

SIÇANLARDA SUBKUTAN OLARAK YERLEŞTİRİLEN KOLLAGEN YAPISINDAKİ MEMBRANLARIN REZORPSİYON ÖZELLİKLERİNİN TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPIC EVALUATION OF RESORPTION CHARACTERISTICS OF COLLAGEN BASED MEMBRANES FOLLOWING SUBCUTANEOUS PLACEMENT IN RATS

BÜLENT KURTIŞ*, BERRİN ÜNSAL†, CANAN AKBAY‡

ÖZET

Bu araştırmanın amacı, periodontal defektlerin tedavisinde yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) tekniği ile birlikte kullanılabilen kollagen esaslı membran materyallerinin rezorpsiyon özellikleri ve hücresel cevaplarını bir sıçan modelinde transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) incelemektir. Çalışmada 20 adet Wistar sıçanı kullanılmıştır. Ticari olarak elde edilebilen kollagen esaslı iki membran; insan dura mater ve tip I bovin kollagen membran 0.5x0.5cm boyutlarında sıçanların sırtına subkutan olarak implante edilmiştir. Genel anestezi altında 40 implant materyali (20 dura mater ve 20 tip I bovin kollagen) yerleştirilmiştir. Deney hayvanları 14. günde dekapite edilerek ilgili bölgelerden blok biyopsiler alınmış ve elde edilen örnekler membran çevresindeki doku kompozisyonu, fagositik hücrelerin yapısal özellikleri ve membranların rezorpsiyon karakteristikleri yönünden TEM de incelenmiştir. TEM de yapılan incelemeler tip I bovin kollagen membranın dura mater membrana göre daha hızlı rezorbe olduğu şeklinde yorumlanmış ve 14. günde her iki grupta da rezorpsiyon işleminin devam ettiği gözlenmiştir. Ayrıca membran materyallerine karşı istenilmeyen bir doku cevabı tespit edilmemiştir.

Anahtar kelimeler : Kollagen membranlar, rezorpsiyon, transmisyon elektron mikroskobu

SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the resorption characteristics of collagen based membrane materials that might be used for guided tissue regeneration (GTR) procedures in the treatment of periodontal defects, using transmission electron microscopy (TEM) in a rat model. In the study 20 Wistar rats were used. Two commercially available resorbable collagen based membrane materials human dura mater and type I bovine collagen were implanted subcutaneously on the dorsal surface of rats with the dimension of 0.5x0.5cm. 40 implant materials (20 dura mater, 20 type I bovine collagen) were placed under general anaesthesia. Experimental animals were sacrificed 14 days post-implantation and tissue specimens were evaluated for the composition of the surrounding tissue, the structural patterns of phagocytic cells and the resorption characteristics of the collagen membranes using TEM. TEM examinations were interpreted as the type I bovine collagen membranes were resorbed faster than the dura mater membranes and resorption process was continuing in both groups at 14 days. In addition no adverse tissue reactions were determined towards to these membrane materials.

Key words : Collagen membranes, resorption, transmission electron microscopy

* Dr. Dt. GÜ Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı

† Doç. Dr. GÜ Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı

‡ Prof. Dr. AÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

GİRİŞ

Periodontal hastalıklar nedeniyle desteğini kaybetmiş dişlerde iyileşme için en ideal durumun peri-

odontal ligamentten köken alan hücrelerin koronal yönde proliferasyonu ile mümkün olabileceği bildirilmiştir^{13,14,18}. Bu amaçla, YDR tekniği prensipleri ile çeşitli yapılardaki rezorbe olabilen ve rezorbe olmayan

fiziksel bariyer membranlar kullanılarak epitel ve dişeti bağ dokusu hücrelerinin migrasyonu engellenirken periodontal ligament ve kemik dokusu hücrelerine öncelik verilmeye çalışılmaktadır^{10,16,25}.

Politetrafluoroethylene (PTFE) gibi rezorbe olmayan membranların ikinci bir cerrahi operasyonla çıkarılmaları gerekliliği araştırmacıları rezorbe olabilen yapılarda membranlar kullanmaya yöneltmiş ve özellikle de kollagen membranlar üzerinde durularak bu membranlarla yapılan klinik ve histolojik çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir^{1-4,24,27,28}.

Kollagenin insan organizması ve periodonsiyumun temel yapı taşı olması, yüksek gerilme kuvveti, lif orientasyonu, kontrol edilebilir çapraz bağlanma özelliği, düşük antijenitesi, fibroblastlar için kemotaktik olması, yara iyileşmesini hızlandırması ve koagülasyon sağlaması bu materyalin en önemli avantajlarını oluşturmuştur^{7,11}. Ek olarak toz, jel, membran veya sponj gibi değişik formlar halinde üretilebilmesi de kollagenin kullanım alanlarını genişletmektedir.

YDR amacıyla kullanılacak rezorbe olabilen membranların doku ile biyolojik uyumluluk gösterirken belirli bir süre sonunda da rezorbe olabilmesi gerektiği bildirilmiştir³. Iglhaut ve arkadaşlarının¹² yaptığı bir çalışmada periodontal ligament hücrelerinin koronal yöndeki migrasyonlarının 2 hafta içerisinde en üst seviyeye ulaştığı bulgulanmıştır. Yine Karring ve arkadaşları¹⁵ da epitel hücrelerinin 2 hafta içerisinde apikal yönde migrasyona uğrama eğiliminde bulduklarını bildirmişlerdir. Buna göre YDR amacıyla kullanılacak rezorbe olabilen membranların yapısal özelliklerini en az 3-4 hafta süreyle muhafaza etmesi gerektiği bildirilmiştir¹⁹. Periodontal rejenerasyonu sağlayacak periodontal ligament ve alveoler kemik dokusu hücrelerinin koronal yöndeki migrasyonlarının tamamlanması ile yerleştirilen membranların rezorbsiyon sürelerinin birbirleriyle uyumlu olması YDR işlemlerinde göz önüne alınması gereken en önemli noktalardan biridir²³.

Bu çalışmanın amacı, rezorbe olabilen kollagen yapısındaki iki değişik membran materyalinin rezorpsiyon özellikleri ve hücrel cevaplarını TEM ile incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) araştırma ve geliştirme merkezinden temin edilen ortalama 250-300gr ağırlığında 20 adet erkek Wistar sıçanı üzerinde gerçekleştirildi. Deney hayvanlarının anestezisi Ketalar⁸ enjeksiyonu ile sağlandı. Sıçanların dorsal bölgelerinde, membran yerleştirilecek bölgeler tüylerden arındırılarak %0.2'lik klorheksidin ve %10'luk povidon iyodür solüsyonu ile silindi.

Takiben iki ayrı bölgeye yaklaşık 1cm uzunluğunda ayrı ayrı insizyonlar yapılarak subdermal doku künt diseksiyonla ayrıldı ve subkutan cepler oluşturuldu. Rezorbe olabilen insan orjinli solvent dehidrate dura mater⁹ ve bovin orjinli, yüksek çapraz bağlantılı tip I kollagen membranlar¹ 0.5x0.5cm boyutlarında kesilerek ayrı ayrı açılan ceplere yerleştirildi ve yara kenarları 4-0 ipek iplikle matris sütür tekniği kullanılarak sütüre edildi.

Deney hayvanları 14. günde servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Membranlar ve çevrelerindeki yumuşak dokular insizyonla çıkarılarak TEM'de incelenmek üzere ortalama 5 mm³ ebadında kesilerek %4'lük glutraldehid solüsyonuna yerleştirildi.

TEM hazırlığı:

Glutraldehid solüsyonunda 1 gün süreyle fikse edilen doku örnekleri cacodylate buffer ile 2x20 dakika yıkanarak final konsantrasyonu %1 olan osmium tetroksit ile post-fiksasyona tabi tutuldu. Daha sonra 30°,50°,70°,90°,100°'lik etil alkol serilerinde dehidrate edildi. Geçiş solüsyonu olarak 2x20 dakika süreyle propylene oksit solüsyonuyla muamele edilen dokular son olarak araldite-CY 212 ile bloklandı. Bloklardan uygun alanlar 70-80nm kalınlığında kesilerek TEM incelemesi için hazırlandı⁹. Örnekler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak Zeiss EM 9S transmisyon elektron mikroskobu ile incelendi.

§ Parke Davis Co.Inc., USA

II Tutoplast, Biodynamics, Erlangen, Germany

¶ Colla-Tec, Inc., Plainsboro, USA

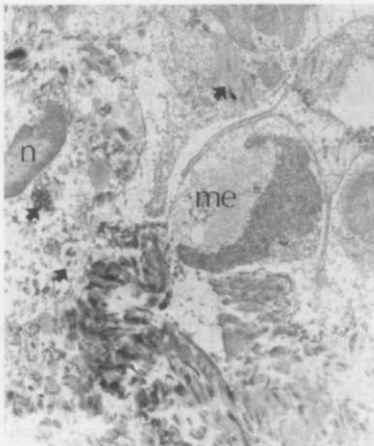
BULGULAR

Dura Mater kollagen membran grubu:

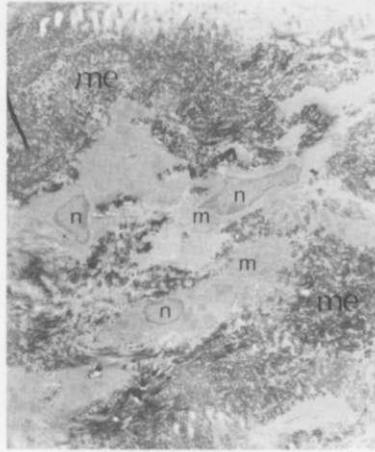
Yavaş gelişen rezorbsiyon alanlarında geniş sitoplazmaları ile aktif makrofaj hücreleri görüldü. Membran materyali makrofajların çevrelerinde henüz tam rezorbe olmamış şekilde bulunuyordu. Makrofajların hücre içine baktığımızda nükleusların düzensiz şekilli oldukları ve eukromatik görüntüde buldukları, kromatinin periferde yığılmış olduğu görüldü. Sitoplazmalarında ise çeşitli yoğunlukta çapları değişken fagositoz vakuelleri mevcuttu. Hücrelerin genişlemiş sitoplazmalarında lizozomların dışında granüllü endoplazmik retikulum ve serbest ribozomlar daha az belirgin olarak izlendi (Şekil 1-2).

Tip I kollagen membran grubu:

Rezorbsiyonun hızlı olduğu gözlenen bu grupta makrofajların yoğun şekilde ve sayıca büyük gruplar oluşturdukları izlendi. Aynı hücrelerin sitoplazmalarında serbest ribozomların yaygın şekilde dağılmış oldukları diğer organellerin ise daha az yoğunlukta olduğu görüldü. Hücreler arası alanda kollagen membran materyali görüntüsü veren çok küçük alanlar vardı (Şekil 3). Büyük büyütmelerde makrofaj nükleuslarının düzensiz şekilli ve eukromatik oldukları, sitoplazmalarında ise çeşitli yoğunlukta ve sayıca fazla heterofajik vakuollerin bulunduğu görüldü (Şekil 4). Heterofajik vakuoller büyük büyütmelerde



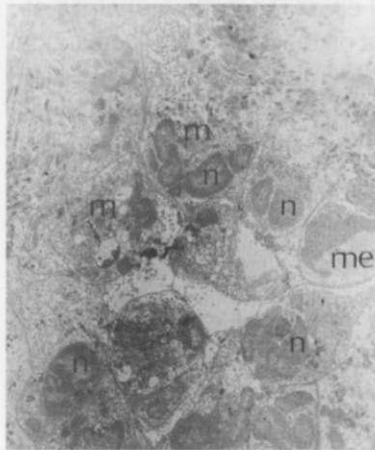
Şekil 1.
Dura mater kollagen membran grubunda makrofaj (m) hücreleri ve membran (me) yapılarının TEM görüntüsü. n: nukleus. Orjinal büyütme x 2500.



Şekil 2.
Şekil 1'in daha büyük büyütmesinde makrofaj (m) hücrelerinin içerisindeki fagositik vakuoller (fv), serbest ribozomlar (çift oklar) ve granüllü endoplazmik retikulumun (oklar) görüntüsü. n: nukleus, me: membran materyali, kl: kollagen lifler. Orjinal büyütme x 9700.

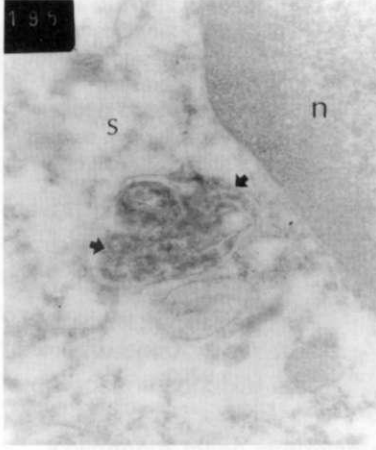


Şekil 3.
Tip I kollagen membran grubunda çok sayıda makrofajlar (m) ve hücre içerisinde heterofajik vakuollerin (oklar) görüntüsü. Makrofaj nükleusları (n) hücre içi yüksek aktivite nedeniyle irregüler yapılar halinde izleniyor. me: membran materyali. Orjinal büyütme x 2500.



Şekil 4.
Tip I kollagen membran grubunda doku içerisinde yapısı bozulmuş membran materyali (me) ve hücre sitoplazmaları içerisinde heterofajik vakuoller (kalın oklar). n: nukleus. Orjinal büyütme x 4700.

incelendiğinde vakuol içerisinde çeşitli büyüklükte fagositoz materyali izlenimini veren düzensiz çapta parçacıklar gözlemlendi (Şekil 5).



Şekil 5.
Şekil 4'ün daha büyük büyütmesinde, heterofajik vakuoller (oklar) ve rezorbe edilen membran yapısının görüntüsü. S:sitoplazma, n:nukleus. Orjinal büyütme x 27.000.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Rezorbe olabilen membranlar kullanılarak uygulanan YDR tekniği'nde membran yapılarının belirli bir süre içerisinde rezorbe olması beklenirken bu sürenin rejenerasyonu sağlayacak periodontal ligament ve kemik dokusu hücrelerinin koronal migrasyonuna izin vermesi ve bu sürede içinde de epitel ile dişeti bağ dokusu hücrelerinin defekt bölgesini doldurmalarına engel olunması istenmektedir.

Iglhaut¹² ve Karring¹⁵ tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarına göre rezorbe olabilen membranların istenilen hücrel migrasyonu sağlayabilmeleri için yapısal özelliklerini en az 3-4 hafta muhafaza etmeleri gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Yine bu konuda Caffesse ve arkadaşlarının⁶ rezorbe olmayan teflon membranlar kullanarak yaptıkları bir çalışmada yeni ataşman oluşumunun miktarı yönünden membranların 4 hafta sonra çıkarıldığı grupla, 8-10 hafta sonra çıkarıldığı grup arasında farklılık bulunmamıştır. Yapılan çalışmalarda rezorbe olabilen membranların rezorpsiyon süreleri polyglaktin membranlar⁸ için 30-60 gün, polylaktik asit membranlar¹⁷ için 3-4 ay ve kollagen membranlar³ için de 2-6 hafta olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte rezorbe olabilen membranlar için en uygun rezorpsiyon süresi hakkında kesin bir cevap bulunamamıştır.

Busscap ve De Boever⁹'in liyofilize dura mater membranı periodontal defektlere uygulayarak yaptıkları bir histolojik çalışmada greft materyalinin 6 hafta

sonrasında hemen hemen tamamına yakınının rezorbe olduğu gösterilmiştir. Ünsal ve arkadaşlarının²⁶ rezorbe olabilen 4 farklı kollagen materyalinin doku reaksiyonu ve rezorpsiyon özelliklerini incelemek amacıyla sıçanlarda yaptıkları bir ışık mikroskopik çalışmada 14. günde fascia lata ve tip I bovin kollagen membran grubundaki fagositik hücre infiltrasyonunun ve dolayısıyla rezorpsiyon hızının, dura mater ve fascia temporalis membran gruplarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Dura mater ve tip I bovin kollagen membranlar kullanarak yaptığımız TEM çalışmamızda da önceki çalışmayla²⁶ uyumlu olarak makrofaj hücrelerinin dura mater membran grubunda tip I bovin kollagen membran grubuna göre sayıca daha az ve rezorpsiyonunda dura mater grubunda daha yavaş olduğu görülmüştür. Yine Quteish ve arkadaşlarının²³ insan tip I kollagen greft materyalini sıçanlara yerleştirerek yaptıkları TEM çalışmalarında 14. günde rezorpsiyonun halen devam ettiği ve yoğun şekilde plazma hücreleri ve makrofaj hücrelerinin gözlemlendiği bulgulanmıştır. Bizim çalışmamızda da 14. günde her iki grupta da membran kalıntılarında rastlanmış ve reaksiyonun özellikle tip I bovine kollagen grubunda daha baskın olmak üzere makrofajlardan meydana geldiği görülmüştür.

Pitaru ve arkadaşlarının²⁰⁻²² tip I rat kollageninden elde ettikleri bir membranla yaptıkları seri çalışmalarında kollagen membranların özellikle iyileşmenin erken dönemlerinde epitelin migrasyonunu engellemede kısmi bir kapasiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacı grubu kollagen membranların koronal bölümlerinin iyileşmenin 10. gününde elde edilen histolojik kesitlerde tespit edilemediğini belirterek koronal bölgedeki bu erken rezorpsiyonun epitelin apikal yönde migrasyonuna izin verdiğini belirtmişlerdir. Koronal bölgedeki bu erken rezorpsiyon mekanik travmaya, postoperatif inflammatuar reaksiyonlara ve tükrükten gelen enzimlerle meydana gelen parçalanmaya bağlanmıştır.

YDR uygulamalarında rezorbe olabilen membranların rezorpsiyon sürelerinin ve özelliklerinin önceden tahmin edilebilmesi tedavi başarısını etkileyebilecek bir faktör olarak görünmektedir. Membranlar erken dönemde rezorbe olduğunda epitel ve dişeti

bağ dokusu hücrelerinin apikal migrasyonunu engelleyemeyecek ve yine periodontal ligament ve kemik dokusu hücrelerinin de koronal migrasyonunu sağlamada yeterli zamanı temin edemeyeceklerdir. Membranlar çok yavaş rezorbe olduğunda ise iltihabi doku reaksiyonlarına neden olabileceklerdir. Çalışmamızda kollagen yapısındaki membranların 14. gündeki rezorpsiyon özelliklerinin incelenmesiyle bu materyallerin klinik uygulamaları sonrası iyileşmenin erken dönemine ışık tutmayı amaçladık. Ancak ağız içi ortamda bulunan çok sayıdaki mikroorganizma türleri ve tükrük yapısı rezorpsiyon zamanı ve özelliklerini değiştirebileceği için bu membranların klinik uygulamadaki rezorpsiyon özellikleri ve YDR işlemindeki başarısının da ileriki çalışmalarla incelenmesi gerektiği görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Al-arrayed F, Adam S, Moran J, Dowell P. Clinical trial of cross-linked human type I collagen as a barrier material in surgical periodontal treatment. J Clin Periodontol 22:371379,1995.
2. Benque E, Zahedi S, Brocard D, Oscaby F, Justumus P, Brunel G. Guided tissue regeneration using a collagen membrane in chronic adult and rapidly progressive periodontitis patients in the treatment of 3-wall intrabony defects. J Clin Periodontol 24:544-549, 1997.
3. Blumenthal NM. The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. J Periodontol 59 : 830-836, 1988.
4. Blumenthal NM. A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE membranes in the treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. J Periodontol 64 : 925-933, 1993.
5. Busschop J, De Boever J. Clinical and histological characteristics of lyophilized allogenic dura mater in periodontal bony defects in humans. J Clin Periodontol 10 : 399-411, 1983.
6. Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. J Periodontol 59 : 589-594, 1988. 7. Doillon CJ, Whyne CF, Brandwein S, Silver FH. Collagen-based wound dressings:Control of the pore structure and morphology. J Biomed Matreial Res 20 : 1219-1228, 1986.
8. Fleisher N, Waal HD, Bloom A. Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using vicryl absorbable mesh (Polyglactin 910). Int J Periodontics Restorative Dent 8 : 45-54, 1988.
9. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy, biological applications. Van Nostrand Reinhold Co, New York, 1970.
10. Hürzeler MB, Quinones CR, Caffesse RG, Schübach P, Morrison EC. Guided periodontal tissue regeneration in interproximal intrabony defects following treatment with a synthetic bioabsorbable barrier. J Periodontol 68 : 489-497, 1997.
11. Hyder PR, Dowell P, Singh G, Dolby AE. Freeze-dried, cross-linked bovine type I collagen:Analysis of properties. J Periodontol 63: 182-186, 1992.
12. Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC, Koch G. Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. J Periodontal Res 23 :107-117, 1988.
13. Isidor F, Karring T, Nyman S, Lindhe J.The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. J Clin Periodontol 13 : 145-150, 1986.
14. Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. J Clin Periodontol 12 : 51-60,1985.
15. Karring T, Nyman S, Lindhe J, Sirirat M. Potentials for root resorption during periodontal wound healing. J Clin Periodontol 11 : 41-52, 1984.
16. Karapataki S, Hugoson A, Falk H, Laurell L, Kugelberg CF. Healing following GTR treatment of intrabony defects distal to mandibular 2nd molars using resorbable and non-resorbable barriers. J Clin Periodontol 27 : 333-340, 2000.
17. Magnusson I, Batich C, Collins BR. New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. J Periodontol 59 : 1-7, 1988.
18. Melcher AM. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol 47 : 494-503, 1976.
19. Minabe M. A critical review of the biologic rationale for guided tissue regeneration. J Periodontol 62 :171-179, 1991.
20. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Azar-avidan O, Noff M. Collagen membranes prevent the apical migration of epithelium during periodontal wound healing. J Periodont Res 22 : 331-333, 1987.
21. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Grosskopf A, Noff M. Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. J Periodontol 59 : 380-386, 1988.
22. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Noff M. Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue attachment during periodontal wound healing in dogs. J Periodont Res 24 : 247-253,1989.

23. Quteish D, Singrao S, Dolby AE. Light and electron microscopic evaluation of biocompatibility, resorption and penetration characteristics of human collagen graft material. *J Clin Periodontol* 18 : 305-311, 1991.
24. Tal H, Pitaru S, Moses O, Kozlovsky A. Collagen gel and membrane in guided tissue regeneration in periodontal fenestration defects in dogs. *J Clin Periodontol* 23 : 1-6, 1996.
25. Tatakis DN, Promsudthi A, Wikesjö UME. Devices for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000 19 : 59-73, 1999.
26. Ünsal B, Kurtiş B, Özcan G, Özdemir A, Karaöz E. An investigation of resorption and tissue reaction after subcutaneous implantation of collagen based membrane materials in rats. *J Marmara Univ Dent Fac* 2 : 609-615, 1997.
27. Wang HL, O'Neal RB, Thomas CL, Shyr Y, Macneil RL. Evaluation of an absorbable collagen membrane in treating class II furcation defects. *J Periodontol* 65 :1029-1036, 1994.
28. Yukna CN, Yukna RA. Multi center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human class II furcations. *J Periodontol* 67 : 650-657, 1996.

Yazışma adresi

Dr. Bülent Kurtiş
GÜ Dişhekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı
Emek-06510 ANKARA