osteoporotic bone defects.

Methods: 24 adult female Wistar rats underwent bilateral ovariectomy. Six weeks later, when the animals were osteoporotic, the rats were divided into three groups: Group D (dentin grafted), Group D-HA (dentin grafted with hyaluronic acid) and Group C (control). A 5-mm diameter critical-size defect was created in the calvarium of each animal. In Group D; the defect was filled by dentin graft, in group D-HA; the defect was filled by dentin graft and hyaluronic acid, in group C; the control group was left empty. All animals were euthanized at 28th day. New bone formation at each defect site was evaluated both histologically and immunohistochemically according to hematoxylin and eosin, BMP2, TGFβ, and osteopontin levels.

Results: Histologically, group D and group D-HA exhibited significantly more new bone formation than group C. Immunohistochemically; The TGFβ and osteopontin levels were significantly higher in Group D-HA. The BMP2 levels did not differ significantly between the groups D and group D-HA.

Conclusions: Dentin graft combined with hyaluronic acid enhances bone regeneration in critical-size calvarial defects in osteoporotic rats.

Keywords: dentin graft, hyaluronic acid, osteoporosis

GİRİŞ

İnsan ömrünün uzamasıyla birlikte yaşlı bireylerde dental tedavi gereksinimleri ve beklentileri artmaktadır¹. Yaşlı bireylerde ağız sağlığının çeşitli fizyolojik, psikolojik ve sosyal nedenlerden dolayı yaşam kalitesi için önemli olduğu görülmüştür².

Osteoporoz, dünya çapında görülen yüksek mortalite ve morbidite oranına sahip yaygın bir hastalık ve başlıca sağlık problemlerinden biridir, elli yaş üstü beş erkekten ve üç kadından birini etkiler ve semptomlar veya kırık oluşana kadar teşhis edilemez³. Osteoporoz, kemik yoğunluğunun azalmasına ve kemik yapısında zayıflamaya neden olmaktadır. Yapılan birçok çalışmada osteoporozdaki bu kemik kaybının çene kemiklerini de etkilediği ve rezorpsiyona ve diş kaybına neden olduğu belirtilmiştir^{1, 4-6}. Osteoporozun metabolizmaya etkisinin incelenmesi için ovarektomize sıçanlar Dünya Sağlık Örgütü tarafından prelinik modeller olarak kabul edilmiştir⁷.

Osteoporotik bireylerdeki kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için otojen kemik greftleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır⁶. Otojen kemik greftleri, osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri nedeniyle 'altın standart' olarak kabul edilmektedirler, bununla birlikte otojen kemik greftlerinin; kısıtlı miktarda elde edilebilme, rezorbe olmaya yatkınlık, ek cerrahi işlem gerekliliği ve artmış morbidite riski gibi dezavantajları vardır ve bu durum araştırmacıları alternatif materyaller araştırmaya yönlendirmiştir⁸.

Dişler ve kemiklerin, embriyolojik olarak aynı kökenden orijinalmaları, kimyasal ve organik içeriklerinin benzer olması gibi birçok benzerliği bulunmaktadır. Dişlerin osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenesis potansiyellerine ve içerdiği büyüme faktörlerine bağlı olarak demineralize dentin otojen kemik greftlerine alternatif olarak kullanılabilir⁹.

Kemik benzeri materyallerin kemik oluşturma kapasitesinin sınırlı olması nedeniyle bazı ekstra ürünler katılarak bu materyallerin osteokondüktivitesini arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Hyaluronik asit; ekstrasellüler matriks içerisinde bulunan, kondrositler, fibroblastlar ve sinoviyositler tarafından sentezlenen, yüksek moleküler ağırlıklı bir glikozaminoglikandır. Doku oluşumu sırasında hücre migrasyonu ve farklılaşmasını teşvik eder ve yara iyileşmesinde önemli rol oynar^{10, 11}. Kollajen gibi diğer osteokondüktif moleküllerle birlikte kemik gelişimini desteklediği belirtilmektedir. Hyaluronik asitin farklı tipleri bulunmaktadır¹¹.

Bu çalışmanın amacı; osteoporotik kemik defektlerinde dentin grefti ve dentin greftinin jel formundaki hyaluronik asit ile yeni kemik oluşumu üzerine etkisini histolojik ve immunolojik olarak karşılaştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütülmüş, çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik no: 2015-02-11/02). 24 adet 6-8 haftalık dişi sıçanlar kullanılmıştır. Tüm hayvanların kafesleri, $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 'lik bir sıcaklıkta ve % 40-60'lık bir nem oranına sahip odalarda tutulmuş, 12 saatlik gündüz gece standardizasyonu bir aydınlatma sistemi kullanılarak yapılandırılmıştır. Tüm sıçanlara bilateral ovarektomi prosedürleri uygulanmış, altı hafta sonra sıçanlar osteoporoz olarak kabul edilmiş ve üç gruba ayrılmıştır; grup D (n=8, Dentin grefti kullanılan grup), grup D-HA (n=8, Dentin grefti+Hyaluronik Asit kombine uygulanan grup) ve grup C (n = 8, kontrol grubu).

Dentin greftinin hazırlanması

İnsanlardan ortodontik tedavi amacı ile çekilmiş sağlıklı 1. premolar dişler su ile yıkanmış, kök üzerindeki periodontal ligament dahil tüm yumuşak dokular uzaklaştırılmış, geriye kalan tüm yumuşak dokuların uzaklaştırılması için 2 saat izopropanol içinde bekletilmiştir. İzopropanolden sonra, dişler üzerindeki organik çözücüyü ortadan kaldırmak amacıyla distile su ile birkaç kez yıkanmış, daha sonra 100°C 'de su içinde kaynatılmıştır. Standart boyutta dentin partikülleri elde etmek amacıyla dişler, QUADRO COMIL (QUADRO, Ontario, CA) cihazı ile daha küçük parçalara ayrılmış ve 1200-1500 μm boyutlarındaki özel eleklerden geçirilmiştir.

Cerrahi prosedür

Ketamin hidroklorür (% 10 Ketaset; Richter Pharma AG, Wels, Avusturya) ve 3 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rom-puns, Bayer, Leverkusen, Almanya) kullanılarak genel anestezi sağlandıktan sonra, steril koşullar altında, sıçanların kalvaryal bölgesinde semilüner bir insizyon yapılmış, paryetal ve frontal kemikleri ortaya çıkaran tam kalınlıkta bir flep kaldırılmıştır. Steril serum fizyolojik irrigasyonu altında bir trefine frezler ile 5 mm çapında kritik boyutlu bir kalvaryal defekt oluşturulmuştur. Defektler oluşturulduktan sonra, sıçanlar her birinde sekiz

tane olmak üzere üç gruba ayrılmıştır: grup D (Dentin): defektlere partiküler dentin grefti uygulanmıştır, grup D-HA (Dentin+Hyaluronik Asit): defektlere partiküler dentin grefti ile birlikte hyaluronik asit uygulanmıştır, grup C (kontrol): defektlere kontrol amaçlı olarak boş bırakılmıştır. Cerrahi işlemlerden sonra tüm flepler rezorbe olabilen 4/0 poliglaktin 910 sütürlerle (Vicryl; Ethicon, Somerville, NJ, ABD) primer olarak dikilmiş, postoperatif enfeksiyon kontrolü için 10 mg/kg sefazolin sodyum (Sefazol; M Nevzat, İstanbul, Türkiye) hayvanlara enjekte edilmiş ve analjezik olarak metamizol sodyum (Novalgin, Aventis, Türkiye) ameliyattan sonra 5 gün boyunca verilmiştir. Ameliyattan 28 gün sonra, hayvanlar yüksek doz anestezi enjeksiyonu ile sakrifiye edilmiştir. Kafatası derisinin diseke edilmesinin ardından, kalvarium çıkarılmış ve hemen % 10'luk formaldehit çözeltisine daldırılmıştır. Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler yapılmıştır.

Histopatolojik analizler

Tüm sıçanlardan alınan kalvariumlar kesilmiş ve 2 gün boyunca % 10 nötral tamponlu formalin içinde hemen tespit edilmiş ve 3 hafta boyunca bir formik asit-sodyum sitrat çözeltisinde dekalsifiye edilmiştir. Dokular, dereceli ksilenlerle temizlenmiş ve parafine gömülmüştür. Kemiklerin koronal kesitleri 5 µm'de kesilmiştir. Kesitler hematoksilin-eozin (HE) ile boyanmıştır.

Her bölüm için kemik oluşumu düzeyi Tatlı ve arkadaşlarının¹² çalışmalarında kullandığı yöntemle göre skorlanmıştır:

- 1: Fibröz doku
- 2: Genel olarak fibröz ve az miktarda kıkırdak doku
- 3: Eşit miktarda fibröz ve kıkırdak doku
- 4: Tamamen kıkırdak doku
- 5: Genel olarak kıkırdak doku ve az miktarda olgunlaşmamış kemik dokusu
- 6: Eşit miktarda kıkırdak ve olgunlaşmamış kemik dokusu
- 7: Genel olarak olgunlaşmamış kemik dokusu ve az miktarda kıkırdak dokusu
- 8: Tamamen olgunlaşmamış kemik dokusu
- 9: Genel olarak olgunlaşmamış kemik dokusu ile birlikte az miktarda olgunlaşmış kemik dokusu
- 10: Olgunlaşmış (Lameller) Kemik

İmmünohistokimyasal analizler

Beş mikrometre boyutundaki kesitler, kemik morfogenetik proteini (BMP) -2, TGFβ (Transforming growth factor beta) büyüme faktörü ve osteopontin antikorlarının saptanması için streptavidin-biyotin peroksidaz kompleks (SABC) tekniği kullanılarak immünohistokimyasal (IHC) boyamaya tabi tutulmuştur. Kesitler ksilen içinde parafinize edilmiş ve derecelendirilmiş alkollerden geçirilerek hidrate edilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesi, 15 dakika boyunca metanol içinde % 3 H₂O₂ ile bloke edilmiştir. Kesitler fosfat tamponlu salin (phosphate-buffered saline) (PBS, pH 7.2) ile durulanmış ve daha sonra 37 °C' de 15 dakika süreyle proteinaz K içinde inkübe edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra, kesitler oda sıcaklığında 10 dakika süreyle % 10'luk immün olmayan sıçan serumu (Thermo Scientific, Fremont, CA) içinde önceden inkübe edilmiştir. Ayrıca, doku bölümleri, birincil antikorlar; BMP2 (NBP1-19751, Novus Biologicals), TGF1 (sc-146, Santa Cruz Biotechnology), anti-osteopontin (ab8448, Abcam) ile 1 saat inkübe edilmiş ve daha sonra oda sıcaklığında PBS ile durulanmıştır. Kesitler daha sonra 20 dakika süreyle biyotininle edilmiş keçi anti-polivalent antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent) (Thermo Scientific, Fremont, CA) ile inkübe edilmiş ve sonrasında PBS içinde durulanmıştır. Streptavidin-peroksidaz, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca uygulanmıştır. Etiketleme, kromojen olarak 3-amino-9-etilkarbazol (Thermo Scientific, Fremont, CA) ile görselleştirilmiştir. Negatif kontroller, birincil antikorların çıkarılması ve normal keçi serumu ile değiştirilmesiyle yapılmıştır. İmmünohistokimyasal sonuçlar ışık mikroskobu (Nikon Eclipse E600) kullanılarak yorumlanmıştır. Lekelenmiş bölümlerin yarı niceliksel değerlendirmesi sadece ilgili alanda gerçekleştirilmiştir. İmmün boyama sonuçları, boya yoğunluğu (0, negatif; 1, zayıf; 2, orta; 3, güçlü boyanma) için yarı-niceliksel olarak ve toplam alan üzerinde pozitif boyanan alanın oranıyla (0; negatif, 1; <% 25, 2; % 26-75, 3; >% 76 olarak değerlendirilmiştir). Tüm ölçümler aynı patolog tarafından yapılmıştır.

İstatistiksel incelemeler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (frekans) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Çalışmanın genel anlamlılık

düzeyi $p<0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir. Post hoc değerlendirmelerde ise anlamlılık düzeyi $p<0.017$ olarak alınmıştır.

BULGULAR

Tablo 1’de grupların immüno-histokimyasal açıdan boyanma verilerinin dağılımı görülmektedir.

Gruplar arasında Hematoksilen eozin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U Testi uygulanmış ve anlamlılık düzeyi $p<0.017$ olarak alınmıştır. Dentin-HA

grubunun HE düzeyi ($7,38\pm1,41$) Dentin ($4,63\pm0,92$) ve Kontrol ($2\pm0,76$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$) (Resim 1). Dentin grubunun HE düzeyi, Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$) (Tablo 3).

Gruplar arasında BMP2 boyanma alanı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.021$; $p<0.05$) (Tablo 2) (Resim 2). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, Dentin-HA grubunun BMP2 boyanma alanı, Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.017$) (Tablo 3).

Tablo 1: İmmüno-histokimyasal boyanma verilerinin dağılımları

			Dentin-HA	Dentin	Kontrol
			n (%)	n (%)	n (%)
BMP2	Boyanan alan	Negatif	0 (%0)	0 (%0)	2 (%25)
		<%25	2 (%25)	4 (%50)	5 (%62,5)
		%26-75	5 (%62,5)	4 (%50)	1 (%12,5)
		>%76	1 (%12,5)	0 (%0)	0 (%0)
	Boyama yoğunluğu	Negatif	0 (%0)	0 (%0)	2 (%25)
		Zayıf	2 (%25)	4 (%50)	5 (%62,5)
		Orta	6 (%75)	4 (%50)	1 (%12,5)
		Güçlü	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
TGFβ	Boyanan alan	Negatif	0 (%0)	0 (%0)	6 (%75)
		<%25	0 (%0)	4 (%50)	2 (%25)
		%26-75	4 (%50)	4 (%50)	0 (%0)
		>%76	4 (%50)	0 (%0)	0 (%0)
	Boyama yoğunluğu	Negatif	0 (%0)	0 (%0)	6 (%75)
		Zayıf	0 (%0)	4 (%50)	2 (%25)
		Orta	8 (%100)	4 (%50)	0 (%0)
		Güçlü	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Osteopontin	Boyanan alan	Negatif	0 (%0)	0 (%0)	3 (%37,5)
		<%25	0 (%0)	1 (%12,5)	3 (%37,5)
		%26-75	1 (%12,5)	7 (%87,5)	2 (%25)
		>%76	7 (%87,5)	0 (%0)	0 (%0)
	Boyama yoğunluğu	Negatif	0 (%0)	0 (%0)	3 (%37,5)
		Zayıf	0 (%0)	4 (%50)	5 (%62,5)
		Orta	4 (%50)	4 (%50)	0 (%0)
		Güçlü	4 (%50)	0 (%0)	0 (%0)

Resim 1: Hematoksilen ve eozin boyası ile defekli kemik iyileşmesini gösteren histolojik bölümlerdir.

1A: Dentin grubunun histopatolojik değerlendirmesidir.

1B: Dentin-HA grubunun histopatolojik değerlendirmesidir.

•; dentin grefti, yeni kemik formasyonu, alveolar boşluk.

Gruplar arasında BMP2 boyanma yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.024$; $p<0.05$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, Dentin-

HA grubunun BMP2 boyanma yoğunluğu, Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.017$) (Tablo 3).

Resim 2: BMP2'nin immünohistokimyasal boyamada gösterildiği kesitler.

2A: Dentin grubunun immünohistokimyasal boyama ile değerlendirmesidir.

2B: Dentin-HA grubunun immünohistokimyasal boyama ile değerlendirmesidir.

•; dentin grefti, yeni kemik formasyonu, alveolar boşluk.

Gruplar arasında TGF β ile boyanan alan açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 2) (Resim 3). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, Dentin-HA grubunun boyanma alanı, Dentin ve Kontrol gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$). Dentin grubunun boyanma alanı, Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$) (Tablo 3).

Gruplar arasında TGF β boyanma yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, Kontrol grubunun TGF β boyanma yoğunluğu, Dentin-HA ve Dentin gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.017$). Dentin-HA ve Dentin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.017$) (Tablo 3).

Resim 3: TGFβ'nin immünohistokimyasal boyamada gösterildiği kesitler.
3A: Dentin grubunun immünohistokimyasal boyama ile değerlendirmesidir.
3B: Dentin-HA grubunun immünohistokimyasal boyama ile değerlendirmesidir.
●; dentin grefti, yeni kemik formasyonu, ; alveolar boşluk.

Gruplar arasında osteopontin boyanma alanı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 2) (Resim 4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, Dentin-HA grubunun osteopontin boyanma alanı, Dentin ve Kontrol gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$). Dentin grubunun osteopontin boyanma alanı, Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$) (Tablo 3).

Gruplar arasında osteopontin boyanma yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, Dentin-HA grubunun osteopontin boyanma yoğunluğu, Dentin ve Kontrol gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$). Dentin grubunun osteopontin boyanma yoğunluğu, Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.017$) (Tablo 3).

Resim 4: Osteopontin'in immünohistokimyasal boyamada gösterildiği kesitler.
4A: Dentin grubunun immünohistokimyasal boyama ile değerlendirmesidir.
4B: Dentin-HA grubunun immünohistokimyasal boyama ile değerlendirmesidir.
●; dentin grefti, alveolar boşluk.

Tablo 2: Gruplar arası patolojik ve immüno-histokimyasal boyanma verilerinin değerlendirilmesi

		Dentin-HA	Dentin	Kontrol	p
		Ort±SS (med-yan) (min-max)	Ort±SS (med-yan) (min-max)	Ort±SS (med-yan) (min-max)	
HE		7,38±1,41 (7) (6-9)	4,63±0,92 (5) (3-6)	2±0,76 (2) (1-3)	0,000*
BMP2	Boyanan alan	1,88±0,64 (2) (1-3)	1,5±0,53 (1,5) (1-2)	0,88±0,64 (1) (0-2)	0,021*
	Boyanma yoğunluğu	1,75±0,46 (2) (1-2)	1,5±0,53 (1,5) (1-2)	0,88±0,64 (1) (0-2)	0,024*
TGFβ	Boyanan alan	2,5±0,53 (2,5) (2-3)	1,5±0,53 (1,5) (1-2)	0,25±0,46 (0) (0-1)	0,000*
	Boyanma yoğunluğu	2±0 (2) (2-2)	1,5±0,53 (1,5) (1-2)	0,25±0,46 (0) (0-1)	0,000*
Osteo-pontin	Boyanan alan	2,88±0,35 (3) (2-3)	1,88±0,35 (2) (1-2)	0,88±0,83 (1) (0-2)	0,000*
	Boyanma yoğunluğu	2,5±0,53 (2,5) (2-3)	1,5±0,53 (1,5) (1-2)	0,63±0,52 (1) (0-1)	0,000*

Kruskal Wallis Test

* $p < 0.05$ **Tablo 3:** Post hoc değerlendirmeler

		Dentin-HA/ Dentin	Dentin-HA/ Kontrol	Dentin/Kontrol
		p	p	p
HE		0,001*	0,001*	0,001*
BMP2	Boyanan alan	0,232	0,011*	0,059
	Boyanma yoğunluğu	0,317	0,011*	0,059
TGFβ	Boyanan alan	0,006*	0,000*	0,002*
	Boyanma yoğunluğu	0,025	0,000*	0,002*
Osteopon-tin	Boyanan alan	0,001*	0,001*	0,012*
	Boyanma yoğunluğu	0,006*	0,001*	0,010*

Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U Test

* $p < 0.017$

TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı; osteoporotik kemik defektlerinde dentin grefti ve dentin grefti ile birlikte hyaluronik asitin yeni kemik oluşumuna etkisinin karşılaştırmalı olarak incelenmesidir. Osteoporoz, kemik rejenerasyon kapasitesinde bozukluğa neden olan, kemik yıkımını arttıran, ileri yaştaki bireylerde yaygın görülen bir sağlık problemidir^{3, 13}. Osteoporozun alveolar kemik kaybı ve diş kaybı ile ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur^{1, 4, 5}. Osteoporozun kemiklere etkisini inceleyebilmek için birçok klinik çalışma yapılmıştır; ancak bu çalışmalar osteoporozun etkileriyle ilgili tam bir açıklama sağlayamamakta

birlikte sorunun altında yatan potansiyel mekanizmaları açıklamak için de yetersiz kalmışlardır³⁻⁵. Bu durum osteoporozun mekanizmasını, etkilerini incelemek için araştırmacıları hayvan çalışmalarına yönlendirmiştir. Dünya Sağlık Örgütü 1995 yılında yayınladığı sonuç bildirgesinde osteoporozun etkilerinin incelenilebileceğini belirtmiştir⁷. Bu çalışmada da bu bildirgeye uygun olarak ovarektomize sıçan modelleri kullanılmıştır.

Ovarektomi sonrası sıçanların postmenapozal osteoporoz benzeri bulgular gösterebilmesi için geçmesi gereken süre ile ilgili olarak çalışmalarda^{3, 6, 13, 14} değişiklik görülmektedir, bu çalışmada Boyd¹⁵ ve Pereira¹⁶'nın

çalışmaları esas alınarak ovarektomi sonrası 6 hafta beklenmiştir.

Osteoporoz nedeniyle oluşan alveolar kemik defektlerini rekonstrükte edebilmek için çeşitli greft materyalleri kullanılmaktadır^{6, 17}. Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için sıklıkla otojen kemik greftleri kullanılmaktadır⁶. Otojen kemik greftlerinin dezavantajlarını⁸ elimine edebilmek amacıyla bu çalışmada otojen kemik greftleriyle benzer özelliklerde bulunan demineralize dentin greftleri⁹ kullanılmıştır. Kemik benzeri materyallerin kemik yapım kapasitesinin kısıtlı olması nedeniyle bu özelliği arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada, greft materyalinin kemik yapım kapasitesini arttırmak için yara iyileşmesi ve kemik yapımında pozitif etkileri olduğu bilinen hyaluronik asit^{10, 11} kullanılmıştır. Hyaluronik asitin çeşitli formları olmakla birlikte; kullanılan greft materyalini bir arada tutulmasına yardımcı olması ve diğer formlarına göre daha stabil olduğu için¹¹ bu çalışmada jel formu kullanılmıştır.

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için kullanılan greft materyallerinin etkinliğini görebilmek için oluşturulan defekt boyutu defektin fizyolojik olarak iyileşemeyeceği boyutlarda olmalıdır¹⁸. Bu nedenle bu çalışmada geçmişteki çalışmalar^{10, 19} baz alınarak sıçan kalvaryumlarında 5 mm çapında defektler oluşturulmuştur.

Sıçanların sakrifikasyonları için beklenen süre ile ilgili çalışmalarda²⁰ değişiklik görülmektedir. Bu çalışmada deneklerin sakrifikasyonları Luize ve arkadaşlarının¹⁴ çalışması referans alınarak, histolojik olarak erken dönem kemik iyileşmesini ortaya koymak amacıyla 28. günde yapılmıştır.

24 sıçanla yapılan bu çalışmada sıçanlar 3 gruba bölünerek 8 sıçanda defekt boş bırakılarak kontrol grubu olarak değerlendirilirken, kalan defektlerden 8'i dentin grefti diğer 8'i de dentin grefti ve hyaluronik asitle rekonstrükte edilmiştir. Literatürde defektlerin sadece hyaluronik asit ile rekonstrükte edildiği çalışmalarda

hyaluronik asitin tek başına kemik formasyonunu arttıramadığı görülmüş^{10, 21, 22} bu nedenle bu çalışmada sadece hyaluronik asitin kullanıldığı grup çalışmaya dahil edilmemiştir.

Dentin greftinin kemik rejenerasyonuna etkisinin incelendiği çalışmalarda²³⁻²⁵; dentin greftinin tek başına²⁴ ya da başka greft materyalleriyle^{23,25} birlikte kullanımında yeni kemik oluşumuna pozitif etkisi olduğu ve kontrol gruplarına nazaran daha fazla kemik oluşumu görüldüğü bildirilmiştir. Osteoporotik sıçanlarda dentin grefti ve Paris alçısının kemik oluşumuna etkisinin incelendiği bir çalışmada⁶ greftle rekonstrükte edilen defektlerde kemik oluşumunun daha fazla olduğu görülmüştür. Bu çalışmada da geçmiş çalışmalarla uyumlu olarak dentin grefti ile rekonstrükte edilen grupta kemik oluşumunun daha fazla olduğu görülmüştür.

Hyaluronik asitin kemik iyileşmesi üzerine pozitif etkisi göz önünde bulundurulduğunda dentin grefti ile kombine edilen hyaluronik asit grubunun, kontrol grubu ve karşılaştırılan diğer gruplara göre pozitif etkili olduğu literatür ile uyumlu olarak ortaya konulmuştur^{10, 11, 21, 22}.

Yapılan literatür araştırmasına göre hyaluronik asit ve dentin greftinin osteoporotik kemiklerde kemik oluşumuna etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır, bu nedenle bu çalışmanın sonuçları birebir karşılaştırılamamıştır.

SONUÇ

Bu çalışmanın sonucunda; dentin greftinin alternatif bir greft materyali olarak kullanılabileceği ve dentin grefti ve dentin grefti-jel formundaki hyaluronik asit kombinasyonunun osteoporotik kemiklerde kemik rejenerasyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmada hyaluronik asitin dentin grefti ile birlikte uygulanmasının kemik üzerindeki pozitif etkilerinin histolojik verilerle desteklenmesine rağmen araştırmanın hayvan çalışması düzeyinde olmasından dolayı elde edilen verilerin klinik çalışmalarda desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H, Ejiri S. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95(4):495-502.
2. McGrath C, Bedi R. The importance of oral health to older people's quality of life. *Gerodontology* 1999;16(1):59-63.
3. Durao SF, Gomes PS, Silva-Marques JM, et al. Bone regeneration in osteoporotic conditions: healing of subcritical-size calvarial defects in the ovariectomized rat. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012;27(6):1400-8.
4. Birkenfeld L, Yemini M, Kase NG, Birkenfeld A. Menopause-related oral alveolar bone resorption: a review of relatively unexplored consequences of estrogen deficiency. *Menopause* 1999;6(2):129-33.
5. Hildebolt CF. Osteoporosis and oral bone loss. *Dentomaxillofac Radiol* 1997;26(1):3-15.
6. Kim SY, Kim SG, Lim SC, Bae CS. Effects on bone formation in ovariectomized rats after implantation of tooth ash and plaster of Paris mixture. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(7):852-7.
7. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995;17(4 Suppl):125S-33S.
8. Cakir M, Karaca IR, Firat A, Kaymaz F, Bozkaya S. Experimental evaluation of the effects of Ankaferd Blood Stopper and collagenated heterologous bone graft on bone healing in sinus floor augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015;30(2):279-85.
9. Kim YK, Lee J, Um IW, et al. Tooth-derived bone graft material. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2013;39(3):103-11.
10. de Brito Bezerra B, Mendes Brazao MA, de Campos ML, et al. Association of hyaluronic acid with a collagen scaffold may improve bone healing in critical-size bone defects. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(8):938-42.
11. Patterson J, Siew R, Herring SW, et al. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials* 2010;31(26):6772-81.
12. Tatli U, Ustun Y, Kurkcu M, et al. Effects of zoledronic acid on healing of mandibular fractures: an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69(6):1726-35.
13. Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *Biomed Res Int* 2015;2015:635023.
14. Luize DS, Bosco AF, Bonfante S, de Almeida JM. Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23(2):207-14.
15. Boyd SK, Davison P, Muller R, Gasser JA. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. *Bone* 2006;39(4):854-62.
16. Pereira MC, Zecchin KG, Campagnoli EB, Jorge J. Ovariectomy delays alveolar wound healing after molar extractions in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(11):2248-53.
17. Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, et al. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed Pharmacother* 2004;58(9):487-93.
18. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986(205):299-308.
19. Yun JI, Wikesjö UM, Borke JL, et al. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a beta-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *J Clin Periodontol* 2010;37(5):419-26.
20. Jardini MA, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100(6):666-73.
21. Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl* 2006;20(3):209-20.
22. Brazão MAM BB, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW. Hyaluronan does not improve bone healing in critical size calvarial defects in rats - a radiographic evaluation. *Brazilian Journal of Oral Sciences* 2010;9:124-27.
23. Kim WB, Kim SG, Lim SC, Kim YK, Park SN. Effect of Tisseel on bone healing with particulate dentin and plaster of Paris mixture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109(2):e34-40.
24. Moharamzadeh K, Freeman C, Blackwood K. Processed bovine dentine as a bone substitute. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;46(2):110-3.
25. Engler-Pinto A, Siessere S, Calefi A, et al. Effects of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. *Clin Oral Implants Res* 2019 (basım aşamasında).