

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SENTETİK VE ALLOJEN GREFT MATERYALLERİ
UYGULANAN KRİTİK BOYUT KEMİK DEFECTLERİNDE
SİSTEMİK VE LOKAL SİMVASTATİN
UYGULAMASININ KARŞILAŞTIRILMALI OLARAK İNCELENMESİ***

DOKTORA TEZİ

Dt. Onur DOKSÖZ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ferhan YAMAN

AĞIZ-DİŞ-ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
DİYARBAKIR

2013

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

“Sentetik ve allojen greft materyalleri uygulanan kritik boyut kemik defektlerinde sistemik ve lokal simvastatin uygulamasının karşılaştırılmalı olarak incelenmesi.” isimli Doktora Tezi 14.01.2014 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı :Doç.Dr.Ferhan YAMAN
Tezi Teslim Eden :Dt.Onur DOKSÖZ

Jüri Üyesinin

	Ünvanı	Adı Soyadı	
Başkan	:Profesör	Beyza Kaya	
Üye	:Profesör	Rezzan Güner	
Üye	:Doçent	Mutan Hamdi ARAS	
Üye	:Doçent	Ferhan YAMAN	
Üye	:Yrd.Doçent	Ela Tules FIRAT	

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

14.01.2014

Prof. Dr. Salih HOŞOĞLU
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması **Dicle Üniversitesi Araştırma Proje Koordinatörlüğü** tarafından desteklenmiştir (Proje No: 12-DH-82).

TEŞEKKÜRLER

Başta doktora eğitimimin ilk yıllarında danışmanlığımı yapan, derin bir sevgi ve saygı duyduğum hocam Prof. Dr. Behçet Erol'a,

Doktora eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen ayrıca tez çalışma konumun belirlenmesi aşamasında bana çok yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. Ferhan Yaman'a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Rezzan Güner'e ve Doç. Dr. Serhat S. Atılğan'a

Tezimin histolojik incelemelerini yapan hocam Prof. Dr. Yusuf Nergis'e,

Tezimin immunohistokimyasal incelemeleri yapan, bana çalışmamın birçok aşamasında yol gösteren ve değerli fikirlerini, deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Selçuk Tunik'e,

Tez çalışmama kaynak sağlayan Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ve deneysel çalışmaların yapıldığı DÜSAM'a,

Sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen hayatımın her anında yanımda olan annem Serap Doksöz, babam Necip Doksöz, kardeşlerim Anıl Doksöz ve Akın Doksöz'e ve bana ailem kadar yakın olan sevgili arkadaşım Gül Küsmen'e

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

KAPAK	
TEŞEKKÜRLER	II
İÇİNDEKİLER	III
TABLolar VE GRAFİKLER	IV
RESİMLER	V
ŞEKİLLER	VI
KISALTMALAR	VII
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	26
BULGULAR	33
TARTISMA	51
SONUÇLAR	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLÖLAR VE GRAFİKLER

Tablo 1: İmmunohistokimyasal skörlama metodu

Tablo 2: ONC immünoaktivitesi için istatistiksel değler $p < 0,05$

Tablo 3: OPN immünoaktivitesi için istatistiksel değler $p < 0,05$

Grafik 1: ONC immunoaktivitesinin grafikte değlendirilmesi

Grafik 2: ONC immunoaktivitesinin grafikte değlendirilmesi

RESİMLER

Resim 1: Kemik doku.

Resim 2: Kemik hücreleri.

Resim 3: Kompakt ve kansellöz kemik görünümü.

Resim 4: Endosteum ve periosteum.

Resim 5: Cerrahi prensiplere uygun olarak hazırlanmış operasyon bölgesi.

Resim 6: İnsizyonu takiben frontal kemiğin görünümü.

Resim 7: Trephan frezle oluşturulan kemik defekti.

Resim 8: Defekt bölgesine uygulanan kemik grefti görüntüsü.

Resim 9: Bölgenin sütüre edilmiş postoperatif görüntüsü.

Resim 10: Etrafında sağlam kemik dokusuyla çıkarılan defekt alanı.

ŞEKİLLER

Şekil 1: Kontrol grubunun histolojik görüntüsü.

Şekil 2: Kontrol grubunun histolojik görüntüsü.

Şekil 3: Sistemik simvastatin ve sentetik greft grubunun histolojik görüntüsü

Şekil 4: Sistemik simvastatin ve sentetik greft grubunun histolojik görüntüsü

Şekil 5: Sistemik simvastatin ve allojen greft grubunun histolojik görüntüsü

Şekil 6: Sistemik simvastatin ve allojen greft grubunun histolojik görüntüsü

Şekil 7: Lokal simvastatin ve sentetik greft grubunun histolojik görüntüsü

Şekil 8: Lokal simvastatin ve sentetik greft grubunun histolojik görüntüsü

Şekil 9: Lokal simvastatin ve allojen greft grubunun histolojik görüntüsü

Şekil 10: Lokal simvastatin ve allojen greft grubunun histolojik görüntüsü

Şekil 11: Kontrol grubu, osteopontin immünreaktivitesi.

Şekil 12: Sentetik greft ve sistemik simvastatin uygulanan grup, osteopontin immünreaktivitesi.

Şekil 13: Allojen greft ve sistemik simvastatin uygulanan grup, osteopontin immünreaktivitesi.

Şekil 14: Sentetik greft ve lokal simvastatin uygulanan grup, osteopontin immünreaktivitesi.

Şekil 15: Allojen greft ve lokal simvastatin uygulanan grup, osteopontin immünreaktivitesi.

Şekil 16: Kontrol grubu, osteonektin immünreaktivitesi.

Şekil 17: Sentetik greft ve sistemik simvastatin uygulanan grup, osteonektin immünreaktivitesi.

Şekil 18: Allojen greft ve sistemik simvastatin uygulanan grup, osteonektin immünreaktivitesi.

Şekil 19: Sentetik greft ve lokal simvastatin uygulanan grup, osteonektin immünreaktivitesi.

Şekil 20: Allojen greft ve lokal simvastatin uygulanan grup, osteonektin immünreaktivitesi.

KISALTMALAR

- ALP:** Alkalen Fosfataz
BMP: Kemik Morfogenetik Protein
cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat
CBFA-1 Core Binding Factor-a 1
COX-2: Siklooksijenaz-2
CYP450: Sitokrom P 450
CYR-61: Cysteine-Rich Protein 61
eNOS: Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz
HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoptotein
HA: Hidroksiapatit
HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A
GGPP: Geranilgeranil Pirofosfat
LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
NSAİ: Non Steroid Antienflamatuvar
NLN-Tİ: N-acetyl cysteine yüklü Titanyum
OPN: Osteopontin
ONC: Osteonektin
PDLLA: Poly-d,L-lactide
PI3K: Fosfatidilinozitol-3 Kinaz
RAB: Monomeric G Protein
RAL: Small GTPase Recombinant Proteins
RAS: Onkogen Protein
RUNX 2: Runt Transkripsiyon Faktörü
SMAD: Sma and Mad related proteins
TGF: Değiştirici Büyüme Faktörü
TCP: Trikalsiyum Fosfat
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

Statinler, serum kolesterol seviyesini düşürmek için kullanılan, ilaçlardır. Statin grubu ilaçlardan simvastatinin lipofilik yapısı nedeniyle kemiğe etkisinin daha fazla olması, antienflamatuar etki gösterme, osteoklast oluşumunda azalma, kemik oluşumunda artma gibi etkiler gösterdiği yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur.

Bu bilgiler ışığında sentetik ve allojen greft materyalleri uygulanan kritik boyut kemik defektlerinde sistemik ve lokal simvastatin uygulamasının etkisini karşılaştırılmalı olarak incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda, 50 adet Sprague Dawley cinsi erkek ratlar kullanılmıştır ve deney hayvanları n=10 olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubunda oluşturulan kalvaryum defekti hiçbir uygulama yapılmadan sütüre edilirken diğer iki grupta sistemik simvastatin uygulaması sentetik ve allojen greftlerle ayrı ayrı kombine edilerek defekt bölgesine uygulandı. Son iki grupta da lokal simvastatin sentetik ve allojen greftlerle ayrı ayrı kombine edilerek defekt bölgesine uygulandı.

30 gün sonunda deney hayvanları histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmek üzere kurban edildi.

Lokal simvastatin uygulanan gruplardaki yeni kemik oluşumunun sistemik simvastatin uygulanan gruplardan daha iyi olduğunu ve lokal simvastatin ile sentetik greftin kombine uygulandığı grubun yeni kemik oluşumunda en etkili grup olduğu yapılan histolojik ve immünohistokimyasal incelemelerle ortaya konmuştur.

Simvastatinin optimum dozda, doğru uygulama yöntemleriyle, ideal bir taşıyıcıyla birlikte kullanımının kemik iyileşmesine katkıda bulunduğu ancak bu konuda daha fazla deneysel araştırmanın yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Sentetik Greft, Allojen Greft, Sistemik ve Lokal Uygulama, Simvastatin

SUMMARY

Statins are a class of drugs used to lower serum cholesterol levels. Indeed, recent studies indicate that some of the cholesterol-independent or “pleiotropic” effects of statins involve enhancing the bone formation and angiogenesis, decreasing osteoclast formation, having anti-inflammatory features because of lipophilic structure of simvastatin.

We aim to examine critical sized bone defects applied synthetic and allogeneic graft materials and the effect of local simvastatin use comparatively in line with this information.

In our research, 50 male Sprague Dawley rats are used and these experimental animals are divided into 5 groups as $n=10$. Calvarium defect is sutured without any implantation in the control group whereas the systematic simvastatin implantation is applied to defect section in two other groups with synthetic and allogeneic grafts combined separately. The same procedure is applied to the last two groups. After 30 days, experimental animals are sacrificed for the purpose of being examined histologically and immuohistochemically.

Immunohistological and histological studies indicate that new bone formation in groups applied simvastatin locally is better than the groups applied simvastatin systematically, and the group which is applied combined local simvastatin and synthetic grafts is the most effective group in new bone formation.

It is required that further research should be conducted for the purpose of seeking the proper usage of simvastatin with the optimal dosage and the implantation methods with an ideal carrier.

Key words: Synthetic graft, allogeneic graft, Systematic and local application, Simvastatin.

GİRİŞ VE AMAÇ

Diş hekimliğinde ve diğer tıp alanlarında kemik defektlerinin tedavisi ile ilgili çalışmalar literatürde önemli ve geniş bir yer kaplamaktadır. Oral ve maksillofasiyal cerrahide travma, kistler, tümörler, enfeksiyonlar veya konjenital anomaliler sebebiyle kemik dokusunda sıklıkla defektler meydana gelebilmektedir.

Klinikte maksillofasiyal cerrahi işlemler sonrasında, kemik defektlerinde oluşan fibrozisin kemik kavitelerinde düzgün ve istenilen şekilde iyileşmeyi engellediği bilinmektedir.

Organizmanın hayatı boyunca kendiliğinden tam olarak kemiksel iyileşme ile kapanması mümkün olmayan defektleri, kritik boyut kemik defekti olarak tanımlanmaktadır. Kendiliğinden kapanması mümkün olmayan defektlerde tedavi için otojen greft uygulanması altın standart olarak kabul edilmektedir, fakat bu yöntemde bazı vakalarda verici alan yetersizliği gibi sorunlarla karşılaşılabilir.

Yetersiz kemik alanlarında veya çeşitli sebeplerle meydana gelmiş kemik defektlerinde rekonstrüksiyon amaçlı cerrahi yöntemler uygulanmaktadır. Kemik greftleriyle yapılan ogmentasyonlar dışında yönlendirilmiş doku rejenerasyonları, distraksiyon osteogenezi gibi yöntemler de sayılabilir.

Günümüzde araştırmacılar kritik boyutta kemik defekti iyileşmesini sağlamak amacıyla, büyüme ve farklılaşma faktörlerini yaptıkları çalışmalarda defekt bölgesine lokal olarak uygulamış ve bu uygulamaların defekt iyileşmesi üzerinde pozitif etkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca NSAİİ-selektif COX-2 inhibitörleri, florokinolon, steroidler, kemoterapotikler, bifosfonatlar, statinler gibi ilaçların da kemik iyileşme sürecinde etkili olabilmesi farmakolojik ajanların kemik defektlerinin iyileşmesi ile ilgili çalışmalarda sıkça kullanılmasının yolunu açmıştır.

Mevcut kolesterol düşürücü ilaçların en güçlü grubunu oluşturan statinler, kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağında 3-hidroksi- 3-metil glutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz enzimini geri dönüşümlü olarak inhibe ederek karaciğerde kolesterol sentezini azaltırlar. Spesifik etkisi dışında statinlerin gösterdiği yararlı veya zararlı bazı etkilerden söz edilebilir, bu etkilerin tümüne birden **pleiotropik** etki denir.

Anjiogenezde artma, antienflamatuar özellik gösterme, osteoklast oluşumunda azalma, kemik oluşumunda artma, tümör hücrelerinin gelişimini ve yaygınlaşmasını engelleme, koroner arter hastalığı riskinde azalma gibi çeşitli yararlı etkileri vardır.

Statin grubu ilaçların bir üyesi olan simvastatinin, özellikle lipofilik olması nedeniyle kemiğe etkisinin daha fazla olabileceği ifade edilmiştir. Çalışmalarda özellikle lokal olarak uygulanan simvastatinin kemik gelişiminde statinler arasında en etkili ilaç olduğu belirtilmiştir (1-4).

Literatürde ilk kez Mundy ve arkadaşları (5) 1999 yılında, statin grubu bir ilaç olan simvastatini 5 gün boyunca günde 3 kez olmak üzere, kalvaryuma toplam 15 subkutanöz enjeksiyon olacak şekilde uygulamış ve 21 gün sonra kemik kalınlığında %30-50 oranında artış olduğu bulmuşlardır. Çalışmada BMP -2 ve VEGF enjeksiyonuyla da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Missana ve arkadaşları (6), 2001 yılında farelerin tibiasında kritik boyutta oluşturulan kemik defektlerinde simvastatinin etkisini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında, 40 erkek farenin kortikal tibia kemiğine 6 mm longitudinal defekt açmışlardır. Deney grubuna 10 mg/kg simvastatini 5 gün boyunca intraperitoneal olarak enjekte etmişler, kontrol grubuna ise simvastatin uygulamamışlardır. Radyografik ve histolojik değerlendirme sonucunda kontrol grubunda ilk hafta yeni kemik oluşumu saptamamış fakat 2, 3 ve 6. haftada değişen miktarlarda kemik kalınlığı saptamışlardır. Deney grubunda ise ilk hafta yeni kemik oluşumu gözlemlemişlerdir; ancak 2, 3 ve 6 haftalarda yeni oluşan kemik miktarını kontrol grubuna benzer bulmuşlardır.

Kılıçoğlu ve arkadaşları (7) 24 adet sıçan üzerinde lokal uygulanan simvastatinin normal kemik dokusunda yaptığı değişiklikleri değerlendirdikleri çalışmalarında simvastatini dimetilsülfoksit içerisinde eritip, günlük 1 mg dozda, sıçanların bacağına enjekte etmişlerdir. 7, 14. ve 21. günlerdeki değerlendirme sonucunda kılcal damarlar gelişiminde belirgin artış, kemik öncü hücrelerinde çoğalma, farklılaşmada artış ve yeni osteoid doku oluşumu izlemişlerdir.

Wong ve Rabie (8) yaptıkları çalışmada; simvastatin ile greftlenmiş kemik defektlerinde, greftlemeden sonraki 3. günde vasküler endotelial büyüme faktörü, 4.

günde kemik morfogenetik proteini-2 salındığını ve 5. günde de yeni kemik oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Wong ve Rabie (8) statinler kullanılarak elde edilen iyileşme modelinin direk olarak kemik morfogenetik proteini kullanılarak elde edilen iyileşme modeli ile benzer olduğunu belirtmişlerdir.

Simvastatinin farklı doz ve taşıyıcılar ile sistemik ve lokal olarak uygulanarak değerlendirildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır. Ancak kritik boyut kemik defektlerinde lokal ve sistemik etkilerinin incelenmesi üzerine yapılmış çalışmalar literatürde yetersizdir.

Çalışmamızda; lokal ve sistemik olarak uygulanan simvastatini, ratlarda oluşturulan kritik boyut kemik defektlerinde, sentetik ve allojen kemik greftleriyle birlikte kullanarak, kemik rejenerasyonunda meydana gelen etkileri histolojik ve immüno-histokimyasal yöntemlerle değerlendirmek amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

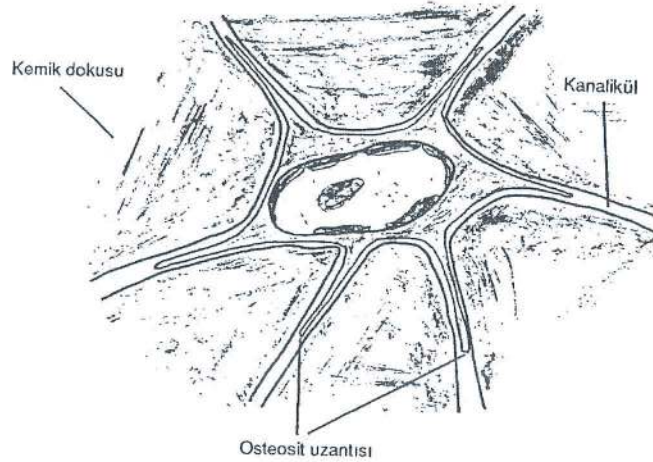
KEMİK DOKUSU

Organizmadaki diğer bağ dokularında olduğu gibi kemik dokusu da hücreler, lifler ve temel maddeden oluşmuş ancak yapısındaki kalsiyumdan ötürü sertleşmiş bir destek dokusudur. Tüm dayanıklılığı ve sertliğine rağmen, bireyin ömrü boyunca yıkılıp yeniden yapılan canlı ve dinamik bir yapıdır ayrıca cerrahi müdahalelerle şekli değiştirilebilen tek dokudur.

Kaslarla beraber vücut hareketini sağlar. Sertliğinden dolayı hayati önemi olan organların korumasını üstlenmiştir. Kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içerir ve vücudun kalsiyum deposudur.

Kemik doku organik ve inorganik komponentlerden yapılmıştır ve kemiğin kompakt ve spongiyöz olmak üzere makroskopik olarak iki ayrı formu vardır (9-14).

Mikroskopik olarak incelenen kemik dokusunda ise hücreler ve hücreler arasında bulunan kemik matriksi olmak üzere iki temel yapı söz konusudur (15).



Resim 1: Kemik doku

Kemik Matriksi

Organik ve inorganik yapılardan meydana gelir. Bu yapıların birbiri ile uyumu kemiğin organizmadaki gerekli işlevlerini tam olarak yerine getirebilmesi açısından çok önemlidir.

Kemik ağırlığının yaklaşık %10-30'u sudur. %60-70'ini meydana getiren inorganik yapı yüksek oranda kalsiyum ve fosfatın meydana getirdiği hidroksiapatit kristalleri olmak üzere az miktarda magnezyum, sodyum, potasyum ve sitrattan meydana gelmiştir. İnorganik yapı kemik dokusunun direncinde ve sertliğinde önemli rol oynar ayrıca hemostaz için gerekli mineralleri sağlar (16-18).

Organik yapı ise kemik ağırlığının %30-40'ını meydana getirir. Büyük bölümü tip-1 kollajen liflerden, protein, glikozaminoglikanlardan oluşan temel maddeden yapılmıştır (19, 20).

KEMİK HÜCRELERİ

Kemik dokusunda 4 tip hücre ayırt edilir:

- Osteoprogenitör hücre
- Osteoblast
- Osteosit
- Osteoklast

Osteoprogenitör Hücreler

Kemiğin ana hücreleri olup mezanşimden kaynaklanırlar. Genellikle soluk boyanan nükleuslu, asidofilik sitoplazmalı hücreler olup endosteumda, periosteumun iç katında ve Havers kanalları gibi bölgelerde bulunurlar.

Osteoprogenitor hücreler mitozla olgun kemik hücrelerine farklılaşmaktadırlar. Bu hücreler kemik büyümesinde, zedelenmesi veya kırık tamirinde aktif hale gelerek bölünürler ve osteoblast hücrelerine dönüşürler (21-23).

Osteoblastlar

Kemik dokusunda matriksin yapımında sorumlu olan bu hücreler, kübik ya da alçak prizmatik boylu hücrelerden yapılmıştır. Nükleusları iri, golgi ve endoplazmik

retikulumları iyi gelişmiştir. Hücreler birbirleriyle kısa çıkıntılarla ilişkidir. Osteoblastlar kökenlerini osteoprogenitör hücrelerden alırlar (19).

Kemik yapıcı hücreler olan osteoblastlar; osteoid dokuyu, kemik matriksini oluşturan tip 1 kollogeni, glikoproteinleri ve ostaokalsin, ostaonektin, osteopontin gibi bazı proteinleri salgırlar. Alkalen fosfataz aktiviteleri yüksektir. Bu enzim hem matriks oluşumunda hem de kalsifikasyonda rol alan önemli bir enzimdir. Görevlerini tamamladıklarında osteositlere dönüşürler (16, 18).

Osteositler

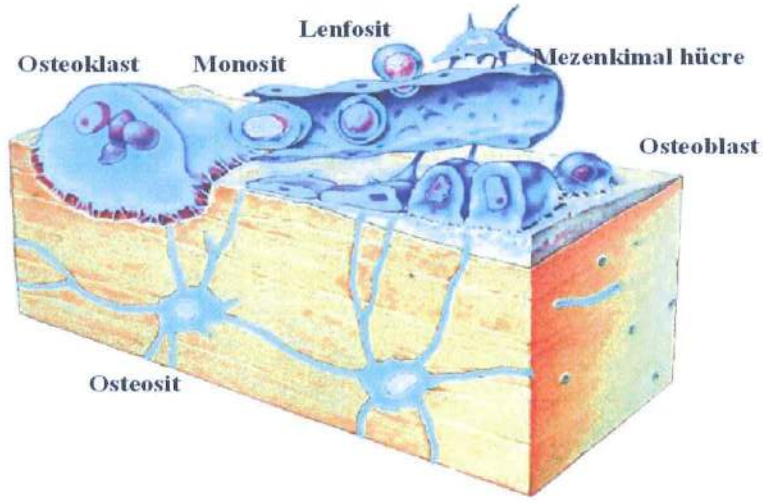
Lakünaların içine yerleşmiş olgun kemik hücreleri olan osteositler kemiğin esas hücreleridir. En belirgin özellikleri stoplazmik uzantıları aracılığıyla birbirleri ile iletişim halinde olmalarıdır. Bu şekilde kemik içinde madde transferi sağlanır ve canlı hücre olma özelliği taşırlar.

Osteositlerin kalsiyumun kemiklerden kana verilmesinde ve hemostatik mekanizmayı düzenleme (kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyerek) gibi önemli metabolik rolleri de vardır. Kemik matriksinin devamlılığı için aktif rol oynarlar. Fonksiyonlarını kaybettiklerinde ise kemik rezorbsiyonu başlar (16, 17, 24).

Osteoklastlar

Howship lakünaları adı verilen çukurlarda yer alan osteoklastlar, çok büyük, ciddi hareket kabiliyetine sahip, çok çekirdekli hücrelerdir. Stoplazmaları asidiktir. Osteoklastların içinde çok çeşitli enzimler bulunur. Bu hücreler kökenini kandan alan monositlerin birleşmesi sonucu oluşturdukları mononükleer fagositik sistemin içinde yer almaktadırlar (16, 24).

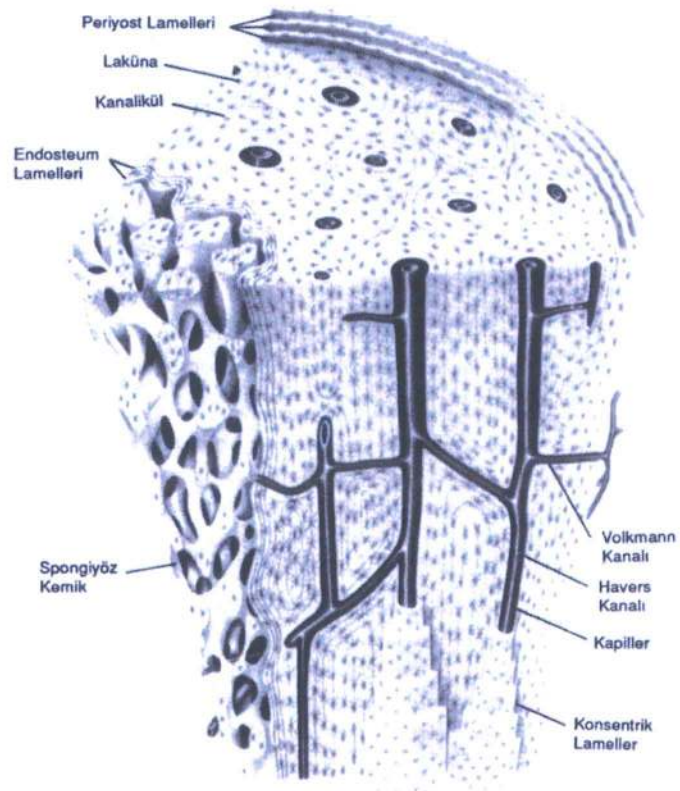
Osteoklastlar salgıladıkları asit fosfataz ile kemiğin mineral matriksini yıkar, lizozomal enzimler aracılığı ile de kollojen ve diğer organik matriks yapıları sindirerek, rezorbsiyonu gerçekleştirirler (24, 25). Ayrıca bu hücreler kalsiyumun kana geçişi ve vücut sıvılarında kalsiyum miktarının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (21, 26-28).



Resim 2: Kemik hücreleri.

Kemik dokusu makroskopik olarak incelendiğinde ise iki yapı göze çarpar;

I-Kompakt (kortikal) kemik II-Spongioz (kansellöz) kemik



Resim 3: Kompakt ve kansellöz kemik görünümü.

Kompakt Kemik Dokusu ve Yapısı

Düzgün, homojen, boşluk içermeyen sert bir yapıya sahip olan kompakt kemiğin mikroskopik olarak incelendiğinde havers kanalları etrafında lamellerden, hücrelerden ve sert bir matriksten oluştuğu görülür. İçinde ise osteositler yerleşmiştir. Kompakt kemikte bulunan kanaliküller her bir lamelde birçok sayıda olduğundan ait olduğu havers sisteminin en içinden en dış lameline kadar temas kurarlar, böylece metabolizmanın olaylanmasını sağlarlar.

Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda diffüzyon olanağı olmadığından kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere kadar ulaşır.

Havers kanalıyla onun etrafındaki lamellerin tümüne birden osteon adı verilir. Bir Havers kanalı yan dallarla kemik iliği ve periyosteumla bağlantı kurar. Bu yan dallara Wolkman Kanalları adı verilir. Haversian kanal sistemleri kemiğin uzun eksenine paralel olarak dizilmişlerdir. Wolkman kanalları ise osteonların kemik dış yüzeyi ve birbirleriyle iletişimini sağlar ve kemik yüzeyine dik seyreder.

Dokunun incelenmesinde lamel sistemi şöyle sınıflandırılır:

- a. Havers Lamelleri
- b. Periyostun altında dış esas lameller
- c. Endosteum etrafındaki iç esas lameller
- d. Osteonların arasındaki ara lameller.

Kortikal kemikler iskeletin büyük bir bölümünü kaplarlar. Daha çok uzun kemiklerin gövde bölümlerinde, yassı kemiklerin iç ve dış tabakalarında bulunurlar. Kuvvetlere karşı direnç göstererek organların korunmasında görev alırlar (16, 17).

Kemiklerde iç ve dış yüzleri saran bağ dokusundan zarsı katmanlar vardır. Bunlardan dıştaki periosteum içteki ise endosteumdur (22).

Periosteum

Eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği dıştan çevreler. Periosteumun; kemiğe desteklik yapmasında, beslenmesinde, gelişiminde ve tamir olaylarında büyük önemi

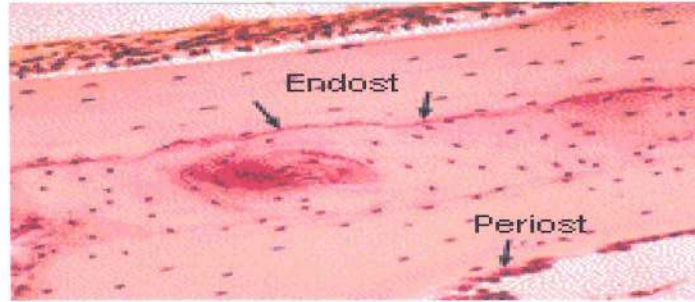
vardır. Yapısında kollajen ve elastik lifler bulunur. Ayrıca Sharpey lifleri adı verilen kollajenler de matriks içine doğru ilerleyerek periyosteumu kemiğe bağlamaktadır.

İki tabakası vardır; dış tabaka sıkı bağ dokusu yapısındadır, kollojen ve elastiklerden meydana gelir. Metabolizmada yer alan damarlar ve lenfleri içerir. İç tabakası hücre açısından çok zengindir, bu hücreler normal şartlarda aktif değilken kemik yaralanmasında osteoblast haline dönüşerek yeni kemik dokuyu yapar ve o bölgeyi onarırlar (16, 22).

Endosteum

Bu tabaka kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemlerini çevreleyen ince bir retiküler bağ dokusudur ve periyosteumdan incedir. Bu tabakanın hem kemik doku hem de hemopoetik (kan hücresi yapımı) hücreleri yapabilme özelliği vardır.

Çok önemli roller üstlenen bağ dokusunun bu iki tabakasının bozulması ve zedelenmesi durumunda kemik için hayati önemi olan fonksiyonlar olumsuz etkilenebilir (16, 22).



Resim 4: Endosteum ve periosteum.

Spongioz (Kansellöz) Kemik Dokusu ve Yapısı

Kompakt kemiğe form olarak benzeyen trabeküler kemik histolojik olarak incelendiğinde sirküler lamel tertiplenmesinin olmadığı görülür. Buna karşılık bol boşluklu adeta petek gibi bir dokusu vardır, bu boşluklar kemik iliği ile doludur.

Özellikle uzun kemiklerin epifizindeki spongiyöz doku basıncın veya kuvvetin geldiği yönde düzenlenmiştir. Böylece yapı çok daha sağlam bir hale gelmektedir. Toplam kemik hacminin % 20'i trabeküler kemikten meydana gelir.

Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ile yassı kemiklerin iç yüzlerinde bulunur (9-13).

KEMİK OLUŞUMU

Bağ dokusunun katılımıyla intramembranöz kıkırdak dokusunun katılımıyla encondral olmak üzere iki tür kemikleşme vardır. İlk oluşan kemik primer yani olgunlaşmamış kemik olup zamanla yerini olgunlaşmış kemiğe bırakır.

İntramembranöz Kemik Oluşumu

Frontal, pariyetal, temporal kemikte, pelvis ve sternumda ayrıca simfiz ve koronoid çıkıntı dışındaki mandibulanın diğer kısımlarında görülür (16, 17, 29).

Kemiğin gelişimi şu şekilde olur; mezenşim hücreleri damarlar etrafında toplanırlar ve çoğalırlar. Bu hücreler osteoblastlara dönüşebilen hücrelerdir. Bu hücreler hücrelerarası madde ve lif sentezini de yaparak osteositlere farklılaşırlar. Damar çevresindeki osteoblastların osteositlere dönüşerek boşalttıkları yerlere arkadan yeni hücrelerin gelmesiyle olayda devamlılık sağlamaktadır. Trabeküller büyür, çoğalır ve anastomozlaşarak spongiyöz kemik dokusu şekillenmiş olur.

Kemik oluşumuna katılmayan bağ dokusu kısımları ise periosteum ve endosteumu meydana getirir (9-11, 13, 18, 30).

Kondral Kemik Oluşumu

Hyalin kıkırdak hücreleriyle meydana gelen bu kemikleşmeden organizmanın uzun ve bazı kısa kemikleri oluşur. Perikondral ve encondral olmak üzere iki tiptir.

Kıkırdak yüzeyindeki mezenşim kaynaklı hücreler osteoblastlara dönüşerek bu bölgede tabakalaşma yaparlar ve ara maddeyi salgılayarak osteosit haline dönüşürler. Bu olayı kalsifikasyon izler. Sonuçta ise diyafizin ortasında ve daha sonra da uçlara doğru gelişen ve kıkırdağı çevreleyen bir perikondral kemik dokusu ortaya çıkar. Kemikleşme tamamlandıktan sonra perikondrium periyosteum adını almaktadır. Bu kemik kompakt yapıdadır ve bu yolla kemiğin enine büyümesi sağlanır.

Enkondral kemikleşmede ise kırıkta hücreleri görev alır. Uzun kemiklerin şekillenmesi bu yolla olur. Kırıkta hücrelerinin özellikle uzun kemiklerin diyafiz bölgesinde değişimleri söz konusudur (12-14).

İntramebranöz ve kondral kemikleşmede önce primer ve bunu takibinde sekonder kemik oluşur. Kemiğin yapımı ve yıkımı azalarak ta olsa hayat boyu devam eder (16).

KEMİK İYİLEŞME SÜRECİ

Kemik skar dokusu oluşturmaz ve yeniden yapılanmayla iyileşir.

Kemik iyileşmesinin 3 dönemi vardır ve bu dönemler kırık kemikte meydana gelen süreçle benzerdir.

- 1- Yangı (Enflamasyon) Evresi
- 2- Onarım (Reperasyon) evresi
- 3- Yeniden şekillenme (Remodeling) evresi (31).

Yangı (Enflamasyon) Evresi (1-4 gün):

Tüm doku travmalarında, dolayısıyla kırıklarda, ilk verilen yanıt enflamasyondur. Travmayı takiben periyost ve çevre yumuşak dokular yırtılarak, damarlar yaralanır. Kan ve lenf sıvısı bu bölgede toplanmaya başlar. Bu sıvı birikerek periyostu kaldırır. Kanamanın durmasını ve pıhtılaşmayı sağlamak için trombosit ve trombotik faktörlerin toplanmasıyla moleküler aracılar yaralanma bölgesine salınır. Kanamanın pıhtılaşması ile hematoma oluşumu gözlenir. Bu kan pıhtısı kırık kenarları çevresinde ve ilik içinde kallus oluşması için kalıp oluşturur.

Kırık hematoma onarım hücrelerinin gücünü kolaylaştıracak fibrinden bir yapı iskeleti sağlamaktadır. Ayrıca hematoma ortamındaki trombositler ve hücrelerden büyüme faktörü ve diğer proteinler salınır. Bunlar, kırık onarımında yeri olan hücre göçünde, periyostal hücre çoğalmasında ve onarım dokusu matriksinin sentezinde araçlardır.

İlk 24 saat içinde ödem oluşur. Polimorf çekirdekli lökositler, monosit ve lenfositleri içeren akut yangı hücreleri, ödemli bölgeye doğru göç ederler.

Kemik dokuda nekroz bölgesi oluşur. Kırık ve çevre dokudan prostoglandinlerin salınımı yanısıra nekrotik materyalin varlığı akut yangının başlatılmasında önemli rol almıştır. Hematom 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur. Fibrin ağından da kemik yapımı için hücre çoğalması başlar. Bu dönemde fibrin matriksi içindeki öncü hücreler, lokal biyolojik etkilerle değişik dokuları oluşturmak için farklılaşmaya hazırdır (31-33).

Onarım (Reperasyon) Evresi (2-40 gün):

Onarım evresi iyileşmenin en önemli kısmıdır. İlk basamağı hematomun organize olmasıdır. Lokal aracılı mekanizmalarla hassaslaşan öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, hücreler arası madde, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmaya ve düzenlenmeye başlar. Hücresel aktivitenin başlaması için gerekli uyarım karmaşıktır. Kimyasal, elektriksel ve mekanik faktörler söz konusudur.

Onarım mekanizmasında rol oynayan hücreler mezanşimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip hücrelerdir. Bu hücreler farklılaşmaya başladığında, ilk değişikliğe uğrayan hücreler, kılcal damarlarla hematom içine giren "fibroblastlar"dır. Fibroblastlar kollajen sentezlerken, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoidi salgırlar. Damarsal beslenmenin iyi olduğu bölgelerde hücreler osteoblastlara dönüşerek trabekülleri oluştururken, beslenmenin yetersiz olduğu bölgelerde hücreler kondroblast ve kondrosite dönüşerek kırık dokuyu oluşturur. İlk 7- 12 günün sonrasında yumuşak kallus kitlesi, fibröz doku ve kırıktan oluşmuştur ve kırık sahasını çevreler. Osteoidin mineralizasyonu, sert kallusun oluşumu ve yapısal stabilite için gereklidir.

Osteoklastlarla meydana gelen geri emilim (rezorpsiyon) boşluklarını osteoblastlar sararak canlı kemik gelişmesini sağlarlar. Neticede nekrotik bölgenin tümü canlı kemikle yer değiştirir.

Kallus oluşumu, yetişkinlerde çocuktan ve kompakt kemikte trabeküler kemikten daha yavaş meydana gelir. Yaralanmadan sonra kallus oluşması ve mineralizasyonu 4-16 hafta arasında zaman gerektirir. Kallus oluşumuyla beraber kaynamanın oluştuğu söylenebilir. Bununla beraber, kaynama henüz son noktasına ulaşmış değildir, onarım evresinin ortasında, kallusun gereksiz ve etkisiz kısımlarının

geri emilimi ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzanması ile yeniden şekillenme evresi (remodeling) başlar (30, 32, 34, 35).

Yeniden Şekillenme (Remodeling) Evresi (25-100)

Kemiğin şekillenmesi en uzun evre olup, aylar yıllar sürebilir. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümüdür. Onarım evresinin ortasında başlayıp, normalde insanlarda 4-16 hafta sürerken, yıllar boyunca da devam edebilir.

Yeniden şekillenme evresinde 4 olay gerçekleşir:

1- Kalsifiye kırıkta, osteoid dokuyla değişerek bir çeşit birincil trabeküler doku oluşur.

2- Lameller kemik bu dokunun yerini alır.

3- Kompakt kemik uçlarındaki kallus, lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşur.

4- İlik kanalı dereceli olarak yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus, osteoklastlar tarafından geri emilir ve boşluklar yeniden düzenlenir (30, 31, 34).

KEMİK GREFTLERİ

Malformasyon, enfeksiyon, travma veya onkolojik bir rezeksiyon sebebiyle oluşan oral ve maksillofasiyal bölgedeki kemik defektlerinin yapısal ve fonksiyonel rekonstrüksiyon problemi henüz tatmin edici bir şekilde çözüm bulamamış olup modern cerrahinin en zor uğraşlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüze dek birçok kemik grefti materyali klinik ve laboratuvar aşamalarında denenmiş, bir bölümü rutin uygulamaya konulmuştur (36-40).

Dünyada en çok yapılan doku nakillerinden biri kemik grefti uygulamasıdır (41, 42).

Kemik grefti uygulamaları oral cerrahide osteogenezi sağlamak, kırıkları takiben rekonstrüksiyon yapılırken, kemiğe kuvvet ilave etmek gerektiğinde ve konturları düzeltmek amacıyla kullanılmaktadır (43).

Kemik greftlerinin biyolojik uyumluluk, osteokondüktif veya osteogenik olmak, toksik olmamak, kolay steril edilmek, enfeksiyona dirençli olmak, defektte stabilite ve destek oluşturmak, kolay elde edilebilir ve saklanabilir olmak gibi özelliklere sahip olması gerekir (44, 45).

Kemik grefti materyallerinin kemik oluşumunu sağlayan 3 mekanizması vardır. Bunlar; osteogenez, osteoindüksiyon, osteokondüksiyondur.

Osteogenez: Kemik grefti içinde bulunan osteoblastlar canlıdır ve kemik oluşturma kapasitesine sahiptirler. Bu karaktere sahip tek kemik grefti otojen kemiktir.

Osteoindüksiyon: Graft içinde bulunan sinyal proteinleri uygulanan bölgedeki kemikte bulunan farklılaşmamış mezenkim hücrelerini dönüştürerek kemik oluşumunu sağlarlar. Farklı insandan alınan allogreftler en yaygın kullanılan osteoindüktiflerdir (23).

Osteokondüksiyon: Kemik veya mezenkimal kök hücrelerinin varlığında greft materyalinin rezorbe olarak yeni kemik oluşumuna uygun ortam sağlamasıdır (21, 45).

Kemik Graftlerinin Sınıflaması

- A-** Kemik Kaynaklı Biomateryaller
 - a- Otojen kemik grefti (Otograft) (Kortikal, Kansellöz, Kortikal ve Kansellöz)
 - b- Homojen kemik grefti (İzograft, Allograft)
 - c- Heterojen kemik grefti (Ksenograft)
- B-** Kemik Esaslı olmayan Biomateryaller
 - a- Doku kaynaklılar
 - b- Metaller
 - c- Jelatin film
 - d- Polimerler
 - e- Kalsiyum sülfat
 - f- Kalsiyum karbonat
 - d- Kalsiyum fosfat

Otojen Kemik Grefti:

Otojen greftin osteojenik hücreler bulundurması ve immünolojik reaksiyona sebep olmaması grefti en avantajlı greft materyali yapmaktadır. Verici bölgede ikinci bir operasyona ihtiyaç olması, uzun süreli postoperatif ağrı ve hareket kısıtlılığı görülebilmesi bu grubun dezavantajlarıdır.

Otojen kemik greftleri kortikal ve kansellöz kemik yapısında olabilir. Bu greftler değişik bölgelerden değişik formlarda elde edilebilirler. Bu bölgeler ağız içinde mandibulanın semfiz ve korpus bölgesi ve maksillanın tuber bölgesidir. Ağız dışında ise iliak ve kalvarial kemik, fibula ve kostalardır (20).

Kortikal greftler, form sağlayıp, dayanıklı ve sert bir yapı oluştururken, osteogenezisi artırıcı yetenekleri yoktur.(46)

Kansellöz kemik ve kemik iliğinin primer avantajı, belirgin şekilde osteogenezisi artırma yetenekleridir. Bu yetenekleri, osteojeniteyi indükleme kapasitelerinin olması kadar, osteoblastlara dönüşebilen canlı hücrelere sahip olmalarına bağlıdır. Bu greftlerin bilinen tek dezavantajı; mekanik sağlamlığı sağlayamamalarıdır (46).

Allogreftler:

Bir kişiden alınıp bir başka kişide kullanılmak üzere toplanan kemik greftleridir. Bir seri işleme tabi tutularak bankalarda saklanır. Çeşitli sebeplerle oluşan kemik defektlerinde sıkça kullanılırlar.

Hazır bulunmaları ve donöre ihtiyaç duyulmaması en önemli avantajlarıyken hazırlama işleminin materyalin yoğunluğunu ve osteojenik potansiyelini azaltması, donör kişide enfeksiyon veya bulaşıcı hastalık bulunma riski önemli dezavantajlarıdır.

Dondurulmuş, dondurulmuş kurutulmuş, demineralize dondurulmuş kurutulmuş, ıslanmış kemik gibi çeşitleri vardır (46-49).

Xenogreftler:

İnsan dışında farklı bir türden elde edilen greftlerdir. Osteojenik potansiyele sahip olmamalarına rağmen kemik oluşumu için matriks meydana getirmektedir.

İşlemler sonrasında organik kısmı elemine edilir ve greft steril edilse de, immünolojik komplikasyonlardan dolayı insanda kullanımı yaygın değildir.

Oral ve maksillofasiyal cerrahide kemik detektlerinde, greft gerektiren çeşitli osteotomilerde ve kimi zaman da kemik greftleriyle karıştırılarak kullanılmaktadır (51-54).

Alloplastlar:

Hayvanlardan elde edilen canlılığını yitirmiş, organik ve inorganik materyaller ve sentetik materyallerdir. Sentetik materyal olarak; seramik hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat ve çeşitli materyaller sayılabilir.

Allogreftler; poroz yapıları içinde progenitor hücrelerin ve endotelial hücrelerin bulunduğu birçok kimyasal alan içerirler. Aynı zamanda, osteoklastlar tarafından rezorbe edildiklerinde serbest kalan kemik matriks içinde büyüme faktörleri de içerirler.

Allogreft kemikte, osteoindüktif özellik taşıyan az miktarda kemik morfojenik proteini de bulunur. Demineralizasyon, allogreft kemik matriksindeki büyüme faktörlerinin biyoyararlanımını artırır. Ayrıca demineralizasyon ile HIV enfeksiyonu geçmesi de önlenmiş olur (55).

Alloplastik materyaller maksillofasiyal cerrahide TME rekonstrüksiyonunda, mandibular, maksiller, zigomatik augmentasyonlarda kullanılan önemli bir greft çeşididir.

Kolay uygulanması, büyüklük ve biçim çeşitliliği, donör sahaya ihtiyaç duyulmaması önemli avantajlarıdır. Yabancı vücut ve inflamasyon reaksiyonları, inflamasyon alanında kemiğin rezorbe olması gibi dezavantajları vardır (56-58).

Trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatit bu gruptaki önemli materyallerdir. Hidroksiapatit kemiğin mineral komponenti olarak bulunduktan sonra, dental, maksillofasiyal ve ortopedik cerrahide kemik greft materyali olarak geliştirilmeye başlanmıştır.

Seramik kemik implantı olarak klinik ve deneysel çalışmalarda en çok kullanılan materyal olan hidroksiapatitin; blok, granül, non-pöröz, pöröz, rezorbe olabilen ve rezorbe olmayan tipleri vardır (59-60).

HA; alveolar kenar augmentasyonu için blok ve parçalı formlarda, çekim sonrası alveolar kenar rezorbsiyonunu önlemek için gömülü kök formunda ve ortognatik ve kraniofasiyal uygulamalarda yer tutucu olarak kullanılabilir. Kalsiyum fosfat implant materyallerinin en temel kısıtlılığı biyomekanik özelliğindedir. Birçok seramikler gibi bu materyaller kolay kırılabilen ve düşük sıkıştırılma rezistansına sahip materyallerdir. Kalsiyum fosfat biyomateryalleri lokal veya sistemik toksitesi, inflamatuvar veya yabancı cisim reaksiyonu olmayan ve direk olarak kemik üzerine fiks edildiğinde kemik ile implant arasında fibröz dokunun oluşmadığı materyallerdir. Kemik oluşumunu indüklemese de sert doku gelişimine uygun oldukları bilinmektedir (27).

TCP; HA'ya benzese de kemik doğal bileşenlerinden değildir. Bir kısmı vücutta HA'ya dönüşür. TCP kristal yapıda bir biyomateryaldir. Mekanik olarak son derece kırılğan, düşük direnç ve gerilim kuvveti ile karakterizedir. Lokal veya sistemik toksiteye, yabancı cisim reaksiyonuna karşı koyarak, kemik ile implant arasında bağlanarak adeta doğal kemik yapıştırıcı görevini yapar (27).

KEMİK İYİLEŞMESİ VE İLAÇLAR

Mineraller ve vitaminler; Vit-A, B, C, D, kalsiyum, fosfor, çinko gibi mineraller kemik iyileşmesini pozitif yönde etkiler. Vit-A ve Vit-D hipervitaminozu kemik iyileşmesini geciktirir. Hormonlar ve enzimler kemik iyileşmesini hızlandırır. Kronik enfeksiyonlar, anemi, denervasyon, raşitizm, radyasyon, antikoagülanlar, hiperbarik oksijen (uzun süreli) kırık iyileşmesini negatif etkiler. Büyüme faktörleri: insülin benzeri büyüme faktör-I, II, fibroblast büyüme faktör, epidermal büyüme faktörü, kemik morfojenik protein gibi faktörler kemik iyileşmesini olumlu yönde etkiler.

Kemik iyileşmesi birçok faktörün etkili olduğu karmaşık bir süreçtir. Biyolojik, biyokimyasal, mekanik ve klinik birçok faktör rol oynar.

NSAİİ-selektif COX-2 inhibitörleri, florokinolon, steroidler, kemoterapotikler (tek doz doksorubisin), bifosfonatlar, statinler gibi ilaçlar da kemik iyileşme sürecinde etkili olabilmektedir.

Literatüre bakıldığında ilaçların kemik iyileşmesi üzerine etkileri ile ilgili birçok çalışma yapıldığı görülmektedir.

Histing ve arkadaşları (61) fareler üzerinde 2 ve 5 haftalık kapalı femur fraktürleri oluşturarak bu bölgelere sildenafil uygulamışlar ve fraktür modellerini radyolojik biyomekanik, histomorfometrik, biyokimyasal protein analizleriyle incelemişler. Sildenafil tedavisinin kemik formasyonunu artırarak kemik iyileşmesini hızlandığı, bunun da muhtemel olarak CYR-61 yoluyla gerçekleştiğini göstermişlerdir.

N-acetyl cysteine yüklü nanotüp titanyum implantlarının (NLN-Ti) potansiyel bir ilaç iletim sistemi olarak incelendiği çalışmada, Hee-Lee ve arkadaşları (62) NLN-Ti implantların kemik osteointegrasyonunu arttırdığını ortaya koyan sonuçlara ulaşmışlardır.

Yaman ve arkadaşları (63), deneysel hayvan modellerinde kemik defekti iyileşmesine sildenafil sitratın etkisini araştıran bir çalışma yapmışlardır. 41 adet rat kullanılan çalışmada iki grup oluşturularak sonuçlar histolojik ve radyolojik olarak incelenmiştir. İnflamatuvar ve tamir fazlarında gruplar arasında istatistiksel olarak belirgin farklılıklar tespit etmişler ve sildenafil kullanılan grupta kemik iyileşmesinin daha ileri olduğunu belirtmişlerdir.

Bir implantın PDLLA ile (poly-d,L-lactide) kaplandığında serbest bırakacağı zoledronik asidin osteoblastlar üzerine pozitif, osteoklastlar üzerine negatif etkiler gösterirken, kemik iyileşmesini hızlandığı göz önünde bulundurularak; Back ve arkadaşları (64) farklı dozda zoledronik asit uygulanan implantların osteointegrasyonu üzerine bir çalışma planlamışlar. İ.V. uygulanan zoledronik asidin PDLLA'ya oranla daha güçlü kemik fiksasyonu sağlaması dışında, biyomekanik ve histolojik analizlere göre gruplar arasında osteointegrasyon artışıyla ilgili belirgin bir fark bulamamışlardır.

Güney ve arkadaşları (65) rat femur fraktür modeli kullanarak ankaferd kanama durdurucu ajanın kemik iyileşmesi üzerine etkisini inceledikleri çalışmada, kanama kontrolü dışında fraktür iyileşmesi anlamında herhangi pozitif bir etki gözlemlenmemişlerdir.

NSAİİ ve COX-2 inhibitörlerinin yumuşak doku ve kemik iyileşmesine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmanın sonucunda kısa dönemde düşük doz NSAİİ ve COX-2 İnhibitörlerinin yumuşak doku iyileşmesine belirgin bir etkisinin olmadığı buna karşın bu ilaçların kemik iyileşmesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir (66).

Diyabetik olmayan ratlarda lokal insülin uygulamalarının femur fraktürlerinin iyileşmesini hızlandırıcı etkisi olup olmadığını araştırdıkları çalışmanın sonucunda lokal olarak uygulanan insülinin kemik fraktürlerinin tedavisinde potansiyel tedavi edici ajan oldukları gözlemlenmiştir.(67)

Statinlerin kemikteki biyolojik etkilerini ilk defa 1999'da Mundy ve arkadaşları in vitro ortamda osteogenezisi stimüle ettiğini göstererek bildirmişlerdir (5). O günden beri statinler üzerine literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Biz de çalışmamızda statin grubu ilaçlardan olan simvastatinin pleiotropik etkilerinden özellikle kemik üzerine olanları çeşitli greft materyalleriyle kombine ederek araştırdık.

STATİNLER

Koroner arter hastalığı dünyada önde gelen mortalite ve morbidite nedenidir. Koroner arter hastalıklarının gelişmesindeki temel nedenlerin başında ateroskleroz gelmektedir. Ateroskleroz oluşumu birçok faktöre bağlı olmakla birlikte, artmış serum kolesterol düzeyleri ile aterosklerotik hastalıklar arasında güçlü bir ilişki bulunduğu yapılan birçok epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir.

Kolesterol yüksekliği bulunan hastaların tedavisinde, diyet ve yaşam tarzı değişiklikleri önemli bir yer tutar. Ancak hedeflenen kolesterol seviyesine ulaşılamamakta ve tedaviye farmakolojik ajanların eklenmesi çoğu zaman gerekli olmaktadır (68, 69).

Statinler mevcut kolesterol düşürücü ilaçların en güçlü grubunu oluştururlar. Statinler, kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamağında 3-hidroksi- 3-metil glutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz enzimini geri dönüşümlü olarak inhibe ederek karaciğerde kolesterol sentezini azaltırlar.

Ayrıca düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol'ün karaciğerde reseptör aracılı endositozunu arttırarak plazma LDL kolesterolünü düşürür. Statinlerin, LDL kolesterol düşürücü etkileriyle birlikte, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol yükseltici ve trigliserid düşürücü etkileri bulunmaktadır. Tedavi ile doz bağımlı olarak yaklaşık LDL % 20-50 düşerken, HDL düzeyinde % 10 artış ve trigliserid degerinde %10-40 oranında düşüş sağlanmaktadır.

Statinlerin kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi azaltıcı etkileri birçok primer ve sekonder korunma çalışmasında gösterilmiştir. Genellikle bu etkiler lipid düşürücü etkiye bağlansa da, yapılmış olan bu çalışmaların alt grup analizlerinde lipid düşürücü etkilerinden bağımsız olan direkt kardiyoprotektif etkileri olduğu düşünülmektedir. Statinlerin bu etkilerine ise genel olarak pleotropik etki denilmektedir (4, 70-72).

Statinlerin Pleiotropik Etkileri

Spesifik etkisi dışında statinlerin gösterdiği yararlı veya zararlı bazı etkilerden sözedilebilir, bu etkilerin tümüne birden pleiotropik etki denir.

Statinler serum kolestrol düşüşünden bağımsız olarak çeşitli pleiotropik etkiler ile endotel fonksiyonlarını, plak stabilizasyonunu, trombosit işlevlerini iyileştirdiği ve vasküler inflamasyonu azalttığı düşünülmektedir. Bu etkilerin çoğunda statinlerin izoprenoid sentezi üzerindeki inhibitör etkisinin rol oynadığı belirtilmektedir. Statinler, gerek serum kolesterol seviyesini azaltarak gerekse pleotropik etkileri ile kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin azaltılmasında etkili olabilen önemli ilaç sınıfını oluşturmaktadırlar (4, 71, 73).

Statinlerin anjiogeneizde artma, antienflamatuar özellik gösterme, osteoklast oluşumunda azalma, kemik oluşumunda artma, tümör hücrelerinin gelişimini ve yaygınlaşmasını engelleme, koroner arter hastalığı riskinde azalma gibi çeşitli pleiotropik etkileri vardır (74, 75).

Doğal statinler; mevastatin, lovastatin, simvastatin, pravastatin, sentetik olanlar; atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve cerivastatindir.

Statinler lipofilik (simvastatin, cerivastatin, fluvastatin ve atorvastatin) ve hidrofilik (pravastatin ve rosuvastatin) olmak üzere ikiye ayrılır. Lipofilik statinler kolaylıkla hücre membranını geçerken hidrofilik statinler hücre membranını geçmek için özel taşıyıcıya ihtiyaç duyarlar. Statinlerin yapısı, yarılanma ömrü ve güçleri farklıdır (75, 76).

Statin grubu ilaçların bir üyesi olan simvastatinin de özellikle lipofilik olması nedeniyle kemiğe etkisinin daha fazla olabileceği ifade edilmiştir (74, 77, 78). İn vivo çalışmalarda özellikle lokal olarak uygulandığında simvastatinin, kemik

gelişiminde statinler arasında en etkili ilaç olduğu belirtilmiştir (78-80). Simvastatinin farklı doz ve taşıyıcılar ile sistemik, lokal ve enjeksiyon gibi değişen şekillerde uygulanarak değerlendirildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır (79, 81-83).

Statinlerin Yan Etkileri

Kolesterol düşürücü ilaçlar arasında klinik etkisinin yüksek yan etkisinin az olması statinlerin avantajlarıdır, ancak yine de bu ilaç grubu önemli yan etkilere sahiptir.

En önemli yan etkiler miyopati, hepatoksisitedir. Serum transaminazlarda artışlar uzun kullanımlarda görülen bir yan etkidir bu nedenle tedavi başlangıcında ve sonrasında düzenli karaciğer fonksiyon testi yapılmalıdır. En yaygın olarak mide bağırsak tahrişine bağlı diyare, bulantı, kusma, mide krampları görülebilir. Baş ağrısı, halsizlik, uyku düzensizliği görülebilir (84, 85).

Statinlerin Kemik Üzerine Etkisi

Trabeküler kemik yapısındaki değişimi düzeltmek ve kemik kitlesini artırmak için anabolik ajanlar diğer bir tedavi seçeneğidir. Anabolik ajan olarak paratiroid hormon, florid ve büyüme hormonları kullanılır (76).

Statinlerin kemikteki biyolojik etkilerini ilk defa 1999'da Mundy ve arkadaşları (5) in vitro ortamda osteogenezi stimüle ettiğini göstererek, bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda simvastatinin minerilazasyon, alkalen fosfataz aktivitesi, osteoblast fonksiyonunu gösteren tip 1 kollojen ve osteokalsin sentezini arttırırlar. Yapılan birçok çalışmada da kemik metabolizması üzerinde anabolik etkisi olan BMP-2 aktivitesinin statinler tarafından arttırıldığı belirtilmiştir.

Kolesterol sentez yolunda oluşan izoprenoidler geranilgeranil pirofosfat (GGPP) ve farnesil pirofosfattır (FPP). Bu izoprenoidler heterotrimeric G proteinleri, küçük G proteinleri ve Rho, Rap, Rab veya Ral gibi Ras benzeri proteinlerin translayon sonrası modifikasyonunda rol alırlar. Statinler bu izoprenoidlerin oluşumlarını bloke eder. İzoprenoidlerin statinler tarafından bloke edilmesiyle BMP-2 aktivitesinde artış olur (76, 86, 87).

Lipofilik statinlerden bazıları (simvastatin, atorvastatin) proteinlerin prenilasyonunu azaltarak kolesterol sentez yolundaki fosfatidilinozitol-3 kinaz (PI3K) yolu aracılığıyla eNOS'u aktive edip epifizlerde büyümeyi sağlayan VEGF'nin ekspresyonunu artırır. Bu lipofilik statinler VEGF-mRNA ekspresyonunu arttırmak suretiyle tip I kollagen ve ALP artışına yol açtığı bulunmuştur. Bir büyüme faktörü olan VEGF'nin kemikleşme ve kemik döngüsünü arttırdığı tespit edilmiştir (77, 89).

Statinler Hmg-KoA redüktaz enzimini bloke ederek osteoklast aktivitesini baskılar (76, 87, 88).

Puliripotent mezenşimal hücrelerin osteoblast, adipozit, kondrosit ve miyozit gibi farklı hücrelere dönüşüm kapasiteleri vardır, statinlerin adipojenik farklılaşmayı inhibe edip transkripsiyon faktörü olan Runx2/Cbfa1'i aktive ederek osteoblastik farklılaşmayı arttırdığı görülmüştür (76, 90).

Simvastatin ve Etki Mekanizması

Simvastatin 2-metil butirilin yan zinciri olan 2,2 dimetil butiril grubunun yer değiştirmesi ile elde edilen lovastatin kimyasal modifikasyonudur. Simvastatin ağız yolu kullanım sonrasında karaciğerde bulunan hücre içi stokrom enzimi P450 tarafından aktif dihidroksi açık asid formuna dönüştürülen diaktif bir ilaçtır (91).

Simvastatinin osteoblastik aktiviteyi harekete geçirdiği, osteoklastik aktiviteyi ise önlediği rapor edilmiştir. Olayın mekanizmasını açıklayan birçok önerme mevcuttur.

Simvastatin TNF ile RAS-Rho mitojen aktiviteli protein kinaz yolunu antagonize ederek ve BMP-SMAD sinyalizasyonu çoğaltarak kemik morfogenetik proteinleri ile indüke edilen osteoblast farklılaşmasını desteklediği öngörülmüştür (92).

Simvastatinin gizli tümör nekroz faktörünü tersine çevirdiği ve BMP-2 inhibasyonunu önlediği gözlemlenmiştir (5).

Simvastatinin oral kullanımı sırasında osteoklast sayısında azalma tespit edilmiştir. Osteoblastlar ve ilik adipozitler, mezenkimal öncüllerden oluşmuşlardır ve adipojenez maddelerin osteoblast farklılaşmasını baskıladığı rapor edilmiştir (93).

Simvastatin tip-1 kollojen ve osteokalsin kemik sialoprotein ekspresyonunu yükseltirken, alkalın fosfatlamasını ve minerilizasyonunu da artırır. Bu durum simvastatinin interlökin 6 ve interlökin 8 üretimini düşürerek anti-inflamatuar etkiye sahip olduğunu gösterir (94).

Simvastatinin doza bağlı bir biçimde ortaya çıkan vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) stimüle ettiği rapor edilmiştir ve VEGF ekspresyonunu stimüle ederek oluşan kemik nodül formasyonunu ile osteoblast farklılaşmasını statinlerin harekete geçirdiği görülmüştür (95).

Statinlerin kemik iyileşmesi üzerine etkisini incelediğimiz araştırmamızı literatürde yapılmış olan çalışmalardan farklı bir boyuta taşıyarak sonuçları immünohistokimyasal olarak incelenmesi planlanmıştır.

Kemik doku iyileşme mekanizması incelenirken geleneksel histolojinin yetersiz kaldığı durumlarda biyokimyasal markırlar kullanılarak immünohistoloji ile daha fazla bilgi elde edilebilir.

Kemik çok sayıda madde ve faktörün katıldığı yapım ve yıkım işlemlerinin birbirini takip ettiği dinamik ve karmaşık bir dokudur. Kemiğin bu aktif durumunu yakından izleyebilmek için, yapım ve yıkım sırasında ortaya çıkan bir takım protein kaynaklı ürünlerin ve enzimlerin ölçümlerinde faydalanılır ve bunların tümüne kemiğin biyokimyasal markırları denir (96).

Kemik metabolizmasının biyokimyasal markırları, osteoblast ve osteoklastlardan salınan maddeler ile kemiğe özgü kollojen yıkım ürünleridir. Bu biyokimyasal markırlar kemiğin yapım ve yıkımının izlenmesinde kullanılmaktadır (97).

Bu markırların kemik tunover hızındaki anomalileri tespit etmekte kullanılan geleneksel tetkiklere göre çok daha fazla duyarlı oldukları bildirilmiştir (97).

Kemik döngüsüne ait biyokimyasal markırlardaki değişiklikler iskelet metabolizmasındaki değişiklikleri yansıtır.

Bu nedenle kemik patolojisi ve rejenerasyonunda kollojen, osteopontin, osteonektin ve osteokalsin gibi anahtar proteinlerin yapısındaki değişiklikleri değerlendirmek önemlidir (98, 99).

Osteokalsin

Osteoblastların sentezlediği organik matriks; tip 1 kollojenin yanı sıra kollojen yapıda olmayan başka proteinler içerir. Bunlardan biri osteokalsindir.

Osteokalsin 49 aminoasitten oluşan, 5,4 kda molekül ağırlığına sahip, kemiğin kalsiyum bağlayan bir proteinidir. Mineralize dokuların en çok bulunan kollojen olmayan proteinidir ve total kemik matriks proteinlerinin %1-2 sini oluşturur. Osteoblastlar tarafından sentezlenen osteokalsin, kemik Gla proteini olarak da adlandırılmaktadır. D vitamininin kontrolü altında açığa çıkar ve olgunlaşmış molekülünün sentezi K vitamini varlığına bağlı olarak gerçekleşir (100, 101).

Yapım aktivitesinin önemli bir göstergesi olan osteokalsin çok çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Mineral depolanmasında ve kemiğin yeniden şekillenmesinde önemli rol oynar. Kalsiyum iyonunu kemik matriksine bağlayan bu protein gelişen kemikte mevcuttur ve kemik oluşumuna katkıda bulunur (100).

Osteopontin

Ekstrasellüler matriks molekülü olan osteopontin multifonksyonel, kollogenöz olmayan, sialik asitten zengin glikolize olmuş kemokin benzeri bir fosfoproteindir.

Osteopontin başlıca kemikte gözlemlenmesine ve osteoblast ile osteoklastlar tarafından sentezlenmesine karşın makrofaj, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, aktif T lenfositler, doğal öldürücü hücreler, epitel ve tümör hücreleri tarafından da salgılanır (102, 103).

Osteopontin biyomineralizasyonda, enflamasyonda, kalsifikasyonda, yara iyileşmesinde, granülomatöz oluşumlarda, fibroziste, nitrik oksitin düzenlenmesinde, tümoral metastazda ve hücre canlılığını korumada rol alır (47).

Osteopontin kemik ve diş yapısında büyük oranda bulunan en önemli non kollagenöz proteinlerdendir. Biyomineralizasyondaki başlıca görevleri kemik hücrelerinin yapışmaları, osteoklast fonksiyonunun ve matriks mineralizasyonunun düzenlenmesidir.(104)

Kemik oluşum ve remodelasyonunda osteopontin kemik ekstrasellüler matriksinde artar (105).

Osteonektin

Çözücü enzim kullanımı olmaksızın, kemik matris proteinlerinin deminaralize yöntemlerinin gelişimi ile osteonektin el değmemiş formda izole edilen ilk proteinlerden olmuştur. Hidiraksipatit birikimin çekirdeklenmesi için kalsiyumu kollojen ile bağlama yetisinden ötürü bu protein osteonektin olarak isimlendirilmiştir (106).

Osteonektin molekülü birçok farklı yapısal özelliği içerisinde bulundurur; bunlardan en göze çarpanı yüksek oranda benzerlikler içeren kalsiyum motif alanlarıdır. Bu yapılar genellikle kalsiyum yapısında bulunan calmadulin gibi hücre içi proteinlerde bulunur. Osteonektinin kemikte yüksek oranda zenginleştirilmesine rağmen gelişme olgunlaşma veya onarım süreçleri boyunca önemli noktalarda bulunan birçok bağlayıcı doku içerisinde de yer alır (107).

SPARC teratokarsinom hücrelerinde sinyal aktarımı habercisi cAMP ile başlatılır ve yapılan araştırmalar ile SPARC'ın embriyo genesizin erken safhalarında da üretildiği ortaya çıkarılmıştır. Kurbağa denekleri üzerinde yapılan araştırmalarda ilginç sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalara göre, osteonektin denek gelişiminde antikör blokesi yolu ile inaktif edilirse, denegın kafa, gövde ve somit oluşumlarında yapısal bozukluklar ortaya çıkmıştır (108).

Osteonektin eksikliği bulunan farelerde trabeküler bağ doku ve mineral azalmasının yanı sıra apatit kristal artışı ile sonuçlanan ciddi osteopeni gelişimi gözlemlenmiştir (109, 110).

Bu araştırmaların sonuçlarına göre osteonektinin hücre gelişimini hücre çeperi, hücre şekli, hücre matriks etkileşimleri, metal iyon bağları, büyüme faktörleri, enzim hareketlerini modüle ederek düzenlediği elde edilmiştir (111).

Kemik doku markırlarından osteopontin ve osteonektinin; osteosit, osteosit lakuna, yeni kemik, osteoblast ve yeni kemik hücrelerinde ekspresyonunu immunohistokimyasal olarak incelediğimiz çalışmamızda, hem lokal ve sistemik olarak simvastatin uygulamasının kemik iyileşmesi üzerine etki farklarını ortaya koyabileceğiz hem de sentetik ve allojen greftler üzerine olan etkilerini karşılaştırmalı olarak inceleme fırsatı sağlamış olacağız.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Gruplar:

Tez çalışmamız; Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kuruluna (2011/45) proje olarak sunulmuş olup, etik kurul onayı alınmıştır. Deney hayvanı olarak, 280-300 gr ağırlığında 4 aylık 50 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanılmıştır. Denekler hazır pellet yem ve su ile beslenilmiştir.

Operasyonlar, Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma Uygulama Merkezi Denek Hayvanları Ameliyathanesinde, histopatolojik incelemeler ise Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

50 adet deney hayvanı 10'ar adet olmak üzere 5 ayrı gruba ayrılmıştır.

Çalışmamızda oluşturulan 5 grup şu şekilde sınıflandırıldı;

1. Grup: 10 adet ratın kalvaryumunda oluşturulan kritik boyut defekt hiçbir işlem yapılmadan boş bırakılarak yara yeri sütüre edildi.
2. Grup: 10 adet rata kalvaryumda kritik boyut kemik defekti oluşturularak sentetik greft betatrikalsiyumfosfat (Poresorb-TCP) uygulandı ve 10mg/kg simvastatin oral gavaj yoluyla sistemik olarak 30 gün boyunca hergün verildi.
3. Grup: 10 adet rata kalvaryumda kritik boyut kemik defekti oluşturularak allojen greft (MinerOss) uygulandı ve 10mg/kg simvastatin oral gavaj yoluyla sistemik olarak 30 gün boyunca hergün verildi.
4. Grup: 10 adet rata, 10 mg simvastatin içeren Zocor tablet (Zocor tablet, simvastatin 40 mg, Merck & Co, NJ, ABD) konsantrasyonu 2,5 mg/ml olacak şekilde serum fizyolojik solüsyonunda çözülüp, elde edilen simvastatin solüsyonundan 0,2 ml alınarak; sentetik greft betatrikalsiyumfosfat (Poresorb-TCP) materyaline emdirilerek elde edilen kombinasyon, oluşturulmuş kritik boyuttaki kalvaryal kemik defektine uygulandı.
5. Grup: 10 adet rata, 10 mg simvastatin içeren Zocor tableti (Zocor tablet, simvastatin 40 mg, Merck & Co, NJ, ABD) konsantrasyonu 2,5 mg/ml olacak şekilde serum fizyolojik solüsyonunda çözülüp, elde edilen simvastatin solüsyonundan 0,2 ml alınarak; allojen kemik grefti (MinerOss) materyaline

emdirilerek elde edilen kombinasyon, oluşturulmuş kritik boyuttaki kalvaryal kemik defektine uygulandı.

Deneklere verilecek lokal ve sistemik simvastatin miktarı literatürde benzer çalışmalar incelenerek sistemik doz 10mg/kg/gün, lokal doz 0,2cc distile suda çözülmüş 10mg simvastatin olarak belirlendi.

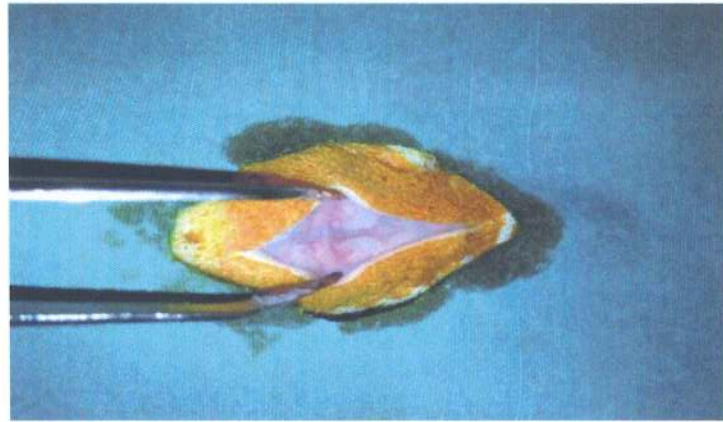
Cerrahi Uygulamalar

Deney hayvanlarında intraperitoneal 3mg/kg xylazine (Rompun %2; Bayer) ve 30mg/kg Ketamin HCl (Ketalar; Eczacıbaşı-Warner Lambert) ile genel anestezi uygulandıktan sonra deney hayvanlarının kalvaryum bölgeleri tıraş edilip dezenfekte (Betadine, Kansuk, Türkiye) edildi (Resim 5).



Resim 5: Cerrahi prensiplere uygun hazırlanan operasyon bölgesi.

Deneklerde kafa derisi enseden alına kadar tıraş edilen bölgede, orta hatta longitudinal bir deri insizyonu yapılarak frontal kemik ortaya çıkartıldı (Resim 6).

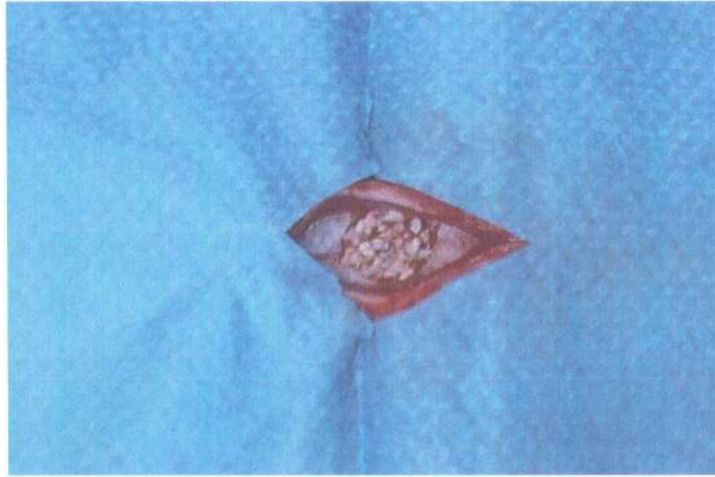


Resim 6: İnsizyonu takiben frontal kemiğin görünümü.

İnce periost elevatörü ile periost flepleri kaldırılarak özel olarak tasarlanmış trephan frez ile orta hatta 0,8 cm çapında dairesel tam kat kemik defekti oluşturuldu (Resim 7).



Resim 7: Trephan frezle oluşturulan kemik defekti.



Resim 8: Defekt bölgesine uygulanan kemik grefti görüntüsü.

Gruplara uygun materyal yerleştirildikten sonra periost defekt üzerine tekrar örtülerek 3/0 vicryl (Vicryl, Ethicon Limited, Belgium) ile dikildi. Cilt 3/0 ipek suture (Doğsan Trabzon/Türkiye) ile primer olarak kapatıldı (Resim 8).



Resim 9: Bölgenin suture edilmiş postoperatif görüntüsü.

Proflaksi amaçlı her ratın sağ gluteal kası içerisine operasyondan hemen sonra tek doz antibiyotik enjeksiyonu (Gentamicin 0.05 ml/kg) ve 7 gün boyunca deneklerin operasyon bölgesine antiseptik solüsyon uygulandı. Deney hayvanlarının birbirine zarar vermelerini önlemek amacıyla ayrı kafeslerde barındırıldı.

Tüm deney grubundaki hayvanlar 30. gün takipleri sonunda aşırı doz sodyum thiopentone'un (Pental Sodyum, .E. Ulugay İlaç San. T.A.S.) intraperitoneal enjeksiyonu ile sakrifiye edilerek ense bölgesinden açılan horizontal kesi ile kalvaryum üzerindeki cilt tamamen kaldırıldı. Defekt alanı, etrafında sağlam kemik olacak şekilde kemik forsepsi ile bölgeden alınarak %10'luk formalin solüsyonuna konuldu.



Resim 10: Etrafında sağlam kemik dokusuyla çıkarılan defekt alanı.

Histokimyasal Boyama Yöntemleri

Bütün gruplarda yer alan deney hayvanlarından alınan kalvarial kemik dokuları, defekt alanının tamamının yer almasına özen gösterilerek, nötral tamponlanmış formalin fiksatifinde 16 saat süre ile bekletilerek fiksasyon sağlandı. Daha sonra akar su altında 12 saat boyunca yıkama işlemi gerçekleştirildi. Dehidratasyon için artan derecelerde ve her birinde 12 saat olmak üzere, % 50, % 70, % 80, % 90, % 96 etanol içerisinde bekletildi. Ardından %99.9'luk etanol içerisinde 2x15 dk bekletilerek dehidratasyon tamamlandı. Dokuların saydamlaştırılması için, 2x15 dk ksilol kullanıldı. Daha sonra 58-60 C° olarak ayarlanmış etüv içerisinde 2x1 saat sıvı parafin içerisinde infiltrasyon işlemi gerçekleştirildi. Son olarak dokular parafine gömülüp, bloklandı. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2265) ile 5-6 µm kalınlığında seri kesitler elde edildi. Elde edilen seri kesitlerin yarısı Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Azan histokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak boyandı. Geri kalan kesitler ise osteopontin ve osteonektin immünreaktivitesini ortaya koymak için immunohistokimyasal olarak boyandı. Elde edilen örnekler fotomikroskop (Eclipse i80, Nikon, Japan) ile değerlendirilip, aynı mikroskobun kamera sistemi ile görüntüler elde edildi.

Hematoksilen-Eosin (H-E) Boyama Yöntemi

Deparafinize edilerek distile suya kadar getirilen parafin kesitler, Harri's hematoksin solusyonunda 9 dakika kadar bekletildi. Çeşme suyunda boya artıkları giderildikten sonra, % 1 lik asit alkol solüsyonunda çalkalandı. Amonyaklı suda çekirdeklerin parlak mavi olması sağlandı. Distile suda yıkanan kesitlere, eosin solusyonuna alınıp 2 dk. kadar bekletildi. Dehidratasyon ve parlatma için yükselen derecelerde etil alkol serilerinden ve ksilolden geçirilen kesitler, entelan ile kapatıldı.

Azan Boyama Yöntemi

Deparafinize edilerek distile suya kadar getirilen parafin kesitler azokarmin solüsyonu ve 58 C°'de ayarlanmış olan etüv içersine konularak 30 dakika kadar bekletildi. Beş dakika kadar soğumaya bırakılan kesitler distile suda yıkandı. Daha sonra anilin alkol damlatılarak 1 dakika kadar beklendi. Kesitler yıkanmaksızın asit alkolde bir dakika bekletildi. Tekrar herhangi bir yıkama işlemine maruz

birakılmayan kesitlere fosfowolframik asit solüsyonu damlatılarak yarım saat kadar beklendi. Yıkama işlemi uygulanmadan bir yarım saat kadar daha polikrom solüsyonunda bekletildi (Azan Trichrome, 04-001802, Milano, Italy). Dehidratasyon ve parlatma için yükselen derecelerde etil alkol serilerinden ve ksilolden geçirilen kesitler, entelan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ve Değerlendirme

Osteopontin Ve Osteonektin

Rutin doku takibi ile hazırlanan parafin bloklardan elde edilen kesitlerin bir bölümü immunohistokimyasal boyama yöntemi için kullanıldı. Bu amaçla, 5-6 µm kalınlığında kesitler alındıktan sonra, gece boyu 37 C° ayarlanmış etüvde bekletildi. Sonraki gün, 58 C° ye ayarlanmış etüve alınan kesitler, bir saat burada bekletildikten sonra, 2X15 dakika ksilolden geçirildi. Azalan alkol derecelerinden, 10'ar dakika süreyle, sırasıyla %100, %96 ve %80'lik etanolden geçirilen dokular, rehidratasyon için 2X5 dakika distile suda bekletildi. Antijen retrieval işlemi için sitrat buffer (Sigma-Aldrich, Germany) solüsyonuna (pH:6:0) alınan dokular mikrodalga fırın içerisinde 3X4 dakika kadar ısımlandı. Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler, doğrudan oda sıcaklığında soğumaları için 20 dakika kadar bekletildi. 2X5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, kurulanıp, dokunun yer aldığı alan silikon kalem vasıtasıyla çevrenip, sınırlandırıldı. İmmünohistokimya barına dizilen kesitlerin üzerine 3X5 dakika phosphate buffer saline (PBS) damlatıldı. Bu sırada immünohistokimya barı içerisine nemliliği sağlamak için daha önceden hazırlanan sıcak su (40-50 C°) bırakıldı. Kesitlerin üzerindeki PBS alınıp üzerine hidrojen peroksit blokaj solüsyonu (1ml %30 H₂O₂ + 9ml metanol) damlatılıp 20 dakika kadar inkübe edildi. Sonraki adımda, bloklama için, non-immün serum (Ultravision, Anti-polyvalent, HRP TP-125-UB, Fremont CA, USA) solüsyonunda 10 dakikalık bekletmenin ardından yıkanmaksızın, osteopontin primer antikoru (1:200, mouse monoclonal; sc 21742, Santa Cruz Biotechnology) damlatılıp bir gece +4 C° de inkübe edildi. Sonraki gün PBS solüsyonunda 3X5 dakika yıkanan kesitler, sekonder antikorla (Ultravision, Anti-polyvalent, HRP TP-125-BN, Fremont CA, USA) 10 dakika inkübe edilip PBS ile yıkandıktan sonra, streptavidin-peroksidaz enzimi (Ultravision, anti-polyvalent, HRP TP-125-HR, Fremont CA, USA) damlatılıp 10 dakika beklendikten sonra tekrar PBS ile yıkama sağlandı. Daha sonra kesitlerin

üzerine diaminobenzidine (Ultravision, DAB plus substrate system, TA-125-HDX, Fremont, CA, USA) damlatılıp 7 dakika beklendi. PBS ile reaksiyon durdurulup hematoksilin ile zıt boyama yapıldıktan sonra entelan ile kapatıldı. DS-2MV yazılım desteği ile Eclipse i8 (Nikon, Japan) değerlendirilip görüntüler elde edildi. Osteopontin ve osteonektin boyanma yoğunluğunun değerlendirilmesi Tablo.1’de gösterildiği gibi yapıldı.

Tablo 1: İmmunohistokimyasal skorlama metodu

Osteopontin ve Osteonektin Ekspresyonu	Ekspresyon düzeyi
-	Ekspresyon yok
+	Zayıf düzeyde ekspresyon
++	Orta düzeyde ekspresyon
+++	Kuvvetli (güçlü) ekspresyon

İstatistiksel Değerlendirme

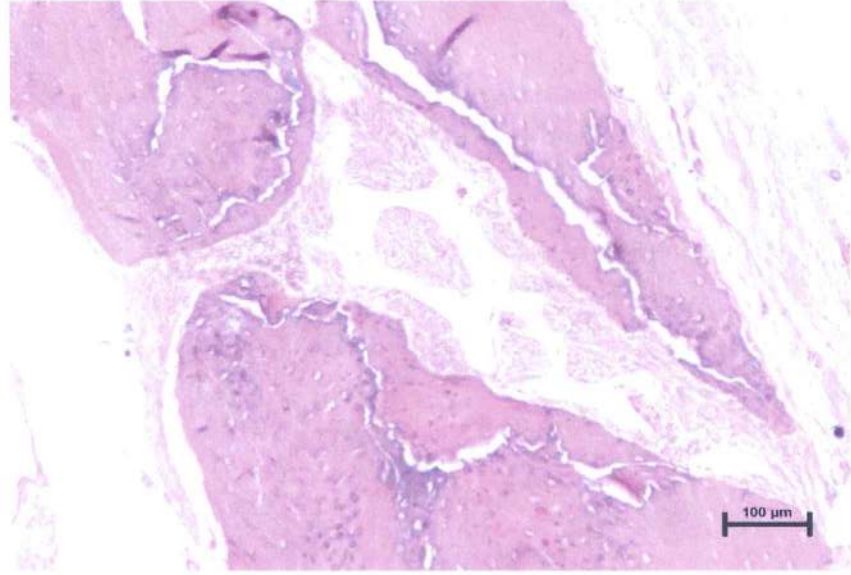
Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 18.0 istatistik programı ve elde edilen verilerin analizinde Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiki anlamlılık düzeyi $p<0,05$ kabul edilmiştir.

BULGULAR

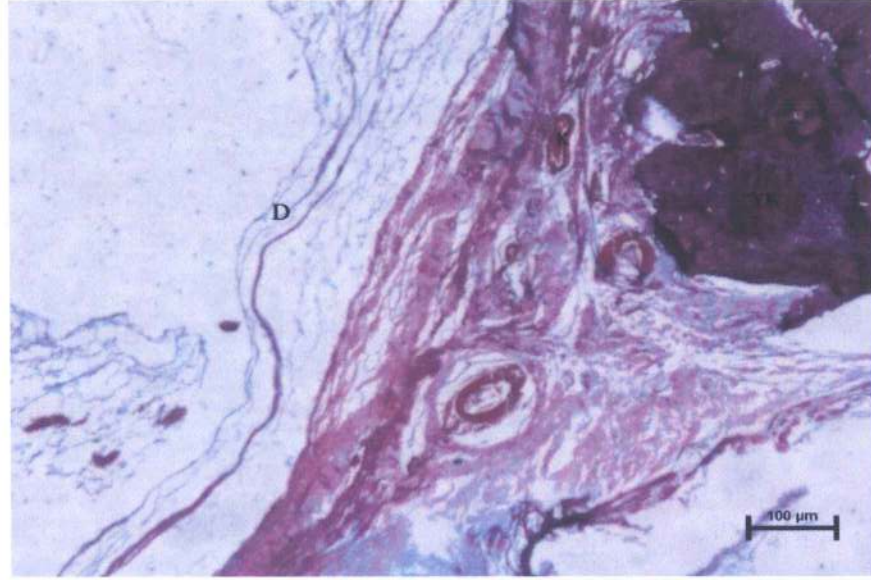
Histopatolojik Bulgular

Kalvaryumda defekt açılıp 30 gün bekleme süresinden sonra sakrifiye edilen ratların kalvaryumundan elde edilen kesitlerde:

Kontrol Grubu (Grup 1): Defekt kenarında tabanı daha önce var olan apeksi defekt merkezine doğru uzanan üçgen şeklinde yeni kemik dokusu seçildi (Şekil 2). Bu yeni kemik dokuda düzensiz kemik iliği boşlukları yanı sıra osteositlerle birlikte kemığın yüzeyinde yerleşim gösteren osteoblastların varlığı gözlemlendi (Şekil 1). Diğer bir kalvaryal kesitte ise defekt alanı fibrosellüler bağ dokusuyla dolu olarak izlendi (Şekil 2).

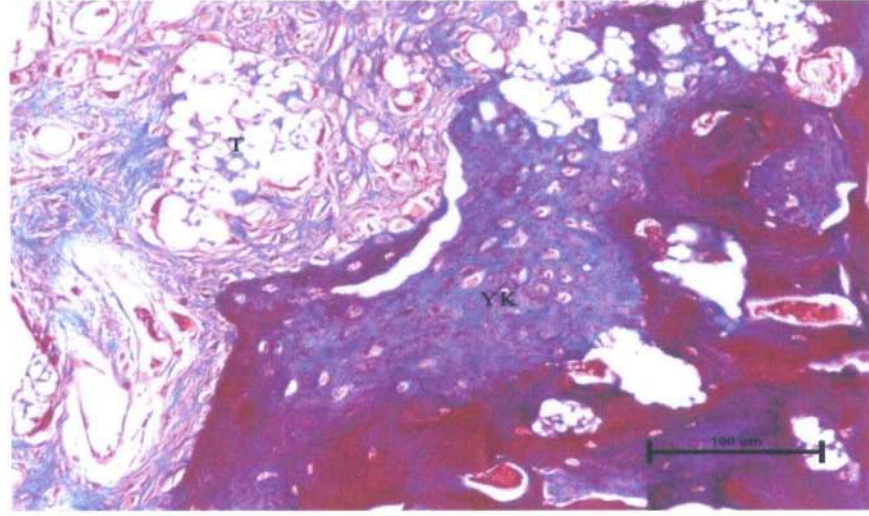


Şekil 1: Kontrol grubu: Defekt alanını dolduran fibrosellüler bağ dokusu ve üçgen şeklinde yeni kemik oluşumu izlenmektedir. (H-E, Bar: 100mm).

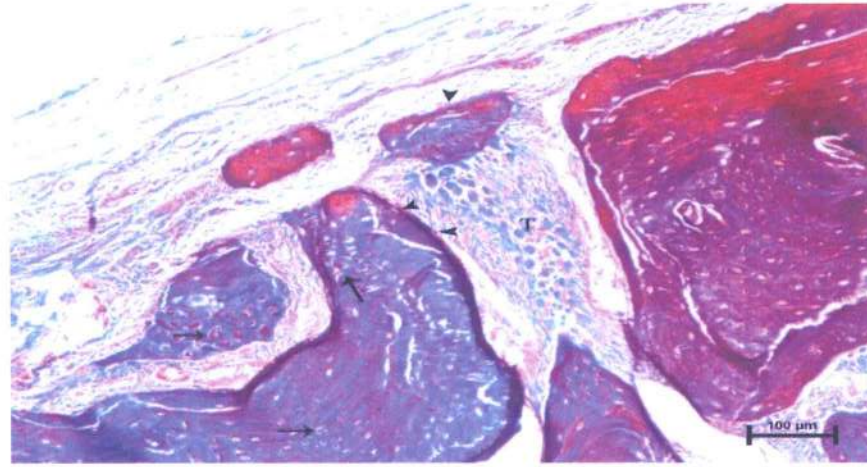


Şekil 2: Kontrol grubu: Defekt kenarında oluşan yeni kemik doku ve defekt alanını dolduran fibrovasküler bağ dokusu. D: Durameter, YK: Yeni kemik dokusu, K: Kan damarı (Azan, Bar: 100mm).

Sistemik simvastatin ve sentetik greft Grubu (Grup 2): Ortada yerleşik β TCP Partikülleri ve etrafı rejenere kemikle çevrelenmiş yeni kemik doku alanları izlendi. Konak kemik üzerinde şekillenen yeni kemik dokusu ve yer yer matür kemiğe dönüşen kemik iliği alanları saptandı (Şekil 3). Aynı grubun diğer bir kalvaryal defekt kesitinde β TCP greft artıkları ve oluşan yeni kemik adacıkları izlendi (Şekil 4).



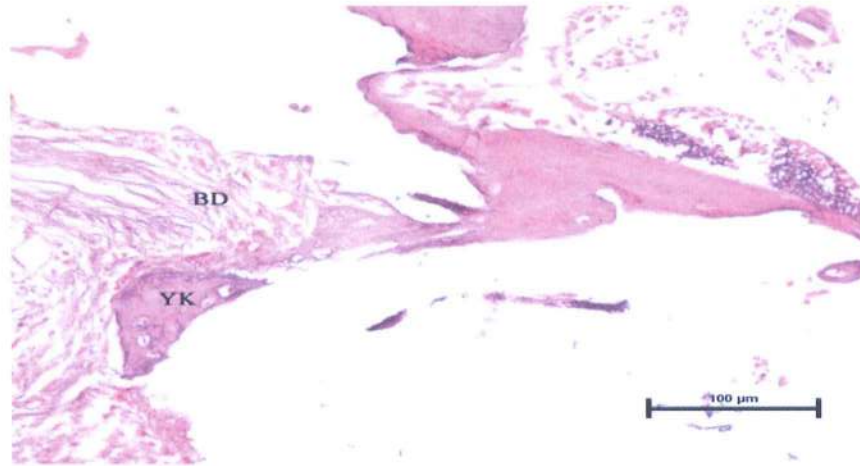
Şekil 3: Sistemik simvastatin ve sentetik greft grubu: Defekt alanında oluşan yeni kemik doku adacıkları adı altında β TCP greft kalıntıları izlenmektedir. YK: Yeni kemik doku, T: Betatrikalsiyum fosfat partikülleri (Azan, Bar: 100mm).



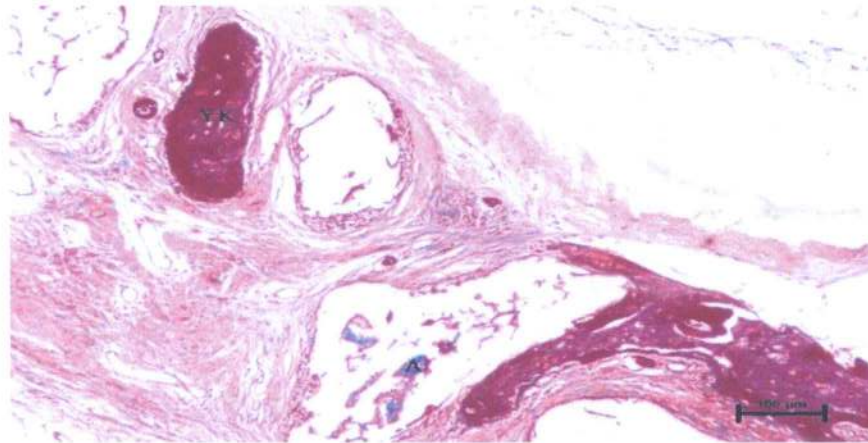
Şekil 4: Sistemik simvastatin ve sentetik greft grubu: Büyük çaplı osteosit ve osteoblast hücreleri içeren yeni kemik dokusu ile fibrovasküler bağ dokusuyla çevrelenmiş beta trikalsiyum fosfat greft artıkları. Ok: Osteosit Okbaşı: Osteoblast, T: Betatrikalsiyum fosfat partikülleri (Azan ,Bar: 100mm).

Sistemik simvastatin ve allojen greft grubu (grup 3): Kalvaryal defekt bölgesine allojen greft uygulanan grubun histolojik kesitlerinde fibrosellüler bağ dokusu içerisinde yeni oluşan kemik adacıkları seçildi (Şekil 5).

Diğer bir kesitte allojen greft artıklarını yarım ay şeklinde saran ve kemik iliği boşluklarını içeren yeni kemik doku ve adacıkları izlendi (Şekil 6).

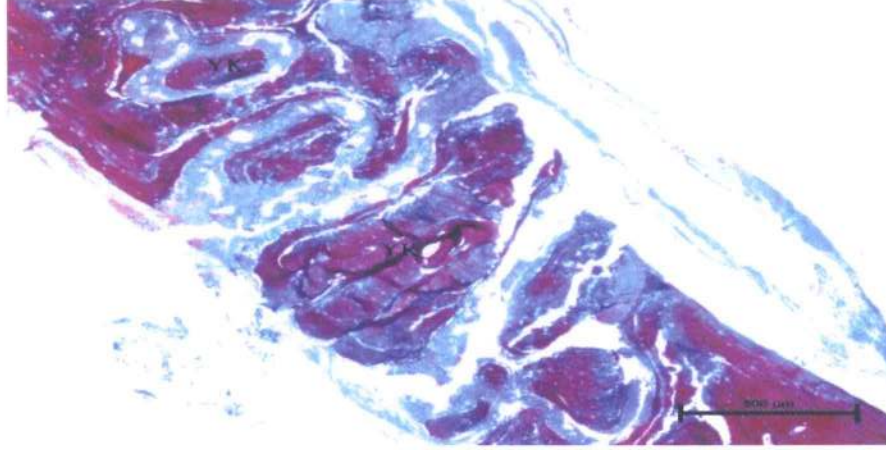


Şekil 5: Sistemik simvastatin ve allojen greft grubu: Defekt alanında fibrosellüler bağ dokusu ve yeni kemik adacığı izlenmektedir. BD: Bağ doku, YK: Yeni kemik doku (H-E, Bar: 100nm).

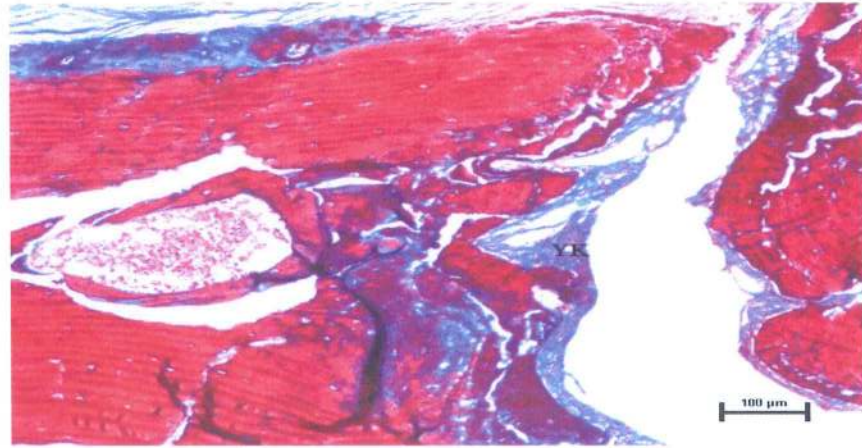


Şekil 6: Sistemik simvastatin ve allojen greft grubu: Allojen greft partiküllerini yarım ay şeklinde çereleyen ve kemik iliği boşluklarını içeren yeni kemik dokusu ile fibröz bağ dokusu içerisinde yerleşik yeni kemik adacığı görülmektedir. YK: Yeni kemik dokusu A: Allojen greft artıkları (Azan, Bar: 100nm).

Lokal simvastatin ve sentetik greft grubu (Grup 4): Defekt bölgesi ve defekt kenarlarında çok miktarda yeni kemik oluşumu yanı sıra iltihabi hücrelerde belirgin bir azalma görüldü (Şekil 7, 8).



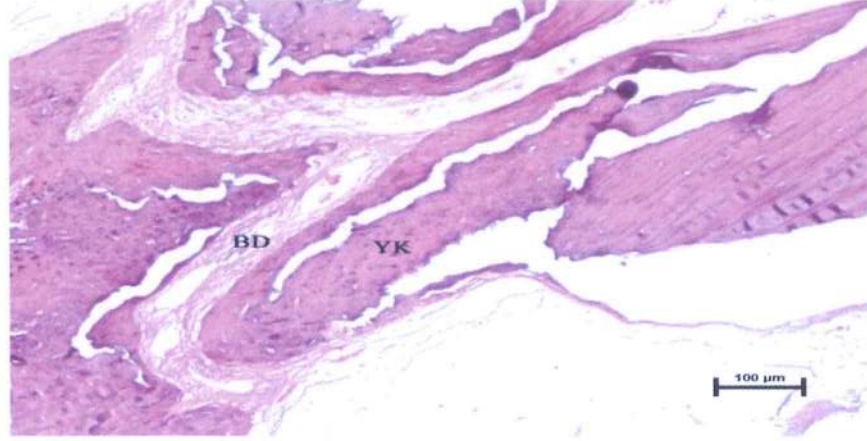
Şekil 7: Lokal simvastatin ve sentetik greft grubu: Defekt bölgesinde defekt uçlarından başlayarak defekt bölgesini dolduran yeni kemik alanları. YK: Yeni kemik alanları (Azan, Bar:500nm)



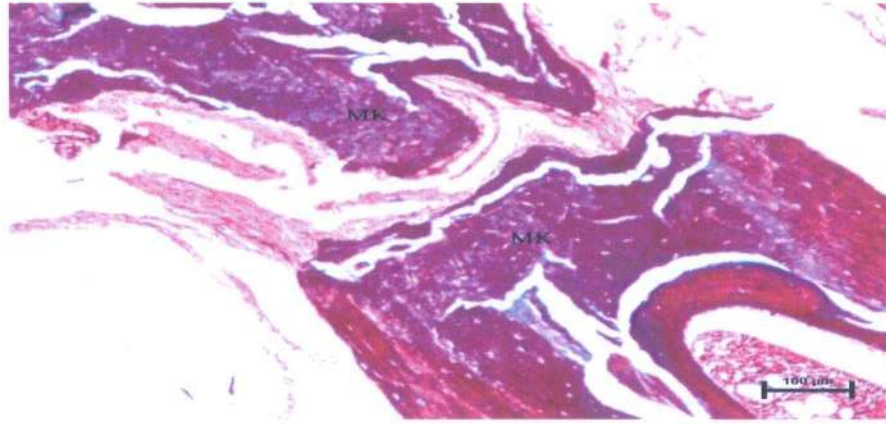
Şekil 8: Lokal simvastatin ve sentetik greft grubu: Defekt kenarında oluşan yeni kemik dokusu YK: Yeni kemik dokusu (Azan, Bar 100nm)

Lokal simvastatin ve allojen greft grubu (Grup 5): Defekt bölgesinde yaygın bağ dokusu ve kronik iltihap hücreleriyle konjesyonel kan damarları ve hemorajik alanlar izlendi. İmmatür yeni kemik dokusu oluşumuyla birlikte çok

sayıda osteosit ve osteoblast hücreleri ile defekt kenarlarında kemik iliği boşlukları gözlemlendi.(Şekil9-10)



Şekil 9: Lokal simvastatin ve allojen greft grubu: Defekt kenarından başlayıp diğerine uzanan yeni kemik trabekülleri ve araları dolduran fibrosellüler bağdokusu izlenmektedir. YK: Yeni kemik dokusu BD: Bağ dokusu (H-E Bar:100nm).



Şekil 10: Lokal simvastatin ve allojen greft grubu; defekt bölgesinde matür yeni kemik dokusunun oluştuğu izlenmektedir. MK: Matür kemik (Azan, Bar: 100nm).

İmmunohistokimyasal Bulgular

Osteopontin (OPN)

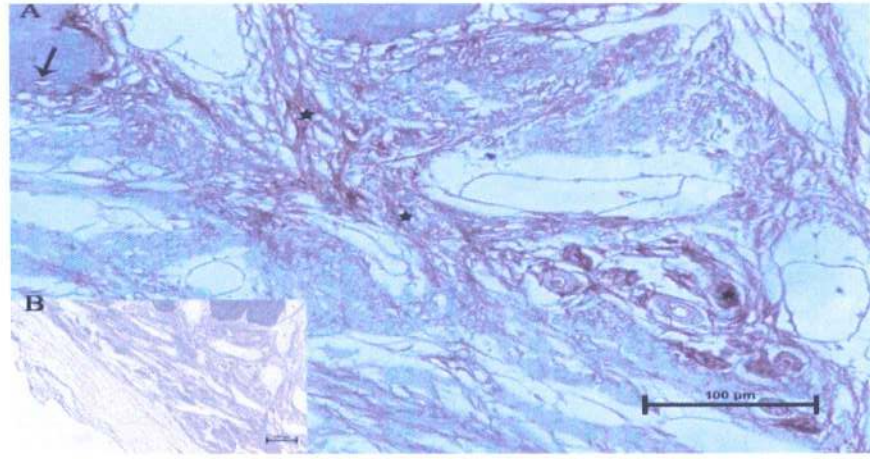
Kontrol grubunda, sentetik greft ve sistemik simvastatin grubunda, allojen greft ve sistemik simvastatin grubunda, sentetik greft ve lokal simvastatin grubunda, allojen greft ve lokal simvastatin grubunda; osteosit hücrelerinde, osteopontin immünreaktivitesi Tablo 1'deki sınıflamaya göre ++ bulundu, orta düzeyde immunoaktivite izlendi. Gruplar arası yapılan karşılaştırmada anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).

Osteosit lakunalarındaki osteopontin immünreaktivitesi, kontrol grubunda, sentetik greft ve sistemik simvastatin grubunda, allojen greft ve sistemik simvastatin grubunda, allojen greft ve lokal simvastatin grubunda Tablo 1'deki sınıflamaya göre +++ bulundu, güçlü düzeyde immunoaktivite izlendi. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı bir farklılık saptanmadı. Ancak kontrol grubu ile lokal sentetik greft ve lokal simvastatin uygulanan grubun karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre osteopontin ekspresyonunda anlamlı düzeyde düşüş saptandı ($p < 0.05$).

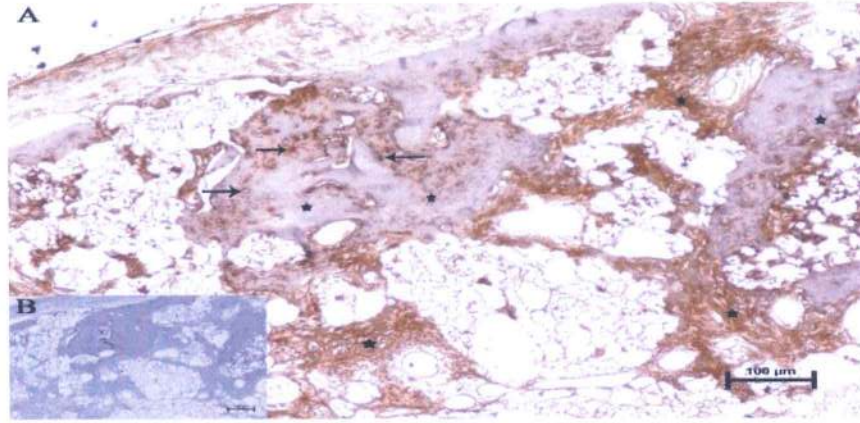
Osteoblastlardaki osteopontin immünreaktivitesi, kontrol grubunda, sentetik greft ve lokal simvastatin grubunda, allojen greft ve lokal simvastatin grubunda Tablo 1'deki sınıflamaya göre + bulundu, düşük düzeyde immunoaktivite izlendi. Ancak, sentetik greft ve sistemik simvastatin grubunda, allojen greft ve sistemik simvastatin grubunda, osteoblast hücrelerindeki osteopontin ekspresyonu Tablo 1'deki sınıflamaya göre ++ bulundu, orta düzeye doğru immunoaktivitede bir artış söz konusuydu. Kontrol grubu ile karşılaştırılan bu artış anlamlıydı ($p < 0.05$).

Yeni oluşan kemik trabeküllerindeki osteopontin immünreaktivitesi incelendiğinde, kontrol grubu ile allojen ve lokal simvastatin uygulanan grupta Tablo 1'deki sınıflamaya göre +++ bulunan immunoaktivite güçlü düzeydeydi. Her iki grubun istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Diğer taraftan sentetik greft ve sistemik simvastatin grubu ile allojen greft ve sistemik simvastatin uygulanan grupta, osteopontin ekspresyonu minimal düzeyde izlenmiştir. Bu her iki grubun kontrol grubu ile kıyaslanmasında anlamlı bir düşüş olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, kontrol grubu ile sentetik greft ve lokal simvastatin uygulanan grup karşılaştırıldığında, immunoaktivite Tablo 1'deki sınıflamaya göre ++ bulundu, orta düzeye doğru bir azalışın olduğu anlamlı olarak saptandı ($p < 0.05$).

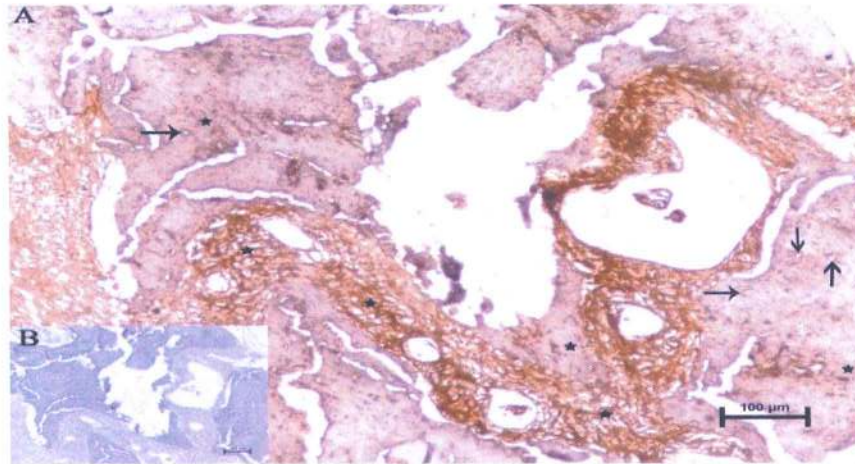
Defekt alanına doğru invaze olan bağ doku içerisindeki osteopontin ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubunda minimal düzeyde olan ekspresyon, sentetik greft ve lokal simvastatin uygulanan grupta Tablo 1'deki sınıflamaya göre ++ bulundu, immunoaktivite orta düzeye doğru artmıştı. Bu artış, istatistiksel olarak anlamlıydı. Bununla birlikte, sentetik greft ve sistemik simvastatin grubunda, allojen greft ve sistemik simvastatin grubunda, allojen greft ve lokal simvastatin grubunda Tablo 1'deki sınıflamaya göre +++ olan güçlü bir immünreaktivite saptandı. Bu güçlü immünreaktivite kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ta anlamlıydı (Şekil 11-15).



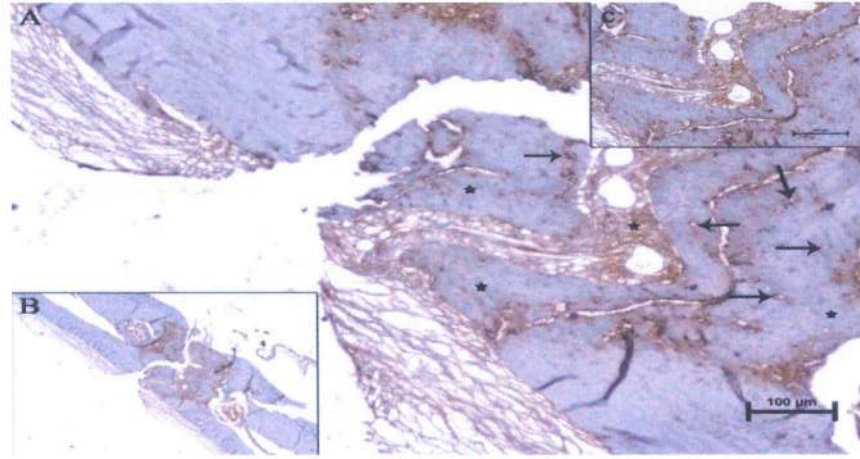
Şekil.11: Kontrol grubu, osteopontin immünreaktivitesi. Defekt kenarlarında, yeni oluşan kemik trabekülleri içerisinde yer alan osteosit lakunalarında (ok başı) orta düzeyde bir boyanma var iken, defekt alanını dolduran bağ doku içerisinde de yer yer ekspresyonların (yıldız) olduğu görülmektedir. B: Negatif kontrol (Osteopontin immün boyama, Bar: 100 µm).



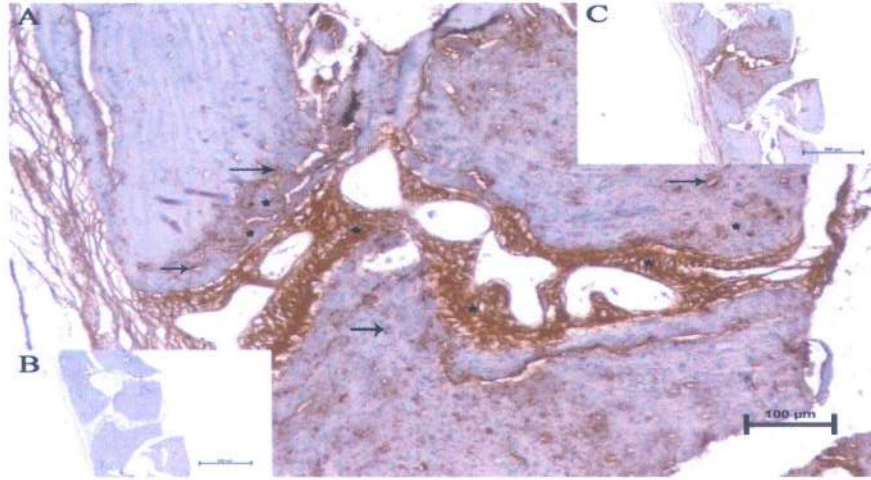
Şekil.12: Sentetik greft ve sistemik simvastatin uygulanan grup, osteopontin immünreaktivitesi. A: Yeni oluşan kemik trabeküllerinde zayıf düzeyde bir boyanma var iken (asterisk), osteosit lakunalarında kuvvetli ekspresyon izlenmektedir (ok başı). Bağ doku alanlarında kuvvetli immünreaksiyon görülmektedir (asterisk). B: Negatif kontrol (Osteopontin immün boyama, Bar: 100 µm).



Şekil.13: Allojen greft ve sistemik simvastatin uygulanan grup, osteopontin immünreaktivitesi. A: Yeni oluşan kemik trabeküllerinde zayıf bir boyanma var iken (yıldız) osteosit lakunalarında (ok başı) ve bağ doku alanlarında (yıldız) kuvvetli ekspresyon izlenmektedir. B: Negatif kontrol (Osteopontin immün boyama, Bar: 100 µm).



Şekil.14: Sentetik greft ve lokal simvastatin uygulanan grup, osteopontin immünreaktivitesi. A: Yeni oluşan kemik trabeküllerinde zayıf bir boyanma var iken (yıldız), osteosit lakunalarında (ok başı) ve bağ doku alanlarında kuvvetli ekspresyon izlenmektedir (yıldız). B: Küçük büyütme. C: Büyük büyütme. (Osteopontin immün boyama, Bar:100 µm)



Şekil.15: Allojen greft ve lokal simvastatin uygulanan grup, osteopontin immünreaktivitesi. A: Yeni oluşan kemik trabeküllerinde (yıldız) ve osteosit lakunalarında (ok başı) güçlü ekspresyon izlenirken, bağ doku alanlarında orta düzeyde immün reaksiyon görülmektedir (yıldız). B: Negatif kontrol, C: Küçük büyütme (Osteopontin immün boyama, Bar: 100 µm).

Osteonektin (ONC)

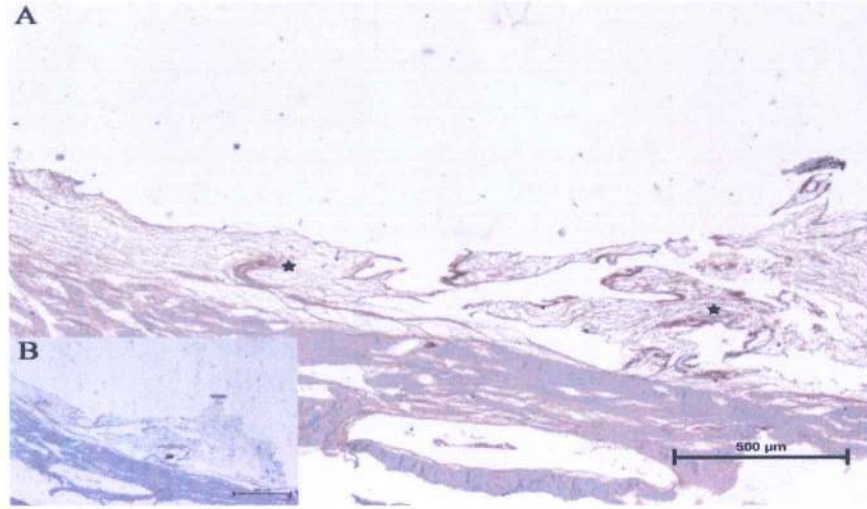
Kontrol grubunda, sentetik greft ve sistemik simvastatin grubunda, allojen greft ve sistemik simvastatin grubunda, sentetik greft ve lokal simvastatin grubunda, allojen greft ve lokal simvastatin grubunda osteosit hücrelerinde herhangi bir osteonektin ekspresyonuna rastlanmadı.

Osteosit lakunalarındaki osteonektin immünreaktivitesi, kontrol grubunda minimal düzeyde izlenirken, sentetik greft ve sistemik simvastatin grubunda, allojen greft ve sistemik simvastatin grubunda, sentetik greft ve lokal simvastatin grubunda Tablo 1'deki sınıflamaya göre immunoaktivite ++ bulundu, ekspresyon orta düzeydeydi. Bu grupların, kontrol grubu ile karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusuydu. Bununla birlikte, allojen greft ve lokal simvastatin uygulanan grupta Tablo 1'deki sınıflamaya göre immunoaktivite +++ bulundu, güçlü bir ekspresyon izlendi ($p<0.05$).

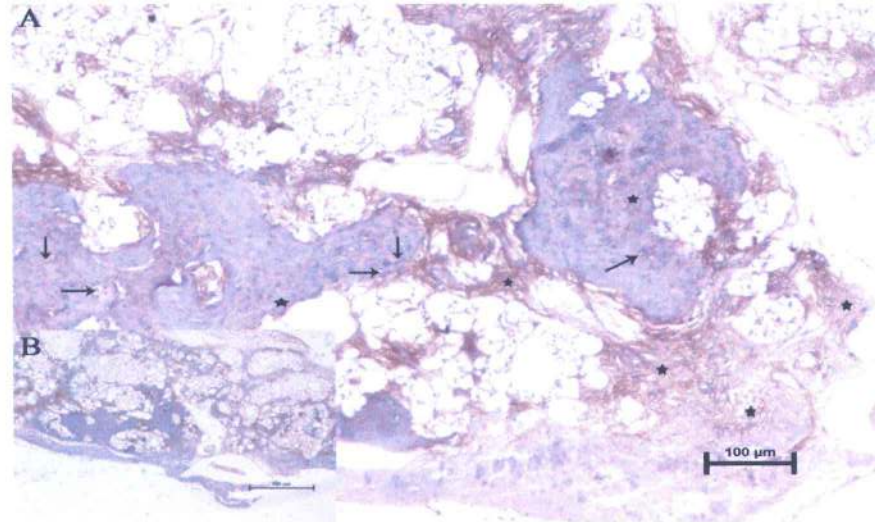
Osteoblastlardaki osteonektin immünreaktivitesi, kontrol grubu, sentetik greft ve sistemik simvastatin grubu, sentetik greft ve lokal simvastatin grubunda Tablo 1'deki sınıflamaya göre +++ bulundu, immunoaktivite güçlü düzeydeydi ($p>0.05$), allojen greft uygulanan gruplarda ise Tablo 1'deki sınıflamaya göre ++, orta düzeyde bir ekspresyon saptandı ($p<0.05$).

Yeni oluşan kemik trabeküllerindeki osteonektin immünreaktivitesi incelendiğinde, kontrol grubunda, sentetik greft ve sistemik simvastatin grubunda, allojen greft ve sistemik simvastatin grubunda Tablo 1'deki sınıflamaya göre +, düşük düzeyde immünreaktivite saptandı. Diğer taraftan, allojen greft ve lokal simvastatin grubu ile sentetik greft ve lokal simvastatin grubunda Tablo 1'deki sınıflamaya göre ++, orta düzeyde izlenen immünreaktivite, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

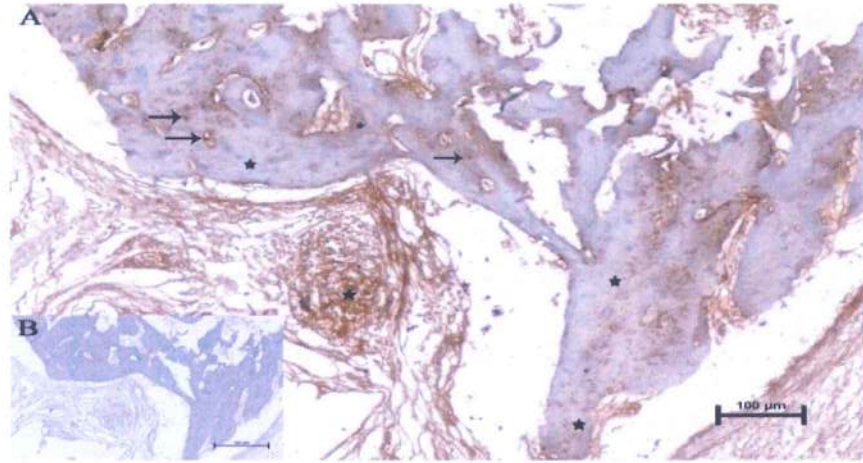
Defekt alanına doğru invaze olan bağ doku içerisindeki osteonektin ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubu ile sentetik greft ve sistemik simvastatin uygulanan gruplarda Tablo 1'deki sınıflamaya göre +, minimal düzeyde olan ekspresyon, sentetik greft ve lokal simvastatin grubu ile allojen greft ve lokal simvastatin uygulanan grupta artan, Tablo 1'deki sınıflamaya göre +++, güçlü düzeyde bir ekspresyon saptandı (Şekil 16-20).



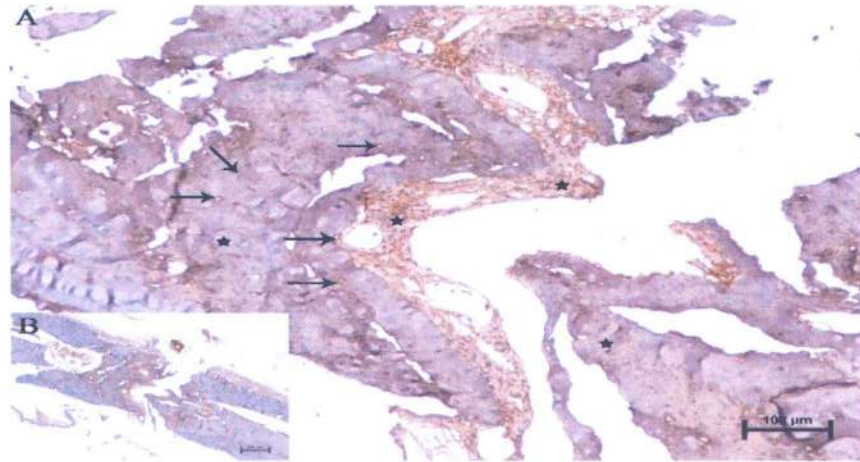
Şekil 16: Kontrol grubu, osteonektin immünreaktivitesi. A: Bağ dokusu alanlarında minimal düzeyde osteonektin ekspresyonu görülmektedir (yıldız). B: Negatif kontrol (Osteonektin immün boyama, Bar:100 µm).



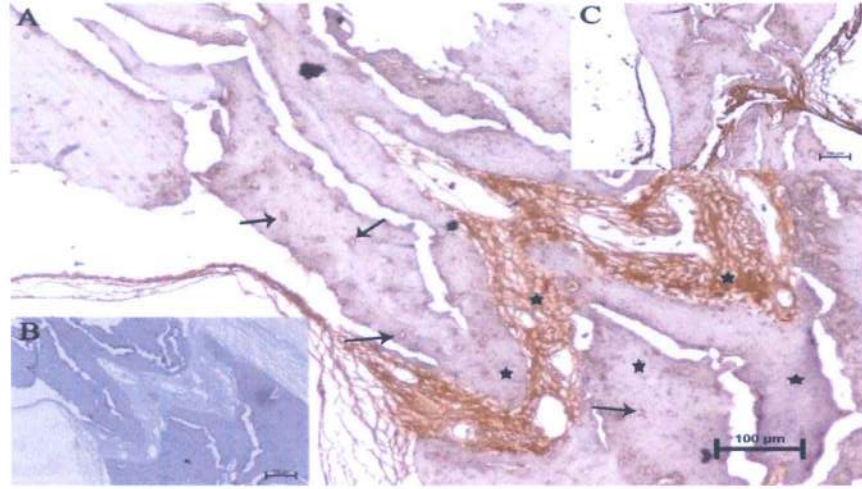
Şekil.17: Sentetik greft ve sistemik simvastatin uygulanan grup, osteonektin immünreaktivitesi. A: Yeni oluşan kemik trabeküllerinde zayıf bir boyanma var iken (yıldız), osteosit lakunalarında (ok başı) ve bağ doku alanlarında (yıldız) orta düzeyde ekspresyon izlenmektedir. B: Küçük büyütme (Osteonektin immün boyama, Bar:100 µm).



Şekil.18: Allojen greft ve sistemik simvastatin uygulanan grup, osteonektin immünreaktivitesi. A: Yeni oluşan kemik trabeküllerinde (yıldız) ve osteosit lakunalarında orta düzeyde bir ekspresyon var iken (ok başı), bağ doku alanlarında kuvvetli immün reaksiyon görülmektedir (yıldız). B: Negatif kontrol (Osteonektin immün boyama, Bar:100 µm).



Şekil 19: Sentetik greft ve lokal simvastatin uygulanan grup, osteonektin immünreaktivitesi. A:Yeni oluşan kemik trabeküllerinde (yıldız) ve osteosit lakunalarında (ok başı) orta düzeyde bir ekspresyon var iken, bağ doku alanlarında zayıf immün reaksiyon görülmektedir (yıldız). B:Büyük büyütme (Osteonektin immün boyama, Bar: 100 µm).



Şekil 20: Allojen greft ve lokal simvastatin uygulanan grup, osteonektin immünreaktivitesi. A:Yeni oluşan kemik trabeküllerinde zayıf bir boyanma var iken (yıldız), osteosit lakunalarında (ok başı) ve bağ doku alanlarında (yıldız) kuvvetli ekspresyon izlenmektedir. B: Negatif kontrol, C:Büyük büyütme (Osteonektin immün boyama, Bar: 100 µm).

İmmünohistokimyasal Değerlere Bağlı İstatistiksel Bulgular

Kontrol Grubu ile Deneysel Grupların Karşılaştırılması

Kontrol grubu ile sistemik simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup OPN immünoaktivitesi açısından değerlendirildiğinde; osteosit ve osteosit lakunalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. Osteoblast ve bağ dokuda deney grubundaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,004-0,001$). Yeni kemik trabeküllerinde kontrol grubunda ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,000$). Aynı gruplar ONC immünoaktivitesi için değerlendirildiğinde; sadece osteosit lakunalarındaki farklılık deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,042$).

Kontrol grubu ile sistemik simvastatin ve allojen greft uygulanan grup OPN immünoaktivitesi açısından değerlendirildiğinde; osteosit ve osteosit lakunalarında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Osteoblast ve bağ dokuda deney grubundaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). Yeni kemik trabeküllerinde kontrol grubunda farklılık anlamlı bulundu ($P=0,001$). Aynı gruplar ONC immünoaktivitesi için değerlendirildiğinde; Osteositlerde istatistiksel olarak farklılık anlamlı bulunmadı. Deney grubunda osteosit lakunalarında, yeni kemik trabeküllerinde ve bağ dokudaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,039-0,007-0,000$). Osteoblastlarda ise kontrol grubundaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,005$).

Kontrol grubu ile lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup OPN ve ONC immünoaktivitesi açısından değerlendirildiğinde; osteosit, osteosit lakunaları ve osteoblastlarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. OPN immünoaktivitesi artışı deney grubunda yeni kemik ve bağ dokuda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,048-0,015$). ONC immünoaktivitesinde artış ta deney grubunda yeni kemik ve bağ dokuda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,005-0,000$).

Kontrol grubu ile lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup OPN immünoaktivitesi açısından değerlendirildiğinde; sadece bağ dokuda deney grubundaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,000$). Aynı gruplar ONC immünoaktivitesi için değerlendirildiğinde; Osteosit lakunaları ve bağ dokuda

deney grubundaki farklılık anlamlı iken ($P=0,000$), osteoblastlarda kontrol grubundaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,029$).

Deney Gruplarının Birbiri Arasında Karşılaştırılması

Tablo 2: ONC immünoaktivitesi için istatistiksel değerler $p<0,05$

Karşılaştırılan Gruplar	Osteosit P(Sig)	Osteosit Lakuna P(Sig)	Osteoblast P(Sig)	Yeni Kemik P(Sig)	Bağ Doku P(Sig)
Lokal+Allojen, Lokal+Sentetik	1,000	0,004	0,007	0,005	0,136
Sistemik+Allojen Sistemik+Sentetik	1,000	0,831	0,002	0,008	0,000
Lokal+Allojen Sistemik+Allojen	1,000	0,001	0,423	0,007	0,451
Lokal+Allojen Sistemik+Sentetik	1,000	0,000	0,014	0,721	0,000
Lokal+Sentetik Sistemik+Allojen	1,000	1,000	0,002	0,491	0,383
Lokal+Sentetik Sistemik+Sentetik	1,000	0,837	0,451	0,006	0,000

ONC immünoaktivitesi için istatistiksel değerlere (P) bakıldığında;

Osteositlerde karşılaştırılan gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı ($P=1$).

Osteosit lakunalarında; Lokal simvastatin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında allojen ve sentetik greft materyali uygulanan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,004$). Lokal simvastatin ve allojen greft grubuyla sistemik simvastatin grupları arasında ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

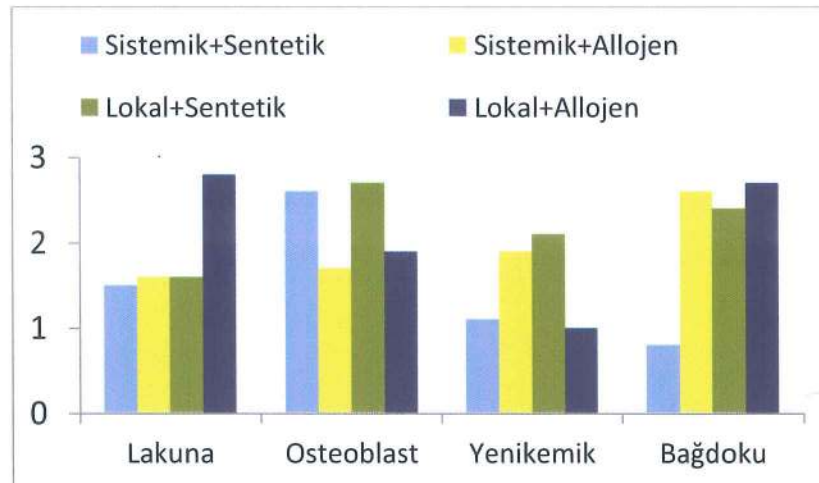
Osteoblastlarda; Lokal simvastatin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında allojen ve sentetik greft materyali uygulanan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,007$). Sistemik simvastatin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında allojen ve sentetik greft materyali uygulanan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,002$). Lokal simvastatin ve allojen

greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve sentetik greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,014$). Lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve allojen greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,002$).

Yeni kemik dokuda; Lokal simvastatin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında allojen ve sentetik greft materyali uygulanan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,005$). Sistemik simvastatin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında allojen ve sentetik greft materyali uygulanan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,008$). Lokal simvastatin ve allojen greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve allojen greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,007$). Lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve sentetik greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,006$).

Bağ dokuda; Sistemik simvastatin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında allojen ve sentetik greft materyali uygulanan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,000$). Lokal gruplar, sistemik simvastatin ve sentetik greft materyali uygulanan grupla karşılaştırıldığında aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,000$).

Grafik 1: ONC immunoaktivitesinin grafikte değerlendirilmesi



Tablo 3: OPN immünoaktivitesi için istatistiksel değerler (p< 0,05)

Karşılaştırılan Gruplar	Osteosit P(Sig)	Osteosit Lakuna P(Sig)	Osteoblast P(Sig)	Yeni Kemik P(Sig)	Bağ Doku P(Sig)
Lokal+Allojen, Lokal+Sentetik	0,746	0,018	0,654	0,044	0,032
Sistemik+Allojen Sistemik+Sentetik	0,776	0,648	0,648	0,490	0,687
Lokal+Allojen Sistemik+Allojen	0,737	0,342	0,006	0,000	0,786
Lokal+Allojen Sistemik+Sentetik	1,000	0,615	0,014	0,000	0,861
Lokal+Sentetik Sistemik+Allojen	0,574	0,084	0,007	0,006	0,038
Lokal+Sentetik Sistemik+Sentetik	0,779	0,042	0,018	0,002	0,074

OPN immünoaktivitesi için istatistiksel değerlere (P) bakıldığında;

Osteositlerde; karşılaştırılan gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı.

Osteosit lakunalarında; Lokal simvastatin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında allojen ve sentetik greft materyali uygulanan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P=0,018). Lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve sentetik greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P=0,042). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Osteoblastlarda; Lokal simvastatin ve allojen greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve allojen greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P=0,006). Lokal simvastatin ve allojen greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve sentetik greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P=0,014). Lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve allojen greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P=0,007).

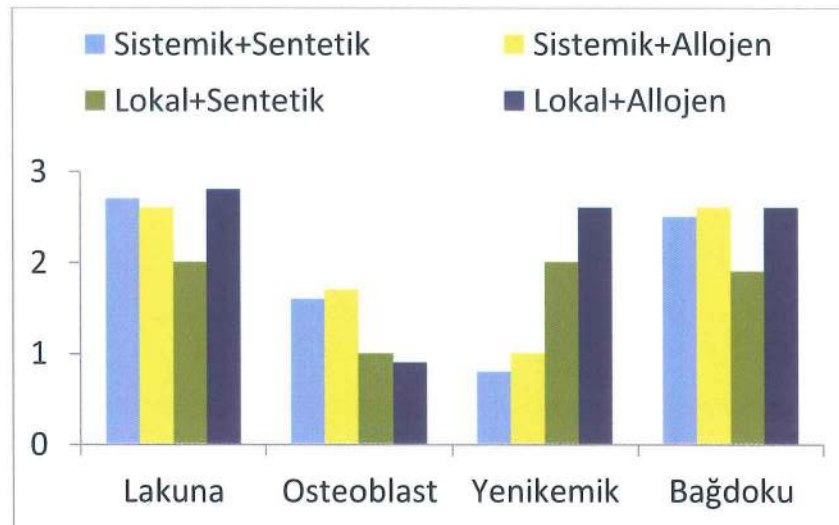
Lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve sentetik greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,018$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Yeni kemik dokuda; Lokal simvastatin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında allojen ve sentetik greft materyali uygulanan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,044$). Lokal simvastatin ve allojen greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve allojen greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,000$).

Lokal simvastatin ve allojen greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve sentetik greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,000$).). Lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve allojen greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,006$). Lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve sentetik greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,002$).

Bağ dokuda; Lokal simvastatin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında allojen ve sentetik greft materyali uygulanan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,032$). Lokal simvastatin ve sentetik greft uygulanan grup ile sistemik simvastatin ve allojen greft grubu arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,038$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Grafik 2: ONC immunoaktivitesinin grafiklerle değerlendirilmesi



TARTIŞMA

Mevcut literatürde yayınlanmış çalışmalardan farklı olarak planladığımız çalışmanın amacı; ratlarda kalvaryal yapıda oluşturulan kritik boyut kemik defektlerine lokal ve sistemik simvastatinin uygulamasının sentetik ve allojen greftler üzerine olan etkisinin histolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi ve simvastatinin bu kritik boyut kemik defektlerinin tedavisindeki rolünün incelenmesidir. Böylelikle hem lokal ve sistemik olarak simvastatin uygulamasının etki farkları hem de farklı yollardan verilen simvastatinin sentetik ve allojen greftler üzerine olan etkilerini karşılaştırmalı olarak inceledik.

Maksilofasiyal cerrahide çeşitli nedenlerle oluşan kemik defektlerinin rejenerasyonunun sağlanması amacıyla bu güne kadar literatürde birçok mekanik ve kimyasal ajanlar denenmiş ve halen de denenmektedir (61-63). Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda tercih edilen en yaygın uygulamalardan biri greft ogmentasyonları olsa da her anlamda ideal bir materyal kullanımı söz konusu değildir.

Son dönemlerde yapılan bazı çalışmalar incelendiğinde farmakolojik ajanların kemik iyileşme sürecine etkisi ile ilgili araştırmalar dikkat çekmektedir (67,68). Özellikle mevcut kolesterol düşürücü ilaçların en güçlü grubunu oluşturan statinlerin spesifik etkisinin yanı sıra anjiogenezde artma, antienflamatuar özellik gösterme, osteoklast proliferasyonunda azalma, kemik oluşumunda artma gibi bazı pleiotropik etkiler göstermesi kemik iyileşmesinde alternatif bir araştırma alanının ortaya çıkmasını sağlamıştır (74, 75).

Statinlerin kemikteki biyolojik etkilerini ilk defa 1999'da Mundy ve arkadaşları in vitro ortamda osteogenezisi stimüle ettiğini göstererek, bildirmişlerdir. Bu çalışmadan sonra statinlerin kemik üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmaların önü açılmıştır (5-8).

Mundy ve arkadaşları (5) statinlerin yeni doğan farelerin kalvaryumunda yeni kemik oluşumunu arttırdıklarını bulmuşlardır.

Sugiyama ve arkadaşları (114) ise simvastatin ve mevastatinin insan osteosarkoma hücrelerinde BMP-2, mRNA ve protein ekspresyonunu arttırdıklarını

rapor etmişlerdir. Statinlerin osteojenik etkileri diğer hücrelerde de görülmüştür. Aynı zamanda deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar ile statinlerin osteojenik etkileri doğrulanmıştır.

Chuengsamarn ve arkadaşları (115) statinlerin yüksek kolesterolü olan hastalarda kemik formasyonunu geliştirdiğini ve kemik mineral yoğunluğunu arttırdığını belirtmiştir. Buna ek olarak statinler, osteoklastik dönüşümün ve osteoblastik apoptozise engel olarak kemik rezorbsiyonunu azalttığını rapor etmişlerdir.

Statinlerin kemik oluşumu üzerine olan etkisi kemik morfogenetik protein-2 salınımı aracılığıyla oluşmaktadır. Wong ve Rabie, statinleri kullanılarak elde edilen iyileşme modelinin, direk olarak kemik morfogenetik proteini kullanılarak elde edilen iyileşme modeli ile benzer olduğunu söylemişlerdir (116).

Statin grubu ilaçların bir üyesi olan simvastatinin özellikle lipofilik olması nedeniyle kemiğe etkisinin daha fazla olabileceği ifade edilmiştir. İn vivo çalışmalarda özellikle lokal olarak uygulandığında simvastatinin, kemik gelişiminde statinler arasında en etkili ilaç olduğu belirtilmiştir (74, 78, 79, 80).

Wong ve Rabie (117) yaptıkları çalışmada simvastatin ile greftlenmiş kemik defektlerinde, greftlemeden sonraki 3. günde vasküler endotelial büyüme faktörü salındığını, 4. günde kemik morfogenetik proteini-2 salındığını ve 5. günde de yeni kemik oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Sağlıklı kemiğe kemik kalınlığını arttırmak amacıyla lokal simvastatin uygulandığında kemik kalınlığında değişik oranlarda artış görülmüştür. Simvastatinin kemik defekti iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada deney grubunda kontrol grubuna göre %308 oranında daha fazla yeni kemik oluşumu tespit edilmiş (118).

Sugiyama ve arkadaşları (119) farklı statinlerin etkilerini araştırdıkları çalışmada farklı uygulama metodları kullanarak BMP-2'nin ektopik osteoindüksiyon üzerine etkilerini incelemişlerdir. Subkutan ve oral yolla simvastatin veya cerivastatin uygulamışlar.

Çalışmanın sonucunda subkutan olarak verilen simvastatin grubunda anlamlı farklılık gözlemlenirken diğer gruplarda istatistiksel olarak farklılık anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamızda kritik boyut kemik defektlerinin iyileşmesine etkisini değerlendirmek için statin grubu ilaçlardan simvastatini kullandık ve yeni kemik formasyonunda yukardaki çalışmalarla paralel olarak artış tespit ettik, özellikle histolojik incelemeler lokal grupların yeni kemik oluşumunda sistemik gruplardan daha iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bizim çalışma sonuçlarımız Wong ve arkadaşları, Sugiyama ve arkadaşlarının, Chuengsamarn ve arkadaşlarının, Mundy ve arkadaşlarının simvastatin ile yaptığı çalışmaların sonuçlarına paralellik göstermektedir.

Kritik boyutlu bir defekt özellikle hayvanların belirli kemiklerindeki yaşam boyu iyileşemeyen en küçük kemik içi yara olarak tanımlanabilir. Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibroz bağ dokusuyla dolumu ve iyileşme eğilimi göstermektedirler. Kritik boyutlu bir defektin belirlenmesine etki eden iki faktör yaş ve hayvan türü önemli görülmektedir (120-122).

Kritik boyutlu defektin boyutunu, Takagi ve Urist (123), ratta 8 mm, fare ve tavşanda 15 mm, köpekte ve maymundada 20 mm olarak rapor etmişlerdir.

Schmitz ve arkadaşları (124) ise 3, 4, 5 ve 8 mm lik defektlerde çalışma yapmışlar ve 8 mm lik defektin ideal bir defekt olduğunu savunmuşlardır.

Literatürde belirtilen bilgileri göz önünde bulundurarak ratlarla yaptığımız çalışmada 8 mm'lik kritik boyut defektler oluşturuldu.

Kemik formasyonunu harekete geçirecek olan simvastatinin başarılı kullanımı lokal konsantrasyona ve uygun taşıyıcı sisteminin seçimine bağlıdır ve bu amaca hizmet eden birçok çalışma mevcuttur (125).

Wu ve arkadaşları (125) çekim sonrası alveol soketindeki rezorbsiyona simvastatin uygulamasının etkisini incelemişler. Simvastatin uygulanan ve uygulanmayan poliaktik asit taşıyıcılar çekim soketine yerleştirmişler ve 1, 2, 4, 8, 12. haftalarda ratlar kurbanı edilmiştir. Lokal olarak uygulanan simvastatinin çekim

soketindeki kemik formasyonunu arttırarak alveolar kemiği etkin biçimde zarardan koruduğunu histolojik kesitlerde göstermişlerdir.

Moriyama ve arkadaşları (126) titanyum implant etrafına lokal olarak uygulanan statinin osteogenezi arttırıp arttırmadığını araştırmayı amaçlayan çalışmalarında 10 haftalık dişi ratlara saf titanyum çubuklar fluvastatin ile veya fluvastatin olmadan uygulanmıştır. Propilen glikol aljinat taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Deney hayvanları 5 gruba ayırarak; sadece implant, implant ve PGA, implant ve PGA ile düşük doz statin, orta doz statin, yüksek doz statin uygulanmıştır.

İmplant etrafındaki kemik oluşumu histomorfometrik prosedürlerle, kemik-implant teması ve implant etrafındaki kemik yoğunluğunu ölçülerek değerlendirmişlerdir. Ayrıca mekaniksel itme testi uygulanarak implantın stabilitesi incelemişlerdir.

İtme kuvvetine dirençte fluvastatin uygulanan grupta statin uygulanmayan grup karşılaştırıldığında, fluvastatin uygulanan grupta itme kuvvetine dirençte önemli artış gözlenmiştir (126).

Calivito ve arkadaşları (127) lokal olarak uyguladıkları simvastatinin kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında, 64 adet rat kullanarak kalvaryumda 5 mm'lik defektler oluşturmuşlardır.

Çalışmada; deney hayvanları 4 gruba ayrılmış. 1. Grupta greft materyali uygulanmış, 2. Grupta greft materyali ile 2.2 mg simvastatin kollajen süngere emdirilerek uygulanmış, 3. grupta greft materyali ile 0.5 mg simvastatin, 4. Grupta ise greft materyaline su emdirilmiş kollajen sünger uygulanmıştır. 30 ve 60 gün sonra sakrifiye edilen deney hayvanları radyolojik ve histolojik olarak incelenmiştir. 30 gün sonraki incelemelerde gruplar arasında önemli farklılıklar gözlenmemiş iken, 60 gün sonra 3. ve 4. grupta çok az yeni kemik formasyonu görülmüştür.

Sonuç olarak lokal uygulanan simvastatinin rat kalvaryumunda oluşturulan defekt tamirine yararlı olmadığı sonucuna varmışlardır (127).

Wong ve arkadaşları (117) 30 Yeni Zelanda tavşanının parietal kemiğinde defekt oluşturmuşlar ve iyileşmekte olan kemiğe simvastatin uygulayarak ve

simvastatin uygulamadan VEGF, BMP-2 ve Cbfa-1'in erken dönem histolojik ekspresyonunu araştırmışlardır.

Statin grubunda (n=9), simvastatin solüsyonu emdirilmiş taşıyıcı kollajen matriks, greftlenen defekt bölgesine uygulanarak 1, 2, 3, 4, 5 ve 6. günlerde hayvanlar kurban edilmiştir.

Kollajen matriks grubunda defekte greftle birlikte su emdirilmiş kollajen matriks uygulanmış, operasyonu takiben 1 ve 6. günlerde hayvanlar kurban edilmiştir.

İmmunolokalizasyon çalışmaları statin grubunda operasyonu takiben 3. gün VEGF, 4. gün BMP-2, 5. gün Cbfa-1 eksprese olduğunu gösterirken, 5. günde yeni kemik oluşumunda gözlenmiştir. Bu bulgular taşıyıcı ve greft uygulanan grupta bir gün erken meydana gelmiştir.

Çalışma statinlerin lokal kemik formasyonunu uyardığını ve hızlandığını, anjiogenezi düzenleyen büyüme faktörlerinin erken ekspresyonunu sağladığını, kemik hücrelerinin değişimini ve osteogenezi başlattığını göstermiştir.

Chou ve arkadaşları (128) β TCP'yi taşıyıcı olarak kullanarak simvastatinin kemik iyileşmesine etkisini araştırmışlardır. β TCP ve simvastatin kombinasyonunun kemik formasyonunu diğer gruplara göre önemli miktarda arttırdığını bulmuşlardır.

Xu ve arkadaşları (129) simvastatinin osteojenik etkisini görmek için β Tcp ile birlikte ilacı kalvaryal defektlere uygulamışlar ve çalışma sonunda simvastatin yüklü β Tcp'nin defektin tamirinde başarılı olduğunu belirtmişlerdir.

Yukardaki çalışmalar doğrultusunda bizde greft materyallerini taşıyıcı olarak kullandık ve sonuç olarak lokal simvastatinin sentetik greft materyalleriyle kombine kullanıldığı grupta yeni kemik oluşumunun diğer gruplardan histolojik olarak daha etkili olduğunu saptadık. Xu ve arkadaşlarının, Chou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonuçları da β Tcp ile simvastatin kombinasyonunun kemik formasyonuna pozitif etkileri olduğunu ortaya koymuş ve bu sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Yapılan literatür incelemelerinde deneysel çalışmanın başarısı için optimal doz seçiminin avantajlar ve dezavantajlar göz önünde bulundurularak dikkatlice ayarlanmasının tedavi sürecini doğrudan etkileyeceği görülmüştür.

Mundy ve arkadaşları (5) 35 gün boyunca günlük 5-10 mg/kg dozlarda statin uygulanan overaktomize farelerde trabeküler kemik yoğunluğunda artış rapor etmişlerdir. Yapılan testler yüksek doz (20mg/kg) simvastatinin kemik formasyonunu arttırırken, düşük doz (1mg/kg) simvastatin uygulamasının kemik formasyonunu azalttığını ve kemik rezorbsiyonunu arttırdığını ortaya çıkartmıştır (130).

Metabolik işlem sürecinin farelerde insanlara oranla 10 kat daha fazla olduğunu göz önüne alan araştırmacılar farelere uygulanan 10mg/kg'lık dozun insanlarda 70 mg/kg'ye karşılık geldiğini ön görmüşlerdir (131).

İmplant osteointegrasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada simvastatinin etkisini ölçmek için günlük 50mg/kg'dan daha yüksek dozda simvastatin deri altına enjekte edildi. Sistemik olarak uygulanan aşırı yüksek doz simvastatinin karaciğer yetmezliği, böbrek rahatsızlığı, miyalji ve diğer yan etkilere sebep olduğu rapor edilmiştir (91, 132).

Bir başka çalışmada lokal olarak uygulanan 70mg/kg'lık dozun deri üzerinde iltihaplanmaya sebep olduğunu göstermişlerdir. Stein ve arkadaşları, farklı dozlarda simvastatin uygulamaları gerçekleştirmişlerdir ve bu uygulamalar sonucunda simvastatin dozunu düşürerek inflamasyonun azaltılabileceğinin sinyallerini bulmuşlar. Farelere uygulanan 1,7-2 mg/kg simvastatinin yumuşak doku şişkinliğini etkin bir biçimde azalttığını ve kemik büyümesine imkan sağladığını belirtmişlerdir (133).

Thylin ve arkadaşları (134) sağlıklı kemik yüzeyine 2.2mg simvastatin uygulamışlar ve enflamasyonun fazla görüldüğü deneklerde enflamasyonun az olduğu deneklere göre kemik kalınlığında belirgin artış olduğunu tespit etmişlerdir.

Stein ve arkadaşları (135) lokal olarak 0.1, 0.5, 1, 1.5 ve 2.2 mg dozlarda simvastatini sağlıklı kemik yüzeyine uygulamışlar ve sonuç olarak simvastatin dozunu düşürünce klinik enflamasyon bulgularının azaldığını, fakat bununla birlikte elde edilen yeni kemik miktarının da azaldığını belirlemişlerdir.

Skoglund ve arkadaşları (112) simvastatini subkütan olarak veya direkt fraktür bölgesine uygulayarak, fraktür tamirini uyaran kabul edilebilir dozları bulmayı amaçlamışlardır. Bu çalışma için 70 farenin femurunda fraktür oluşturarak stabilizasyonu sağlamışlardır.

İlk olarak 20 fareye subkutan olarak 20 mg simvastatin veya taşıyıcı enjekte etmişlerdir. Taşıyıcı 14 gün boyunca günde 24 saat kilogram başına 5 veya 10 mg simvastatin uygulamasına imkan vermektedir. İkinci olarak 30 fare 3 gruba ayrılmış ve subkutan olarak taşıyıcı madde uygulanmıştır. Taşıyıcı madde günde kilogram başına 5 veya 10 mg simvastatin içermektedir. Son olarak 20 farenin fraktür bölgesine osmotik mini pompa görevi gören silikon bir tüp yerleştirilmiştir. Bu yolla 10 fareye günlük kilogram başına 0.1 mg simvastatin lokal olarak deney boyunca uygulanırken, diğer 10 fareye taşıyıcı bileşik uygulanmıştır.

14 gün sonunda tüm deneyler bitirilmiş ve sakrifikasyon yapılmıştır, çalışma sonunda fraktür bölgesine direkt olarak uygulanan simvastatinin fraktür iyileşmesinin biyometrik parametrelerine pozitif etkisinin olduğu bulunmuştur (112).

Wong ve arkadaşları (131) simvastatin solüsyonunu 10mg/kg olacak şekilde subkutan yolla overektomize ratlarda tibiada oluşturulan fraktür bölgesine enjekte ederek ilacın kırık iyileşmesine etkisini incelemişlerdir. 1, 2 ve 4. haftalarda histolojik ve histomorfometrik çalışmalar yapılarak simvastatinin kırık iyileşmesini geliştirdiğini belirtmişlerdir.

Ayukawa ve arkadaşları (113) uyguladıkları titanyum implant etrafında kemik oluşumuna simvastatinin etkisini araştırmayı amaçlayarak 30 haftalık dişi ratların tibialarına implant uygulayarak 0, 0.125, 1, 5 ve 10 mg/kg simvastatini günlük olarak intraperitoneal olarak uygulamışlardır. 30 gün sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. İmplant etrafındaki kemik yüzdesi, kemik yoğunluğu ve kortikal kemik yüzdesi incelenmiştir.

Histometrik incelemeler 5 ve 10 mg/kg simvastatinin uygulanan gruplarda kemik temas oranı ve kemik yoğunluğunun diğer gruplara oranla önemli derecede iyi olduğunu göstermiştir. Gruplar arasındaki kortikal kemik yoğunluğunda ise önemli bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak 5 ve 10 mg/kg dozlarındaki simvastatinin implant etrafındaki kemik formasyonunu arttırdığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda simvastatin dozu belirlenirken yukarıda belirtilen çalışmalardan yararlanılarak simvastatin dozunun 10mg/kg olmasına karar verdik ve uygulanan bu dozun lokal gruplarda yeni kemik oluşumunda etkili olduğunu histolojik olarak saptadık.

Simvastatinin deneysel çalışmalarda farklı yöntemler kullanılarak uygulandığına dair örnekler literatürde mevcuttur.

Simvastatin ve alfa trikalsiyum fosfat greftini kombine kullanarak ratlarda oluşturdukları kalvaryal defekte lokal olarak uygulayarak kemik iyileşmesini inceledikleri bir çalışma yapan Nyan ve arkadaşları bu çalışmanın sonucunda osteoprogenitör hücrelerin çoğalması güçlenmesinin erken dönem kemik iyileşmesi için kritik aşama olduğunu ve bu aşamanın simvastatin ile uyarılan TGF- β 1 ve BMP-2 ekspresyonunun artmasıyla ilişkili olduğu belirtmişlerdir (136).

Moriyama ve arkadaşları (126) titanyum implant etrafına lokal olarak uygulanan fluvastatinin osteogenezi arttırıp arttırmadığını araştıran bir çalışma yapmışlar ve deney sonunda fluvastatin uygulanan grupla uygulanmayan grup karşılaştırıldığında itme kuvvetine dirençte önemli artış gözlemişlerdir.

Kılıç ve arkadaşları (137) lokal ve sistemik simvastatin uygulamasının distraksiyon osteogenezi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda uygulanan doz ve metod ile simvastatinin distraksiyon rejenerasyonuna limitli etkisinin olduğunu göstermişlerdir.

Sugazaki ve arkadaşları (138) topikal olarak uyguladıkları mavastatinin isogreft uygulanan kemikte kemik miktarını, kemik dönüşümünü arttırarak ve BMP-2, RANKL mRNA ekspresyonunu geliştirerek arttırdığını belirtmişlerdir.

Sistemik olarak uygulanan simvastatinin düşük dozda kırık iyileşmesi üzerine erken dönem anabolik etkisinin araştırıldığı çalışmada 54 adet tavşan kullanılmıştır. Kontrol grubu ve günlük 10 mg/kg, 30 mg/kg olmak üzere oral simvastatin uygulanan iki grup oluşturulmuştur.

Sonuç olarak günde 30 mg/kg simvastatin dozunun kallus oluşumuna negatif anabolik etki gösterdiği, 10 mg/kg simvastatin dozunun ise özellikle kırığın erken döneminde önemli bir pozitif veya negatif etki göstermediği belirtilmiştir (139).

Bir başka çalışmada oral ve subkütanoz olarak uygulanan simvastatinin tibia defektleri ve kan kolesterol seviyesine etkilerini araştırmışlar ve tibia defektlerinde kemik iyileşmesini geliştirmediğini ve kan kolesterol seviyesini düşürmediğini belirtmişlerdir (140).

Fu ve arkadaşları (141) yaygın olarak kullanılan sistemik ilaçlardan statinlerin implant etrafında kemik iyileşmesine etkisini araştırmışlar, lokal ve sistemik uygulanan statinlerin kemik formasyonunu ve yoğunluğunu arttırdığını bulmuşlardır.

Sıçanların kalvaryumunda oluşturulan deneysel defektlerde lokal ve sistemik olarak uygulanan simvastatinin, kemik iyileşmesi üzerine etkisi histolojik olarak değerlendirildiğinde, lokal uygulanan ilacın kemik iyileşmesinde daha etkili olduğu sonucuna vardık. Özellikle lokal simvastatin uygulanan gruplarda osteosit oluşumunun, osteblast aktivitesinin ve yeni kemik oluşumunun daha fazla olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar Nyan ve arkadaşlarının, Wu ve arkadaşlarının, Özeç ve arkadaşlarının, Wong ve arkadaşlarının, Sugazaki ve arkadaşlarının lokal olarak simvastatin uygulaması yaptıkları çalışmalarının kemik iyileşmesine etkisiyle ilgili sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (138-141).

Sentetik greft uygulanan defektlerde lokal ve sistemik ilaç uygulaması immunohistokimyasal olarak karşılaştırıldığında lokal grupta yeni kemik trabeküllerinde osteopontin (OPN) immunoaktivitesinde artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Allojen greft uygulanan defektlerde lokal ve sistemik ilaç uygulaması immunohistokimyasal olarak karşılaştırıldığında osteositlerde, osteosit lakunalarında, greft alanına doğru invaze olan bağ dokuda anlamlı bir farklılık görülmezken yeni kemik trabeküllerinde ise lokal ilaç uygulanan grupta izlenen osteopontin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Sentetik greft uygulanan defektlerde osteonektin (ONC) immünoaktivitesindeki artış, yeni oluşan kemikte ve bağ dokuda lokal simvastatin uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Allojen greft uygulanan defektlerde ONC immunoaktivitesinde artış; sadece osteosit lakunalarında lokal simvastatin uygulanan grupta sistemik simvastatin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızla birebir örtüşmese de distraksiyon osteogenezinde, kemikteki iyileşme sürecinin moleküler düzeyde OPN, ONC, OC gibi proteinlerin ekspresyonlarına bakılarak değerlendirilen çalışmada distraksiyon fazında bu proteinlerin dikkat çekici düzeyde arttığı belirtilmiştir (142). Bir başka çalışmada deneysel rat fraktürlerindeki iyileşmenin 7. ve 14. günlerinde OPN, ONC ve OC proteinlerinin osteoblast ve yeni kemik trabeküllerinde eksprese oldukları tespit edilmiştir (143).

İmmunohistokimyasal sonuçlarımızda özellikle lokal gruplarda osteoblast ve yeni kemik trabeküllerinde hem OPN hem de ONC ekspresyon düzeylerindeki artışın diğer gruplara göre istatistiksel anlamlılık taşıması, histolojik sonuçlarla paralel olarak lokal simvastatin uygulamasının kemik formasyonuna etkisinin daha fazla olmasından kaynaklanabileceği kanaatindeyiz.

Hiç şüphesiz ki bu tür deneysel çalışmaların başarısında uygulanan doz, uygulama şekli ve uygulama süresi ne kadar önemliyse sonuçların değerlendirilmesi aşamasında sakrifikasyon zamanı da o kadar önemlidir.

Farklı sakrifikasyon zamanlarının değerlendirildiği, çekim sonrası alveol soketindeki rezorbsiyona simvastatin uygulamasının etkisini inceleyen bir çalışmada 1, 2, 4, 8 ve 12. haftalarda ratların sakrifikasyonu planlanmış ve kemik mineral yoğunluğu 4, 8 ve 12. haftalarda sakrifiye edilen gruplarda önemli derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca 4. haftada geniş bir alanda yeni kemik oluşumu görülmüş ve 1. hafta hariç diğer haftalarda yüksek bir kemik formasyonu oranı ve kalitesi tespit edilmiştir (125).

Maksimum kemik oluşumu ile minimum inflamasyonun meydana geleceği optimal doz simvastatin ile alfa TCP kombinasyonunun çalışıldığı araştırmada 8. hafta daha fazla olmak üzere 2. ve 4. haftalarda da yeni kemik oluştuğu belirtilmiştir (144).

Nyan ve arkadaşları (136) simvastatin ve alfa trikalsiyum fosfat greftini kombine kullanarak ratlarda oluşturdıkları kalvaryal defektte kemik iyileşmesini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Oluşturulan defektlerde alfa TcP'yi simvastatin ile ve simvastatin olmadan uygulayarak aradaki farkı gözlemlemişlerdir. Deney hayvanları 3, 7, 10, 14 ve 21. günlerde sakrifiye edilmiş ve elde edilen dokular histolojik olarak incelenmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda osteoprogenitör hücrelerin çoğalması güçlenmesinin erken dönem kemik iyileşmesi için kritik aşama olduğu ve bu aşamanın simvastatin ile uyarılan TGF- β 1 ve BMP-2 ekspresyonunun artmasıyla ilişkili olduğu belirtmişlerdir. Bununla birlikte yeni kemik oluşumunun 14. ve 21. günlerin sonunda önemli derecede arttığını belirtmişlerdir (136).

Araştırmacıların (125, 136, 144) 4. haftayı takiben yeni kemik oluşumunun meydana geldiğini belirttiği çalışmalar rehberliğinde 30 günlük çalışma süresinin anlamlı bir sonuç elde etmek açısından yeterli olduğunu saptamış bulunmaktayız.

Alloplastik kemik materyalleri (hidroksilapatit, trikalsiyumfosfat vs) ve kemik allo greftlerinin sadece osteokondüktif etki göstermeleri, otojen kemik greftlerinin ise verici bölgede postoperatif komplikasyonlara sebep olması araştırmacıları hem osseoindüktif hem de osseokondüktif karakterli, allojenik ve düşük antijenik özellikte kemik grefti elde etmeye yönlendirmiştir. Bu amaçla, Otolize, antijeni çıkartılmış (deantijenize) allojenik kemik (AAA) ile çalışmalar yapılmıştır. Araştırmacılar, liyofilize veya diğer allojenik insan kemiklerinin aksine AAA kemiğin osseoindüktif olduğunu kısmen ya da tamamen demineralize edilmesinden dolayı da osseokondüktif olduğunu bulgulamışlar (145).

Stamm ve Foitzik (146), 1997 yılında kullanıma sunulmuş olan saf-faz β TCP seramiğinin (β - TricalciumPhosphate Ceramic) otolog kansellöz kemik ile kullanımında histolojik ve radyolojik bulguları incelemişler ve β TCP seramiğinin belirtildiği gibi biyouyumlu, osseokondüktif, tamamen rezorbe olabilen bir materyal olarak cerrahi alanda kullanımının başarılı sonuçlar vereceğini bildirmişlerdir.

Hirota ve arkadaşları (147) allogreft, β TCP, allojenik kemikle kombine β TCP'yi greft materyali olarak karşılaştırdıkları çalışmalarında; kemik formasyon

miktarı, β TCP absorpsiyon oranı ve ortamda kalan β TCP oranını karşılaştırmışlardır. Kombine greft materyalindeki kemik formasyonu allogreftle 5. Hafta sonunda aynı çıkarken, β TCP grubuna göre daha yüksek kemik formasyonu olduğunu görmüşlerdir.

Delawi ve arkadaşları (148) TCP, otogreft ve allogreti karşılaştırdıkları çalışmada tüm greft çeşitlerini ayrı ayrı uygulamışlar ve tcp ile lokal otojen grefti kombine kullanmışlardır. Spinal cerrahi sonrası bilgisayarlı tomografide kaynaşma oranları karşılaştırıldığında otogreft ve allojen greftlerde TCP ve TCP/otogreft kombinasyonuna göre önemli derecede yüksek kaynaşma tespit etmişlerdir. Düşük kaynaşma oranına rağmen TCP'nin otogreft ve allogreftte alternatif olabileceği belirtilmiştir.

Chesmel ve arkadaşları (36) otojen kemik greftinin ve dört değişik formdaki insan demineralize kemiğinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla ratlarda oluşturulan kranial defektlere otogreft, demineralize rat kemiği ve 4 değişik formdaki insan demineralize kemiğini uygulamışlar ve rat demineralize kemiğinin ve insan demineralize kemik türlerinin otojen greft ile benzer oranlarda yeni kemik yapımı oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Optimal dozda uygulanan simvastatinin ilacın yavaş yavaş salınımını sağlayabilecek osteokondüktif bir biyomateryal olan alfa-TCP ile kombine kullanılmasının kemik rejenerasyonunu stimule edeceğini belirten çalışmalar literatürde mevcuttur (136). Aynı araştırmacılar farklı simvastatin oranları ile kombine edilen alfa-TCP'nin erken dönem kemik iyileşmesinde moleküler ve hücresel etkilerini araştırmışlardır. 2,4 ve 8. Haftalarda kemik yoğunluğu TCP ile 0,1 mg simvastatin grubunda önemli derecede yüksek bulunmuştur. Defekt kapanma yüzdesi ve kemik mineral yoğunluğu da aynı grupta daha yüksek bulunmuştur. Optimal dozda simvastatinle uygulanan TCP'nin etkin bir kemik grefti materyali olacağı iddia edilmiştir (144).

Simvastatin ile allojen greftin birlikte kullanıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmadı fakat β TCP ile ilgili çalışmalar ve optimum dozda simvastatinin β TCP'nin etkin bir greft materyali olmasını sağladığı ortaya

konmuştur. β TCP kullanılan bu çalışmaların sonuçları aynı grefti kullandığımız gruplarda elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermiştir (128, 129) .

Histolojik çalışmaların sonucunda sentetik greft ile lokal simvastatinin kombine uygulandığı grupta kemik iyileşmesinin diğer gruplara göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Kemik iyileşmesinde daha başarılı olan lokal simvastatin uygulanan gruplarda; sentetik greft materyali uygulanan kesitlerde defekt kenarlarının yanı sıra defekt bölgesinde de yeni kemik oluşumu görülmüş ve allojen greft uygulanan kesitlere göre iltihabi hücrelerde belirli bir azalma gözlenmiştir. Sistemik uygulamalarda ise kısmen ya da çok az yeni kemik oluşumu görülmüştür.

İmmunohistokimyasal sonuçlarda lokal ilaç verilen gruplarda; allojen veya sentetik greft uygulanan defektler ONC ekspresyonda artış açısından değerlendirildiğinde; sentetik greft grubunda allojen greft grubuna göre yeni kemikte ve osteoblastta istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. OPN ekspresyonunda artış için aynı gruplar karşılaştırıldığında ise allojen greft uygulanan grupta yeni kemik ve bağ dokusunda istatistiksel olarak sonuçlar daha anlamlı çıkmıştır.

Lokal gruplarda yeni kemik trabekülleri ve osteoblastlarda ONC ekspresyonunun istatistiksel olarak daha anlamlı olmasının sentetik greftlerin daha ideal bir taşıyıcı olmasından kaynaklandığını düşündük. OPN ekspresyonundaki istatistiksel anlamlılığın ise allojen greft grubunun lehine olmasının bu proteinin zamana ve ekspresyon bölgesine göre farklı biyolojik roller üstlenebilmesinden kaynaklandığını düşündük.

Matriks proteinlerinin fonksiyonları hala tam olarak bilinmese de ekspresyon süreçlerinin dokuların onarımında, mineralizasyonun başlaması ve düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (149).

Literatürde yapılan çalışmalarla ilgili incelemelerde sonuçların değerlendirilmesinde farklı yöntemler tercih edilmiştir.

Nyan ve arkadaşları (136) simvastatinin kalvaryal defektlerde iyileşmeye olan etkisini değerlendirdikleri çalışmada histolojik incelemeyi tercih etmişlerdir.

Chissas ve arkadaşları (139), sistemik olarak düşük dozda uyguladıkları simvastatinin kırık iyileşmesine etkisini inceledikleri çalışmada sonuçları biyomekanik testler, histomorfometrik analiz ve bilgisayarlı tomografi kullanarak incelemişlerdir.

Kılıç ve arkadaşları (137) lokal simvastatinin distraksiyona etkilerini radyografik, CT ve histomorfometrik incelemelerle değerlendirmişlerdir.

Aykan (150) yaptığı çalışmada kobaylarda alveolar yapıda oluşturulan kemik defektlerinde farklı dozlarda lokal simvastatinin uygulaması sonrası oluşacak değişiklikleri histolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirmiştir.

Oliveira ve arkadaşları (151) rat mandibulasındaki cerrahi defektlerdeki kemik iyileşmesine simvastatinin etkisini immünohistokimyasal olarak incelemişlerdir.

Biz de çalışmamızda sonuçları histolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirdik. Osteosit, osteoblast, yeni kemik, bağ doku, osteosit lakunalarında; osteopontin ve osteonektin ekspresyonlarını immünohistokimyasal olarak inceleyen kemik dokuda iyileşmenin araştırdığı benzer çalışma çok azdır. Aykan ve arkadaşları, kemik siyaloprotein ve osteopontin ekspresyonu için immünohistokimyasal boyama yapmış, fakat OPN boyamalarında tüm hücrelerdeki boyama karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Oliveira ve ark., osteopontin ekspresyonu için boyama yapmışlardır ve simvastatinle tedavi edilen defektlerde yeni oluşan kemik matriksinin mineralize olan bölgelerinde OPN dağılımını izlemişlerdir.

Bizim sonuçlarımız Nyan ve arkadaşlarının (136), Wu ve arkadaşlarının (124), Moriyama ve arkadaşlarının (126) çalışmaları sonucunda buldukları sonuçlarla paralellik göstermektedir.

SONUÇLAR

Sentetik ve allojen greft materyalleri uygulanan kritik boyut kemik defektlerinde sistemik ve lokal simvastatin uygulamasının karşılaştırılmalı olarak incelendiği çalışmamızda;

1- Sentetik greft ve sistemik simvastatin uygulamasının kemik iyileşmesinde kısmen yarar sağladığı görüldü.

2- Allojen greft ve sistemik simvastatin uygulamasının kemik iyileşmesinde çok az yarar sağladığı görüldü.

3- Lokal simvastatin uygulanan gruplardan sentetik greftle kombine edilen grubun allojen greftle kombine edilen gruba göre daha etkili olduğu görüldü. Kemik defekti bölgesine uygulanan lokal simvastatin ile sentetik greft kombinasyonunun kemik iyileşmesinde diğer gruplara göre çok etkili olduğu belirlendi.

4- Kemik ogmentasyonlarının başarısını arttırmaya yönelik farmakolojik ajanlar için taşıyıcı olarak greft materyallerinin kullanılabileceği ve bu uygulamalarda sentetik greft materyallerinin allojen greft materyallerine göre daha etkili olduğu belirlendi.

5- Sentetik greft uygulanan defektlerde lokal ve sistemik ilaç uygulaması immunohistokimyasal olarak karşılaştırıldığında lokal grupta yeni kemik trabeküllerinde osteopontin (OPN) immunoaktivitesinde artış istatistiksel olarak anlamlı görüldü.

6- Allojen greft uygulanan defektlerde lokal ve sistemik ilaç uygulaması immunohistokimyasal olarak karşılaştırıldığında osteositlerde, osteosit lakunalarında, greft alanına doğru invaze olan bağ dokuda OPN immunoaktivitesinde anlamlı bir farklılık görülmezken yeni kemik trabeküllerinde ise lokal grupta izlenen OPN artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

7- Sentetik greft uygulanan defektlerde osteonektin (ONC) immünoaktivitesindeki artış, yeni oluşan kemikte ve bağ dokuda lokal simvastatin uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Allojen greft uygulanan defektlerde ONC immunoaktivitesinde artış; osteosit lakunalarında ve

yeni kemikte lokal simvastatin uygulanan grupta sistemik simvastatin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

8- İmmunohistokimyasal sonuçlarda lokal ilaç verilen gruplarda; allojen veya sentetik greft uygulanan defektler ONC ekspresyonunda artış açısından değerlendirildiğinde; sentetik greft grubunda allojen greft grubuna göre yeni kemikte ve osteoblastta istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. OPN ekspresyonunda artış için aynı gruplar karşılaştırıldığında ise allojen greft uygulanan grupta yeni kemik ve bağ dokuda istatistiksel olarak sonuçlar daha anlamlı bulundu.

Özellikle lokal uygulanan simvastatinin, literatürdeki birçok araştırmanın sonucuna göre de kemik rejenerasyonunu arttırdığı, yaptığımız çalışmanın sonucuna da paralellik gösterdiği ve bu farmakolojik ajanın optimum dozda, doğru uygulama yöntemleriyle, ideal bir taşıyıcıyla birlikte kullanımının araştırıldığı daha fazla çalışmanın yapılmasının önem arz ettiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1-Jones P, Kafonek S. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1998; 81: 582-7.
- 2- Bakker-Arkema RG, Davidson MH. Efficacy and safety of a new HMG CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in patients with hypertriglyceridemia. *JAMA* 1996; 275:128-33.
- 3- Paolo C, Edward TH. *Current Opinion in Cardiology*. Turkish Edition 2006; 1(1):34-41. Tokgözoğlu L. Ateroskleroz ve Enflamasyonun Rolü. *Türk Kardiyol Dern Ars* 2009; 37 Suppl 4: 1-6.
- 4- Sözen SB, Albayrak ES, Yazıcı M. Statinlerin Etki Mekanizmaları ve Akut Koroner Sendromda Statin Kullanımı. *MN Kardiyoloji* 2008;15: 138-145.
- 5- Mundy G, Garrett R. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1946-9.
- 6-Missana LR, Juarez J. In vivo bone formation stimulated by statins. *Conferencia; IADR 79th General Session & Exhibition*; 2001.
- 7-Serin-Kilicoglu S, Erdemli E. New addition to the statin's effect. *J Trauma*. 2007 Jul;63(1):187-91.
- 8-Ricky W.K. Wong, A. Bakr M. Rabieb Early healing pattern of statin-induced Osteogenesis *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* (2005) 43, 46-50.
- 9-Bloom and Fawcett.: *A Textbook of Histology*, 11 th. Ed. Saunders Comp., Philadelphia, 1986.
- 10-Erbengi T: *Histoloji 1*. Beta Basın Yayın Dağıtım, İstanbul, 1987.
- 11-Erkoçak A: *Genel Histoloji*; Ankara Üniversitesi yayınları, Ankara, 1980.
- 12-Kurt E. Johnson: *Histology and Cell Biology*. 2 nd. ed. Harwall Pub. Pennsylvania 1991.
- 13-Leeson. T, Leeson, R: *Text and Atlas of Histology*, W.B. Saunders Co. Philadelphia 1988.
- 14-Paker Ş: *Histoloji*, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları, Bursa: 1990.
- 15-Aslan M, Kemik Defektlerinin iyileşmesinde Kemik Greftlerinin ve Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu Yönteminin Etkilerinin incelenmesi ve Karşılaştırılması, *Doktora Tezi*, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2002.
- 16-Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO, Basic Histology. Aytekin Y, *Temel Histoloji*, İstanbul, Baris Kitabevi, 1998;132-146.
- 17-Gartner LP, Hiatt JL., *Color Textbook of histology*, 2nd Edition, W.B.Saunders Company, Philadelphia, Chapter 7, Cartilage and Bone, 2001, 129-153.
- 18-Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, *Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Quintessence Publishing Co., Coral Stream, Illinois Chapter 2, *Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy*, 1999, 17-55.
- 19-Alpaslan C, Irie K, Takahashi K. Long-term evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone formation with a biologic and synthetic delivery system. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1996;Oct;34(5):414-418.
- 20- Peterson LJ. *Principles Of Oral And Maxillofacial Surgery*. 1.ed.Philadelphia Lippincott-Raven Publishers; 1997.

- 21- Garg KA. Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants. 1th ed. China, Quintessence Publishing 2004 p1-13.
- 22-Erdoğan D, Görgün M, Hatiboğlu MT, Ilgaz.C. Genel Histoloji 2. Baskı, Ankara, Hatiboğlu Yayınevi 1999.
- 23-Tuskan C. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateryaller. . İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları no100, İstanbul 2002.
- 24-Clara M, Maskar Ü. Histoloji. İstanbul, Sermet Matbaası;1961:274-306.
- 25- Cormack DH.: Essential Histology, JB Lippincott Company, Philadelphia, Chapter 8, Dense Connective Tissue, Cartilage, Bone and Joints,1993, 159-190.
- 26-Akay MT. Genel Histoloji. 5. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık;2001.
- 27- Fonseca RJ, Walker RV. Oral and Maxillofacial Trauma, 1.ed Philadelphia W.B. Saunders Company 1991 p 31-44.
- 28-Eroschenko VP. Histoloji Atlası fonksiyonel ilişkileriyle. Demir R. 9. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2001.
- 29-Bancroft JD, Stevens A, A Theory and Practice of Histological Techniques. 4th edition, Churchill Livingstone, New York,1996; Chapter 15, Bone, 309-339.
- 30- Fawcett DW, Jesh RP: Bloom&Fawcett's Concise Histology, 2nd Ed., Amember of the Hodder Headline Group, London, Chapter 6, Bone, 2002, 87-99.
- 31-Cruess RL. Healing of bone,tendon and ligament : Fractures. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Co, 1984:1:147-167.
- 32-Brond AR, Rubin TC. Fracture Healing. Surgery of the Musculoskeletal System. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990:1: 93-114.
- 33-Ozaki A.Role of fracture hematoma and periyosteum during fracture healing in rats. Interaction of fracture hematoma and the periyosteum in the initial step of the healing process. J. Orthop. Sci 2000; 5(1):64-70.
- 34-Miller Mark D. Review of Orthopaedics. 2nd edition. 1996: 1-22.
- 35- Khan SN. Bone growth factors:Orthop. Clin. North Am. 2000; 31(3):375-388.
- 36-Chesmel KD, Branger J: Healing Response to Various Forms of Human Demineralized Bone Matrix in Athymic Rat Cranial Defects. J Oral Maxillofac Surg 56: 857, 1998.
- 37- Dupoirieux L: Experimental Study on Demineralized Bone Matrix (DBM) and Coral as Bone Graft Substitutes in Maxillofacial Surgery. Int J Oral Maxillofac Surg 23: 395, 1994.
- 38- Helm GA. Sheehan JM. Sheehan JP. : Utilization of Type 1 Collagen Gel, Demineralized Bone Matrix, and Bone Morphogenetic Protein-2 to Enhance Autologous Bone Lumbar Spinal Fusion. J Neurosurg 86:93, 1997.
- 39- Rabie ABM. Lie Ken Jie RKP: Integration of Endochondral Bone Grafts in the Presence of Demineralized Bone Matrix. Int J Oral Maxillofac Surg 25: 311, 1996 20.
- 40-Redondo LM. Cantera JMG. : Effect of Particulate Porous Hydroxyapatite on Osteoinduction of Demineralized Bone Autografts in Expenmental Reconstruction of the Rat Mandible. Int J Oral Maxillofac Surg 24: 445, 1995.
- 41-Giannoudis P, Psarakis S, Kontakis G. Can we accelerate fracture healing? Acritical analysis of the literature. Injury. 2007 Mar;38 Suppl 1:S81-9.

- 42-Gutierrez GE, Lalka D, Garrett IR, Rossini G, Mundy GR. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. *Osteoporos Int*. 2006;17(7):1033-42. DOI: 10.1007/s00198-006-0079-0
- 43- Türker M, Yücel S, Ağız, Dis, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi, Ankara, Atlas Kitapçılık, 1999; 426-433.
- 44-Moore WR, Graves SE, Bain GI, Australian and New Zealand Journal of Surgery; 2001, 71: 6, 354.
- 45-Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101. DOI: 10.1007/s005860100282
- 46- Beumer J, Curtis TA, Firteli DA. Maxillofacial Rehabilitation. The CV Mosby Company, 1979.
- 47-Sabiston DC, Textbook of Surgery The Biological Basis of Modern Surgical Practice. WB Saunders Company, 1991.
- 48-Keith DA, Atlas of Oral and Maxillofacial Surgery. W B Saunders Company, 1992.
- 49-Marks RE. ; Review Course in Oral and Maxillofacial Surgery (Principles of Reconstruction in Cancer Related Deformities) . Louisiana State University Medical Center, November 15-21, 1986.
- 50-Marx R E, Carlson E R . Tissue Banking Safety: Caveats and Precautions for the Oral and Maxillofacial Surgeon. *J Oral Maxillofac Surg* 51: 1372-1379 , 1993
- 51-Hislop WS, Finlay PM, Moos KF . A Preliminary study into the uses of Anorganic Bone in Oral and Maxillofacial Surgery. *British J.Oral Maxillofac. Surg*.
- 52-Karaca I, Yaman S, Uğar DA, Aral L, Arıcıoğlu A, İşman F. An Investigation of Serum Alkaline Phosphatase, Calcium and Phosphate Levels after Intramedullary Implantation of Pyrost in Humans. *Biochemical Archives*. Vol.13, 69-74, 1997.
- 53-Karaca İ, Türker M, Akbay C. Experimental Investigation of Bone Regeneration Using Pyrost in Animals. *J.Nihon Univ.Sch.Dent.*, 36 : 95- 101 , 1994.
- 54-Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG.: Bone Grafts, Derivates and Substitutes. Butterworth - Helelmann Company. Oxford, 3 - 80 , 1994
- 55- Swenson CL, Arnoczky SP: Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg Am* 2003, 85-A(2):323-32.
- 56-Ellis III E. Surgical reconstruction of defects of jaws. In Peterson LJ, eds. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*. St. Louis. Cv Mosby;1998:680-4.
- 57-Bloomquist DS, Turvey TA. Modern practice in orthognatic and reconstructive surgery. In Fonseca Volume 2, Philadelphia, London. WB Saunders Company; 2000:513-21.
- 58-Khan SN, Tomin E, Lanr JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*.2000;31:389-96.
- 59-Burchardt H. Biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 1983;174: 28-42.
- 60-Seiler JG, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc*.2000; 9:91-7.
- 61-Tina Histing, Kerstin Marciniak, Sildenafil Accelerates Fracture Healing in Mice Department of Trauma, Hand and Reconstructive Surgery, University of Saarland

- 62-Young-Hee Lee a, Govinda Bhattarai Bone regeneration around N-acetyl cysteine-loaded nanotube titanium dental implant in rat mandible a Department of Oral Biochemistry, Institute of Oral Bioscience, BK21 Program, School of Dentistry.
- 63-Yaman F, Atilgan S, Günes N Phosphodiesterase-5 inhibitors may facilitate bone defect recovery. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, University of Dicle, Diyarbakir, Turkey.
- 64-Back DA, Pauly S, Rommel L Effect of local zoledronate on implant osseointegration in a rat model. Department of Orthopedics and Traumatology, German Armed Forces Hospital Berlin, Berlin, Germany.
- 65-Günay M, Amanvermez R, Ankaferd Blood Stopper: Does it have a role in fracture healing? Turk J Med Sci (2013) 43: 733-738.
- 66-Michael R. Chen • Jason L. Dragoo - The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on tissue healing. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (2013) 21: 540–549.
- 67-Andrew G. Park, David N. Paglia, Local Insulin Therapy Affects Fracture Healing in a Rat Model. Department of Orthopaedics, University of Medicine, Dentistry of New Jersey New Jersey Medical School.
- 68-Sytowski PA, Kannel WB, D'Agostino RB. Changes in risk factors and decline in mortality from cardiovascular disease: the Framingham study. N Engl J Med 1990; 322: 1635-1641.
- 69-Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). Circulation 1998; 97: 1440–5.
- 70-Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science 2001; 292: 1160-4.
- 71-Paolo C, Edward T.H. Current Opinion in Cardiology. Turkish Edition 2006; 1(1):34-41.
- 72-Masumoto A, Hirooka Y, Hironaga K, et al. Effect of pravastatin on endothelial function in patients with coronary artery disease (cholesterol-independent effect of pravastatin). Am J Cardiol 2001; 88: 1291–4.
- 73-Qian Zhou, MD; James K. Liao, MD. Pleiotropic Effects of Statins. Basic Research and Clinical Perspectives . Circ J 2010; 74: 818–826.
- 74-Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2002.
- 75- Goldstein C, Sprague S, Petrisor BA. Electrical stimulation for fracture healing: current evidence. J Orthop Trauma. 2010 Mar;24 Suppl 1:S62-5. doi:10.1097.
- 76- Horiuchi N, Maeda T. Statins and bone metabolism. Oral Diseases 2006;12:85-101.
- 77-Basarir K, Erdemli B, Can A, Erdemli E, Zeyrek T. Osseointegration in arthroplasty: can simvastatin promote bone response to implants? Int Orthop. 2009 Jun;33(3):855-9. DOI: 10.1007/s00264-007-0490
- 78-Caplan AI, Pechak DG. The cellular and molecular embryology of bone formation, in Bone and Mineral Research. Vol. 5. New York: W.A. (Ed.), Elsevier; 1987 117-184.
- 79-Bassett CAL. Biophysical principles affecting bone structure. İçinde Bourne GH, editör. Biochemistry and physiology of bone. 2nd ed. New York: Academic Press; 1971. p. 341–76.
- 80-Chan KA, Andrade SE, Boles M, Buist DS, Chase GA, Donahue JG ve ark. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. Lancet. 2000 Jun 24;355(9222):2185-8.

81-Chan MH, Mak TW, Chiu RW, Chow CC, Chan IH, Lam CW. Simvastatin increases serum osteocalcin concentration in patients treated for hyper cholesterolaemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (9): 4556-9. doi: 10.1210/jc.86.9.4556

82-Chen Y. Orthopedic applications of gene therapy. *J Orthop Sci.* 2001;6(2):199- 207. DOI: 10.1007/s007760100072

83-Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24 Suppl:237-59.

84-Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Güngör T, Harrity TW ve ark. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res.* 2003 Jan;18(1):88-96. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.1.88.

85-Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med.* 2002 Feb 14;346(7):539-40.

86-Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology* 2003;144:681-692.

87-Edwards CJ, Spector TD. Statins as modulators of bone formation. *Arthritis Res* 2002;4: 151-153.

88- Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C, Ailhaud G, Dani C. Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:478-484.

89-Song C, Guo Z, Ma q et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in Mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res commun.* 2003;398:458-462.

90-Massaró EJ, Rogers JM. The Skeleton Biochemical, Genetic and Molecular Interactions in Development and Homeostasis. Totawa,NJ: Humana Press Inc; 2004.

91-Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58: 3-18.

92- Yamashita M, Otsuka F , et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- α inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol.* 2008;196:601-13.

93-Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, Del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11:E47-51.

94- Sakoda K, Yamamoto M, Negishi Y, Liao JK, Node K, Izumi Y. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. *J Dent Res.* 2006;85:520-3.

95- Takenaka M, Hirade K, Tanabe K, Akamatsu S, Dohi S, Matsuno H, et al. Simvastatin stimulates VEGF release via p44/p42 MAP kinase in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301:198-203.

96- Özgürtaş T, Kutluay T: Yeni kemik markırları ve klinik kullanımları. *Gata Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD. T Klin. Tıb. Bilimleri* 2001: 523-527.

97-Partfitt A.M., Simon I.S. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis bone: correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res.* 2:427-436

98-Allegri S JR, Allegri MR, Yoshimoto M, et al. Soft tissue integration in the neck area of titanium implants-an animal trial. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: 117-132.

- 99-Zietek M, Gedrange T, Mikulewicz T. Long term evaluation of biomaterial application in surgical treatment of periodontitis. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: 81-86.
- 100-Hauschka PV, Lian JB. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989 Jul;69(3):990-1047
- 101-Lian J.B., Gundberg C.M. (1998) Osteocalcin: Biochemical considerations and clinical applications. *Clinical Orthopedic Related Research*, 226:267-291
- 102-Yumoto K., Ishijima M. 2002. Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*;2, 99(7):4556-61
- 103-Mazzalli M. Kipari T. (2002). Osteopontin a molecule for all seasons. *OJM*: 3-13
- 104-Giachelli C.M., Steitz S. (2000) Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization, *Matrix Biol*: 19(7):615-22
- 105-McKee M.D., Nanci A. (1996). Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover and repair, *Micros. Res. Tech*;1,33(2):141-64
- 106-Termine JD, Kleinman HK, Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*. 1981 Oct;26(1 Pt 1):99-105.
- 107-Bhattacharya S, Bunick CG, Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 6;1742(1-3):69-79. Review.
- 108-Purcell L, Gruia-Gray J, Developmental anomalies of *Xenopus* embryos following microinjection of SPARC antibodies. *J Exp Zool*. 1993 Feb 1;265(2):153-64.
- 109-Delany AM, Amling M, Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000 May;105(9):1325. No abstract available.
- 110-Mansergh FC, Wells T, Osteopenia in Sparc (osteonectin)-deficient mice: characterization of phenotypic determinants of femoral strength and changes in gene expression. *Physiol Genomics*. 2007 Dec 19;32(1):64-73. Epub 2007 Sep 18.
- 111-Bradshaw AD, Sage EH, SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest*. 2001 May;107(9):1049-54.
- 112-Björn Skoglund* and Per Aspenberg. Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2007, 8:98 doi:10.1186/1471-2474-8-98.
- 113-Ayukawa Y, Ogino Y. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. *Journal of Oral Rehabilitation* 2010 37; 123–130.
- 114-Sugiyama, M., Kodama, T., Konishi, K., Abe, K., Asami, S. And Oikawa, S. (2000) Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 688–692
- 115-Chuengsamarn, S., Rattanamongkoulgul, S., Suwanwalaikorn, S., Wattanasirichaigoon, S. and Kaufman, L. (2010) Effects of statins vs. non-statin lipid-lowering therapy on bone formation and bone mineral density biomarkers in patients with hyperlipidemia. *Bone* 46, 1011–1015
- 116-Wong RW, Rabie AB. Histologic and ultrastructural study on statin graft in rabbit skulls. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1515-21.
- 117-Wong RW, Rabie AB. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2005; 43: 46-50.

118-Wong RWK, Rabie ABM. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003; 41: 244-8.

119-T Sugiyama, T Nakagawa. Subcutaneous administration of lactone form of simvastatin stimulates ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Oral Diseases* (2007) 13, 228–233.

120-Frame JW.: A convenient animal model for testing bone substitute materials . *J.Oral Surg.* 38:176 ,1980.

121-Rowe NL.: Nonunion of the mandible and maxilla *J.Oral Surg.*27:520.1969

122-Takagi K., Urist MR.: The reaction of the dura the bonemorphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann.Surg.*196.:100,1982.

123-Urist. M.R. New advances in bone resarch .*West J.Med.*141:71.1984.

124-Schmitz JP., Schwartz Z., Hollinger JO., Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel).*;138(3):185-92,1990.

125-Wu Z, Liu C, Zang G, Sun H. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37:170-6.

126-Yasuko Moriyama. Topical application of statin affects bone healing around implants. *Clin. Oral Impl. Res.* 19, 2008; 600–605.

127-Jimmy Cavalcanti Calixto The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 39 (2011) 215-220.

128-Chou J, Ito T, Otsuka M. The effectiveness of the controlled release of simvastatin from β -TCP macrosphere in the treatment of OVX mice. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013 Jun 20. doi: 10.1002/term.1784.

129-Xu LY, Sun XJ. Repair of calvarial defect using a tissue-engineered bone with simvastatin-loaded β -tricalcium phosphate scaffold and adipose derived stem cells in rabbits. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2013 Aug;22(4):361-7.

130-Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1636-41.

131-Wang JW, Xu SW, Yang DS, Lv RK. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporos Int.* 2007;18:1641-50.

132-Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci.* 2007;104:384-6.

133-Jun-Beom Park. The use of simvastatin in bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Sep 1;14 (9):e485-8.

134-Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, Reckling RR, Ojha J, Bhattacharyya I, Marx DB, Reinhardt RA. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *J Periodontol* 2002; 73: 1141-8.

135- Stein D, Lee Y, Schmid MJ. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol* 2005; 76: 1861-70.

136-Myat Nyan, Takayuki Miyahara. Molecular and Tissue Responses in the Healing of Rat Calvarial Defects After Local Application of Simvastatin Combined With Alpha Tricalcium Phosphate. 2009 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 93B: 65–73, 2010.

- 137-Erdem Kılıç. Effects of Simvastatin on Mandibular Distraction Osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 66:2233-2238, 2008.
- 138-Masaki Sugazaki, Hiroaki Hirotani, Effects of Mevastatin on Grafted Bone in MRL/MpJ Mice. *Connective Tissue Research*, 51: 105–112, 2010.
- 139-Dionysios Chissas. Can low doses of simvastatin enhance fracture healing? An experimental study in rabbits. *Injury, Int. J. Care Injured* 41 (2010) 687–692.
- 140-Anbinder AL. Influence of Simvastatin on Bone Regeneration of Tibial Defects and Blood Cholesterol Level in Rats. *Braz Dent J* (2006) 17(4): 267-273.
- 141-Fu JH, Bashutski JD. Statins, glucocorticoids, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: their influence on implant healing. Department of Surgical Specialties, University of Nebraska Medical Center, College of Dentistry, Lincoln 68583-0757, USA.
- 142-Sato M, Expression of Bone Matrix proteins mrna during distraction osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research* Volume 13, Number 8, 1998.
- 143-Hirakawa K. Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by in situ hybridization. *Journal of Bone and Mineral Research* Volume 9, Issue 10, pages 1551–1557, October 1994.
- 144-Myat Nyan. Effects of the combination with a-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clin. Oral Impl. Res.* 20, 2009; 280–287.
- 145-Kübler N, Reuther J, Kirchner T, Priessnitz B, Sebald W, Osteoinductive, Morphologic, and Biomechanical Properties of Autolyzed, Antigen-Extracted, Allogeneic Human Bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 51:1346-1357,1993.
- 146-Stamm SM, Foitzik C. Sinüs Floor Elevation with Autologous Bone and Cerasorb. First Histological and Radiolpgical Studies. 1998.
- 147-Hirota M, Matsui Y, Combination with allogenic bone reduces early absorption of beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) and enhances the role as a bone regeneration scaffold. Experimental animal study in rat mandibular bone defects. *Dent Mater J.* 2009 Mar;28(2):153-61.
- 148-Delawi D, Krut MC, Comparing autograft, allograft, and tricalcium phosphate ceramic in a goat instrumented posterolateral fusion model. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013 Nov;19(11):821-8. doi: 10.1089/ten.TEC.2012.0576. Epub 2013 May 30.
- 149-Sommer B. Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone* Vol. 19, No. 4 October 1996:371-380.
- 150-Aykan T. Simvastatinin deneysel alveol defektlerine etkilerinin değerdendirilmesi. Gazi Üniversitesi. Doktora Tezi. 2007.
- 151-Oliveira NM. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:170-179.

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Onur

Soyadı: Doksöz

Doğum Yeri ve Tarihi: Hatay/Antakya 06,03,1984

Eğitimi:

Lise eğitimimi Osman Ötken Anadolu Lisesinde tamamladım.

2003 yılında İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'ne girmeye hak kazandım ve 2008 yılında mezun oldum.

2009 yılından itibaren Dicle Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalında Doktora Programına başladım ve 2014 yılında doktora programını bitirmeye hak kazandım.

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: AÇBİD