

**SUBPERIOSTAL OLARAK YERLEŞTİRİLEN HİDROKSİLAPATİT/
KOLLAGEN/GLİKOSAMİNOGLİKAN VE DOĞAL MERCAN
İMLANTLARININ HİSTOPATOLOJİK İNCELENMESİ***

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

ÖZET

Bu çalışmada 18 kobayın kafasına subperiostal olarak yerleştirilen hidroksilapatit/kollagen/glikosaminoglikan ve doğal mercan implantlarına karşı gelişen doku reaksiyonları ve yeni kemik oluşumu, implant materyallerinin yerleştirilmesinden 30, 60 ve 90. gün sonra histolojik olarak ışık mikroskopunda ve polarize ışıkta incelenmiştir. Doğal mercanın 30. günde rezorbe olmaya başladığı ve periost altında yeni kemik formasyonun başladığı gözlenirken, hidroksilapatit/kollagen/glikosaminoglikan implantları çevresinde hiçbir dönemde yeni kemik formasyonu gözlenmemiş ve hidroksilapatit partikülleri çevresinde fibröz enkapsülasyon izlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Doğal Mercan, Hidroksilapatit, Kollagen, Yeni Kemik Formasyonu.

SUMMARY

**HISTOLOGIC EVALUATION OF SUBPERIOSTEALLY IMPLANTED
HYDROXYLAPATITE/COLLAGEN/GLYCOSAMINOGLYCANS
AND NATURAL CORAL**

Tissue reactions and new bone formation at 30, 60, and 90. days following the subperiosteal implantation of Hydroxylapatite/

(*) Araştırma G.Ü. Tıp Fak. Cerrahi Araştırma Merkezinde yapılmıştır.

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

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

collagen/glycosaminoglycans and Natural Coral in 18 guinea pigs were evaluated histologically using polarized light and light microscopy. Animals implanted with natural coral showed new bone formation at each time interval and resorption of natural coral was observed. Histopathologic evaluation of Hydroxylapatite/collagen/glycosaminoglycans implants revealed no evidence of new bone formation and the hydroxylapatite particles were surrounded by fibrous connective tissue.

Key Words : Natural Coral. Hydroxylapatite. Collagen. New bone formation.

GİRİŞ

Yaşlı hastalarda sıklıkla karşılaşılan alveoler kret rezorpsiyonu oral ve maksillofasiyal cerrahinin temel sorunlarından birini oluşturmakta olup, kret yükseltilmesi amacıyla çeşitli teknikler ve materyaller tarif edilmiş ve önerilmiştir.

Kullanılan materyaller arasında hidroksilapatit (HA) biyolojik uyumunun iyi olması, kolay elde edilebilir olması, osteokondüktif özelliği olması nedeniyle en çok tercih edilen materyal olmuş ve yaygın kullanım alanı bulmuştur (12, 13). Alveoler kret yükseltilmesi amacıyla genellikle hidroksilapatitin granül formu tercih edilmektedir. Ancak granül formun kullanıldığı klinik uygulamalarda partiküllerin yerleştirilmesinde zorluklar, istenen formun verilememesi, partiküllerin migrasyonu gibi problemlerle karşılaşmış ve bu problemlere çözüm getirebilmek amacıyla HA, kollagen, jelatin (çözülebilir kollagen) ve fibrin yapıştırıcı ile birleştirilerek solid formda bir implant materyali elde edilmeye çalışılmıştır (9, 22, 25).

Kemik defektlerinin onarımında ve alveoler kret yükseltilmesinde yaygın olarak kullanılan kalsiyum fosfat grubu sentetik implant materyali HA yanında, temel olarak kalsiyum karbonattan oluşan ve fiziksel yapısı kemiğe benzerlik gösteren doğal mercanla hayvan deneylerinde umut verici sonuçlar elde edilmiş ve klinik uygulamalarda yerini almıştır (3, 8). % 99 kalsiyum karbonat ve % 1 eser elementlerden oluşan ve inert bir biyolojik materyal olan doğal mercan hidroksilapatitin aksine rezorbe olmaktadır (10, 17).

Bu çalışmada subperiostal olarak yerleştirilen HA/kollagen/glikosaminoglikan ve doğal mercan implantlarının yeni kemik oluşumu üzerindeki etkileri ve oluşan doku reaksiyonlarının karşılaştırılması olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada ağırlıkları ortalama 400 gram olan her iki cinsten ortalama 6 aylık 18 adet kobay kullanıldı. Kobayların anestezisi 55 mg/kg sodyum thiopentone BP (Pentotal sodium. Fako İlaçları A.Ş. Levent, İstanbul) ile sağlandı. Gerekli anesteziyi takiben hayvanların kafaları traş edilerek antiseptik solüsyonla silindi. Deri, deri altı doku, kas ve periostu içeren düz insizyon yapıldı. Dokular diseke edilerek subperiostal cep oluşturuldu. Oluşturulan bu subperiostal ceplere 9 hayvanda Biosphere (Inoteb BP 26 56920 St-Gonnery, France) 9 hayvanda ise Biostite (Bioetica S.A. 32 Rue Saint Jean De Dieu 69007 Lyon France) yerleştirildi. Kullanılan Biostite materyali % 88 poröz hidroksilapatit, % 9.5 sığır derisinden elde edilmiş tip I kollagen ve % 2.5 kondroitin sülfat içermektedir. Yapılan insizyonlar 3x0 ipek sütür ile primer olarak kapatıldı. Her grupta 3 deney hayvanı olacak şekilde hayvanlar 30, 60 ve 90. günlerde öldürüldü. İmplant materyalleri çevre kemik ve yumuşak dokularla birlikte blok halinde çıkarıldı ve % 10'luk formole yerleştirilerek histopatolojik incelemeye gönderildi. Histopatolojik inceleme amacıyla nekropsi materyalleri % 10'luk formolde fikse edildi. Daha sonra % 10'luk formik asitte bir hafta süreyle demineralize edilen dokular akarsu altında 8 saat yıkandıktan sonra rutin doku takibine alındı. Dokular parafin bloğa gömüldü ve 5 mikron kalınlığında seri kesitleri alındı. Kesitler hemotoksilen eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda ve polarize ışıkta incelendi.

SONUÇLAR

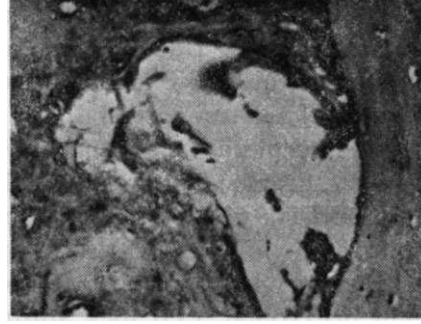
30. Gün Bulguları

Doğal mercanın bu döneme ait tüm örneklerinde kemiğin periostal yüzünde belirgin kalınlaşma izlenmiştir. Periostal bağ dokuda doğal mercanı temsil edecek mikroskobik bulgu yer alma-

maktadır. Kemikteki kalınlaşma kompakt, lamellar yapıdaki kortikal plağın devamında kondroosteoid oldukça benzeyen yeni kemikle karakterlidir (Şekil 1). Osteositler oval yada yuvarlak lakünler içinde yer almışlardır. Kemiğin kalınlaştığı bu bölgeye polarize ışıkla bakıldığında yer yer odaksal «woven kemik» patenimin bulunduğu ve bu odaklar arasında lamellar birefringansın ortaya çıktığı görülmüştür. Bu bölge medüller doku içermemektedir ve havers kanallarından fakirdir. Yer yer havers kanalından farklı görünümde ve vasküler eleman içermeyen boşluklar dikkati çekmiştir (Şekil 2).



Şekil 1. 30. gün doğal mercan grubunda kemiğin periosteal yüzünde kondroosteoid benzeyen yeni kemik oluşumu (HEx100).

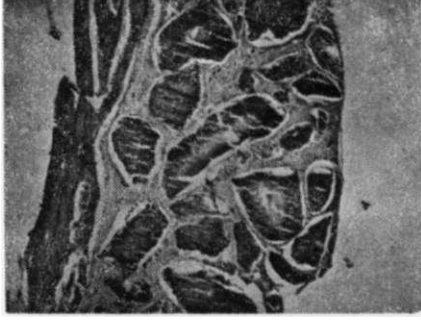


Şekil 2. 30. gün doğal mercan grubunda genç kemik dokusu içinde vasküler eleman içermeyen irregüler boşluk (HEx400).

HA/kollagen/glikosaminoglikan implantlarının mikroskopik incelemesinde kemik yüzeyinde periosteal bağ doku içinde HA partiküllerinin multinükleer dev hücreler tarafından sarmalandığı izlenmiştir (Şekil 3, 4). Kollagen fragmanlarının komşuluğunda da dev hücrelerin varlığı dikkati çekmiştir (Şekil 5). Ara doku ince fibriller yapıda olup az sayıda mononükleer iltihap hücresi içermektedir. Kemiğin periosteal yüzünde rezorpsiyon alanları gözlenmiş, yeni kemik yapımı saptanmamıştır.

60. Gün Bulguları

Doğal mercan grubunda otuzuncu günde gözlenen kondroosteoid benzer yapıdaki yeni kemik dokusu 60. gün örneklerinde



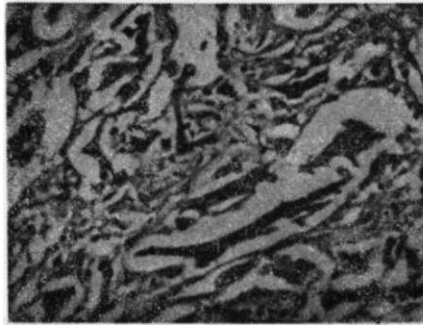
Şekil 3. 30. günde HA/kollagen/glikosaminoglikan implant materyali (HEX40).



Şekil 4. HA partikülleri çevresinde yabancı cisim dev hücreleri (HEX200).

varlığını sürdürmekle birlikte nispeten inceleme göstermiştir (Şekil 6, 7). Ayrıca polarize ışıpta lamellar birefringans gösteren alanlar artmıştır.

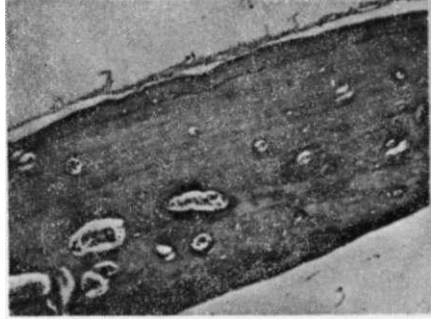
HA/kollagen/glikosaminoglikan grubunda HA partiküllerinin komşuluğundaki kemik dokuda rezorpsiyon izlenmiştir. Partiküller çevresinde muftinükleer dev hücreler ve az sayıda eosinofil lökosit görülmüştür (Şekil 8). İmplant materyalinin izlenmediği bazı kesitlerde kemiğin subperiostal yüzünde yeni kemik yapımı ile karakterli kalınlaşma dikkati çekmiştir (Şekil 9).



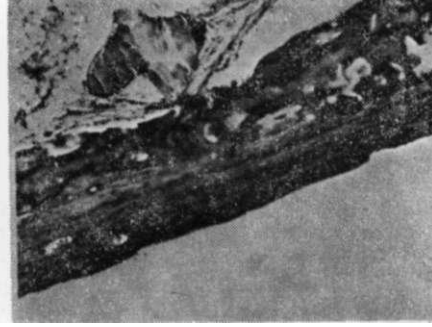
Şekil 5. HA/kollagen/glikosaminoglikan implant materyalinde kollagen parçaları ve çevresinde yabancı cisim dev hücreleri (HEX400).



Şekil 6. 60. gün doğal mercan grubunda yeni kemikte maturasyon (HEX100).



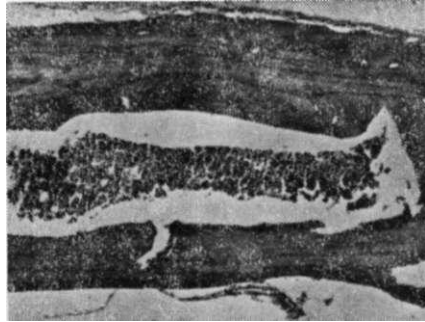
Şekil 7. 60. gün doğal mercan grubunda yeni kemikte inceleme ve maturasyon (HEx100).



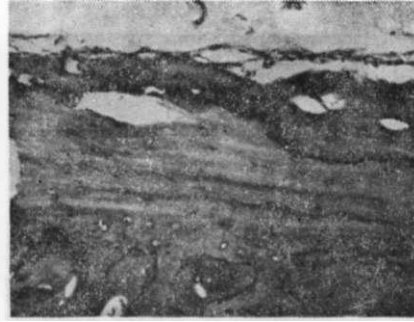
Şekil 8. 60. gün HA/kollagen/glikosaminoglikan grubunda HA partikülü ve komŐu kemikte rezorbsiyon (HEx100).

90. Gün Bulgular

Doğal mercan grubunda yeni kemik dokusunun kk, iğsi osteosit lakünleri ve lamellar yapıdan zenginleŐmesiyle matür görünüm aldığı izlendi. Polarize ışıkta «woven kemik» paterninin ancak kk bir kaç odakta yer aldığı buna karŐın yeni kemiğin lamellar birefrjans veren dıŐ kortikal plakla örtüldüğü dikkati çekti (Şekil 10).



Şekil 9. 60. gün HA/kollagen/glikosaminoglikan grubunda implant materyali ile komŐuluk göstermeyen alanda perital yeni kemik reaksiyonu (HE x 100).



Şekil 10. 90. gün doğal mercan grubunda matür kemik dokusu (HE x 200).

HA/kollagen/glikosaminoglikan grubunda HA partiküllerinin kemik yüzeyine dağıldığı ve kemikte rezorpsiyon oluşturduğu izlenmiştir. Partiküller çevresinde ince bant şeklinde fibröz dokuların geliştiği dikkat çekmiştir. Yeni kemik yapımı saptanmamıştır (Şekil 11).



Şekil 11. HA partikülleri ve kemik rezorpsiyonu (HE x 100).

TARTIŞMA

Hidroksilapatitin granül formu atrofik alveoler kreterlerin yükseltilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmakla beraber, yerleştirilmesinde zorluklarla karşılaşmakta ve yerleştirildikten sonra istenen formda kalması çoğu kez sağlanamamaktadır. Bu problemlere çözüm getirebilmek amacıyla çeşitli stabilizasyon teknikleri ve HA partiküllerinin kollagen tüp içerisinde yerleştirilmesi gibi yöntemler önerilmiştir (4, 5, 6, 7). Ancak bu işlemler zaman alıcı ve özel materyallere ihtiyaç gösteren yöntemler olup başarı, kullanılan tekniğe bağlı olarak sınırlı kalabilmektedir.

Kollagen bir biomateryal olarak yumuşak doku konturlarının düzeltilmesi amacıyla, yanıklarda ve hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır (11, 14, 16, 23). Kollagenin zayıf antijenitesi olduğu ancak klinik açıdan önemli bir sistemik etki oluşturmadığı bildirilmiştir (15). Mehlisch (19), HA/kollagen implantının kullanıldığı hastalarda yapılan serolojik testlerde kollagene karşı antikor saptamakla birlikte mukozal dokularda hipersensitivite bulguları ve sistemik reaksiyonların oluşmadığını kaydetmiştir. Kemikğin iki doğal komponenti olan kollagen ve hidroksilapatitin birleştirilme-

si yerleştirilmesi kolay bir implantın elde edilmesini sağlamakta ve partiküllerin dağılmasını önlemektedir. Yapılan hayvan çalışmaları kollajenin iyileşme ve yeni kemik oluşumu üzerinde bir etkisi olmadığı, sadece HA partiküllerini bir arada tutmaya yaradığı ve rezorbe olarak dens, fibröz dokuyla yer değiştirdiği ortaya koyulmuştur (1, 9, 20). Çalışmamızda kullanılan HA/kollagen/glikosaminoglikan implantının içeriğinde % 2.5 oranında yer alan kondroitin sülfat ise üretici firma tarafından mineralizasyonu artırması amacıyla implant materyaline ilave edilmiştir.

Çalışmamızda subperiostal olarak yerleştirilen HA/kollagen/glikosaminoglikan implantlarının tüm dönemlerdeki histolojik incelemesinde HA partikülleri çevresinde çok çekirdekli dev hücrelerin varlığı dikkati çekmiş ve az sayıda mononükleer iltihabi hücre izlenmiştir. Çalışmalarında benzer bulgular elde eden Nagase ve arkadaşları (22) bunun hidrokسيلapatite karşı gelişen yabancı cisim reaksiyonu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda kobayların kafatası kemiğine subperiostal olarak yerleştirilen HA/kollagen/glikosaminoglikan implantları içerisine doğru yeni kemik oluşumu gözlenmemiş, özellikle 90. gün kesitlerinde HA partiküllerinin ince fibröz bantlarla çevrelendiği ve hiç bir partikülün doğrudan kemik dokusu komşuluğu göstermediği bulgulanmıştır. Çalışmalarında benzer bulgular ortaya koyan Bell ve Beirne (1) de kollajenle karıştırılarak kemik defektlerine yerleştirilen HA partiküllerinin büyük kısmının gevşek fibröz dokuyla çevrelendiğini ve sadece bir kaç partikül ile kemik arasında direkt temas olduğunu bildirmişlerdir. Marshall (18) ve Mehlisch (19) ise HA/kollagen implantı ile alveoler kret yükseltilmesi gerçekleştirilen hastalardan alınan örneklerin histolojik incelenmesinde HA partiküllerinin fibröz konnektif doku veya kemik dokuyla çevrelendiğini göstermişlerdir. İmplant materyali altındaki kemikte izlediğimiz rezorpsiyon Silverberg ve arkadaşları (24) tarafından da bildirilmiştir.

HA/kollagen/glikosaminoglikan implantlarının 60. günlük mikroskobik incelemesinde implant materyali içermeyen bazı kesitlerde periost altında gözlenen yeni kemik oluşumunun cerrahi işleme karşı gelişen periostal cevap olduğunu düşünmekteyiz. Yine bu döneme ait kesitlerde izlenen eozinofil lökositler hipersensitivite reaksiyonunu telkin edecek yoğunlukta değildir.

Doğal mercanın subperiostal olarak yerleştirilmesini takiben 30 gün içinde kemiğin periostal yüzünde kalınlaşma meydana getiren ve kondroosteoid benzeyen yeni kemik oluşumu saptanmıştır. Periosttaki öncü hücreler osteoblast ve kondroblastlara değişme yeteneği taşırlar. Bazen mezensimal stem hücre kondroid ve osteoid arasında bir ara form geliştirebilir. Kondroosteoid olarak adlandırılan bu genç doku sonuçta matür kıkırdak veya matür kemik olarak gelişir. Ayrıca bu genç doku içinde odaksal olarak woven kemik varlığı yeni kemik yapımındaki hızlanmanın işaretidir (21).

30. gün örneklerinde doğal mercanın büyük oranda rezorbe olduğu izlenmekle birlikte incelenen örneklerde yer yer saptadığımız ve havers kanallarından farklı yapıdaki boşluklar henüz rezorbe olmamış ve demineralizasyon sırasında tamamen uzaklaşmış doğal mercan parçacıklarını düşündürmektedir. Çeşitli kemik defektlerine yerleştirilen doğal mercanın hızla vaskülarize olduğu, bir yandan rezorbe olurken diğer yandan yerini yeni oluşan kemiğe bıraktığı ve yeni kemik formasyonunun 6. haftada histolojik olarak izlendiği bildirilmiştir (10). Guillemine ve arkadaşları (8) da osteoblastik aktivitenin 6-7. haftalarda başladığını, aynı sürede implant osteoklastik aktiviteyle rezorbe olmaya başladığını kaydetmişlerdir. Doğal mercanın rezorpsiyon derecesi implantın hacmine bağlı olup büyük implant materyali kullanıldığında rezorpsiyon tam olarak oluşmamaktadır (3). Bezins ve Philliope (2) doğal mercanın rezorbe olmayan HA'ten üstün olduğunu, poröz yapıdaki doğal mercanın yeni oluşan kemikle yer değiştirdiğini ve böylece bir heterogreftin homogreft dönüşüğünü ileri sürmüşlerdir.

Sonuçlarımız inert bir materyal olan hidroksilapatitin kolla-gen ve glikosaminoglikan ile birleştirilmesinin yerleştirme kolaylığı dışında yeni kemik oluşumu ve doku reaksiyonlarında bir değişikliğe sebep olmadığını, doğal mercanın ise kemik oluşumunu stimüle etme ve rezorbe olarak yeni oluşan kemikle yer değiştirme özelliği nedeniyle kemik yükseltilmesi amacıyla tercih edilebileceğini düşündürmektedir.

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. Bell, R., Beirne, O.R. : Effect of hydroxylapatite, tricalciumphosphate, and collagen on the healing of defects in the rat mandible. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 46 : 589-594, 1988.
2. Bezins, T., Philippe, B. : Dysharmonies volumiques craniofaciales. Étude clinique et nouvelle approche thérapeutique : Les onlays sous-periostes mal-leables. *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, 33 : 183-189, 1988.
3. Brasnu, D., Roux, P., Loty, B., Laccourreye, H. : Corali: A new procedure for craniofacial reconstruction. *Annales Oto-Laryngologiques*, 105 : 431-433, 1988.
4. 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.
5. El Deeb, M. : Comparison of three methods of stabilization of particulate hydroxylapatite for augmentation of the mendibular ridge. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 46 : 758-766, 1988.
6. Gongioff, R.K., Montgomery, OK. : Experimental study of the use of collagen tubes for implantation of particulate hydroxylapatite. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 43 : 845-849, 1985.
7. Gongioff, R.K. : Use of collagen tube contained implants of particulate hydroxylapatite for ridge augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 46 : 641-647, 1988.
8. Guillemin, G., Patat, J.L., Fournie, «T, Chetail, M. : The use of coral as bone substitute. *J. Biomed. Mater. Res.*, 21 : 557-567, 1987.
9. Hatcher, J.E., Matukas, V.J. : Laboratory animal studies of apatite and collagen biomaterials. *J. Dent. Res.*, 65 : 347, 1986.
10. Issahakian, S., Quhayoun, J.P., Guillemin, G., Patat, J.L. : Le Corail madreporaire. *L'information Dentaire*, 24 : 2123-2132, 1987.
11. Ito, J., Yokoyama, M., Imamura, H. : Therapeutic embolization in the external carotid artery region. *Neurol. Surg.*, 8 : 1145-1147, 1980.
12. Jarcho, M. : Calcium phosohate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Ortop. Rel. Res.*, 157 : 259-278, 1981.
13. Jarcho, M. : Biomaterial aspects of calcium phosphates. Properties and applications. *Dental Clinics of North America*, 30 : 25-47, 1986.
14. Knapp, T.R., Kaplan, E.N. Daniels, J.R. : Injectable collagen for soft tissue augmentation. *Plast. Reconstr. Surg.*, 60 : 398-402, 1977.
15. Kramer, P.M., Cooperman, L., Michaeli, D. : The immunogenicity of injectable collagen : A 1-year prospective study. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 10 : 638-641, 1984.

16. Kramer, F.M., Churukian, M.M. : Clinical use of injectable collagen. Arch. Otolaryngol. 110 : 93-98, 1984.
17. Levent, Y., Guero, S., Guillemin. G., Jost. G. : Utilisation du corail en remplacement de greffes osseuses en chirurgie faciale, quatre ans de recul. Ann. Chir. Plast. Esthet., 33 : 279-282, 1988.
18. 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.
19. 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, 1989.
20. Minabe, M., Sugaya, A., Satou, H., Tamura, T., Ogawa, Y., Hori, T., Watanabe, Y. : Histological study of the hydroxyapatite-collagen complex implants in periodontal osseous defects in dogs. J. Periodontol., 59 : 671-678, 1988.
21. Mirra, J.M. : Bone tumors. Clinical, radiologic and pathologic correlations. Lea Febiger, Philadelphia, pp. 144-155, 1989.
22. Nagase, M., Chen, R., Asada Y., Nakajima, T, Radiographic and microscopic evaluation of subperiosteally implanted blocks of hydroxylapatite-gelatin mixture in rabbits. J. Oral Maxillofac. Surg., 47 : 40-45, 1989.
23. Neumann. P.M., Zur, B., Ehrenreich. Y. : Gelatin-based sprayable foam as skin substitute. J. Biomed. Mater. Res., 15 : 9-11, 1981.
24. 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, 1986.
25. Wittkamp, A.R.M. : Augmentation of the maxillary alveolar ridge with hydroxylapatite and fibrin glue. J. Oral Maxillofac. Surg., 46 : 1019-1021, 1988.