

**SUBKUTAN OLARAK İMPLANTE EDİLEN  
HİDROKSİLAPATİT/KOLLAGEN/GLİKOSAMİNOGLİKAN  
VE DOĞAL MERCANIN HİSTOPATOLOJİK  
DEĞERLENDİRİLMESİ\***

Doç. Dr. Gökhan ALPASLAN\*\*, Dr. Cansu ALPASLAN\*\*,  
Doç. Dr. Tülin OYGÜR\*\*\*

**ÖZET**

Bu çalışmada 18 kobayın sırtına subkutan olarak yerleştirilen doğal mercan ve hidroksilapatit/kollagen/glikosaminoglikan implantlarının osteoindüktif özellikleri ve doku reaksiyonları histopatolojik olarak incelenmiştir. Her iki materyalin de osteoindüktif olmadığı : böbrek, karaciğer, dalak ve lenf nodüllerinde herhangi bir patolojiye sebep olmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Hidroksilapatit. Kollagen. Doğal Mercan.

**SUMMARY**

**HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF  
SUBCUTANEOUSLY IMPLANTED  
HYDROXYAPATITE/COLLAGEN/GYL COSAMINOGLYCANS  
AND NATURAL CORAL IMPLANTS**

The osteoinductive property and tissue reaction to natural coral and Hydroxyapatite/Collagen/Glycosaminoglycans implants implanted subcutaneously in 18 guinea pigs were evaluated histopathologically in this study. It was concluded that both materials

(\*) Araştırma G.Ü. Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde yapılmıştır.

(\*\*) G.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi

(\*\*\*) G.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı.

were not osteoinductive and caused no adverse effects on kidney, liver, spleen and lymph nodes.

Key Words : Hydroxylapatite. Collagen. Natural Coral

## GİRİŞ

Oral ve maksillofasiyal cerrahi uygulamalarında gerek kemik defektlerinin onarımı gerekse de atrofik alveoler kreterin yükseltilmesi amacıyla çeşitli materyaller ve teknikler tanımlanmıştır. Kemik greftleri pek çok vakada en çok tercih edilen yöntem olmakla birlikte beraberinde getirdiği komplikasyonlar ve dezavantajlar sentetik implant materyallerinin kullanımını gündeme getirmiştir.

Geçtiğimiz yıllarda fosfat ve kalsiyum esaslı materyaller geliştirilmiş ve kemiğin devamlılığını sağlamak amacıyla pek çok tedavi şekli önerilmiştir.

Hidroksilapatit (HA) ve trikalsiyumfosfat (TCP) kalsiyum fosfattan oluşurken (1, 2, 3); doğal mercan (DM) ise aragonit kristalleri şeklinde bulunan kalsiyum karbonattan (4) oluşmaktadır.

Kemik, yaralanmalardan sonra kendini onarabilme ve yeniden şekillenme yeteneğine sahiptir. Kemik mevcut kemiğin üzerine apozisyon şeklinde yığılıyorsa bu osteokondüksiyon olarak bilinmektedir (5). Subperiostal olarak greftlenmiş atrofik alveolar kemik alıcı kemik yüzeyi ile greft materyali arasındaki osteokondüktif etkileşme ile restore edilebilmektedir. Osteoindüksiyon ise ilgili dokunun normal davranışı dışında hücrel değişiklikler ve diferansiyasyon ile karakterize bir prosestir. Bu fenomende indiferansiye mezenşimal hücreler osteoblast ve kondroblastlara dönüşmek üzere stimüle olmaktadır (6).

HA'in blok ve partiküllü formlarının kullanımında karşılaşılan problemleri çözmek amacıyla materyal kollagen, jelatin ve fibrin yapıştırıcı ile karıştırılmış; aynı zamanda kollagen tüp ve poliglikolik asit örgü içine yerleştirilmiştir (7, 8, 9, 10, 11, 12).

Kalsiyum fosfatların biyorezorpsiyonu biyolojik sıvılar içinde kimyasal çözülme ve fagositoz gibi hücrel işlemler sonucunda meydana gelmektedir (1, 13). Kalsiyum fosfatlardan betatrikalsiyum-

fosfat poröz yapıdaysa küçük parçalara ayrılarak bölgesel lenf bezleri gibi çevre dokular arasına yayılabilmektedir (3). Doğal mercanın kısa sürede vaskülarize olarak yavaş yavaş rezorbsiyona uğradığı ve süngerimsi kemikle yer değiştirdiği; medüller kısmında rezorbsiyon olurken kortikal kısmında kompakt kemiğe dönüşümün olduğu gösterilmiştir. Rezorpsiyon mekanizmasının ise enzimatik olarak meydana geldiği ifade edilmiştir (14, 15).

İmplant edilen biyomateryallerin sistemik komplikasyonlarından birisi de materyalin yada materyalin içeriğinin implantasyon alanından uzak bölgelere taşınmasıdır. Erimeyen partiküller hücrel mekanizmalar yoluyla lenfatiklere taşınabilmektedir. Metal-lerin ve seramiklerin kullanıldığı deneysel çalışmalarda makrofajlar yoluyla da lenfatiklere taşınma olabileceği gösterilmiştir (16). Klinik denemelerde trikalsiyumfosfatın lenf bezlerinde biriktiği ileri sürülmüştür (2). Silikon parmak eklemine yerleştirilmesinden beş yıl sonra aksiller lenf bezlerinde silikon partikülleri bulunmuştur (17).

Bu çalışma doğal mercan ve hidroksilapatit/kollagen/glikosaminoglikan implantlarının osteoindüktif özelliklerinin, meydana gelen doku reaksiyonlarının ayrıca böbrek, dalak, bölgesel lenf bezi ve karaciğer üzerindeki etkilerinin histolojik olarak incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

İmplant Tanımı : HA/Kollagen/Glikosaminoglikan implant materyali (Biostite. Bioetica SA. 32 Rue Saint Jean De Dieu 69007 Lyon. France) % 88 partikül halindeki poröz hidroksilapatit : % 9.5 sığır derisinden elde edilmiş tip I kollagen ve % 2.5 kondroitin sülfattan meydana gelmektedir. Silindir şeklindeki materyal ikiye bölünerek iki adet yarı silindir elde edildi. Doğal mercan (Biosphere. Inoteb BP 26-56920 Saint Gonnery. France) 150 milimikron büyüklüğünde por yapısı içeren ve Genus porites türündeki doğal mercandan elde edilen rezorbe olabilen bir biyomateryaldir.

Cerrahi İşlemler : Çalışmamızda ağırlıkları 400-600 gr. arasında değişen her iki cinsten toplam 18 adet kobay kullanıldı. Deney hayvanlarının anestezisi intraperitoneal olarak enjekte edilen 55 mg/

kg Sodyum Thiopentone BP (Pentotal Sodyum. Fako İlaçları A.Ş., Levent, İstanbul) ile sağlandı. Hayvanların sırt derisi traş edilerek antiseptik solüsyonla silindi. Sırtın orta hattında yaklaşık 3 cm. uzunluğunda vertikal insizyon yapıldı. Deri alttaki dokulardan diseke edilerek implant materyallerinin yerleştirilebileceği bir boşluk oluşturuldu, 9 hayvanın sırtına doğal mercan (Biosphere grubu), 9 hayvanın sırtına ise HA/kollagen/GAG implantı (Biostite grubu) yerleştirildi. Deri insizyonları 3x0 ipek sütür ile primer olarak kapatıldı. Hayvanlar 30, 60 ve 90. günlerde her grupta 3 deney hayvanı olacak şekilde öldürüldü. İmplant materyalleri çevresindeki yumuşak dokularla birlikte çıkartılarak % 10'luk formol içerisinde yerleştirildi. Nekropsi materyali olarak çıkartılan rejyonel lenf nodülleri, dalak, karaciğer ve böbrek de % 10'luk formol içerisinde histopatolojik incelemeye gönderildi. Fiksasyonu takiben dokular demineralize edilerek parafin bloğa gömüldü ve 5 mikron kalınlığında seri kesitleri alındı. Hematoksilen-eozin ile boyanan kesitler ışık mikroskobunda incelendi.

## SONUÇ

Biostite grubu kesitlerin mikroskobik incelenmesinde subkutan dokuya implante edilen materyalin dağılmadan, kompakt halde yer aldığı ve demineralizasyon nedeniyle materyalin içeriğindeki HA partiküllerinin açık bazofilik boyanan homojen yapıda olduğu izlendi.

30. gün bulguları : HA partikülleri çok çekirdekli yabancı cisim dev hücreleriyle çevrelenmişti. Partiküller arası dokuda hafif düzeyde mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 1). Osteoid veya yeni kemik yapımı saptanmadı.

60. gün bulguları : Partiküllere karşı yabancı cisim dev hücre reaksiyonunun devam ettiği gözlemlendi. Bazı partiküllerin küçük fragmanlara ayrıldığı ve iltihabi infiltrasyona eozinofil lökositlerin katıldığı dikkati çekti (Şekil 2, 3). Yeni kemik yapımı saptanmadı.

90. gün bulguları : HA partiküllerinin arasında vaskülarize sellüler bağ dokunun yer aldığı ve bazı partiküllerin ince fibröz bantlarla çevrelendiği izlendi (Şekil 4). Yeni kemik yapımı saptanmadı.



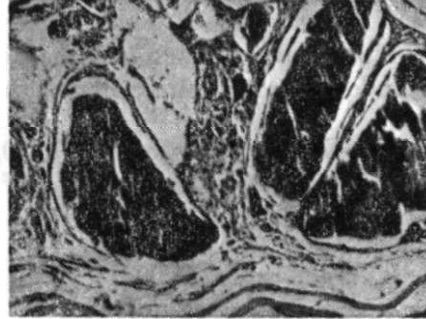
**Resim 1.** 30. gün Biostite grubunda implantasyon bölgesinin panoramik görünümü (HEx40).



**Resim 2.** 60. gün Biostite grubunda implant materyaline karşı gelişen yabancı cisim reaksiyonu (HE x 40).



**Resim 3.** 60. gün Biostite grubunda HA partikülü komşuluğunda iltihabi hücre infiltrasyonu ve çok çekirdekli dev hücre (HEx400).



**Resim 4.** 90. gün Biostite grubunda çok çekirdekli dev hücreler ve ince fibröz bantlarla çevrilmiş HA partikülleri (HEx100).

Nekropsi bulguları : Lenf bezlerinde folliküler hiperplazi ile karakterli reaktif değişiklikler dışında karaciğer, böbrek ve dalak dokularında ışık mikroskopik düzeyde patoloji saptanmadı. Lenf bezi bulguları non-spesifik olarak değerlendirildi.

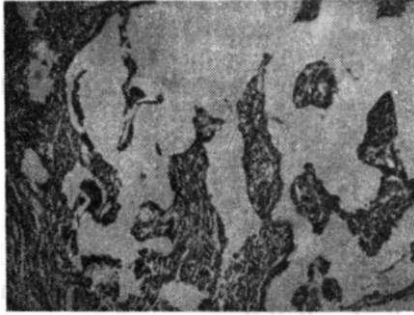
Biosphere grubu: Mikroskopik incelemede demineralizasyon nedeniyle doğal mercanın tamamen uzaklaştığı ve geriye materyal boşluğunun kaldığı izlendi.

30. gün bulguları : Boşluk halinde izlenen materyal alanı çevresinde yoğun mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu izlendi (Şekil 5). Çok sayıda yabancı cisim dev hücrelerinin materyal boşluğu-iltihabi granülasyon dokusu komşuluğunda uzandığı gözlemlendi (Şekil 6). Çevre reaksiyoner dokudan materyal içine doğru ödemli, genç bağ dokunun girdiği dikkati çekti. Yeni kemik veya osteoid yapımı saptanmadı.

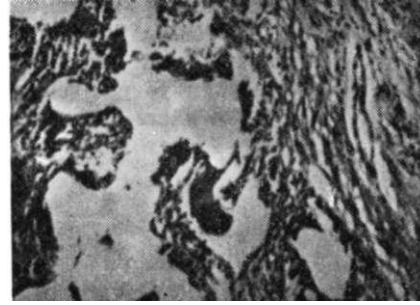
60. gün bulguları: Materyal boşluğu en dışta fibroblastlardan zengin bağ doku alanları ve yer yer multinükleer yabancı cisim dev hücreleri içeren iltihabi granülasyon dokusu ile çevrelenmişti. Ayrıca gevşek, fibromikzoid dokunun trabeküler paternde materyal boşluğuna girdiği gözlemlendi. Bu dokuyu ince fibriller uzantıları olan iğsi veya yıldızsı biçimde mezensimal hücreler oluşturmaktaydı (Şekil 7). Kemik veya osteoid yapımı saptanmadı.

90. gün bulguları: Bir örnek dışında bu gruba ait örneklerin seri kesitlerinin tümünde deri ve deri altı dokuların normal histomorfolojide olduğu izlendi. Bir örnekte ise subkutan yağ dokusu içinde nodul biçiminde fibrovasküler doku odağı izlendi (Şekil 8).

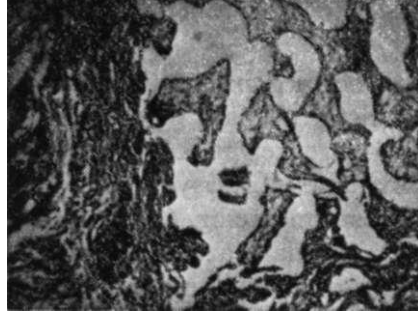
Nekropsi bulguları : 30, 60, 90. günlerde dekapite edilen deney hayvanlarından alınan lenf bezi, karaciğer, böbrek ve dalak dokularında ışık mikroskopik düzeyde patoloji saptanmadı. Bazı lenf bezi kesitlerinde izlediğimiz folliküler hiperplazi non spesifik olarak değerlendirildi.



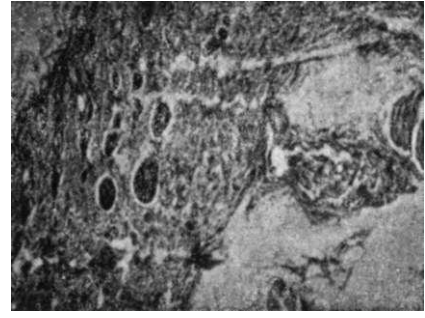
**Resim 5.** 30. gün Biosphere grubunda materyal boşluğu çevresinde iltihabi hücre infiltrasyonu (HEx100).



**Resim 6.** 30. gün Biosphere grubunda yabancı cisim dev hücreleri ve iltihabi granülasyon dokusu (HEx200).



**Resim 7.** 60. gün Biosphere grubunda trabeküler yapıda gevşek fibromiksoid doku (HEx100).



**Resim 8.** 90. gün Biosphere grubunda deri altı yağ dokusunda nodul benzeri fibrovasküler doku (HEx40).

### TARTIŞMA

30. gün bulguları kobay subkutan dokusunda biosphere'e karşı yabancı cisim reaksiyonunun geliştiğini göstermektedir. Yanısıra, yeni oluşan gevşek fibromiksoid yapıda genç bağ dokusunun biosphere'i temsil eden boşluk içine doğru girişi 60. günde çarpıcı belirginlik kazanmıştır. Bu yeni doku şekil ve kalınlık olarak birbirine benzeyen trabeküllerden oluşmuş organize görünüm sergilemektedir. İmplant materyalini çevreleyen yumuşak dokularda yabancı cisim reaksiyonu gözlenirken yeni gelişen genç bağ dokuda iltihap hücresi yer almamaktadır. Bu bulgulara dayanarak 60. günde çevre reaksiyoner dokuda yer alan aktif fibroblastik proliferasyonun biosphere'in fiziksel yapısındaki porlar içine girişler yaptığı düşünülebilir. 60. gün kesitlerinde osteoid formasyonunun saptanmaması materyalin bu dönemde osteoindüktif olmadığını göstermektedir.

Biosphere grubunun 90. gün kesitlerinde implant materyaline ait mikroskopik bulguya rastlanmamıştır. Bir örnekteki subkutan fibröz nodül, tümüyle rezorbe olan materyalden geriye kalan onarım dokusu olabileceği gibi başka bir nedene bağlı olarak gelişmiş olabilir. Diğer örneklerde implant materyaline ait hiçbir mikroskopik bulgunun olmayışı biosphere'in 90. günde tamamen rezorbe olduğunu göstermemektedir. Böyle bir yoruma gidebilmek için diğer örneklerde de fibröz skar dokusu, eski kanama alanları gibi implantasyon prosedürünü temsil edecek bulguların saptanması ge-

rektiği ve herhangi bir yoruma gidebilmek için 90. gün bulgularının yeterli olmadığı düşünülmektedir.

Biostite materyali 30. günde yabancı cisim granülasyon dokusuyla çevrelenmiştir. Bu dokunun karakteristik elemanı olan çok çekirdekli dev hücreler HA partiküllerini sararken makrofaj ve lenfositlerden zengin mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu doku reaksiyonunun kronik fazda olduğunu göstermektedir. 60. günde tabloya eklenen eozinofil granülositler sayıları az olduğundan bir aşırı duyarlılık reaksiyonundan çok kronik iltihabın geç fazını temsil etmektedir. 90. günde bir yandan dev hücreler ve makrofajlarca parçalanma devam ederken diğer yandan bazı partiküllerin fibröz bantlarla sarmalanmaya başlaması organizmanın implant materyalini fibröz bağ doku ile sınırlandıracağını düşündürmektedir. İndiferansiye mezensim hücresinin osteoblasta farklılaşması ile beklenebilecek osteoindüksiyon şüphesizki doku iyileşmesinin terminal fazını temsil eden fibröz bağ dokuda gerçekleşmeyecektir. Kolagen/hidroksilapatit implantına karşı yabancı cisim veya allerjik reaksiyon gelişmediğini bildiren Kathagen'in (18) aksine bulgularımız yabancı cisim reaksiyonu ve fibröz enkapsülasyon oluştuğunu bildiren diğer çalışmalarla uyum içerisinde (1,7,8, 19).

Biostite materyaline karşı yabancı cisim reaksiyonunun geliştiğini ve subkutan dokuya implante edildiğinde osteoindüktif olmadığını gösteren sonuçlarımız El Deeb'in (20) sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Rezorbe olabilen kalsiyumfosfat implantlarında açığa çıkan kalsiyum ve fosfat iyonları merak konusu olmuştur. Açığa çıkan bu iyonların vücut dolaşımına girerek normal yolla vücuttan uzaklaştığı bildirilmiştir (21). Rejyonel lenf bezlerinde non-spesifik olarak değerlendirilen folliküler hiperplazi dışında karaciğer, dalak ve böbrekte herhangi bir patoloji izlenmediğini ortaya koyan çalışmalarımızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

### **Teşekkür**

Çalışmamızda deney hayvanı ve doğal mercan materyalini temin ederek bizlere katkıda bulunan Tadımlı Tıbbi Malzeme San. ve Tic. Ltd. Şirketine teşekkür ederiz.



### KAYNAKLAR

1. Jarcho. M. : Biomaterial Aspects of Calcium Phospates Dental Clinics of North America 30 : 25-47, 1986.
2. Brandies. E.F., Dielert. E. : Clinical Use of Tricalciumphosphate and Hydroxylapatite in Maxillofacial Surgery. JOI 11 (2) : 40-44, 1985.
3. DeGroot. K. : Calciumhydroxyapatite. JOI 12 (3) : 485-489, 1986.
4. Guillemin. G., Patat. J.L., Fournie. J., Chetail. M. : Contribution a l'etude du devenir d'un fragment de squeitte de corail madraporaire implante dans la diaphyae des os longs enez la chien. C.R. Acad Sc Paris 293 (3) : 371-376,1981.
5. Urist, M.R. : Fundamental and clinical bone physiology. Philadelphia : J.B. Lippincott. 1980 pp. 331-368.
6. Urist, M.R. : Bone formation and autoinduetion. Science 150 : 893, 1965.
7. Nagase. M., Chen, R., Asada, Y., Nakajima, T. : Radiographic and microscopic evaluation of subperiosteally implanted blocks of hydroxylapatitegelatin mixture in rabbits. J. Oral Maxillofac Surg 47 : 40-45, 1989.
8. Mehlich, D.R. : Collagen/Hydroxylapatite implant for augmenting deficient alveolar ridges : A 24-month clinical and histologic summary Oral Surg Oral Med Oral Pathol 68 : 505-516, 1939.
9. Gongloff, R.K. : Use of Collagen Tube Contained Implants of Particulate Hydroxylapatite for Ridge Augmentation. J. Oral Maxillofac Surg 46 : 641-647, 1988.
10. Wittkampf. A.R.M. : Augmentation of the maxillary alveolar ridge with hydroxylapatite and fibrin glue. J. Oral Maxillofac Surg. 46 : 1019-1021, 1988.
11. Silverberg. M., Singh. M., Sreekanth. S. : Use of polyglycolic acid mesh to confine particulate hydroxylapatite for augmentation of bone in the rat. J. Oral Maxillofac Surg. 44 : 877-881, 1988.
12. Brown. J.S., Ward-Booth. R.P. : Use of polyglactin 910 knitted mesh tubing to stabilize particulate hydroxylapatite in alveolar ridge augmentation. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol 73 : 19-22, 1992.
13. Donath. C, Rohrer, M.D., Hörmann. K. : Mobile and immobile hydroxylapatite integration and resorption and its influence on bone. JOI 12 (1) : 120-127, 1985.
14. Guillemin. G., Patat. J.L., Fournie. J., Chetail, M. : The Use of Coral as a Bone Graft Substitute. J. Biomed Mat. Res. 21 : 557-567, 1987.

15. Issahakian, S., Quhayoun. J.P., Guillemin. G., Patat. J.L. : Le Corail Madreporaire. *L'information Dentaire* 24 : 2123-2132, 1987.
16. Schoen. F.J. : Biomaterials. In : Laskin DM. ed. *Oral and Maxillofacial Surgery*. St. Louis : The C.V. Mosby Company, 1980 : p. 306.
17. Christie. A.J., VVeinberger. K.A., Dietrich. M. : Silicone Lymphadenopathy and Synovitis; Complications of Silicone Elastomer Pinger Joint Prosthesis. *JAMA* 237 : 1463, 1977.
18. Katthagen. B.D., Mittelmier. H. : Experimental Animal Investigation of Bone Regeneration With Collagen-Apatite. *Arch. Orthop Trauma Surg* 103 : 291-302, 1984.
19. Marshall. S.G. : The combined use of endosseous dental implants and collagen/hydroxylapatite augmentation procedures for reconstruction/ augmentation of the edentulous and atrophic mandible : A preliminary report. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol* 68 : 517-526, 1989.
20. El Deeb. M., Roszkowski. M.T., El Hakim. I. : Subcutaneous Implantation of Hydroxylapatite/Collagen in Induced Diabetic and Non-diabetic Rats. *Int. J. Oral Maxillofac Surg* 19 : 113-119, 1990.
21. Jarcho, M. : Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 157 : 259-278, 1981.