



**RAT KALVARYAL KEMİK DEFEKTLERİNDE  
STRONTİUM RANELATIN KEMİK  
REJENERASYONUNDAKİ ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Muhammet Fatih ÖZÜPEK**

**İnönü Üniversitesi ve Gazi Üniversitesi  
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Ortak Doktora  
Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ümit YOLCU  
Ortak Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN**

**Doktora Tezi-2016**

**T. C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RAT KALVARYAL KEMİK DEFEKTLERİNDE STRONTİUM RANELATIN  
KEMİK REJENERASYONUNDAKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Muhammet Fatih ÖZÜPEK**

**İnönü Üniversitesi ve Gazi Üniversitesi  
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı  
Ortak Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Ümit YOLCU**

**Ortak Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2013/92 proje numarası ile desteklenmiştir.

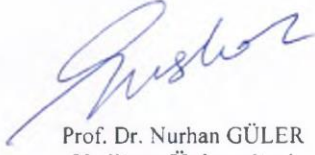
**MALATYA  
2016**

## KABUL VE ONAY SAYFASI


İnönü Üniversitesi ile Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüleri Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Muhammet Fatih ÖZÜPEK**'in "Rat Kalvaryal Kemik Defektlerinde Strontium Ranelatın Kemik Rejenerasyonundaki Etkinliğinin Araştırılması" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

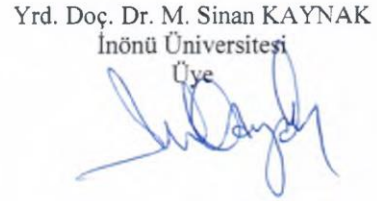
Tez Savunma Tarihi: 07/11/2016

  
Prof. Dr. Derviş YILMAZ  
Gazi Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Nurhan GÜLER  
Yeditepe Üniversitesi  
Üye

  
Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN  
Gazi Üniversitesi  
Üye

  
Doç. Dr. Ümit YOLCU  
İnönü Üniversitesi  
Tez Danışmanı  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. M. Sinan KAYNAK  
İnönü Üniversitesi  
Üye

### ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../2016 tarih ve 2016/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Enstitü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kemik Dokusu .....	3
2.1.1. Kemik Matriksi .....	3
2.1.2. Osteoprogenitör Hücreler .....	4
2.1.3. Osteoblastlar .....	4
2.1.4. Osteoklastlar .....	5
2.1.5. Osteositler .....	6
2.2. Periosteum ve Endosteum.....	6
2.2.1. Periosteum .....	6
2.2.2. Endosteum .....	7
2.3. Kemik Tipleri.....	7
2.3.1. Primer (Olgunlaşmamış) Kemik Dokusu .....	7
2.3.2. Sekonder (Olgunlaşmış) Kemik Dokusu .....	8
2.3.2.1. Kompakt Kemik Dokusu .....	8
2.3.2.2. Süngerimsi Kemik Dokusu .....	9
2.4. Kemik Oluşumu .....	9
2.4.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu .....	9
2.4.2. Endrokondral Kemikleşme .....	10
2.5. Kemik dokusunun büyüme evreleri .....	11
2.5.1. Şekillenme ( Modeling ) .....	11

2.5.2. Yeniden Şekillenme ( Remodeling ).....	11
2.6. Kemik İyileşmesi .....	12
2.6.1. Kemik İyileşmesi Süreci .....	12
2.7. Kritik Boyuttaki Defekt .....	13
2.8. Kontrollü Salım Teknolojisi .....	13
2.8.1. Kontrollü Salımda Kullanılan Polimerler .....	14
2.8.2. Kontrollü Salım Tarihinde PLGA.....	15
2.8.3. PLGA'nın Özellikleri .....	15
2.8.4. PLGA Salım Mekanizması .....	16
2.9. Strontium Ranelat .....	17
2.9.1. Strontium Ranelatın Yapısı.....	17
2.9.2. Strontium Ranelatın Kemik Hücrelerine Etki Mekanizması .....	18
2.9.4. Stronsiyum Ranelatın Farmakokinetik Özellikleri .....	19
2.9.5. Stronsiyum Ranelatın Yan Etkileri .....	20
3. MATERYAL VE METOT .....	21
3.1. Çalışma Grupları.....	21
3.2. Strontium Ranelat Salımlı PLGA Partikülleri Üretim Tekniği .....	22
3.2.1. Materyal .....	22
3.2.2. Metot.....	22
3.2.2.1. Mikrokürelerin Hazırlanması.....	22
3.2.2.2 Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	23
3.2.2.3. Stronsiyum Ranelat Yüklenen Kürelerin İn Vitro Salım Çalışmaları .....	24
3.3 Gavajla Beslenen Hayvanlara İlacın Hazırlanması .....	24
3.4. Cerrahi Teknik .....	25
3.5. Histolojik ve Histomorfometrik İnceleme .....	33
3.6. İstatistiksel Değerlendirme .....	33
4. BULGULAR.....	35

4.1. Histolojik ve Histomorfometrik Bulgular.....	35
4.2. Grupların histolojik veriler açısından istatistiksel değerlendirilmesi .....	47
5. TARTIŞMA .....	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR .....	57
EKLER.....	67
EK.1. Özgeçmiş .....	67
EK.2. Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı.....	68



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi s¼recinde bizlerden desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım; Doç. Dr. Ümit YOLCU'ya, Prof. Dr. Serkan POLAT'a, Yrd. Doç. Dr. Hilal ALAN'a, Yrd. Doç. Dr. Mustafa KIRTAY'a ve Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN'a teşekkür ederim.

Çalışmamda kullanılan mikrokürelerin hazırlanmasını üstlenen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a ve Doç. Dr. Yeşim AKTAŐ'a teşekkür ederim.

Çalışmamın histolojik analizlerinde çok değerli katkılarından ötürü Prof. Dr. Mehmet GÜL'e teşekkür ederim.

Doktora tezimin deney aşamasında ve sonrasında bana çok yardımda bulunan yakın dostlarım Yrd. Doç. Dr. Ahmet Hüseyin ACAR'a, Dr. Dt. Orhan GEÇÖR'e ve Dr. Dt. Cem ÖZGÜR'e teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel analizlerinin hesaplanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Saim YOLOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez projemin desteklenmesinde katkıları bulunan Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman dualarıyla, varlıklarıyla yanımda olan ve beni destekleyen anneme, babama, kardeşime teşekkür ederim.

## ÖZET

### Rat Kalvaryal Kemik Defektlerinde Strontium Ranelatın Kemik Rejenerasyonundaki Etkinliğinin Araştırılması

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı; deneysel olarak oluşturulan, rat kalvaryal kemik defektlerinde stronsiyum ranelatın kemik rejenerasyonundaki etkisinin araştırılmasıdır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada toplam 40 adet Wistar albino Rat kullanıldı. Her ratın kalvaryumuna bir adet 5mm çapında standart defekt açıldı. Hayvanlar 5 gruba ayrıldı. İlk grupta (A), rat kalvaryumuna açılan defekt boş kalmıştır. Hayvanlar 2 ay süresince normal olarak beslenmiş daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. 2.grupta (B), rat kalvaryumuna açılan defekt boş kalmıştır. Hayvanlar 2 ay süresince gavajla günlük 625mg/kg stronsiyum ranelat (Protelos 2g-Servier) ile beslenmiş, daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. 3.grupta (C), rat kalvaryumuna açılan defekte içine strontium ranelat yüklenen PLGA materyalleri konmuştur. Gruptaki hayvanlar 2 ay süresince normal olarak beslenmiş daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. 4.grupta (D), rat kalvaryumuna açılan defekte boş PLGA materyali konmuştur. Gruptaki hayvanlar 2 ay süresince normal olarak beslenmiş daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. 5. grupta (E), rat kalvaryumuna açılan defekte boş PLGA materyali konmuştur. Gruptaki hayvanlar 2 ay süresince gavajla günlük 625mg/kg stronsiyum ranelat (Protelos 2g-Servier) ile normal olarak beslenmiş daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılıma uygun olmadığı saptanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Anlamlılık  $p<0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

**Bulgular:** Histomorfometrik inceleme sonucunda çalışma gruplarında kontrol grubuna oranla kemikleşme miktarı artmıştır. Çalışma grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde en fazla kemikleşme oranı C grubunda bu grubu sırasıyla E, B, D grupları izlendi.

**Sonuç:** Strontium Ranelat'ın lokal salım yapan ve granül formu yeni kemik oluşumunu artırmaktadır.



**Anahtar kelimeler:** Stronsiyum Ranelat, Histoloji, Kemik rejenerasyonu, PLGA, Rat.



## ABSTRACT

### **Investigation Of Effectiveness On Bone Regeneration Of Strontium Ranelate In Rat Calvarial Bone Defect**

**Aim:** This work aims to study the effect of strontium ranelate in rat calvarial bone defects- that are experimentally generated on bone regeneration.

**Material and Method:** 40 Wistar albino rats were used in this work. A standard 5 mm diameter defect was made in each rat's calvarium. Animals were divided into 5 groups. In the first group (A), the defect in rat calvarium was empty. Animals were normally fed for 2 months and sacrificed later. The defect in rat calvarium in the second group (B) was also empty. Animals in this group were also sacrificed after they were fed daily 625 mg/kg strontium ranelate (Protelos 2 g- Servier) through gavage. In the third group (C), PLGA materials with strontium ranelate were placed into the defect in rat calvarium. Animals in the group were normally fed for 2 months and sacrificed later. In the fourth group (D), empty PLGA material was placed into the defect in rat calvarium. Animals in this group were normally fed for 2 months and sacrificed later. In the fifth group (E), empty PLGA material was placed into the defect in rat calvarium. Animals in this group were normally fed daily 625 mg/kg strontium ranelate (Protelos 2 g- Servier) through gavage and sacrificed later. The Kolmogorov-Smirnov test was used to analyze whether parameters gathered from data analysis were normally distributed. It found that the parameters were not fit to normal distribution. The Kruskal Wallis test was applied to compare the parameters between the groups and the Mann Whitney U test was used to find out the group that differs from others. The significance level was 5%.

**Results:** Histomorphometric analysis showed that the amount of ossification increases in study groups more than control groups. Analyzing the study groups, the highest rate of ossification was in the group C, followed by E, B and D respectively.

**Conclusion:** We concluded that the granular and locally oscillated form of strontium ranelate increases bone regeneration.

**Key Words:** Strontium ranelate, Histology, Bone Regeneration, PLGA, Rats.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	:Deoksiribonükleik asit
EE	: Enkapsülasyon etkinliği
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
FDA	: Food and Drug Administration
$\mu\text{m}$	: Mikro Metre
Ort	: Ortalama
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGA	: Poliglikolik asit
PLA	: Polilaktik asit
PLGA	: poli (laktik-ko-glikolik asit)
PVA	: Polivinil alkol
RNA	:Reoksiribonükleik asit
Rpm	: Rounds per minute (dakikada devir sayısı)
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
SS	: Standart sapma
TGF- $\beta$	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- Beta

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil No</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 2.1. Kemiğin hücresel elemanları .....	6
Şekil 2.2. PLGA hidrolizi (10).....	16
Şekil 2.3. Stronsiyum ranelatın kimyasal yapısı .....	18
Şekil 3.1. Çalışma grupları .....	22
Şekil 3.2. Hazırlanan mikrokürelere ait SEM fotoğrafları. (A: boş mükrokürelere, B: İlaç yüklü mikrokürelere). .....	24
Şekil 3.3. Hazırlanan mikrokürelere ait SR'ın pH 7.4 fosfat tamponundan in-vitro salım profili (n=3). .....	24
Şekil 3.4. İlaç ve karışımın görüntüsü .....	25
Şekil 3.5. Ratlara anestezi yapılırken.....	26
Şekil 3.6. Rat kafa derisi traş edilip povidin iyot çözeltisi ile silindikten sonraki görüntü .....	27
Şekil 3.7. Cerrahi sahanın steril olarak örtülmesi .....	27
Şekil 3.8. Kafa derisi insizyonu .....	28
Şekil 3.9. Rat paryetal kemiğinin görüntüsü.....	28
Şekil 3.10. Trefin frez yardımıyla defektin açılması .....	29
Şekil 3.11. Defektlerin trefin frez yardımıyla oluşturulduktan sonra cerrahi sahanın görüntüsü. ....	29
Şekil 3.12. Kafadan çıkarılan kemik parçası. ....	30
Şekil 3.13. Strontium ranelat salımlı PLGA partikülleri .....	30
Şekil 3.14. Küret yardımıyla partiküllerin taşınması .....	31
Şekil 3.15. PLGA partiküllerinin defekt alanına yerleştirildikten sonraki görüntüsü.....	31
Şekil 3.16. Strontium ranelat içeren PLGA partiküllerin defekt alanına yerleştirildikten sonra alınan görüntü.....	32
Şekil 3.17. Cerrahi işlem tamamlandıktan sonra flebin dikişli görüntüsü .....	32

Şekil 3.18. Hayvanların gavajla beslenme görüntüsü.....	33
Şekil 4.1. A grubu; Cerrahi uçlar(oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız). H-E, ölçü skalası=100 µm .....	35
Şekil 4.2. A grubu; Cerrahi uçta osteokonduktif kemik büyümesi (ok), fibröz bağ dokusu (yıldız), osteoblastik aktivite (ok başı). H-E, ölçü skalası=1000 µm. ....	35
Şekil 4.3. A grubu; Cerrahi uçlar (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), Trikrom, ölçü skalası=1000 µm.....	36
Şekil 4.4. A grubu; Cerrahi uç (ok), fibröz bağ dokusu (yıldız), Trikrom, ölçü skalası=100 µm.....	36
Şekil 4.5. B grubu; Cerrahi uçlar(oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), yeni kemik oluşumu (ok başı). H-E, ölçü skalası=1000 .....	37
Şekil 4.6. B grubu; Cerrahi uçta osteokonduktif kemik büyümesi (ok), fibröz bağ dokusu (yıldız). H-E, ölçü skalası=100 µm.....	38
Şekil 4.7. B grubu; Cerrahi uçlar (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), ince kalsifiye kemik lameller (ok başı). Trikrom, ölçü skalası=1000 µm. ....	38
Şekil 4.8. B grubu; Cerrahi uçta osteokonduktif aktivite (ok), kalsifiye kemik lamel (ok başı) fibröz bağ dokusu (yıldız), Trikrom, ölçü skalası=100 µm.....	39
Şekil 4.9. C grubu; Cerrahi uçlar (oklar), Salımlı preperat alanları (ok başları). H-E, ölçü skalası=1000 µm.....	40
Şekil 4.10. C grubu; Salımlı preperat alanları çevresinde osteojenik aktivite ve kalsifikasyon (ok başları). H-E, ölçü skalası=100 µm.....	40
Şekil 4.11. C grubu; Cerrahi uçlar (oklar), Salımlı preperat alanları çevresinde osteojenik aktivite ve kalsifikasyon (ok başı), Trikrom, ölçü skalası=100 µm.....	41
Şekil 4.12. C grubu; Kalsifiye kemik doku (ok), Salımlı preperat alanları çevresinde osteojenik aktivite ve kalsifikasyon (ok başları), Trikrom, ölçü skalası=100 µm. ....	41
Şekil 4.13. D grubu; Cerrahi uçlar (oklar), fibröz bağ dokusu içinde alanları (yıldız), H-E, ölçü skalası=1000 µm. ....	42

Şekil 4.14. D grubu; PLGA alanları çevresinde osteojenik aktivite (ok başları), fibröz bağ dokusu içinde PLGA alanları (yıldız). H-E, ölçü skalası=100 µm. ....	43
Şekil 4.15. D grubu; Cerrahi uçlar (oklar), Fibröz bağ dokusu (yıldız). Trikrom, ölçü skalası=100 µm. ....	43
Şekil 4.16. D grubu; Fibröz bağ dokusu (yıldız), Osteokonduktif kemik büyümesi (ok), kalsifiye kemik doku lamelleri (ok başları). Trikrom, ölçü skalası=100 µm. ....	44
Şekil 4.17. E grubu ;Cerrahi uçlar (oklar), fibröz bağ dokusu içinde PLGA alanları (yıldız). H-E, ölçü skalası=1000 µm. ....	45
Şekil 4.18. E grubu ;Cerrahi uçlarda osteokonduktif kemik oluşumu ve osteoblastlar (ok), PLGA alanları çevresinde osteojenik aktivite (ok başları) fibröz bağ dokusu içinde PLGA alanları (yıldız). H-E, ölçü skalası=100 µm. ....	45
Şekil 4.19. E grubu; Cerrahi uçlar (oklar), Fibröz bağ dokusu (yıldız), cerrahi uç yakınında yeni kemik oluşumu (ok başı). Trikrom, ölçü skalası=100 µm. ....	46
Şekil 4.20. E grubu; PLGA alanları(yıldız), Osteokonduktif kemik büyümesi (ok), kalsifiye kemik doku lamelleri (ok başları). Trikrom, ölçü skalası=100 µm. ....	46
Şekil 4.2. Grupların yeni oluşan kemik/total alan oranı ortalamaları .....	47

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
Tablo 3.1. Boş ve ilaç yüklü mikrokürelere ait karakterizasyon parametreleri (n=3). .....	23
Tablo 4.1. Grupların yeni oluşan kemik/total alan oranı ortalamaları .....	47
Tablo 4.2. Gruplar arasında kemik/total alan ortalamaları karşılaştırılması .....	48



# 1. GİRİŞ

Vücutta pek çok fizyolojik ve patolojik durumdan dolayı kemik kayıpları ortaya çıkar. Fizyolojik kayıplar genellikle yaşlanma sonucu meydana gelir. Cerrahi işlemler veya patolojik dokunun çıkartılması sonucu meydana gelen kayıplarda fizyolojik tamir devreye girer (1). Kendiliğinden ve hızlı bir şekilde iyileşmeyi sağlamak kemik iyileşmesinde temel amaçtır. Boyutsal olarak uygun kemik defektlerinde bunu sağlamak mümkün olsa da; vücudun farklı bölgelerinde ve belli boyutun üzerindeki kemik defektleri kendiliğinden iyileşmemektedir (2). Bozulan bu yapının fonksiyon ve estetik olarak eski haline dönüştürülmesi için birçok yöntem mevcuttur (3). Bu yöntemlerin hepsinin temel amacı; bu bölgenin yeni kemik yapımıyla eski fonksiyon ve estetik yapıya kavuşturulmasını sağlamak olmuştur. Bu amaç için lokal veya sistemik olarak etkili ilaçlar ve materyaller kullanılmıştır (4). Lokal olarak kullanılan materyallere kemik greftleri ve biyomateryaller örnek olarak verilebilirken, sistemik olarak kullanılanlara örnek olarak osteoblastik aktiviteyi artırıp osteoid madde yapımını artıran ilaçlar verilebilir (5).

İkili etki mekanizmasına sahip Stronsiyum ranelat, postmenopozal dönemde osteoporoz tedavisi için geliştirilmiştir. Bu etki mekanizması vucuttaki kemiklerde, kemik yapımını arttıran ve kemik yıkımını azaltan şeklinde kendini gösterir (6, 7). Yapılan çalışmalarda postmenopozal osteoporozlu kadınlarda vertebral kırık, nonvertebral kırık ve majör nonvertebral kırık riskini 1, 3, 4. ve 5. yıllarda düşürdüğü ve hastalar tarafından iyi tolere edildiği gösterilmiştir (6).

Yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesi durumunda yüksek maliyetlerle ve uzun zaman süreçleriyle karşılaşılabilir. Bu gibi sebeplerden dolayı var olan etken maddenin güvenilirliğini ve etkinliğini geliştirmek için bir takım yaklaşımlara başvurulur. Bunlar arasında etkin madde veya maddelerin salım hızını veya yerini kontrol etmek, doz veya dozlama sayısını değiştirmek, dayanıklılığını artırmak gibi yaklaşımlarla yeni ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmesi gösterilebilir. Bu sistemler hastanın yaşam kalitesi üzerinde olumlu etkiler sağlar (8).

Biyoparçalanabilir bir polimer olan polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında ve doku mühendisliği alanında çok önemli bir potansiyele sahiptir. PLGA'nın önemli üstünlükleri olarak Amerika Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylı olması,



Deoksiribonükleik asit (DNA), Reoksiribonükleik asit (RNA), proteinler ve peptid dahil çok farklı yapıdaki maddelerin taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında kullanılması, uzun süreli klinik deneyimin kazanılmış olması, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması sayılabilir (9, 10).

Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan rat kalvaryal kemik defektlerinde stronsiyum ranelatın, hayvanların stronsiyum ranelatla beslenmesinden ve stronsiyum ranelatın lokal olarak defekte uygulanmasından sonraki, yeni kemik oluşumundaki etkisinin histolojik, histomorfometrik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kemik Dokusu

Kemik dokusu diğer dokular gibi hücreler ve hücreler arası maddeden oluşmakla birlikte, yüksek oranda mineralize olması dolayısı ile son derece sert bir bağ dokusudur. İskeletin mekanik ve metabolik olarak desteklenmesinde rol oynar. Organların korunmasında, kalsiyum ve fosfat gibi iyonları depolayıp gerektiğinde salgılayarak organizmanın iyon dengesinin sağlanmasında görev alan ve içerdiği kemik iliği sayesinde kan hücrelerinin yapımına olanak sağlayan özel bir bağ dokusudur (11). Bu işlevlerine ek olarak, kaldıraçlardan meydana gelen sistemleri oluşturup, çizgili (iskelet) kas kasılmalarının oluşturduğu kuvvetleri arttırarak vucutsal hareketlere dönüştürür (12).

Kemik dokusu yapısal olarak kendisini yenileyebilir. Kemik dıştan gelen mekanik uyarılar doğrultusunda hacmini, şeklini ve içeriğini yönlendirebilen ve yaşam süresince istemli fiziksel aktivitelere direnç ve destek sağlayan bir yapıya sahiptir (13, 14).

Vücut ağırlığının %30-40'ını kemik oluşturur. Kemik, metabolik olarak aktif bir yapıya sahip olmakla birlikte, minerallerden ve organik bileşenlerden oluşur. Tip I kolajen en büyük organik komponenti olan kemik dokusunun, yaklaşık %8'i su ve %92'si sert maddeden meydana gelir. Sert maddenin %21'i organik, %71'i ise inorganik yapıdadır. Ekstrasellüler matriks kollajen lifleri çevreler çeşitli glikozaminoglikan ve proteoglikanlardan oluşur (15). İnorganik kısmı büyük oranda kalsiyum ve fosfattan oluşmaktadır. Bunlarla beraber bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da inorganik kısmında bulunmaktadır (16).

Özel bir bağ dokusu olan kemikte hücreler arası madde kalsifiye olmuştur (kemik matriksi). Üç ayrı hücre tipi taşır: Bu hücreler; matriksin laküna adı verilen kaviterinde yerleşmiş olan osteositler, matriksin organik kısımlarının sentezini yapan osteoblastlar ve kemik dokusunun rezorpsiyonu ve yeniden modellenmesini sağlayan çok nüveli dev hücre olan osteoklastlardır (12).

#### 2.1.1. Kemik Matriksi

Kemik matriksinin kuru ağırlığının %50' si inorganik madde tarafından meydana gelir. Özellikle kalsiyum ve fosfor boldur, ancak bikarbonat, potasyum, sitrat,

sodyum ve magnezyum da bulunur. X-ışın difraksiyon çalışmaları kalsiyum ve fosfor  $[C_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  bileşiminde, hidroksiapatit kristallerinin oluştuğunu göstermektedir.

Matriksin organik maddesi tip 1 kollajen ve proteoglikan agregasyonları ile birkaç özel yapısal glikoproteini içeren temel maddedir. Kemik glikoproteinleri, matriks kalsifikasyonunun başlatılmasından sorumlu olabilir. Kemik dokusunun sertliği ve direncinden minerallerin kolajen liflerle ilişkisi sorumludur. Kemiğin kalsiyumu ortadan kaldırıldığında şekli aynı kalır, fakat tendon kadar esnek hale gelir. Matriksin çoğu kolajenden oluşur. Matriksin organik kısımları çıkarıldığında, kemik orijinal şeklini korur, ancak kırılabilir hale gelir, dokunulduğunda ufalanır ve kırılır (17).

### **2.1.2. Osteoprogenitör Hücreler**

Mitozla bölünüp farklılaşarak osteoblastlara dönüşebilen öncü hücrelerdir, bir başka deyişle osteoblastların prekürsörleridir. Kemik iliğindeki mezenkimal hücrelerden köken alırlar. Uzunca, oval şekilli nükleusları bulunan, soluk asidofil veya hafif bazofil sitoplazmalı yassı, mekik şekilli hücrelerdir. Sitoplazmaları organelden zengindir. İyi gelişmiş endoplazma retikulumu, bol serbest ribozom, belirgin golgi kompleksi içerirler. Hücre aktivitesi ile uyumlu olarak çok sayıda mitokondriyum ve bir miktar lizozom bulunur. Kemiğin büyüme döneminde ve kırık iyileşmesi döneminde mezenkimal hücrelerden köken alan osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini salgırlar (11).

Erişkinlerde inaktif olan bu hücreler kemiğin normal büyümesi sırasında aktiftirler. Ancak kemik yaralanması gibi durumlarda aktive edilerek mitozla çoğalırlar ve çoğalan bu hücrelerin bir bölümü kemiği oluşturan osteoblastlara dönüşür. Osteoblastlar osteoprogenitör hücrelere kemik yapımı (osteogenez) durduğunda dönüşebilirler (18).

### **2.1.3. Osteoblastlar**

Osteoblastlar kemik matriksinin organik kısımlarının üretilmesinden (Tip 1 kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler) sorumludurlar (Şekil 2.1). Kemik inorganik kısımlarının çökebilmesi, devamlılığını sürdürebilecek durumda olan osteoblastların varlığına bağlıdır. Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde, yan yana, tek katlı epiteli andıracak şekilde bulunurlar. Osteoblastlar aktif olarak matriks sentezi yaparken, kübik şekilden prizmatığe kadar değişik şekle ve bazofilik sitoplazmaya sahiptirler. Üretim

işlevleri azalmaya başladığında, yassılaşırlar ve sitoplazmalarındaki bazofilik özellik azalmaya başlar (17).

Bazı osteoblastlar yeni meydana gelmiş matriks ile kuşatılarak osteosit haline gelirler. Bu işlem sırasında laküna adı verilen boşluklar meydana gelir. Lakünaların içinde osteosit ve uzantıları, bunlarla birlikte birlikte giden az miktarda kireçlenmemiş matriks bulunur (17).

Matriksin sentezi sırasında osteoblastlar, aktif protein sentezi yapıp salgılayan hücrelerin ince yapısına sahiptir. Osteoblastlar kutuplaşmış hücrelerdir. Matriks elemanları, daha eski kemik matriksi ile teması olan hücre yüzeylerinden salgılanarak osteoid adı verilen yeni ancak henüz kireçlenmemiş matriks tabakasını osteoblastlar ile daha önce meydana gelmiş kemik arasında oluşturur. Bu yöntem, kemik apozisyonu (mevcut kemik dokusu üzerine depolanma) henüz meydana gelmiş matriks üzerine kalsiyum tuzlarının tortulanmasının ardından tamamlanır (17).

#### **2.1.4. Osteoklastlar**

Osteoklastlar osteoprogenitör hücre soyuna ait değildir. Karşılık olarak, osteoklastlar kemik iliğindeki osteoklast progenitör yola ayrılan monosit-makrofaj progenitör hücre soyundan kaynaklanır (19).

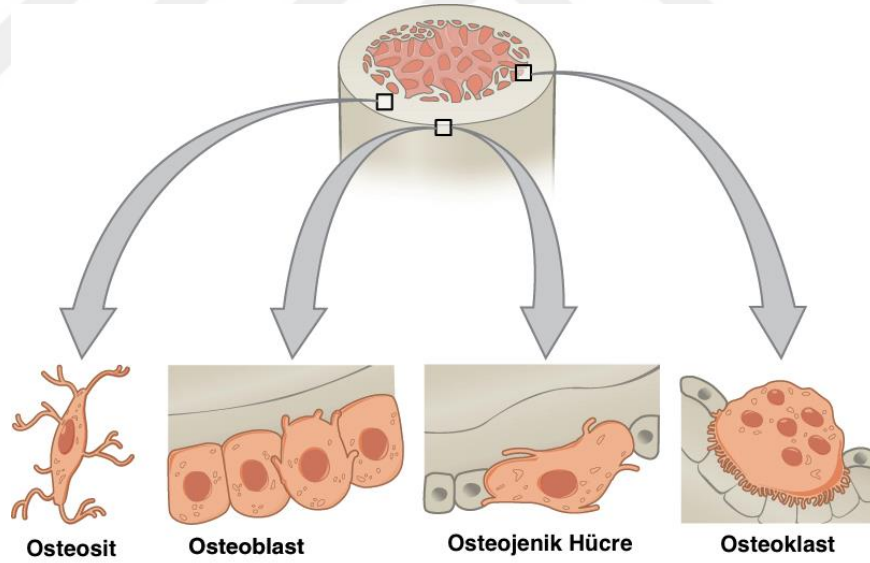
Osteoklastlar kemiğin yeniden şekillenmesinde ve yenilenmesinde önemli rol oynarlar. Bu süreç çeşitli bölgelerdeki kemik matriksinin çıkarılmasını takiben osteoblastlar tarafından oluşturulan yeni kemik ile yer değişimini içerir (19).

Osteoklast öncül progenitör hücreleri monositlerdir. Monositler kemik iliğinin stromal hücreleri ve osteoblastlar tarafından düzenlenen bir işlemle 30 kadar çekirdekten meydana gelen çok çekirdekli osteoklastları oluşturmak için birleşirler ve kan dolaşımı vasıtasıyla kemiğe ulaşırlar. Hedef kemik matriksine bağlandıktan sonra, osteoklastlar kemik emilimi için gerekli olan korunmuş bir asidik çevre meydana getirir. Kemik emilimi önce adenosin trifosfat aracılığı ile düzenlenen asidik bir ortamda inorganik kemik bileşenlerinin ayrılmasını, takiben de katepsin k denen bir lizozomal proteaz ile organik bileşenlerin enzimatik yıkımını içerir. Osteoklastlar subosteoklastik bölüm veya howship lakünü denen bir yüzeysel çukur içerisine yerleşmiş, büyük ve oldukça polarize bir hücredir. Osteoklastlar metabolik bir ihtiyaca cevaben kalsiyumun kemikten kana hareketi için geçici olarak aktiflenirler. Osteoklast aktivitesi direk olarak

kalsitonin, D3 vitamini, kemik iliğinin stromal hücreleri ve osteoblastlar tarafından üretilen düzenleyici moleküller ile sağlanır (19).

### 2.1.5. Osteositler

Osteoblastlardan kaynaklanan osteositler, matriks lamelleri arasında lakunalar içine yerleşmişlerdir. Her lakünada sadece bir osteosit vardır. Osteositlerin sitoplazmik uzantıları ince silindirik kanalcıklarla sarılmıştır. Komşu osteositler, sitoplazmik uzantılarının birbirleri arasında yaptıkları, hücre bağlantıları iletişimi oluşturup, besin maddelerinin hücreden hücreye geçişini sağlarlar. Osteositler ile kan damarları arasında cereyan eden bir kısım moleküler değişim, osteositler ile kemik matriksi arasında bulunan çok az miktardaki ekstraselüler madde aracılığı ile de olur. Bu değişim aşağı yukarı 15 hücrelik bir osteosit zincirine destek sağlayabilmektedir. Osteositler osteoblastlarla mukayese edildiğinde, yassı elips şeklindedirler. Endoplazmik retikulumları ve golgi kompleksleri küçülmüştür. Bu hücreler kemik matriksinin devamlılığı ile aktif olarak ilgilidirler. Osteositlerin ölümünü takiben matriks rezorpsiyonu görülür (20).



Şekil 2.1. Kemik hücresel elemanları

## 2.2. Periosteum ve Endosteum

### 2.2.1. Periosteum

Bu tabaka bağ dokusundan yapılmıştır. Eklem yüzeyleri dışında tüm kemiği dıştan çevreler. Periosteum kemiğin beslenmesinde, gelişiminde, tamir olaylarında görevlidir. Ayrıca kemiğe desteklik görevi de vardır. Yapısında kollajen ve elastik lifler

bulunur. Ayrıca Sharpey lifleri adı verilen kollajenler de matris içine doğru ilerleyerek periosteumu kemiğe bağlamaktadır. Bunlar dış esas lameller ile ara lamellere kadar uzanabilirler (16, 17).

Perikondrium 2 tabakaya sahiptir. Dış tabaka daha çok sıkı bağ dokusuna sahipken iç tabaka hücreden zengin gevşek bağ dokusu yapısındadır ve bol damar içerir (20). Dış tabaka elastikler ve kollajenden oluşur. Lenfatikleri ve metabolizmada rol oynayan damarları içerir. İç tabakanın hücreleri ise özellikle kemik yaralanmasında osteoblast haline farklılaşarak yeni kemik dokuyu meydana getirirler ve o bölgeyi tamir ederler. Onarım sırasında osteoblastların epiteloit hücreler şeklinde tabakalaşma yaptığı izlenir. Bu nedenden dolayı bu tabaka osteojenik kat olarak adlandırılır. Kemik onarımını katılıp aktif olan bu hücreler normal koşullarda inaktif durumdadırlar (16, 17).

### **2.2.2. Endosteum**

Endosteum kompakt kemiklerin iç yüzeyleri ve spongiyöz kemik trabeküllerini örter. Retiküler bağ dokusundan oluşmuşlardır. Endosteumun kemik dokusuna dönük kısmında tek sıra halinde dizilmiş osteoprogenitör hücreler bulunur. Bu hücreler kemik yapımı ve onarımı esnasında bölünerek osteoblastlara farklılaşır (21, 22).

### **2.3. Kemik Tipleri**

Kemikteki mikroskobik incelemelerin neticesinde kemiğin iki farklı türü olduğu bulunmuştur. Kemik, primer (birincil, wöwen, olgunlaşmamış, yada örgün kemik) ve sekonder (ikincil, olgun, yetişkin yada örgün kemik) olmak üzere iki kısımda incelenir. Embriyolojik gelişim sürecinde, primer kemik kırık ve diğer tamir olaylarında ilk görülen kemik çeşitidir. Sekonder kemikte kollajen lif dağılımı lameller halinde organize olmuş biçimdedir. Primer kemikte ise bu durum, rastgele ve değişik yönlere dağılmış ince kollajen lif şeklindedir. Yetişkinlerde primer kemik, yerini sekonder kemiğe bırakır (23, 24).

#### **2.3.1. Primer (Olgunlaşmamış) Kemik Dokusu**

Fötal gelişim ve kemik onarımı sırasında ilk oluşan olgunlaşmamış kemik dokusudur. Bu dokuda kollajen lifler her yönde seyrederek ağlar oluştururlar. Temel madde yeterince kemikleşmemiştir. Hücreler çoktur. Hidroksiapatit kristalleri kollajen lifler üzerine oturmuştur. Hücreler osteositlerdir. Bulunuş oranları sekonder kemik dokuya göre daha yüksektir. Bunlar ara maddede gelişigüzel dağılmışlardır. Primer

kemikte lakünalar biraz daha toparlaktır. Gelişim sürecinde bazı bölgeler hariç yerini sekonder kemik dokuya bırakır. Kafatası süturları, tendonların insersiyö bölgeleri, dişlerin alveolleri primer kemik olarak kalır. Mineral maddesi sekondere oranla azdır (16).

### **2.3.2. Sekonder (Olgunlaşmış) Kemik Dokusu**

Sekonder kemik dokusu çeşitlidir ve genellikle yetişkinlerde bulunur. Özellik olarak kollajen lifler 3-7 mikro metre ( $\mu\text{m}$ ) kalınlığında birbirlerine paralel veya bir vasküler kanal etrafında dairesel olarak yerleşmiş lameller halinde düzenlenmiştir. Osteon veya havers sistemi, kan damarlarının, sinirlerin ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran dairesel lamellerin meydana getirdiği bütünlüğe denir. Osteositleri içeren lakünalar lameller arasında ve nadiren de içinde bulunur. Bir lamelin kollajen lifleri birbirlerine paraleldir. Her havers sisteminin etrafı mineralize amorf matriks ve birkaç kollajen lifden oluşan yapıştırıcı madde ile çevrilidir (12).

Erişkinlerde sadece sekonder kemik dokusu bulunur. Sekonder kemik dokusunun iki türü vardır. Bunlar spongios (süngerimsi, kansellöz) kemik ve kortikal (kompakt, lameller) kemiktir (25).

#### **2.3.2.1. Kompakt Kemik Dokusu**

İnsan iskeletinin %80'i kompakt kemiktir. Kemiklerin iç ve dış tabakalarını meydana getirir. Vital organları korumak, biyofonksiyonel kuvvetlere direnç göstermek, harekete olanak vermek ve iç denge için uygun bir kaynak oluşturmak kompakt kemiğin görevleri arasındadır (26).

Kompakt kemik, kortikal ya da lameller kemik olarakta anılır. Örgü kemikten farklılaşarak gelişir. Bu farklılaşma embriyolojik kemiğin periosteal ve endosteal yüzeylerini saran vasküler kanallar vasıtasıyla meydana gelir. Kompakt kemiğin temel yapı birimi havers sistemidir. Bu sistemler osteon olarak da adlandırılır. Osteonlar, uzunlamasına yerleşimli vasküler kanalları çevreleyen silindirik şekilli lameller kemik tabakalarından oluşurlar. Volkmann kanalları yatay yerleşimlidir. Komşu osteonları birbirine bağlar. Kortikal kemiğin mekanik gücü osteonların sıkı yerleşimiyle ilişkilidir (27, 28).

### **2.3.2.2. Süngerimsi Kemik Dokusu**

Süngerimsi kemiğe kansellöz ya da spongiyöz kemik de denmektedir. Vücut kemiklerinin hacimsel olarak %20'sini teşkil eder. Süngerimsi kemik, mikroskopik açıdan kompakt kemikten farklılıklar gösterir (29, 30).

Bu dokuda birbirleriyle anostomozlaşan kemik trabekülleri vardır. Bu trabeküllerin arasında düzensiz boşluklar vardır ve kemik iliği ile doludur. Spongiyöz kemik trabeküllerinde kemik lamelleri paralel seyirlidir (16). Süngerimsi kemiğin yüzey kemik oranı kompakt kemiğe göre 8 kat daha fazladır. Bu da kemik yapıcı hücrelere daha fazla ulaşılmasına olanak sağlar (31).

Süngerimsi kemik dokusu yassı kemiklerin iç yüzeyleri, kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımlarında bulunur. Bu dokuda havers ve volkman kanalları yoktur. Beslenmesi kemik iliğinde bulunan kan damarlarından olur (16).

### **2.4. Kemik Oluşumu**

Kemik 2 yolla şekillenir: Osteoblastların salgıladıkları matrikse doğrudan doğruya minerallerin çökmesi ile zar içinde kemikleşme (intramembranöz kemikleşme) veya önceden mevcut kıkırdak matriks üzerine tortulanarak, kıkırdak içinde kemikleşme (endrokondral kemikleşme).

Her iki yolla da, oluşan ilk kemik, birincil veya özgü kemiktir. Birincil kemik geçici bir dokudur ve kısa sürede tam lameller veya ikincil kemikle yer değiştirir. Kemik büyümesi esnasında, birincil kemik alanları, rezorbsiyon alanları ve ikincil kemik sahaları yan yana görülürler. Bu kemik yapımı ve yeniden modellenme bileşimi, büyüyen kemiklerin yanı sıra yetişkinlerde de hayat boyu sürer ama yetişkinlerdeki değişim hızı epeyce yavaştır (17).

#### **2.4.1. İnamembranöz Kemik Oluşumu**

Kafatasının yassı kemikleri gibi membran kemikler intramembranöz kemikleşme ile gelişir. İnamembranöz kemikleşme şu sıralama ile gerçekleşir.

Embriyonik mezenşim, damardan zengin bağ dokuya dönüşür. Kollajen lifleri içeren jelatinöz bir ekstraselüler matrikse gömülü fibroblast benzeri mezenşim hücreleri bir araya gelir. Mezenşim hücreleri osteoblastların tipik prizmatik şeklini alır ve kemik matriksi salgılamaya başlar. Birçok kemikleşme merkezi gelişir ve bu merkezler sonunda birleşerek süngere benzeyen ve dolayısıyla süngerimsi kemik ya da primer spongiyöz olarak adlandırılan anostomozlaşan trabeküllerin bir ağını oluşturur. Erken



dönemdeki intramembranöz kemik ağı kemik olarak adlandırılır. Kalsiyum fosfat apozisyon ile uzanan kemik matriksinde depo edilir. Kemik matriksi mineralizasyonu, 2 yeni gelişime öncülük eder. Bu öncülükler trabeküllerin kalınlaşması ile osteoblastların osteositler şeklinde hapsedilmesi ve perivasküler kanalların kısmen kapanması ile mezenşim hücrelerinin kan yapıcı hücrelere dönüşmesi şeklindeki hematopoez olaylarında yeni görev üstlenmektir. Osteositler kanaliküller içindeki sitoplazmik uzantılarla birbirlerine bağlanırlar ve kan damarlarına komşu osteoprogenitör hücrelerden yeni osteoblastlar oluşur. Daha sonra lamelli kemikte, yeni sentezlenen kollajen lifleri düzenli demetler oluşturmak üzere dizilirler. Lameller osteonlar veya havers sistemini oluşturur. Ardından osteoprogenitör hücre potansiyeline sahip fusiform hücreler periost ve endosteumu oluşturmak üzere yoğunlaşır. Doğumda kemik gelişimi tamamlanmamıştır. Kafatasının kemikleri osteojenik dokuya ev sahipliği yapan fontaneler tarafından ayrılır. Genç bir çocuğun kemikleri hem örgü hem lamelli kemik matriksi içerir (19).

#### **2.4.2. Endrokondral Kemikleşme**

Bu kemikleşme uzun ve kısa kemiklerde görülür. Kemikleşme önce hıyalin kıkırdaktan ufak bir modelle başlayıp ardından kemik dokusu oluşumuyla sonlanır. Perikondriumun iç katında bulunan mezenkim hücreleri modelin diyafiz kıkırdağını örter. Bu mezenkim hücreleri osteoprogenitor hücrelere, onlar da osteoblastlara farklılaşır. Üst üste yerleşen kemik lamellerini bu osteoblastlar yapar. Böylece yeni kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında silindirik biçimde bir kemik manşet ortaya çıkar. Bu kemik manşet, kondrositlerin beslenmesine engel olur. Oluşan iskemi, kondrositlerde önce hipertrofiye neden olur. Ardından diyafizin orta kısmından başlayarak tahrip olur, devamında kondrositlerde ölmeler meydana gelir. Kıkırdak modelin ortasında devamlı boş kaviteler oluşur (kemik iliği kavitesi). Periosteumdaki osteoklastlar kemik manşetini yer yer delerek foramen nutrisyumları açarlar. Periosteumdaki kan damarları bu deliklerden girerler, osteoprogenitor ve hematopoetik hücreleri taşırlar. Bu kan damarlarıyla gelen kalsiyum ve fosfor iyonları, alkalin fosfataz aracılığıyla birleşerek kıkırdak matrikse çöker ve böylece diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Diyafizde şekillenen boşluklara kan damarları ile gelen mezenşim hücrelerinden farklılaşan osteoblastlar, kalsifiye kıkırdak matriksi üzerine tek sıra dizilerek kemik dokusu yapmaya başlarlar. Böylece ortaları kalsifiye kıkırdak, yüzeyleri ise kemik dokusundan meydana gelen kemik trabekülleri meydana

gelir. Bu trabeküller ile kan damarlarının aralarında kalan boşluklarda kemik iliği şekillenir. Kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında kondrositler mitoz ile çoğalarak alt alta dizilen gruplar yaparlar. Bu süreçte modelin boyu da devamlı olarak uzar. Kemik manşet de kalınlaşıp, epifizlere doğru uzanır ve kondrositlerin bulunduğu bölgeyi dıştan sarar. Kemikleşme merkezinde olduğu gibi önce kıkırdak matriks, ardından da ilk şekillenenlerin devamı halinde kemik trabekülleri oluşur. İkincil kemikleşme merkezleri encondral kemikleşen epifizlere yaklaşıncaya, epifizlerin içlerinde belirir. Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında sadece kıkırdak bir disk kalır ki buna epifiz plağı denir. Kemikleşme sona erinceye kadar epifiz plaklarındaki kıkırdak hücreleri diyafiz yönüne doğru bölünüp çoğalarak devamlı kıkırdak dokusu yapar, bu kıkırdak da devamlı olarak yerini kemik dokusuna bırakır. Böylelikle kemikler belli bir yaşa kadar uzamaya devam eder. En sonunda epifiz plakları da kemikleşir, kemik büyümesi sonlanır (32).

## **2.5. Kemik Dokusunun Büyüme Evreleri**

### **2.5.1. Şekillenme ( Modeling )**

Kemik şekillenmesi kemik yüzeylerinde yapım ve yıkım olayları meydana gelmesidir. Bu süreç sonucunda kemik yüzeyine yeni kemik dokusu eklenmesi veya var olan kemik dokusunun azalması gerçekleşir. Kemik büyümesi aşamasında periostal kemik yapımı endostal yıkımdan daha fazladır. Kemiğin şekillenme aşamasında ise kemiğin şekil, hacim, dayanıklılık gibi temel özellikleri belirlenir. Kemik şekillenmesinde kortikal tabakanın kalınlığında artma meydana gelir ve uzun kemiklerin uç kısımları şekillenir (33, 34).

### **2.5.2. Yeniden Şekillenme ( Remodeling )**

Yeniden şekillenme sürecinde osteoblastlar ve osteoklastlar rol oynar. Bu süreçte eski kemik rezorbe olur ve yerini yeni kemiğe bırakır (35). Bu süreç yaşam boyu devam eder. Bu şekillenmenin amacı mikroskobik düzeydeki zararı tamir ederek kemik direncini arttırmak ve kalsiyum homostazını korumaktır. Normal şartlarda rezorbe olan kemik miktarı kadar kemik yapımı gerçekleşir. İki tip şekillenme vardır;

1. Kortikal kemiğin yeniden şekillenmesi;
2. Trabeküler kemiğin yeniden şekillenmesi;

Fizyolojik yeniden şekillenmede, mekanik etkiler ve sistemik endokrin hormonların süreci başlatılır. Buna karşılık patolojik yeniden şekillenmede örneğin romatoid artrit

olduğu gibi, enflamasyonla ilgili olan sitokinler makrofaj ailesi hücreleri toplanarak salgılanır ve kemiğin yeniden şekilenme süreci gerçekleşir (36).

## **2.6. Kemik İyileşmesi**

Kemik dokusu beslenme, endokrin, metabolik ve mekanik koşullara karşı etkilenen bir dokudur. Bu nedenle canlı ve dinamik doku olma özelliği taşır. Kırık kemik hattı ve defekt sahasında meydana gelen iyileşme çok sayıda biyokimyasal, hormonal, biyomekanik, hücrenel ve patolojik süreç tarafından etkiye uğrar. Yaralanan dokunun iyileşmesiyle, genellikle orijinal dokudan morfoloji ve fonksiyon olarak farklılaşan bir doku oluşur ve tamir olarak adlandırılır. Doku rejenerasyonunda ise, morfoloji ve fonksiyonun tamamen restore edildiği bir iyileşme gerçekleşir. Yaralanmanın durumuna bağlı olarak kemik dokunun iyileşmesi hem rejenerasyonu hem de tamiri içerir. Örneğin doğru bir şekilde stabilize edilmiş küçük bir kemik kırığı (yeşil ağaç kırığı) rejenerasyonla iyileşirken büyük defektler genellikle tamirle iyileşir. Yaralı bölgede kemik defektinin oluşumuyla birlikte genel doku cevapları meydana gelir. Bunlar kanama ve daha sonra burada oluşan granülasyon dokusunun meydana getirdiği pıhtılaşma olaylarıdır. Kan damarları periosttan gelerek, çevrelerindeki bağ dokusu ile beraber defekt bölgesine girerek bölgeyi damarsal ve hücrenel olarak zengin bir granülasyon dokusu ile doldururlar. Kemik fraktürü varsa endosteum da bu olayda görevlidir. ekim soketinin kapanması ve alveoler kemik içerisindeki defektlerin iyileşmesini tanımlamak için bir model oluşturulur. ekimi takip sonrası boş soket kanla dolarak pıhtı oluşur. Pıhtı içine iltihabi hücreler göç eder, ardından enflamasyon süreci başlar. Pıhtı içine damarsal dokular ve mezenşimal hücreler geçerler ve granülasyon dokusu oluştururlar. Granülasyon dokusunun zamanla öncü bağ dokusuyla yer değiştirmesiyle yeni kemik oluşumu başlar. Daha sonra bu kemik, modelasyon ve remodelasyon sürecinden geçerek lameller kemik ve kemik iliğine dönüşür (37).

### **2.6.1. Kemik İyileşmesi Süreci**

Kemik iyileşmesinin süreci 3 evrede gerçekleşmektedir.

Enflamasyon evresi 1-4 gün arasındır. Defekt bölgesinde hematoma ilk birkaç saat ile birkaç gün içinde meydana gelir. Bu hematomda, defekt iyileşmesi için gerekli birçok faktör depolanmıştır. Bu esnada, trombositlerden Transforme Edici Büyüme Faktörü- Beta (TGF- $\beta$ ) ve Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) gibi, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli rol oynayan faktörler salgılanır. Enflamatuar hücreler (makrofajlar, monositler, lenfositler ve polimorfonükleer hücreler) ve

fibroblastlar, prostoglandin etkileşimi ile kemiğe infiltre olurlar. Bu aşamada defekt bölgesinde granülasyon dokusu oluşumu, vasküler doku ve mezenşimal hücre göçü başlar (38). Onarım evresi 2-40 gün arası değişir. Bu fazda ise fibroblastlar, vasküler göçe yardım etmek üzere stromaya geçerler. Vasküler göç arttıkça, kollojen matriks belirginleşir ve bu esnada osteoidler oluşur. Bunu takiben mineralizasyon gerçekleşir. Defekt alanında yumuşak kallus meydana gelir. İlk 4-6 haftalık süre içinde oluşan bu kallusun, basınca karşı direnci düşüktür (31).

Yeniden modellenme evresi 25-100 gün arasındadır. Defekt alanında kallus oluşumu başladığı zaman, remodelasyon aşaması başlar. Oluşan büyük defekt kallusu, normal kemik iliği boyutuna ulaşıncaya kadar osteoklastlar tarafından yıkılır. Bundan sonra, havers sistemi bulunan lameller kemik yapısı meydana gelir. Bu süreç yıllar boyu devam edebilir (38).

### **2.7. Kritik Boyuttaki Defekt**

Maksillofasiyal cerrahide defektleri onarmak için farklı materyaller kullanılmaktadır. Kullanılan materyallerin geliştirilmesi amacıyla iyileşmenin gözlenmek istendiği defekt boyutu spontan olarak iyileşebileceği boyuttan geniş olmalıdır. Kritik boyutlu defekt, bir hayvanda herhangi bir osteopromotif bir materyal kullanmaksızın yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak belirtilmektedir. Kritik boyutlu defektler daha çok fibröz bağ dokusuyla yapım ve iyileşme eğilimi göstermektedirler (39).

### **2.8. Kontrollü Salım Teknolojisi**

Kontrollü salım teknolojisi, kimyasal salım yapan bir polimerik taşıyıcının salım süresini uzatmak için kullanılır. Bu preparatlar, genellikle ilaç için bir taşıyıcı madde olarak hareket eden bir polimer matriksi içine ilaç katılmasıyla meydana gelir. Bu ürünler ilk olarak ağızdan sürekli salım yapan ürünler için geliştirilmiştir (40). Kontrollü salım yapan polimerik preparatların ilk klinik kullanımları 1960'lerde gerçekleşmişken, preparatların geliştirilmesi için 1950'lerin başlarından itibaren geniş çaplı çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (41, 42). Bu teknolojinin modern uygulamaları başlıca ilaç salımı üzerine olmuştur. Ayrıca tarım, yiyecek, kozmetik, böcek ilaçları üzerinde kontrollü salım uygulamaları yapılmaktadır (40, 43-47). İlaçların kontrollü salımıyla ilaçlar üzerinde pek çok faydalar ortaya çıkmıştır (48):

- İlaç alındıktan sonra istenilen süre boyunca etkin madde plazma konsantrasyonu sabit kalır. Hasta daha az sıklıkla ilaç alır ve küçük dozlarda tedavi sağlanır.

- Tedavi düşük dozlarla sağlandığı için etkin madde/maddelerinin yan ve toksik etkileri azaltılır/görülmez.
- Etkin madde/maddelerinin parçalanmasını önleyerek yarılanma ömürlerini uzatır.
- Kontrollü salım sistemlerinde hedeflendirme olanağı sayesinde etkin madde istenen doku ve organlara yönlendirilebilir.
- İlaç kullanımı sırasında yaşanan sorunlar (gece ilaç kullanma, unutma riski, kısa zaman aralıklarında ilaç kullanma durumları) ortadan kalkar.
- Terapötik indeksi dar olan etkin maddeler için uygundur (54).

Kontrollü salım uygulamaları için (oral, enjekte edilebilir, transdermal, implante edilebilir) uygulama yolları, (mikro-nano küreler, hidrojeller, filmler, granüller) gibi aygıtlar üzerinde çalışılmıştır. Enjekte edilebilir mikro-nano küreler bu formların en popüleridir (48).

### **2.8.1. Kontrollü Salımda Kullanılan Polimerler**

Pek çok farklı sentetik ve doğal polimerler, kontrollü salım sistemleri için araştırılmıştır ve bunlardan bazıları FDA tarafından ticari kullanım için onay almıştır (41). Yüksek molekül ağırlıklı polisakkaritleri içeren doğal polimerler için, agaroz alginat, karragenan, hiyaluronik asit, kitosan ve dekstran veya kollajen, albümin, jelatin, elastin ve ipek fibrin gibi proteinler örnek verilebilir (41, 49, 50). Bununla birlikte, genel olarak doğal polimerler sentetik polimerlerden sentezi ve işlenmesi bakımından daha sınırlıdır. Bu dezavantajlar, kontrollü salım sistemleri için sentetik polimerlerin kullanımına yönelik ilgiyi artırmıştır. Sentetik polimerler; selüloz türevleri, akrilik polimerleri, polaksamerler, polaksaminler, poliesterler ( poli-laktik asit, poli-glikolik asit, polilaktik-ko-glikolik asit) , polianhidritler, poliamitler, fosfor bazlı polimerler ve poliüretanları içerir (40, 42). Sentetik polimerlerin dikkate alınması gereken iki önemli özelliği biyobozunurluk ve biyouyumluluktur. Biyobozunur polimerler sayesinde implante edilen salım yapan cihazların geri çıkarılması için cerrahiye ihtiyaç kalmaz. Polimerin biyolojik uyumluluğu toksisite ve inflamasyonla ilgili komplikasyonlarla karşılaşılmasından önemlidir. Polimerler ile yapılan çalışmalarda çok sayıda farklı salım mekanizması ve salma kinetiği tespit edilmiştir (48).

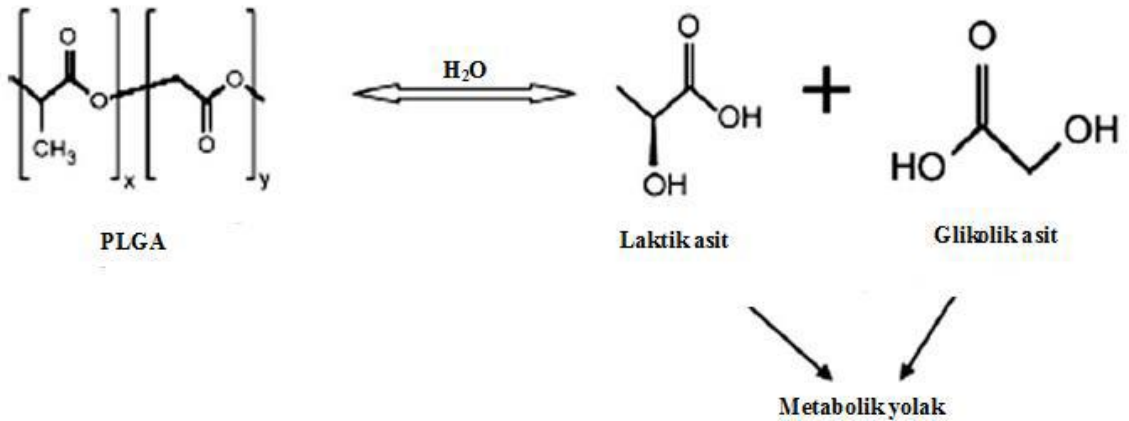
### **2.8.2. Kontrollü Salım Tarihinde PLGA**

Bugüne kadar kontrollü salım sistemlerinde PLGA, en iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan polimerdir. Bu sentetik polimer biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanma ve olumlu salma kinetiğine sahip olması nedeniyle büyük başarı bulmuştur (51). Poliglikolik asit (PGA) ve polilaktik asit (PLA), PLGA kopolimeriyle birlikte 1960'lı yıllarda biyolojik olarak parçalanabilir sentetik polimer cerrahi suture olarak keşfedildi (52, 55). Bu polimerlerin ameliyat dikiş ipliklerindeki başarılı bir şekilde kullanımı, polimerik biyomateryaller olarak kullanılmasının genişlemesine yol açmıştır. Bu zamandan sonra bu kopolimer kontrollü salım sistemlerindeki uygulamalar için en yaygın ve başarılı olarak araştırılmış polimer olarak incelenmiştir (56). PLGA, geniş yelpazede küçük moleküllü ilaçların, doğurganlık düzenleyici hormonların, büyüme hormonlarının, steroid hormonlar da dahil olmak üzere peptidler ve proteinlerin, anti-enflamatuar ilaçların, sitokinlerin, kemoterapötiklerin, antibiyotiklerin, narkotik antagonistlerinin, insülin ve aşıların salımında kullanılmıştır (46, 57-62). Diğer polimerler gibi PLGA'nın üzerinde kontrollü salım mekanizması için araştırmalar yapılmıştır. PLGA'nın enjektabl mikro-nano kürecikler gibi farklı cihaz morfolojileri içine işlenmesi oldukça kolaydır (63).

### **2.8.3. PLGA'nın Özellikleri**

Biyoparçalanabilir bir polimer olan PLGA ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında ve doku mühendisliği alanında çok önemli bir potansiyele sahiptir. PLGA'nın önemli üstünlükleri olarak FDA ve EMA tarafından onaylı olması, DNA, RNA, proteinler ve peptid dahil çok farklı yapıdaki maddelerin taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında kullanılması, uzun süreli klinik deneyimin kazanılmış olması, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olması sayılabilir (9, 10). Bunlara ek olarak, yapılan çalışmalar sürekli salım sistemleri hazırlanması için PLGA'nın degradasyon özelliklerinin son derece uygun olduğunu ortaya çıkarmıştır. Poliester yapıdaki PLGA kopolimeri PLA ve PGA polimerlerinden oluşmuştur ve özellikleri iyi tanımlanmıştır. D ve L olmak üzere iki optik izomeri bulunan PLGA, laktid yapısında da asimetric bir karbon içerir. Böylece optikçe aktif olan L-laktid ve D-laktid, ayrıca optikçe aktif olmayan DL-laktid olmak üzere üç farklı laktide sahiptir (9). PLA hidrofobik bir polimerdir. Bu yapısındaki metil yan grubundan kaynaklanır. PGA'ye göre hidrolize daha dayanıklıdır. Bunun nedeni metil grubunun sterik engel oluşturmasıdır. Poli(DL-laktid) yapısındaki düzensizliklerden dolayı amorf yapıda iken Poli(L-laktid) yarı-

kristal (yaklaşık % 37 oranında kristalinite) yapıdadır. PLA düşük termal stabilite ve kırılabilirliğe sahiptir. PGA %45-55 oranında kristalin yapı gösterir ve metil yan grubuna sahip değildir. Bu nedenden dolayı birçok organik çözücüde çözünmez. PLGA, L-laktid veya DL-laktid'in glikolid ile kopolimerizasyon yapılmış bir polimerdir. Glikolid: laktid oranları farklılaştırılarak PLGA'nın kristalinite derecesi kontrol edilebilmektedir (9). Piyasada farklı molekül ağırlıklarına ve kopolimer bileşimlerine sahip PLGA örnekleri bulunmaktadır. PLGA'nın tipleri genellikle PLGA 50:50, 25:75 gibi monomer oranlarıyla tanımlanırlar. PLGA kopolimeri yapısında % 50 oranında laktid % 50 oranında glikolid içerir. PLGA 25:75 (laktid: glikolid) amorf bir yapıda iken PLGA 80:20 (laktid: glikolid) ise yarı-kristalin yapıdadır. PLGA, su varlığında ester bağları üzerinden hidrolize uğrar (Şekil 2.2). Bu hidroliz ile monomerik asitlere parçalanan PLGA, Krebs döngüsü aracılığı ile CO<sub>2</sub> ve su halinde idrarla atılır (10). PLGA'nın biyoparçalanması üzerinde camı geçiş sıcaklığı, molekül ağırlığı, kristalinite derecesi, laktid: glikolid oranları etkindir. PLGA yüksek oranda laktid içerirse daha az hidrofildir ve daha az su absorbe eder, böylece hidrolize olma hızı yavaşlar. PLGA ile hazırlanan taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklüğü, yüzey özellikleri ve PLGA'nın molekül ağırlığı, laktid: glikolid oranları gibi özellikleri salım üzerinde etkili olan değişikliklerdir (9). PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin hücre içine alınma şekilleri pinositoz ve klaritrin aracılı endositoz iledir (10).



Şekil 2.2. PLGA hidrolizi (10).

#### 2.8.4. PLGA Salım Mekanizması

PLGA polimerin bozulma oranı PLGA bazlı salım sistemlerinin, salım mekanizmaları için en yaygın tartışılan konulardan biridir (31). Bununla birlikte, cihazın özelliklerine bağlı olarak, diğer işlemler de serbest bırakma mekanizmasına katkıda bulunabilir. Cihaz ilk sulu bir ortamda battığındaki su penetrasyonu ve

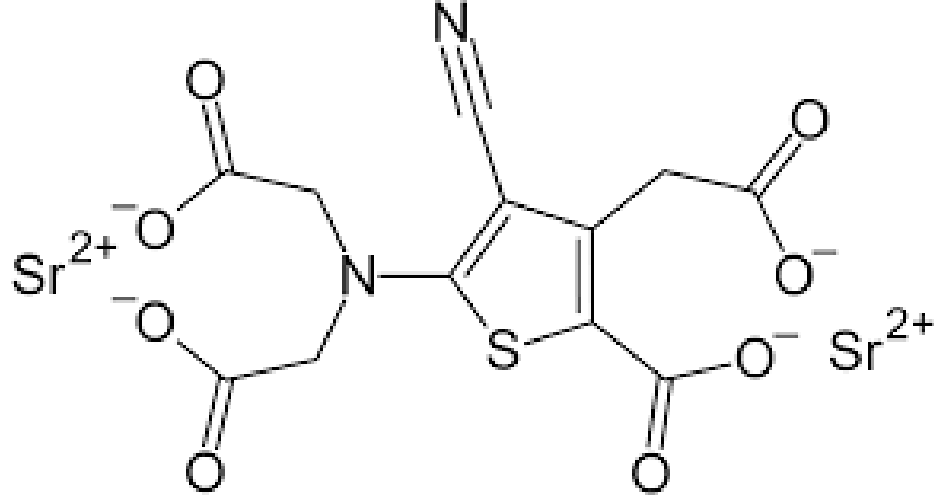
çözündürme, erozyon ve PLGA polimer parçalarının difüzyonu, serbestleşen ilacın difüzyon oranı değişiklik gösterir. Bu işlemler benzer zaman skalasında olduğu zaman, salma mekanizması karmaşık olabilir ve dolayısıyla serbest bırakma verileri arasında gözlenen farklılıkların anlaşılmasını yorumlamak zorlaşır. Bir PLGA matristen, genelleşmiş serbest bırakma mekanizmasını tanımlamak için biz ilk olarak su penetrasyonu ve PLGA matrisin hidrasyonunu düşünürüz. Başlangıçta su, salım yapan cihazın yüzeyinden, merkezine penetre olur. Bu da cihazın hidrolitik PLGA polimer bozunma süreçlerini ve polimer matrisinin içine kapsül şeklinde hapsedilmiş ilacın difüzyonunu aktive eder. Polimer bozunma ilerledikçe küçük fragmanlar ve PLGA'dan gelen monomerler cihazdan aşınmaya başlar. Cihazdan serbestleşen ilacın difüzyon oranı sırayla hızlanmaya başlar. PLGA hidrolizinin otokatalitik tepkimesinde pH gradyanının meydana gelmesi halinde cihazın merkezinde ilacın hatta polimerin erozyon ve difüzyon süreci hızlanacaktır. Yeterli kütle cihazın merkezinden uzaklaştıktan sonra pH gradyanı cihazdan ilacın salımı tükeninceye kadar dengeleyici otokatalitik hidrolizi dengelemeye başlayacaktır (60).

## **2.9. Strontium Ranelat**

### **2.9.1. Strontium Ranelatın Yapısı**

Stronsiyum ranelat (SR), iki adet stabil stronsiyum ( $Sr^{2+}$ ) atomu ve ranelik asitten meydana gelmektedir (Şekil 2.3). İçeriğindeki  $Sr^{2+}$ , İskoçya yakınlarında bir kurşun madeninde 1770'li yıllarda keşfedilmiştir. Bulunduğu yerler besinler, su ve eser miktarda da iskelettir. SR 20 farklı tuz arasından tercih edilmesinin nedeni stronsiyumun biyoyararlanımının, gastrik toleransının iyi olması ve stronsiyum ve organik bileşen arasındaki sahip olunan yüksek orandır. Kemik mineralizasyonuna katılan  $Sr^{2+}$ , divalent bir katyon olup atomik ve iyonik özellikleri ile kalsiyuma benzemektedir. Kemik koruyucu bir element olan SR kemikte hidroksiapatit kristallerinin yüzeyine kalsiyum gibi bağlanarak tutunur. Stronsiyumun hidroksiapatitteki kalsiyum ile değişimi sınırlı miktarda meydana gelir. Kemik matriksinin kristal yüzeylerinde düşük oranda iyonik geçiş nedeni ile kemik tutulumu meydana gelir. Hormonlar ve büyüme faktörleri gibi, mineraller ve eser elementlerin direkt ve indirekt mekanizmalarla kemik rezorpsiyonunu ve formasyonunu etkilediği gösterilmiştir (6).





Şekil 2.3. Stronsiyum ranelatın kimyasal yapısı

### 2.9.2. Strontium Ranelatın Kemik Hücrelerine Etki Mekanizması

Çeşitli çalışmalarda SR anti-rezorpsiyon yapıcı ve kemik oluşturucu bir madde olduğunu gösterilmiştir. Fare kalvarya kültürlerinde, kalsiyum serbest kalması değerlendirildiğinde, SR'nin kemik erimesini yaklaşık % 30 azalttığı görülmüştür. Buna ek olarak izole edilmiş sıçan hücrelerindeki çukur testlerinde, SR'nin yaklaşık % 30 oranında osteoklast aktivitesini azalttığı ve yine çukur testlerinde uzun kemik kültürleri içindeki dentin dilimleri üzerinde fare osteoklastlarının kemik rezorpsiyon aktivitesini düşürdüğü görülmüştür. İki katyonun belirgin etkileri düşünüldüğünde, bu etkiler SR'a spesifiktir. Kalsiyum ranelatta aynı etkiler görülmemiştir. SR'nin 2 osteoklast markırları olan karbonik anhidraz II ve vitronektin reseptörünü etkileyerek osteoklastların ifadesi sayısı azalttığı görülmüştür. Daha ileri çalışmalarda SR'nin in vitro kemik oluşumu üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Rat kalvarya organ kültürü ve rat kalvarya hücre kültürlerinde, SR ilk önce preosteoblast hücrelerin replikasyonunu artırdığı görülmüştür. Böylece fonksiyonel hücreler ve matriks sentezi aktivitesi etkilenir. İn vitro, fare kalvaryal MC3T3-E1 osteoblast hücrelerinden elde edilip farklılaştırılan osteojenik modellerde, SR'nin osteoblast farklılaşması markırı alkalın fosfataz etkinliğini artırdığı bulunmuştur. Ve bu sistemde matriks mineralizasyonu etkilenmeksizin kollajen sentezi artmıştır (66).

### 2.9.3. Strontium Ranelatın Kemik Kütlesi Ve Dayanıklılığına Etkisi

Hayvan modellerinde yapılan çeşitli çalışmalarda SR'nin anti-rezorpsiyon ve kemik oluşturan etkileri gösterilmiştir. Normal yetişkin farelerde SR uygulaması

vertebral kemik formasyonunda artışa, kemik rezorpsiyonunda azalışa, böylece kemik kütlesinde artışa sebep olmuştur (67). Yetişkin ratlarda SR lumbar vertebra ve femurda kemik kütlesini artırmıştır. Bu histolojik olarak trabeküler kemik volümünün değerlendirilmesiyle doğrulanmıştır. Bu etki tibial metafizlerde trabeküler seperasyonun azalması ve trabeküler kalınlık ve sayısındaki artışla ilişkilidir. SR'nin kemik mikro mimarisini geliştirdiği görülmüştür. Bu sonuçlar kemik dayanıklılığını artırmıştır. Tedavi edilen hayvanlarda plazma alkalın fosfataz aktivitesi ve stronsiyum ranelatin kemik oluşturucu etkisi birbiriyle uyumlu olarak artmıştır (68). Çoğunlukla insanlardaki gibi kemik remodelingi görülen yetişkin maymunlarda SR'nin kemik rezorpsiyonunu azalttığı ve alveoler kemikteki mineralizasyon yüzeylerinde artışa neden olduğu anlaşılmıştır (69). Elde edilen farmakolojik veriler neticesinde SR'nin vertebral ve apendiküler iskelet sisteminde kemik kütlesi ve dayanıklılığını artırdığı görülmüştür (66).

#### **2.9.4. Stronsiyum Ranelatin Farmakokinetik Özellikleri**

Stronsiyumun biyoyararlanımı ölçüldüğünde, 2 gr saşe doz ağızdan alındıktan sonra %27 olarak bulunmuştur. Stronsiyumun da kalsiyuma benzer şekilde gastrointestinal yoldan 2 mekanizma ile emildiği düşünülmektedir; bu mekanizmalar doygunluğa ulaşmayan yüksek bir doz olan pasif emilim ve düşük bir doz olan aktif emilimdir. SR'nin günde 2 kez olarak, sabah kahvaltıdan bir saat önce ve akşam yemeğinden 3 saat sonra alınımının, akşam yemeğinden 3 saat sonra bir kez alınımıyla benzer etkiyi gösterdiği görülmüştür (6). SR'nin ve kalsiyumun eş zamanlı alınımı stronsiyumun biyoyararlanımını düşürmektedir. Bunun muhtemel olarak aktif yarış yerindeki yarıştan kaynaklandığı düşünülmektedir. Stronsiyum ranelatla eş zamanlı besin alınımında ilacın biyoyararlanıma negatif etkisi mevcuttur. Renalik asitin mutlak biyoyararlanımı stronsiyum ranelat ağızdan tek doz 2 gr alındıktan sonra % 2,5 olarak ölçülmüştür. Bunun nedeni renalik asidin düşük lipofilik özellikte olması ve SR'nin düşük çözünürlüğe sahip olması olabilir. Doz aralıklarıyla ilgili yapılan çalışmalarda (25 gün 0.5-4 gr/gün SR alımı) kararlı duruma hem renalik asit hem stronsiyum için 15 gün sonra varılmıştır. En yüksek doz verilerek (2x2.0 gr stronsiyum ranelate/gün) yapılan 25 günlük tedaviden sonra stronsiyumun maksimal  $20 \pm 2.3$  mg/l plazma konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Minimal plazma konsantrasyonu olarak sabah ölçülen  $16.2 \pm 3.0$  mg/l bulunmuştur. Bu sonuçlara bakarak plazma konsantrasyonlarında dalgalanmalar görülmüştür. Aynı doz aralıklarında renalik asit için minimal plazma

konsantrasyonu  $0.65\pm 0.42$  mg/l ve plazma konsantrasyonu ise  $0.79\pm 0.36$  mg/l bulunmuştur. Ranelik asidin plazma konsantrasyonunda dalgalanma minimal düzeydedir. Total klirensin (12 ml/dk) %57'sini SR'nin klirensi (7.6 ml/dk) oluştururken ranelik asidin renal klirensi (62 ml/dk) total klirensin (78 ml/dk) %80'ini oluşturmaktadır. Bu da ranelik asit'in özellikle böbrekler yoluyla atıldığıının bir göstergesidir. Postmenopozal kadınlarda stronsiyumun yarı ömrü  $6.3\pm 2.7$  gün olarak, ranelik asidin yarı ömrü de  $3.3\pm 2.3$  gün olarak bulunmuştur. Alınan doza bağlı olmakla beraber stronsiyum ranelatin postmenopozal kadınlar tarafından kronik alımı stronsiyumun kemiklere katılımına neden olur. Stronsiyum 3-24 ay gibi bir sürede plazma konsantrasyonunda stabil bir hale geçer. SR'nin vücuttan atılımı gastrointestinal sistem ve böbrekler yolu ile olur. Tedavi bitimini takiben hızlı bir şekilde kemikten atılım başlar. Tedavi bitiminden sonra 6 hafta içinde kemikteki stronsiyum oranı %50 azalır, tam arınma periyodu ise 3 yılı bulur (6).

### **2.9.5. Stronsiyum Ranelatin Yan Etkileri**

SR'nin yapılan klinik çalışmalar sırasında en sık görülen yan etkileri baş ağrısı, diyare, bulantı ve cilt irritasyonu olarak sayılabilir. Bu etkiler hastanın tedavisini sonlandırmasını gerektirmemekle birlikte hafif ve kısa sürelidir. Daha az görülen yan etkiler olarak hafıza sorunları, baygınlık ve çok nadir olarak da nöbetler sıralanabilir. Plasebo kontrollü çalışmalarda venöz tromboemboli görülme sıklığında yükselme görülmüştür ve bunun nedeni tam olarak bulunamamıştır. Bu yüzden daha önce venöz tromboemboli öyküsü olan ve yüksek riske sahip olan hastalarda kullanılmamalıdır (6).

SR'nin kardiyovasküler kalp hastalıkları riskini arttırabileceği belirtilmiş olsa da böyle bir ilişkinin olmadığını belirten çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Bunun dışında iskemik kalp hastalığı, periferik vasküler hastalık, serebrovasküler hastalık, kontrolsüz hipertansiyon durumlarında ve akut miyokard infarktüs riski taşıyan hastalarda SR'nin kullanılmaması gerektiği belirtilmiştir. 2015'te yapılan klinik bir çalışmada postmenopozal kadınlar 2 gruba ayrılmıştır. Çalışma grubundaki hastalara 1 yıl süreyle günlük olarak 2 gr SR oral yolla kullanılmıştır. Çalışmanın başlangıcında 3., 6. ve 12. ayında 2 grup arasında kardiyovasküler risk faktörleri açısından değerlendirilmiştir. Gruplar arasında herhangi bir fark görülmediği rapor edilmiştir. Daha önce SR'nin kullanımı ile arttığı belirtilen venöz tromboemboli ve miyokard infarktüs riskinin ise diğer faktörlerle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (55).

### 3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2013-92 no'lu proje ile desteklendi. Çalışmamızın deney kısmı için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2014/A-21 sayılı karar ile onay alındı.

Çalışmada ortalama 200-250 gram ağırlığında, 40 adet Wistar Albino türü dişi rat kullanıldı. Ratlar operasyondan sonra 20-24°C sıcaklık, % 30-40 nem oranı ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlıkta bırakılarak ve sıkıştırılmış pelit yemi ile beslenerek 2 ay bakıldı.

Çalışmamıza başlamadan önce hayvanlar uzman bir veteriner tarafından incelenmiş ve genel sağlık durumlarının iyi olduğuna dair onay alınmıştır. Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi. Cerrahi işlem sonrası denekler her grup için ayrılmış olan özel bakım kutularına alındı. Uzman veteriner gözetiminde, filtrelenmiş havalandırılması olan odalarında takipleri yapıldı.

Çalışmamız sonunda hayvanlardan elde edilen örneklerin histolojik ve histomorfometrik incelemesi İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Bulgularının istatistiksel değerlendirmesi İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapılmıştır.

#### 3.1. Çalışma Grupları

Çalışmada toplam 40 adet Wistar Albino cinsi dişi rat kullanıldı ve her grupta 8 rat olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Her bir ratın kalvaryumunda paryetal kemiğe unilateral olarak 5 mm çapında defekt açıldı. Toplamda her grupta 8 olmak üzere 40 defekt oluşturulmuş oldu.

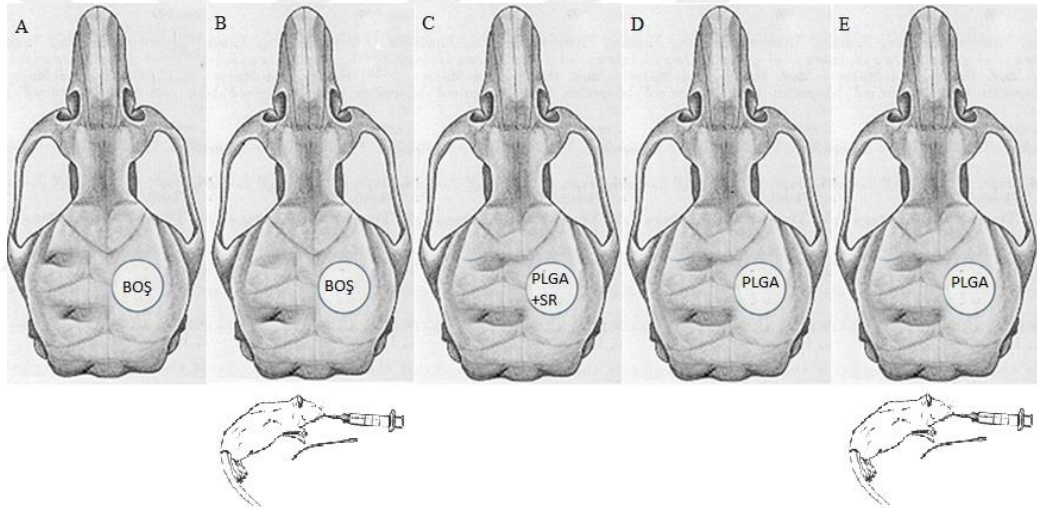
İlk grupta (A), rat kalvaryumuna açılan defekt boş kalmıştır. Hayvanlar 2 ay süresince normal olarak beslenmiş daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

2. grupta (B), rat kalvaryumuna açılan defekt boş kalmıştır. Hayvanlar 2 ay süresince gavajla günlük 625mg/kg stronsiyum ranelat (Protelos 2g-Servier) ile beslenmiş, daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

3. grupta (C), rat kalvaryumuna açılan defekte içine strontium ranelat yüklenen PLGA materyalleri konmuştur. Gruptaki hayvanlar 2 ay süresince normal olarak beslenmiş daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

4. grupta (D), rat kalvaryumuna açılan defekte boş PLGA materyali konmuştur. Gruptaki hayvanlar 2 ay süresince normal olarak beslenmiş daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

5. grupta (E), rat kalvaryumuna açılan defekte boş PLGA materyali konmuştur. Gruptaki hayvanlar 2 ay süresince gavajla günlük 625mg/kg stronsiyum ranelat (Protelos 2g-Servier) ile normal olarak beslenmiş daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Çalışma grupları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışma grupları

### 3.2. Strontium Ranelat Salımlı PLGA Partikülleri Üretim Tekniği

#### 3.2.1. Materyal

PLGA, polivinil alkol (PVA) Sigma (USA)’dan, SR, FARGEM (NOBEL İlaç San. ve Tic. A.Ş. Düzce, Türkiye) ‘den temin edilmiştir.

#### 3.2.2. Metot

##### 3.2.2.1. Mikrokürelerin Hazırlanması

Mikroküreler emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (108, 109) . Polimer olarak PLGA kullanılmıştır. Sulu faz % 0,4’lük PVA

çözeltilisi ve stronsiyum ranelat organik faz ise PLGA'nın diklorometan: metanol (9:1) karışımı içinde çözünmesinden oluşmaktadır. Organik faz, sulu faza 0.5 mL/dakika hızda ilave edilirken 13.500 rpm'de homojenizatör (Ultraturrax®) kullanılarak karıştırılmıştır. Ardından 100 mL distile su bu karışıma eklenmiş ve 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda organik solvenin uçması sağlanmıştır. Elde edilen mikroküre süspansiyonu 4°C'de 30 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edilerek üstteki berrak kısım (süpernatant) dan etkin madde miktarı tayini yapılmıştır. Daha sonra mikroküreler liyofilize edilerek toz halde elde edilmiştir.

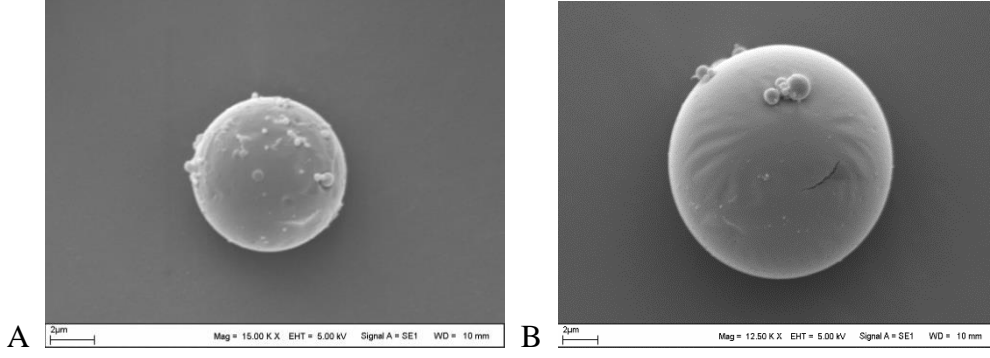
### 3.2.2.2 Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Nano-ZS (Malvern Zeta-sizer, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. (Tablo 3.1). İlaç yüklü ve boş mikrokürelerin yüzey özellikleri "Carl Zeiss AG - EVO® 40" (Zeiss, Almanya) taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir (Şekil 3.2). SR'ın enkapsülasyon etkinliği (EE) üstteki berrak kısımdan UV spektrofotometresi kullanılarak belirlenmiştir (Eşitlik 1).

$$\text{Eşitlik 1. \%EE} = 100 \times \frac{[(\text{SR}'\text{nin teorik miktarı}) - (\text{Süpernatanttaki serbest SR miktarı})]}{(\text{SR}'\text{nin teorik miktarı})}$$

Tablo 3.1. Boş ve ilaç yüklü mikrokürelere ait karakterizasyon parametreleri (n=3).

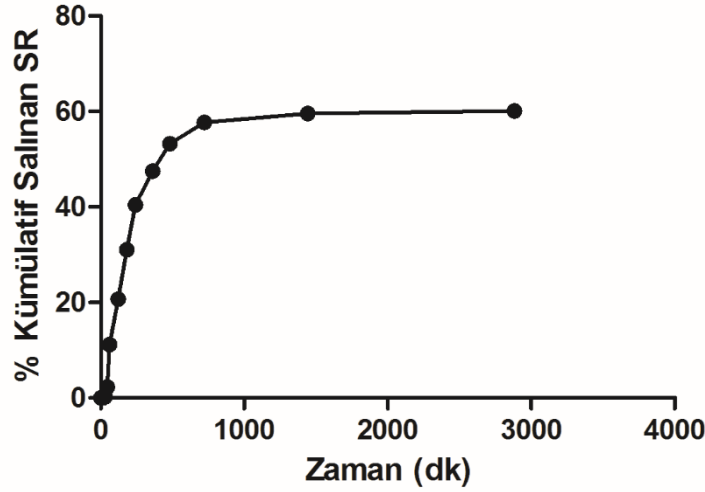
Materyal	Partikül Boyutu Ort.±SS (µm)	Zeta Potansiyel Ort.±SS (mV)	PDI	% EE±SS
Boş Mikroküreler	1703±220	-9.01±7.02	0,763	-
İlaç yüklü Mikroküreler	2103±860	-14.8±5.97	1,000	42.8±2.65



Şekil 3.2. Hazırlanan mikrokürelere ait SEM fotoğrafları. (A: boş mikrokürelere, B: İlaç yüklü mikrokürelere).

### 3.2.2.3. Stronsiyum Ranelat Yüklene Kürelerin İn Vitro Salım Çalışmaları

Stronsiyum ranelat'ın mikrokürelere salım çalışmaları, pH 7.4 fosfat tamponu kullanılarak 37°C'de 48 saat boyunca gerçekleştirilmiştir (110). Belirlenen zaman aralıklarında (15., 30., 45. dakikalarda, 1., 2., 3., 4., 6., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde) örnekler alınmış ve ortam hacminin değişmemesi için örnek hacmi kadar sıcaklığı 37°C'ye getirilmiş fosfat tamponu ilave edilmiştir. Numuneler 305 nm'de UV spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Mikrokürelere SR salım oranı 48 saatin sonunda % 60,1 olarak bulunmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Hazırlanan mikrokürelere SR'ın pH 7.4 fosfat tamponundan in-vitro salım profili (n=3).

### 3.3 Gavajla Beslenen Hayvanlara İlacın Hazırlanması

Gavajla beslenecek hayvanlara çözelti hazırlanırken 32 ml çeşme suyunun içinde 2 gr (Protelos 2g-Servier) katılıp karıştırılmıştır. Böylece her 2 ml'lik çözelti içinde 125 mg ilaç bulunmaktadır. Gavajla beslenen gruplarda hayvanlar günlük ortalama 2ml'lik karışımla beslenmişlerdir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İlaç ve karışımın görüntüsü

### 3.4. Cerrahi Teknik

Çalışmadaki Wistar albino cinsi ratlar ortalama 150-200 gr ağırlığındaydı. İşlem öncesinde asepsi ve antisepsi kurallarına uyularak deneklerin tümüne anestezi için intramüsküler yolla Ketamin Hidroklorür (Ketamidor-Richte Pharma) 50 mg/kg ve Xylazine (Rompun-Bayer) 5 mg/kg enjeksiyonu yapıldı (Şekil 3.5). Cerrahi işlemler steril cerrahi koşullar altında asepsi, antisepsi ve sterilizasyon kurallarına uyularak gerçekleştirildi. Cerrahi işlem öncesinde rat kafa derisi traş edilip, povidon iyot (Batticon standart solüsyon, Adeka, Türkiye) çözeltisi ile temizlendi (Şekil 3.6 ). Operasyon sahası açıkta kalacak şekilde steril örtüler ile örtüldü (Şekil 3.7). Rat kalvaryumunda orta hat boyunca paryetal bölgeyi açığa çıkaracak şekilde 15 no'lu bistüri ile antero-posterior insizyon yapıldı ve tam kalınlık flep kaldırıldı. Defekt oluşturulacak alana ulaşıldı. Ekartörler kullanılarak cerrahi alanda yeterli görüş sahası oluşturuldu (Şekil 3.8 -3.9).

Dış çapı 5 mm olan trefin frez yardımıyla ve serum fizyolojik yıkaması altında hayvanın sağ paryetal kemiğine defekt açıldı (Şekil 3.10-3.11 ). Defekt oluşturulurken 'dura mater'e zarar vermemek için azami dikkat gösterildi. Her denekte unilateral olarak defekt açılıp, ameliyat sahasında artıkların uzaklaştırılması için iyice irrigasyon edildi.

Paryetal kemikten çıkartılan kemik parçasının görüntüsü (Şekil 3.12 ). Boş kaplara yerleştirilen materyaller (Şekil 3.13) bir küret yardımıyla (Şekil 3.14) açılan paryetal defektlere yerleştirildi. Boş PLGA partikülleri bir grupta açılan defektlere, strontium ranelat içeren PLGA partikülleri diğer grupta açılan defektlere yerleştirildi (Şekil 3.15 -3.16). Kaldırılan flep repoze edilip 3-0 eriyebilen sütür ile sütüre edildi (Şekil 3.17). Gavaj yöntemiyle, ratlar için günlük 625mg/kg strontium ranelat ilacıyla



beslenen grupta ortalama 200 gr olan hayvanlar, her 2 ml'lik çözelti içinde 125 mg ilaç bulunan çözeltiden her gün 2 ml içirilerek beslendi (Şekil 3.18). Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra ratlar gruplarına ait şeffaf takip kutularına alındı ve olağan bakım şartlarında takip edildi. 8 haftalık bir takibin ardından denekler yüksek doz Ketamin HCL (Alfamine®) enjeksiyonu ile sakrifiye edildiler. İncelenecek defekt alanından yaklaşık 5 mm uzaklıktan geçecek şekilde kafatası kemiği frezler yardımıyla kesilerek numuneler alındı.

Daha sonra histomorfometrik incelemeler için histoloji laboratuvarına teslim edildiler.



Şekil 3.5. Ratlara anestezi yapılırken



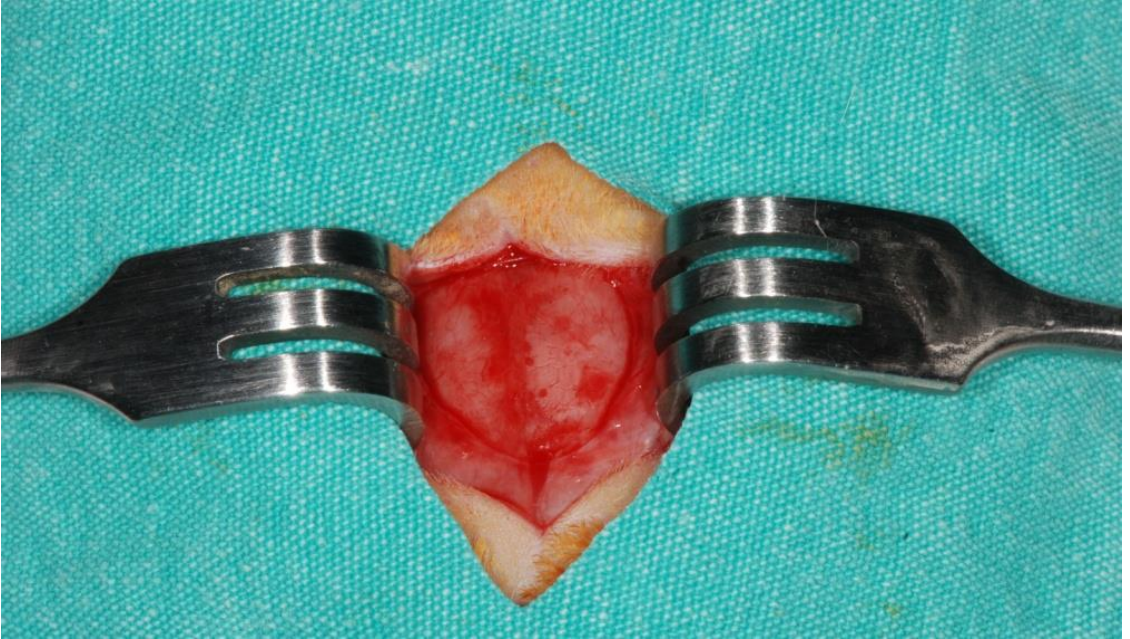
Şekil 3.6. Rat kafa derisi traş edilip povidin iyot çözeltisi ile silindikten sonraki görüntü



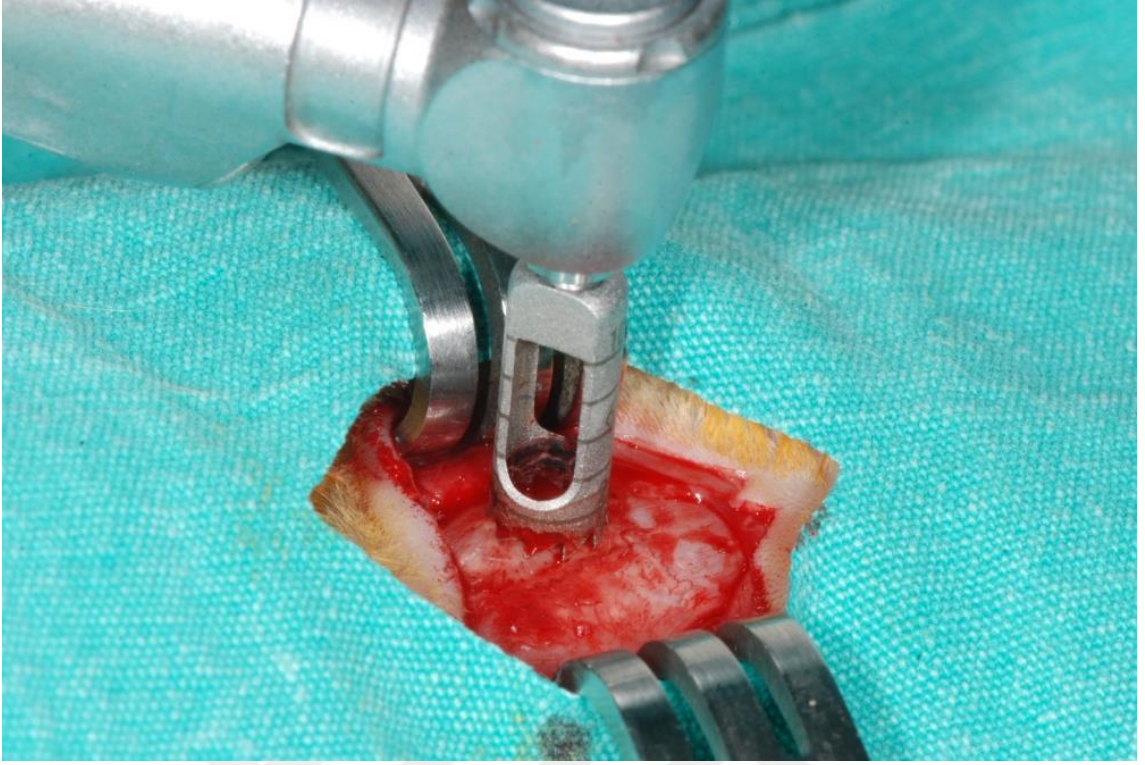
Şekil 3.7. Cerrahi sahanın steril olarak örtülmesi



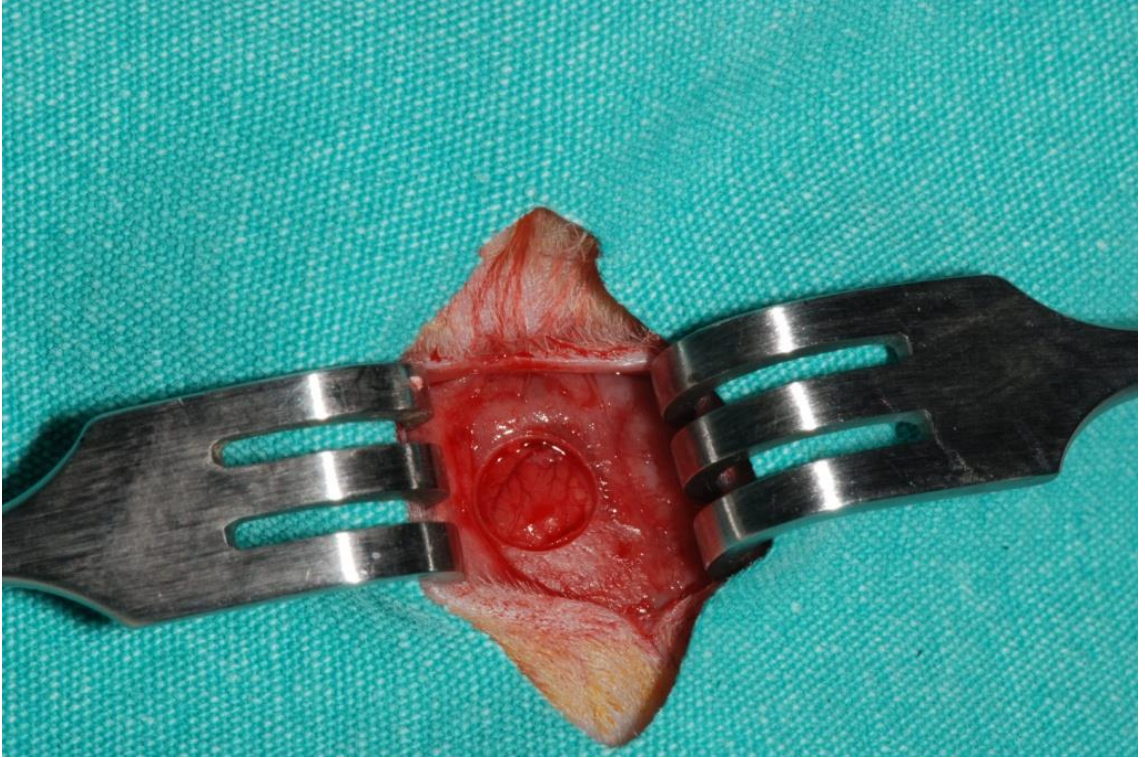
Şekil 3.8. Kafa derisi insizyonu



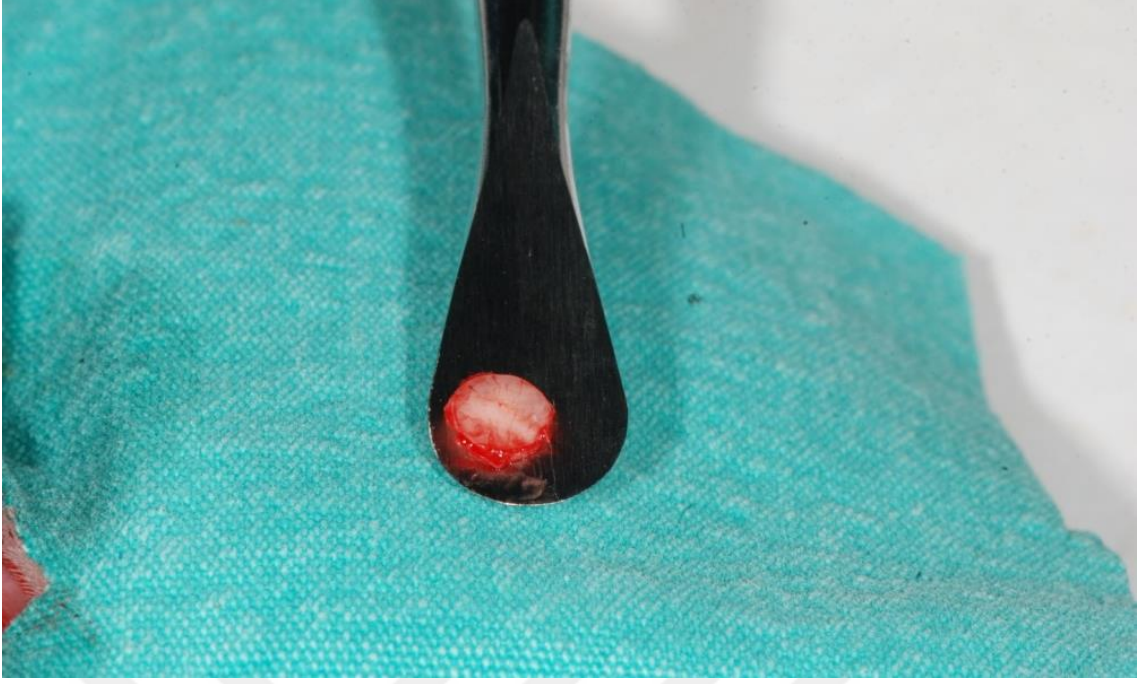
Şekil 3.9. Rat pariyetal kemiğinin görüntüsü



Şekil 3.10. Trefin frez yardımıyla defektin açılması



Şekil 3.11. Defektlerin trefin frez yardımıyla oluşturulduktan sonra cerrahi sahanın görüntüsü.



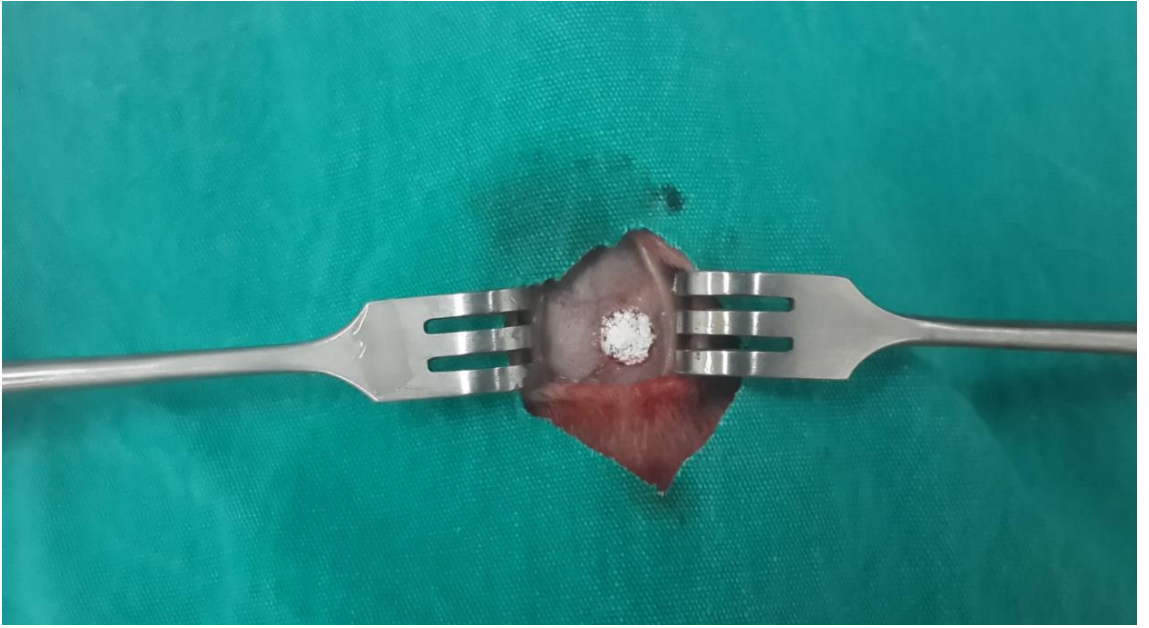
Şekil 3.12. Kafadan çıkarılan kemik parçası.



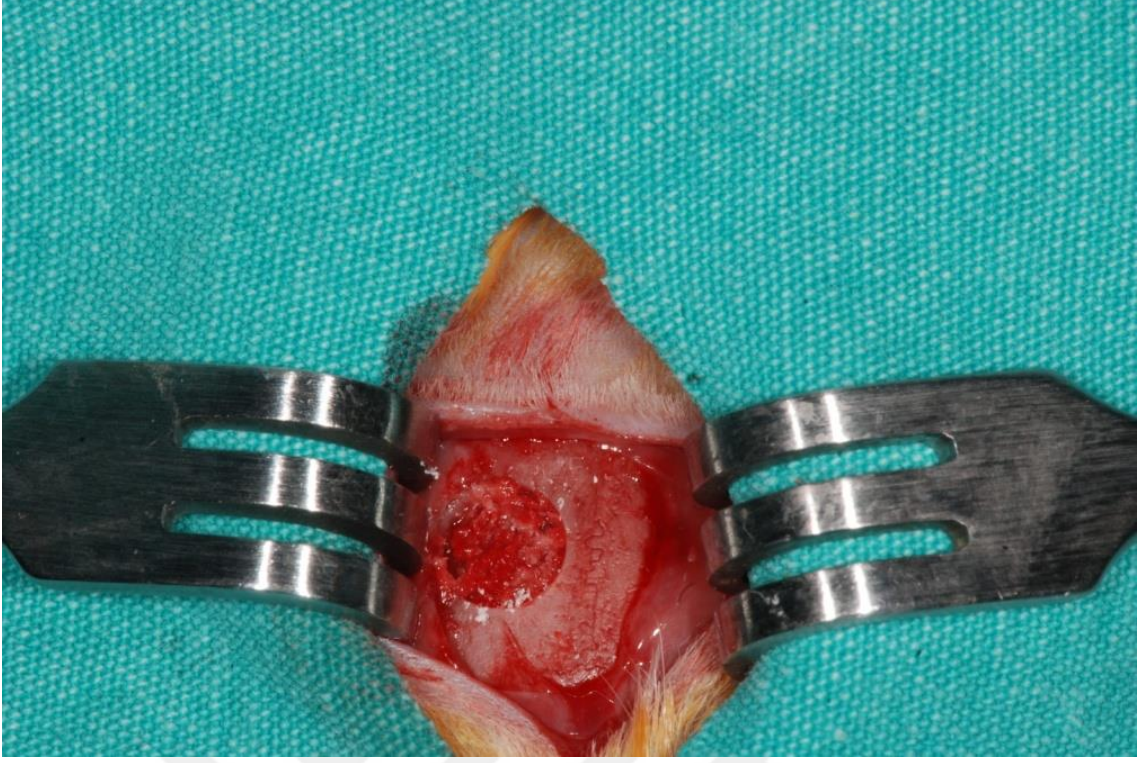
Şekil 3.13. Strontium ranelat salımlı PLGA partikülleri



Şekil 3.14. Küret yardımıyla partiküllerin taşınması



Şekil 3.15. PLGA partiküllerinin defekt alanına yerleştirildikten sonraki görüntüsü.



Şekil 3.16. Strontium ranelat içeren PLGA partiküllerin defekt alanına yerleştirildikten sonra alınan görüntü



Şekil 3.17. Cerrahi işlem tamamlandıktan sonra flebin dikişli görüntüsü



Şekil 3.18. Hayvanların gavajla beslenme görüntüsü

### 3.5. Histolojik ve Histomorfometrik İnceleme

Kalvaryal kemik doku örnekleri nötral tamponlu %10 formaldehit ile üç gün süresince oda ısısında tespit edildi. Tespit işlemini takiben gün aşırı değiştirilerek yenilenen % 10'luk formik asit içerisinde 6 gün süresince dekalsifikasyon işlemine tabi tutuldu. Dekalsifikasyon süreci tamamlanan kemik doku örnekleri akan çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra doku örnekleri artan derecelerde etil alkol serisinde (%70, %96 ve %99) dehidratasyon, ksilen serisinde şeffaflandırma ve 62 °C de erimiş parafin serisinde infiltrasyon işlemlerinden geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile 6 µm kalınlığındaki kesitler alınarak lamalar üzerine yerleştirildi. Hazırlanan kemik doku kesitlere Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Gomori'nin trikrom boyamaları uygulandı (70). Boyanmış olan kemik doku kesitleri Leica DFC280 ışık mikroskobunda incelenerek Leica Q Win Plus V3 görüntü analiz sisteminde (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) fotoğraflar alındı. Kesitlerdeki total doku alanı ve bu total doku alanı içindeki kemik doku alanları ölçümleri yapıldı. Her bir örnek için kemik doku indeksi (total kemik doku alanı/toplam doku alanı) belirlendi.

$$\text{YENİ OLUŞAN KEMİK ORANI} = \frac{\text{DEFEKT ALANI İÇİNDEKİ YENİ KEMİK DOKU ALANI}}{\text{TOPLAM DOKU ALANI}}$$

### 3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Çalışma verileri



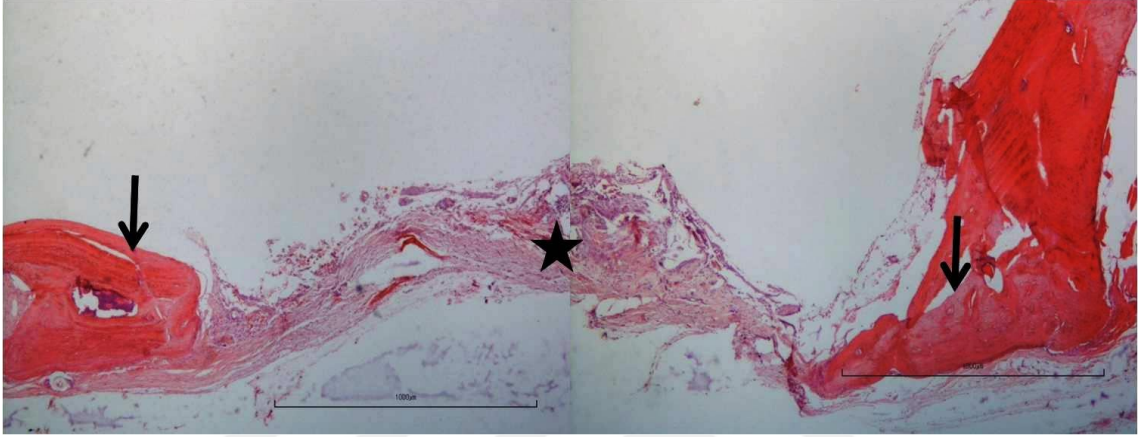
değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılıma uygun olmadığı saptanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.



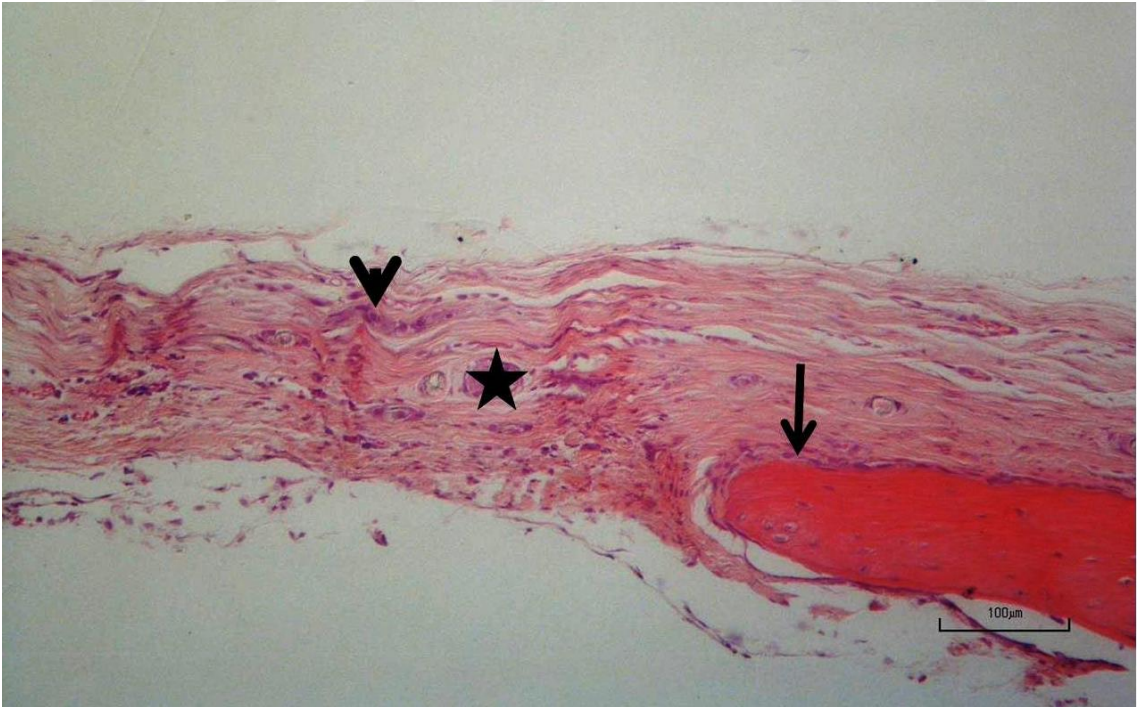
## 4. BULGULAR

### 4.1. Histolojik ve Histomorfometrik Bulgular

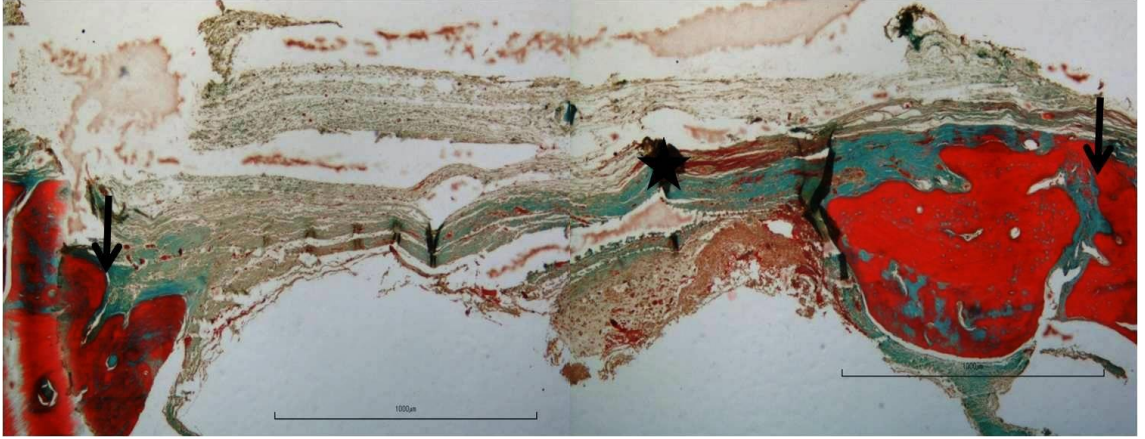
**A1:** İncelenen H-E ile boyanan kesitlerde iki cerrahi uç arasında uzanan alanın fibröz bağ dokusu yapısında olduğu görüldü. Bağ dokusu içinde yer yer küçük osteoblast grupları izlendi (Şekil 4.1, 4.2). Trikrom ile boyanan kesitlerde fibröz bağ dokusu yeşil renkte boyanmıştı, özellikle cerrahi uçlara yakın fibröz bağ dokusu alanlar içinde kırmızı rekte boyanan küçük kalsifikasyon alanları mevcuttu (Şekil 4.3, 4.4).



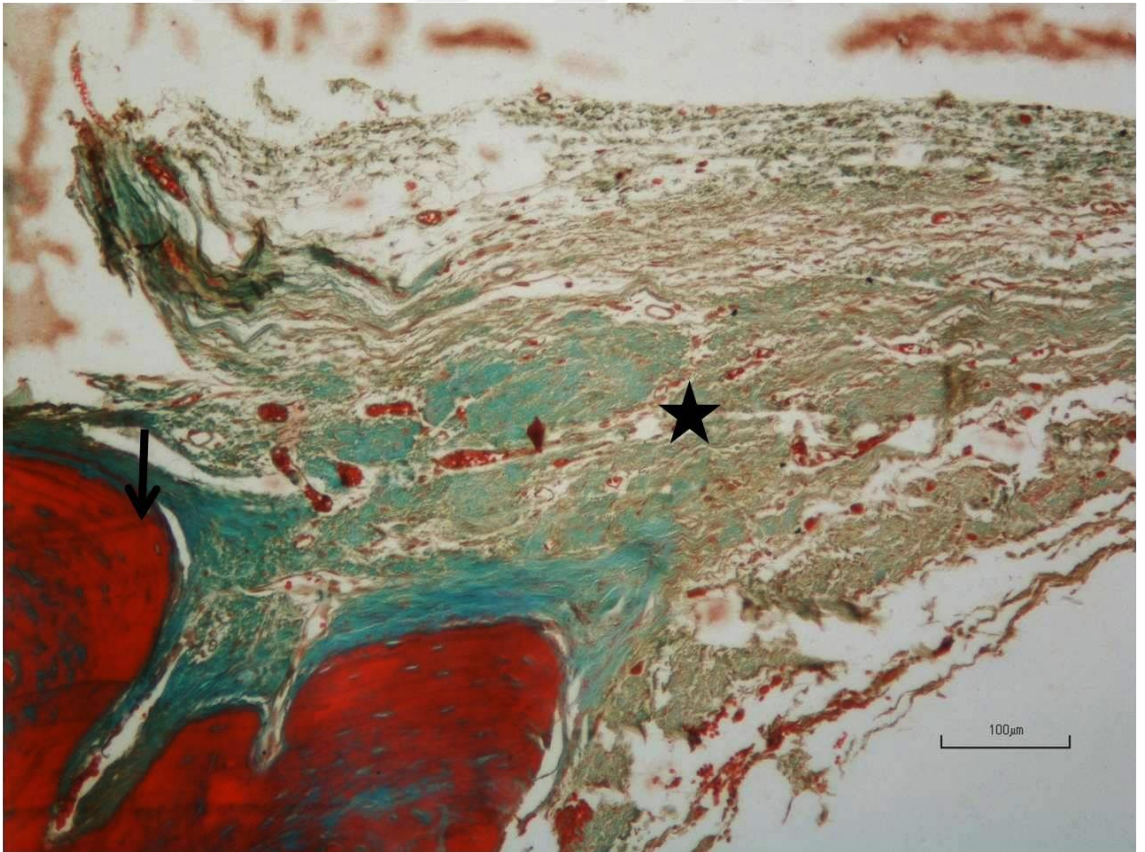
Şekil 4.1. A grubu; Cerrahi uçlar(oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız). H-E, ölçü skalası=100 µm



Şekil 4.2. A grubu; Cerrahi uçta osteokondüktif kemik büyümesi (ok), fibröz bağ dokusu (yıldız), osteoblastik aktivite (ok başı). H-E, ölçü skalası=1000 µm.

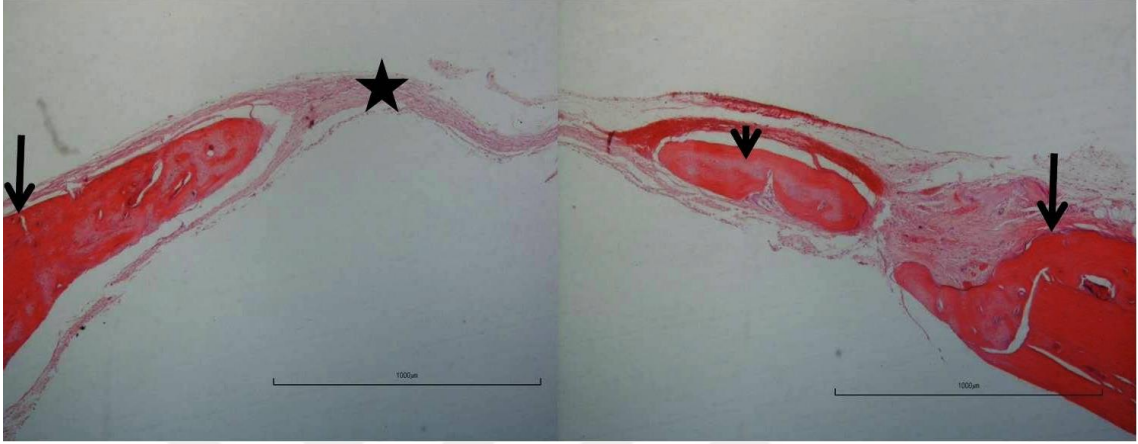


Şekil 4.3. A grubu; Cerrahi uçlar (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), Trikrom, ölçü skalası=1000 µm.

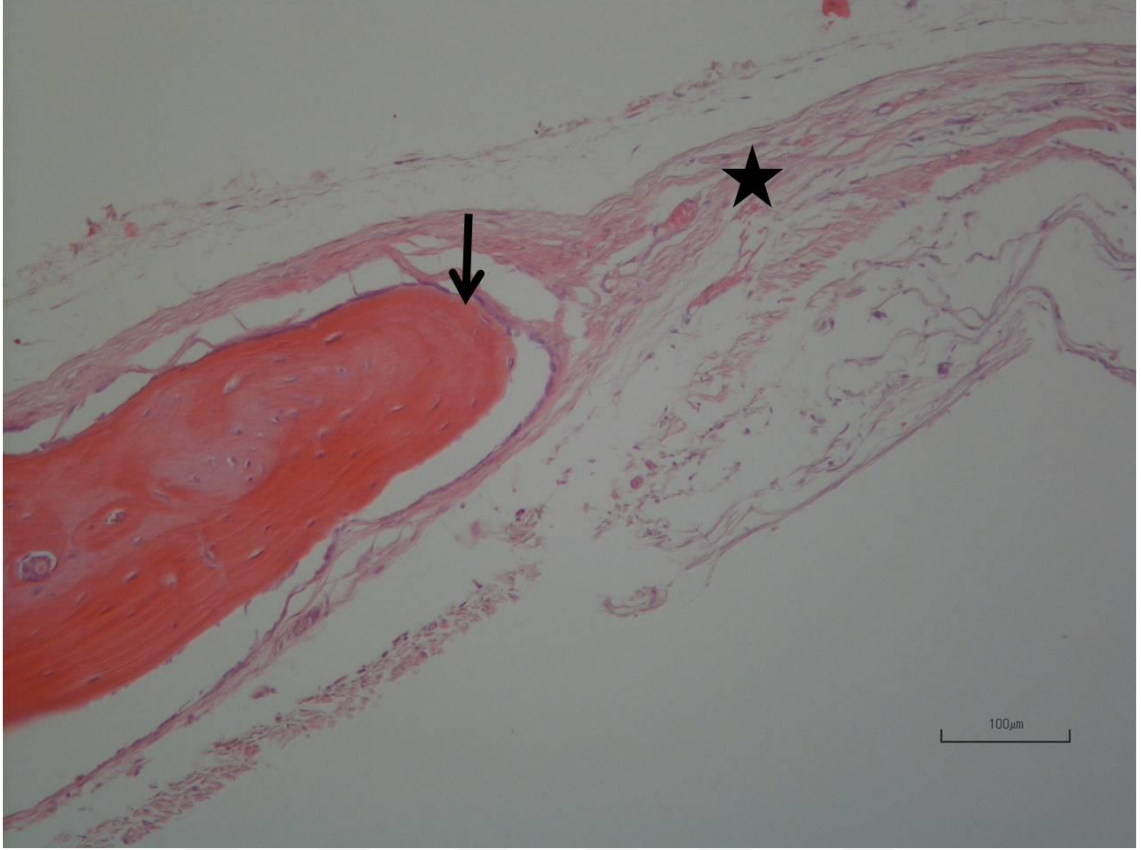


Şekil 4.4. A grubu; Cerrahi uç (ok), fibröz bağ dokusu (yıldız), Trikrom, ölçü skalası=100 µm.

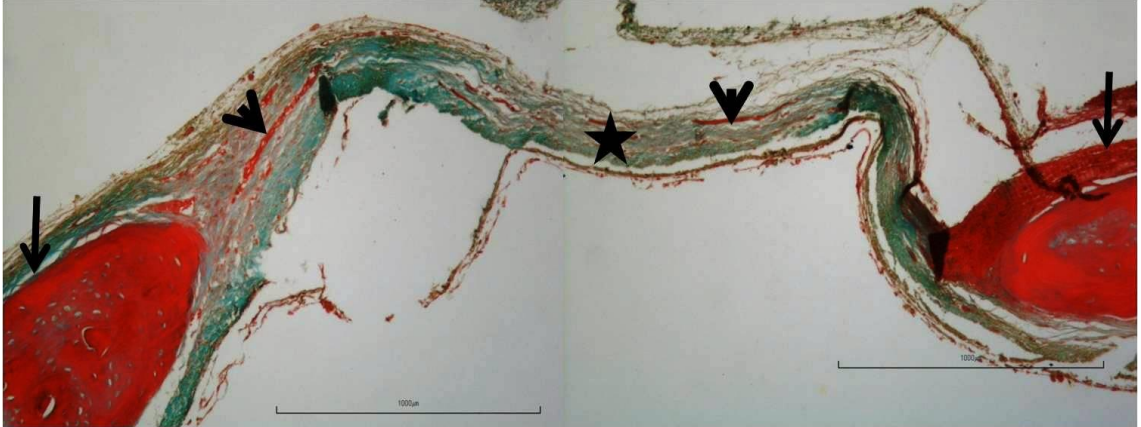
**B:** Hematoksilen-eozin ile boyanan kesitlerde kemik doku cerrahi uçları arasında fibröz bağ dokusu alanların yer aldığı görüldü. Bu bağ dokusu alanlar içinde yer yer cerrahi uçlara yakın bölgelerde, adacıklar şeklinde kalsifiye kemik doku alanlarına rastlandı. Cerrahi uçlardaki kemik dokuda osteokondüktif aktivite ve ince lameller şeklinde uzama izlendi (Şekil 4.5, 4.6). Trikrom ile boyanan kesitlerde yeşil renkte boyanmış fibröz bağ dokusu içinde ince lameller şeklinde kalsifiye kemik doku alanları tespit edildi (Şekil 4.7, 4.8).



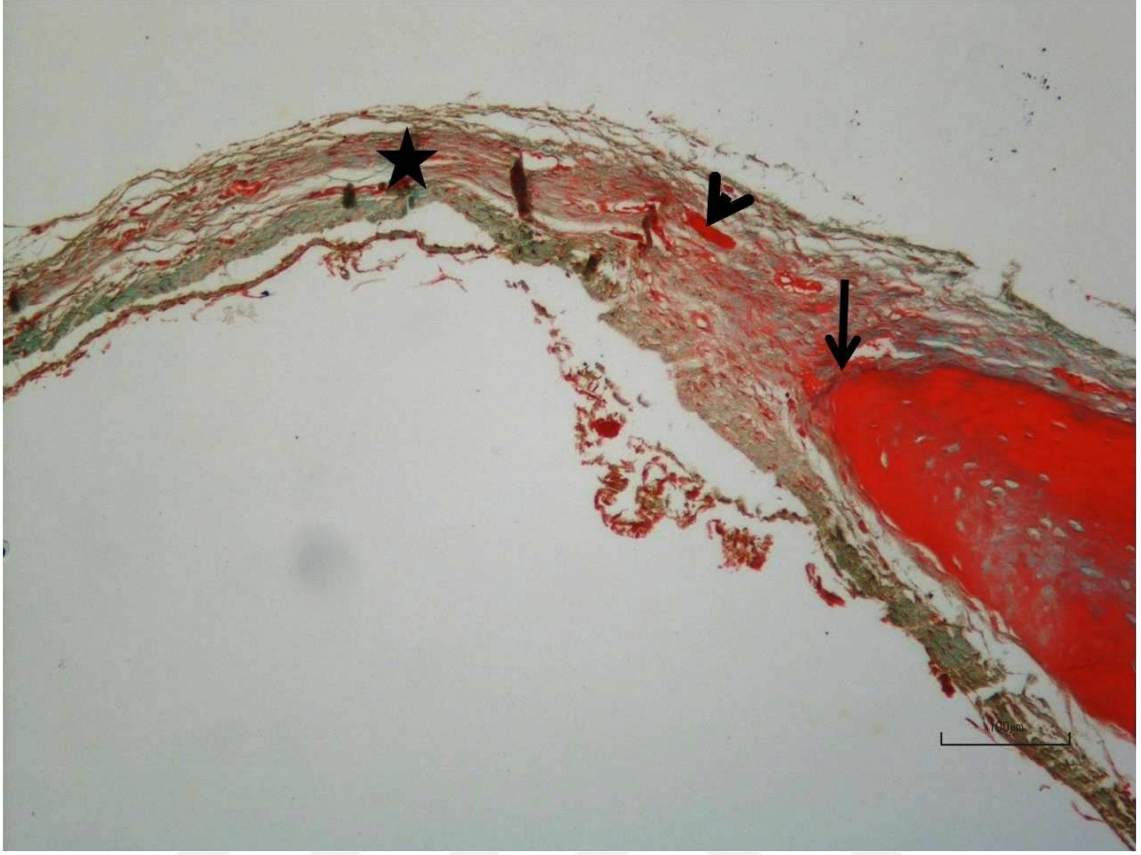
Şekil 4.5. B grubu; Cerrahi uçlar(oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), yeni kemik oluşumu (ok başı). H-E, ölçü skalası=1000



Şekil 4.6. B grubu; Cerrahi uçta osteokondüktif kemik büyümesi (ok), fibröz bağ dokusu (yıldız). H-E, ölçü skalası=100 µm

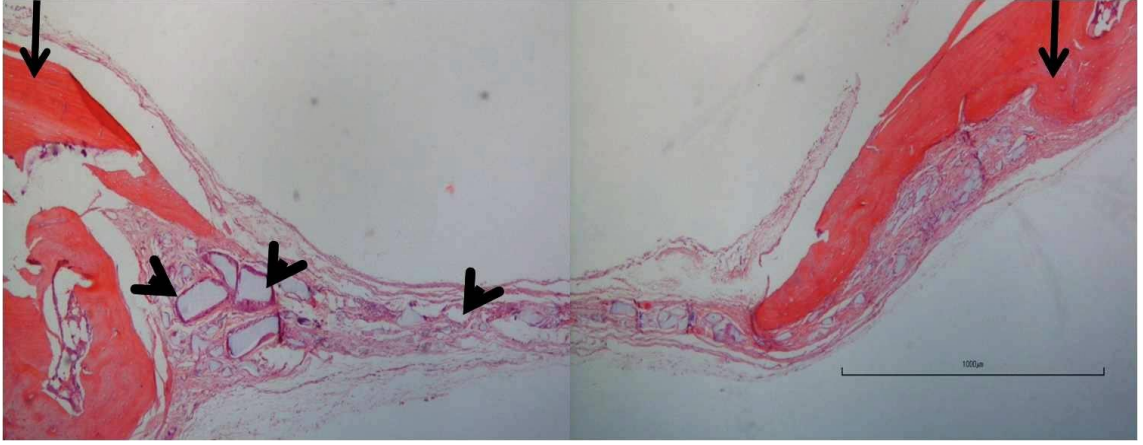


Şekil 4.7. B grubu; Cerrahi uçlar (oklar), fibröz bağ dokusu (yıldız), ince kalsifiye kemik lameller (ok başı). Trikrom, ölçü skalası=1000 µm.



Şekil 4.8. B grubu; Cerrahi uçta osteokonduktif aktivite (ok), kalsifiye kemik lamel (ok başı) fibröz bağ dokusu (yıldız), Trikrom, ölçü skalası=100  $\mu$ m.

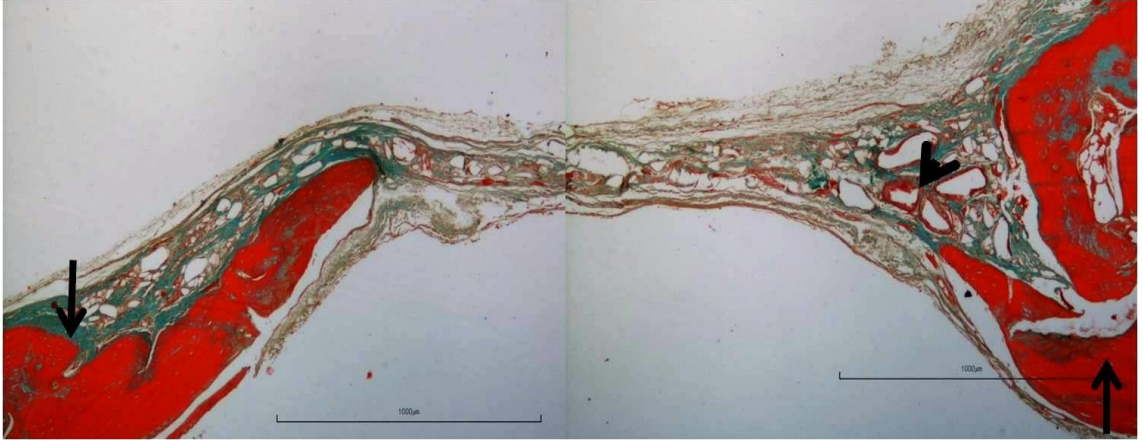
**C:** Hematoksilen-eozin ile boyanan kesitlerde kemik doku cerrahi uçları arasında fibröz bağ dokusu ile bağlamıştı. Bu fibröz bağ dokusu alanlar içinde değişik çaplarda, düzensiz sınırlı boşluklar şeklinde greft alanları izlendi. Bu greft alanları periferinde yoğun osteojenik aktivite ve kalsifikasyon alanları izlendi. Cerrahi uçlara yakın bölgelerde fibröz bağ dokusunun daha kalın, greft alanların daha geniş, osteoblastik ve osteoklastik aktivitenin daha yoğun olduğu tespit edildi. Cerrahi uçlarda kemik dokuda osteokonduktif aktivite ve kemik doku uç bölgelerinde belirgin uzama tespit edildi. (Şekil 4.9, 4.10 ). Trikrom boyanan kesitlerde fibröz bağ dokusu yeşil, greft alanları çevresindeki osteoblastik ve osteoklastik aktivite alanları kırmızı renkte izlendi. Fibröz bağ dokusu içinde yer yer ince, küçük lameller şeklinde kalsifiye kemik doku olduğu görüldü (Şekil 4.11, 4.12).



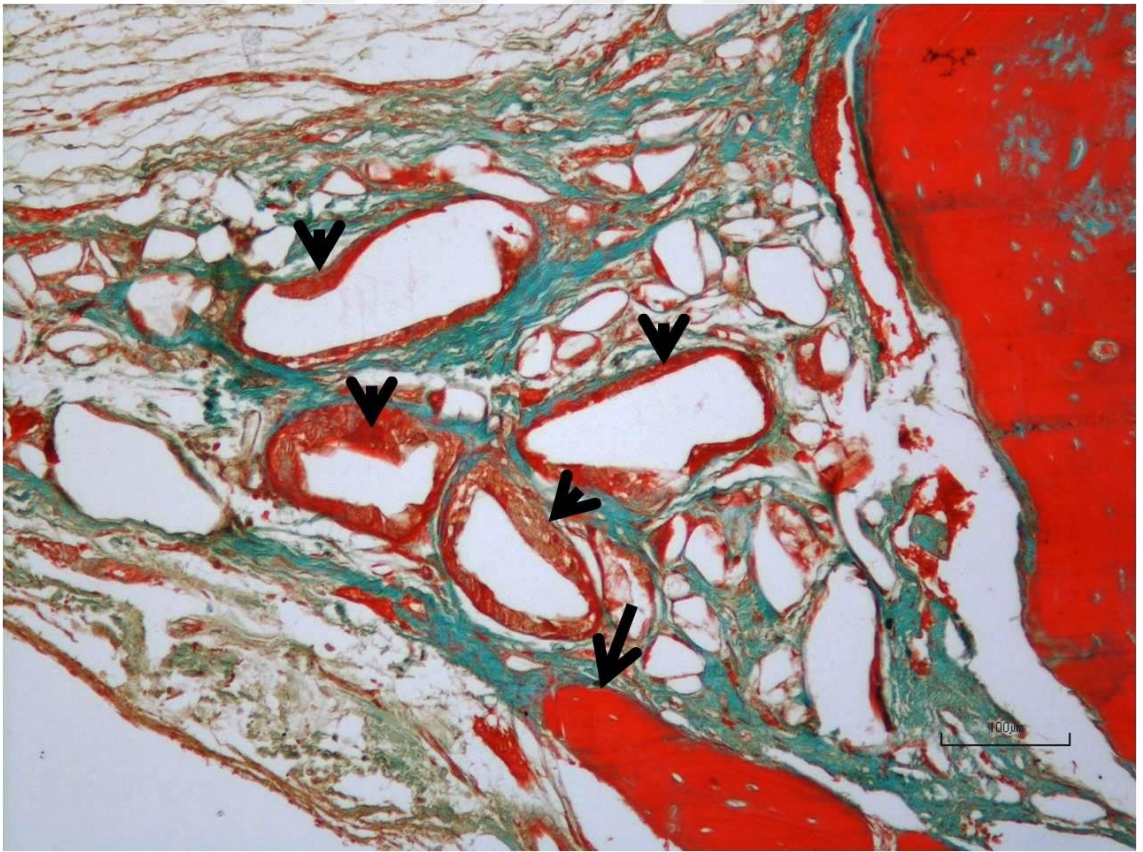
Şekil 4.9. C grubu; Cerrahi uçlar (oklar), Salımlı preperat alanları (ok başları). H-E, ölçü skalası=1000 µm.



Şekil 4.10. C grubu; Salımlı preperat alanları çevresinde osteojenik aktivite ve kalsifikasyon (ok başları). H-E, ölçü skalası=100 µm.



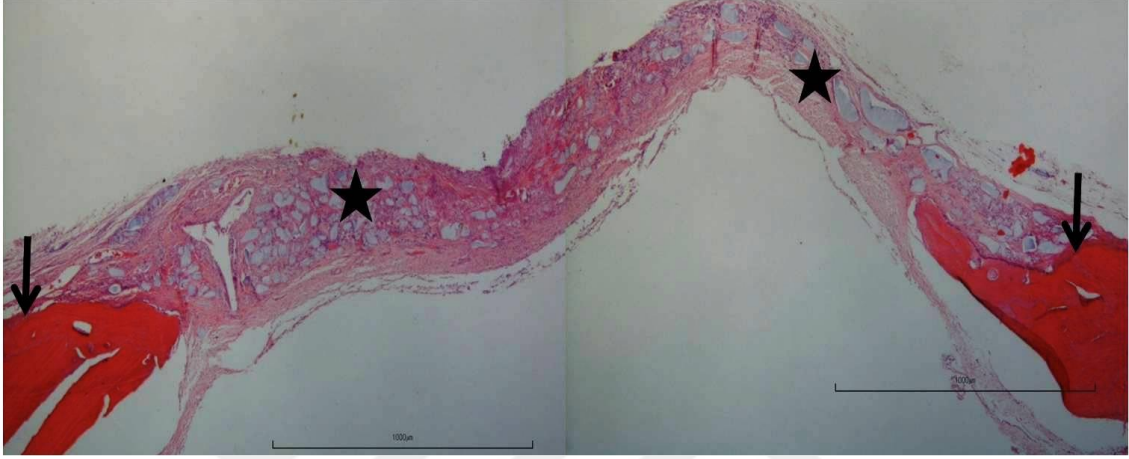
Şekil 4.11. C grubu; Cerrahi uçlar (oklar), Salımlı preparat alanları çevresinde osteojenik aktivite ve kalsifikasyon (ok başı), Trikrom, ölçü skalası=100 µm



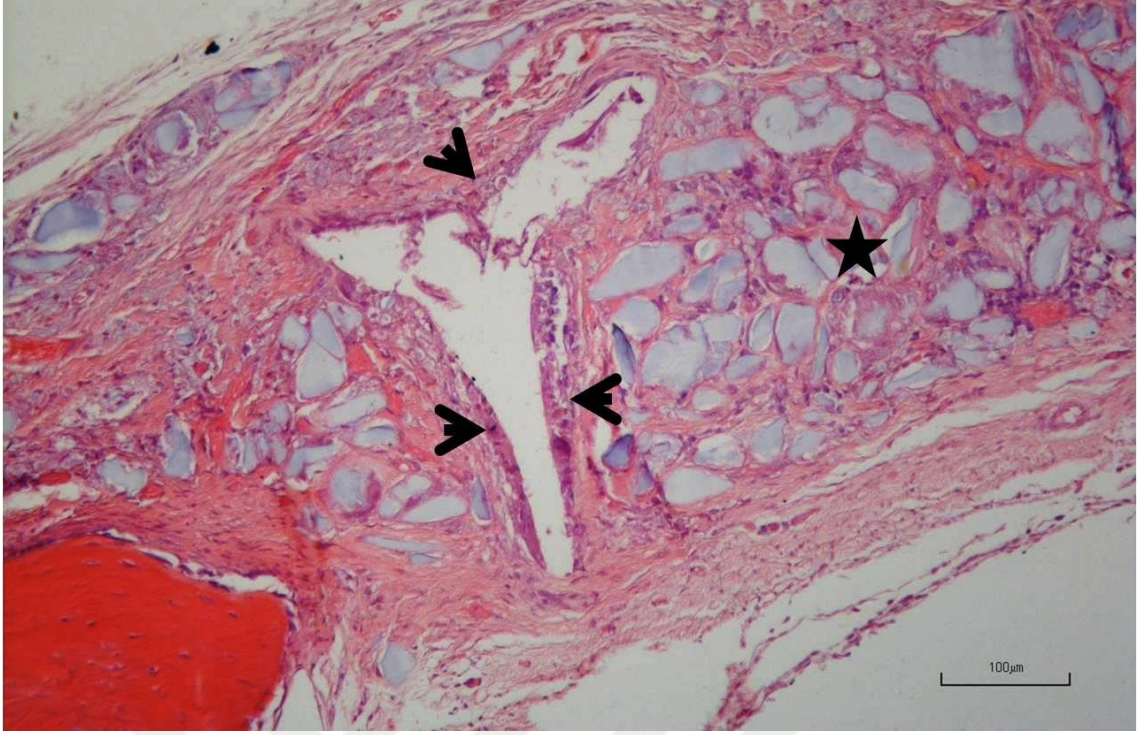
Şekil 4.12. C grubu; Kalsifiye kemik doku (ok), Salımlı preparat alanları çevresinde osteojenik aktivite ve kalsifikasyon (ok başları), Trikrom, ölçü skalası=100 µm.



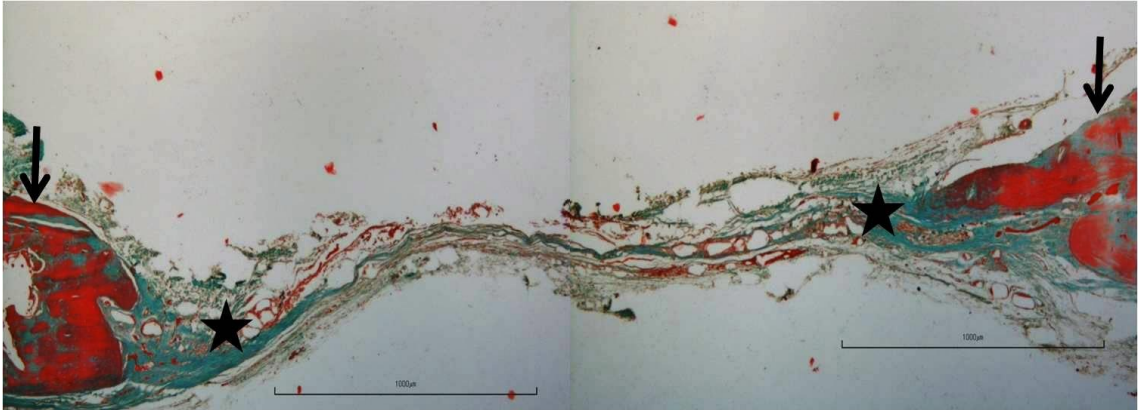
**D:** Hematoksilen-eozin ile boyanan kesitlerde kemik doku cerrahi uçları arasındaki bölge çok sayıda düzensiz şekilli greft materyali alanları içeren fibröz bağ dokusu yapısında izlendi. Greft materyali içeren alanlar aselüler yapıda olup çevre bağ dokusu alanlarda osteoblastik ve yer yer osteoklastik aktivite izlendi (Şekil 4.13, 4.14). Trikrom boyanan kesitlerde fibröz bağ dokusu içinde ince ve küçük lameller şeklinde kalsifiye kemik dokusu mevcuttu. Cerrahi uçlara yakın alanlarda fibröz bağ dokusu daha kalın, merkezi bölgelerde daha ince izlendi. İnce kemik lameller ve kalsifikasyon odakları cerrahi uçlara yakın bölgelerde yoğunlaşmaktaydı (Şekil 4.15, 4.16 ).



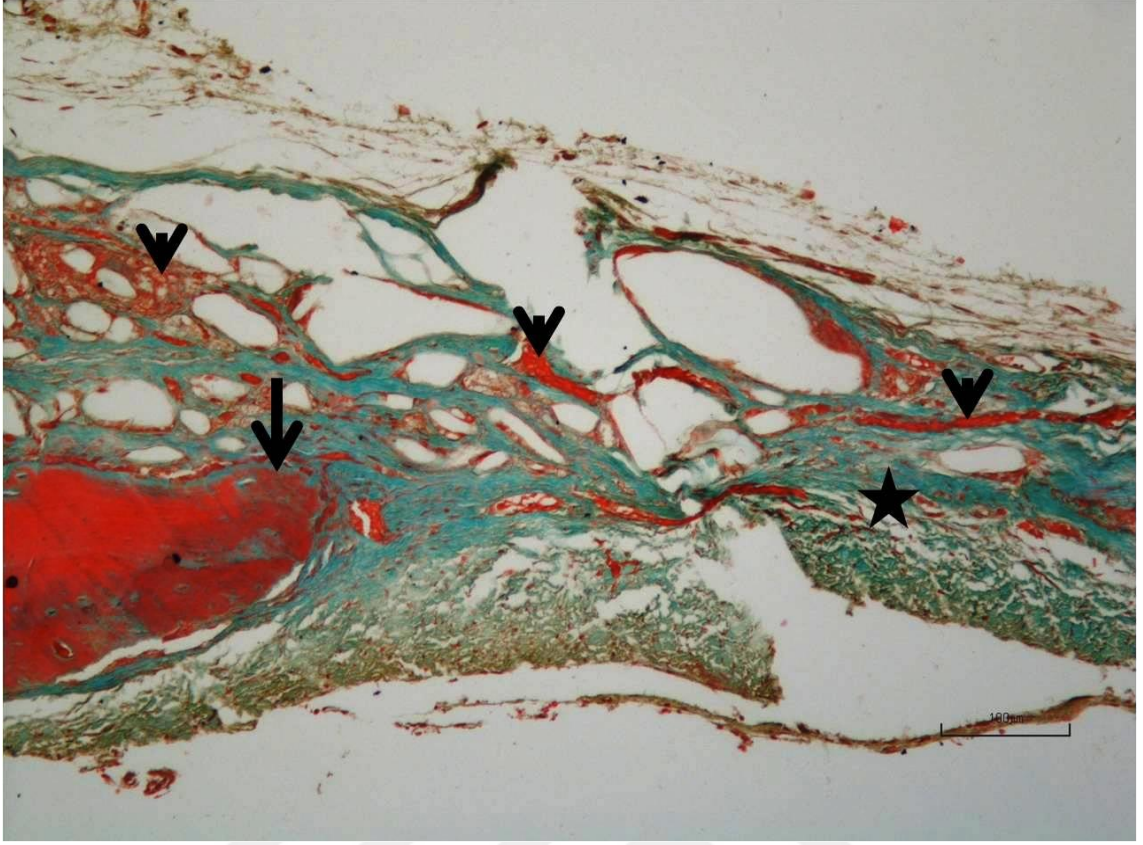
Şekil 4.13. D grubu; Cerrahi uçlar (oklar), fibröz bağ dokusu içinde alanları (yıldız), H-E, ölçü skalası=1000 µm.



Şekil 4.14. D grubu; PLGA alanları çevresinde osteojenik aktivite (ok başları), fibröz bağ dokusu içinde PLGA alanları (yıldız). H-E, ölçü skalası=100 µm.

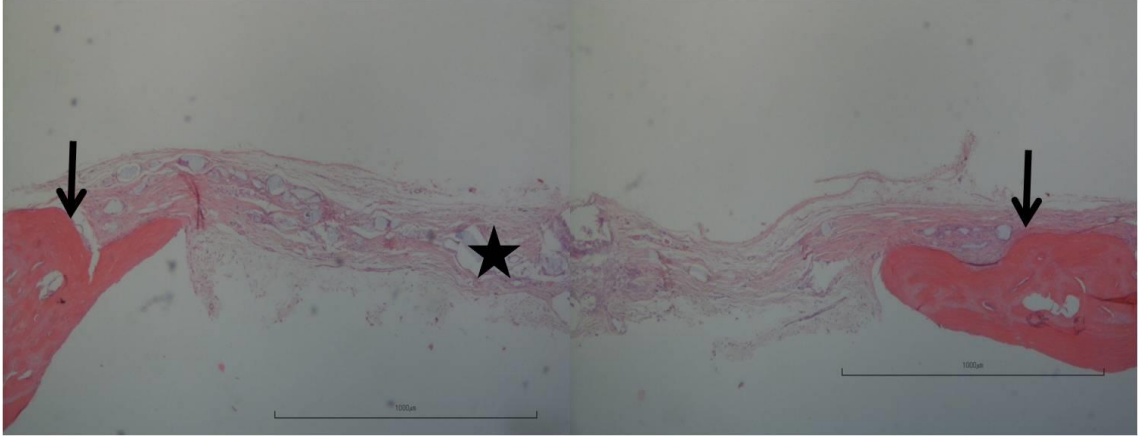


Şekil 4.15. D grubu; Cerrahi uçlar (oklar), Fibröz bağ dokusu (yıldız). Trikróm, ölçü skalası=100 µm.

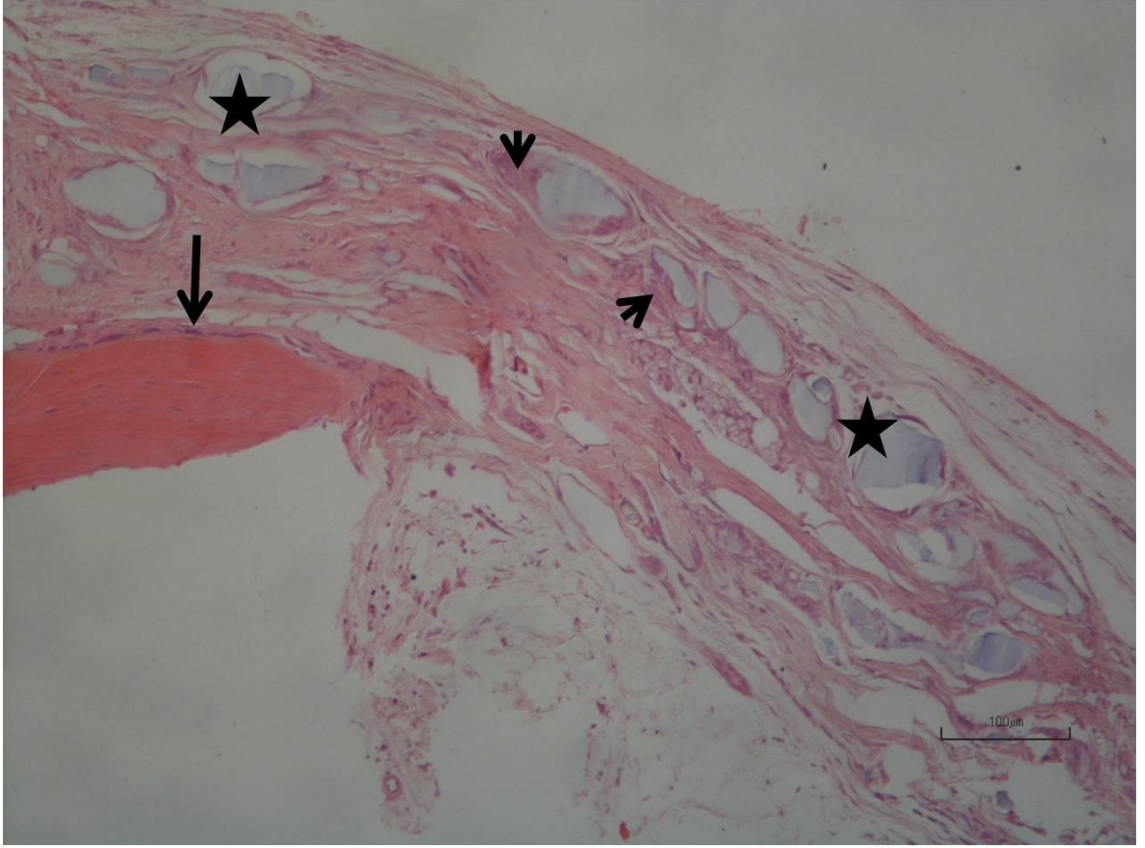


Şekil 4.16. D grubu; Fibröz bağ dokusu (yıldız), Osteokondüktif kemik büyümesi (ok), kalsifiye kemik doku lamelleri (ok başları). Trikróm, ölçü skalası=100 µm

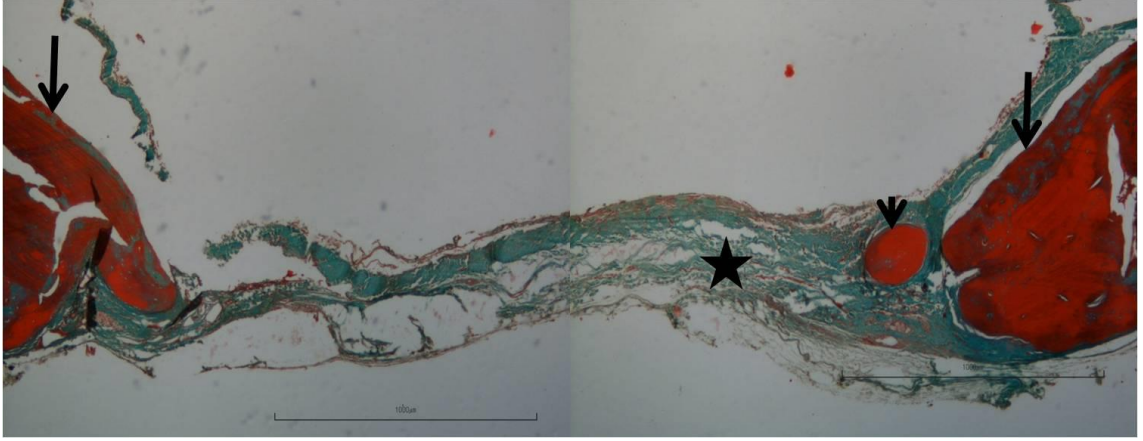
**E:** Hematoksilen-eozin ile boyanan kesitlerde kemik doku cerrahi uçları arasındaki bölge çok sayıda düzensiz şekilli, farklı genişliklerde vakuoler görünümlü, PLGA alanları alanları içeren fibröz bağ dokusu yapısında izlendi. PLGA içeren alanlar aselüler boşluklar şeklinde olup perifer bağ dokusu alanlarda osteoblastik ve yer yer osteoklastik aktivite odakları izlendi (Şekil 4.17, 4.18 ). Trikróm boyanan kesitlerde fibröz bağ dokusu içinde ince lameller şeklinde kalsifiye kemik dokusuna yer yer de cerrahi uçlara yakın bölgelerde adacıklar şeklinde kemik doku oluşumları mevcuttu. Cerrahi uçlara yakın alanlarda osteokondüktif kemik oluşum alanları çevresinde osteoblastlar izlendi (4.19, 4.20).



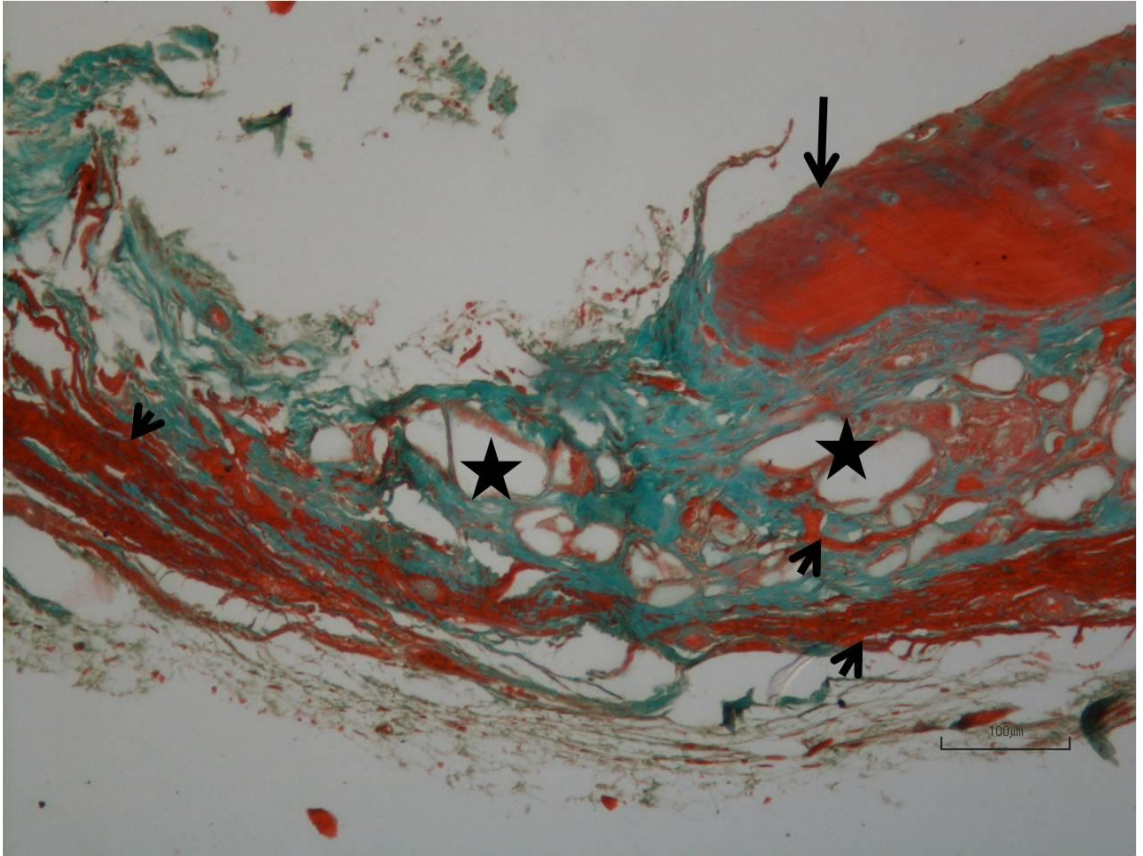
Şekil 4.17. E grubu ;Cerrahi uçlar (oklar), fibröz bağ dokusu içinde PLGA alanları (yıldız). H-E, ölçü skalası=1000 µm.



Şekil 4.18. E grubu ;Cerrahi uçlarda osteokondüktif kemik oluşumu ve osteoblastlar (ok), PLGA alanları çevresinde osteojenik aktivite (ok başları) fibröz bağ dokusu içinde PLGA alanları (yıldız). H-E, ölçü skalası=100 µm.



Şekil 4.19. E grubu; Cerrahi uçlar (oklar), Fibröz bağ dokusu (yıldız), cerrahi uç yakınında yeni kemik oluşumu (ok başı). Trikróm, ölçü skalası=100  $\mu$ m.



Şekil 4.20. E grubu; PLGA alanları(yıldız), Osteokondüktif kemik büyümesi (ok), kalsifiye kemik doku lamelleri (ok başları). Trikróm, ölçü skalası=100  $\mu$ m

## 4.2. Grupların histolojik veriler açısından istatistiksel değerlendirilmesi

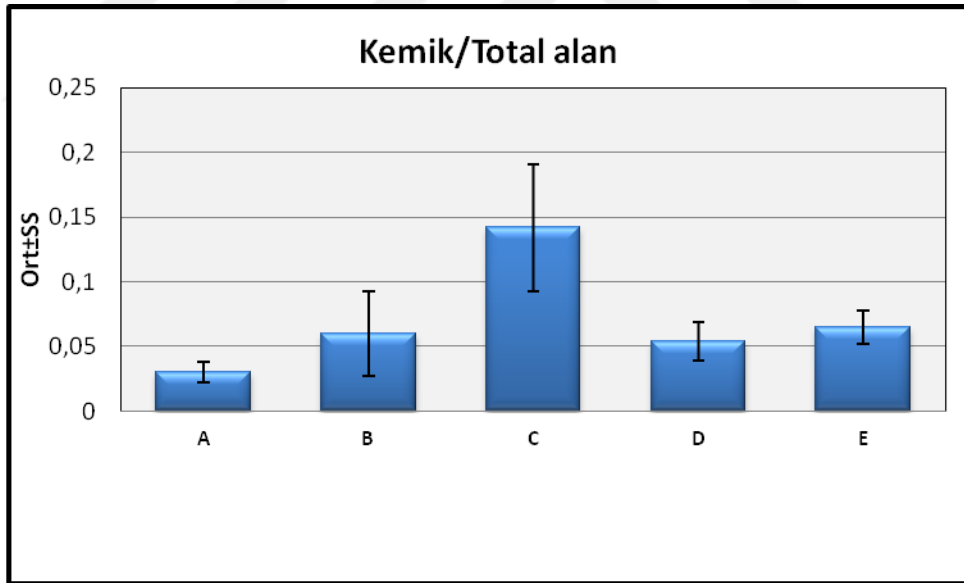
Tablo 4.1. Grupların yeni oluşan kemik/total alan oranı ortalamaları

Yeni oluşan kemik/Total alan	
Ort±SS (medyan)	
<b>A</b>	0,03±0,008 (0,03)
<b>B</b>	0,06±0,033 (0,05)
<b>C</b>	0,142±0,049 (0,14)
<b>D</b>	0,054±0,015 (0,05)
<b>E</b>	0,065±0,013 (0,07)
<b>p</b>	<b>0,001*</b>

Kruskal Wallis Test

\*  $p < 0.05$

Gruplar arasında yeni oluşan kemik/total alan oranı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p:0.001$ ;  $p < 0.05$ ) (Tablo 4.1.) (Şekil 4.2.).



Şekil 4.21. Grupların yeni oluşan kemik/total alan oranı ortalamaları

Tablo 4.2. Gruplar arasında kemik/total alan ortalamaları karşılaştırılması

<b>Histomorfometri</b>	
	<b>p</b>
<b>A-B</b>	0,010*
<b>A-C</b>	0,002*
<b>A-D</b>	0,003*
<b>A-E</b>	0,002*
<b>B-C</b>	0,006*
<b>B-D</b>	**
<b>B-E</b>	**
<b>C-D</b>	0,003*
<b>C-E</b>	0,003*
<b>D-E</b>	0,047*

*Mann Whitney U test*                      \*  $p < 0.05$                       \*\*  $p > 0.05$

Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; C grubunun kemik/total alan oranı ortalaması, A grubundan (p:0.002), B grubundan (p:0.006), D grubundan (p:0.003) ve E grubundan (p:0.003) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.05). A grubunun kemik/total alan oranı ortalaması, B grubundan (p:0.010), D grubundan (p:0.003) ve E grubundan (p:0.002) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p<0.05). D grubunun kemik/total alan oranı ortalaması, E grubundan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p:0.047; p<0.05). Diğer gruplar arasında kemik/total alan oranı ortalamaları açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 4.2).

## 5. TARTIŞMA

Vücutta pek çok fizyolojik ve patolojik durumdan dolayı kemik kayıpları ortaya çıkar. Fizyolojik kayıplar genellikle yaşlanma sonucu meydana gelir. Cerrahi işlemler veya patolojik dokunun çıkartılması sonucu meydana gelen kayıplarda ise fizyolojik tamir devreye girer (1). Kendiliğinden ve hızlı bir şekilde iyileşmeyi sağlamak kemik iyileşmesinde temel amaçtır. Boyutsal olarak uygun kemik defektlerinde bunu sağlamak mümkün olsa da, vücudun farklı bölgelerinde ve belli boyutun üzerindeki kemik defektleri kendiliğinden iyileşmemektedir (2). Bozulan bu yapının fonksiyon ve estetik olarak eski haline dönüştürülmesi için birçok yöntem mevcuttur (3). Bu yöntemlerin hepsinin temel amacı, bu bölgenin yeni kemik yapımıyla eski fonksiyon ve estetik yapıya kavuşturulmasını sağlamak olmuştur. Bu amaç için çeşitli lokal veya sistemik olarak etkili ilaçlar ve materyaller kullanılmıştır (4). Lokal olarak kullanılan materyallere kemik greftleri ve biyomateryaller örnek olarak verilebilirken, sistemik olarak kullanılanlara örnek olarak osteoblastik aktiviteyi artırıp osteoid madde yapımını artıran ilaçlar verilebilir (5). Biz çalışmamızda kemik formasyonunu stimüle eden ve kemik rezorpsiyonunu azaltan stronsiyum ranelatin yeni kemik oluşumundaki etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Genel olarak yeni bir aygıt tasarlanması veya biyomekanik testler için yapılan çalışmalarda büyük hayvanların kullanılması, çoklukla kemik iyileşmesinin moleküler mekanizması ve moleküler genetiğinin incelenmesi konusunda da küçük hayvanların kullanılması hususunda görüş birliği vardır (76). Bugüne kadar köpek, koyun, maymun ve tavşan modelleri üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu hayvanların pahalı olmaları ve bakımlarının zor olması gibi birçok dezavantajları vardır. Rat kullanılması sebepleri arasında ratların büyük hayvanlara göre daha kolay manipüle edilmeleri, temin edilebilme kolaylığı, ucuz olmaları, fizyolojileri hakkında yeterli kaynak bulunması ve enfeksiyona karşı dirençli olmaları gibi avantajları sayılabilir (77). Bu avantajlardan dolayı çalışmamızda rat kullanmayı tercih ettik.

Kalvarya, morfolojik ve embriyolojik olarak membranöz kemikleşme göstererek maksillofasiyal bölgede membranöz kemikleşme gösteren diğer kemiklerle benzerlik taşır. Anatomik olarak da bikortikal tabakaya sahip olması mandibulaya benzer (84). Fizyolojik olarak ise atrofiye uğramış mandibula modeline benzerlik gösterir. Kalvaryada paryetal bölgeye defekt açıldığında defektlerin tabanında dura mater, üzerinde ise periost bulunur. Bu yapılar, kemik oluşumuna öncülük edecek osteoprogenitör hücrelere sahiptir.



Bahsedilen özellikleri kalvaryum bölgesini deneysel araştırmalar için ideal bir bölge haline getirmiştir (85).

Kritik boyutlu defekti tanımlamak gerekirse, çalışma yapılacak hayvanda defekt alanına herhangi bir materyal konulmaksızın yaşam boyu kemik yapımı ile iyileşme görülmeyen en küçük boyuttaki alandır . Bu defektlerde iyileşme kemik dokusundan çok, fibröz bağ dokusuyla meydana gelir (78-80). Literatürde rat kalvaryumunda kritik boyutlu defekt için tam bir fikir birliği olmamakla beraber 4-5 mm'lik defekti kabul edilir boyut olarak alan çalışmalar mevcuttur. Laktemur ve ark 2016' da (81) , Calixto ve ark. 2011'de (82) ve Lima ve ark. 2011'de (83) yaptıkları çalışmalarda sıçan kalvaryal defektindeki kritik boyutu 5 mm olarak tercih etmişlerdir. Çalışmamızda deneğin türü, yaşı, defektin lokalizasyonunu göz önünde bulundurarak 5 mm çapında kritik defekt oluşturduk. Kalvaryal defekt oluşurmada en çok tercih edilen teknik trefin frezin kullanıldığı yöntemdir. Flebin kaldırılmasını takiben duraya zarar vermeden kesi yapılmaya çalışılmalıdır. Çünkü duranın kemik iyileşmesi ve rejenerasyonunda önemli görevi vardır (86).

Stronsiyum ranelat ağızdan alınan, 2 kararlı stronsiyum atomundan ve renalik asitten oluşan aktif bir ajandır. Postmenapozal dönemdeki bayanların fraktür risklerini azaltmada ve osteoporoz hastalarının tedavi yönetiminde kullanılmaktadır. Stronsiyum ranelat çift yönlü etki gösterir. Kemik formasyonunu stimüle ederken, kemik rezorpsiyonunuda azaltır. Bu etkisinden dolayı yeni kemik oluşumu lehine kemik döngüsünü dengeler. Yapılan çok sayıda çalışmada bu ilacın kemik kalitesi ve kemik gücü ile bağlantılı olan tüm parametreleri geliştirdiği görülmüştür (87). Bu parametreler çalışma modelimizde stronsiyum ranelat ilacını seçmemizde etkili olmuştur.

Maimoun ve ark. 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada 6 aylık dişi, 30 ratın tibiasına birer titanyum implant yerleştirmişler, 15 hayvanı 8 hafta boyunca 625mg/kg dozunda ve haftada 5 gün boyunca stronsiyum ranelat ile beslemişlerdir. Deney sonucunda çalışma grubundaki çekme mukavemeti testi sonuçları kontrol grubundan anlamlı derece yüksek çıkmıştır. İmplant yanındaki trabeküler alandaki doku sertliğinde çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla artış görülmüştür. Aynı çalışmada implant yanında yer alan kortikal kemikteki nano girintiler değerlendirilmiştir. Stronsiyum ranelat, elastik modülü, doku sertliği ve çalışma enerjisi parametrelerini kontrol grubuna göre artırmıştır (88). Reginster ve ark. 3 yıllık bir takip sonrasında, kemik mineral densitesi ile ilgili yaptığı bir çalışmada, stronsiyum ranelatın kontrol grubuyla

karşılaştırıldığında omurga densitesinde %14,4'lük bir artış yaptığını bulmuştur. Benzer şekilde femur boynundaki kemik mineral densitesinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında %8,3'lük bir artış görülmüştür (89). Stronsiyum ranelat ile tedavi olan hastaların lojistik regresyon analiz sonuçları doğrultusunda, femur boynu kemik mineral densitesindeki her %1'lik artış, 3 yıl sonrasında yeni vertebral kırık yaşanma riskini %3'lük bir oranda düşürmüştür (87). Li ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada 20 ratta osteoporoz modeli oluşturmuş ve hayvanların distal femurlarına 2'şer adet mini implant yerleştirmişlerdir. Hayvanların yarısını 625mg/kg/gün stronsiyum ranelat ile beslemişlerdir. 12 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edilmiş yapılan mikro bilgisayarlı tomografi ölçümlerinde stronsiyum ranelat grubunda kontrol grubuna kıyasla kemik hacminde ve osteointegrasyon yüzdesinde artış görülmüştür. Histomorfik olarak çalışma grubunda kemik alanı yoğunluğunda ve kemik implant temasında artış görülmüştür (91). Li ve ark. ovariektomi uyguladıkları ratlarda tibia fraktürü iyileşmesini incelemişlerdir. Hayvanları 2 gruba ayırmışlar ve çalışma grubundaki hayvanları 625mg/kg/gün stronsiyum ranelatla sistemik beslemişlerdir. Dördüncü ve sekizinci haftalarda kallus kalitesi radyografik, histolojik, mikro bilgisayarlı tomografiyle incelenmiştir. İnceleme sonrasında çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla kemik formasyonu, kemik mineral densitesi, biyomekanik dayanıklılıkta yükseliş ve kallusun mikro yapısal özelliklerinde de belirgin gelişme görülmüştür (95). Sheng ve ark. ratlarda lokalize kas paralizi yapmışlar, biyomekanik analizler sonucunda stronsiyum ranelatın kemiğin mekanik performansını arttırdığını ve immobilize ratlarda kemik kaybını önlediğini bildirmişlerdir (96).

Postmenopozal osteoporotik bayanlarla yapılan Faz 3 çalışmalarda, stronsiyum ranelatın, 3 yıllık takip sonucunda 2gr/günlük dozunun vertebral kırık, vertebral olmayan kırık ve kalça kırığı riskini azalttığı görülmüştür (92). Bain ve ark. osteoporoz modeli oluşturmuş ratlarda yaptıkları çalışmada 52 hafta boyunca hayvanları stronsium ranelatla 125, 250 ve 625 mg/kg, 5/7 gün dozlarında beslemişler ve insanda kullanılan 2 g / gün terapötik dozunun kan stronsiyum konsantrasyonuna en yakın dozu hayvanlarda 625mg/kg/gün olarak bulmuşlardır (93). Bu literatür bilgileri çalışmamızda kullandığımız ratları günlük 625mg/kg dozunda besledik.

Literatürde strontiyum ranelatın yeni kemik oluşumunu artırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur. Zacchetti ve ark. 6 aylık, 30 ratı içeren çalışmalarında hayvanları kontrol ve çalışma olarak 6 gruba bölmüşler ve tibialarına 2.5mm defektler açmışlardır. Çalışma grubundaki 15 hayvan haftada 5 gün 625mg/kg stronsiyum ranelat ile beslemişler ardından dördüncü, sekizinci ve onikinci haftalarda gruplardaki onar rat sakrifiye edilmiştir. Mikro bilgisayarlı tomografiyle yapılan defekt bölgesindeki çalışma ve kontrol grupları arasındaki yeni oluşan kemik hacmi / toplam hacim oranları kontrollerinde dördüncü haftada, sekizinci haftada ve onikinci haftada çalışma grubu lehine bir artış görülmüştür (94). Özturan ve ark. osteopörotik rat modeli oluşturdukları çalışmalarında fraktür iyileşmesiyle ilgili çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında 40 adet üç aylık rat kullanmışlar ve hayvanları 2 gruba ayırmış ardından hayvanların sağ tibial orta shaftında transvers fraktür oluşturmuş ve intermeduller fiksasyon yapmışlardır. Çalışma grubundaki hayvanlar 450 mg/kg/günlük stronsiyum ranelatla oral olarak beslenmiştir. 6 hafta sonra bütün hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Kallus matürasyonu stronsiyum ranelat grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla çıkmıştır. Matür örgü kemik oranları kıyaslandığında stronsiyum ranelat grubundaki oran kontrol grubuna nazaran daha yüksek çıkmıştır (90). Li ve ark. ovariektomi uyguladıkları ratlarda tibia fraktürü iyileşmesini incelemişler. Hayvanları 2 gruba ayırmışlar ve çalışma grubundaki hayvanları 625mg/kg/gün stronsiyum ranelatla sistemik beslemişlerdir. Dördüncü ve sekizinci haftalarda kallus kalitesi radyografik, histolojik, mikro bilgisayarlı tomografiyle incelenmiştir. İnceleme sonrasında çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla yeni kemik formasyonu, kemik mineral densitesi, biyomekanik dayanıklılıkta yükseliş ve kallusun mikro yapısal özelliklerinde de belirgin gelişme görülmüştür (95). Çalışmamız da stronsiyum ranelatın yeni kemik oluşumundaki etkinliği değerlendirildiğinde, stronsiyum ranelatın gavajla (B grubu) ve lokal olarak (C grubu) uygulandığı 2 grupta kontrol grubuna (A grubu) nazaran kemikleşme miktarını anlamlı şekilde arttırdığı görülmüştür. Boş PLGA partiküllerinin bulunduğu D grubu ve lokal olarak stronsiyumun ranelatın PLGA partiküllerine yüklendiği C grubu ile karşılaştırıldığında; C grubunda D grubuna nazaran kemikleşme miktarının anlamlı şekilde yüksek çıktığı görülmüştür. Boş PLGA partiküllerinin bulunduğu D grubu ve boş PLGA partiküllerinin bulunduğu ve hayvanların gavajla stronsiyum ranelatla beslendiği E grubu karşılaştırıldığında; E grubunda D grubuna nazaran anlamlı şekilde kemikleşme miktarı artmıştır. Çalışmamızın sonuçları bahsedilen çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesi durumunda yüksek maliyetlerle ve uzun zaman süreçleriyle karşılaşılabilir. Bu gibi sebeplerden dolayı var olan etken maddenin güvenilirliğini ve etkinliğini geliştirmek için bir takım yaklaşımlara başvurulur. Bunlar arasında etkin madde veya maddelerin salım hızını veya yerini kontrol etmek, doz veya dozlama sayısını değiştirmek, dayanıklılığını artırmak gibi yaklaşımlarla yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gösterilebilir. Bu sistemler hastanın yaşam kalitesi üzerinde olumlu etkiler sağlar (78). Uygun bir ilaç taşıyıcı sisteminde beklenen temel özelliklerin başında, etken maddeyi istenen doku ve/veya organa istenen hızda ve sürede taşınması gelmektedir. Etkin maddenin salım hızını kontrol eden sistemler “ Kontrollü salım sistemleri” ve etken maddeyi istenen doku ve/veya organa taşıyan sistemler “Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler” diye adlandırılır (97).

Diş hekimliğinde ilaç taşıyıcı sistemlerle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Talaat ve ark. 2016 yılında tavşan temporomandibuler eklemine kontrollü salım yapan ilaçlarla ilgili çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada kitosan bazlı hidrojellerin termosensitif uygunluğu değerlendirilmiştir. Çalışma grubundaki hayvanların eklemine 0,2 ml Kitosan/ $\beta$ -gliserofosfat/Hiyaluronik asit kontrollü salım sistemi, kontrol grubuna 0,2 ml Hiyaluronik asit enjekte edilmiştir. Bir hafta sonra hiyaluronik asit oranları çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek çıkmıştır (98). Torshabi ve ark. yaptıkları bir çalışmada PLGA kürelerinin içine minosiklin, metronidazol ve siprofloksasin antibiyotiklerini 1:1:1 oranında yüklemişlerdir. Boş PLGA küreleri ile bu üç antibiyotiği içeren küreleri in vitro olarak, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* periodontal patojenine karşı etkinliğini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda dolu kürelerle boş küreler karşılaştırıldığında, dolu kürelerin iyi salım ve antibakteriyel özellik gösterdiğini ve boş kürelerle benzer hücre biyouyumluluğuna sahip olduğunu bildirmişlerdir (105). Bizim çalışmamızda geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemde boş PLGA kürelerine stronsiyum ranelat hapsedilmiştir.

Sentetik bir polimer olan PLGA, nanosistemlerin hazırlanmasında başarılı bir şekilde kullanılır. FDA onaylı (insanda kullanım için) PLGA'nın biyouyumlu, biyoparçalanabilir, uygun mekanik özelliklere ve öngürülebilir biyoparçalanma kinetiğine sahip olması ve düşük toksisite/düşük immünojenite göstermesi önemli özelliklerindedir. PLGA nanopartikülleriyle özellikle aşılarda, genlerin, büyüme faktörlerinin, peptid/protein yapıdaki ilaçların, antikanser ve antihipertansif etkili etken maddelerin taşınması amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Etkin maddeler, nanopartiküllere

hapsedilmiş ve/veya yüzeyine absorbe olmuş halde bulunur. PLGA nanopartikülleri çoğunlukla emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi, emülsiyon-difüzyon yöntemi ve nanopresipitasyon yöntemleri kullanılarak hazırlanmaktadır (99). Sousa ve ark. amoksisilin yükledikleri PLGA mikroküreleriyle ilgili yaptıkları kök kanal çalışmasında *Enterococcus faecalis*'e karşı yaptıkları antibiyogram sonuçlarında kürelerin ilacın verimini artırdığını bildirmişlerdir (103). Lee ve ark. PLGA - tetrasiklin- kitosan ve lovastatin'den oluşan, geliştirdikleri lokal salım yapan polimerin kronik periodontitisteki etkinliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda hazırlanan preperatın 3 duvarlı defekte sahip periodontitise sahip köpeklerde yeni yemik oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir (104). Cleland ve ark. tolterodin yüklü PLGA mikroküreleri hazırlamış aktif mesane hastalığının tedavisinde tolterodin L-tartarat tabletleriyle in vivo olarak ile karşılaştırmış, mikrokürelerin tolterodin tabletlerinden daha etkili olduğu sonucuna varmıştır (100). Jordan ve arkadaşları insan büyüme hormonu içeren PLGA/PLA mikroküreleri hazırlamışlardır. Sistem sıçan plazmasında 3 gün, maymun plazmasında ise 7 gün boyunca salım gerçekleştirmiştir (101). Gou ve ark. yaptıkları bir çalışmada PLGA kopolimeri içine düşük (3 mg zoledronik asit), orta (30 mg zoledronik asit) yüksek doz (300 mg zoledronik asit) yüklemişler, ratların distal femurlarına açtıkları defektlerin içine koymuşlardır. 6 hafta sonra mikro bilgisayarlı tomografi ve histolojik olarak defektleri incelemişler, inceleme sonrasında kontrol grubuna (yalnız PLGA kopolimeri) ve düşük seviyedeki zoledronik asit grubuna kıyasla orta ve yüksek derecedeki zoledronik asit grubunda mineralize kemik hacmi ve kemik mineral densitesi oranında artış görülmüştür. Lokal kontrollü zoledronik asit gruplarında osteoklast sayısını azalıp osteoblast sayısı artmış olduğunu ve orta ve yüksek doz zoledronik asit içeren gruplarda kemik oluşum belirteçlerinin ifadelerinin hızlanmış olduğunu bildirmişlerdir (102).

SR ile yapılan in vivo deneylerde, çalışma süreleri farklılıklar göstermektedir. Cebesoy ve ark. SR'nin rat tibiasındaki fraktürün 2., 3., ve 4. haftalardaki iyileştirme etkisine bakmışlardır (106). Linderbäck ve ark. SR ile besledikleri ratların tibialarına yerleştirdikleri titanyum vidaları 4.ve 8. haftalarda pull out testine tabi tutmuşlar ve aynı haftalarda mbt ile vidaların çevresindeki kemikleşme miktarlarına bakmışlardır (107). Özturan ve ark. osteoporotik ratlarda SR'nin kemik iyileşmesine etkisine bakmışlar çalışmaları 6 hafta sürmüştür (90). Li ve ark. 12 haftalık çalışmalarında, osteoporotik ratlarda SR'nin titanyum implantların osteointegrasyona etkisine bakmışlardır (91). Li ve ark. ratlarda osteoporoz modeli oluşturup tibia fraktürü meydana getirmişler 4. ve 8.

haftalarda kemik iyileşmesini incelemişlerdir (95). Literatürdeki çalışmalarını değerlendirdiğimizde 8 haftalık bir çalışma yapmayı uygun gördük. Biz SR'nin lokal salım yapan formuyla ilgili çalışma literatürde bulamadık. Bu açıdan ilk olma özelliği göstermektedir. Geliştirdiğimiz formun diğer gruplarla beraber hayvanlardaki 8 haftalık etkisini değerlendirdik.

Histolojik ve histomorfometrik incelemelerle iyileşme sürecinin anlaşılabilmesi, yeni oluşan kemiğin yoğunluk ve stabilitesinin saptanması sağlanabilmektedir (71, 72). Kemik hücrelerini, aktivitesinin ve kemik matriksini in situ olarak direkt değerlendirilebilen tek yöntem histomorfometri olduğu için, kemiği değerlendirmede altın standart olarak kabul edilir (73, 74). 1982' de Donath ve Breuner tanımladığı histomorfometri tekniği ile implantların, kemik grefti materyallerinin ve/veya canlı kemik dokunun incelenebildiğini bildirmiş ve rutin inceleme teknikleri arasına girmiştir. Histolojik ve histomorfometrik teknikleri içeren araştırmalar hayvanlarda veya in vitro çalışmalarda gerçekleştirilebilirken, etik nedenler insanlarda yapılan araştırmaları kısıtlamaktadır (75). Çalışmamızda, histopatolojik ve histomorfometrik incelemelerle hücresel bazda oluşan değişiklikler değerlendirilmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, şu sonuçlara varılmıştır:

Kontrollü salım teknolojisiyle üretilen preperatlar sayesinde istenilen etki istenilen bölgede ve çok daha düşük dozlarda sağlanabilir.

Stronsiyum ranelatın lokal salım yapan ve oral alınan granül formu yeni kemik oluşumunu artırmıştır.



## KAYNAKLAR

1. Ninomiya T, Miyamoto Y, Ito T. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur. *J Bone Miner Metab* 2003, 21: 67–73.
2. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 1980, 38: 176-80.
3. Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR, *Orthopaedic Basic Science: The Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*. 2nd Edition. Rosemont Illinois 2000, chap. 8.
4. Gupta MC, Maitra S. Bone graft substitutes; Past, present, future. *J Postgrad Med* 2002. 48; 142-8.
5. Ballı B. Kemik iyileşmesi ve iyileşmeyi etkileyen faktörler. Bitirme tezi. İ. Ü. Dishekimliği Fakültesi. İstanbul; 2004.
6. Bozbey I, Yalçın AP. Postmenopozal Osteoporoz Tedavisinde Stronsiyum Ranelat. *Archives of rheumatology* 2009, Volume 24, Issue 3. 149-55.
7. Tournis S. Improvement in bone strength parameters. The role of strontium ranelate. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007, 7(3): 266-7
8. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 2012, 2: 2-11
9. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 2011, 3: 1377-97.
10. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 2012, 161: 505-22.
11. Eşrefoğlu M. *Genel Histoloji*. Medipres Matbaacılık. Malatya. 2004: 271.
12. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology*. Arda O, (Çeviri editörü). İstanbul: Barış kitabevi. 1993.
13. Bernard GW. Healing and repair of osseus defects. *Dent Clin North Am* 1991; 35: 469-77.
14. Doblare M, Garcia JM, Gomez MJ. Modelling bone tissue fracture healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics* 2004; 71: 1809-40.



15. Veis A. Mineral-matrix interactions in bone and dentin. *J Bone Miner Res* 1993, 8 Suppl 2, 493-7.
16. Erdoğan D, Hatipoğlu M, Görgün M, Ilgaz C. *Genel Histoloji*, Hatipoğlu Yayın Evi. Ankara 1999: 107-17.
17. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*. Aytekin Y, Solakoğlu S,(Çeviri editörleri.) İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri 2006:141-54.
18. Clafin RS. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. *Journal of American Dental Association* 1936, 23, 945- 59.
19. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş*. Demir R. (Çeviri editörü.) Ankara: Palme yayıncılık. 2006; 128.
20. Cormack D H. *Essential Histology*. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1993; 159- 90.
21. Tekelioglu M. *Genel Tıp Histolojisi*: Beta Basım Yayım A.Ş.; 1989.
22. Meyer U, Wiesmann HP. *Bone and Cartilage Engineering*. 2006: Springer.
23. Revell PA. *Pathology of Bone*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1986: 30; 203-31.
24. Aslan M. Kemik defektlerinin iyileşmesinde heterojen kemik greftinin ve yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu yönteminin etkilerinin incelenmesi ve karşılaştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Hastalıkları Ve Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi 2002.
25. Müftüoğlu S. Kemik nasıl oluşur. *Bilim ve Teknik Dergisi*. 1993, 26(313); 907.
26. Martin RB. Burr DB. *Mechanical adaptation, in Structure, Function and Adaptation Of Compact Bone*. Raven Press, New York, chaps.2,4,7 and 8.1989.
27. Kalfas IH. Principles of Bone Healing. *Neurosurg Focus* 2001;10(4): 1-4.
28. Garg AK. *Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants*: Quintessence Publishing Co, Inc; 2004.
29. Jee WSS, Cowin SC editor. *Integrated bone tissue physiology: Anatomy and physiology*. *Bone Mechanics Handbook*. 2nd ed. Florida: CRC press: 2001: 1-68
30. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 2001, 22: 2581-93
31. Soydan N. *Genel Histoloji*. İstanbul: Beta Yayıncılık; 1992.
32. Köse İ. Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Sentetik Kemik Greftleri İle Kalsiyum Kanal Blokerleri Ve B-2 Reseptor Antagonistlerinin Etkilerinin

- Deneysel Olarak İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Hastalıkları Ve Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi. 2012.
33. Gorski JP. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998, 9; 201-23.
34. Jee WSS. *Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology*. In: Cowin SC (ed). *Bone Mechanics Handbook*. 2. ed. CRC Press, Florida; 2001, 1-68.
35. Gruber R. Mechanisms of bone development, remodeling and loss. Đinde Watzek, G. editor. *Implants in qualitatively compromised bone*. New Malden Surrey, UK: Quintessence; 2004. 9-28.
36. Goldring SR. Inflammatory mediators as essential elements in bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 2003,73: 97-100.
37. Boysan E. Titanyum Bariyer Ve Greft Materyallerinin Yonlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu Uzerine Etkisinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Hastalıkları Ve Cerrahisi Anabilim Dalı . Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi 2010.
38. Akar V. Gömulu alt yirmi yaş dişleri çekim kavitelerindeki kemik iyileşmesinin alınan radyografilerle bilgisayarlı ortamda analizi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Hastalıkları Ve Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi 2007.
39. Burdurlu MÇ. Kritik Boyutlu Kemik Defektlerinde Lokal Simvastatin Ve Led İle Uygulanan Fotobiyomodülasyonun Kemik İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Histopatolojik İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Hastalıkları Ve Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi . İstanbul: Yeditepe Üniversitesi 2014.
40. Hui HW, Robinson JR, Lee VHL. *Design and fabrication of oral controlled release drug delivery systems*. In: Robinson, JR.; Lee, VHL., editors. *Controlled drug delivery: Fundamentals and applications*. New York: Marcel Dekker; 1987.
41. Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chem Rev* 1999, 99(11); 3181–98.

42. Drake C, Arch A. Standard Telephones and Cables Public Limited Company, assignee. *Controlled release system*. 1989 Sep.
43. Langer R, Peppas N. Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents. *A Review. Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 1983, 23(1); 61–126.
44. Shaviv A, Mikkelsen R. Controlled-release fertilizers to increase efficiency of nutrient use and minimize environmental degradation - A review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 1993, 35(1); 1–12.
45. Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. Flavour encapsulation and controlled release a review. *Int J Food Sci Tech* 2006, 41(1); 1–21.
46. Gerstl Z, Nasser A, Mingelgrin U. Controlled Release of Pesticides into Water from Clay-Polymer Formulations. *J Agric Food Chem* 1998, 46(9): 3803–9.
47. Lisa BP. Controlled Release in the Food and Cosmetics Industries. *Polymeric Delivery Systems: American Chemical Society* 1993; 42–52.
48. Hines DJ, Kaplan DL. Poly (lactic-co-glycolic acid) controlled release systems: experimental and modeling insights. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2013, 30(3); 257–76.
49. Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol*. 2001, 5(4); 447–51.
50. Herrero VR, Rincón AC, Alonso M, Reboto V, Molina MIT, Rodríguez CJC. Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release. *J Controlled Release* 2005, 102(1); 113–22.
51. Crotts G, Park TG. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: Release kinetics and stability issues. *J Microencapsul* 1998, 15(6); 699–713.
52. Cutright DE, Beasley JD III, Perez B. Histologic comparison of polylactic and polyglycolic acid sutures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1971, 32(1); 165–73.
53. Frazza EJ, Schmitt EE. A new absorbable suture. *J Biomed Mater Res* 1971, 5(2); 43–58.
54. Gürsoy AZ. Giriş. İçinde: Gürsoy AZ (editör). *Kontrollü Salım Sistemleri*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği 2002: 3-6.
55. Karakan NC. Ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde sistemik olarak uygulanan stronsiyum ranelatın alveoler kemik rezorpsiyonu üzerindeki

- etkisinin histomorfometrik ve histopatolojik açıdan araştırılması. Periodontoloji anabilim dalı, Uzmanlık tezi. Sivas: Cumhuriyet üniversitesi 2015.
56. Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* 2004, 282(1–2); 1–18.
  57. Kitchell JP, Wise DL. *Methods in Enzymology. Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug—polymer matrix systems*. Academic Press, 436-48.
  58. Chen L, Apte RN, Cohen S. Characterization of PLGA microspheres for the controlled delivery of IL-1 $\alpha$  for tumor immunotherapy. *J Controlled Release* 1997, 43(2–3); 261–72.
  59. Han M. Biodegradable membranes for the controlled release of progesterone. 1. Characterization of membrane morphologies coagulated from PLGA/progesterone/DMF solutions. *J Appl Polym Sci*. 2000, 75(1); 60–7.
  60. Wang YM, Sato H, Horikoshi I. In vitro and in vivo evaluation of taxol release from poly(lactico- glycolic acid) microspheres containing isopropyl myristate and degradation of the microspheres. *J Controlled Release* 1997, 49(2–3); 157–66.
  61. Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Fujioka S, Hino T. Pulmonary delivery of insulin with nebulized dl-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect. *J. Controlled Release* 1999, 62(1–2); 279–87.
  62. Price JS, Tencer AF, Arm DM, Bohach GA. Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 1996, 30(3); 281–6.
  63. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactideoglycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000, 21(23); 2475–90.
  64. Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *J Controlled Release* 2007, 121(1–2); 3–9.
  65. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 1997, 28(1); 5–24.
  66. Marie JP. Strontium as therapy for osteoporosis. *Current Opinion in Pharmacology* 2005, 5; 633–6.

67. Delannoy Ph, Bazot D, Marie PJ. Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. *Metabolism* 2002, 51; 906-11.
68. Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour JP, Rizzoli R. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *J Bone Miner Res* 2004, 19; 2012-20.
69. Buehler J, Chappuis P, Saffar JL, Tsouderos Y, Vignery A. Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone* 2001, 29; 176-9.
70. Gül M, Bayat N, Gül S, Hüz M, Yıldız A, Otlu A. A Comparison of Three Different Agents of Decalcification for a Histological Examination of Bone Tissues. *J Turgut Ozal Med Cent* 2014, 21(4); 274-9.
71. Lundgren S, Nyström E, Nilson H, Gunne J, Lindhagen O. Bone grafting to the maxillary sinuses, nasal floor and anterior maxilla in the atrophic edentulous maxilla. A two-stage technique. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997, 26(6); 428-34.
72. Tadic D, Epple MA. Thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 2004, 25(6); 987-94.
73. Humadi A, Alhadithi RH, Alkudiyari SI. Validity of the DEXA Diagnosis of Involutional Osteoporosis in Patients with Femoral Neck Fractures, *Indian J. Orthop* 2010, 44; 73–8.
74. Iwaniec UT, Wronski TJ, Turner RT. Histological Analysis of Bone. *Methods Mol. Biol* 2008, 325–41.
75. Cabbar F. Sığır Kaynaklı Kemik Grefti İle Ogmente Edilen Maksiller Sinüslerde Trombositten Zengin Plazmanın Yeni Kemik Oluşumuna Etkisi: Histolojik Ve Histomorfometrik Değerlendirme. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Hastalıkları Ve Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, İstanbul: Yeditepe Üniversitesi 2009.
76. Auer J, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, Rechenberg B, Hofmann-Amttenbrinck M, Schneider E, Terpitz RM, Thiele F, Rippe KP, Grainger DW. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2007, 8; 72.

77. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005, 16; 129-38.
78. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J.Oral Surg* 1980, 38; 176.
79. Rowe NL. Nonunion of the mandible and maxilla. *J.Oral Surg* 1969, 27; 520.
80. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura the bonemorphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg* 1982, 196; 100.
81. Lektemur AA, Toker H, Ozer H. Ozone Therapy Enhances Osseous Healing In Diabetic Rats With Calvarial Defect: A Morphometric and Immunohistochemical Study. *J Periodontol.* 2016, 18; 1-15.
82. Lima CE, Calixto JC, Anbinder AL. Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Braz Oral Res* 2011, 25(1); 42-8.
83. Calixto JC, Lima CE, Frederico L, Lima RP, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2011, 39(3); 215- 20.
84. Freeman E, Turnbull R.S. The role of osseous coagulum as a graft material. *J.Periodont Res* 1973, 8; 229.
85. Prolo DJ, Gutierrez RV, DeVine JS, Oklund SA. Clinical utility of allogeneal skull discs in human craniotomy. *Neurosurgery* 1984,14; 183.
86. Hobar PC, Schreiber JS, McCarthy JG, Thomas PA. The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. *Plastic and reconstructive surgery* 1993, 92; 405-10.
87. Iolascon G, Frizzi L, Di Pietro G, Capaldo , Luciano F. Gimigliano F. Bone quality and bone strength: benefits of the bone-forming approach. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2014, 11(1); 20-24
88. Maïmoun L, Brennan TC, Badoud I, Dubois-Ferriere V, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. *Bone* 2010, 46; 1436–41
89. Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, et al. Strontium ranelate reduces the risk of non vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90; 2816-22.

90. Ozturan KE, Demir B, Yucel I, Cakıcı H, Yilmaz F, Haberal A. Effect of Strontium Ranelate on Fracture Healing in the Osteoporotic Rats. *Inc. J Orthop Res* 2011, 29; 138–42.
91. Li Y, Li X, Song G, Chen K, Yin G, Hu J. Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. *Clin Oral Implants Res* 2012, 23(9); 1038-44.
92. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004, 350; 459–68.
93. Bain SD, Jerome C, Shen V, Dupin-Roger I, Ammann P. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. *Osteoporos Int* 2009, 20; 1417–28.
94. Zacchetti G, Dayer R, Rizzoli R, Ammann P. Systemic treatment with strontium ranelate accelerates the filling of a bone defect and improves the material level properties of the healing bone. *BioMed Research International Volume* 2014, 10.
95. Li YF, Luo E, Feng G, Zhu SS, Li JH, Hu J. Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 2010, 21(11); 1889-97.
96. Sheng ZF, Ma YL, Tong D, Fang DY, Liang QC, Liu LH, Zhang J, Liao EY. Strontium ranelate prevents bone loss in a rat model of localized muscle paralysis. *Annals of Biomedical Engineering* 2012, 40(3); 657–65.
97. Kaş HS. İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. İçinde: Gürsoy AZ (editör). *Kontrollü Salım Sistemleri*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği 2002: 65-102.
98. Talaat W, Haider M, Kawas SA, Kandil NG, Harding DR. Chitosan-based thermosensitive hydrogel for controlled drug delivery to the temporomandibular joint. *J Craniofac Surg* 2016.
99. Özakar E. Etkin madde yüklü plga nanopartiküllerinin hazırlanması ve in vitro değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi 2014.

100. Cleland JL, Duenas ET, Park A, Daugherty A, Kahn J, Kowalski J, Cuthbertson A. Development of poly(d,l-lactide-coglycolide) microsphere formulations containing recombinant vascular endothelial growth factor to promote local angiogenesis. *J of Control Rel* 2001, 72(1-3); 13-24.
101. Jordan F, Naylor A, Kelly CA, Howdle SM, Lewis A, Illum L. Sustained release hGH microsphere formulation produced by a novel supercritical fluid technology: In vivo studies. *J of Control Rel* 2010, 141(2); 153-60.
102. Gou W, Wang X, Peng J, Lu Q, Wang Y, Wang A, Guo Q, Gao X, Xu W, Lu S. Controlled Delivery of Zoledronate Improved Bone Formation Locally In Vivo. *PLoS One* 2014, 11; 9
103. Sousa FFO, Luzardo AA, Pérez EA, Seoane PR, Blanco MJ. Development of a novel AMXloaded PLGA/Zein microsphere for root canal disinfection. *Biomed Mater* 2010, 5; 1-10.
104. Lee BS, Lee CC, Wang YP, Chen HJ, Lai CH, Hsieh WL, Chen YW. Controlled-release of tetracycline and lovastatin by poly(d,l-lactide-co-glycolide acid)-chitosan nanoparticles enhances periodontal regeneration in dogs. *Int J Nanomedicine* 2016, 18, 11; 285-9.
105. Torshabi M, Nojehdehian H, Tabatabaei FS. In vitro behavior of poly-lactic-co-glycolic acid microspheres containing minocycline, metronidazole, and ciprofloxacin. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* 2016, 0; 1–8.
106. Cebesoy O, Tutar E, Kose KC, Baltaci Y, Bagci C. Effect of strontium ranelate on fracture healing in rat tibia. *Joint Bone Spine*. 2007, 74(6); 590-3.
107. Linderbäck P, Agholme F, Wermelin K, Närhi T, Tengvall P, Aspenberg P. Weak effect of strontium on early implant fixation in rat tibia. *Bone* 2012, 50; 350–6.
108. Wakiyama N, Juni K, and Nakano M. Influence of physicochemical properties of polylactic acid on the characteristics and in vitro release patterns of polylactic acid microspheres containing local anesthetics. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 1982, 30(7); 2621-8.



109. Jones DS. and Pearce KJ. An Investigation of the Effects of Some Process Variables on the Microencapsulation of Propranolol Hydrochloride by the Solvent Evaporation Method. *International Journal of Pharmaceutics*. 1995, 118(2); 199-205.
110. Moreira APD. PH effect on the dissolution behavior of the microspheres containing strontium ranelate, in 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine, ISCM 2014, M.P. Ginebra, et al., Editors. 2015, *Trans Tech Publications Ltd*. 315-320.



## **EKLER**

### **EK.1. Özgeçmiş**

1985 yılında Ankara’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Ankara’da bitirdim. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde başladığım yüksek öğrenimimi 2009 yılında tamamladım. 2010 yılında İnönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı’nda doktora programına dahil oldum.



## EK.2. Deney Hayvanları Etik Kurulu Kararı



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 11-03-2016  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol no.su : 2014/A-21  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar Albino  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 50 Adet  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 200-250 gr

Dış Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yrd. Doç. Dr Ümit Yolcu'nun yürütücüsü olduğu "Rat Kalvaryal Kemik Defektlerinde Strontium Ranelatin Kemik Rejenerasyonundaki Etkinliğinin Araştırılması" isimli 2014/A-21 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Başkan	 Prof. Dr. Nigar VARDI Üye	 Doç. Dr. Yılmaz ÇİGREMİŞ Üye
 Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	 Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye	 Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
Salih AVCI Sivil Üye	Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	