

Bölüm 2

DİŞ HEKİMLİĞİNDE DENEY HAYVANI KEMİK DOKU ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN ANALİZ TEKNİKLERİ

Ufuk TAŞDEMİR¹
Berrin İYİLİKÇİ²

KEMİK DOKU ANALİZ TEKNİKLERİ

Kemik dokunun histolojik değerlendirmesi ve karakterizasyonu genellikle light mikroskopi ile yapılır. Histolojik çalışmaların iki ana tipi tanımlayıcı histoloji ve histomorfometridir. Ayrıntılı değerlendirme için metotlardan birine veya ikisine birden başvurulur. Tanımlayıcı histoloji kemiğin morfolojisi, hücrelerin dizilişi, matriks, implant veya implant doku ara yüzeyi gibi dokuyu ilgilendiren durumlar hakkında genel bir bilgi sağlar. Örnek vermek gerekirse, kemik defektinde yeni kemik oluşumunun miktarını hesaplamak gibi...Skorlama sistemleri ile kemik miktarı hakkında bilgi verilebilir. Defekt bölgesinde tam kemik oluşumu 3, orta seviyede kemik oluşumu 2, düşük seviyede kemik oluşumu 1, hiç kemik oluşmamışsa 0 ile skorlanır (An & Martin, 2003).

Kemik Dokunun Histolojik Analizleri

Mikroanatomik Metotlar

Trabeküler Yapı—İki Boyutlu Görüntüleme

Kortikal doku miktarı iskeletsel dayanıklılık ve kırığa yatkınlığı değerlendirmede major faktördür (An ve Martin 2003).

Yarı Otomatik Görüntü Analizi İle Histomorfometrik Değerlendirme (OsteoMeasure ve Bioquant)

Osteomeasure ve bioquant kemik histomorfometrisini incelemede kullanılan otomatik görüntüleme cihazlarıdır. Bu cihazlarla kansellöz kemiğin bölümlerinin (mikromarların) ölçümleri rutin Toluidine Blue veya Goldner metodu kullanılarak sağlanır (Van Oosterwijk, Duyck & Vander Sloten, 2000). Ayrıca bu

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Pamukkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, otasdemir@pau.edu.tr

² Araştırma Görevlisi, Pamukkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, biyilikci@pau.edu.tr

tır. İmmunohistokimyasal analizler ise teknik olarak karmaşık oluşu ve dekal-sifikasyon gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir. Flow sitometride fosfotaza özgü antikorların kullanılması, immünohistokimyasal yöntemlerle görülenlere benzer doğrulama sorunları oluşturur. Flow sitometri ile elde edilen sonuçlar, benzer şekilde, mümkün olduğunda başka yollarla da desteklenmelidir. Western blot analizi, poliakrilamid jelin çözünürlüğü ve protein hedeflerinin sayısı ile sınırlıdır. RT-PCR analizi, mRNA seviyesini ölçümünde daha az örnekle bile iyi sonuç verir.

Sonuç olarak, diş hekimliği alanında kemiğe yönelik yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan kemik belirteçleri, alkalın fosfataz, osteokalsin ve tartrat dirençli asit fosfataz olarak bulunmuştur. Bunun yanında histoloji-histomorfometri kombinasyonu ve immunohistokimyasal analizler sıklıkla kullanılan ve terk edilmesi güç tekniklerdir. Yine immunohistokimyasal tekniklerle birlikte µBT' nin kullanımı yaygınlaşmaktadır.

Diş hekimliğinin tüm alanlarında en çok kullanılan deney hayvanı ödenen ücretin nispeten az, bakımının kolay, temin edilebilirliğinin yüksek, toplum tarafından kabul edilebilir, hayvanın tutsaklığa toleransının iyi oluşu nedeniyle rat iken, bunu ikinci sırada tavşan takip eder. Kalvaryal defekt çalışmalarında kemik oluşumunu değerlendirmede sıklıkla rat kullanılırken; implant çalışmalarında, ti-biasının insan mandibulasına en yakın kemik özelliğini taşıması sebebiyle tavşan kullanımı iyi sonuç verir.

Örneklerin temini için çoğu kemik çalışmasında hayvanların ötenazi işlemi kaçınılmazdır. Çalışmaların geneline bakıldığında ortalama olarak kemik iyileş-mesi çalışmalarında 7., 14., 28. günlerde, kırık iyileşmesi çalışmalarında 21. gün, implant çalışmalarında ise 4-16 haftalar arasında ötenazi işlemi gerçekleştiril-miştir.

Kullanılacak kemik belirteci, analiz tekniği, deney hayvanı yapılacak çalış-manın içeriğine göre değişmekte olup, araştırmacının çalışma öncesinde detaylı bir literatür taraması yapıp bu anlamda doğru bir karar vermesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Aaron JE, Johnson DR, Kanis JA et al. (1992). An automated method for the analysis of trabecular bone structure. *Comput Biomed Res.* 25::1-6.
2. An YH, Martin KL. (2003). *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage.* Totowa: Humana Press Inc.
3. Bernardino M.I., Farias L.I. CAMR. (2014). Use of Animal models in Experimental Research in Dentistry in Brazil. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 14(1):17-21. doi:10.4034/PBOCI.2014.141.03.
4. Boyde A, Shapiro IM. (1980). Energy dispersive X-ray elemental analysis of isolated epiphyseal growth plate chondrocyte fragments. *Histochemistry.* 69(1):85-94.

5. Francis DA MD. (2002). Trends observed in bone metabolism markers from dogs following radial ostectomy. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2(A5).
6. Helen E. Gruber and Jane A. Ingram. (2003). Basic Staining and Histochemical Techniques and Immunohistochemical Localizations Using Bone Sections. İçinde: Y. H. An and K. L. Martin, editör. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage.* Totowa: Humana Press Inc.
7. Kalyuzhny AE. (2017). Signal Transduction histochemistry.(Second edit). USA:Humana Press Inc.
8. Marks SC Jr, Cielinski MJ SK. (1996). Bone surface morphology reflects local skeletal metabolism. *Microsc Res Technol.* 33:121–127.
9. Obrant KJ OR. (1984). Electron microprobe analysis and histochemical examination of the calcium distribution in human bone trabeculae: a methodological study using biopsy specimens from post-traumatic osteopenia. *Ultrastruct Pathol.* 7:123–131.
10. Van Oosterwijck H, Duyck J, Vander Sloten J et al. (2000). The use of microfocus computerized tomography as a new technique for characterizing bone tissue around oral implants. *J Oral Implant.* 26:5–12.
11. Piattelli A, Scarano A, Russo P, Matarasso S. (1996). Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. (17): 791-6.
12. Reid SA. (1987). Micromorphological characterization of normal human bone surfaces as a function of age. *Scanning Microsc.* 1:579–597.
13. Reid SA BA. (1987). Changes in the mineral density distribution in human bone with age: Image analysis using backscattered electrons in the SEM. *J Bone Min Res.* 2:13–22.
14. Tirachaimongkol C., Pothacharoen P. RPA. (2016). Relation between the stability of dental implants and two biological markers during the healing period: a prospective clinical study. *Int J Implant Dent.* 2(27). doi:10.1186/s40729-016-0058-y.
15. Ünal, B., Aslan, H., Canan, S., Şahin, B., Kaplan S. (2002). Biyolojik Ortamlardaki Objelerin Sayımı Yapılırken Kullanılan Eski (tarafı) Metotların Önemli Hata Kaynakları ve Çözüm Önerileri. ; . Cilt: 22, Sayı: 1 (Ek) Sayfa 1-6. Türk Hekimler Birliği Vakfı Türkiye Klin Tıp Bilim Derg Özel Sayısı Stereolojide Temel Kavram ve Yöntemler. 22(1):1–6.
16. Xiang Z, Markel' MD. (1995). Bromodeoxyuridine Immunohistochemistry of Epon-embedded Undecalcified Bone in a Canine Fracture Healing Model. 43(6): 629-635.