

KEMİĞİN ORGANİK MATRİKSİNİN BİYOSENTEZİ**Burhan USLU *****Kaya ALPAR ******Nihat BOZCUK *******Naci BOR ********Nejat TOKGÖZOĞLU****Ö Z E T**

Osteoblastların sekresyon fonksiyonu trityumlu glisin kullanarak otoradyografik olarak incelenmiştir. Kollagen sentezinin kemik ana hücrelerinin proliferasyonu ile başladığı ve osteoblastların lakuna içine girmesinden sonra da devam ettiği saptanmıştır. Öte yandan kollagen sentezinin periodik olarak oluştuğu da izlenmiştir.

Mineralize kemik dokusunun hücre dışı komponentleri kalsiyum fosfat inorganik kristalleri ve organik matriksin kollage lifleri tarafından meydana getirilir. Kemik dokunun ağırlığının % 70 ini mineral faz ve % 30 unu organik matriks meydana getirir. Organik matriksin esas elemanı kollagendir ve matriksin % 90 ını meydana getirir. Diğer komponentleri ise iki tip karbonhidrattır. Bunlarda glikoprotein ve glikozaminoglikandır (1,4,6,8,10).

Kırık iyileşmesinde de en önemli iki olay 1) Hücre proliferasyonu ve 2) Kollagen sentezidir. Kollagen sentezini incelemek için trityumla işaretli amino asitler kullanılmıştır.

Bu çalışmada trityumlu glisin ile proliferen olan hücreler işaretlenerek kırık iyileşmesi sürecinde osteoblastların kollagen sekresyonunu incelemek amaç edinilmiştir.

MATERYEL

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Bilim Dalı ile Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Deneylerde Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Laboratuvarın-

* Eskişehir Tıp Fakültesi Ortopedi Uzmanı

** H.

*** H. Ü. Biyoloji Doçenti

**** H. Ü. Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi Profesörü

da üretilen % 99 homojen Swiss Albino türü 30 sıçan kullanıldı. Sıçanların hepsi dişi, yaşları 2-3 ay ve ağırlıkları 170-200 gr arasında idi. Deney hayvanlarının sağ arka bacağına tibia ve fibulası digital kompresyon yöntemi ile kırıldı. Bunu takiben Radiochemical Center-Amersham İngiltere'den getirttiğimiz (2-3 H) Glisini steril fizyolojik serum ile 1:4 oranında sulandırıp, hayvanların ağırlıklarının beher gramı için 0.5 mikrocurie radyoaktif madde periton içine steril şartlarda zerk edildi. Deney hayvanları 100 mgr Nembutal zerki ile öldürülüp, sağ arka bacadan biyopsi alındı. Biyopsi materyali nötral tamponlu formalin solüsyonunda 24 saat tesbit edildi. Tesbit işlemini takiben biyopsi materyali 24 saat normal ısıda akan musluk suyu ile yıkandı ve % 10 formik asit solüsyonu içine konulup yedi gün dekalsifikasyon için beklendi. Beş mikron kalınlığında kesilen bloklar subbing solüsyonuna batırılmış lam üzerine monte edildi. Preparatlar A.R. 10 stripping otoradyografi filmine sarıldı ve 30 gün süre ile buzdolabında 4°C da soyma filmini ışınlamağa bırakıldı. Bu süre sonunda preparatlar Kodak D-19 yüksek kontrast negatif developman ile developpe edildi ve sonra Metafix solusyonunda tesbit edildi. Preparatlar 1/3 oranında dilüe Ehrlich hematoksileni ve % 25 Eosin ile boyanıp ışık mikroskopisi ile incelendi. Kırık yapılmayan tibiada kontrol olarak kullanıldı.

BULGULAR :

Otoradyografik preparatların incelenmesi sonucu aşağıdaki bulgular tesbit edildi:

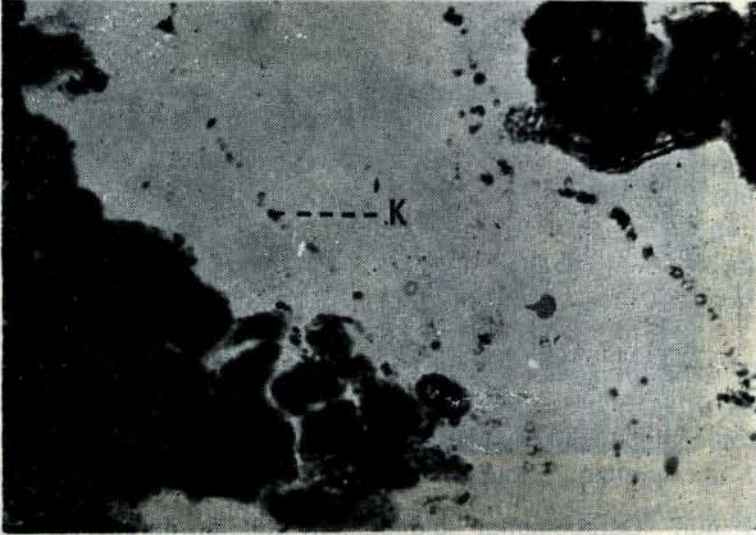
1. gün : Periostta hücrelerde aşırı proliferasyon olmamasına karşı özellikle kırtekte yakın hücrelerde aşırı kollagen yapımı göze çarpıyordu. İşaretli glisin, hücre içi ve dışında bol miktarda tesbit edildi. Hücreler uzun, ince, iğ şeklinde olan hücrelerdi (Resim: 1). Spongios kemik ve kırmızı kemik iliği hücreleri çevrelerinde de aşırı kollajen salınması görüldü. Kırmızı kemik iliği morfolojik olarak çok karışık olduğundan kollajen sentezi yapan hücre veya hücrelerin hangi olduğu kesinlikle saptanamıyordu (Resim: 2).

2. gün : Periostta proliferasyonun arttığı ve ince, uzun kemik ana hücrelerinin osteoblasta farklılaştıkları ve bol miktarda kollajen salgıladıkları tesbit edildi. Kırık kemik uçları arasında işaretli glisin ihtiva eden bol miktarda kollajen mevcut idi (Resim: 3).

3. gün : Periostta proliferasyonun arttığı, buna karşın kollajen sentezinin azaldığı görüldü.



Resim : 1



Resim : 2

4. gün : Periostta proliferasyonun aşırı arttığı ve hücrelerin büyük bir ç

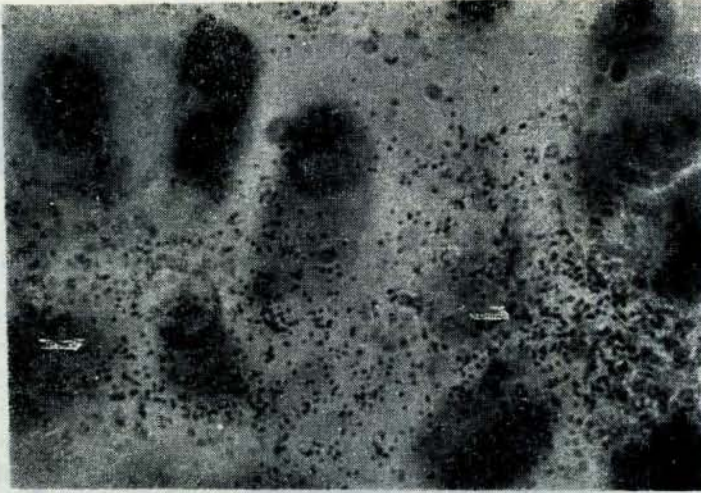
ne ileri derecede işaretli kollajen salgıladıkları tesbit edildi (Resim: 4).

5. gün : Kollajen sentezinin azaldığı, kortekse yakın osteoblastların çevresinde halkalar teşkil ettiği izlendi.

6. gün : Kollajen sentezinde yine artma vardı. İç kallus tamamen osteoid niteliğini kazanmıştı.



Resim : 3



Resim : 4

7. gün : Osteoblastlar salgıladıkları kollajen ile çevrelerine lakuna yapmışlardı. Kollajen sentezi azalmıştı. Kallusun en dış tabakasını ise kıkırdak hücreleri teşkil ediyordu.

8. gün : Korteks kenarında yeni trabeküller gelişmişti. Osteoblastların demetler şeklinde kollajen salgıladıkları görüldü.

9-10. gün : Kallusta kollajen sentezi ileri derecede azalmıştı. Kallus hücrelerinin çoğunluğunu osteoblastlar teşkil ediyordu.

TARTIŞMA :

Kırık iyileşmesinde kollajen salgılayan hücrelerin osteoblast kondroblast, fibroblast ve kan hücreleri olduğu ileri sürülmüştür.

(3,5,9). Ancak kırık iyileşmesi sırasında, bu hücrelerin hangisinin kollajen salgıladığı kesinlikle anlaşılmamıştır.

Kırık iyileşmesinde hücrenel ve biyokimyasal olaylar yanyana olmaktadır. Periostta, spongioz kemikte ve büyük bir olasılıkla kırmızı kemik iliğinde bulunan kemik ana hücreleri prolifer olup, önce osteoblasta sonuçta osteosite farklılaşır. Bu farklılaşma olayı devam ederken kollajen ve mukopolisakkarit salgılanır. Organik matrisin kalsifiye olması ile de kırık iyileşmesi tamamlanır (5,6).

Kırık hadisesinin başlangıç safhasında, mukopolisakkarit sekresyonu fazladır. Geç fazda ise kollajen sekresyonu fazla olur (10). Mukopolisakkaritlerin, kollajen teşekkülündeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır, fakat kollajen teşkil arttıkça mukopolisakkarit miktarı azalır. İyileşen kemiğin gerginliğe dayanıklılığı kollajen miktarı ile ilgilidir. Kollajen sentezi kesinlikle osteoblastlar tarafından yapılmaktadır. Bu durum çalışmalarımızla kanıtlanmıştır.

Osteoblastlar lakuna içine girdikleri zaman, başlangıçta kollajen salgılamaktadır. Salgılama faaliyeti bir süre sonra durmaktadır. Bu sırada, osteoblastların, osteosite farklılaşmasını morfolojik görünüm yerine, hücrenin görevine göre sınırlamanın daha yararlı olacağı görüşündeyiz.

Periosteumda bulunan fibroblastlarda tesbit edilmedi. Esasında, fibroblastlarında kollajen sentezindeki rolü üzerinde çeşitli yazarlar, kemik dışı dokuların iyileşmesinde fikir birliğinde olduğu bilinmektedir (2,6,9). Bu kadar az hücre işaretlenmesi ve kollajen salınımı, periostun fibroz tabakasında meydana gelen hafif bir yaralanmanın tamirine kafi gelecektir.

Kemik korteksinde, ilk günlerde periostun aksine, yüzeysel kısımda osteoblastlarda otoradyografik tanecik tesbit edildi. Orta kısımda osteositlerde işaretlenme yoktu. Korteksde yer yer ölü osteositlere rastlandı. Korteksde aşırı bir proliferasyona rastlanmadı. 4 cü günden sonra, bu artmağa başladı, hücrelerin osteoblastlara farklılaştığı müşahade edildi. Trabeküler yapının meydana geldiği ve trityumlu glycine ile işaretli kollajen dokunun osteoblastlar tarafında halka teşkil ettiği, osteoblastların lakuna içine gömüldükleri dikkati çekiyordu.

Hücrelerin korteksde çok az olmasına karşın, spongiozda çok miktarda hücre tesbit edildi. Spongiozda kemik ana hücresi, osteoblasta dönüşür. Sonra yeterli salgılama yapılır ve meydana gelen lamellar kenarında osteosite farklılaşır.

Spongioz kemiğin, kemik hücrelerinden bu derecede zengin olması, otojen kemik greflerinin en iyi gref olduğunu kanıtlamaktadır.

Kollajen teşekkülüne ait bir klasik teori, kollajen fibriller halinde hücre içinde meydana gelir, sonra hücre dışına salınırlar şeklindedir (7). Bulunan sonuçlar işaretli materyelin hücre içinde olduğunu göstermektedir.

Kırık uçlarında hareketlilik kaybolduğunda, hücrelerin büyük çoğunluğunun lameller kemik çevresinde dizili osteoblastlar olduğu görüldü. Osteosite farklılaşması tamamlanmamış osteoblastların çok fazla olması, kırık uçlarının birbiriyle birleşmesinde organik kemik matriksinin önemli rolü olduğunu göstermektedir. Vücudun derin tabakalarının tamiri, doku ne olursa olsun daima kollajen ile olur (2,9). Bu bakımdan osteoblastların kollajen salgılamaları artırılabilirse, kırık uçlarının kaynama hızı muhtemelen hızlandırılabilir.

SONUÇLAR :

1. Trityumlu gilislin ile işaretlenen hücrelerin takibi sonucu, kırık iyileşmesinde, kollajen salgılanmasının osteoblastlarca meydana geldiği saptanmıştır.

Osteoblastların yanı sıra, kondroblastların da az da olsa kollajen salgılanmasına katkıda buldukları tespit edilmiştir.

Bu hücrelerin, kırık iyileşmesinden kollajen salgılamaları literatürde iddia edildiği gibi saptanmıştır. Deneylerimiz sırasında osteoklastlarda ve fibroblastlarda herhangi bir işaretlenme tesbit edilmemiştir.

2. Fibroblastların, endomisyum hücrelerinin kırık iyileşmesinde literatürde iddia edildiğinin aksine, kırık iyileşmesine fazla katkısı olmadığı anlaşılmıştır.

3. Kollajen salgılanması en bol olarak, peirostun kamyum tabakasında kemik iliği ve spongioz kemikte olmaktadır. Korteksde ise çok az miktarda kollajen salgılanması olmaktadır.

4. Osteoblastlar kollajen salgılamaya, kemik ana hücresi durumunda iken başlamakta ve bu fonksiyonları osteosite farklılaştıktan az bir süre sonra sona ermektedir.

5. Kırık uçlarının birbiriyle birleşmesinde kollajen salgılanmasının önemli bir rolü olduğu saptanmıştır.

6. Kırık iyileşmesi tamamlandıkça, hücrelerin kollajen salgılama görevlerinin azaldığı tesbit edilmiştir.

SUMMARY

The collagen secretion of the osteoblasts is investigated by radioautography. Throughout the fracture healing the major source of collagen secretion was found to be the osteoblasts which were located in periosteal and spongiosa zone.

LİTERATÜR

- 1 — ALTNER, P.C. : The Callus-problem (Gerhard Küntscher'den çeviri). St. Louis, Warren H. Green Inc., 1974
- 2 — AREY, L.B. : Human Histology, Fourth Edition, 96-97, Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1974 4
- 3 — BASSET, L.A., STINCHFIELD, F.E. : Contributions of Endosteum, Corteks and soft Tissue to Osteogenesis. Surgery, Gynaecology and Obstetrics, 1961.
- 4 — BASSET, L.A. : Current Concepts of Bone Formation. The Journal of Bone and Joint Surgery, 44-A : 1217-1240, 1962.
- 5 — BECKER, R.D. : Augmentation of Regenerative Healing in Man. Clinical Orthopaedics and Related Research, 83: 255-260, 1972.
- 6 — CARNERIO, J., and LEBLOND, C.P. : Role of -Osteoblast and Odontoblasts in secreting the Collagen of Bone and Dentin. As Shown by Radioautography in mice given Tritium-Labelled Glycine. Exp. Cell Research., 18, 291-300, 1959.
- 7 — CLYDE, B. KERNEK and JAMES B. WRAY : Cellular Proof. in the Formation of Fractures in the Rat Tibia. Clinical Orthopaedics and Related Research. No. 91, March-April, p.197, 1973.
- 8 — COHEN, J., LACROIX, P. : Bone and Cartilage Formation by Periosteum. The Journal of Bone and Joint Surgery, 37-A: 717-730, 1955.
- 9 — GROSS, J. : Collagen. Sci. Amer., 121 May 1961
- 10 — YOUNG, R.W. : Autoradiographic Studies on Bone and Cartilage Matrix formation in young Rats injected with Glycine-H³. Anat. Rec., 143-2. p. 335, 1962.