

HİDROKSİLAPATİT - KOLLAJEN (TIP I) - GLİKOZAMİNOGLİKAN (HAKG) KARIŞIMININ SIÇAN GLUTEAL KASI İÇİNDE ERKEN DÖNEMDE MEYDANA GETİRDİĞİ REAKSİYONLARIN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ

Hakan Özyuvacı* Namık Soydan** Aygen Ilıcalı*** Cüneyt Oral****

Yayın kuruluna teslim tarihi: 5. 10. 1993

ÖZET

Bu çalışma 20 adet 150-200 gr ağırlığında erkek wistar albino sıçanı üzerinde yapılmıştır. Sıçan gluteal adelesi içerisine yerleştirilen Hidroksilapatit - Kollajen (Tip I) - Glikozaminoglikan (HAKG) (Biosite®, Bioetica, Lyon, France) karışımının dokuda meydana getirdiği erken dönem reaksiyonları histolojik olarak incelenmiştir.

Sonuçta materyalin doku uyumunun çok iyi olduğu (Biyokompatibl) yumuşak doku içerisinde erken dönemde herhangi bir osteojen etki yapmadığı tesbit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Hidroksilapatit, kollajen (Tip I), glikozaminoglikan, kas doku reaksiyonu.

HISTOLOGIC INVESTIGATION OF EARLY STAGE REACTIONS OF HYDROXYLAPATITE - COLLAGEN (TYPE I) GLUKOZAMINO GLICAN (HACG) MIXTURE IN RAT GLUTEAL MUSCLE

ABSTRACT

20 male, 150-200 gr of weight Wistar albino rats were used in this study-Hydroxylapatite - Collagen (Type I) - Glucoseaminoglican (HACG) (Biosite®, Bioetica, Lyon, France) mixture was put in the rat gluteal muscle and looked through early stage of histologic changes in this tissue. Our results showed that, this mixture was highly biocompatible but not osteogenic in early stage of soft tissue healing.

Key words: Hydroxylapatite, collagen (Type I), glucoseaminoglican, tissue reaction in muscle.

GİRİŞ

Kemik dokusunda, hidroksilapatitin iyileşme üzerine olumlu yönde etkileri 1970'li yıllardan bu yana birçok araştırmalar yapılarak belirlenmiştir. Hidroksilapatit kemik yapımına yardımcı olan, kemik iyileşmesini hızlandıran (Osteokonduktif) ve doku ile uyumu olan (Biyokompatibl) bir biyoaktif materyaldir (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11). Hidroksilapatitin kemik yapımını başlatabilen, yumuşak dokular içinde osteojen etki gösteren bir materyal olmadığı, ancak böyle bir

özellik kazanabilmesi için kemiğin organik matrisinde bulunan bazı maddeler ile karıştırılarak uygulanmasının bu açıdan yararlı olabileceği ve maddenin kemik yapımını uyaran (Osteoinduktif) hale getirilebileceği belirtilmektedir (2,5,8,9). Biz bu araştırmada, Hidroksilapatit - Kollajen (Tip I) - Glikozaminoglikan (HAKG) karışımını sıçan gluteal adelesi içerisine yerleştirerek karışımın kas dokusu içindeki biyolojik etkilerini incelemeyi amaçladık.

* Arş. Gör. Dr. İ.Ü. Diş Hek. Fak. Ağız, Diş, Çene Hast. ve Cerrahisi Anabilim Dalı

** Prof. Dr. İ.Ü. Diş Hek. Fak. Temel Bilimler, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı

*** Prof. Dr. İ.Ü. Diş Hek. Fak. Ağız, Diş, Çene Hast. ve Cerrahisi Anabilim Dalı

**** Doç. Dr. İ.Ü. Diş Hek. Fak. Ağız, Diş, Çene Hast. ve Cerrahisi Anabilim Dalı

GEREÇ VE YÖNTEM

İnsitu olarak yapılan bu araştırmada 150-200 gr. ağırlığında 20 adet erkek wistar albino Sıçanı kullanılmıştır. Hayvanlar araştırma süresince şehir suyu ve İstanbul yem sanayi tarafından hazırlanan % 21 oranında protein içeren yemlerle beslenmişlerdir. Eter anestezisi altında sırt derileri traşlandıktan sonra 15 no bisturi ile ciltte 2 cm boyunda insizyon yapılmış ve kütü disseksiyon ile gluteal kasa ulaşılarak kas üzerinde 1 cm'lik yer açılıp içerisine hidroksilapatit-kollajen (Tip I) - Glikozaminoglikan (HAKG) (Biostite, Bioetica, Lyon, France) yerleştirilmiştir. Cilt altı 3/0 katgut ve cilt 3/0 ipek dikişler ile kapatılmıştır. Hayvanlar 4 gruba ayrılmıştır. Her bir grupta 5 er adet sıçan bulunmaktadır. Beşer sıçandan oluşan 4 grup 3,7,14 ve 21 günler de sakrifiye edilmiştir. Hazırlanan parafin bloklardan 7-10 mikron kalınlığında kesitler yapılmış, Hematoxylen-Eosin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda histolojik yönden incelenmişlerdir.

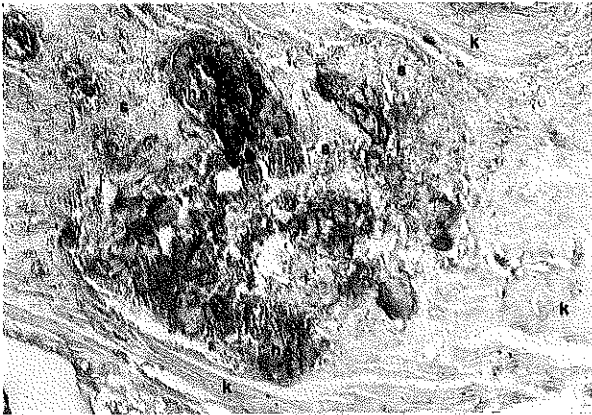
BULGULAR

Hazırlanan preparatların ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda;

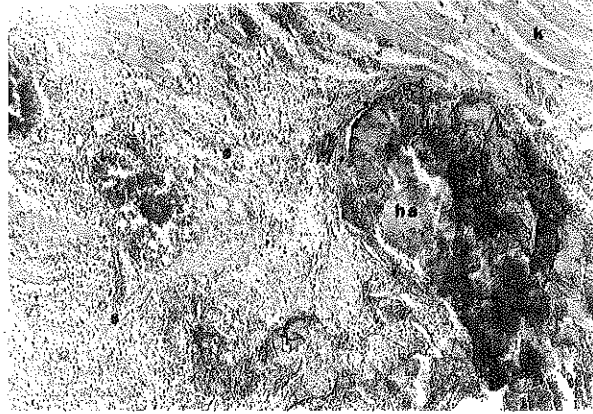
Üç günlük grup:

Kas dokusu içerisinde hidroksilapatit kristallerinin bütünlüklerini koruduğu, büyük kristal küme etrafında enkapsülasyon başlangıcı belirlenmiştir. Kristalleri saran spongios (kollajen) alanlar subakut iltihap dokusu ile infiltre olmuştur. Dokunun çok az vaskularize olduğu dikkati çekmiştir. Reaksiyonel dokunun spongios odaklar etrafında yoğunlaştığı, diğer alanların daha az hücre kapsadığı gözlenmiştir (Resim 1-2).

*Resim 1 : (HAKG) karışımının rat gluteal kasına yerleştirildikten üç gün sonraki görüntüsü (H.E x 40)
ha= Hidroksilapatit kristaller, s= spongios alanlar (kollajen Tip I), k= kas dokusu.*



*Resim 2 : H.E x 100, ha= Hidroksilapatit kristal, s= spongios bölge ve hücre infiltrasyonu, k= kas dokusu, *Enkapsülasyon*



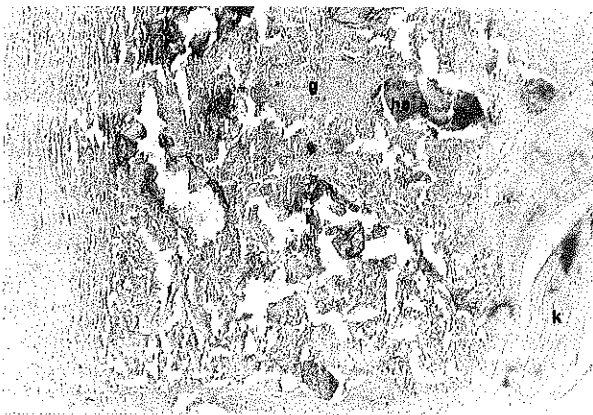
7 günlük grup :

Kas içine yerleştirilen maddenin spongios kısımları büyük ölçüde rezorbe olmuştur. Granülasyon dokusu ise daha fazla organize olmuştur. Fibröz alanlar artmıştır. (Resim 3-4).

14 günlük grup:

14. günde, yerleştirilen materyalin rezorbe olma sürecinin devam ettiği görülmüştür. Kas dokusu ile materyal arasındaki devamlılık fibröz bağ dokusu ile onarılmıştır. Parçalanmış ve kapsüllü kristal odakları arasında çok ufak spongios artıklar seçilebilmektedir. Granülasyon dokusu alanlarının çok daralmış olduğu görülmüştür. Yer yer kronik iltihap hücreleri ise düzensiz dağınık adacıklar şeklinde seçilebilmektedir (Resim 5-6).

*Resim 3 : (HAKG) karışımının Gluteal adale içerisine uygulandıktan 7 gün sonraki görüntüsü.
(H.E x 40) ha= Hidroksilapatit kristali, k= kas dokusu, g= granülasyon dokusu*



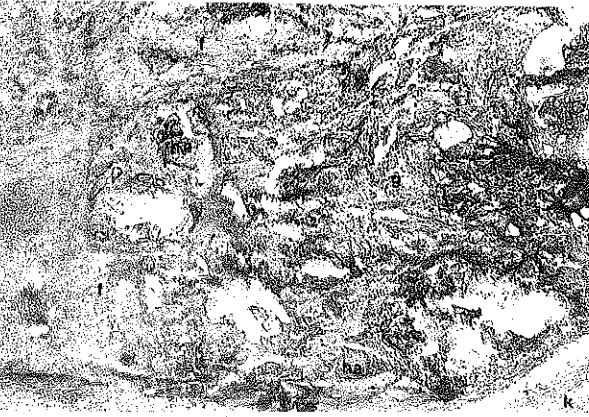
Resim 4 : H.E x 100 ha= Hidroksilapatit kristali k= kas doku, g= Granülasyon dokusu, f= fibröz doku.
Materyalin yerleştirilmesinden 7 gün sonra materyal ile kas doku arasındaki ilişki fibröz doku ile onarılmıştır.



Resim 5 : (HAKG) karışımının gluteal kas içine yerleştirilmesinden 14 gün sonraki görüntüsü H.E x 40, ha= Hidroksilapatit kristalleri, k= Kas doku, g= Granülasyon dokusu, f= Fibröz doku alanları



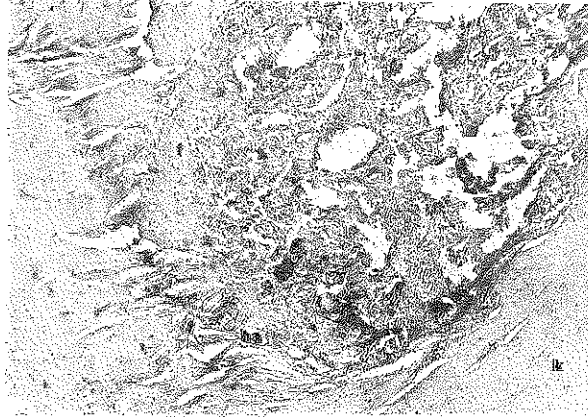
Resim 6 : H.E x 100 ha= Hidroksilapatit kristalleri, f= Fibröz doku, k= Kas doku, g= Granülasyon dokusu, Materyalin rezorpsiyonunun ilerlemiş olduğu, kas doku ile materyalin arasında fibröz bağ dokusu karakterinde bir onarım olduğu görülmektedir.



21 günlük grup:

21. günde yerleştirilen materyalin rezorpsiyonunun henüz tamamlanmadığı görülmüştür. Materyali saran dokuda mononükleer hücre sayısı azalmış, fibröz doku alanları artmıştır ki, bu da kas dokudaki normal iyileşme biçimidir. Kristaller etrafında histiositlere benzer iri hücreler gözlenmiştir. Materyal ile kas doku arasındaki sınırdaki yer yer fibröz, yer yer ise granülasyon dokusu görünümü veren organize bir doku ayırd edilmektedir (Resim 7-8-9).

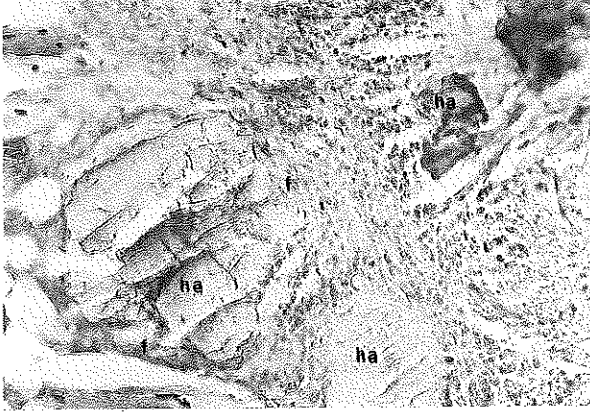
Resim 7 : H.E x 40, Materyalin kas doku içersine yerleştirildikten 21 gün sonraki görüntüsü, ha= Hidroksilapatit kristalleri, f= Fibröz doku, k= Kas doku



Resim 8 : H.E x 100, ha= Hidroksilapatit kristalleri, f= Fibröz doku, 21. günde fibröz dokunun arttığı görülmektedir. Kristaller çevresinde fibröz doku oluşumu belirgindir. Spongios bölgelerde granülatöz görünüm varlığını sürdürmektedir.



Resim 9 : H.E x 200, ha= Hidroksilapatit kristali, f= Fibröz doku, Kristaller ile yakın ilişki içerisinde bulunan hücre yoğunluğu azalmıştır.



Sonuç olarak; bütün gruplardan elde edilen kesitlerin histolojik incelenmesinde, kas doku içerisindeki HAKG karışımının herhangi bir ossifikasyonu uyarmadığı, yani materyalin osteoindüktif olmadığını belirledik. Kas doku içerisine yerleştirilen bu materyalin kas dokudaki iyileşme sürecini bozmadığı ve materyalin doku dostu, dokuya uyumlu (Biyokompatibl) bir materyal olduğunu saptadık. Öte yandan fibröz onarımında Hidroksilapatit kristallerinin çevresinde spongios alanlara oranla daha erken olduğunu tesbit ettik.

TARTIŞMA

Hidroksilapatitle ilgili olarak birçok araştırma yapılmış ve bu araştırmalar sonucunda maddenin dokular ile tam bir uyum içerisinde olduğu belirtilmiştir. Maddenin kemik yapımını destekleyen (Osteokonduktif) özellikte olduğu saptanmıştır (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11). Hidroksilapatitin saf olarak kullanılmasına oranla kemiğin organik matrisinde bulunan bazı yapılarla birlikte kullanılmasının iyileşme üzerine etkisinin daha fazla olacağı bildirilmiştir (2,5,8,9,10). Bazı araştırmacılar, Hidroksilapatitin böyle karışım şeklinde kullanıldığı zaman yumuşak dokuda bile kemik yapımını sağlayabileceğini düşünmüşler ve araştırmışlardır (1,9).

Misiek D.J. ve arkadaşları 1984 yılında yaptıkları çalışmalarında Hidroksilapatitin farklı yüzey özelliğine sahip tiplerini cilt altına yerleştirmişler ve sonuçta materyalin dokular ile tam bir uyum halinde olduğunu bildirmişlerdir (7). Biz de, araştırmamızın sonucunda kullandığımız maddenin doku ile tam bir uyum içinde olduğunu saptadık.

Frame J.W. 1987 yılında yayınladığı makalesinde Hidroksilapatitin tek başına osteogenezi başlatmayacağı ancak otogen kemik tozu ile karıştırılarak uygulandığı da osteogenezi başlatabileceğini belirtmiştir (2). Çalışmamız sonunda biz kas doku içinde kullandığımız karışımın osteogenezi başlatmadığını, kemiğin organik matrisindeki bazı maddelerin bir etki göstermediğini saptadık.

Yücel E. ve arkadaşları 1988 yılında yayınladıkları araştırmalarında Hidroksilapatit ve Hidroksilapatit Kollajen karışımını deri altına implante etmişler ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Materyalin her iki tipte de doku uyumlu olduğunu iyileşme süreci içinde sadece Hidroksilapatit kollajen karışımı yerleştirilen alanlarda Hidroksilapatit yerleştirilen alanlara oranla enflamasyonun daha uzun sürdüğünü belirtmişlerdir. Araştırmada, herhangi bir osteogen etkiden bahsedilmemektedir (11). Biz de yaptığımız çalışma sonucunda, kullanılan karışımın doku uyumlu olduğunu, iyileşmenin bu dönemde herhangi bir osteogen etki göstermediğini ve enflamasyonun spongios alanlarda H.A. kristalleri etrafındaki alanlara oranla daha geç dağıldığını tesbit ettik.

El Deeb M. ve arkadaşları 1990 yılında yaptıkları çalışmalarında diabetik ve diabetik olmayan sıçanlarda cilt altına yerleştirilen hidroksilapatit kollajen karışımının dokuda herhangi bir olumsuz reaksiyon yaratmadığını doku dostu olduğunu saptamışlardır. Materyalin cilt altında osteogenez yapmadığı ancak distrofik mineralizasyonun görüldüğünü bildirmişlerdir (1). Biz ise, yaptığımız çalışmada kas doku içerisinde herhangi bir kalsifiye alana rastlamadık.

Klinge B. ve arkadaşları 1992 yılında yayınladıkları çalışmalarında hidroksilapatitin kemik grefti ile birlikte uygulanmasının daha olumlu sonuçlar verebileceğini bu yönde araştırmalar yapılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Bir başka çalışmamızda; Hidroksilapatitin Kollajen ve glikozaminoglikanla birlikte uygulandığında saf hidroksilapatite oranla kemiğe daha fazla direnç kazandırdığını, iyileşmenin erken döneminde saf hidroksilapatitin daha fazla kemik yapımı sağladığını ancak ileri dönemde kemik yapımının gerilediğini aksine karışım uygulandığında kalıcı bir kemik yapımı oluştuğunu tesbit ettik. Hidroksilapatitin kollajen gibi kemik organik matrisinde bulunan proteinlerle uygulamasının daha uygun olacağını saptadık (8). Bu çalışmanın sonucunda ise kas doku içine yerleştirilen karışımın osteogenezi uyarmadığı tesbit edildi.

Serre C.M. ve arkadaşları 1993 yılında yayınladıkları primer osteoblast kültürü çalışmalarında sade-

ce kollajen Tip I yine sadece Hidroksilapatit ve HAKG karşılaştırmışlar ve en iyi osteogen matris oluşumunu karışımın sağladığını tesbit etmişlerdir (9). Biz çalışmamızda, aynı karışımı kullanarak olası osteogen etkisini kas dokusu içinde araştırdık ve sonuçta erken dönemde böyle bir etkiye rastlamadık.

Sonuç olarak; HAKG karışımının doku dostu olduğunu ancak bu sürede fibröz dokuda herhangi bir osteogenez başlatmadığını tesbit ettik. Bu etkisinin daha uzun sürelerde araştırılması gerektiği kanısına vardık.

KAYNAKLAR

1. 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* 1990; **19**: 113-9.
2. Frame, J.W: Hydroxylapatite as a biomaterial for alveolar ridge augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1987; **16**: 642-55.
3. Hahn E, Sonis S, Gallagher G, Atwood D: preservation of the alveolar ridge with hydroxylapatite-Collagen implants in rats. *J Prosthet Dent* 1988; **60**: 729-734.
4. Harwey W.K, Pincock J.L, Matukas J.J, Lemons J.E: Evaluation of a subcutaneously implanted Hydroxylapatite-Avitene mixture in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 1985; **43**: 277.
5. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J: Osseous Response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skullbone defects. *J Oral Maxillofac surg* 1992; **50**: 241-249.
6. Mehlisch RD: Collagen/hydroxylapatite implant for augmenting deficient alveolar ridges-A 24-month clinical and histologic summary. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; **68**: 505-16.
7. Mısıek DJ, Kent JN, Crr RF: Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes. *J Oral Maxillofac surg* 1984; **42**: 150-160.
8. Özyuvacı H: Hidroksilapatit yerleştirilmesinden sonra kemik yapısındaki biyomekanik ve histolojik değişikliklerin deneysel incelenmesi - Doktora tezi 1992.
9. Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Boivin G: In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxylapatite - an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. *Biomaterials* 1993; **14**: 97-106.
10. White E, Shors EC: Biomaterial Aspects of Interpore-200 porous Hydroxylapatite. *Dental clinics of North America* 1986; **30**: 49-67.
11. Yücel E, Delilbaşı E, Delilbaşı L, Alpaslan G, Yamalık MK: Deri altına implante edilen hidroksilapatit-Avitene karışımının etkilerinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi. *A Ü Diş Hek Fak Der.*1988; **15**: 137-41.

Yazışma adresi

Arş. Gör. Dr. Hakan Özyuvacı
İ. Ü. Dişhekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Hastalıkları ve
Cerrahisi A.B.D.
34390 Çapa - İstanbul