

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANA BİLİM DALI

**SİMVASTATİNİN DENEYSEL ALVEOL DEFİKTLERİNE ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Tuba AYKAN

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Emel ÖKTE

ANKARA

EKİM 2007

GİRİŞ VE AMAÇ

Periodontal hastalıklar etyolojisinde spesifik veya bir grup mikroorganizmanın rol aldığı, epitelyal ataşmanın apikale migrasyonu, bağ doku ve alveol kemiğinin kaybı ile karakterize bir enfeksiyondur.¹ Periodontal hastalıklar yetişkinlerde diş kaybının en önemli nedenidir ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından dünyada en sık rastlanan hastalık olarak tanımlanmaktadır.^{2,3,4}

Periodontal tedavide rejenerasyonu sağlamak amacıyla günümüze kadar çeşitli cerrahi teknikler ve biyomateryaller geliştirilerek denenmiştir. Bunlar arasında otojen kemik greftleri⁵, allogreftler⁶, ksenogreftler⁷, alloplastlar⁸, kök yüzeylerinin biyolojik preparasyonu⁹, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniği¹⁰, mine matriks proteinleri¹¹ ve büyüme faktörleri¹² yer almıştır. Periodontal rejeneratif tedavilerde kullanılan biyomateryaller, osteogenezisi ve sementogenezisi başlatmalı, alıcı tarafından tamamen kabul edilmeli, kolay bulunabilmeli ve ucuz olmalıdır. Greft materyalleri ile çeşitli oranlarda başarı sağlanmışsa da, elde edilme zorluğu, başta hepatit ve HIV gibi çeşitli kan hastalıkları olmak üzere çeşitli hastalıkları taşıma riskinin bulunması, maliyetlerinin çok yüksek olması ve periodontal dokuların tam olarak rekonstrüksiyonu sağlayamamaları gibi dezavantajları bulunmaktadır.^{13,14} Bütün bu olumsuzluklar nedeni ile periodontal kemik kayıplarında rejenerasyonu sağlamaya yönelik teknik ve materyaller üzerindeki çalışmalar halen devam etmektedir.

Son yıllarda periodontitiste oluşan kemik defektlerinde lokal kemik oluşumunun uyarılması için, sistemik olarak kullanılan bazı ilaçlarının lokal uygulamasının alternatif bir yöntem olabileceği ileri sürülmüştür.¹⁵

Hidroksimetilglutaril-koenzim A redüktaz (HMG- CoA redüktaz) inhibitörleri olarak da tanımlanan statinler, yüksek kan kolesterol seviyesi bulunan hastalarda serum kolesterol konsantrasyonunu düşürmek için yaygın olarak kullanılan en etkili ilaçlardır.¹⁶ Statinler tarafından HMG- CoA redüktaz enziminin inhibisyonu sonucu statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinin dışında sinir sistemi, immün sistem, kardiyovasküler sistem ve iskelet sistemi üzerinde de bazı yararlı etkilere neden olduğu belirtilmektedir.¹⁷ Statinlerin iskelet sistemi üzerine, osteoklastların aktivasyonunu inhibe ederek ve kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) geninin açığa çıkmasını sağlayıp kemik oluşumunu artırarak yararlı etki gösterdikleri çalışmalarda yer almaktadır.^{16,18}

Osteopöroz ile ilgili deneysel çalışmalarda, sistemik verilen statinlerin trabeküler kemik hacminde artışa neden olduğu saptanmıştır.^{19,20} İnsanlarda ise statinlerin sistemik kullanımının kırık riskini azalttığı,^{21,22,23,24} kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı^{21,25} ve serumda bulunan osteokalsin, alkalen fosfataz gibi kemik biyomarkerlarında artışa neden olduğu^{26,27,28} yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiş ve statinlerin osteopöroz gibi sistemik kemik hastalıklarının tedavisinde kullanabilecek potansiyel ilaçlar olduğu bildirilmiştir.²⁹

Statin grubu ilaçların bir üyesi olan simvastatinin¹⁴ de özellikle lipofilik olması nedeniyle kemiğe etkisinin daha fazla olabileceği ifade edilmiştir.^{16,30} İn vivo çalışmalarda özellikle lokal olarak uygulandığında simvastatinin, kemik gelişiminde statinler arasında en etkili olduğu belirtilmiştir.^{15,31,32} Simvastatinin farklı doz ve taşıyıcılar ile sistemik, lokal ve enjeksiyon gibi değişen şekillerde uygulanarak değerlendirildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır.^{15,33,34,35} Farelerde bacakta oluşturulan kırık bölgesine³⁴ ve kafatasına¹⁵ enjeksiyon yoluyla uygulanan simvastatinin yeni kemik oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir. Wong ve Rabie kemik defektlerine kollajen matriks içerisinde uygulanan simvastatinin, lokal olarak kemik oluşumunu hızlandırdığını ve anjiogenez, kemik hücrelerinin farklılaşması ve osteogenezi düzenleyen büyüme faktörlerinin erken açığa çıkmasını sağladığını göstermişlerdir.³³ Ancak literatürde simvastatinin kemik yapımı için gerekli olan optimal dozu ve en uygun taşıyıcı ile ilgili arayışlar halen devam etmektedir.

Statinler diş hekimliğinde çok az sayıda çalışma ile değerlendirilmiştir. Restrospektif yapılan bir çalışmada başlangıç periodontal tedavi sonrasında 3 yıl sistemik olarak statin kullanan kronik periodontitis hastalarında diş kaybının %48 oranında azaldığı bulunmuştur.³⁶ Ancak, Saver ve arkadaşları sistemik statin kullanan hastaları yine retrospektif olarak incelediklerinde, statin kullanımının kronik periodontitisi iyileştirmede iddia etmişlerdir.³⁷

Yapılan kültür çalışmalarında simvastatinin periodontal ligament³⁸ ve osteoblast hücreleri^{38,39} üzerinde yararlı etkisi olduğu bildirilmiş ve periodontal rejeneratif tedavide kullanılabileceği iddia edilmiştir.

Deneysel olarak periodontitis oluşturulan farelerde enjeksiyon yolu ile lokal uygulanan simvastatininin etkisini histolojik ve radyografik olarak

değerlendiren bir çalışmada ise simvastatinin kemik rezorpsiyon miktarını ve ataşman kaybını önemli derecede azalttığı gösterilmiştir.⁴⁰

Bütün bu bilgiler göz önünde alındığında, simvastatinin periodontal hastalıklarda izlenen kemik defektlerine uygulanmasıyla pozitif sonuçlar elde edilebileceği izlenimi olmasına karşın, konuyla ilgili çalışmaların simvastatinin klinik kullanımını henüz desteklemediği ve birçok bilinmeyen var olduğu görülmektedir. Ayrıca literatür bilgilerimiz dahilinde farklı dozlardaki simvastatinin kemik defektlerine etkisini karşılaştıran ve konuyu immünohistokimyasal olarak bir araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle çalışmamızın amacı, kobaylarda alveolar yapıda oluşturulan kemik defektlerine farklı dozlarda lokal simvastatinin uygulaması sonrası oluşacak değişikliklerin histolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirerek simvastatinin bu kemik defektlerinin tedavisindeki rolünü incelemektir.

GENEL BİLGİLER

Periodontal tedavinin amacı periodontal hastalığın ilerlemesini durdurmanın yanı sıra periodontitis sonucunda yıkıma uğramış, kaybedilmiş periodontal dokuların yapı ve fonksiyon olarak yeniden eski sağlıklı durumlarına dönmelerini sağlamaktır.³⁸

Derin kemik içi defektlerin tedavisinde kaybolan dokuların rekonsrüksiyonu için otojen kemik greftleri⁵ demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftleri⁶, ksenogreftler⁷, alloplastlar⁸, asit uygulamaları⁹, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniği¹⁰, mine matriks proteinleri¹¹ ve çeşitli büyüme faktörleri¹² tedavi seçenekleri arasında değişen başarı oranları ile uygulanmıştır. Bu materyaller osteogenez, osteoindüksiyon veya osteokondüksiyon yoluyla defektlerin iyileşmesinde yer almıştır.⁴¹

Altın standart olarak kabul edilen otojen kemik greftlerinin ikinci bir operasyon alanı gerektirmesi, operasyon süresinin uzaması, elde edilecek kemik grefti miktarının sınırlı olması, hastanın psikolojik stresini arttırması ve postoperatif dönemde hastada ağrı, infeksiyon, hipersensivite meydana getirebilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır.^{13,41,42}

Otojen greftlerin bu dezavantajlarından dolayı kemik defektlerinin tedavisinde allogreftler, heterogreftler ve alloplastlar kullanılmaya başlanmıştır. Allogreftler otojen greftlerle karşılaştırıldıklarında osteojenik özellikleri daha düşük, rezorpsiyon oranları yüksek ve kanlanmaları otojen greftlere oranla daha azdır. Allogreftler başka bir vericiden elde edildikleri için, kullanıldıklarında allerjik reaksiyon meydana gelebilir ve HIV virüsünü içeren infeksiyöz hastalıkların geçiş riski mevcuttur.^{13,43} Yine hayvan kaynaklı olan heterogreftler kullanıldığında da muhtemel patojenlerin bulaşma riski vardır.⁴¹

Alloplastik materyallerin hastalık geçiş riski bulunmaması ve biyolojik olarak güvenli olması gibi avantajları vardır.⁴⁴ Bununla birlikte alloplastik materyallerle elde edilen klinik sonuçlar umut verici olarak görülmesine rağmen histolojik olarak incelendiğinde minimal kemik oluşumu meydana geldiği veya kemik oluşumu olmadan greftin bağ doku ile enkapsüle olduğu görülmüştür.⁴⁵

İnsanlarda yapılan histolojik çalışmalar ve kontrollü klinik çalışmalar bazı greft uygulamalarında iyileşmenin rejenerasyon şeklinde gerçekleştiğini gösterirken günümüzde periodontal dokuların tam olarak rekonstrüksiyonunu elde etmek hala güçtür.⁴⁶

Periodontal rejenerasyon iki farklı sert doku (sement ve kemik) ve iki farklı yumuşak doku (dişeti ve periodontal ligament) hücrelerinin tamamen işbirliği içerisinde etkileşimini gerektiren oldukça kompleks bir yara iyileşmesi işlemidir.⁴⁷ Periodontal doku rejenerasyonu, spesifik progenitör hücrelerin repopülasyonunu isteyen, uygun hücrelerin iyileşme bölgesine gelmesini takiben kemik ve sement gibi mineralize dokuların oluşumu ve fonksiyonel periodontal ligament gelişimi için ekstraselüler matriks oluşumu ve matürasyonunu gerektiren karmaşık bir olaydır.⁴⁸

Son zamanlarda yapılan çalışmalar yara tamiri veya rejenerasyonunu düzenleyen mekanizmaları hücresel ve moleküler düzeyde anlamaya yönelmiştir.⁴⁸ Hasar görmüş dokuların rejenerasyon veya tamir ile iyileşmesi doğru hücrelerin ve sinyallerin mevcudiyetine bağlıdır ve bu hücreleri uyarmak ve çalıştırmak için ortam gereklidir. Sinyaller, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi difuze olabilen faktörler tarafından sağlanırken, ekstraselüler matriks (ESM) hücrelerin bu sinyallere nasıl cevap vereceğini düzenler.⁴⁷ Ekstraselüler matriks periodonsiyumun önemli yapısal bir komponentidir ve içerisinde başlıca 3 major makromolekül tipi vardır. Bunlar kollajenler, proteoglikanlar ve glikoproteinlerdir. Bu moleküller kemiğin ve periodonsiyumun gelişimi ve rejenerasyonu sırasında çeşitli biyolojik olaylara katılmaktadırlar. Hücreler ve ekstraselüler matriks arasındaki etkileşim fibronektin, tenasin ve kemik siyaloprotein (KSP) gibi çeşitli adezyon molekülleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu proteinler, hücrelere direkt olarak veya integrinler gibi hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla bağlanma gibi özelliklere sahiptir.⁴⁹

Mineralize dokular belirgin olarak diş ve çevre dokularında mevcuttur. Sement sementoblastlar, alveol kemiği osteoblastlar tarafından sentezlenen kollajen lifler arasında veya içinde mineral oluşumunun gerçekleştiği bağ dokulardır. Non-kollajenöz matriks proteinlerinin kollajen matriksin organizasyonunda, hidroksiapatit kristallerinin oluşumu ve gelişimini düzenlemede önemli role sahip oldukları düşünülmektedir. Osteopontin (OPN) ve KSP major non-kollajenöz proteinler arasında yer almaktadır.⁵⁰

OPN bir hücre ataşman proteinidir. Vücutta birçok hücre tarafından üretilmesine karşın⁵¹ çalışmalarda primer olarak kemik ve sement gibi mineralize dokuların ekstraselüler matriksinde bulunduğu bildirilmiştir.^{51,52} OPN osteogenez ve sementogenezin farklı evrelerinde salgılanır.⁴⁷ OPN osteogenezin erken oluşum evrelerinde önemli rol oynar.⁴⁸ Kemikte osteopontin osteoblastlar tarafından kemik matriksi oluşturacakları zaman üretilir^{51,53} ve ardından mineralize olmuş matrikste birikir.⁵³ OPN osteoblastların ekstraselüler matrikse bağlanmasını kolaylaştırır. OPN aynı zamanda osteoklastlar tarafından da yüksek miktarda salgılanır^{51,53} ve kemik rezorpsiyonu sırasında osteoklastların bağlanmasına neden olur.⁴⁸ Bu bilgiler OPN'nin, kemik hücrelerinin kemiğe bağlanmasında ve ardından kemik hücrelerinin fonksiyonunu^{51,53} ve matriks mineralizasyonunu kontrol etmede önemli rolü olduğunu göstermektedir.⁵⁴ OPN'nin bir diğer fonksiyonu da kristal gelişimini düzenlemesidir.⁵⁵ KSP'nin hemen hemen tamamı farklılaşmış mineralize doku oluşturan hücreler tarafından açığa çıkarılırken, OPN'nin osteoblast, osteosit, osteoklast gibi kemik hücreleri dışında yara iyileşme bölgelerinde fibroblastlar, aktive olmuş lenfositler ve makrofajlar gibi non osteojenik hücreler tarafından da açığa çıktığı ve yumuşak bağ doku hücrelerinin de OPN ile boyanabileceği bildirilmiştir.^{52,56,57}

KSP mineralize kemik matriksinin önemli bir komponentidir⁵⁸ ve total non-kollajenöz proteinlerin %15'ini oluşturur.⁴⁸ KSP kemik ve sement oluşumunun farklı dönemlerinde yüksek miktarda açığa çıkar^{47,48,50,52} ve osteoblast ve sementoblast farklılaşmasının erken belirtisi olduğu düşünülmektedir.⁵⁰ Çalışmalar kemik oluşumunun başlangıcında osteoblastlardan yüksek miktarda KSP açığa çıktığını ve KSP'nin kemiğin başlangıç mineralizasyonunda rolü olduğunu gösteren hidroksiapatit kristallerinin oluşumu⁵⁹ çekirdeklenmesi^{48,58} ve gelişimini⁵⁹ düzenlediğini göstermiştir. Bunun dışında KSP 'nin hücre bağlama ve hücre işaretleme özelliği bu proteinin kemik hücrelerinin mineralize matrikse bağlanmasında ve kemik remodelasyonunda önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir.^{48,50} KSP 'nin kollajen matriks içinde yer almasının preosteoblastlar için mitojenik olduğu ve bu hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını arttırdığını böylelikle kemik kalsifikasyonunu uyardığı bildirilmiştir.⁵⁰ Mineralize doku oluşturan hücreler tarafından KSP açığa çıkarılması normal olarak hücreler osteoblastlara, sementoblastlara veya odontoblastlara farklılaşınca kadar tespit edilemez. Kemik oluşturan hücrelerin kültüründe KSP hücreler çok katlı olana kadar ve aktif olarak kemik benzeri doku oluşturan kadar sentezlenmez.⁵² İmmünohistokimya boyamaları KSP' nin osteoid dokuda bulunduğunu göstermiştir. KSP yine normal ve iyileşen fare periodonsiyumunun mineralize olan bölgelerinde, gelişen rat mandibula kemiğinde ve uzun kemiklerde kırıldak çevresinde spesifik olarak lokalize

olmuştur. Bazı araştırmalar in vivo osteoklastlardan KSP ekspresyonunu olduğunu ve KSP'nin kemik rezorpsiyonuna katıldığını^{60,61} bildirirken diğerleri osteoklastlardan KSP ekspresyonu gösterememiştir.^{62,63} Ankiloze olmuş periodontal ligamentte mineralizasyon ve KSP ekspresyonu bildirilmiştir. Özellikle hızlı yeni kemik oluşumunun mevcut olduğu alanlarda KSP yüksek seviyede salgılanmıştır.⁵⁰

2.1. STATİNLER

Statinler olarak bilinen 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri, yüksek kan kolesterol seviyesi bulunan hastalarda ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan, güvenilirlikleri kanıtlanmış, en etkili ajanlardır.^{64,65} Geniş çaplı klinik çalışmalar statinlerin total serum kolesterol seviyesini %15-40, LDL (Düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol seviyesini %20-60, trigliserit seviyesini %10-30 oranında azalttığını ve HDL (Yüksek yoğunluklu lipoprotein) seviyesini %5-15 oranında arttırdığını göstermiştir.⁶⁶ Statinlerin koroner arter hastalığı bulunan veya bulunmayan kişilerde kardiyovasküler ölüm oranını azalttığına dair birçok çalışma bulunmaktadır.^{67,68,69,70,71}

2.1.1. Statinlerin sınıflandırılması:

Statinler elde edilişleri, karaciğer metabolizması, fizikokimyasal özellikleri ve spesifik aktivitelere göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır.⁷²

— *Elde edilişlerine göre:*

Farmakolojik özelliklerine göre 9 farklı HMG-CoA redüktaz inhibitörü mevcuttur.^{64,73,74} Bunlar lovastatin, mevastatin (compactin), pravastatin, simvastatin, fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve cerivastatindir. Lovastatin, pravastatin, mevastatin ve simvastatin mantar fermentasyonundan sonra elde edilen doğal statinlerdir. Fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve cerivastatin ise kimyasal sentez yoluyla elde edilir.^{64,73} 2001 yılında 31 hastanın rabdomiyolizin (kas liflerinin bütünlüğünün bozulması) neden olduğu akut renal yetmezlik nedeniyle ölmesi nedeniyle cerivastatin dünya farmasötik marketinden kaldırılmıştır. Sonuç olarak şu anda klinik kullanımında sadece 8 statin vardır. Bunlar; lovastatin,

mevastatin, simvastatin, pravastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve fluvastatindir.^{64,72,74}

Statinlerin elde ediliş yolunun farklı davranış mekanizması yaratabileceği ileri sürülmüştür. Fakat sentetik olarak üretilen statinlerin doğal statinlerden daha az etkili olduğunu gösteren herhangi bir bilgi mevcut değildir.⁷³

Doğal statinler kimyasal yapılarına bağlı olarak oldukça benzer olmalarına rağmen bunların arasından simvastatinin, lovastatin ve pravastatinden yaklaşık olarak iki kat daha güçlü olduğu bildirilmiştir.^{16,64}

— ***Karaciğer metabolizması:***

Bütün statinler için hedef organ karaciğerdir ve hepatositleri hedeflemektedirler.^{72,73} Üretim şekli ne olursa olsun bütün statinler karaciğer yoluyla benzer şekilde metabolize olurlar.⁷³ Fluvastatin ve lovastatininin %70'inden fazlası, simvastatinin %80'ininden fazlası ve pravastatinin %46'sı karaciğerde tutulmaktadır. Statinlerin çoğu dolaşımda düşük konsantrasyonda bulunurlar. Atorvastatinin %12, pravastatinin %17, fluvastatinin % 20-30, simvastatin ve lovastatinin %5, cerivastatinin %60'ından fazlası dolaşımda bulunur.^{26,72,73} Dolaşıma geçen statinlerin farmakolojik etkisi oldukça düşüktür.⁷⁵

— ***Fizikokimyasal özellikleri:***

Lovastatin, simvastatin, atorvastatin ve cerivastatin lipofiliktir.^{64,76} Pravastatin ve rosuvastatin oldukça hidrofiliktir.⁶⁴ Fluvastatin ise her iki özelliğe de sahiptir.⁷² Simvastatin ve atorvastatin gibi lipofilik statinler hücre içine girmek için hücre membranından kolayca geçebilirler. Hidrofilik statinlerin ise hücre içerisine girebilmek için spesifik taşıyıcı mekanizmalara ihtiyacı vardır.¹⁶

— **Spesifik aktivite:**

Atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin ve pravastatin aktif bileşik olarak verilir. Simvastatin, atorvastatin ve lovastatin inaktif formlarda uygulanır ve enzimatik yollarla aktif forma dönüştürülür.^{64,72}

2.1.2.Simvastatin

Simvastatin, statin ailesinin iyi bilinen bir üyesidir¹⁴ ve Nocardia autrophica'dan elde edilen doğal kaynaklı bir maddedir.²⁹ Klinik olarak oral yoldan 5, 10, 20, 40 ve 80 mg/gün olarak tablet şeklinde uygulanır.^{14,38} Simvastatin karaciğerden ilk geçişte elimine olduğundan en büyük etkisi karaciğer üzerinedir. Karaciğer yetersizliği ilacın birikimine neden olabilir. Yüksek miktarda alkol tüketen ve karaciğer hastalığı öyküsü bulunan kişilerde ilaç dikkatle kullanılmalıdır.²⁹

Preparat içindeki herhangi bir bileşene aşırı duyarlılık durumunda, aktif karaciğer hastalığında, karaciğer fonksiyon testlerinin açıklanamamış ısrarcı yüksekliğinde, gebelikte ve laktasyonda ilaç kontendikedir. Pediyatrik kullanım ile ilgili güvenilirlik ortaya konmadığından, çocuklarda kullanımı önerilmemektedir.²⁹

2.1.3.Statinlerin yan etkileri

Statinler genel olarak iyi tolere edilmektedirler. Klinik etkilerinin yüksek olması ve diğer kolesterol düşürücü ilaçlara göre yan etkilerinin az olması, bu ilaçların avantajlarıdır.^{72,77} En önemli yan etkileri karaciğer ve kas toksiteleridir.⁷² En az bir yıl süre ile statin kullananların yaklaşık %2'sinde, serum transaminazlarının düzeyinde belirgin bir artış vardır. Bu nedenle tüm hastalarda tedaviye başlamadan önce ve başladıktan sonra düzenli olarak karaciğer fonksiyon testlerinin yapılması ve serum transaminazlarının ölçülmesi çok önemlidir. Olguların yaklaşık %0.5'inde çizgili kas hücrelerini zedeleyerek rabdomiyoliz yapabilir. Buna bağlı olarak yaygın myalji ile kas krampı yaratır. En sık görülen yan etkileri olguların %15' inde mide bağırsak tahrişine bağlı olarak ortaya çıkan konstipasyon, diyare, dispepsi, karın ağrısı ve bulantıdır. Aynı oranda döküntü ve kaşıntı oluşturur. Seyrek olarak uyku

bozukluğu da yapabilir. ³⁴ Baş ağrısı, üst solunum yolu infeksiyonu, halsizlik, göğüs ağrısı, anjina gibi diğer yan etkiler de gözlenebilir. ^{78,79} Bu yan etkiler görüldüğünde ilaç kullanımı kesilebilir.

2.1.4.Statinlerin pleiotropik etkileri

Statinlerin inhibe ettiği HMG-CoA redüktaz reaksiyonunun ürünü olan mevalonat, sadece kolesterol için değil aynı zamanda farnesil pirofosfat (FPF) ve geranilgeranil pirofosfat (GGPF) gibi birçok nonsteroidal izoprenoidik bileşikler için de öncüdür. Klinik çalışmalara ve yapılan diğer temel çalışmalara göre bu enzimin inhibisyonu nedeniyle statinlerin kolesterol düşürme etkilerinden bağımsız olarak çeşitli yararlı etkileri bulunmaktadır. Bu yararlı etkiler "pleiotropik etkiler" olarak adlandırılmaktadır. ^{64,65,72} Statinlerin pleiotropik etkileri nedeniyle klasik endikasyonları dışında da kullanımları söz konusu olabileceği belirtilmiştir. ⁸⁰ Statinlerin tanımlanmış başlıca pleiotropik etkileri şunlardır:

1. Koroner arter hastalığı riskinde azalma ¹⁶
2. Aterosklerotik lezyonların boyutunda ve miyokard infarktüsü geçirme riskinde azalma ⁶⁴
3. Trombosit agregasyonu ve trombus birikiminde azalma ¹⁶
4. Anjiogenezde artma ¹⁶
5. Alzheimer hastalığında azalma ^{16,64}
6. Antiinflamatuvar özellik ¹⁶
7. T lenfosit aktivasyonunda azalma(immunosupresif özellik) ¹⁶
8. Kemik oluşumunda artma(kemik anabolik özellik) ¹⁶
9. Osteoklast oluşumunda azalma ¹⁶
10. Antioksidan etki ⁶⁵
11. Tümör hücrelerinin gelişimini ve metastazını engelleme(antitümör etki) ^{64,65,72}
12. Serebral damarlarda ateroskleroza azaltarak felç ve iskemik atak insidansında azalma ^{29,65}
13. Nefropati gelişiminde azalma ⁸¹
14. Diyabet gelişiminde azalma ⁸¹

2.1.5. Statinlerin antiinflamatuvar etkileri

Statinlerin kardiyovasküler hastalık riskini azaltma nedenlerinden biri de C-Reaktif Protein (CRP), matris metalloproteinazlar (MMP) ve TNF- α 'nın inhibisyonuna neden olarak antiinflamatuvar özellik göstermeleridir.^{36,37,82} İnflamasyon aterosklerozun başlamasında ve ilerlemesinde ve miyokard infarktüsü gibi koroner kalp hastalıklarında önemli rol oynamaktadır. CRP, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlere karşı karaciğerden üretilen bir klinik inflamasyon belirtisidir. Koroner kalp hastalığına sahip bireylerde CRP seviyesi artar. Statinler tedaviden 6 hafta sonra plazma CRP konsantrasyonu düşürmektedirler.⁸²

MMP'ler kemiğin hem fizyolojik hem de patolojik sürecinde önemli role sahip enzimlerdir. Statinler makrofajlardan MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'u içeren matriks metalloproteinazların salgılanmasını azaltır.¹⁶ MMP-9 kemik gelişiminde önemli role sahiptir. MMP-9 kemiğin patolojik yıkım sürecine katılmaktadır. MMP-9 olmayan sıçanlarda kemik iliği oluşumunda ve endokondral kemikleşmede gecikme görülmüştür. Statinler makrofaj ve endotel hücrelerinden MMP'lerin açığa çıkmasını baskılamaktadırlar. Thunyakitpisal ve arkadaşları simvastatinin osteoblast ve fibrosarkom hücrelerinden doza ve zamana bağlı olarak MMP-9 salgılanmasını baskıladığını göstermişlerdir.⁸³

Birçok çalışma IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi lokal olarak üretilen sitokinlerin osteoklast aktivitesine veya kemik oluşumuna neden olarak kemik remodelasyonunun düzenlenmesine katıldığı göstermiştir.^{84,85} Statinlerin çeşitli inflamatuvar markerların açığa çıkmasını düzenleyen nüklear faktör kappa beta'nın (Nf κ β) aktivasyonunu inhibe ederek endotel hücrelerinden, makrofajlar veya monositlerden lipopolisakkaritlerin neden olduğu IL-1β, IL-6 ve TNF- α gibi sitokin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir.^{16,28,86,87,88}

Statinler nötrofillerin kemotaksis ve transendotelial migrasyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterirler.⁷² Bu sonuçlar statinlerin inflamatuvar hücrelerin sayısını azalttığını göstermiştir.¹⁶

2.2. STATİNLERİN KEMİK ÜZERİNE ETKİSİ

Statinlerin kemik üzerine etkileri, karaciğer üzerindeki etkileri ile paralel değildir. Statinler karaciğere yüksek seçicilikleri olduğu için ilk geçiş etkisine uğrarlar ve kemiğe düşük konsantrasyonda ulaşırlar. Bu nedenle kemik döngüsünü nasıl etkiledikleri hala açık değildir. Pravastatin gibi bazı statinler karaciğerde çok etkiliyken, kemiğe etkileri yoktur. Bunun nedeni hidrofilik statinlerin kemik hücreleri tarafından alınımının az olmasıdır. Kemikte etkili olabilmeleri için periferik dağılımının iyi olması gereklidir. Simvastatin, atorvastatin ve cerivastatin lipofilik oldukları için kemiğe etkileri daha fazladır.^{29,79,89}

2.2.1. Statinlerin kemik oluşturabilme mekanizması

Statinlerin kemik üzerine etkilerinin hangi yolla olduğu tam olarak açıklanamamıştır fakat iki farklı mekanizma ile kemik üzerine etki gösterdikleri düşünülmektedir.¹⁸ Her iki mekanizmada da “mevalonat basamağı” statinlerin kemik üzerinde etkilerinde anahtar basamaktır. Kolesterol mevalonat yolu adı verilen biyosentez yolu aracılığıyla üretilir.³⁸ Mevalonat sadece kolesterol için değil aynı zamanda osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunun kontrolünde de önemli bir öncüdür.^{64,75} Yıkılma sürecindeki ilk metabolit olan mevalonatın dışardan verilmesi statinlerin kemik üzerine etkilerini engellemiştir.^{29,89} Statinlerin kemik üzerine etkilerinde düşünülen mekanizmalar şunlardır (Tablo 1):

1.Osteoklastların aktivasyonunun engellenmesi: Kolesterol sentezi ve osteoklast aktivasyonu aynı biyokimyasal akışı içermektedir. Kolesterol yapımı bir kaç adımda gerçekleşir. Asetil-koenzim A (Asetil-CoA) ve asetoasetil-koenzim A 'nın (Asetoasetil-CoA) HMG-CoA oluşturmak üzerine yoğunlaşması ile kolesterol sentezi başlar.⁶⁴ İlk önce HMG-CoA, HMG-CoA redüktaz enzimi ile mevalonata dönüşür. Ardından mevalonat, geranil pirofosfata, geranil pirofosfat da farnesil pirofosfat sentaz enzimi ile farnesil pirofosfata dönüşür. Sonra squalene oluşur ve sonuç olarak kolesterol meydana gelir.¹⁸ Osteoklastlar, ara ürünlerden farnesil pirofosfat ve bundan oluşan geranilgeranil pirofosfatları Rho, Rac ve Rab gibi osteoklast hücre membranının oluşumu, fonksiyonu ve şekillendirilmesinden sorumlu bazı proteinleri modifiye etmek ve aktive etmek için kullanırlar. Bu olay prenilasyon olarak adlandırılır.^{18,30,35,90}

Biyofosfonatlar antirezorptif aktiviteye sahip ilaçlardır.³⁵ Statinler ve biyofosfonatlar mevalonat yolunun farklı basamaklarında yer alır.²⁸ Biyofosfonatlar, farnesil sentetazı inhibe ederek, statinler ise HMG-CoA redüktazı inhibe ederek bu ürünlerinin oluşumunu engeller.^{18,80} Izoprenoidlerin sentezinin engellenmesi osteoklast aktivitesinde önemli rol oynar.²⁸ Böylece izoprenoidlerin sentezinin ve prenilasyonun engellenmesi ile her iki grup ilaç da osteoklastların aktivasyonunu engelleyerek^{18,80} ve osteoklast sayısını¹⁶ azaltarak antirezorptif etki gösterir. Statin veya biyofosfonatlarla karşılaşan osteoklastların ölmeleri ile kemik döngüsü yavaşlar, kemik yıkımı azalır ve kemik yapım yıkım dengesi sağlanmış olur.^{18,80}

Biyofosfonatlar, kemik yıkımını azaltırken, kemik oluşumunu önemli derecede uyarmaz.⁷⁹ Biyofosfonatlar ve statinler yapısal olarak oldukça farklılık gösterir. Biyofosfonatlar, pirofosfata benzer bir bölge içerir ve karşılaştıkları osteoklastların yüzeyine sıkıca bağlanır. Statinlerde ise böyle bir yapı yoktur. Bu nedenle statinlerin in vivo şartlarda osteoklastlara karşı biyolojik aktivite gösterip göstermeyeceği bilinmemektedir.⁸⁰

2. Kemik morfojenik protein-2 (BMP-2) aktivasyonu ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) üretimi: Statinlerin kemik oluşumunu arttırmasındaki ikinci mekanizma ise BMP-2 öncüsünü aktive etmesidir. Mundy ve arkadaşları 1999 yılında osteoblastların farklılaşmasını ve kemik oluşumunu arttıracak ajanları araştırmışlardır. BMP ailesinin üyeleri osteoblast farklılaşmasını arttırdığından çalışmalarında BMP-2 geninin öncüsünü aktive eden küçük molekülleri araştırmışlardır. İnceledikleri 30.000'den fazla doğal bileşikler arasında sadece statinlerin BMP-2 geninin öncüsünü aktive ettiğini bulmuşlardır.¹⁹ Simvastatin ve BMP-2' nin kemik yapımındaki etkisi BMP-2 antagonistinin, simvastatinin stimule ettiği kemik yapımını azaltması ile desteklenmiştir.¹⁵

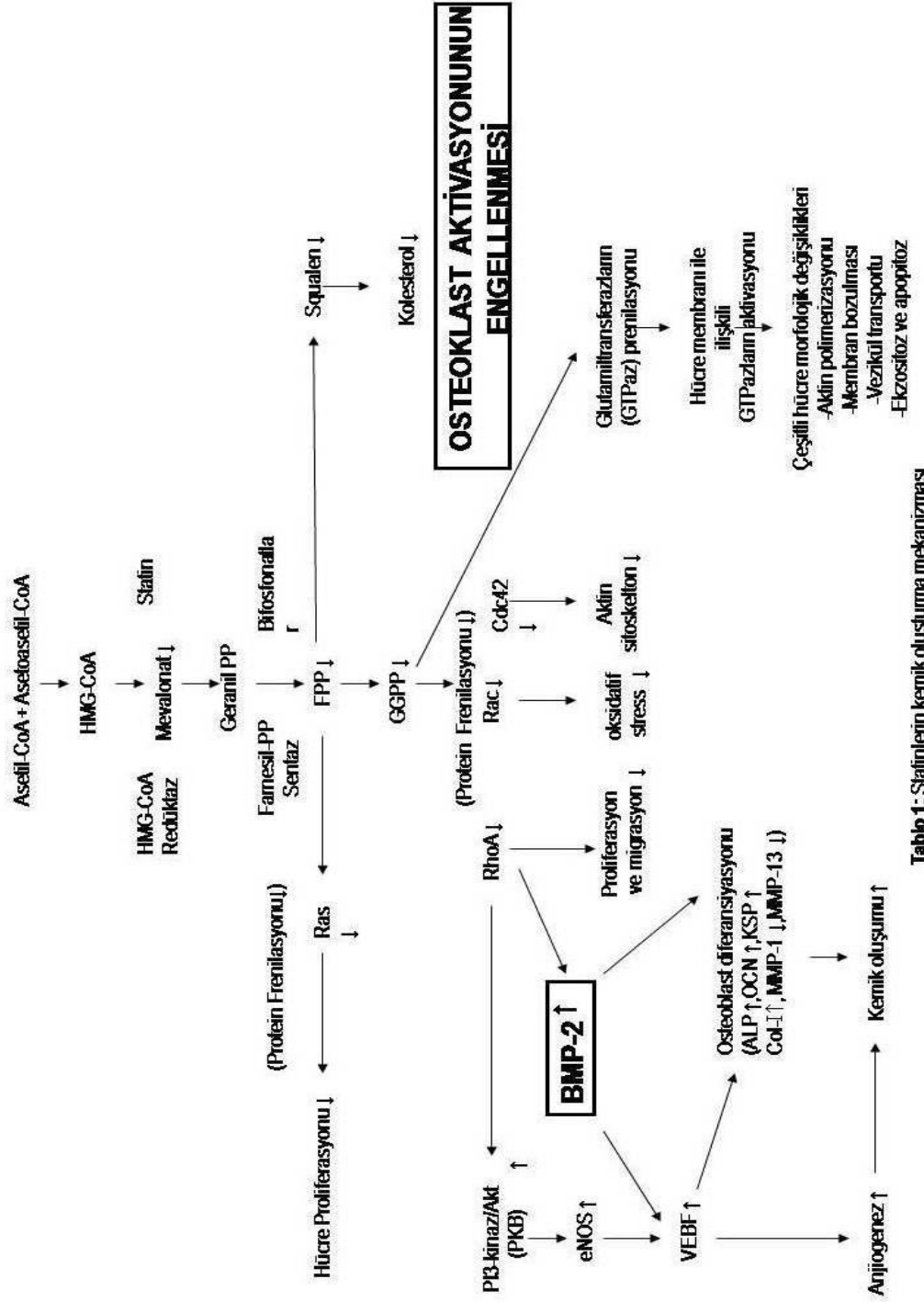
Anjiogenez kemik oluşumu için gereklidir. VEBF anjiogenik bir sitokindir. VEBF endotel hücreleri üzerine direk etkiye sahiptir ve anjiogenezin güçlü bir düzenleyicisidir. VEBF kan damarlarını genişletir ve daha fazla yeni kan damarlarının invazyonuna neden olur. Bu da mezenşimal hücrelerin bölgeye popülasyonu artırır. Ayrıca VEBF endotel hücrelerin osteoanabolik faktörler üretmesini uyarak indirekt yolla osteoblastların farklılaşmasına ve çoğalmasına neden olur.³³ Gerber ve arkadaşları VEBF'nin kemik gelişimi ve oluşumdaki önemini göstermek amacıyla yaptıkları çalışmalarında VEBF'nin açığa çıkmasını inhibe etmeleri sonucunda bölgede yeni kan

damarlarının invazyonu ve yeni kemik oluşumu gerçekleşmemiştir. Faktörün yeniden ortama verilmesi ile yeni damar ve kemik oluşumu tekrar sağlanmıştır.⁹¹

Statinler endotelial hücrelerin çoğalmasını sağlar. Endotelial hücrelerdeki bu artış damar gelişimini olumlu etkileyerek, kemik öncü hücrelerin artışına ve yeni kemik oluşumuna neden olur.⁹²

Statine bağlı osteogeneze erken iyileşmeyi araştıran bir çalışmada immunlokalizasyon tekniği ile statin uygulanan ve uygulanmayan kemik defektlerinin iyileşmesinde VEBF, BMP-2 ve önemli bir kemik oluşum faktörü olan core binding faktörün (Cbfa1) erken histolojik ekspresyonu incelenmiştir. Simvastatin uygulanan defektlerde cerrahiden üç gün sonra VEBF, dört gün sonra BMP-2, beş gün sonra Cbfa1 saptanmış ve beşinci günde yeni kemik oluşumu gözlenmiştir. Bu olaylar kontrol grubundan hep bir gün daha önce meydana gelmiştir. Sonuçta statinlerin lokal uygulandığında, angiogenezi artırarak ve osteogenezi düzenleyen büyüme faktörlerinin erken açığa çıkmasını sağlayarak kemik oluşumunu arttırdığını bulmuşlardır.³³

uygulandı
kemiğine
simvastati
oluşumu s



Tablo 1: Statinlerin kemik oluşuma mekanizması

Maeda ve arkadaşları farelerin osteoblast ve kemik iliği hücrelerini kullanarak simvastatinin osteoblast farklılaşması ve fonksiyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Simvastatinin BMP-2'yi ve mineralizasyon için önemli bir enzim olan alkalen fosfatazı indüklediğini ve tip 1 kollajen gibi kemik matriks proteinlerinin akümüasyonunu doza ve zamana bağlı olarak arttırdığını göstermişlerdir.⁹³ Hidrofilik statinlerin değil, simvastatin, atorvastatin ve cerivastatinin gibi lipofilik statinlerin osteoblastlarda kemik anabolik faktör olan VEBF'ün açığa çıkmasını arttırdıklarını bulmuşlardır.⁹⁴ Maeda ve arkadaşları yine statinlerin fare osteoblast hücrelerinin BMP-2 açığa çıkarmasını uyardığını ve alkalen fosfataz aktivitesi, VEBF, tip 1 kollajen, osteokalsin ve kemik siyaloproteini artırırken kollajenaz-1 ve kollajenaz-3'ün açığa çıkmasını baskılayarak osteoblast fonksiyonunu düzenlediğini göstermişlerdir.⁹⁵ Sugiyama ve arkadaşları simvastatin ve mevastatin gibi lipofilik statinlerin insan osteosarkom hücrelerinde BMP-2 açığa çıkmasını arttırdığını, pravastatin gibi hidrofilik statinlerin ise osteoblast hücrelerinde BMP-2 açığa çıkarıcı etkilerinin olmadığını göstermişlerdir. BMP-2 öncüsünün statine bağlı aktivasyonu ortama mevalonatın eklenmesinden sonra durmuştur.⁸⁹

İn vitro çalışmaların çoğu farklı osteoblast kültür deneylerinde statinlerin anabolik potansiyelini değerlendirmek üzere dizayn edilmiştir. Çok az sayıda çalışma osteoklast hücre kültüründe statinlerin antirezorptif etkilerini değerlendirmiştir. Örneğin; Baumann ve arkadaşları kemik iliği kültüründe lovastatinin osteoklast oluşumunu inhibe ettiğini bulmuşlardır.⁹⁶ Fisher ve arkadaşları statinlerin osteoklastların ölümüne neden olduğunu göstermiştir.⁹⁷ Grasser ve arkadaşları statin tedavisinin osteoklastogenezis üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında farelerin kemik iliği hücrelerine lovastatin eklemiş ve 6 gün sonra doza ve zamana bağlı olarak osteoklast sayısının azaldığını izlemişlerdir.¹⁷

2.2.3. Statinlerin sistemik kullanımının klinik olarak kemik üzerine etkisi

Osteoporöz, düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikro yapısının bozulması sonucu kemik kırılabilirliğinin ve kırık olasılığının artması ile karakterize sistemik bir iskelet hastalığıdır.⁸⁰ Osteoporöz dünyada milyonlarca insanı etkilemektedir ve kemik hastalıkları arasında en yaygın görülendir.^{16,30}

Osteoporöz tedavisi için günümüzde kullanılan biyofosfonat, kalsitonin, östrojen, selektif östrojen reseptör düzenleyicileri ve vitamin D analogları gibi ilaçların çoğu yeni kemik oluşumunu uyarmak yerine osteoklast aktivasyonunu inhibe ederek kemik rezorpsiyonunu inhibe ederler.^{16,16,18,30,65} Bu ilaçlar sadece kemik kütlesini stabil tutmakta fakat kemik oluşumuna etki etmemektedir. Kemik rezorpsiyonunu engelleyen ilaçların ispatlanmış başarısına rağmen, kemik kaybına uğramış insanlarda, trabeküler yapıyı ve kemik mineral yoğunluğunu (KMY) arttıracak toksik olmayan anabolik ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.^{30,92} Bu nedenle statinlerin kemik dokusu üzerine etkilerinin bulunmasından sonra, literatürde birçok klinik çalışma hiperlipidemi tedavisi için statin kullanan hastaları osteoporöz açısından değerlendirmiştir.^{22,24,75,98} Bu çalışmaların bir kısmı statinlerin kemik dokusu üzerine etkileri olduğu ve osteoporotik kırıkların profilaktik tedavisinde kullanılabilecek potansiyel ajanlar oldukları belirtirken, diğerleri statinlerin kemik dokusunu üzerine etkilerini saptayamamıştır.³⁰

Meier ve arkadaşları 50 yaş ve üzerindeki 91611 hasta üzerinde yaptıkları çalışmalarında statin kullanan hastalarda kırık görülme riskinin azaldığını belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre statin kullanan hastalarda, kullanmayan hastalara oranla kalça kırıkları %88 ve genel olarak bütün kemikleri kapsayan kırıklar %45 oranında azalmıştır.²² Pasco ve arkadaşları statin kullanan 1375 bayanda kırık oranını saptamak amacıyla yaptıkları çalışmalarında statin kullanan bayanlarda kırık oranında % 60 azalma olduğu saptanmışlardır.²³ Wang ve arkadaşları medikal bakımda olan 65 yaş üzerindeki 6110 hastayı kapsayan çalışmalarında statin kullanımı ile kalça fraktürü görülme riskinin %71 oranında azaldığını belirtmişlerdir.²⁴ Chan ve arkadaşları 60 yaş ve üzerindeki statin kullanan hastalarda osteoporotik kırık riskinin düşük olduğunu bulmuşlar ve bu sonucun kemik mineral yoğunluğundaki artışa bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.⁹⁸

Kemik mineral yoğunluğu kırık riskinin en önemli belirleyecilerinden biridir.³⁰ Chung ve arkadaşları tip 2 diabetes mellituslu hastalarda statinlerin KMY üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında statinlerin kemik kaybını önlediğini ve KMY'nu arttırdığını bulmuşlardır.⁹⁹ Edwards ve arkadaşları ortalama 48 ay statin tedavisi gören menapoz sonrası dönemdeki 41 kadın hastada kontrol grubuna göre KMY'nun yaklaşık olarak %10 daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.²⁵ Montagnani ve arkadaşları, 12 ay boyunca günlük 40 mg simvastatin tedavisi uyguladıkları menapoz dönemindeki hastalarda, simvastatin kullanımı ile kemik oluşumu ve KMY arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir.²¹ Lupattelli ve arkadaşları hiperkolesterolemisi olan 40 kadın hastaya 2 yıl boyunca günlük

40 mg simvastatin tedavisi uygulamışlar ve bu tedavinin kalça kemiğinde KMY'nu arttırdığını belirtmişlerdir.¹⁰⁰

Statin tedavisinden sonra kemik markerlarında oluşan değişiklikler sadece birkaç çalışmada gösterilmiştir. Statinlerin kemik üzerine etkisini prospektif olarak ilk defa Chan ve arkadaşları değerlendirmiştir. Statinlerin sistemik kullanımındaki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, osteoporöz olmayan 17 yüksek kolesterol hastasını dört hafta boyunca 20 mg simvastatin ile tedavi ederek spesifik biyokimyasal kemik markerlarındaki değişikliklere bakmışlar ve simvastatinin kemik markerlarından osteokalsini %85 oranında arttırdığı bildirmişlerdir.²⁶ Stein ve arkadaşları atorvastatin ve simvastatinin kemik biyomarkerları üzerine etkisini araştırmışlar ve sadece simvastatinin kemik döngüsü üzerine yararlı etkisi bulunduğunu göstermişlerdir.²⁷ Tıkız ve arkadaşları simvastatin tedavisi görenlerde kemik döngüsü parametreleri ve serum sitokin seviyeleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Postmenapoz dönemdeki yüksek kolesterolü olan ve daha önce hiperlipidemi tedavisi görmemiş 32 kadın hastaya 3 ay boyunca günde 20 mg simvastatin kullandırmış ve simvastatin tedavisinin serum sitokinlerinden IL-6 seviyesinde değişikliğe neden olmadığını, osteokalsin ve kemik alkalin fosfataz seviyelerinde artışa ve TNF- α seviyesinde azalmaya neden olduğu bulmuşlardır.²⁸

Statinlerle ilgili yapılan bazı klinik çalışmalarda da, statinlerin insanda kemik dokusu üzerine bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. La Croix ve arkadaşları retrospektif olarak 90.000'den fazla menapoz sonrasındaki hastaların verilerini incelemişleridir. Az sayıda hastanın uzun dönem statin kullandığı bu çalışmada fraktür riski ve kemik yoğunluğu arasında ilişki bulamamışlardır.¹⁰¹ Van Staa ve arkadaşları fraktürü olan 81.880 hastanın medikal kayıtlarını incelemişlerdir. Klinik uygulamada reçetelenen dozlarda statin kullanımı ve kırık riski arasında ilişki bulamamışlardır.⁷⁵ Rejnmark ve arkadaşları statinlerin kemik döngüsü ve KMY üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ortalama 4 yıldır statin tedavisi gören menapoz dönemindeki 140 hastayı kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Statin kullananlarda kemik oluşum markerlarından osteokalsin ve alkalin fosfatazın, kemik rezorpsiyon markerlarından tip 1 kolajenin C- terminal telopeptidinin plazma konsantrasyonunun kontrol grubundaki bireylere oranla daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Statin tedavisinin kemik döngüsünü yavaşlattığını fakat kemik kütlesi ve KMY üzerine pozitif etkisinin bulunmadığını ifade etmişlerdir.¹⁰²

Diğer yandan statinlerin kırık, KMY ve kemik markerları üzerindeki etkisini inceleyen sistematik meta-analizde statin kullanımı ile kalça kırığı ve KMY arasında pozitif yönde bir ilişki bulunurken kemik markerları üzerinde etkisinin az olduğunu bulunmuştur.¹⁰³

2.2.4. Statinlerin sistemik kullanımının kemik üzerine etkisinin deneysel olarak incelenmesi

Ooforektomi yapılan fareler östrojen eksikliğine bağlı kemik kaybı için yaygın olarak kabul gören preklinik bir modeldir.¹⁷ Ooforektomi yapılmış farelere statinlerin sistemik olarak uygulandığında yeni kemik oluşumuna etkisini araştırmak için yapılan deneysel bir çalışmada statinler 5 ila 50 mg/kg arasında değişen dozlarda verilerek trabeküler kemik hacmi değerlendirilmiş ve statinlerin trabeküler kemik hacminde %39-94 oranında artışa neden olduğu bildirilmiştir. Kemik oluşum oranı arttığı ve osteoklast sayısı azaldığı için bu sonucun anabolik etki nedeniyle olduğu düşünülmüştür.¹⁹ Oxlund ve arkadaşları ratlara üç ay boyunca, günlük 10 mg/kg simvastatin tedavisini gastrik tüp yardımı ile ağız yolu ile uygulamışlar ve vertebralardan alınan bilgisayarlı tomografiler ile yapılan histomorfometrik analizler sonucunda simvastatin grubunda kontrol grubuna göre süngerimsi kemiğin %23 oranında arttığını gözlemlemişlerdir.²⁰ Skoglund ve arkadaşları 81 farenin femurunda kırık oluşturmuşlar ve bu farelerin 41'ine 21 gün boyunca oral yoldan 120 mg/kg simvastatin uygulamışlardır. 8, 14 ve 21. günde kurban edilen hayvanlarda 14. günde simvastatin tedavisi gören grupta kemik alanının daha geniş ve kemiğin mekanik özelliklerinin daha dirençli olduğunu, yirmi birinci günde ise kırıkların histolojik olarak iyileştiğini bulmuşlar ve simvastatinin kırık tedavisinde yeni bir seçenek olabileceğini belirtmişlerdir.¹⁰⁴ Oxlund ve Andreassen 60 rata ooforektomi yaptıktan sonra ratların belli bir kısmına 3 ay boyunca oral yoldan günlük 40 mg/kg simvastatin tedavisi uygulamışlardır. Sonuçta simvastatin uygulanan grupta, kontrol grubuna oranla kemik kaybının daha az olduğunu ve simvastatinin kemik oluşumunu uyardığını belirtmişlerdir.¹⁰⁵ Pytlik ve arkadaşları ratlarda 4 hafta boyunca günde 3 mg/kg ve 6 mg/kg dozlarda uygulanan simvastatinin ooforektominin neden olduğu osteopeni gelişimindeki etkisinin araştırdıkları çalışmalarında her iki dozda da kemik oluşumunun yoğunlaştığı ve rezorpsiyonun azaldığını fakat en güçlü aktivitenin 6 mg/kg dozda gerçekleştiğini göstermişlerdir.³⁵ Batukan ve arkadaşları ooforektomize sıçanlarda 4 ay boyunca östrojen replasman tedavisine eklenen 3 mg/kg ve 6 mg/kg dozlardaki simvastatinin KMY üzerine etkisini araştırmışlardır. Sıçanlarda ooforektomi sonrası KMY'yi korumaya yönelik profilaktik olarak tek

başına uygulanan yüksek doz oral simvastatinin, östrojen replasman tedavisi kadar etkili olduğunu bulmuşlardır. Östrojen replasman tedavisi ile düşük doz simvastatin KMY'yi en fazla arttırmasına rağmen sonuç istatistiksel olarak anlam ifade etmemiştir. Diğer yandan östrojen tedavisi ile yüksek doz simvastatin verilmesinin KMY üzerine bu ilaçların tek tek verilmesine kıyasla avantaj sağlamadığı, hatta KMY'yi azalttığı bulunmuştur.¹⁰⁶

Statinlerin sistemik olarak uygulandığı bazı hayvan çalışmalarında ise, kemik dokusu üzerine etkileri belirlenememiştir. Von Stechow ve arkadaşları ooforektomi operasyonu yaptıkları farelere 8 hafta boyunca, günlük 10mg/kg simvastatin tedavisi uygulamışlar ve kortikal ve trabeküler kemik dokusu üzerinde yaptıkları incelemede simvastatin grubu ile kontrol grubu arasında herhangi bir fark olmadığını bulmuşlardır.¹⁰⁷ Havsa, ooforektomi yaptığı ratlara 35 gün boyunca, günlük 10 mg/kg simvastatin tedavisi uygulamış ve simvastatinin KMY üzerine anlamlı bir etkisinin bulunmadığını bildirmiştir. Ayrıca uygulanan bu tedavinin karaciğer ve böbreğe etkisini belirlemek için yaptığı incelemelerde, her iki organın histopatolojisinin normal olduğunu fakat biyokimyasal incelemede karaciğer enzim düzeylerinde artış olduğunu saptamıştır.⁷⁹ Maritz ve arkadaşları ooforektomi yapılan ve yapılmayan farelerde değişik dozlardaki simvastatin, atorvastatin ve pravastatinin etkisini değerlendirmiş, statinlerin KMY'nu azalttığını, doza bağlı farklı etkiler gösterdiğini, 20 mg/kg gibi yüksek doz simvastatinin kemik oluşumunu ve rezorpsiyonunu arttırdığını, 1 mg/kg gibi düşük doz simvastatinin kemik oluşumunu azalttığını ve kemik rezorpsiyonunu arttırdığını, sonuçta simvastatinin ooforektominin neden olduğu kemik kaybını önlemediğini bulmuşlardır.¹⁰⁸

2.2.5. Statinlerin lokal uygulamalarının kemik üzerine etkisi

İlk kez Mundy ve arkadaşları 1999 yılında, statinin grubu bir ilaç olan simvastatini 5 gün boyunca günde 3 kez olmak üzere, kalvaryum üzerine toplam 15 enjeksiyon olarak subkutanöz uygulamış ve 21 gün sonra kemik kalınlığında %30-50 oranında artış olduğu bulgulamışlardır. Çalışmada BMP-2 ve FGF enjeksiyonuyla da benzer sonuçlar elde edilmiştir.¹⁹

Missana ve arkadaşları 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 gözlemlenmiştir fakat 2, 3 ve 6 haftalarda yeni oluşan kemik miktarını kontrol grubuna benzer bulmuşlardır.¹⁰⁹

Erdemli ve arkadaşları 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 ve farklanmada artış ve yeni osteoid doku oluşumu izlenmiştir.⁹²

Kırık iyileşmesinde simvastatinin etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada 36 adet ratın sağ bacak bölgesinde kapalı kırık oluşturulmuştur. Günlük 1 mg ve 2 mg dozda simvastatin 5 gün boyunca kırık bölgesinde derinin altına enjekte edilmiş ve 7., 14. ve 21. günlerde histolojik olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta simvastatin uygulanan 7.gün grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kemik oluşumunun uyarıldığı izlenmiştir. Simvastatin uygulanan 14.gün grubunda, oluşan yeni osteoid dokunun kalınlığındaki artışın daha belirgin olduğu ve 7. güne oranla daha kalın ve organize olduğu saptanmıştır. Simvastatin uygulanan 21.gün grubunda ise ilacın uyardığı yeni kemik oluşumunun ilerlediği ve damarlanmanın geniş bir alana yayıldığı görülmüştür.³⁴

Anbinder ve arkadaşları farelerde tibial defektlerde simvastatinin oral veya subkutanöz uygulamasının kemik rejenerasyonuna ve kan kolesterol seviyelerine etkisini araştırmışlardır. 40 farenin tibiasında yaklaşık 3 mm uzunluğunda ve 2,5 mm çapında defekt oluşturmuşlardır. 7 mg/kg simvastatini günde 3 kere subkutanöz enjeksiyon yoluyla veya 20 mg/kg simvastatini deney süresi boyunca oral yoldan uygulamışlardır. 15 veya 30 gün sonra kan örneklerinin alınmasının ardından kurban edilen hayvanlarda histolojik ve histomorfometrik analizler sonucunda subkutanöz veya oral yolla simvastatin uygulanmasının kan kolesterol seviyesini değiştirmediğini ve kemik tamirini iyileştirmede etkili olmadığını bulmuşlardır.¹¹⁰

Sugiyama ve arkadaşları rhBMP-2 'nin neden olduğu kemik oluşumu üzerine statinlerin etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında sıçanlara rhBMP-2'yi intramusküler olarak yerleştirdikten sonra 20 gün boyunca 10 mg/kg simvastatin ve 0.3 mg/kg cerivastatini ağız yoluyla veya subkutanöz olarak uygulamış, radyografik, histolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda simvastatinin subkutanöz uygulamasının kemik döngüsünde azalma yaratarak rhBMP-2 ile meydana gelen osteoindüksiyonu uyardığını bulmuşlardır.¹¹¹

2.3. Dişhekimliği alanında statinlerin değerlendirilmesi

Statinlerin kemik oluşumunu artırıcı, osteoklast sayısını azaltıcı ve antiinflamatuvar etkileri nedeniyle, periodontitiste izlenen izole kemik defektlerinin tedavisinde veya alveolar kret deformitelerinin rejenerasyonunda pozitif etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir.^{15,31}

Kılıç tez çalışmasında mandibulanın distraksiyon osteogenezisinde lokal ve sistemik olarak uygulanan simvastatinin erken kallus konsolidasyonu üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Bu amaçla on sekiz Yeni Zelanda tavşanına unilateral mandibular osteotomi yapılmıştır. Tavşanlar lokal simvastatin, sistemik simvastatin ve kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrılmışlardır. Lokal simvastatin grubunda, serum fizyolojik içinde çözündürülmüş simvastatin, kollajen taşıyıcıya enjekte edilerek operasyon sırasında bölgeye yerleştirilmiştir. Sistemik simvastatin grubuna, distraksiyon tedavisi süresince oval gavaj yolu ile günlük 10 mg/kg simvastatin uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise herhangi bir tedavi uygulanmamıştır. Distraksiyon fazının tamamlanmasından iki hafta sonra sakrifiye edilen hayvanlarda yapılan histomorfometrik ve radyolojik analizler sonucunda gruplar arasında distraksiyon aralığındaki kallus alanı ve yoğunluğu açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır.²⁹

Ayukawa ve arkadaşları titanyum implantlar etrafına uygulanan simvastatinin osteogenez üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında farelerin tibialarına implant yerleştirdikten sonra, farelere 30 gün boyunca 10 mg/kg simvastatini intraperitonel olarak enjekte etmişlerdir. 30 gün sonunda sakrifiye ettikleri hayvanlarda kemiğin implantla olan kontakt miktarını ve implantın etrafındaki kemik yoğunluğunu histolojik ve histometrik olarak

değerlendirmişlerdir. Simvastatin uygulanan grupta meduller kanalda bol miktarda daha kalın kemik trabekülleri gözlemiştir ve simvastatinin implant çevresinde osteogenezi arttırdığı bulmuşlardır. Sonuçta lokal uygulanan simvastatinin osteointegrasyonu arttırabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹¹²

2.4. Periodontal Alanda Statinlerin Değerlendirilmesi

Periodontal tedavi spesifik defektleri hedeflediğinden lokal uygulama gereklidir. Thylin ve arkadaşları 2002 yılında periodontal uygulamada simvastatin için uygun olabilecek yöntemi araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmalarında, 2.2 mg simvastatini iki farklı şekilde sıçan kalvaryasında test etmişlerdir. Bir gruba simvastatini subperiosteal olarak kalvaryaya enjekte etmişlerdir. Diğer grupta özel olarak hazırladıkları kubbe şeklinde olan polilaktikasit membran altına simvastatin yerleştirerek kalvaryaya uygulamışlardır. Her iki grubu da 22. ve 44. günlerde histolomorfometrik olarak incelemişlerdir. İki uygulama şeklinde de simvastatinin ödem, inflamasyon, kabuklaşmaya neden olduğunu görmüşlerdir. Membran altına simvastatin uygulandığında 22 gün sonra simvastatin enjekte edilen gruba oranla kemik alanında ve kemik kalınlığında istatistiksel olarak anlamlı artış bulgulamışlardır fakat 44 gün sonunda simvastatinin uyardığı kemiğin önemli miktarı kaybedilmiştir.¹⁵

Stein ve arkadaşları periodontal tedavi için klinik kullanıma uygun olabilecek dozu araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmalarında tek doz olarak 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, veya 2.2 mg simvastatini farelerin mandibulalarına lokal uygulayıp doku inflamasyonu ve kemik gelişimi açısından değerlendirmişlerdir. 2.2 mg simvastatini 0.5 mg'a düşürmenin inflamasyonu azalttığı ve 0.5 mg simvastatinin klinik olarak daha kabul edilebilir bir doz olduğunu ileri sürmüşlerdir.¹¹³

İlk defa Wong ve Rabie 2003 yılında kemik defektlerinin tamirinde statinlerin osteoindüktivitesini in vivo olarak araştırmışlardır. Bu amaçla 9 tavşanda toplam 15 tane 10X5 mm tam kalınlık kemik defekti oluşturmuşlardır. Simvastatin içeren Zocor tableti 10 mg suda çözerek elde ettiği konsantrasyonu 2.5 mg/ml olan solusyondan 0.2 ml alarak 0.02 g absorbe olabilen kollajen süngere emdirmiş ve deney grubuna uygulamışlardır. Kontrol grubunda ise absorbe olabilen kollajen süngere serum fizyolojik emdirerek defekt alanına uygulanmıştır. Bütün hayvanlar deney süresinde çok hızlı iyileşmişlerdir, hiçbir hayvanda infeksiyon veya yan etki izlenmemiştir. 14 gün sonra sakrifiye edilen hayvanların histolojik değerlendirmelerinde statin uygulanan defektlerde aktif kontrol grubuna göre

%308 oranında daha fazla yeni kemik oluşumu saptanmıştır. Pasif kontrol grubunda ise yeni kemik oluşumu gözlemlenmiştir. Sonuçta statin kollajen greftlerin küçük defektlerde tek başına veya geniş defektlerde otojen kemik greftleri gibi diğer kemik greftleri ile kombine olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹¹⁴

Junqueira ve arkadaşları farelerde yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda simvastatinin etkisini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında mandibulada kemik defektleri oluşturmuş, bu defektleri politetrafluoroetilen membran ile kaplamış ve simvastatin bir grup farelere 15 gün, diğer gruba 30 gün boyunca oral yoldan kullanırlanmışlardır. Cerrahiden 15, 30 veya 60. gün sonra densitometrik, histolojik ve morfometrik analizler sonucunda simvastatin verilen farelerde kontrol grubuna oranla daha fazla yeni kemik oluştuğunu bulgulamışlardır.¹¹⁵

Özeç ve arkadaşları lokal uygulanan simvastatinin etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında 23 farenin mandibulasında 3 mm çapında kemik defekti oluşturmuşlardır. Deney grubunda 10 mg simvastatin içeren Zocor tableti konsantrasyonu 2.5 mg/ml olacak şekilde suda çözmüş, elde edilen simvastatin solüsyonundan 0.2 ml alarak 0.02 mg jelatin süngere emdirmiş ve defekt alanına uygulamışlardır. Aktif kontrol grubunda 0.2 ml suyu jelatin süngere emdirerek defekte yerleştirmiş, pasif kontrol grubunda ise defekt alanını boş bırakmışlardır. Bu çalışmada bütün hayvanlar 14 günlük deney süresince iyi iyileşmişlerdir. Hayvanların hiçbirinde herhangi bir yan etki veya inflamasyon gözlenmemiştir. Radyografik olarak rejenere alanın yoğunluğu deney grubunda pasif kontrol grubuna göre %240, aktif kontrol grubuna göre %190 oranında fazla bulunmuştur. Histolojik değerlendirmede ise defekt alanın kenarında ve ortasında yeni kemik oluşumu gözlenirken kıkırdak oluşumu gözlenmemiştir. Aktif kontrol grubunda defekt kenarında dar bir alanda kemik oluşumu gözlenirken pasif kontrol grubunda defektler fibröz bağ doku ile dolmuştur. Her üç grupta da 3 mm'lik defekt tamamen yeni kemik ile dolmamıştır. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında simvastatin uygulanan grupta diğer gruplara oranla yeni kemik miktarı daha fazla bulunmuştur. Sonuç olarak statinlerin kemik oluşumu üzerine pozitif etkisinin olduğu ve kemik greft materyali olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.³¹

Thylin ve arkadaşları farelerde oluşturulan kemik defektlerinde simvastatin ve bioaktif camın beraber kullanımının kemik yapımını üzerine etkisini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmalarında, 32 farenin kafatasına 8 mm çapında kemik defekti açmışlardır. Bu defektlere sadece metilselüloz jel,

biyoaktif cam, 2.2 mg simvastatin jel ve biyoaktif camla beraber simvastatin jel uygulamışlardır. 4 hafta sonra yapılan histomorfometrik incelemede sadece simvastatin (%48) veya sadece biyoaktif cam (%57) uygulanan defektlerde periferik kemik kalınlığının, kontrol grubu ve biyoaktif cam ile simvastatinin kombine uygulandığı defektlerden (%43) daha fazla olduğunu ve simvastatinin biyoaktif camla kombine kullanımının kemik kalınlığında artışa neden olmadığını saptamışlardır.¹¹⁶

Horiuchi ve Terashima ooferektomize yapılmış farelerde maksiler molar dişi çekerek mandibular molar bölgede ilaçların etkisini mikrokompüterize tomografi ile değerlendirmişlerdir. 17 β estradiol veya çok az miktarda yüksek doz paratiroid hormon ile kombine olarak atorvastatin uygulanan fonksiyonel okluzyonun olmadığı ratlarda trabeküler kemik alanında artış gözlemişlerdir. Antirezorptif ilaçlarla kombine statin tedavisinin ağız sağlığını geliştirebileceğini, statinlerin dental hastalıkların tedavisinde yararlı etkilerinin olabileceğini ve periodontal hastalıkların ilerlemesini durdurabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹⁶

Bradley ve arkadaşları farelerin mandibulalarına polilaktik asit kubbe içerisinde yerleştirilen 0.5 mg simvastatinin lokal uygulanmasının BMP-2 ve nitrik oksit açığa çıkmasını uyardığını, kemik oluşum oranını arttırdığını ve cyclooxygenase-2 inhibitörlerinin simvastatinin neden olduğu kemik gelişimi üzerine olumsuz etkisi olduğunu göstermişlerdir.¹¹⁷

Nareika ve arkadaşları statinlerin yüksek konsantrasyonda glikoz ve lipopolisakkaritlerin proinflatuar sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanmasındaki uyarıcı etkisini baskıladığını bulmuşlar ve statinlerin periodontal hastalığın tedavisinde yararlı olabileceğini iddia etmişlerdir.¹¹⁸

Yazawa ve arkadaşları simvastatinin periodontal ligament üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında düşük konsantrasyonda simvastatinin insan periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonu ve osteoblastik diferansiyasyon üzerinde pozitif etkisi olduğunu bulgulamışlardır.³⁸

Thunyakıtpısal simvastatinin osteoblast hücreleri, insan fibroblast hücreleri ve insan periodontal ligament hücreleri proliferasyonu üzerine etkisini saptamak amacıyla yaptığı çalışmada simvastatinin osteoblast hücrelerinin proliferasyonu arttırdığını, insan fibroblast hücrelerinin

ve periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı etkilemediğini bulgulamıştır.³⁹

Sakoda ve arkadaşları simvastatinin kültüre edilmiş insan oral epitel ve fibroblast hücrelerinden, IL-6 ve IL-8 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiğini bildirmişlerdir.¹¹⁹

Vaziri ve arkadaşları farelerde deneysel olarak oluşturdukları periodontitiste simvastatinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında enjeksiyon yolu ile 0.05 ml dozda simvastatinin lokal olarak bölgeye uygulamışlar ve histolojik, radyografik incelemeler sonrasında simvastatinin kemik rezorpsiyonunu ve ataşman kaybını önemli derecede azalttığını göstermişlerdir.⁴⁰

Statin tedavisinin periodontal hastalık üzerine etkisini klinik olarak ilk defa Cuncha-Cruz ve arkadaşları retrospektif olarak araştırmışlardır. Statinlerin kronik periodontitis hastalarında diş kaybı üzerine yararlı etkilerinin olup olmadığını araştırdıkları çalışmalarında başlangıç periodontal tedavi sonrasında 3 yıl statin kullanan hastalarda diş kaybının %48 oranında azaldığını bulmuşlardır.³⁶ Saver ve arkadaşları statin kullanan kronik periodontitisli hastalarda diş kayıp oranını daha geniş bir popülasyonda araştırmışlardır. Statin kullanan ve sigara alışkanlıkları bilinen 48-64 yaş aralığındaki 12.631 hastanın verileri retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Statin kullanımının diş kayıp riskinin artması veya azalması ile ilişkili olmadığını ve statin kullanımının kronik periodontitisin seyrini iyileştirmede etkili olmadığını göstermişlerdir.³⁷

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmamız Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı sonrası Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı Yetiştirme ve Tıbbi Cerrahi Araştırma Ünitesinden sağlanan 600-800 gr ağırlığındaki toplam 28 adet sağlıklı erişkin dişi deney kobayı (Guinea Pig) üzerinde gerçekleştirildi. Deney boyunca kobaylar ayrı kafeslerde yumuşak diyet uygulaması ile beslendi. Her kobayda maksilla ve mandibulada keser dişlerin sağında ve solunda yer alan dişsiz bölgelerde dört adet kemik defekti oluşturuldu. (Resim 1) Bu defektler her kobayda benzer olmak üzere, 1. ve 2. deney, aktif ve pasif

simvastatin) içerecek ve simvastatin içermeyecek şekilde hazırlandı.(Tablo 3) Buna göre 2.2 mg simvastatin için, esneklik sağlamak amacıyla plastizer olarak 2.5 mg polietilen glikol 300¹ ve polimer olarak molekül ağırlığı 100.000 olan 7.3 mg hidroksipropil selüloz 100² kullanıldı. 0.5 mg simvastatin için de, 2.5 mg polietilen glikol 300 ve molekül ağırlığı 100.000 olan 9.0 mg hidroksipropil selüloz 100 ve aktif kontrol bölgesi için 2.5 mg polietilen glikol 300 ve molekül ağırlığı 100.000 olan 9.5 mg hidroksipropil selüloz 100 olmak üzere her biri 12 mg ağırlığında olacak şekilde hesapları yapıldı.

Tablo 3: Hazırlanan polimer taşıyıcıların içerikleri

MADDE	1.Deney bölgesi	2.Deney bölgesi	Aktif Kontrol Bölgesi
Simvastatin	2.2 mg	0.5 mg	0
Hidroksipropil selüloz 100 (Polimer)	7.3 mg	9.0 mg	9.5 mg
Polietilen glikol 300 (Plastizer)	2.5 mg	2.5 mg	2.5 mg

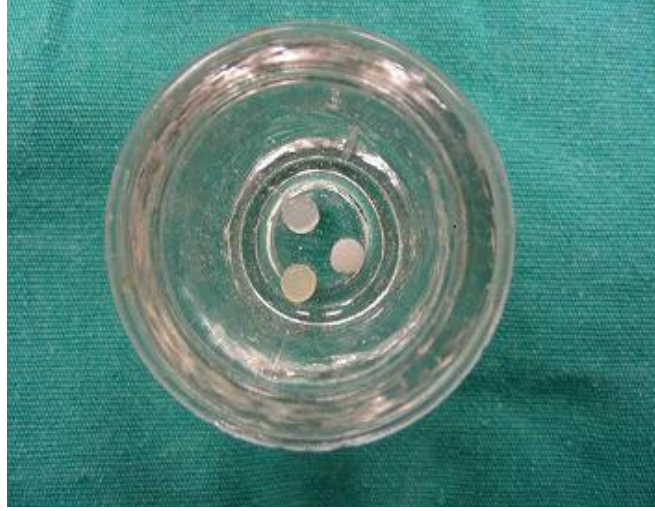
Her üç polimer taşıyıcı için yukarıda verilen miktarları içerecek şekilde hesaplanan plastizer ve polimer tartıldı ve 25 ml distile su içerisine ilave edilerek bir magnetik karıştırıcı³ kullanılarak çözüldü. 0.5 mg ve 2.2 mg simvastatin içerecek polimerik taşıyıcılar için bu çözelti içerisine hesaplanan miktarlardaki simvastatin ilave edildi ve homojen bir çözelti elde edilinceye kadar karıştırıldı. Daha sonra her üç çözelti farklı petri kutularına dökülerek 40°C'lik etüve konuldu ve suyun ortamdan ani olarak uzaklaşmasını önlemek için üzerleri filtre kağıdı ile kapatıldı. 48 saat sonra suyun tamamen uzaklaşmasıyla oluşan film şeklindeki polimer tabakasından özel yaptırılan bir mantar delici yardımıyla defekt boyutuna uygun olacak şekilde 0.385 cm çapında küçük parçalar kesilerek polimer taşıyıcılar kullanıma hazır hale getirildi. (Resim 2) Kesilen polimer taşıyıcılar 12 mg ağırlığında ve 1.5 mm kalınlığındaydı. Buna göre, 2.2 mg simvastatin, 0.5 mg simvastatin içeren

¹ Dolder Ltd.

² Aqualon

³ Heidolph

polimer taşıyıcılar ve simvastatin içermeyen polimer taşıyıcılar kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında bir cam desikatör içerisinde korundu.



Resim 2: Hazırlanan polimerler

Hazırlanan polimer taşıyıcılardaki simvastatin miktarının bir kez daha kontrolü yapıldı. Bu amaçla spektrofotometre kullanılarak⁴, metanol⁵ içerisinde, 237.5 nm dalga boyunda simvastatin miktarı tayin edildi. Bu işlem üç kere yapıldı ve her sonuç için yapılan üç deneyin ortalaması alındı. Miktar tayini ile taşıyıcılar içerisindeki simvastatin miktarının doğruluğu tespit edildikten sonra salım hızı deneyine geçildi.

3.2. Simvastatinin in vitro salım hızının saptanması:

Simvastatinin in vitro salım hızı, diyaliz kese difüzyon tekniği^{121,122} kullanılarak incelendi. İşlemler iki farklı doz simvastatin içeren polimer taşıyıcılar için ayrı ayrı yapıldı. Deneyler 37° C termostatlı su banyosunda, pH 6,8 fosfat tampon çözeltisinde⁶ gerçekleştirildi.

⁴ Shimadzu UV-1202

⁵ Sigma Aldrich, USA

⁶ Merck&Co.,Inc.,USA

2 cm eninde kesilen diyaliz kesenin⁷ içine simvastatin içeren tek bir polimerik taşıyıcı ve 1 ml pH 6.8 fosfat tampon çözeltisi ilave edildi. Diyaliz kesenin her iki açık yüzeyi plastik mandallarla kapatıldıktan sonra 37° C' deki 50 ml pH 6.8 fosfat tampon çözeltisine daldırıldı. Diyaliz kese belirli zaman aralıklarında (3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168. saatlerde) 37° C' deki yeni pH 6.8 fosfat tampon çözeltisine aktararak deneye devam edildi. Bu zaman aralıklarında toplanan örneklerdeki simvastatin miktarı spektrofotometrede 238 nm' de tayin edildi ve simvastatin çıkışı incelendi. Deneyler iki farklı doz simvastatin içeren polimer taşıyıcıların her biri için üç kere yapıldı ve elde edilen üç deney sonucunun ortalaması alındı. Bu şekilde in vitro ortamda her iki dozda hazırlanan simvastatinin polimer taşıyıcıdan salındığı test edildi.

3.3. Cerrahi Operasyonlar:

Operasyonların tüm safhalarında asepti ve antisepti kurallarına dikkat edildi. Cerrahi girişim öncesi kobaylara intramuskuler yolla 30 mg/kg ketamin hidroklorür (Alfamine)⁸ ve 6 mg/kg ksilazin hidroklorür (Alfazyne)⁹ enjekte edilerek anestezileri sağlandı. Genel anestezinin ardından lokal hemostaz sağlamak amacıyla operasyon bölgelerine 0.5 cc %4'lük artikain HCL + 1/100000 epinefrin HCL içeren Ultracain DS Forte¹⁰ enjekte edildi.

3.3.1. Kemik defektlerinin oluşturulması:

Her bölgede yer alacak kemik defektlerinin standardizasyonu amacıyla defektin mezial kemik marjiniinden 3 mm uzaklıkta olacak şekilde ve kemiğin orta hattında yer alacak şekilde defektler oluşturuldu. Defektlerin hazırlanması sırasında ilgili bölgedeki kretin orta hattına Bard-Parker 15 numaralı bistüri ucu kullanılarak 1cm uzunluğunda horizontal insizyon yapıldı. (Resim 3) İnsizyonu takiben flep periost elevatörü ile mukoperiosteal olarak kaldırılarak kemik açığa çıkarıldı.(Resim 4) Kullanılacak trephine frezin ucu 1

⁷ Sigma-Aldrich M_A :12 400 23 mm*15mm,USA

⁸ Alfamine % 10 Enjektabl , Alfasan International B.V, Woerden, Hollanda

⁹ Alfazyne %2 Enjektabl, Alfasan International B.V, Woerden, Hollanda

¹⁰ Hoechst Marion Roussel, Almanya

mm'ye işaretlendi. Açığa çıkan kemik yüzeyinde trephine frez ile 4000 devir/dk dental tur kullanılarak steril serum fizyolojik banyosu altında her grupta benzer olacak şekilde kemik defektlerinin sınırları oluşturuldu.(Resim 5) Defektin derinliği periodontal sond yardımı ile kontrol edildi. Bu işlemi takiben defekt alanı içerisindeki kemik universal küret yardımıyla blok halinde çıkarıldı. Bütün hayvanlarda defektler trephine frez çapı olan 4,2 mm çapında ve 1 mm derinliğinde oluşturuldu. (Resim 6) Defektler yıkanıp kanama kontrolünün yapılmasının ardından her hayvanda oluşturulan kemik defektlerine Tablo 1'de açıklandığı şekildeki sırasıyla 2.2 mg, 0.5 mg simvastatin içerecek şekilde hazırlanan ve simvastatin içermeyen polimer taşıyıcılar uygulandı. (Resim 7) Pasif kontrol grubu ise boş bırakıldı. Polimer taşıyıcılar yerleştirildikten sonra defekt alanındaki yara kenarları karşılıklı uyumlandırılarak 3.0 ipek suture kullanılarak primer olarak kapatıldı.(Resim 8)



Resim 3: Horizontal insizyon



Resim 4: Flebin kaldırılmasını takiben defekt açılacak bölgedeki kemiğin açığa çıkarılması



Resim 5: Trephine frez ile defekt sınırlarının belirlenmesi



Resim 6: Oluşturulan kemik defekti



Resim 7: Polimer taşıyıcının yerleştirilmesi



Resim 8: Bölgenin primer kapatılması

3.4. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmeleri :

Kobaylar yüksek dozda Ketamine HCL ve Xylazine injekte edilerek ve kalplerinden kan alınarak sakrifiye edildi. Deney hayvanlarının sakrifikasyonlarını takiben defekt alanlarının bulunduğu maksilla ve mandibula giyotin yardımı ile bütün olarak çıkarıldı ve kobaylardan alınan doku materyalleri histolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Anabilim Dalı'nda takibe alındı.

3.5. Histolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için örneklerin hazırlanması:

Alınan doku örnekleri defekt alanları ve defekt alanlarına komşu olan sağlam bölgeleri de içine alacak şekilde küçültüldü. Bu şekilde elde edilen örneklerden %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda 24-72 saat tespit edildi. Tespit işleminin ardından maksilla ve mandibula bölgesinden elde edilen kemik ve diş dokusunu içeren doku örnekleri ayrıca %10'luk

tamponlanmış formik asit solüsyonunda demineralize edildi. Kesitler mandibulada transvers yönde maksillada ise dorsal yönde alındı. Tüm biyopsi materyallerinin 24 saat boyunca yıkanmasından sonra otomatik doku takip cihazında¹¹ takibe alındı.

Doku takibinin tamamlanmasından sonra parafin bloklara gömülmüş doku örneklerinin her birinden 5 mikron kalınlığında toplam 10 adet adeziv cama seri kesitler alındı. 4 cam immünhistokimya boyamaları için ayrılırken, diğer 6 adet cam histolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler için hemotoksilen–eosin ile boyandı.

3.6. İmmünhistokimya boyamaları:

Dokularda, osteogenez ve sementogenezin farklı evrelerinde salgılanan ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerinden osteopontin(OPN)¹² ve kemik siyaloprotein¹³ (KSP) ekspresyonunu göstermek için immünhistokimya boyamaları yapıldı. İmmünhistokimya değerlendirmeleri için alınan kesitler 37°C derecelik etüvde 12 saat süre ile bırakıldı. Ardından ksitolde 30 dakika bekletildikten sonra, 20 dakika süre ile %96'lık etil alkolden geçirilerek deparafinize ve dehidrate edildi. Çeşme suyunda ve sonrasında distile suda yıkanan antikor için hazırlanan kesitlerden kemik siyaloprotein antikoruna ile boyanacak örnekler antijen retrieval solüsyonu (0,1M sitrat buffer, pH:6. 0) ile mikrodalga fırında 15 dakika muamele edildi ve oda ısısında 30 dakika bekletildi. Osteopontin antikoruna ile boyanacak kesitler bu süre içerisinde fosfat buffer saline solusyonunda (PBS, pH: 7.4) muamele edildi. Bu işlemlerin ardından tüm kesitlerde %3'lük H₂O₂ ile 10 dakika endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Kesitler PBS ile yıkandı ve spesifik olmayan boyamaları bloke etmek için Ultra V¹⁴ blokta 8 dakika bekletildi. Primer antikorlar kemik siyaloprotein II ve osteopontin PBS (ph:7,4) solusyonu ile 1:250 oranında sulandırılarak kesitleri kapatacak şekilde 3 saat süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında sırasıyla sekonder (bağlayıcı) antikor ve streptavidin–biyotin kompleksi¹⁵ 10'ar dakika ile uygulandı ve kesitler PBS solüsyonu ile yıkandı. Antikor-antijen bağlanan bölgeleri görüntülemek amacı ile 3,3'-diaminobenzidine¹⁶ (DAB) 10 dakika süre ile uygulandı ve Harris Hematoksilende 1 dak bekletildikten sonra alkol ve ksilenle muamele edildi.

¹¹ SHANDON Citadel 2000

¹² (Akm2A1, sc-21742, IgG1; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)

¹³ (BSP II; Cat. no. AB1854- rabbit policlonal antibody; Chemicon, Temecula, CA. USA)

¹⁴ [LabVision Corp., USA, cat#TA-060-UB]

¹⁵ Polyvelant streptavidin detection system, Neomarkers, CAT NO:TP-015-HA Labvision Co, Ca, USA

¹⁶ DAB; Zymed Laboratories, Inc.; South San Francisco, CA

Camları kapatmak için entellan¹⁷ kullanıldı. Kontrol dokusu olarak kobayların molar dişlerinin bulunduğu bölgelerden elde edilen matur kemik dokusu kullanıldı.

3.7. İmmünohistokimya değerlendirmeleri:

Antikorların immünreaktivitesini karşılaştırmak için doku komponentleri boyanma yoğunluğu aşağıdaki skalaya göre yapıldı:¹²³

Boyanma yok ise 0/ (-);
Hafif boyanma mevcutsa 1/ (+);
Orta boyanma mevcutsa 2/ (++);
Yoğun boyanma varsa 3/ (+++)

3.8. Histopatolojik ve histomorfometrik değerlendirme:

Histolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler için hemotoksilen-eosin ile boyanan camların histolojik değerlendirmesi ışık mikroskopunda¹⁸ X40, X100, X200 ve X400 büyütmelede gerçekleştirildi.

3.8.1. İnflamasyon Derecesinin (ID) Değerlendirilmesi:

Her bir örnek için inflamasyon skorlaması, ışık mikroskopunda X 100' lük büyütme alanında defekt açılan bölgede oluşan bağ dokusunda yapıldı. Dokunun %10' dan azında mononükleer inflamatuvar infiltrat görülüyorsa hafif(1), % 10-50 arasında ise orta(2), dokunun %50' sinden fazlasında inflamatuvar infiltrat görülüyorsa yoğun(3) olarak değerlendirilerek skorlama yapıldı. Ayrıca apse formasyonu da 4 olarak değerlendirildi.(Tablo 4)

Tablo 4 : İnflamasyon dereceleri

Yok	< % 10	%10-50	%50-100	Apse
Yok(0)	Hafif(1)	Orta(2)	Yoğun(3)	Apse(4)

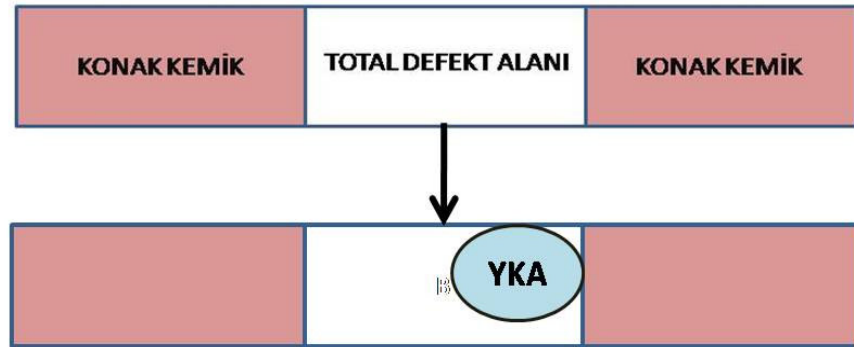
¹⁷ Cytoseal XYL, Cat no:8312-4, Richard Allan Scientific

¹⁸ Nikon E 600

3.8.2.Histomorfometrik değerlendirme:

Histomorfometrik değerlendirmeler, her örnek için seri kesitler halinde alınan camlardan, defekt alanının en net olarak görüldüğü ve dokunun orta seviyesine denk gelen bir kesitte X100'lük büyütmede yapıldı. Histomorfometrik değerlendirmede izlenen kesitteki total defekt alanı (TDA), ve yeni kemik alanı (YKA) Leica Qwin V 3.3.1 bilgisayar programı kullanılarak (Nikon 5700) değerlendirildi. Alan hesapları iki boyutlu düzlemde yapıldı. TDA olarak ; defektin tabanı, defektin tavanı ve konak kemik kenarı arasında kalan alan mm² cinsinden hesaplandı.YKA olarak TDA'da bulunan yeni kemik alanı mm² olarak ölçüldü. Oluşan yeni kemik alanı yüzdesi ise şu formül ile hesaplandı.

$$\text{Yeni kemik alanı yüzdesi (YKA\%)} = \frac{\text{Yeni kemik alanı (YKA)}}{\text{Total defekt alanı (TDA)}} \times 100$$



Şekil 1: Ölçülen histomorfometrik parametrelerin şematik olarak gösterilmesi

İstatistiksel Analiz:

Elde edilen veriler, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Biyometri ve Genetik Bilim Dalında SPSS 11.5 paket program kullanılarak analiz edildi. Tanımlayıcı ortalama $\pm$ std.sapma veya % olarak verildi. Bağımsız gruplar (7,14,30 ve 45 gün) arasında ortalamalar yönünden farkın anlamlılığı Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) veya Kruskal Wallis testiyle değerlendirildi. Tek Yönlü Varyans Analizi sonucunun anlamlı görüldüğü yerlerde farka neden olan grubu belirlemek amacıyla post hoc testlerden Tukey testi kullanıldı. Kruskal Wallis test istatistiği sonucunun

anlamli görüldüğü yerlerde ise farka neden olan grubu belirlemek amacıyla Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Takip günleri içerisinde bölgeler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı ise Bağımlı-t testi veya Wilcoxon İşaret testi ile değerlendirildi. Bölgeler ve takip günleri içerisinde gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda Bonferroni Düzeltmesi yapıldı. Kategorik karşılaştırmalar için ANOVA tekniğı kullanıldı. $p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

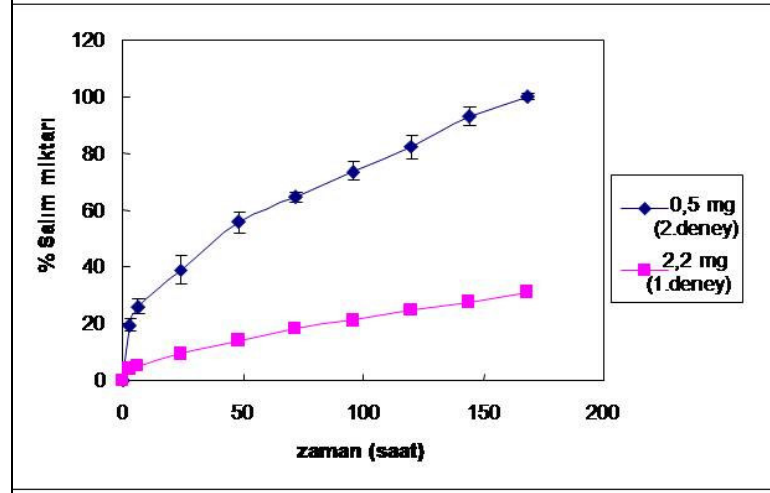
4.1. Salım Deneyi Bulguları:

Araştırmamızda kullanılan 0,5 mg ve 2,2 mg simvastatinin polimer taşıyıcıdan 3,6,24,48,72,96,120,144 ve 168 saat sonraki salım miktarları ve hızları tablo 5'te verilmektedir.

Tablo 5. Polimer taşıyıcılardan simvastatinin zamana bağlı in vitro salım miktarları ve hızları.

Zaman (saat)	0,5 mg simvastatin		2,2 mg simvastatin	
	Salım miktarı %	Salım Hızı mg/dak	Salım miktarı%	Salım Hızı mg/dak
3	19,6	1,94	3,83	0,161
6	26,06	2,47	5,06	1,12
24	39,02	4,93	9,162	0,448
48	55,67	3,64	14,16	1,31
72	64,67	2,02	18,23	1,16
96	73,8	3,44	21,33	0,849
120	82,42	4,17	24,42	0,705
144	93,07	3,21	27,63	1,22
168	100	1,18	31,24	1,44

Şekil 2'de ise 0,5 mg ve 2,2 mg simvastatinin polimer taşıyıcıdan zamana bağlı salım miktarının grafiği verilmektedir.



Şekil 2: 0,5 mg ve 2,2 mg simvastatinin polimer taşıyıcıdan zamana bağlı salım miktarlarının yüzde değerleri gösterilmektedir.

Buna göre, in vitro şartlarda 168 saat sonra (7. gün) 0.5 mg simvastatinin polimer taşıyıcıdan salımı tamamlanırken, 2.2 mg simvastatinin %31,24'ünün salımının gerçekleştiği görülmüştür. Bu verilere göre in vitro ortamda 2.2 mg simvastatinin polimer taşıyıcıdan salımı yaklaşık olarak 25 gün sonra tamamlanacaktır. Salım deneyi 2.2 mg simvastatinin çözünme hızının 0.5 mg simvastatine oranla daha yavaş olduğunu dolayısıyla materyalin in vitro ortamda kalma süresinin 18 gün daha uzun olduğunu göstermektedir.

4.2.Klinik gözlemler:

Hazırlanan polimer taşıyıcıların kullanımında herhangi bir sorun yaşanmadı ve simvastatinin defekt ortamına yerleştirilmesi için uygun bir taşıyıcı olduğu görüldü.

Operasyon sonrasında 1. deney bölgesinde 7 ve 14. günlerde defekt alanının bulunduğu bölgelerdeki yumuşak dokuda yoğun inflamasyon, apse ve aşırı ödem gözlemlendi. 30. günde 1. deney bölgesinde hala bazı hayvanlarda yumuşak dokuda inflamasyon ve ödem mevcutken, 45. günde hiçbir hayvanda inflamasyon izlenmedi. 2. deney, aktif ve pasif kontrol bölgelerinde 7,14,30 ve 45. günlerde ise herhangi bir klinik inflamasyon belirtisi gözlenmedi ve iyileşme sorunsuz gerçekleşti.

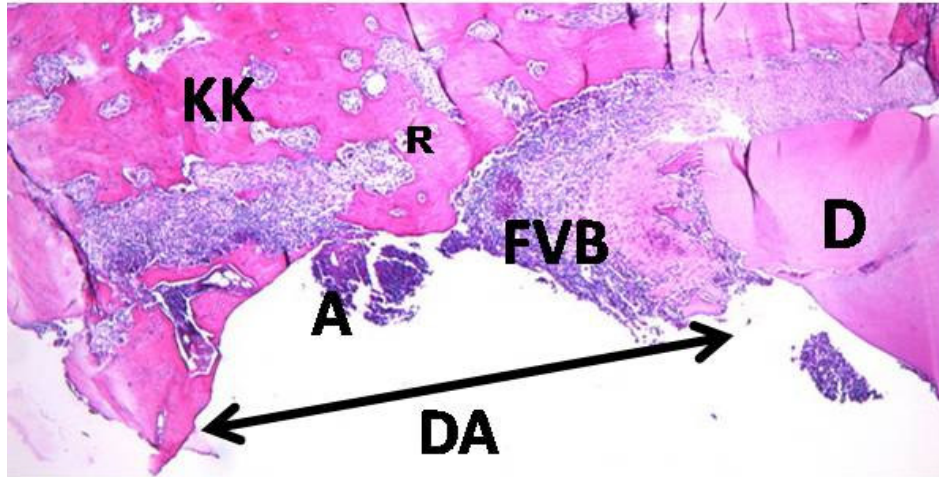
4.3. Histolojik Bulgular:

1.Deney Bölgesi

7. gün

2.2 mg simvastatin uygulanan 1. deney bölgesindeki örneklerin hepsinde defekt alanının fibrovasküler bağ dokusu ile dolduğu gözlemlendi. Tüm örneklerde defekt alanında bulunan bağ dokudaki inflammatuar hücreler mikst tipteydi. Üç örnekte, defekt alanında yabancı cisim ve/veya kemik sekestr ve çevrelerinde apse formasyonu görüldü.

Konak kemikte yoğun nötrofil lökositlerinin de eşlik ettiği mikst tipte inflammatuar infiltrat, osteoklastik aktivite ve rezorpsiyon tüm örneklerde bulunmaktaydı. İki örnekte periodontal ligamentte nötrofil infiltrasyonu mevcuttu. Diş yapısı korunmuş olarak izlendi. (Resim 9)

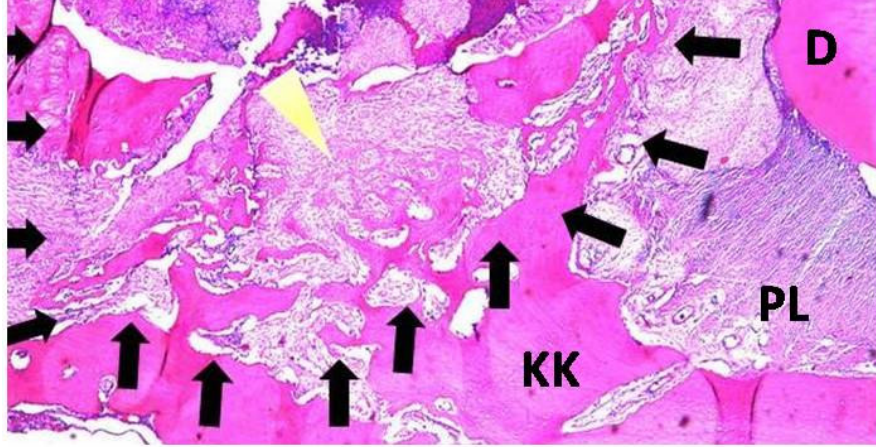


Resim 9: 1.Deney bölgesinde 7. günde defekt alanında, fibrovasküler yapıdaki bağ dokusunda yoğun inflamasyon, apse ve konak kemikte rezorpsiyon. (H&E,X40) (DA: Defekt alanı, KK: Konak kemik, D: Diş, FVB: Fibrovasküler bağ dokusu, A: Apse odağı, R: Rezorpsiyon)

14. gün

Defekt alanının fibroselüler bağ dokusu ile yer değiştirdiği görüldü. Altı örnekte defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranı % 70-80 idi. Bir örnekte ise bu oranın %100 olduğu dikkati çekti. (Resim 10). Örneklerin 3'ünde hafif, 4 örnekte ise yoğun düzeyde mononükleer inflamatuvar infiltrat bulunmaktaydı. Yoğun infiltrasyonun gözlemlendiği bu 4 örnekte yabancı cisim ve/veya kemik sekestr alanları ile beraber fokal apse odakları eşlik etmekteydi.

Konak kemikte 5 örnekte rezorpsiyon mevcuttu. Bütün örneklerde periodontal ligament ve diş yapısı normaldi.



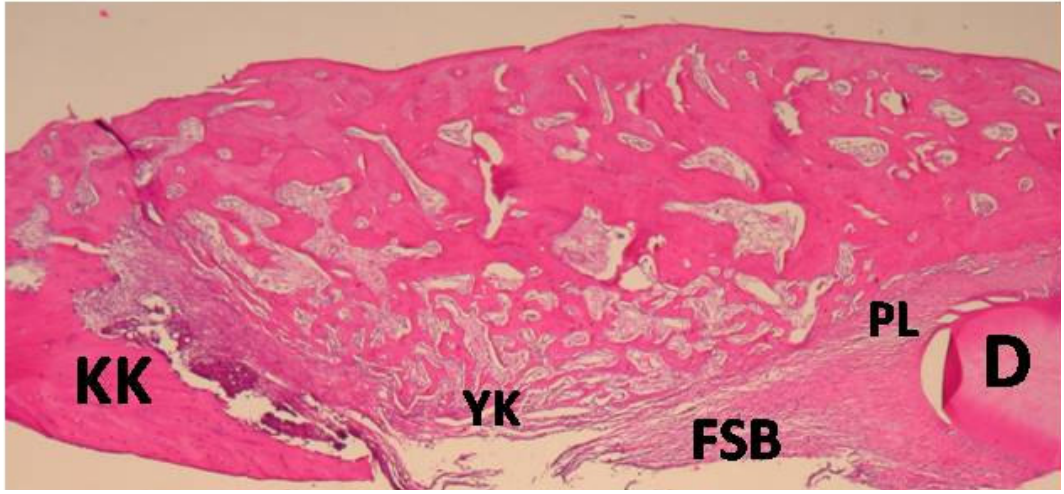
Resim 10: 1.deney bölgesinde 14.günde oklarla çevrelenen defekt alanında %100 lük yeni kemik oluşumu izlenmektedir. Sarı ok yeni kemik yapım alanlarını göstermektedir. (H&E,X40) (D: Diş, PL: Periodontal ligament, KK: Konak kemik)

30.gün

Defekt alanında fibroselüler bağ dokusu ile beraber yeni kemik alanları mevcuttu. Örneklerde defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranı %50-100 arasında değişmekteydi. (Resim 11) Defekt bölgesinde hafif-orta düzeyde mononükleer inflamatuvar iniltrat bulunmaktaydı. Bir örnekte inflamatuvar infiltrat yoğun ve mikst tipteydi. 4 örnekte yabancı cisim ve/veya

kemik sekestr alanları izlenmişken, bunlardan birinin çevresinde apse olduğu görüldü.

Komşu kemikte örneklerin yalnız ikisinde osteoklast ve rezorpsiyon gözlemlendi. Konak kemikte bir örneklerin dışında infiltrat gözlenmedi. Periodontal ligament ve diş normaldi.



Resim 11: 1.deney bölgesinde 30.günde defekt alanında yeni kemik yapım alanı. (H&E,X20) (D: Diş, YK:Yeni kemik, FSB: fibroselüler bağ dokusu,PL: Periodontal ligament)

45. gün

Defekt alanında fibröz bağ dokusu devamlılığında matür kemik olduğu izlendi. Defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranına göre %80-100 oranında matür kemik mevcuttu. (Resim 12) Bir örnekte yeni oluşan kemik üzerinde ince bir fibroselüler bağ doku mevcuttu ve bu bağ dokusunda orta düzeyde inflamatuvar infiltrat görüldü. Bir örnekte de belirgin apse formasyonu mevcuttu.

Konak kemikte apse formasyonu izlenen bir örnek dışında, nekrotik kemik, infiltrasyon ve rezorpsiyon gözlenmedi. Periodontal ligament ve diş normaldi.



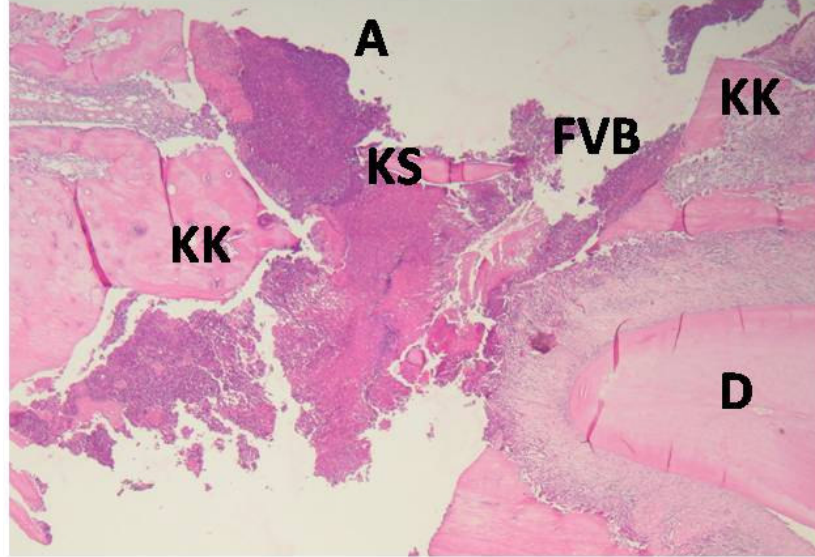
Resim 12: 1. deney bölgesinde 45. günde defekt kenarları ve konak kemik birleşmesi (H&E,X20) (D: Diş, PL: Periodontal ligament, YK: Yeni kemik, KK: Konak kemik)

İkinci Deney Bölgesi

7. gün

0,5 mg simvastatin uygulanan bölgelerdeki örneklerin tümünde defekt alanının fibrovasküler bağ doku ile dolduğu izlendi. Tüm örneklerde yabancı cisim ve /veya kemik sekestr gözlenmiş olup, aynı zamanda bu alanlara tüm örneklerde bu alanlara apse formasyonu eşlik etmekteydi.

Konak kemikte tüm örneklerde defekt alanının çevresinde nötrofil lökositlerinin eşlik ettiği mikst tipte inflamatuvar infiltrat, osteoklast varlığı ve eşlik eden rezorpsiyon görüldü. Bir örnekte dişte yapılan işleme bağlı travma ve periodontal ligamentte fokal apse odağı, diğer tüm örneklerde ise periodontal ligament ve diş yapısı korunmuş olarak izlendi. (Resim 13)

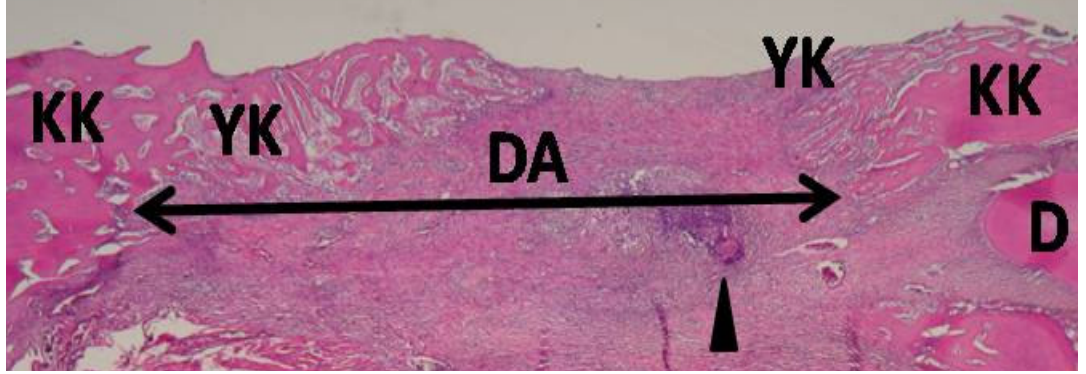


Resim 13: 2.Deney bölgesinde 7. günde defekt alanında izlenen fibrovasküler yapıdaki bağ doku,kemik sekestri, yoğun inflamasyon ve apse formasyonu. (H&E,X40) (KK: Konak kemik, D: Diş, FVB: Fibrovasküler bağ dokusu, A: Aps e odağı, KS: kemik sekestri)

14. gün

Tüm örneklerde defekt alanının fibroelüler bağ dokusu ile dolduğu izlendi. 1 örnek haricinde diğer tüm örneklerde yeni osteoid yapımı görüldü. Bu örneklerde kenarlarının karşılıklı gelme oranının % 50-60 arasında olduğu dikkati çekti. (Resim 14) Bir örnekte ise bu oran %100 olarak bulgalandı. Yeni osteoid yapımının görölmediği bir örnek dahil olmak üzere 2 örnekte hafif düzeyde mononükleer infiltrat mevcutken diğer örneklerde yabancı cisim ve/veya kemik sekestr alanları çevresinde ve tüm bağ dokusunda orta-yoğun şiddette inflamataur infiltrat görüldü.

Konak kemikte örneklerin hepsinde hafif düzeyde mononükleer inflamataur infiltrat, az sayıda osteoklast ve rezorpsiyon mevcuttu. Periodontal ligament ve dişe ait yapılar normal görünümdeydi.

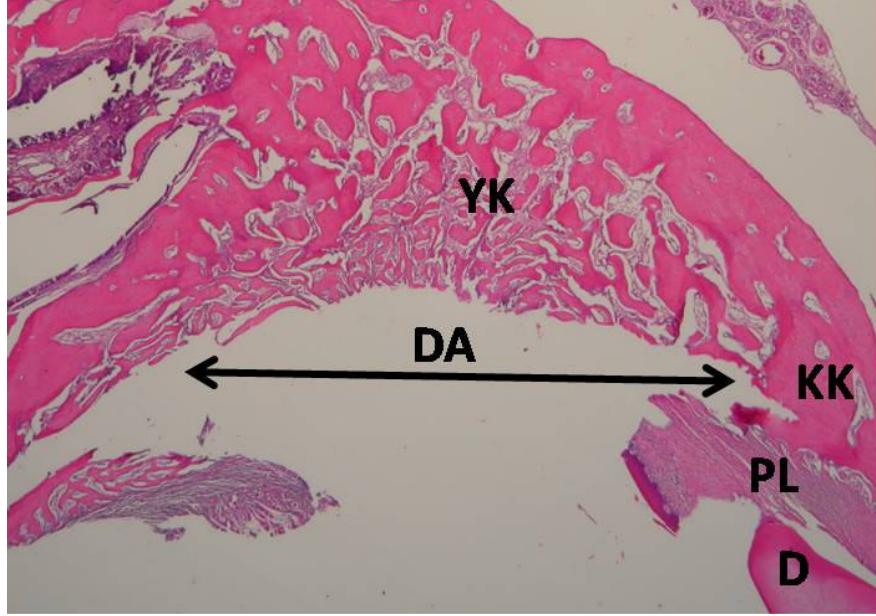


Resim 14: 2. Deney bölgesinde 14.günde defekt alanında %50-60 lık yeni kemik dolumu ve siyah ok ile gösterilen kemik sekestri çevresinde inflamasyon (H&E,X20) (KK: Konak kemik, D: Diş, DA: Defekt alanı, YK: Yeni kemik)

30.gün

Defekt alanında fibroselüler bağ dokusu ile yeni kemik alanları izlenmekteydi. (Resim 15) Defekt alanında kemik kenarlarının karşılıklı gelme oranı % 50-90 arasında değişmekteydi. Bir örnekte ise defekt kenarların tamamen birleştiği (%100) dikkati çekti. Örneklerin genelinde hafif-orta düzeyde inflamatuvar infiltrat bölgede mevcutken iki örnekte herhangi bir infiltrasyona rastlanılmadı. Bir örnekte yabancı cisim ve/veya kemik sekestri mevcutken çevresinde fokal apse odağı görüldü.

Konak kemikte apse görülen bir örnekte sınırlı bir alanda rezorpsiyon olduğu dikkati çekti. Bu örnek dışındaki örneklerin hiç birinde konak kemikte infiltrasyon, osteoklast tipinde hücreler ve rezorpsiyon bulunmamaktaydı. Tüm örneklerde periodontal ligament ve diş yapıları intakttı.

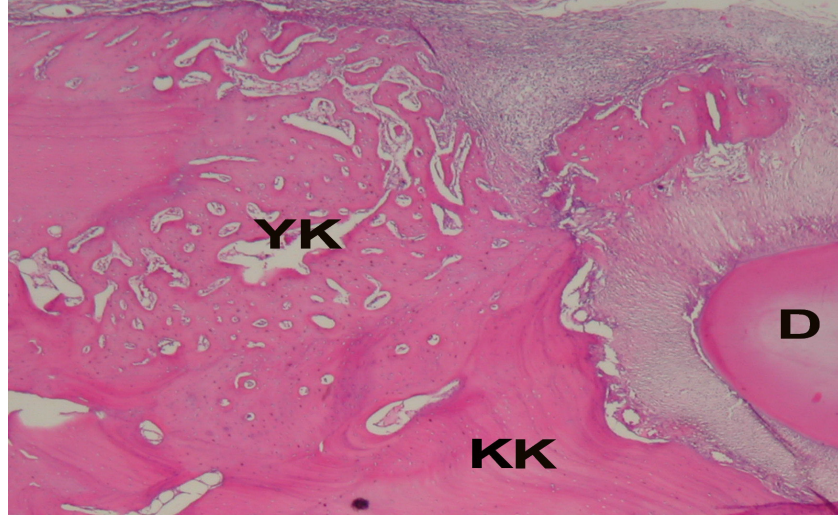


Resim 15: 2.deney bölgesinde 30.günde defekt alanında izlenen yeni kemik yapım alanı. (H&E,X20) (DA: Defekt alanı, YK: Yeni kemik, KK: Konak kemik)

45. gün

Defekt alanında fibröz yapıda bağ dokusu ve matür kemik mevcuttu. Defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranının %40-100 arasında olduğu dikkati çekti. (Resim 16) 3 örnekte yabancı cisim ve/veya kemik sekestr alanı izlenirken bunların ikisinde fokal apse odağı mevcuttu. İki örnekte herhangi bir inflamasyon izlenmezken diğer örnekler hafif düzeyde mononükleer inflamatuvar infiltrat içermekteydi

Konak kemikte ise fokal apse odağı bulunan iki örnekte mononükleer inflamatuvar infiltrat, osteoklast varlığı ve rezorpsiyon eşlik ettiği görüldü. Diğer örneklerde konak kemikte rezorpsiyon mevcut değildi. Periodontal ligament ve diş yapıları normal görünümdeydi.



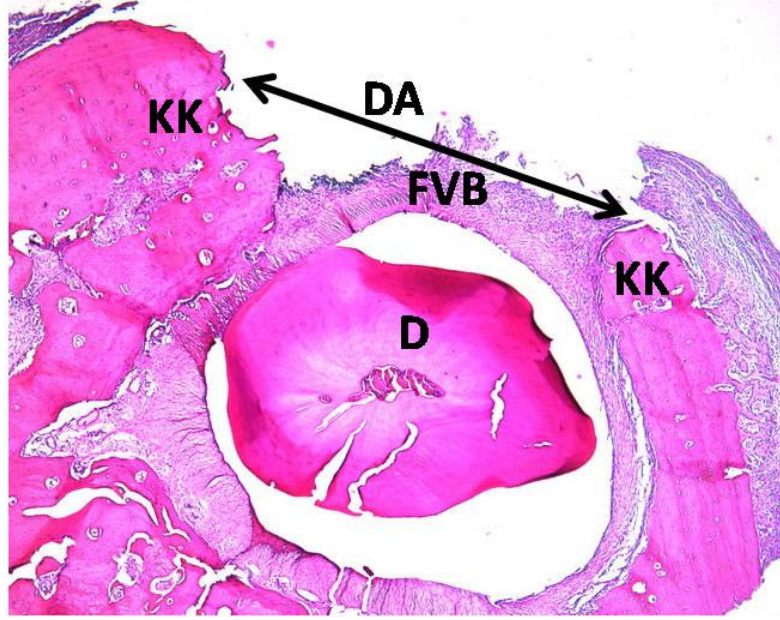
Resim 16: 2. deney bölgesinde 45. günde defekt alanının matür kemik ile dolması. (H&E,X40) (D; Diş, KK; Konak kemik, YK; Yeni matür yapıda kemik)

Aktif kontrol bölgesi

7. gün

Defekt alanının fibrovasküler bağ dokusu ile dolduğu ve orta-yoğun düzeyde mikst tipte inflamatuvar infiltrat içerdiği görüldü. (Resim 17) 4 örnekte yabancı cisim ve/veya kemik sekestri izlenmiş olup ve bu örneklerde apse formasyonu mevcuttu.

Konak kemikte bir örnek haricinde nötrofil lökositlerinin eşlik ettiği mikst tipte inflamatuvar infiltrat, osteoklast hücrelerinin varlığı ve rezorpsiyon saptandı. Periodontal ligament ve diş normal görünmekteydi.

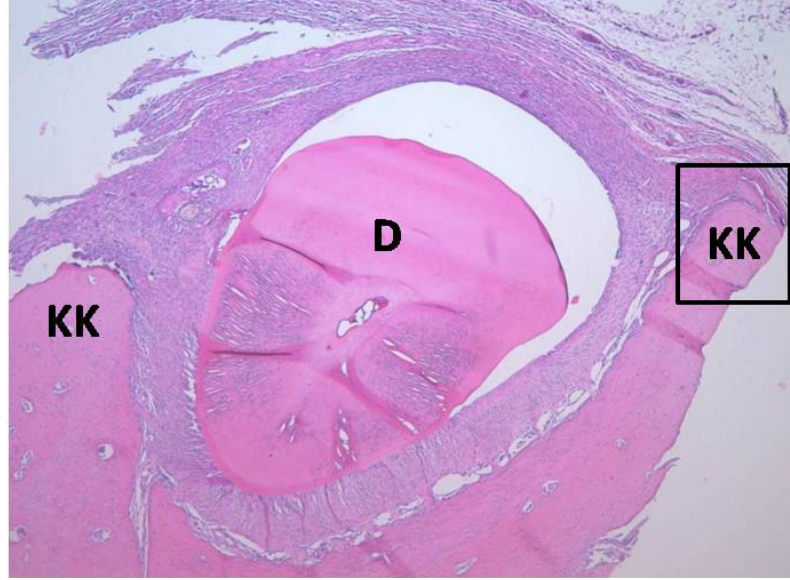


Resim 17: Aktif kontrol bölgesinde 7. günde defekt alanının fibrovasküler bağ dokusu ile dolumu ve çevre kemikte artmış infiltrasyon. (H&E,X40) (DA: Defekt alanı, D: Diş, KK: Konak kemik, FVB: Fibrovasküler bağ dokusu)

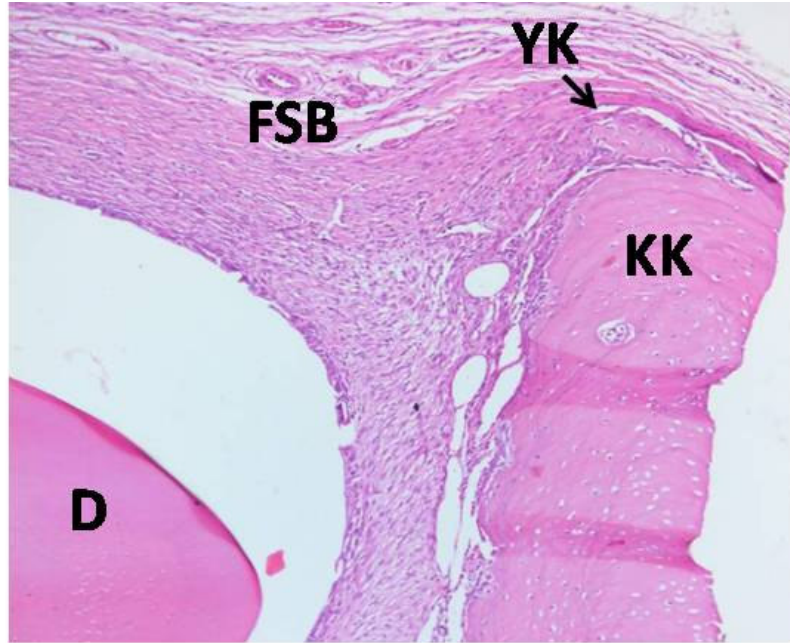
14. gün

Bütün örneklerde defekt alanı fibroselüler bağ dokusu ile yer değiştirmişti. (Resim 18) Örneklerin tümünde konak kemikten defekt alanına doğru yeni osteoid yapım alanları gözlenirken, defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranı %5-10 arasında değişmekteydi. (Resim 19) Defekt bölgesinde orta-yoğun düzeyde inflamatuvar infiltrasyon mevcuttu. Örneklerin 5'inde yabancı cisim ve/veya kemik sekestr alanları mevcutken bunların ikisinde apse formasyonu eşlik etmekteydi.

Konak kemik kenarlarında, 1 örnek dışındaki örneklerin hepsinde hafif düzeyde inflamatuvar infiltrat ve hafif düzeyde rezorpsiyon izlendi. Bütün örneklerde periodontal ligament ve diş yapısı normaldi.



Resim 18: Aktif kontrol bölgesinde 14. günde defekt bölgesinin fibroselüler bağ dokusu ile dolumu (H&E,X40) (D: Diş, KK: Konak kemik)

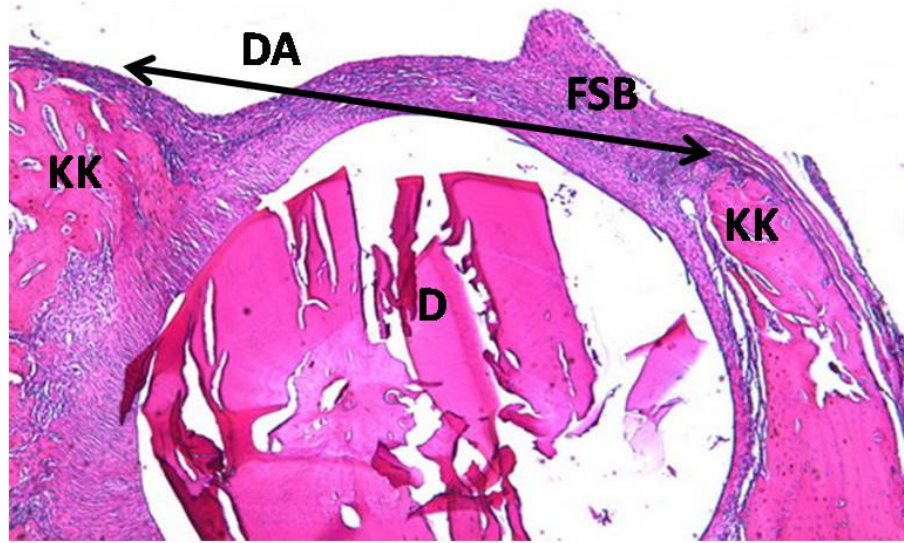


Resim 19: Resim 18'de kare içinde izlenen bölgenin büyük büyütmedeki görünümü. (H&E,X100) (D: Diş, KK: Konak kemik, FSB: Fibroselüler bağ doku, YK: Yeni kemik)

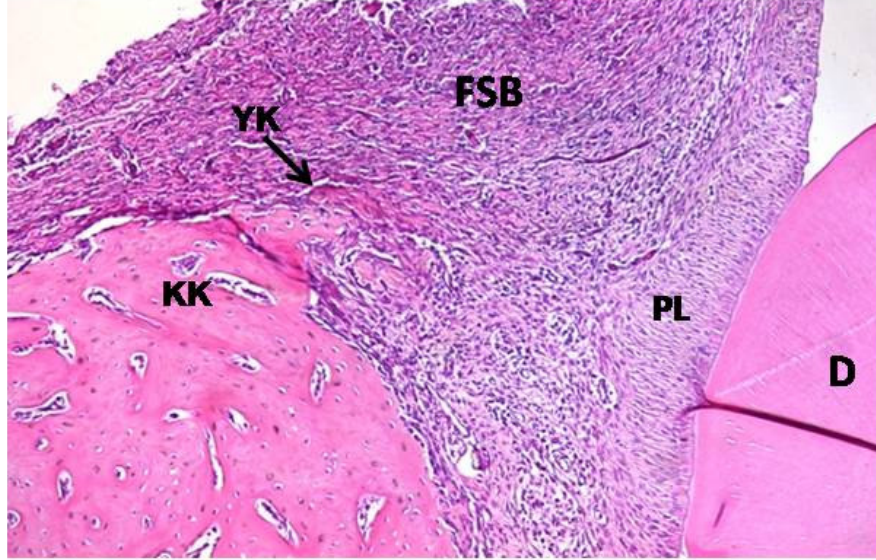
30.gün

Defekt alanında fibroelüler bağ dokusu ve minimal düzeyde yeni kemik bulunmaktaydı. Defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranı %5-30 arasında değişmekteydi. (Resim 20 ve 21) Dört örnekte yabancı cisim ve/veya kemik sekestr alanı bulunurken bir örnekte fokal apse odağı gözlemlendi. Örneklerin genelinde infiltrasyon şiddeti hafiften-yoğuna doğru değişmekteydi.

Konak kemik yönünden örneklerin dördünde içerisinde hafif düzeyde mononükleer infiltrat gözlenirken bunların yalnız ikisinde osteoklast ve rezorpsiyon mevcuttu. Periodontal ligament ve diş normal görünümdeydi.



Resim 20: Aktif kontrol bölgesinde 30 günde defekt alanının fibroelüler bağ dokusu ile dolumu. (H&E,X40) (D: Diş, DA: Defekt alanı , FSB: Fibroelüler bağ dokusu, KK: Konak kemik)

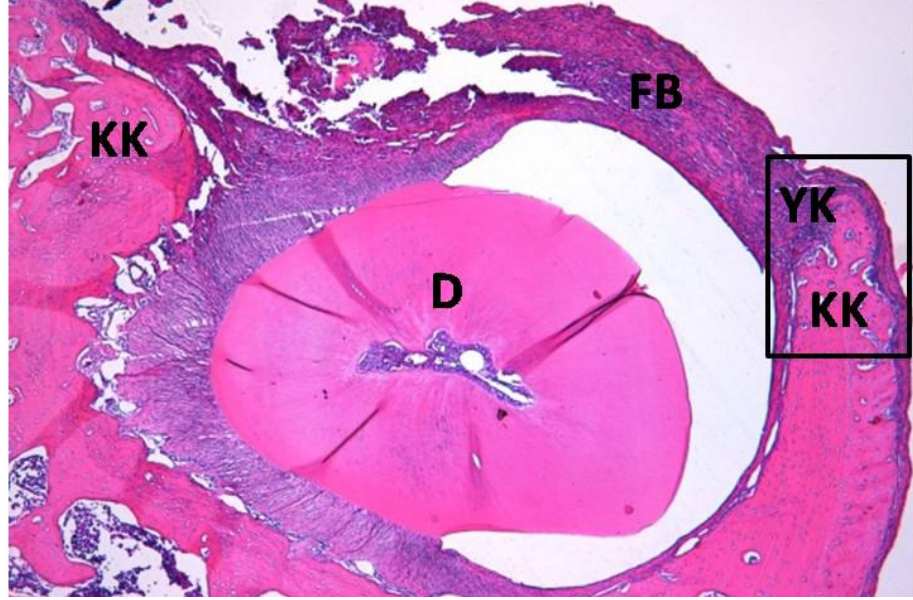


Resim 21: Aktif kontrol bölgesinde 30 günde minimal düzeyde siyah ok ile gösterilen yeni kemik yapım alanı (H&E,X100) (D: Diş, KK: Konak kemik, YK: Yeni kemik, FSB: Fibroelüler bağ dokusu, PL: Periodontal ligament)

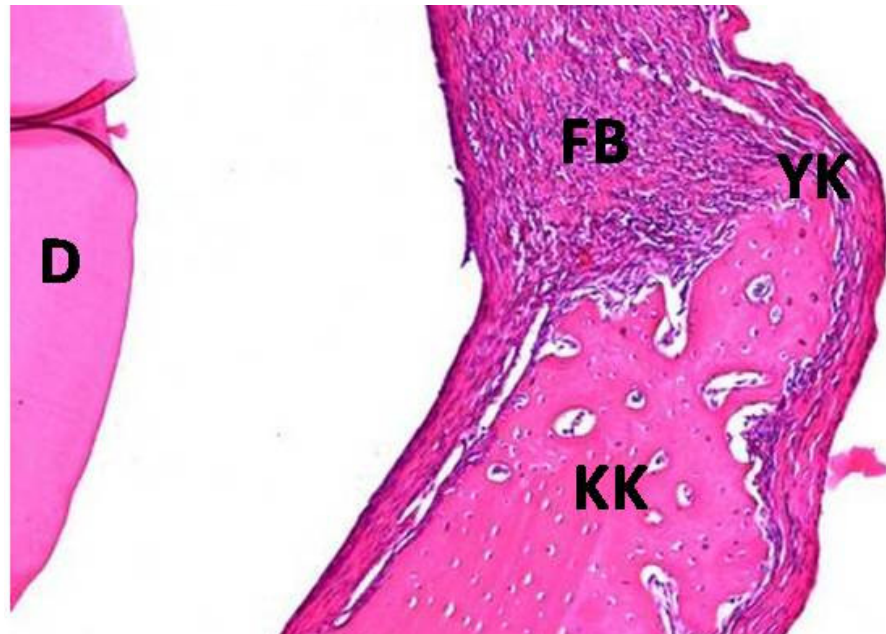
45. gün

Defekt alanının genel olarak fibröz karakterde bağ dokusu ile dolu olduğu ve minimal düzeyde matür kemik bulunduğu görüldü. (Resim 22 ve 23) Defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranı %5-30 arasında değişmekteydi. Örneklerin dördünde yabancı cisim ve/veya kemik sekestr alanları mevcuttu. Bu örneklerin de yalnız birinde yaygın apse formasyonu gözlemlendi. Bir örnekte de bağ dokuda hafif düzeyde mononükleer inflamatuvar infiltrat bulunurken, örneklerin biri dışında hiçbirinde nekroz, nekrotik kemik, apse ve rezorpsiyon alanları izlenmedi.

Konak kemikte bir örnek haricinde rezorpsiyon görülmedi. Periodontal ligament ve diş yapısı normaldi.



Resim 22: Aktif kontrol bölgesinde 45. günde fibröz yapıda bağ dokusu ile iyileşme ve minimal yeni kemik yapım alanı. (H&E,X40) (FB: Fibröz bağ dokusu, D: Diş, KK: Konak kemik, YK: Yeni kemik)



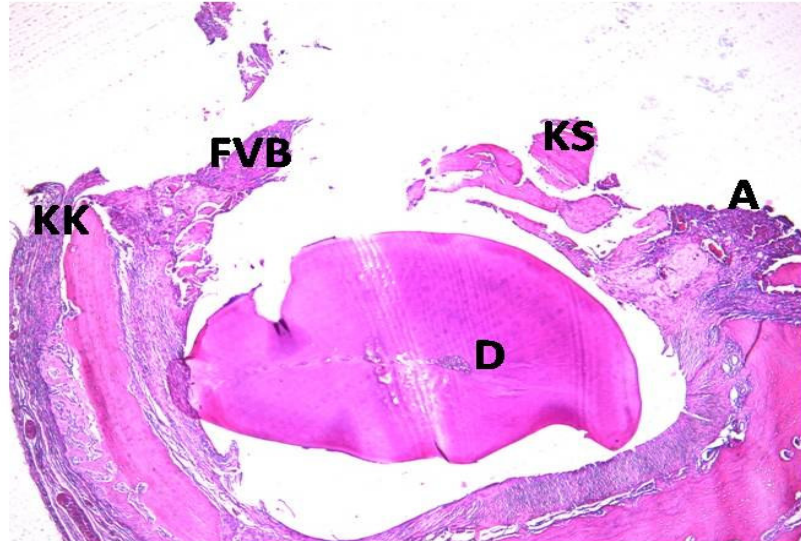
Resim 23: Resim 22'da kare içinde izlenen bölgenin büyük büyütmedeki görünümü. (H&E,X100) (KK: Konak kemik, YK: Matür yapıdaki yeni kemik, D: Diş; F: Fibröz bağ dokusu)

Pasif Kontrol Bölgesi

7.gün

Örneklerin tümünde defekt alanının fibrovasküler bağ dokusu ile dolduğu görüldü. Örneklerin tümünde yabancı cisim ve/veya kemik sekestrlerinin yanı sıra yoğun ve yer yer apse odakları mevcuttu. (Resim 24)

Konak kemikte dört örnekte nötrofil infiltrasyonu, osteoklast ve rezorpsiyon mevcuttu. İki örnekte ise konak kemiğin derinliklerinde de benzer tablo izlendi.



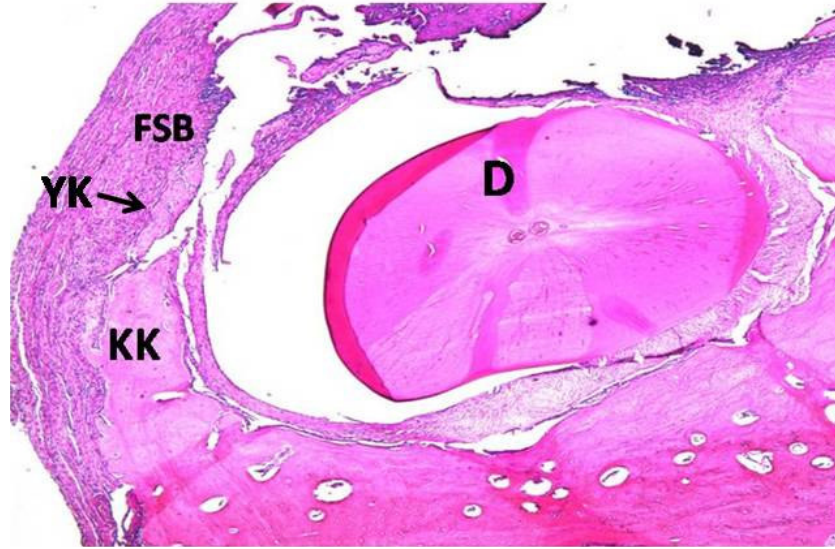
Resim 24: Pasif kontrol bölgesinde 7.günde defekt alanının fibrovasküler bağ doku ile dolumu (H&E,X40) (D: Diş, FVB: Fibrovasküler bağ dokusu, KS: Kemik sekestr, KK: Konak kemik, A: Apse odağı)

14.gün

Bütün örneklerde defekt alanındaki fibrovasküler bağ dokusu fibroselüler bağ dokusu ile yer değiştirmişti. Defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranı % 5-25 arasında değişmekteydi. (Resim 25) Defekt bölgesinde

yoğundan apseye kadar değişen yer yer mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Örneklerin biri hariç hepsinde yabancı cisim ve/veya kemik sekestr alanları mevcuttu.

Konak kemikte, yabancı cisim ve kemik sekestrlerinin bulunduğu örneklerde, mononükleer inflamatuvar infiltrasyon, osteoklastik hücre varlığı ve rezorpsiyon alanları dikkati çekti. Periodontal ligament ve diş yapısı normaldi.



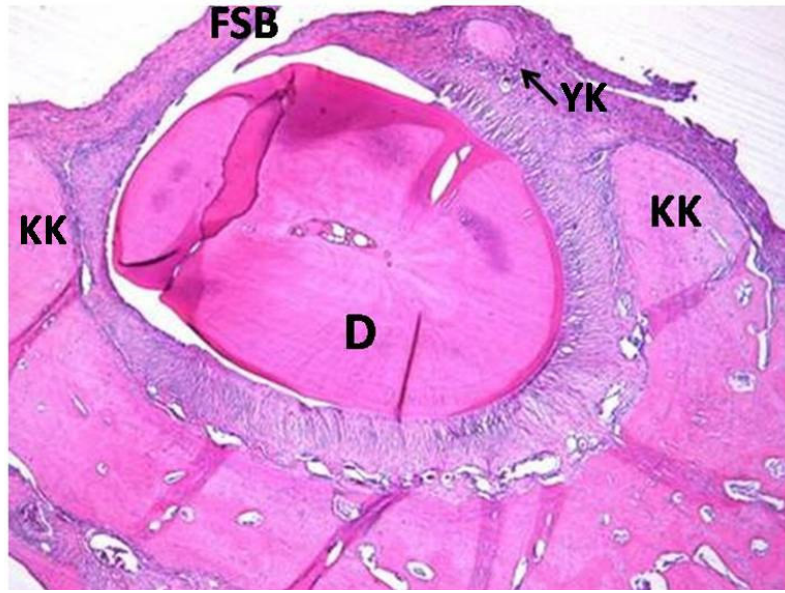
Resim 25: Pasif kontrol bölgesinde 14. günde kemik defekt alanında fibroelüler bağ dokusu ve siyah ok ile gösterilen minimal yeni kemik alanı (H&E,X40) (D: Diş , KK: Konak kemik, FSB: Fibroelüler bağ dokusu,YK: Yeni kemik)

30.gün

Defekt alanın büyük bölümü fibroelüler bağ dokusu ile doluydu. Yeni kemik oluşumu minimal düzeydeydi. Defekt kenarının karşılıklı gelme oranı % 5-30 arasındaydı. Bir örnekte yeni osteoid adası defektin orta kısmındaydı. (Resim 26) Bölgede hafif düzeyde mononükleer inflamatuvar infiltrat da mevcuttu. Dört örnekte yabancı cisim ve/veya kemik sekestr izlemişken bu örneklerin ikisinde nekrotik kemik ve apse formasyonu

bulunmaktaydı. Bu örnekler dışındaki diğer üç örnekte apse ve kemik sekesteri izlenmedi.

Konak kemikte yabancı cisim ve/veya kemik sekestri izlenen örnekler dışında rezorpsiyon izlenmedi. Periodontal ligament ve diş normal görünümdeydi.

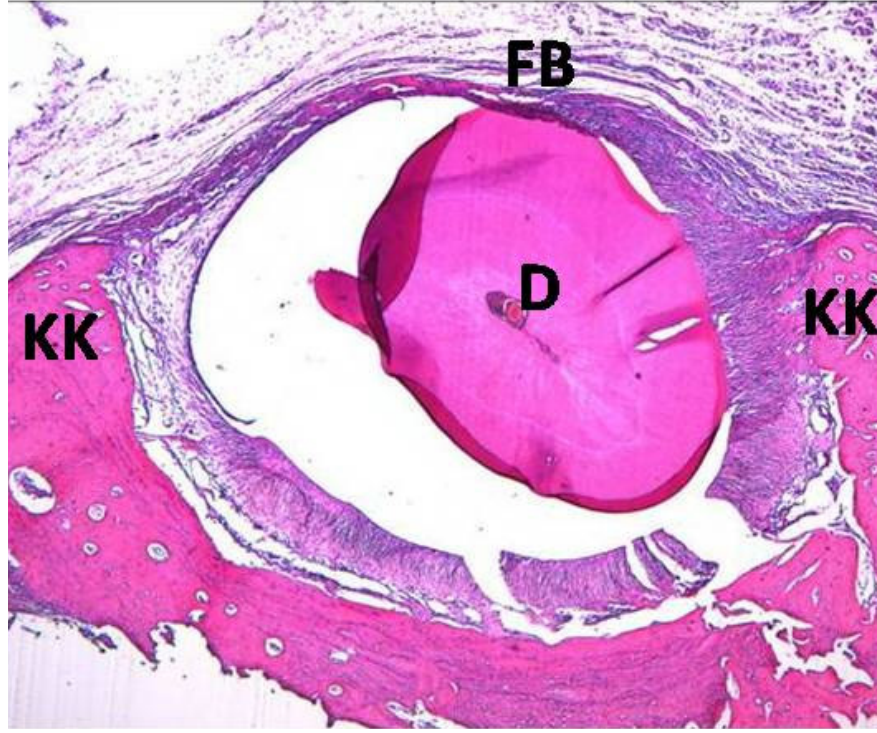


Resim 26: Pasif kontrol bölgesinde 30. günde defekt alanında fibroselüler bağ dokusu ile iyileşme ve siyah ok ile gösterilen yeni kemik oluşumu. (H&E,X40) (D: Diş, KK: Konak kemik, YK: Yeni kemik, FSB: Fibroselüler bağ dokusu)

45. gün

Defekt alanında genel olarak fibröz karakterde bağ dokusu ve az miktarda matür kemik olduğu görüldü. (Resim 27) Defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranı ise %5-30 arasındaydı. Bir örnekte hafif düzeyde inflamasyon görülürken diğer örneklerde inflamasyon gözlenmedi. Örneklerin hiçbirinde nekroz, nekrotik kemik, yabancı cisim, apse ve izlenmedi.

Konak kemikte hiçbir örnekte rezorpsiyon görülmedi. Periodontal ligament ve diş normal görünümdeydi.



Resim 27: Pasif kontrol bölgesinin 45. günde fibröz yapıda bağ dokusu ile iyileşmesi (H&E,X40) (D: Diş, FB: Fibröz bağ dokusu, KK: Konak kemik)

İnflamasyon bulguları:

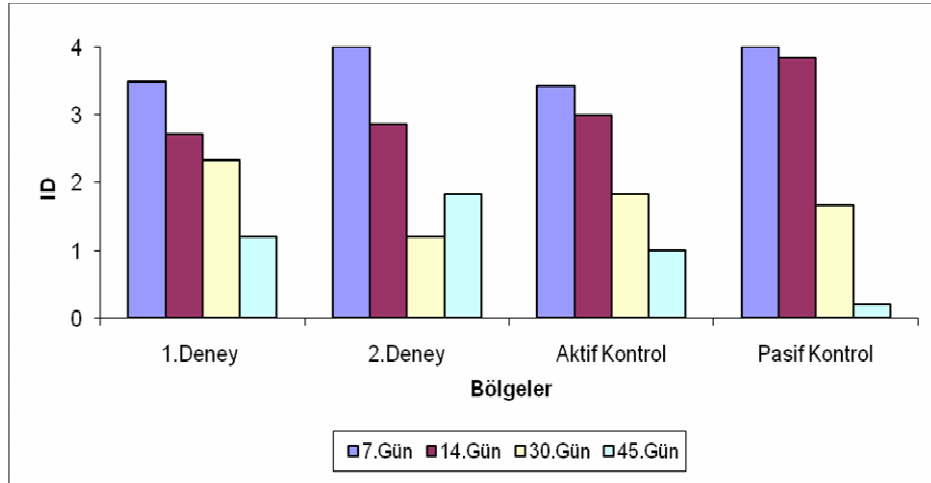
Deney süresince, deney ve kontrol bölgelerinde defekt alanındaki bağ dokuda izlenen inflamasyon dereceleri (ID) Tablo 6 ve Şekil 5' te görülmektedir.

Tablo 6. Deney süresince 1. ve 2. deney ve aktif ve pasif kontrol bölgelerinde izlenen inflamasyon derecesi miktarları verilmektedir.

	7. Gün	14. Gün	30.Gün	45.Gün	P
1.Deney Bölgesi	3,5±0,55	2,7±1,60	2,3±1,03	1,2±1,79	0,117
2.Deney Bölgesi	4,0±0,00	2,9±1,07	1,2±1,30 [†]	1,8±1,83	0,010
Aktif Kontrol Bölgesi	3,4±0,79	3,0±0,89	1,8±1,17	1,0±1,00 [†]	0,006
Pasif Kontrol Bölgesi	4,0±0,00	3,8±0,41	1,7±1,37 ^{†,‡}	0,2±0,45 ^{†,‡}	<0,001

[†]: 7.Gün ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,008).

[‡]: 14.Gün ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,008).



Şekil 3. Tablo 6'ya ait ID'lerinin grafikte izlenmesi.

Buna göre, 2. deney bölgesi 45. gün dışında, ID'lerinin deney boyunca tüm bölgelerde giderek azaldığı izlenmiştir. Ancak istatistiksel anlamlı azalma 2. deney bölgesinde 7-30 günler arasında bulgulanmıştır ($p=0,004$). Aktif kontrol bölgesinde ise 7 ile 45.günler arasında azalma anlamlı bulunmuştur. ($p=0,005$). Pasif kontrol bölgesinde hem 30 hem de 45. günlerdeki ID'deki azalma hem 7 hem de 14. güne göre istatistiksel anlamlı görülmüştür. ($p<0,001$, $p=0,003$, $p < 0,004$)

7,14,30 ve 45. günlerde bölgeler ID açısından birbirleriyle karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlı farklılık bulgulanmamıştır.

Histomorfometrik bulgular:

Yeni kemik alanı yüzdesi (YKA%)

Deney süresince defekt alanında izlenen, deney ve kontrol bölgelerine ait yeni kemik alanı yüzdesi değerleri Tablo 7 ve Şekil 6'da görülmektedir.

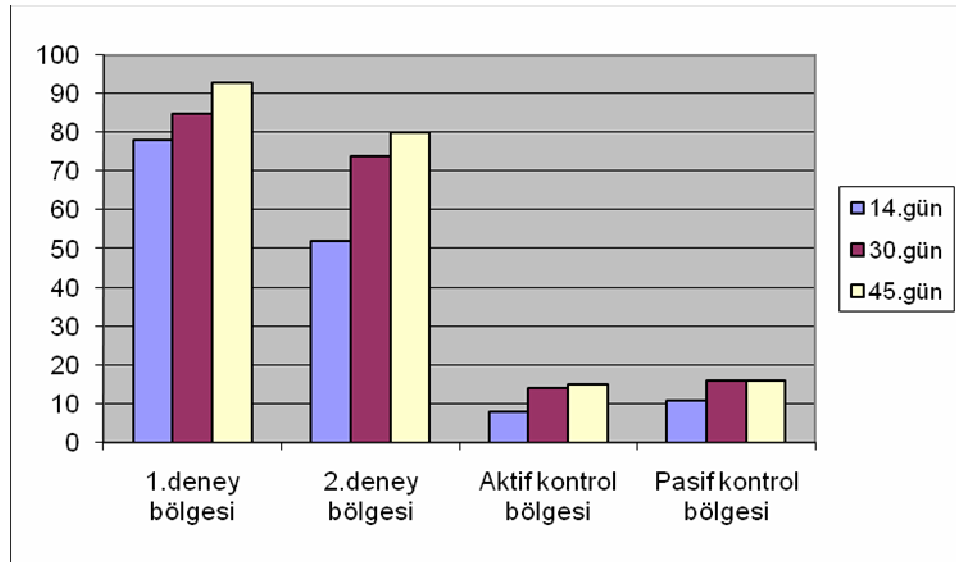
Tablo 7: Deney süresince 1. ve 2. deney, aktif ve pasif kontrol bölgelerinde, defekt alanında hesaplanan yeni kemik alanı yüzdesi verilmektedir.

	14.Gün	30.Gün	45.Gün	p
1.Deney Bölgesi	78,6±4,5	85,0±4,5 [‡]	93,6±4,5 [‡]	<0,001
2.Deney Bölgesi	52,8±9,1 [†]	74,3±9,1 ^{†,‡}	80,0±9,1 ^{†,‡}	<0,001
Aktif Kontrol Bölgesi	7,9±2,5 [†]	14,3±2,5 ^{†,‡}	15,0±2,5 ^{†,‡}	<0,001
Pasif Kontrol Bölgesi	11,4±3,09 [†]	16,4±3,09 ^{†,‡}	16,4±3,09 ^{†,‡}	<0,001

* 1.Deney Bölgesi ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01).

† 2..Deney Bölgesi ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01).

‡ 14. Gün ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01).



Şekil 4: Tablo 7’de yer alan YKA% değerlerinin grafikte izlenmesi.

Buna göre, hem deney hem de kontrol bölgelerinde oluşan yeni kemiğin giderek arttığı izlenmiştir. Ancak istatistiksel anlamlı artış deney ve kontrol bölgeleri için 14. gün ile 30. ve 45. günler arasında bulgulanmıştır. (p<0,001).

7,14,30 ve 45. günlerde deney ve kontrol bölgeleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, deney süresince, 1. ve 2. deney bölgelerindeki yeni kemik alanı yüzdeslerinin aktif ve pasif kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak istatistiksel anlamlı farklılığın 1. deney bölgesi ile 2. deney, aktif ve pasif kontrol bölgeleri arasında ve 2.deney bölgesi ile hem

aktif hem de bölgeleri arasında olduğu bulgulanmıştır. ($p<0,001$) Aktif ve pasif kontrol bölgeleri arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir.

İmmunhistokimyasal Bulgular:

Hem osteopontin hem de kemik siyaloprotein ile boyanan hücrelerdeki nükleer kahverengi boyanmalar pozitif olarak kabul edildi.

Kontrol dokusu olarak kullanılan matür kemik hücrelerinde ise, hem OPN hem de KSP ile osteositlerde boyanma izlenmezken, osteoblastlarda pozitiflik görüldü.

OPN ve KSP ile incelenen tüm hücrelerde boyanma paterninde değişkenlikler izlendi. Ancak 7,14,30 ve 45. günlerde deney ve kontrol bölgeleri kendi içlerinde ve birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. ($p>0,0125$) (Tablo 8 ve 9)

Tablo 8'de osteopontin ve tablo 9'da kemik siyaloprotein ile deney ve kontrol bölgelerine ait hücrelerde 7,14,30 ve 45. günlerde izlenen boyanma paternleri yer almaktadır. OPN ve KSP ile incelenen tüm hücrelerde farklı boyanma paternleri izlense de, bölgeler kendi içlerinde ve birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunamamıştır. ($p>0,0125$)

Tablo 8. OPN ile hücrelere ait boyanma paternleri

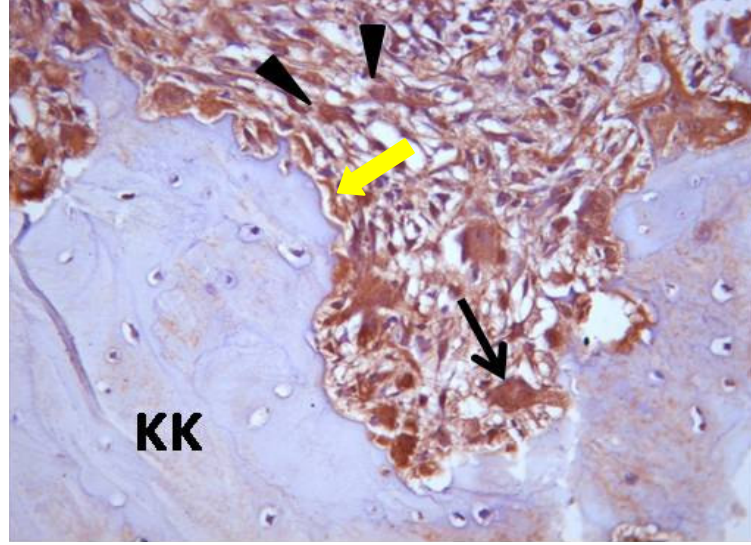
		7.Gün	14.Gün	30.Gün	45.Gün	p*
KONAK KEMİK OSTEOSİTLERİ (-)	1.Deney Bölgesi	0,4±0,55	0,2±0,41	0,0±0,00	0,0±0,00	0,183
	2.Deney Bölgesi	0,3±0,52	0,6±0,53	0,0±0,00	0,0±0,00	0,060
	Aktif Kontrol Bölgesi	0,1±0,38	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,488
	Pasif Kontrol Bölgesi	0,1±0,38	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,438
KONAK KEMİK OSTEOBLASTLARI (+++)	1.Deney Bölgesi	3,0±0,00	3,0±0,00	2,3±0,82	2,8±0,41	0,250
	2.Deney Bölgesi	2,5±0,84	3,0±0,00	2,6±0,55	2,8±0,45	0,354
	Aktif Kontrol Bölgesi	2,7±0,49	3,0±0,00	3,0±0,00	2,8±0,45	0,324
	Pasif Kontrol Bölgesi	2,9±0,38	2,9±0,38	2,8±0,41	2,8±0,41	0,999
OSTEOKLAST (+++)	1.Deney Bölgesi	3,0±0,00	2,6±0,55	2,8±0,50		0,325
	2.Deney Bölgesi	2,7±0,52	2,8±0,45			0,792
	Aktif Kontrol Bölgesi	2,6±0,53	2,9±0,38	2,7±0,58		0,517
	Pasif Kontrol Bölgesi	2,9±0,38	3,0±0,00	3,0±0,00		0,755
YENİ KEMİK OSTEOSİTLERİ ++(+++)	1.Deney Bölgesi		2,7±0,52	1,8±0,75	2,7±0,52	0,074
	2.Deney Bölgesi		2,1±0,38	2,2±0,45	1,8±0,75	0,484
	Aktif Kontrol Bölgesi		2,9±0,38	2,3±0,96	2,4±0,55	0,259
	Pasif Kontrol Bölgesi		2,0±1,41	2,3±0,52	1,2±0,41	0,116
YENİ KEMİK OSTEOBLASTLARI (+++)	1.Deney Bölgesi		3,0±0,00	2,7±0,52	3,0±0,00	0,119
	2.Deney Bölgesi		2,9±0,38	2,8±0,45	2,8±0,41	0,968
	Aktif Kontrol Bölgesi		3,0±0,00	3,0±0,00	3,0±0,00	1,000
	Pasif Kontrol Bölgesi		2,5±1,00	2,5±0,55	2,7±0,52	0,699
FİBROBLAST (++)	1.Deney Bölgesi	2,8±0,45	1,8±0,75	1,7±1,03	1,8±0,75	0,123
	2.Deney Bölgesi	2,2±1,17	2,6±0,53	1,2±0,45	1,5±0,55	0,016
	Aktif Kontrol Bölgesi	2,6±0,53	2,9±0,38	2,4±0,55	2,0±0,00	0,036
	Pasif Kontrol Bölgesi	2,4±0,53	1,9±0,90	2,0±0,89	1,7±0,52	0,291
PERİODONTAL LİGAMENT (+/++)	1.Deney Bölgesi	2,0±1,00	1,0±0,00	1,4±0,55	1,5±0,84	0,181
	2.Deney Bölgesi	1,8±0,84	1,1±0,38	1,6±0,55	1,0±0,00	0,061
	Aktif Kontrol Bölgesi	1,4±0,53	2,0±0,82	2,0±1,00	1,8±0,45	0,470
	Pasif Kontrol Bölgesi	1,7±0,76	1,0±0,58	1,7±0,82	1,0±0,00	0,075
SEMENTOBLAST (++)	1.Deney Bölgesi	2,6±0,55	2,5±0,55	1,8±0,96	2,0±0,63	0,223
	2.Deney Bölgesi	2,6±0,55	1,7±0,76	2,2±0,84	2,2±0,75	0,230
	Aktif Kontrol Bölgesi	2,6±0,53	2,7±0,49	2,8±0,45	2,6±0,89	0,866
	Pasif Kontrol Bölgesi	2,6±0,53	2,1±0,38	2,5±0,55	1,8±0,84	0,161

* Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı değil (p>0,0125).

(0/-: Boyanma yok, +/1: hafif boyanma, ++/2: orta boyanma, +++/3: yoğun boyanma)

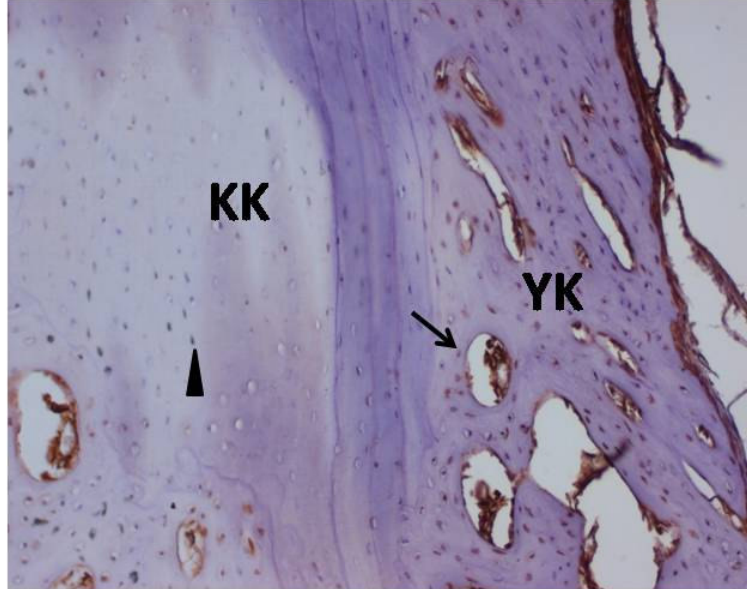
Tablo 8'de izlenen boyanma paternlerine göre, konak kemiğin derinlerinde bulunan osteositlerde boyanma izlenmezken, defekt kenarlarındaki konak kemik osteoblastlarının deney süresince yoğun boyandığı dikkat çekmekteydi.

Konak kemik çevresindeki osteoklastların da 2. deney bölgesindeki 30. gün dışında, 45.güne kadar olan deney süresince yoğun boyandığı izlendi. Ancak 2. deney bölgesi 30.günde ve tüm deney ve kontrol bölgelerinde 45. günde osteoklast hücreleri bulunmamaktaydı. (Resim 28)

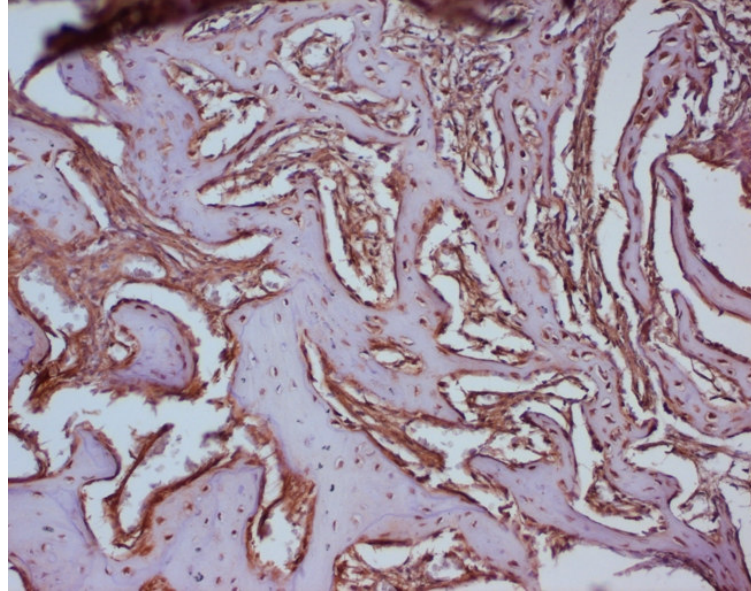


Resim 28. Konak kemik osteositlerinde boyanma olmaması ,defekt kenarlarındaki konak kemik osteoblastlarında ve osteoklastlarda yoğun boyanma ve defekt alanındaki bağ dokuda yer alan fibroblastlarda yoğun boyanmanın izlendiği 7. gün örneği. (ABC, X200)(► : Fibroblastlar , →: Osteoklast, ➔:Osteoblast, KK: Konak kemik)

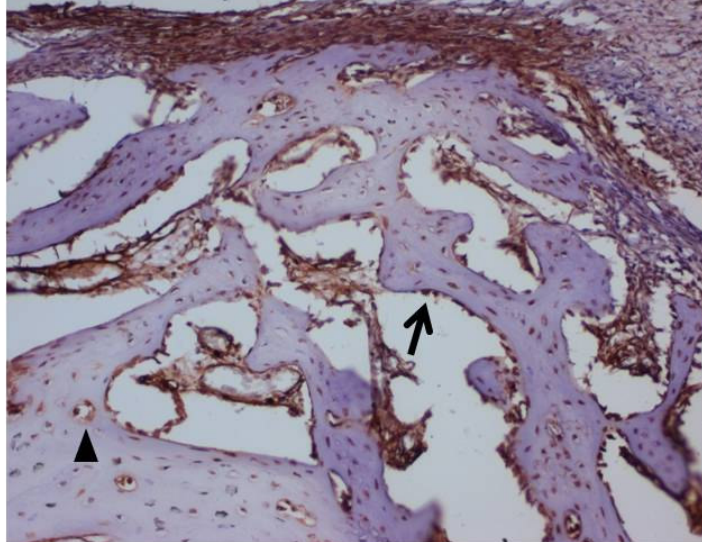
Yeni kemiğe ait osteositler ve osteoblastlar ise 14.günden itibaren görülmeye başlandı ve deney süresince hem deney hem de kontrol bölgelerinde yoğun boyanma izlendi.(Resim 29,30 ve 31)



Resim 29: Konak kemik osteositlerinde boyanma izlenmemesi ve defekt bölgelerinde yeni kemik alanlarındaki osteositlerde OPN ile yoğun boyanmanın görüldüğü 45. Güne ait örnek. (ABC,X100) (KK: Konak kemik, YK: Yeni kemik , ▲:Konak kemik osteositleri, →: Yeni kemik osteositleri)

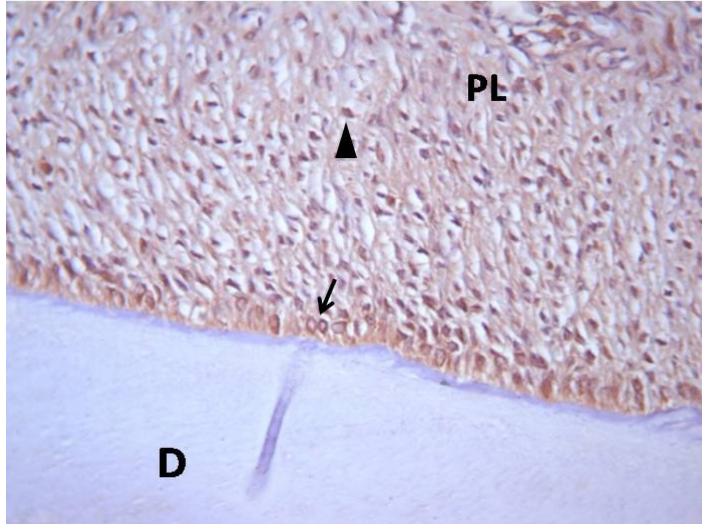


Resim 30. Yeni kemik osteosit ve osteoblastlarında izlenen OPN ile yoğun boyanmaya ait 14. gün örneği. (ABC,X100)



Resim 31: Yeni kemik osteosit ve osteoblastlarında izlenen OPN ile yoğun boyanmaya ait 45. gün örneği. (ABC,X100) (▲: Yeni kemik osteositleri, →: Yeni kemik osteoblastları)

Deney süresince tüm bölgelerde fibroblast (Resim 28) ve sementoblast hücrelerinde orta, periodontal ligament hücrelerinde ise hafif/orta derecede boyanma izlendi. (Resim 32)



Resim 32. Sementoblast hücrelerinde orta, periodontal ligament hücrelerinde hafif/orta derecede izlenen OPN ile boyanma paternine ait 7. gün örneği. (ABC,X100) (D: Diş, PL: Periodontal ligament, SB: sementoblastlar)

Tablo 9’da deney süresince tüm bölgelere ait KSP boyanma paternleri yer almaktadır.

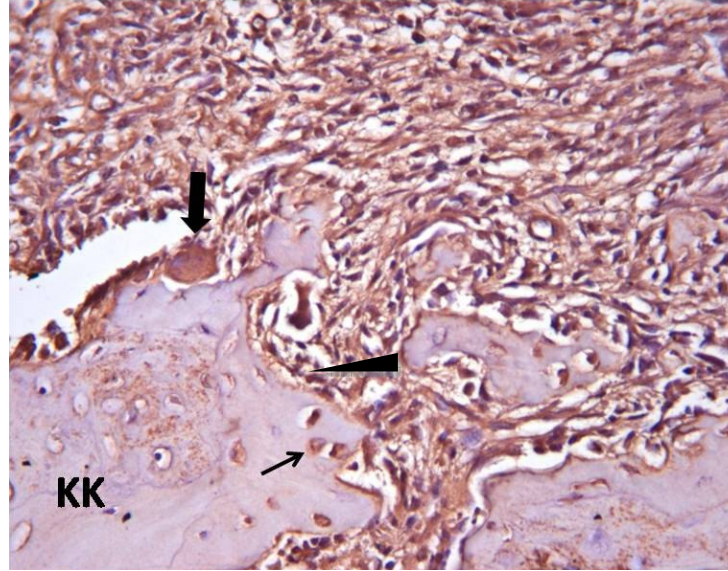
Tablo 9. KSP ile hücrelere ait boyanma paternleri.

		7.Gün	14.Gün	30.Gün	45.Gün	p*
KONAK KEMİK OSTEOSİTLERİ (+)	<i>1.Deney Bölgesi</i>	1,0±0,00	1,0±0,63	1,2±0,45	1,6±0,55	0,213
	<i>2.Deney Bölgesi</i>	1,0±0,71	1,0±0,63	1,0±0,58	1,0±0,00	1,000
	<i>Aktif Kontrol Bölgesi</i>	0,6±0,53	0,7±0,49	1,2±0,45	0,8±0,50	0,238
	<i>Pasif Kontrol Bölgesi</i>	1,3±0,49	1,0±0,00	1,4±0,53	1,6±0,55	0,184
KONAK KEMİK OSTEOBLASTLARI (++)	<i>1.Deney Bölgesi</i>	1,8±1,26	2,0±0,63	2,2±0,84	2,4±0,55	0,739
	<i>2.Deney Bölgesi</i>	2,6±0,55	2,5±0,55	2,4±0,53	2,7±0,52	0,846
	<i>Aktif Kontrol Bölgesi</i>	2,3±0,49	2,6±0,53	2,6±0,55	2,5±0,58	0,678
	<i>Pasif Kontrol Bölgesi</i>	1,9±0,90	2,8±0,41	2,1±0,69	2,4±0,55	0,118
OSTEOKLAST (+++)	<i>1.Deney Bölgesi</i>	3,0±0,00	2,4±1,34	0,8±1,10		0,836
	<i>2.Deney Bölgesi</i>	3,0±0,00	2,4±0,55			0,138
	<i>Aktif Kontrol Bölgesi</i>	2,4±0,55	2,8±0,50	0,7±1,15		0,233
	<i>Pasif Kontrol Bölgesi</i>	2,6±0,53	2,8±0,45	1,2±1,10		0,756
YENİ KEMİK OSTEOSİTLERİ (++)	<i>1.Deney Bölgesi</i>		1,2±0,41	1,8±0,75	2,0±0,82	0,120
	<i>2.Deney Bölgesi</i>		1,5±0,55	2,4±0,53	2,0±0,00	0,013
	<i>Aktif Kontrol Bölgesi</i>		1,6±1,14	2,0±0,00	1,8±0,50	0,750
	<i>Pasif Kontrol Bölgesi</i>		1,8±0,75	1,7±0,49	2,0±0,71	0,790
YENİ KEMİK OSTEOBLASTLARI (++)	<i>1.Deney Bölgesi</i>		2,0±1,10	2,0±1,00	2,3±0,96	0,912
	<i>2.Deney Bölgesi</i>		2,0±0,89	2,7±0,49	2,9±0,38	0,088
	<i>Aktif Kontrol Bölgesi</i>		1,8±0,84	2,3±0,50	2,8±0,50	0,156
	<i>Pasif Kontrol Bölgesi</i>		2,2±0,41	2,4±0,53	2,6±0,55	0,349
FİBROBLAST -(+)	<i>1.Deney Bölgesi</i>	0,5±0,58	0,0±0,00	0,4±0,53	0,6±0,55	0,025
	<i>2.Deney Bölgesi</i>	0,8±0,45	0,1±0,38	0,6±0,55	0,7±0,59	0,008
	<i>Aktif Kontrol Bölgesi</i>	0,3±0,49	0,5±0,58	0,8±0,45	0,8±0,50	0,821
	<i>Pasif Kontrol Bölgesi</i>	0,3±0,76	0,5±0,55	0,7±0,58	0,6±0,89	0,590
PERİODONTAL LİGAMENT -(+)	<i>1.Deney Bölgesi</i>	0,3±0,50	0,5±0,55	0,7±0,58	0,0±0,00	0,203
	<i>2.Deney Bölgesi</i>	0,6±0,89	0,1±0,38	0,7±0,52	0,3±0,49	0,291
	<i>Aktif Kontrol Bölgesi</i>	0,4±0,53	0,0±0,00	0,2±0,45	0,5±0,58	0,206
	<i>Pasif Kontrol Bölgesi</i>	0,7±0,76	0,2±0,41	0,4±0,53	0,6±0,55	0,046
SEMENTOBLAST (++)	<i>1.Deney Bölgesi</i>	1,8±0,96	1,5±0,84	2,0±1,00	1,6±0,89	0,014
	<i>2.Deney Bölgesi</i>	1,6±0,55	2,0±0,63	2,0±0,00	1,9±0,69	0,006
	<i>Aktif Kontrol Bölgesi</i>	1,4±0,98	1,9±0,90	2,0±0,00	2,5±0,58	0,053
	<i>Pasif Kontrol Bölgesi</i>	1,7±0,95	1,8±0,75	2,1±0,38	2,0±0,71	0,017

* Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı değil (p>0,0125).
(0/-: Boyanma yok, +/1: hafif boyanma, ++/2: orta boyanma, +++/3: yoğun boyanma)

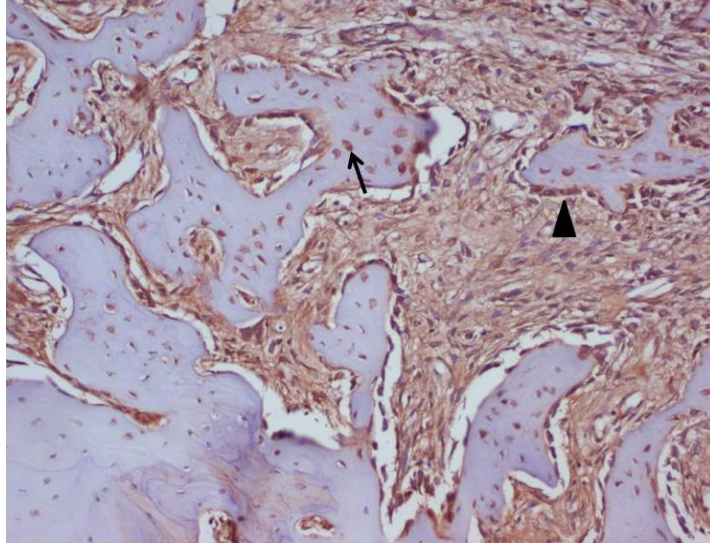
Genel olarak konak kemiğe ait osteositler deney süresince KSP ile hafif boyanırken, konak kemik etrafına dizilmiş olan osteoblastlar orta yoğunlukta boyanma gösterdi.

Osteoklastlar yönünden ise KSP ile boyanmanın 7. ve 14. günlerde yoğun olduğu izlendi. 30. günde 2.deney bölgesinde osteoklast izlenmezken, diğer bölgelerde boyanma yoğunluğunda azalma görüldü. 45. günde ise deney ve kontrol bölgelerinde osteoklast bulgulanmadı. (Resim 33)

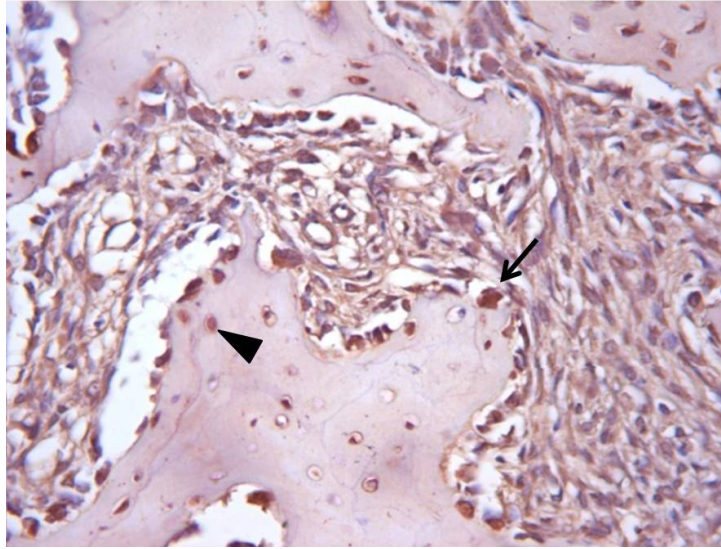


Resim 33. Konak kemiğe ait osteositlerdeki hafif boyanma ve konak kemik etrafındaki osteoblastlarda orta, osteoklastlarda yoğun boyanmaya ait 14. gün örneği. (ABC,X200) (→:Osteoklastlar, KK: Konak kemik; →: osteositler)

14. günden itibaren izlenmeye başlayan yeni kemik osteositlerinde ve osteoblastlarında KSP ile orta yoğunlukta boyanma saptandı.(Resim 34,35,37)



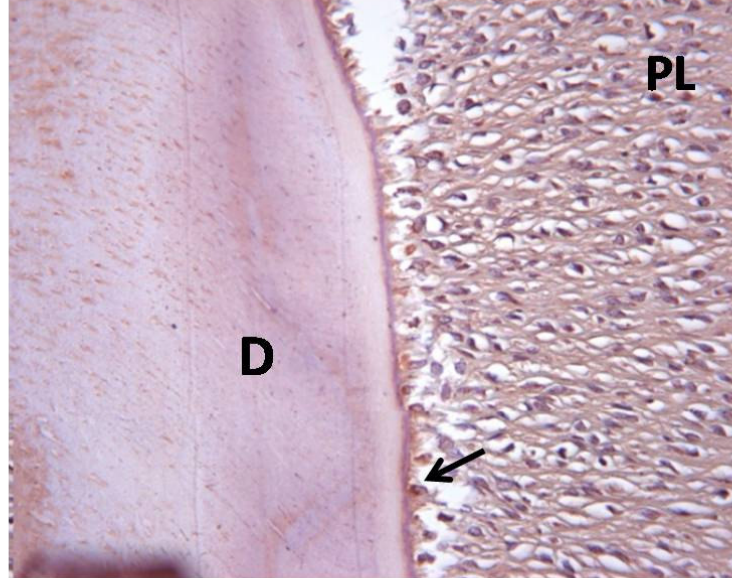
Resim 34. Yeni kemik osteosit ve osteoblastlarında izlenen KSP ile orta yoğunlukta boyanmaya ait 30. gün örneği. (ABC,X100) (▲: Yeni kemik osteoblastları, →: Yeni kemik osteositleri)



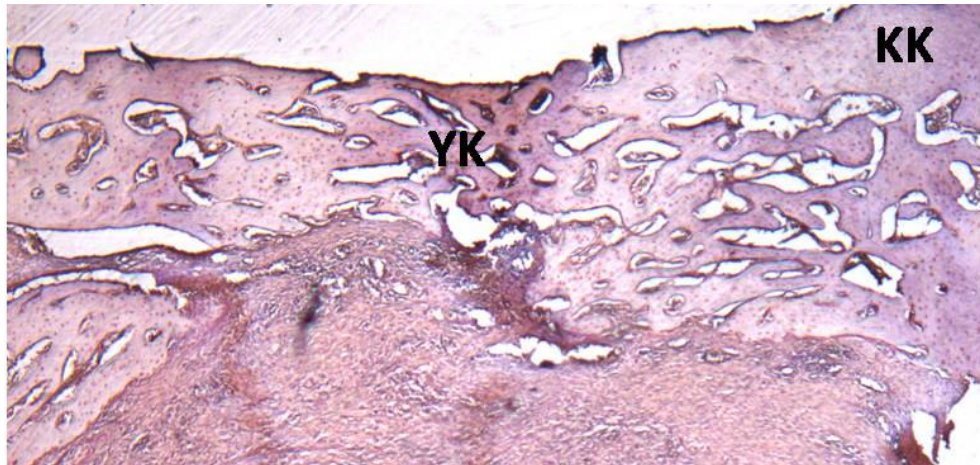
Resim 35. Yeni kemik osteosit ve osteoblastlarında izlenen KSP ile orta yoğunlukta boyanmaya ait 14. gün örneği. (ABC,X200) (▲:Yeni kemik osteositleri: →: Osteoklast)

Deney süresince periodontal ligament ve fibroblast hücrelerinde tüm bölgelerde çok zayıf boyanma mevcuttu veya hiç boyanma izlenmedi.

Genel olarak bütün örneklerde sementoblastlarda deney boyunca orta yoğunlukta boyanma izlendi. (Resim 35)



Resim 36. Periodontal ligament hücrelerinde boyanma izlenmemesi ve sementoblast hücrelerinde orta derecede izlenen KSP ile boyanma paternine ait 14. gün örneği. (ABC,X100) (D: Diş, PL: Periodontal ligament, →: Sementoblastlar)



Resim 37. Konak kemik osteositlerinde hafif, yeni kemik osteositlerinde orta derecede izlenen KSP ile boyanmaya ait 45. gün örneği. (ABC,X40) (KK: Konak kemik, YK: Yeni kemik)

TARTIŞMA

Günümüze kadar periodontal hastalık sonucunda meydana gelen kemik defektlerinin tedavisi için farklı tiplerde kemik greftleri^{6,7,8}, bariyer membranlar¹⁰, asit uygulamaları⁹, mine matriks proteinleri¹¹, büyüme faktörleri¹² ve bunların değişik kombinasyonları içeren^{124,125,126} birçok farklı uygulamalar denenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları incelendiğinde, birçok materyal ile standart flep operasyonlarından daha üstün sonuçlar elde edilmesine rağmen meydana gelen doku kayıplarının tamamen geri kazanımlarını sağlayabilecek ideal bir materyal ya da tedavi protokolünün mevcut olmadığı görülmektedir.^{124,125,126}

Son yıllarda literatürde araştırılan diğer bir alternatif ise, sistemik hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bazı ilaçların lokal olarak kemik defekt alanına uygulanmasıdır.¹⁵ Hidroksimetilglutaril-koenzim A redüktaz inhibitörleri olarak da tanınan statinler, yüksek serum kolesterolünü düşürmek amacıyla tıpta yaygın kullanılan ilaçlardır.^{16,17} Literatürde statinlerin kolesterol düşürme özelliklerine ilave olarak özellikle antiinflamatuvar etki, angiogenezi artırma ve kemik oluşumunu uyarma gibi etkileri olduğu belirtilmiştir.¹⁶ Ayrıca statinlerin kemik greft materyallerine göre daha düşük maliyetinin olmasının yanı sıra yan etkilerinin azlığı ve kolay elde edilebilir olması gibi avantajları da bulunmaktadır.⁷² Statin grubu ilaçların kemik metabolizması üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalara^{15,29,31,75} rağmen, bu etkileri üzerine çelişkili bilgiler vardır. Örneğin; Vaziri ve arkadaşları farelerde deneysel olarak oluşturdukları periodontitiste simvastatinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında enjeksiyon yolu ile 0.05 ml dozda simvastatinin lokal uygulaması, histolojik ve radyografik inceleme sonrasında simvastatinin kemik rezorpsiyon miktarını ve atışman kaybını önemli derecede azalttığını ve simvastatinin periodontitiste atışman ve alveol kemik üzerinde koruyucu etkisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir.⁴⁰ Yazawa ve arkadaşları yaptıkları kültür çalışmasında simvastatinin periodontal ligament üzerinde yararlı etkisi olduğunu ve periodontal rejeneratif tedavide kullanılabilecek potansiyeli olabileceğini göstermişlerdir.³⁸

Literatür genelde incelendiğinde statinlerin kemik defektlerinin tedavisindeki rolü, uygulama dozu ve kullanılan taşıyıcı gibi pek çok faktöre ait tartışmaların devam ettiği ancak bu konularda net bir sonuca varılamadığı yine literatür bilgileri dahilinde farklı dozlardaki simvastatinin kemik defektleri üzerindeki etkisini hücresel düzeyde inceleyen herhangi bir çalışmanın

bulunmadığı görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda farklı dozlarda ve polimer taşıyıcı ile hazırlanan simvastatinin kemik defektleri üzerindeki etkisini histolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak erken ve geç dönemde araştırması hedeflenmiştir.

Statinlerin lokal uygulamaları ile ilgili literatürde az sayıda ve çelişkili araştırmanın^{15,29,31,114} bulunması ve henüz klinik kullanımda olmaması nedeniyle ve osteoindüktif özelliklerini araştırmak amacıyla çalışmamızı deneysel olarak planlanmıştır.

Literatürde osteojenik, osteoindüktif veya osteokondüktif olmaya aday materyallerin klinik kullanımlarından önce biyolojik potansiyellerini ve uygulanabilirliklerini ortaya koymak ve periodontal hastalıklarda rejenerasyonla ilgili tedavi girişimlerini değerlendirmek amacıyla kemirgenler, köpekler ve primat modeller yaygın olarak kullanılmıştır.^{47,127,128} Bu nedenle çalışmamızda, bakım kolaylığı, ucuz ve kolay elde edilebilir olması nedeniyle, deney hayvanları etik kurulunun izni doğrultusunda deney hayvanı olarak kemirgenlerden kobaylar tercih edilmiştir.

Literatür incelemesinde, osteojenik potansiyelin yaşa göre değiştiği bildirilmesi^{129,130} sebebiyle çalışmamızda tüm deney hayvanlarının erişkin olmasına dikkat edilerek yaş farklılığının kemik oluşumu üzerine göstereceği değişikliklerin elimine edilmesine çalışılmıştır.

Lipofilik bir statin olan simvastatinin hidrofilik statinlere göre kemik dokusuna afinitesinin daha fazla olması, yağda çözünmediği için hücrelere daha kolay girebilmesi³² ve yapılan çalışmaların^{15,19,29,31,32,79} sonucuna göre kemik üzerine olumlu etkilerinin diğer statin grubu ilaçlara göre daha yüksek bulunması nedeniyle çalışmamızda statinler arasında simvastatin kullanıldı.

Statinler klinik olarak sistemik yoldan verilmektedir.³¹ Sistemik kullanımlarında karaciğere spesifite göstermeleri ve perifer dolaşıma çok düşük oranda dağılmaları nedeniyle kemik dokusuna çok az düzeyde ulaşırlar.³⁰ Lokal uygulamalarda ise statinler enterohepatik dolaşıma girmez ve uygulanan bölgedeki kemik dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunur.¹⁶ Gutierrez ve arkadaşları farelerde statinlerin topikal uygulamalarının, kemik oluşumu açısından, sistemik uygulamalarından daha

etkili olduğunu göstermişlerdir.¹³¹ Periodontal tedavi spesifik defektleri hedeflediği için lokal uygulama gerektiğinden ve literatürde yeni kemik oluşumu açısından lokal uygulamanın sistemik uygulamaya göre daha etkili olduğu gösterildiğinden çalışmamızda simvastatin lokal uygulandı.

Periodontal tedavide uyarıcı etkiye sahip tek doz uygulaması gereklidir. Tylin ve arkadaşları yaptıkları pilot çalışmalarda 2.2 mg simvastatinin kafatasında kemik kalınlığını uyaracak optimum doz olduğunu göstermiştir.¹⁵ Fakat 2.2 mg simvastatinin lokal uygulanması inflamasyona neden olmuştur. Bu nedenle takip eden çalışmalar 2.2 mg dozu düşürmenin klinik inflamasyon belirtilerini azaltabileceğini ileri sürmüşler ve 0.5 mg simvastatinin tek sefer lokal uygulamada daha uygun bir doz olduğunu bildirmişlerdir.^{31,113} Bu verilere dayanarak çalışmamızda simvastatinin lokal uygulaması için optimum doz olduğu ileri sürülen en yüksek doz 2.2 mg ve en düşük doz 0.5 mg karşılaştırılması planlandı.

Farelerde, kobaylarda, tavşanlarda veya köpeklerde maksilla ve mandibulada oluşturulan standardize edilmiş kemik defektleri kemik oluşumu ve periodontal yara iyileşmesini değerlendirmek için araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.^{127,132,133,134,135,136} Bu tür defektler akut ve kronik olarak ikiye ayrılır. Kronik defektler belirli bir miktar kemik uzaklaştırılmasını takiben sulkus içerisine plak tutunmasını sağlayacak ligatürlerle oluşturulurken, akut defektlerde önceden bakteri kontaminasyonu yoktur ve cerrahi yollar ile anında oluşturulmaktadır. Akut defektler günümüzde araştırmalarda^{47,110,136,137,138,139} kullanılan geçerli bir yöntem olduğu için çalışmamızda tercih edildi.

Kritik boyutta defekt, bir hayvana herhangi bir osteojenik, osteokondüktif veya osteoindüktif bir materyal implante edilmeden yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı (dolumu) ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak tanımlanmaktadır. Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibröz bağ dokusuyla dolumu ile iyileşme eğilimi gösterir.^{128,140} Bununla beraber çalışmalarda süre kısıtlı olduğundan ve çalışmanın süresi hayvanın tüm yaşam süresine kadar uzanmadığından, hayvan deneylerinde kritik boyuttaki defektler çalışma süresince iyileşme göstermeyecek boyuttaki defektlere işaret eder.¹¹⁰ Bir kemik defektindeki iyileşmenin miktarı geniş ölçüde yara büyüklüğüne bağlıdır. O nedenle iyileşmenin gözlemlenmek istendiği bir defekt tipi spontan olarak iyileşebileceği boyuttan fazla olmalıdır.¹⁴⁰

Kaban ve arkadaşları farelerde 4 mm çapında oluşturdukları defektlerin 24 hafta sonra iyileşmediğini göstermişlerdir¹⁴¹ ve genel olarak kobaylarda yapılan çalışmalarda 4 mm çapındaki defektler kritik boyutta defekt olarak kabul edilmektedir.^{127,138,141,142} Literatürde yer alan bu bilgileri göz önünde bulundurarak çalışmamızda 4,2 mm çapında akut defektler oluşturuldu.

Simvastatini lokal uygulamak için bir taşıyıcıya gerek duyulması taşıyıcı seçimine özen gösterilmesi zorunluluğunu getirmektedir. İstenen etkiyi elde edebilmek için, simvastatinin yerleştirilen bölgede uzun süreli devamını sağlayacak ve farmakolojik etkilerini sürekli olarak gösterecek bir taşıyıcı ile defekt alanına uygulanması gerekmektedir. Kemik defektlerinin tedavisinde kemik rejenerasyonunu indükleyebilen ilaçların bölgeye uygulanmalarına yardımcı olarak biyolojik olarak parçalanabilen materyaller kullanılmaktadır. Sentetik, doğal polimerler ve biyoseramiklerle desteklenmiş ilaçlar içeren salımı güçlendirilmiş sistemler taşıyıcılar arasında yer almaktadır.¹⁴³

Polimer teknolojisindeki artışla beraber ilaç salım sistemlerinde biyolojik olarak uyumlu çeşitli polimerler yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu polimerler, içerilerine yerleştirilen ilaçları kontrollü salma ve istenilen etkiyi elde etmek için düşük miktarda ilaca gerek duyulması gibi avantajlara sahiptir. Biyolojik olarak parçalanabilen materyaller içinde taşınan ilaçlar uzun zaman periyodunda uygulandıkları bölgede istenen konsantrasyonda bulunabilir ve farmakolojik etkilerini sürekli olarak gösterebilirler.³⁰ Tylin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada simvastatinin polimer ailesinin bir üyesi olan metil selüloz jel ile kontrollü salımı kemik oluşumunu önemli derecede arttırmıştır.¹⁵

Ismail, simvastatin için çeşitli lokal salım sistemlerini değerlendirdiği çalışmasında, simvastatini taşımak amacıyla bir polimer olan hidroksipropilmetilselüloz, sodyum karboksimetil selüloz ve kitosanı, jel ve granül şeklinde kullanmıştır. Sonuç olarak 24 saat içinde simvastatinin yaklaşık %50'sinin hidroksipropilmetilselüloz granül ve jelinden, %66-88'inin sodyum karboksimetil selüloz granül ve jelinden, %50'sinin kitosan granülden, %30'unun kitosan jelden salındığı göstermiştir. Kitosan jelden simvastatinin salımı uzun dönem tedavi için uygun görülmesine rağmen kitosan granüllerinde görülen aşırı şişkinliğin kemik defektlerinde kullanımlarını sınırlandırabileceğini, bu nedenle simvastatinin taşınmasında

hidroksipropilmetilselüloz granüllerinin uygun bir taşıyıcı olabileceğini ileri sürmüştür.³²

Hidroksipropilselüloz (HPS) toksik olmayan, suda çözülebilir doğal bir polimerdir.¹⁴⁴ Medikal alanda lokal ve sistemik olarak kullanılmaktadır.¹⁴⁵ İlaçlar özelliklerini kaybetmeden HPS ile kolaylıkla karıştırılabilmektedir.¹⁴⁴ Bu nedenlerle çalışmamızda taşıyıcı olarak HPS kullanıldı.

Kemik defektlerinde etkili bir iyileşme sağlanması için simvastatinin ortamda uzun bir süre kalması gerekmektedir. Simvastatinin polimer taşıyıcıdan ortama salındığını teyit etmek ve maddelerin salım hızı hakkında fikir sahibi olabilmek amacıyla çalışma öncesi salım deneyleri de yapıldı.

Denek farklılıklardan kaynaklanabilecek, iyileşmeyi ve çalışma sonuçlarını etkileyebilecek faktörlerin gruplar üzerine olan etkilerinin eşitlenebilmesi amacıyla, literatürde yer aldığı gibi^{146,147}, çalışmamızda da, deney ve kontrol grubunu oluşturan defektlerin aynı kobayda oluşturulmasına dikkat ettik. Ayrıca oluşturduğumuz kemik defektlerinin benzer bölgede olması ve oral cerrahi girişimlere daha iyi bir rehber olacağı düşüncesiyle, uygulamaların çeneler bölgesinde yapılması uygun görüldü. Bu nedenle çalışmamızda her kobayda maksilla ve mandibulada sağ ve sol tarafında yer alan kesici dişlere komşu olmak üzere toplam dört adet kemik defekti oluşturuldu.

Benzer çalışmalarda yer aldığı gibi taşıyıcının tek başına etkisini izleyebilmek ve herhangi bir materyal yerleştirilmeden iyileşmenin şeklini görebilmek amacıyla kontrol grupları aktif ve pasif kontrol bölgesi olarak da planlandı.^{31,114}

Periodontal kompleksi oluşturan doku komponentlerinin iyileşme hızlarının farklı olması, örneklerin belirli dönemlerde izlenmesi zorunluluğunu doğurmaktadır.¹²⁷ Literatürde histopatolojik değerlendirme günlerinin farklılıklar gösterdiği görülmektedir.¹³⁹ Benzer deneysel çalışma literatür bulguları, genel olarak kemikleşmenin 1.-2. haftalarda başladığını^{33,114,148}, 6-8 haftalarda olgun kemiğin oluştuğunu bildirmektedir.^{148,149,150,151,152,153,154} Simvastatinin erken ve geç dönemde kemik defeklerinin iyileşme kapasitesine

etkisini karşılaştırmalı olarak inceleyebilmek için erken dönem için 7. ve 14., geç dönem için 30. ve 45. günler değerlendirme periodları olarak seçildi.

Kemik defektleri ile ilgili çalışmalarda iyileşmenin hücresele seviyede tespiti açısından en geçerli ve en uygun değerlendirme şeklinin histoloji ve histomorfometrik yöntemlerin kullanılması olduğu bilinmektedir.^{127,138} Literatürde simvastatinin etkilerinin daha çok histolojik sonuçları^{31,114} çalışılmışken, rejenerasyon işlemi boyunca iyileşmenin moleküler ve hücresele düzeyi hakkında bilgi veren immunhistokimya çalışmaları bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda simvastatinin kemik defektlerinin iyileşmesi üzerindeki etkisini histolojik ve histomorfometrik değerlendirmenin yanı sıra, yeni oluşan dokularla ilişkili matriks moleküllerinin ekspresyonu da immünohistokimyasal olarak incelendi.

Kemik defektlerini dişli alanda oluşturduğumuz için matriks molekülleri arasından kemik ve periodontal dokuların rejenerasyonunu gösterebilen proteinler tercih edildi. Literatürü incelediğimizde yara bölgelerinde kemik ve periodontal dokuların rejenerasyonunu çalışmak için mineralize bağ dokuda iki non-kollogenöz matriks proteininin yararlı olabileceği görülmektedir. Bu proteinler kemik, dentin ve sement gibi mineralize bağ dokularda bulunan osteopontin ve kemik siyaloproteindir.¹⁵⁵ Bu nedenle çalışmamızda bu iki protein kullanıldı.

Simvastatinin polimer taşıyıcılar ile hazırlanmasını takiben, yaptığımız salım deneyi sonucunda in vitro şartlarda 168 saat sonra (7. günde) 0.5 mg simvastatinin HPC'den %100 salımının tamamlandığını, 2.2.mg simvastatinin ise %31,24'ünün salımının gerçekleştiğini gördük. Salım deneyi 2.2 mg simvastatinin salım hızının 0.5 mg simvastatine oranla daha yavaş olduğu göstermekteydi.

Tylin ve arkadaşları farelerin kafatasına 2.2 mg simvastatini lokal uygulandıkları inflamasyon, apse ve deri bölgesinde kabuklaşma görmüşlerdir.¹⁵ Stein ve arkadaşları ise 2.2 mg dozu 0.5 mg'a düşürmenin klinik inflamasyon belirtilerini azalttığını bulmuşlardır.¹¹³ Çalışmamızda benzer olarak kobaylarda 1. deney bölgesinde uyguladığımız yüksek doz olan 2.2 mg simvastatinin özellikle erken dönemde klinik olarak yumuşak dokuda inflamasyon, ödem ve apseye neden olduğunu, 0.5 mg simvastatinin uygulanan bölgede ve kontrol bölgelerinde iyileşmenin sorunsuz gerçekleştiğini gördük. 0.5 mg simvastatinin in vitro ortamda 7. günde

salımının tamamlamasının izlenmesi, deney ortamında 2.2 mg'a göre daha az kaldığını düşündürmektedir. Bu nedenle klinik açıdan sorunsuz iyileşme gözlenmiş olabilir. Ancak 2.2 mg simvastatin ile inflamasyon, apse ve ödem görülse de, 30. günden itibaren yumuşak dokudaki bu reaksiyon giderek azalmıştır.

Yara iyileşmesi birçok işlemi içeren kompleks bir olaydır. Travma veya cerrahi eksizyon sonucunda hasar gören kemik iyileşmesi genel olarak 3 basamakta incelenir.

Birinci fazda başlangıç yaralanmayı takiben akut inflamatuvar reaksiyon gelişir. Tamir inflamasyonla başlar. Fibroblastlar ve vasküler endotel hücreler proliferasyon olarak defekt bölgesinde kısa zamanda granülasyon dokusunu oluşturur. Granülasyon dokusunun histolojik karakteristiği yeni küçük kan damarların oluşumu ve fibroblastların proliferasyonu şeklindedir.^{47,19,156} Çalışmamızda iyileşme şekline uygun olarak 7. günde bütün defekt alanlarının fibrovasküler bağ doku ile dolduğu ve yeni kemik oluşumunun mevcut olmadığı görülmüştür. Kontrol bölgeleri için 7. günde iyileşme şekli literatürdeki birçok çalışma ile uyum göstermektedir.^{31,114,157} Ancak statinlerin neden olduğu osteogenezin erken dönemini inceleyen bir çalışmada, tavşanların kafatasında oluşturulan 10X5 mm boyutundaki kemik defektine, kollajen süngere emdirilen 0.2 ml simvastatin uygulaması ile beşinci günde defekt kenarında yeni kemik oluşumu gözlenmiş ve 6. günün sonunda yeni kemik miktarı artarak defekt merkezine doğru ilerlemeye başlamıştır.³³ Çalışmalar arasındaki bu farklılığın, simvastatinin uygulandığı doz, kullanılan taşıyıcı ve hazırlanış şeklinin farklılığından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda kullandığımız polimer taşıyıcıdan simvastatinin ortama salımı kolajen süngere oranla daha yavaş olabilir dolayısıyla kemik oluşumu daha geç başlamış olabilir.

Kemik iyileşmesinin ikinci fazında granülasyon dokusu, meydana gelecek sert doku için bir iskelet görevi görür. Periosttaki istirahat halindeki hücreler uyarılarak yeni kemik yapımına başlarlar. Kemik defektlerindeki iyileşmeyi inceleyen çalışmalara^{31,114,157} benzer olarak çalışmamızda 14. günde, kontrol grubu dahil olmak üzere tüm örneklerde, periost ve kemik iliğinden gelen farklılaşmamış hücrelerin proliferasyonu ve diferansiyasyonu sonucunda konak kemik kenarlarından itibaren değişen oranlarda yeni kemik yapımı izlendi.

Wong ve Rabie tavşanların kafatasında oluşturulan 10X5 mm boyutundaki kemik defektine konsantrasyonu 2.5 mg/ml olacak şekilde suda çözünerek elde edilen simvastatin solüsyonundan 0.2 ml alarak kollajen sünger ile uyguladıkları çalışmalarında, 14 gün sonra simvastatin uyguladıkları grupta defekt kenarlarının karşıdan karşıya birleşme eğiliminin yüksek olduğunu gözlerken, kontrol grubunda az bir miktar yeni kemik oluştuğu ve defekt alanının fibröz doku ile dolduğunu görmüşlerdir.¹¹⁴

Özeç ve arkadaşları farelerin mandibulalarında 3 mm çapında oluşturdukları defektlere konsantrasyonu 2.5 mg/ml olacak şekilde suda çözünerek elde edilen simvastatin solüsyonundan 0.2 ml alarak jelatin sünger ile uyguladıklarında, 14 gün sonra konak kemik-greft yüzleşmesinde yeni kemik oluştuğu ve oluşan yeni kemiğin defekt ortasına doğru ilerlediği görmüşlerdir. Pasif kontrol grubunun ise fibröz bağ doku ile dolduğunu izlemişlerdir.³¹

Çalışmamızda her iki çalışmaya benzer olarak simvastatin uygulanan alanlarda defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranının kontrol bölgelerine göre daha yüksek olması ve kontrol bölgelerinde defekt alanının büyük bir kısmının fibroblastlar bağ doku ile dolu olması, simvastatinin osteoindüktif özelliğe sahip bir ilaç olduğunu destekler niteliktedir.

30. günde kemik yapımının devam ettiği ve 45. günde ise yerini matür kemiğe bırakmaya başladığı görüldü. Simvastatin uygulanan defekt alanlarında yeni oluşan kemik kontrol bölgelerine göre 4-5 kat daha fazla bulundu. Ancak kontrol bölgelerinde örneklerin hiçbirinde defekt kenarlarının tamamen birleşme göstermediği ve defekt alanının büyük bir bölümünün fibröz bağ doku ile dolu olduğu izlendi.

2.2 mg simvastatinin uygulanan bölgelerde, 0.5 mg simvastatin uygulanan bölgelere göre yeni kemik alanı yüzdesi istatistiksel anlamı olarak daha fazla bulundu. Bu sonucun, doza bağlı olarak ve 2.2 mg simvastatinin salım hızının daha yavaş olması ve defekt alanında daha uzun süre kalmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Kemik defektlerinde simvastatinin rolünü uzun dönemde inceleyen bir çalışma mevcut olmadığından geç dönemde elde ettiğimiz sonuçların birebir karşılaştırılması yapılamadı. Fakat histomorfometrik

değerlendirmede 14, 30 ve 45. günlerde yeni oluşan kemik alanı yüzdesinin simvastatin uyguladığımız defekt alanlarında kontrol bölgelerine göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek olması ve bölge içi değerlendirmede 14.gün ile 30. ve 45. günler arasında istatistiksel fark bulunması, simvastatinin etkisini erken dönem olan 14. günden başlayarak 45.güne kadar giderek artan oranda gösterdiğini düşündürmektedir.

Defekt alanında bulunan bağ dokudaki inflamasyon derecesinin 7. günde tüm bölgelerde benzer derecede yüksek olması, kullanılan polimer taşıyıcı ve farklı simvastatin dozlarının histolojik düzeyde bu duruma neden olmadığını düşündürmektedir. Bu nedenle 7. günde izlenen yüksek inflamasyon derecesi kemiğin akut defekte verdiği reaksiyona bağlı olduğu şeklinde açıklanabilir. ID'nin 45. güne doğru tüm bölgelerde giderek eşit oranda azalması bu bulgularımızı desteklemektedir.

Kemik defektlerinin intraoral bölgede açılması ve kobayların kemirgen hayvanlar olması nedeniyle örneklerin çoğunda mikrobiyal dental plak, kobaya ait kıllar gibi maddeler ile kontaminasyona bağlı olarak yabancı cisim reaksiyonu izlendi. Yabancı cisim bulunan örneklerde, yabancı cisim reaksiyonu nedeniyle defekt alanındaki bağ dokuda apse ve yoğun inflamasyon görüldü ve bu örneklerde inflamasyon derecesi yüksekti. Günler arasındaki fark ID yönünden incelenirken hayvanların bağımsız oldukları da göz önünde alınırsa günler arasındaki istatistiksel azalmanın nedenin ortamda görülen yabancı cisimlerin miktarına da bağlı olabileceği görülmektedir. Deney süresince bölgeler arasında ID yönünden istatistiksel anlamlı farkın görülmemesi de izlenen ID'lerin simvastatin ve taşıyıcıdan çok yabancı cisim reaksiyonuna bağlı olduğunu desteklemektedir.

Örneklerin çoğunda hem deney hem de kontrol bölgelerinde 7. ve 14. günlerde konak kemikte osteoklastik aktivite ve rezorpsiyonun yüksek olması da bu olayın kullandığımız taşıyıcı ve simvastatin dozlarından bağımsız olarak geliştiğini göstermekteydi. Konak kemikteki rezorpsiyona bağ dokudaki inflamasyonun neden olabileceği düşünüldü. İnflamasyon derecesindeki azalma ile orantılı olarak osteoklastik aktivite ve konak kemikteki rezorpsiyonun azalması bu bulgumuzu desteklemekteydi.

Literatürde rejenere olan kemik ve periodontal dokuları değerlendiren immünohistokimya çalışmaları oldukça sınırlıdır.^{47,52,123,158} Bu çalışmalarda deneysel olarak farelerde oluşturulan fenestrasyon⁵²,

maymunlarda oluşturulan kemik içi¹⁵⁸ ve köpeklerde oluşturulan klas 3 furkasyon defektlerinde⁴⁷ rejenere olan periodontal dokularda ve kemikte OPN ve KSP mevcudiyeti gösterilmiştir. Çalışmamızda literatürdeki bu çalışmalarla uyumlu olarak defekt oluşturduğumuz alanlarda boyanmanın izlenmesi, OPN ve KSP'nin rejenerasyon olan bölgelerde bulunduğu ve görüşünü desteklemektedir.

OPN ve KSP kemik oluşumunun farklı döneminde açığa çıkan ve multifonksiyona sahip proteinlerdir. OPN ekstraselüler matriks hücre adezyon proteinidir.⁵¹ OPN kalsifikasyondan önce mineralize olmamış matrikste birikir ve kalsifikasyona neden olur. OPN osteoblastların major ürünü olmasına rağmen beyin ve böbrek hücrelerinden sentezlendiği de bildirilmiştir.¹⁵⁹ OPN'nin hücre adezyonu dışında kemoatraksiyon ve immünomodülasyona katıldığı da bilinmektedir.¹⁶⁰ KSP'nin ise daha çok matür osteoblastlar tarafından eksprese edildiği ve hidroksiapatit kristallerinin oluşumuna katıldıkları bildirilmiştir.¹⁶¹

Osteositlerin görevleri tam bilinmemekle beraber, kemik oluşumu ve rezorpsiyonu sırasında inaktif olmadığı ve sinyal göndererek kemik remodelasyonuna katıldıkları düşünülmektedir.^{159,162} Çalışmamızda konak kemik osteositlerinin bazı örneklerde OPN ile çok zayıf, KSP ile de hafif boyanması, osteositlerin inaktif olmadığını ve bu proteinler aracılığıyla osteoblast ve osteoklast hücrelerine sinyal göndererek kemik remodelasyonuna katıldığı görüşünü desteklemektedir.

Christgau ve arkadaşları köpeklerde klas 3 furkasyon defektlerinde YDR ve flep operasyonu arasındaki farkı immünohistokimya yöntemleri ile araştırdıkları çalışmalarında cerrahiden iki hafta sonra konak kemik yüzeyinde osteoblast ve osteoklastlarda OPN ve KSP ekspresyonu gözlemlemişler, bu nedenle kemikte bir remodelasyon işlemi varlığını ifade etmişlerdir.⁴⁷ Bu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da defekt kenarındaki konak kemik osteoblastlarının OPN ve KSP ile orta/yoğun derecede boyanması, osteoblastların salgıladıkları OPN ve KSP aracılığıyla ekstraselüler matrikse bağlandığı ve defekt kenarından itibaren defekt alanına doğru konak kemik osteoblastlarının aktif olarak kemik yapımına katıldığını göstermektedir. Konak kemik çevresinde izlenen osteoklastların da OPN ve KSP ile yoğun boyanması, osteoklastların bu proteinler aracılığıyla kemik yüzeyine bağlanarak rezorpsiyona neden olduğunu, yani hem deney hem de kontrol bölgelerinde konak kemikte aktif bir remodelasyonu olduğunu gösterdi.

Çalışmamızda deney ve kontrol bölgelerinde 14. günden itibaren izlemeye başladığımız yeni kemiğe ait osteoblastlarda ve osteositlerde erken ve geç dönemde kuvvetli OPN ve KSP ekspresyonu gözlemlendi. Erken dönemdeki yoğun boyanma aktif hücre proliferasyonu ve adezyonu olduğu, her iki hücrelerinde yeni kemik oluşumuna katıldığı ve kemik oluşumu için uyarımın devam ettiğini gösterdi. Geç dönemde ise yeni kemiğe ait osteoblastlarda ve osteositlerde OPN ile boyanma gözlenmesinin yanı sıra özellikle KSP ile boyanma paterninde giderek artış izlenmesi kemiğin mineralize olarak matür bir yapı kazanmaya başladığının işaretiydi.

Diğer yandan değişen oranlarda boyanma görülmesine karşın genel olarak deney ve kontrol bölgelerinde fibroblastların OPN ile orta, KSP ile hafif yoğunlukta boyandığı veya hiç boyanmadığı izlendi. İnanç¹⁶³ ve Ivanovski¹⁶⁴ yaptıkları kültür çalışmalarında immatur fibroblast hücrelerinin OPN gibi kemik ile ilişkili makromolekülleri eksprese ettiklerini, bu hücrelerin osteoblastik fenotipe sahip olduklarını ve uygun bir uyarı geldiğinde osteoblast hücrelerine dönüşebileceklerini belirtmişlerdir. Çalışmamızda deney ve kontrol bölgeleri birbirleriyle karşılaştırıldığında benzer boyanma paternleri görülmesine karşın, simvastatin uyguladığımız bölgelerde, kontrol bölgelerine oranla istatistiksel anlamlı olarak daha fazla kemik yapımı görmemizin nedeni, simvastatinin immatur fibroblast hücrelerini uyararak bu hücrelerin osteoblast hücrelerine dönüşümünü artırması olabilir.

Lekic ve arkadaşları farelerde molar dişlerin bulunduğu alanlarda 0.6 mm çapında akut defektler oluşturarak bir grupta bölgede bulunan periodontal ligamenti kök yüzeyinden uzaklaştırmış, diğer grupta ise uzaklaştırmamışlardır. Sonuçta periodontal ligamenti kök yüzeyinden uzaklaştırmadıklarında komşu mineralize dokularda kemik oluşumunun arttığını bulgulamışlar ve periodontal ligament hücrelerinin osteoblast öncü hücreleri için kaynak görevi gördüğünü ve komşu kemik alanlarında birikebileceğini ileri sürmüşlerdir.¹²³ Hücre kültür çalışmalarında ise periodontal ligament hücrelerinin sementoblast, fibroblast ve osteoblast öncü hücrelerini içerdiği gösterilmiş ve periodontal ligament içinde bulunan bu hücrelerin kök yüzeyi ve alveol kemik yüzeyine doğru göç ettiği ve sonuçta gelen uyarılara göre osteoblast, sementoblast ve fibroblastlara farklılaşabileceği de ifade edilmiştir.^{164,165} Çalışmamızda da bütün bölgelerde periodontal ligamentin korunmasına bağlı olarak OPN ve KSP ile değişen oranlarda boyanması bu hücrelerde fenotipik değişiklikler olduğunu ve periodontal ligamentin kemik ve sement oluşumuna katıldığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda sementoblastların orta yoğunlukta OPN ve KSP eksprese ettikleri izlendi. Birçok çalışmada, sementogenez sırasında sementoblastların KSP ve OPN eksprese ederek kök yüzeyine bağlanabileceği ve sement yapımının gerçekleşebileceği ifade edilmiş ve bu durumun sement mineralizasyonu ile ilişkili olabileceği ileri sürmüştür^{47,49,166}

Ancak kobayların kesici dişlerinin sürekli gelişim göstererek erüpsiyona uğradığı bilinmektedir. Elwood¹⁶⁷, kobayların insizör dişlerindeki bu uzamanın günde ortalama 0,3 mm olduğunu bildirmiştir. Bu bilgiyi göz önüne aldığımızda periodontal ligament ve sementte OPN ve KSP ile izlenen boyanma paternini sadece simvastatinin etkisine bağlamak mümkün değildir. Bu nedenle konu bu yönüyle sürekli erüpsiyonun olmadığı deney modeliyle araştırmaya açıktır.

Çalışmamızda deney ve kontrol bölgeleri birbirleriyle karşılaştırıldığında hem OPN ve hem de KSP ile istatistiksel anlamlılık taşıyan tedaviye bağlı bir farklılık izlenmemiştir.

Benzer olarak Christgau ve arkadaşları da köpeklerde klas 3 furkasyon defektlerinde YDR ve flep operasyonu arasında ESM proteinlerinin ekspresyonunu farklı dönemlerde karşılaştırdıkları çalışmalarında tedavi şekilleri arasında ESM moleküllerinin ekspresyonu açısından fark bulunmadığını ortaya koymuşlardır.⁴⁷

Sculean ve arkadaşları da maymunlarda kronik periodontal defektler oluşturmuş ve bu defektlere yönlendirilmiş doku rejenerasyonu, mine matriks proteinleri, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ile kombine mine matriks proteinleri ve sadece flep cerrahisi uygulamışlar ve OPN, kollajen I ve III'ün ekspresyonunu incelemişlerdir. Araştırmalarının sonucunda rejeneratif tedavi yöntemleri ile daha iyi sonuç elde etmelerine rağmen tüm tedavi grupları arasında matriks moleküllerinin dağılımı ve boyanma yoğunluğu arasında fark bulamamışlardır.¹⁵⁹ Sculean ve arkadaşları bu çalışmalarında periodontal rejenerasyon için bir ortam oluşturulduğunda, tedavi şekline bakılmaksızın matriks proteinlerinin benzer boyanma paterni gösterdiklerini ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda da yukarıda belirtilen bu çalışmalara benzer olarak bütün takip dönemlerinde 1. ve 2. deney bölgesinde kemik oluşum oranının kontrol gruplarına oranla istatistiksel anlamlı izlense de, moleküler düzeyde ESM proteinlerinden hem OPN hem de KSP ekspresyonu açısından bölgeler arasında farklılık bulgulanmadı. Simvastatinin yara iyileşmesi üzerindeki etkisini immünohistokimya yöntemleri ile inceleyen benzer bir çalışma bulunmadığından sonuçların bire bir karşılaştırılması yapılamadı. Bununla beraber çalışmamızda deney ve kontrol bölgelerinin benzer boyanma göstermesinin Sculean ve arkadaşlarının da belirttiği gibi defekt oluşturarak periodontal rejenerasyon için uygun bir ortam oluşturulduğunda, uygulanan tedavi şekline bakılmaksızın bu moleküllerin benzer ekspresyon olması nedeniyle olabileceği düşünüldü.

Tesbit edebildiğimiz bulgularımız içerisinde çalışmamız, polimer taşıyıcı ile uygulanan simvastatinin kemik oluşumunu uyardığını, en iyi sonucun yüksek doz olan 2.2 mg ile elde edildiğini, ancak 2.2 mg simvastatinin deney süresince giderek azalan yumuşak dokuda inflamasyonunu bulguladık. Bu sonuçlarımıza göre simvastatinin klinik çalışmalarda uygulanabilecek ve kemik yapımında olumlu katkısı olabilecek bir madde olduğu, klinik çalışmalar öncesi, özellikle kronik ve sürekli erüpsiyonun izlenmediği periodontal kemik defektlerinde de deneysel yönden taşıyıcının rezorpsiyon süresi, dokuda simvastatinin doza bağlı salım zamanı gibi konuya ait açık yönlerinin çok iyi araştırılmasının gerektiğine inanıyoruz.

SONUÇLAR

0.5 ve 2.2 mg olmak üzere farklı dozlarda ve HPS polimer taşıyıcı ile lokal uygulanan simvastatinin kemik defektleri üzerine etkisini, her kobayda deney ve kontrol bölgeleri yer alacak şekilde akut defektler oluşturarak, 7. ve 14. günlerde erken, 30. ve 45. günlerde geç iyileşme döneminde histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelediğimiz deneysel çalışmamızda:

1. Simvastatinin defekt ortamına yerleştirilmesi için hazırlanan polimer taşıyıcının kullanımında sorun yaşanmadı ve uygun bir taşıyıcı olduğu görüldü.
2. Simvastatin içeren polimer taşıyıcıların hazırlanmasını takiben, cerrahi uygulama öncesi yapılan in vitro salım deneyi sonucunda, 7. günde 0.5 mg simvastatinin tamamen (%100) salındığı, 2.2 mg simvastatinin ise %31,24 oranında ve daha yavaş salındığı bulguları.
3. Operasyonları takiben klinik iyileşmede 2. deney ve aktif, pasif kontrol bölgelerinde sorun izlenmedi. Ancak 2.2 mg simvastatin uygulanan 1. deney bölgesinde 7. ve 14. günlerde yoğun, 30. günde ise hafif olmak üzere izlenen yumuşak dokuda inflamasyon, apse ve aşırı ödem, 45. günde bulgulanmadı.
4. Histolojik bulgulara göre 7. günde bölgelerin tümünde defekt alanının önce fibrovasküler bağ doku ile dolduğu, 14. günden başlayarak 30. gün dahil olmak üzere fibroblastlar bağ doku ile yer değiştirdiği, 45. günde ise yerini fibröz bağ dokuya bıraktığı izlendi.
5. Yeni kemik oluşumunun bölgelerin hiçbirinde 7. günde başlamadığı, 14.günden itibaren izlenen yeni kemik oluşumunun deney ve kontrol bölgelerinde değişen oranlarda olmak üzere, 45. günde yerini matür kemiğe bırakmaya başladığı görüldü.

Histomorfometrik olarak incelendiğinde defekt alanlarına ait yeni kemik alanı yüzdesinin deney ve kontrol bölgelerinde 14. günden itibaren giderek arttığı izlendi. Buna göre 14,30 ve 45. günlerde yeni kemik alanı yüzdesi sırasıyla 1.

deney bölgesinde %78, %85 ve %93; 2. deney bölgesinde %52, %74 ve %80; aktif kontrol bölgesinde %7, %14 ve %15; pasif kontrol bölgesinde ise %11, %16 ve %16 olarak bulgulandı. Hem deney hem de kontrol bölgeleri için 14. gün ile 30. ve 45. günler arasındaki bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu.

Deney ve kontrol bölgeleri birbirleri ile karşılaştırıldığında ise deney süresince, 1. ve 2. deney bölgelerindeki yeni kemik alanı yüzdelerinin aktif ve pasif kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. 1. ve 2. Deney bölgeleri arasındaki fark da istatistiksel anlamlı bulundu. Aktif ve pasif kontrol bölgeleri arasında ise istatistiksel anlamlı farklılık izlenmedi.

6. Defekt alanlarında 14. günden itibaren izlenen defekt kenarlarının karşılıklı gelme oranının bölgelere göre değiştiği görüldü. Buna göre, 14, 30 ve 45. günlerde bu oran 1. deney bölgesinde sırasıyla %70-80, %50-100 ve %80-100, 2. deney bölgesinde %50-60, %50-90 ve %40-100 arasında izlendi. Aktif kontrol bölgesinde ise %5-10, %5-30 ve %5-30 olarak bulgulandı. Pasif kontrol bölgesinde de yine sırasıyla %5-10, %5-30 ve %5-30 olarak görüldü.

7. Tüm bölgelerde defekt alanındaki bağ dokusunda görülen inflamasyon derecesinin 2. deney bölgesi 45. gün dışında deney boyunca giderek azaldığı izlendi. Bu azalmanın 2. deney bölgesinde 7-30 günler arasında, aktif kontrol bölgesinde 7 ile 45.günler arasında, pasif kontrol bölgesinde ise 7. ve 14. günler ile hem 30 hem de 45. günler arasında istatistiksel olarak anlamlılık taşıdığı bulgulandı. ID 'nin kemiğin verdiği reaksiyona ve örneklerde bulunan yabancı cisim reaksiyonuna bağlı olarak değişim gösterebileceği görüldü. Deney süresince bölgeler ID açısından birbirleri ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlı farklılık bulgulanmadı.

8. Defekt alanına komşu konak kemiğin histolojik değerlendirilmesinde deney süresince deney ve kontrol bölgelerinde osteoklast varlığı ve konak kemikte rezorpsiyonun giderek azaldığı izlendi.

9. İmmünohistokimya incelemelerinde 7., 14, 30. ve 45. günlerde deney ve kontrol bölgelerinde OPN ve KSP ile değişen oranlarda izlenen boyanma paternleri kendi içlerinde ve birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulgulanmadı.

Deney süresince OPN ile konak kemik osteositlerinde hafif boyanma veya boyanmama izlenirken, defekt kenarlarında konak kemik osteoblastları yoğun boyandı. Konak kemik çevresindeki osteoklastların ise, 2. deney bölgesinde 30. güne ve tüm bölgelerde 45. güne kadar yoğun boyandığı izlendi.

14. günden itibaren izlenmeye başlayan yeni kemik osteosit ve osteoblastlarında yoğun boyanma mevcuttu. Fibroblast ve sementoblastlar orta, periodontal hücreler ise hafif/orta boyandı.

KSP ile konak kemik osteositleri hafif konak kemik etrafındaki osteoblastlar yoğun boyandı. Osteoklastlarda özellikle 7. ve 14. günlerde tüm bölgelerde yoğun izlenen boyanmanın 30. günde azaldığı 30. günde 2. deney ve 45. günde ise tüm bölgelerde osteoklast varlığının olmadığı bulgulandı. Yeni kemik osteosit ve osteoblastları orta yoğunlukta boyanma gösterdi. Fibroblast ve periodontal ligament hücrelerinde hafif boyanma veya boyanmama izlenirken, sementoblastlar orta yoğunlukta boyandı.

10. Çalışmamız limitleri dahilinde bölgeler arasında yeni kemik oluşumunun 1. ve 2. deney bölgelerinde kontrol bölgelerine oranla istatistiksel anlamlı olmak üzere yüksek bulgulanması simvastatinin kemik rejenerasyonunda katkısı olabilecek bir madde olduğunu ve bu nedenle ileri çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır.

ÖZET

SİMVASTATİNİN DENEYSEL ALVEOL DEFEKTLERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Statinler, tıpta serum kolesterol düzeyini düşürmek için yaygın kullanılan ilaçlardır. Son zamanlarda çeşitli çalışmalarda simvastatinin de yer aldığı statin grubu ilaçların bu özelliklerinin yanı sıra, kemik oluşumunu uyarma, antiinflamatuvar etki gösterme ve anjiogenezisi artırma gibi etkileri de olduğu bildirilmiştir.

Bu nedenle çalışmamızda 0.5 ve 2.2 mg olmak üzere farklı dozlarda ve HPS polimer taşıyıcı ile lokal uygulanan simvastatinin kobaylarda oluşturulan alveolar kemik defektleri üzerine etkisini histolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanarak değerlendirmek amaçlanmıştır.

Simvastatinin polimer taşıyıcıdan in vitro salım deneyinin ardından, 28 adet sağlıklı kobayın, sağ ve sol maksilla ve mandibulasında yer almak üzere her hayvanda toplam 4 adet kemik defekti oluşturulmuştur. 1. deney bölgesine 2.2 mg, 2. deney bölgesine 0.5 mg simvastatin içeren polimer taşıyıcılar uygulanmıştır. Aktif kontrol bölgesinde tek başına polimer taşıyıcı uygulanırken, pasif kontrol bölgesinde defekt boş bırakılmıştır.

Operasyonların ardından her grupta 7 adet olmak üzere kobaylar, 7 ve 14. günlerde erken, 30 ve 45. günlerde geç dönemde değerlendirilmişlerdir.

Yapılan histolojik ve histomorfometrik analizler sonucunda simvastatin uygulanan bölgelerde yeni kemik oluşumunun kontrol bölgelerine göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla olduğu, en iyi sonucun ise 2.2 mg simvastatin ile elde edildiği ve başlangıçta izlenen yumuşak dokudaki inflamasyonun deney süresince giderek azaldığı bulgulanmıştır.

Immünohistokimyasal değerlendirmede ise farklı boyanma paternleri izlense de, deney boyunca bölgeler kendi içlerinde ve birbirleriyle karşılaştırıldığında OPN ve KSP ekspresyonu açısından istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı, bu nedenle boyanma paternlerinin uygulanan tedavi şeklinden bağımsız olduğu izlenmiştir.

Simvastatinin kemik yapımında olumlu katkısı olduğu, ancak klinik kullanımına geçilmeden önce konunun açık yönlerine cevap aranan deneysel çalışmalara gereksinim vardır.

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFECT OF SIMVASTATIN ON EXPERIMENTAL ALVEOLAR BONE DEFECTS

Statins, are the most effective and widely used drugs to lower cholesterol levels in hypercholesterolemia. Recently various studies confirmed that among statins, simvastatin has positive side effects such as stimulation of new bone formation, antiinflammatory effect and angiogenesis promotion.

The aim of this study was to evaluate the effect of local application of different doses (2.2 and 0.5 mg) of simvastatin carried with HPS polymer carriers at the treatment of alveolar bone defects by using histologic, histomorphometric and immunohistochemical techniques.

Following in vitro simvastatin delivery experiment, four bone defects were created at the left and right maxilla and mandibula of 28 healthy guinea pigs. The first experimental region were filled with 2.2 mg simvastatin whereas the second filled with 0.5 mg simvastatin. Polymer carrier applied alone at the active control region. The last defect was left empty as the control region.

Each group of 7 guinea pigs were sacrificed at 7th and 14th days for early and at 30th and 45th days for late evaluation after surgery.

The histological and histomorphometric results showed that; simvastatin stimulated bone formation at statistically significant level when compared to control regions. Best results were obtained with 2.2 mg simvastatin and soft tissue inflammation gradually reduced during the experimental period.

Although we observed different staining patterns during the experiment, both OPN and BSP expressions were found statistically similar between test and control regions showing no effect of different treatment modalities.

Although simvastatin seems to promote bone healing, further experimental studies are needed to explore the unknown sides before clinical usage.

KAYNAKLAR

1. Marks SC Jr, Mehta NR. Lack of effect citric acid treatment of root surfaces on the formation of new connective tissue attachment. J Clin Periodont 1986;13: 109-16.
2. Al-Shammari KF, Al-Khabbaz AK, Al-Ansari JM, Neiva R, Wang HL. Risk indicators for tooth loss due to periodontal disease. J Periodontol 2005; 76(11):1910-8.
3. Apsey DJ, Kaciroti N, Loesche WJ. The diagnosis of periodontal disease in private practice. J Periodontol 2006; 77:1572 -81.
4. Arrocha R, Wittwer JW, Gargiulo AW. Tissue response to heterogeneous bone implant in dogs, J Periodontol 1968; 39 (3):162-6.
5. Dragoo MR, Sullivan HC. A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. II. External root resorption. J Periodontol 1973; 44 (10): 614-25.
6. Bender SA, Rogalski JB, Mills MP, Arnold RM, Cochran DL, Mellonig JT. Evaluation of demineralized bone matrix paste and putty in periodontal intraosseous defects. J Periodontol 2005; 76(5): 768- 77.
7. Nevins ML, Camelo M, Lynch SE, Schenk RK, Nevins M. Evaluation of periodontal regeneration following grafting intrabony defects with bio-oss collagen: A human histologic report. Int J Periodontics Restorative Dent 2003; 23(1): 9 -17.
8. Ong MM, Eber RM, Korsnes MI, MacNeil RL, Glickman GN, Shyr Y, et al. Evaluation of a bioactive glass alloplast in treating periodontal intrabony defects. J Periodontol 1998; 69(12) : 1346- 54.

9. Stahl SS, Froum SJ, Kushner L. Healing responses of human intraosseous lesions following the use of debridement, grafting and citric acid root treatment. II. Clinical and histologic observations: One year postsurgery. *J Periodontol* 1983; 54(6) : 325-38.

10. Joly JC, Palioto DB, de Lima AF, Mota LF, Cafesse R. Clinical and radiographic evaluation of periodontal infrabony defects treated with guided tissue regeneration. A pilot study. *J Periodontol* 2002; 73(4) : 353-9.

11. Rosing CK, Aass AM, Mavropoulos A, Gjermo P. Clinical and Radiographic Effects of Enamel Matrix Derivative in the Treatment of Intrabony Periodontal Defects: A 12-month Longitudinal Placebo-controlled Clinical Trial in Adult Periodontitis Patients. *J of Periodontol* 2005; 76(1) : 129-33.

12. Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1997; 68 (12): 1186- 93.

13. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Rekombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long- bone segmental defect model. *Clin Orthoped Related Resarch* 1993; 301: 302-12.

14. Jeon JH, Thomas MV, Puleo DA. Bioerodible devices for intermittent release of simvastatin acid. *Int J of Pharma* 2007; 12: 1-7.

15. Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, Reckling RR, Ojha J, Bhattacharyya I, et al. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *J Periodontol* 2002; 73 (10):1141-8.

16. Horiuchi N, Maeda T. Statins and Bone Metabolism. *Oral diseases* 2006; 12: 85-101.

17. Grasser WA, Baumann AP, Petras SF, Harwood HJ Jr, Devalaraja R, Renkiewicz R, et al. Regulation of osteoclast differentiation by Statins. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2003; 3(1): 53-62.
18. Cruz AC, Gruber BL. Statins and osteoporosis: Can these lipid-lowering drugs also bolster bones. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2002; 69(4): 277- 88.
19. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999; 286 (5446): 1946-9.
20. Oxlund H, Dalstra M, Andreassen TT. Statin given perorally to adult rats increases cancellous bone mass and compressive strength. *Calcif Tissue Int* 2001; 69 (5): 299-304.
21. Montagnani A, Gonnelli S, Cepollaro C, Pacini S, Campagna MS, Franci MB, et al. Effect of simvastatin treatment on bone mineral density and bone turnover in hypercholesterolemic postmenopausal women: A 1-year longitudinal study. *Bone* 2003; 32(4): 427-33.
22. Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, Schlegel B, Jick H: HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA* 2000; 283: 3205-10.
23. Pasco JA, Kotowicz MA, Henry MJ, Sanders KM, Nicholson GC. Geelong Osteoporosis Study. Statin use, bone mineral density, and fracture risk: Geelong Osteoporosis Study. *Arch Intern Med.* 2002;162 (5):537-40.
24. Wang PS, Solomon DH, Mogun H, Avorn J. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA* 2000; 283: 3211-16.
25. Edwards CJ, Hart DJ, Spector TD. Oral statins and increased bone mineral density in postmenopausal women. *Lancet* 2000; 355: 2218- 19.

26. Chan MH, Mak TW, Chiu RW, Chow CC, Chan IH, Lam CW. Simvastatin increases serum osteocalcin concentration in patients treated for hypercholesterolaemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (9): 4556-9.
27. Stein EA, Farnier M, Waldstreicher J, Mercuri M; Simvastatin/torvastatin Study Group. Effects of statins on biomarkers of bone metabolism: A randomised trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11(2): 84-7.
28. Tikiz C, Unlu Z, Tikiz H, Ay K, Angin A, Onur E, et al. The effect of simvastatin on serum cytokine levels and bone metabolism in postmenopausal subjects: Negative correlation between TNF-alpha and anabolic bone parameters. *J Bone Miner Metab* 2004; 22(4): 365-71.
29. Kılıç E. Lokal ve Sitemik Simvastatin Uygulamalarının Distraksiyon Osteogenezisi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Doktora tezi. Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi; 2005.
30. Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: New role for old drugs. *J Pharm Pharmacol* 2006;58 (1) :3-18.
31. Ozec I, Kilic E, Gumus C, Goze F. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *J Craniofac Surg* 2007;18 (3):546-50.
32. Ismail FA. Design and in vitro evaluation of polymeric formulae of simvastatin for local bone induction. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2006 ; 32 : 1199-206.
33. Wong RW, Rabie AB. Early Healing Pattern of Statin-induced Osteogenesis. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2005; 43(1): 46- 50.
34. Serin S. Simvastatinin in vivo kırık iyileşmesi üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2001.

35. Pytlik M, Janiec W, Misiarz-Myrta M, Gubala I. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol* 2003; 55(1):63-71.
36. Cunha-Cruz J, Saver B, Maupome G, Hujoel PP. Statin use and tooth loss in chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2006; 77(6): 1061-6.
37. Saver BG, Hujoel PP, Cunha-Cruz J, Maupome G. Are statins associated with decreased tooth loss in chronic periodontitis? *J Clin Periodontol* 2007; 34(3):214-9.
38. Yazawa H, Zimmermann B, Asami Y, Bernimoulin JP. Simvastatin Promotes Cell Metabolism, Proliferation, and Osteoblastic Differentiation in Human Periodontal Ligament Cells. *J Periodont* 2005; 76(2): 295-302.
39. Thunyakıtpısal P. Simvastatin stimulates osteoblast proliferation, not gingival fibroblast and PDL Cells. 2001 IADR Abstract form.
40. Vaziri H, Naserhojjati-Roodsari R, Tahsili-Fahadan N, Khojasteh A, Mashhadi-Abbas F, Eslami B, et al. Effect of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *J Periodontol*. 2007;78(8):1561-7.
41. Özeç İ. Lokal Olarak Uygulanan Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2'nin Distraksiyon Osteogenezisi Üzerine Etkisinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi. Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi;2003.
42. Rosenberg E, Rose LF. Biologic and clinical considerations for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. *advances in periodontics, Part II. Dental clinics of North America* 1998; 42(3), 467-90.

43. Carlson ER, Marx RE, Buck BE. The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risks and safety. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995 ; 80 (1) :17-23.
44. Çakılcı B. Kemik içi defektlerin tedavisinde trombositten zengin plazma uygulama sonuçlarının karşılaştırılması. Doktora tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi;2007.
45. Academy Report. Periodontal regeneration. *J Periodontol* 2005; 76: 1601- 22.
46. Trombelli L, Heitz-Mayfield L, Needleman I, Moles D, Scabbia A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J Clin Periodontol* 2002; 29 (Supl.3) : 117- 35.
47. Christgau M, Caffesse RG, Schmalz G, D'Souza RN. Extracellular matrix expression and periodontal wound-healing dynamics following guided tissue regeneration therapy in canine furcation defects. *J Clin Periodontol* 2007;34(8):691-708.
48. Hakki SS, Wang D, Franceschi RT, Somerman MJ. Bone sialoprotein gene transfer to periodontal ligament cells may not be sufficient to promote mineralization in vitro or in vivo. *J Periodontol* 2006 ;77(2):167-73.
49. Matias MA, Li H, Young WG, Bartold PM. Immunohistochemical localisation of extracellular matrix proteins in the periodontium during cementogenesis in the rat molar. *Arch Oral Biol* 2003;48(10):709-16.
50. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10 (1):79-98.
51. Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, Tsuji K, Shinomiya K, Nifuji A, et al. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* 2001;142(3):1325-32.

52. Nguyen L, Lekic P, McCulloch CA. Collagen implants do not preserve periodontal ligament homeostasis in periodontal wounds. *J Periodontal Res.* 1997 ;32(5):419-29.
53. Thorwarth M, Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Schlegel KA. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone* 2006 ;38(1):30-40.
54. Rincon JC, Xiao Y, Young WG, Bartold PM. Production of osteopontin by cultured porcine epithelial cell rests of Malassez. *J Periodontal Res* 2005 ;40(5):417-26.
55. Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000 ;71(10):1591-600.
56. Kaku M, Uoshima K, Yamashita Y, Miura H. Investigation of periodontal ligament reaction upon excessive occlusal load--osteopontin induction among periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2005; 40(1):59-66.
57. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(3):279-303.
58. Shimizu E, Nakajima Y, Kato N, Nakayama Y, Saito R, Samoto H, et al. Regulation of rat bone sialoprotein gene transcription by enamel matrix derivative. *J Periodontol* 2004;75(2):260-7.
59. Zhang Y, Song J, Shi B, Wang Y, Chen X, Huang C, Yang X, Xu D, Cheng X, Chen X. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects. *Biomaterials.* 2007 ;28(31):4635-42.
60. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* 1991;49(6):421-6.

61. Arai N, Ohya K, Kasugai S, Shimokawa H, Ohida S, Ogura H, et al. Expression of bone sialoprotein mRNA during bone formation and resorption induced by colchicine in rat tibial bone marrow cavity. *J Bone Miner Res* 1995;10(8):1209-17.
62. Chen J, Zhang Q, McCulloch CA, Sodek J. Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin). *Histochem J.* 1991;23(6):281-9.
63. Horton MA, Nesbit MA, Helfrich MH. Interaction of osteopontin with osteoclast integrins. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 760:190-200.
64. Alegret M, Silvestre JS. Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006; 28(9): 627- 56.
defects. *J Periodontol* 2005, 76(10), 1667-74.
65. Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR. Statins and bone formation. *Current Pharmaceutical Design* 2001; 7: 715 -36.
66. LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 1999; 282(24): 2340-6.
67. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-9.
68. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. west of scotland coronary prevention study group. *N Engl J Med* 1995; 333(20): 1301-7.

69. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and recurrent events trial investigators. N Engl J Med 1996; 335(14): 1001-9.
70. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Bere PA, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force /Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. JAMA 1998; 279 (20):1615-22.
71. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial. Lancet 2002; 360(9326):7-22.
72. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. J Cell Mol Med 2001; 5(4): 378-87.
73. Blumenthal RS. Statins: Effective antiatherosclerotic therapy. Am Heart J 2000;139 c(4):577-83.
74. Dikeç M. Hiperlipidemik hastalarda atorvastatin kullanımının lipoprotein (a) ve diğer lipid parametreleri üzerine etkisi. Uzmanlık tezi. İstanbul: Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2006.
75. Van Staa TP, Wegman S, De Vries F, Leufkens B, Cooper C. Use of statins and risk of fractures. J Am Med Assoc 2000; 285: 1850-5.
76. Davidson MH. Controversy surrounding the safety of cerivastatin. Expert Opin Drug Saf 2002 ;1 (3): 207-12.
77. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Effects of statins on bone mineral density: A meta-analysis of clinical studies. Bone 2007; 40(6):1581-7.

78. Mauro VF. Clinical pharmacokinetics and practical applications of simvastatin. Clin Pharmacokinet 1993; 24(3):195-202.
79. Havsa T. Ooferektomili sıçanlarda simvastatinin kemik, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarına etkisinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2002.
80. Sarıdoğan ME, Özkul İ. Statinlerin kemik üzerine etkileri. Osteoporoz Dünyasından 2003, 9(3): 114-9.
81. McFarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR. Pleiotropic effects of statins: Lipid reduction and beyond. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 1451-8.
82. Jialal I, Stein D, Balis D, Grundy SM, Adams-Huet B, Devaraj S. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. Circulation. 2001;103 (15):1933-5.
83. Thunyakitpisal PD, Chaisuparat R. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduced the expression of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase b) in osteoblastic cells and ht1080 fibrosarcoma cells. J Pharmacol Sci 2004; 94 (4):403-9.
84. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. N Engl J Med 1995; 332(5):305-11.
85. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res 1996; 11 (8): 1043-51.
86. Schieffer B, Drexler H. Role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and

immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* 2003; 91(12A):12H-18H.

87. Inoue I, Goto S, Mizotani K, Awata T, Mastunaga T, Kawai S, et al. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: Reduction of mRNA levels for interleukin-1 β , Interleukin-6, Cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in primary endothelial cells. *Life Sci* 2000; 67 (8):863-76.
88. Grip O, Janciauskiene S, Lindgren S. Atorvastatin activates PPAR- γ and attenuates the inflammatory response in human monocytes. *Inflamm Res* 2002; 51 (2): 58-62.
89. Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271(3):688-92.
90. Coons JC. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in osteoporosis management. *Ann Pharmacother* 2002 ; 36 (2): 326-30.
91. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):623-8.
92. Erdemli E, Serin S, Tekelioğlu M. Osteoporozu yeni çözüm. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2002,55 (1): 11-6.
93. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 280(3):874-7.

94. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology* 2003; 144: 681-92.
95. Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 2004; 92(3):458-71.
96. Baumann AP, Grasser W, Petras S, Harwood H, Thompson DD, Paralkar V. Inhibition of osteoclast formation by statins. *J Bone Miner Res* 2001; 16: S507.
97. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, et al. Alendronate mechanism of action: Geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ;96 (1) :133-8.
98. Chan KA, Andrade SE, Boles M, Buist DS, Chase GA, Donahue JG, et al. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet* 2000; 355: 2185- 8.
99. Chung YS, Lee MD, Lee SK, Kim HM, Fitzpatrick LA. HMG-CoA reductase inhibitors increase BMD in type 2 diabetes mellitus patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(3):1137-42.
100. Lupattelli G, Scarponi AM, Vaudo G, Siepi D, Roscini AR, Gemelli F, et al. Simvastatin increases bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Metabolism* 2004; 53(6): 744-8.
101. La Croix AZ, Cauley JA, Jackson R, McGowan J, Pettinger M, Hsia J, et al. Does statin use reduce the risk of fracture in postmenopausal women? Results from the women's health initiative observational study. *J Bone Miner Res* 2000;15(S1): S155.

102. Rejnmark L, Buus NH, Vestergaard P, Andreasen F, Larsen ML, Mosekilde L. Statins decrease bone turnover in postmenopausal women: A cross-sectional study. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:581-9.
103. Hatzigeorgiou C, Jackson JL. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase Inhibitors and osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005;16(8):990-8.
104. Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P. Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 2004-8.
105. Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone* 2004; 34: 609-18.
106. Batukan C, Özgün MT, Serin İS, Özçelik B, Uludağ S, Başbuğ M, et al. Ooferektomi yapılmış sıçanlarda simvastatin ve 17 β -östrodiolün kemik mineral dansitesine etkisi. *J Turkish-German Gynecol Assoc* 2007; 8(1): 22- 8.
107. von Stechow DV, Fish S, Yahalom D, Bab I, Chorev M, Müller R, et al. Does Simvastatin Stimulate Bone Formation in vivo? *BMC Musculoskeletal Disorders* 2003; 4(8): 1-10.
108. 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(10):1636-41.
109. Missana et al. In vivo bone formation stimulated by statins. 2001 IADR Abstract form
110. Anbinder AL, Junqueira JC, Mancini MNG, Balducci I, Rocha RF, Carvalho YR. Influence of simvastatin on bone regeneration of tibial

- defects and blood cholesterol level in rats. *Braz Dent Journal* 2006 ; 17 (4): 267-73.
111. Sugiyama T, Nakagawa T, Sato C, Fujii T, Mine K, Shimizu K, et al. Subcutaneous administration of lactone form of simvastatin stimulates ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Oral Diseases* 2007; 13: 228-33.
 112. Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15(3) 346- 50.
 113. Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N, et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *MJ Periodontol* 2005; 76(11):1861-70.
 114. Wong RW, Rabie AB. Statin Collagen Grafts Used to Repair Defects in the Parietal Bone of Rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003; 41(4): 244-8.
 115. Junqueira JC, Mancini MN, Carvalho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. *J Oral Sci* 2002 ;44 (3-4):117-24.
 116. Thylin MR et al. Simvastatin and bioactive glass in repair of osseous defects. 32nd Annual Meeting and Exhibition of the AADR (March 12-15, 2003)
 117. Bradley JD, Cleverly DG, Burns AM, Helm NB, Schmid MJ, Marx DB, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor reduces simvastatin-induced bone morphogenetic protein-2 and bone formation in vivo. *J Periodontal Res* 2007; 42 (3):267-73.
 118. Nareika A, Maldonado A, He L, Game BA, Slate EH, Sanders JJ, et al. High glucose-boosted inflammatory responses to lipopolysaccharide are suppressed by statin. *J Periodontal Res* 2007; 42(1): 31-8.

119. 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(6):520-3.
120. Karatas, A., Baykara, T. Studies of indomethacin inserts prepared using water-soluble polymers I. Effect of the preparation method and polymers on drug release. *S.T.P. Pharm. Sci* 2000; 10 (2), 187-193.
121. Levy MY, Benita S. Drug release submicronized o/w emulsion: A new in vitro kinetic evaluation model. *Int J Pharm* 1990; 66: 29-37.
122. Washington C. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: Effects of drug partition. *Int J Pharm* 1989; 56: 71-4.
123. Lekic P, Sodek J, McCulloch CA. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec.* 1996;244(1):50-8.
124. Cortellini P., Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontol 2000* 2000; 22: 104-132.
125. Nyman S, Gottlow J, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation by guided tissue regeneration. *J Perio Res* 1987; 22: 252-254.
126. Trombelli L. Which reconstructive procedures are effective for treating the periodontal intraosseous defect? *Periodontol 2000* 2005; 37: 88-105.
127. Uraz A. Kalsiyum karbonat esaslı yeni bir kemik greft materyalinin deneysel olarak invivo değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi;2002.

128. Proyor ME, Susin C, Wikesjö UME. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodont* 2006; 33:455- 60.
129. Hosny M, Sharawy M. Osteoinduction in young and old rats using demineralized bone powder allografts.*J Oral Maxillofac Surg.* 1985;43(12):925-31.
130. Irving JT, LeBolt SA, Schneider EL. Ectopic bone formation and aging.*Clin Orthop Relat Res.* 1981;(154):249-53.
131. 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.
132. Lekic P, Rubbino I, Krasnoshtein F, Cheifetz S, McCulloch CA, Tenenbaum H. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *Anat Rec* 1997;247(3):329-40.
133. Nemcovsky CE, Zahavi S, Moses O, Kebudi E, Artzi Z, Beny L, et al. Effect of enamel matrix protein derivative on healing of surgical supra-infrabony periodontal defects in the rat molar: A histomorphometric study. *J Periodontol* 2006;77(6):996-1002.
134. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg* 1994 ;5(3):201-3.
135. Johnson MW, Sullivan SM, Rohrer M, Collier M. Regeneration of peri-implant infrabony defects using perioglas: a pilot study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997 12(6):835-9.
136. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995; 33: 312-18.

137. Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg.* 2000 ;106(2):360-71
138. Ömeroğlu A. Kobaylarda oluşturulan kemik defektlerine uygulanan bifosfonat grubu ilaçların yeni kemik oluşumu üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi;2002.
139. Doğan H. Lokal olarak uygulanan salmon kalsitonin hormonunun kobaylarda oluşturduğu osteoblastik aktivite değişimleri. Doktora Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 1997.
140. Develioğlu H. Kritik Boyutlu Ve Kritik Boyutlu Olmayan Defektler. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2003; 6(1):60-3.
141. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990 ;1(1):60-8.
142. Sugimoto A, Hakuba N, Gyo K. Reconstruction of mastoid cortex defect using bone morphogenetic protein: an experimental study in the guinea pig. *Acta Otolaryngol.* 2004 ;124(3):253-7.
143. Martins VCA, Goissis G, Ribeiro AC, Marcantonio Jr E, Bet MR. The controlled release of antibiotic by hydroxapatite: Anionic collagen composites. *Artif Organs* 1998; 22 (3) :215- 21.
144. Noguchi T, Fukuda M, Ishikawa I. Periodontal treatment by local drug delivery using resorbable base material. *Adv Dent Res* 1988; 2(2): 401-4.
145. Francis MF, Cristea M, Winnik FM. Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how?. *Pure Appl Chem* 2004; 76(7-8): 1321-35.

146. Barteck BK, Carr JA. Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol.* 1995;21(2):88-95.
147. Develioglu H, Koptagel E, Gedik R, Dupoirieux L. The effect of a biphasic ceramic on calvarial bone regeneration in rats. *J Oral Implantol.* 2005;31(6):309-12.
148. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res* 1997; 76 (8): 1460-70.
149. Glass DA, Mellonig JT, Towle HJ. Histologic evaluation of bone inductive proteins complexed with coralline hydroxylapatite in an extraskeletal site of the rat. *J Periodontol* 1989;60(3):121-6.
150. Indovina A Jr, Block MS. Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction sites. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60(1):53-8.
151. Majzoub Z, Berengo M, Giardino R, Aldini NN, Cordioli G. Role of intramarrow penetration in osseous repair: a pilot study in the rabbit calvaria. *J Periodontol* 1999;70(12):1501-10.
152. MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J Clin Periodontol* 1999;26(4):239-45.
153. Stubbs D, Deakin M, Chapman-Sheath P, Bruce W, Debes J, Gillies RM, Walsh WR. In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. *Biomaterials* 2004;25(20):5037-44.
154. Su-Gwan K, Hak-Kyun K, Sung-Chul L. Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2001;29(5):282-8.

155. Kawaguchi H, Ogawa T, Kurihara H, Nanci A. Immunodetection of noncollagenous matrix proteins during periodontal tissue regeneration.J Periodontal Res 2001;36(4):205-13.
156. Tissue repair: Celular growth, fibrosis, and wound healing.
157. Mah J, Hung J, Wang J, Salih E. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. Eur J Orthod. 2004; 26(5):475-82.
158. Sculean A, Junker R, Donos N, Berakdar M, Brex M, Dunker N. Immunohistochemical evaluation of matrix molecules associated with wound healing following regenerative periodontal treatment in monkeys.Clin Oral Investig. 2002 ;6(3):175-82.
159. Fujihara S, Yokozeki M, Oba Y, Higashibata Y, Nomura S, Moriyama K. Function and regulation of osteopontin in response to mechanical stress.J Bone Miner Res. 2006;21(6):956-64.
160. De Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures.J Histochem Cytochem. 2003;51(5):633-41.
161. Domon S, Shimokawa H, Yamaguchi S, Soma K. Temporal and spatial mRNA expression of bone sialoprotein and type I collagen during rodent tooth movement.Eur J Orthod. 2001;23(4):339-48
162. Bonewald LF. Osteocytes as Dynamic, Multifunctional Cells. Ann N Y Acad Sci. 2007 23.
163. Inanc B, Eser Elcin A, Koc A, Balos K, Parlar A, Murat Elcin Y. Encapsulation and osteoinduction of human periodontal ligament fibroblasts in chitosan-hydroxyapatite microspheres.J Biomed Mater Res A. 2007 .15;82(4):917-26.

164. Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2001;36(3):131-41.
165. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res.* 200.;10(3):149-60.
166. Ivanovski S, Li H, Daley T, Bartold PM. An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane-mediated periodontal wound healing. *J Periodontal Res.* 2000;35(3):115-26.
167. Elwood WK. Eruption rates of mandibular incisors of guinea pigs. *J Dent Res.* 197.;50(5):1356.

Adı: TUBA

Soyadı: AYKAN

Doğum Yeri ve Tarihi: KİLİS- 2007

Eğitimi :

Hacettepe Üniversitesi: 1996-2001

Çukurova Elektrik Kahramanmaraş Anadolu Lisesi:1989-1995

Fatih İlkokulu: 1984-1989

Yabancı Dili: İngilizce

TEŞEKKÜR

Sonsuz ve karşılıksız sevgileri ve fedakarlıklarıyla beni bu noktaya getiren, verdikleri destek ve hoşgörüyü hayatımın her aşamasında hissettiğim ve her şeyimi borçlu olduğum sevgili aileme,

Periodontoloji alanında bana yetişme fırsatı veren, Doktora çalışmalarında yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Köksal BALOŞ'a,

Periodontoloji alanındaki eğitimim ve doktora çalışmam sırasında, eğitim ve öğrenimimle yakından ilgilenen, değerli bilgi ve deneyimleriyle yetişmemde büyük emek harcayan, bana yol gösterip, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez yöneticim Sayın Prof. Dr. Emel ÖKTE'ye,

Başta Doç.Dr. Sibel Elif GÜLTEKİN ve Dt. Defne AKPINAR olmak üzere tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Anabilim Dalı üyelerine ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç.Dr. Ayşegül Karataş'a,

Eğitim sürem boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her zaman destek ve yakınlığını gördüğüm çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gönen ÖZCAN, Sayın Prof. Dr. Nurdan ÖZMERİÇ KURTULUŞ, Sayın Doç. Dr. Gülay TÜTER ve Doç. Dr. Bülent KURTİŞ ve şahıslarında tüm Hoca'larıma,

Göstermiş oldukları anlayış ve dostluktan dolayı değerli arkadaşlarım Dt. Eylem AYHAN, Dt. İkim DEMİREL, Dt. Pelin GÖKALP, Dt. Selin PINAR ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.