

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

LOKAL SİMVASTATİN UYGULAMASININ İN VİVO OLARAK
KEMİK YAPIMI ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK
ARAŞTIRILMASI : KOBAY (GUİNEA PİG) ÇALIŞMASI.

GAMZE ŞENOL GÜVEN

DANIŞMAN
PROF.DR.GÜLSÜM AK

AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ PROGRAMI

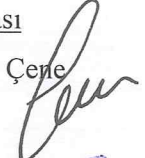
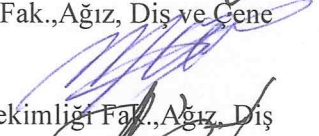



İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programında Gamze Şenol Güven tarafından hazırlanan LOKAL SİMVASTATİN UYGULAMASININ İN VİVO OLARAK KEMİK YAPIMI ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK ARAŞTIRILMASI: KOBAY (GUİNEA PİG) ÇALIŞMASI başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

06 / 06 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Gülsüm AK (Tez Danışmanı) İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak.,Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD	
2.Dr. Meral ÜNÜR (Tez İzleme Komitesi) İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak.,Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD	
3.Prof. Dr. Sabire DEĞER (Tez İzleme Komitesi) İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak.,Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD	
4.Prof. Dr. Sina UÇKAN (Medipol Üniv. Diş. Hekimliği Fak. Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD)	
5.Doç.Dr. Erdal CEVHER (İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. FarmasÖTİK Anabilim Dalı	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gamze ŞENOL GÜVEN (İmza)



İTHAF

Değerli eşim Dr. Gökhan GÜVEN ve Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleri ile beni her zaman destekleyen, bana güvenen, bilimsel ve insani yönlerini hayat boyu örnek alacağım değerli tez danışman hocam Prof.Dr. Gülsüm AK'a,

Tez çalışmamda farmasötik açıdan bilgi birikimiyle beni destekleyen, bilimsel açıdan örnek aldığım sayın hocam Doç.Dr. Erdal CEVHER'e ve değerli asistanı Deniz MORİNA'ya,

Tezimin histolojik kısmının yapılmasında büyük emeği geçen Doç.Dr. Vakur OLGAC'a,

Doktora çalışmamın istatistiksel değerlendirmesini yapan Ebru OSMANOĞLU'na,

Deney safhalarında desteğini esirgemeyen Veteriner hekim Nurten KILIÇ ÖCALAN'a ve tüm DETAE personeline,

Deney aşamasında bana yardım eden Dt. Mert AÇIKGÖZ, Dt. Özlem FİLİZ BAYAR, Dt. Arda ÖZTAN, Dt. Serdar HEPŞENOĞLU'na,

Deney aşamaları dahil doktora eğitimim süresince desteğini her an hissettiğim, sabır ve anlayışla beni yalnız bırakmayan sevgili eşim Dr. Gökhan GÜVEN'e,

Hayatım boyunca sevgi ve ilgileri ile her zaman yanımda olan beni her düştüğümde ayağa kaldıran sevgili annem Sennur ŞENOL'a, babam Mehmet ŞENOL'a, ablam Gökknur Gökdemir'e, kardeşim Arif Refik ŞENOL'a

teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31323

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KEMİK	3
2.1.1. Kemik Dokusu	3
2.1.2. Kemik Hücreleri.....	3
2.1.2.1. Osteoprogenitör Hücreler.....	3
2.1.2.2. Osteoblastlar.....	3
2.1.2.3. Osteoklastlar.....	4
2.1.2.4. Osteositler	5
2.1.3. Kemik Matriksleri	5
2.1.3.1. Organik Matriks	6
2.1.3.2. İnorganik Matriks.....	6
2.1.4. Kemik Zarları	6
2.1.4.1. Periosteum (Periost).....	7
2.1.4.2. Endosteum (Endost).....	7
2.1.5. Kemik Tipleri.....	7
2.1.5.1. Primer Kemik Dokusu	7
2.1.5.2. Sekonder Kemik Dokusu	8
2.1.6. Kemik Büyümesi ve Gelişiminin Evreleri	9
2.1.6.1. İntramembranöz Kemikleşme	9

2.1.6.2. Endokondral Kemikleşme	10
2.1.7. Kemığın Şekillenmesi	11
2.1.8. Kemığın Yeniden Şekillenmesi (Remodeling)	12
2.1.9. Kemik İyileşmesi	12
2.1.9.1. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler	14
2.1.10. Kemik Greftleri	14
2.1.11. Bariyer Membranlar	17
2.1.11.1. Rezorbe Olmayan Membranlar	17
2.1.11.2. Rezorbe Olabilen Membranlar	17
2.2. Statinler	18
2.2.1. Statinlerin Farmakolojik Özellikleri	19
2.2.2. Statinlerin Etki Mekanizması	20
2.2.3. Statinlerin Endikasyonları	21
2.2.4. Statinlerin Kontrendikasyonları	22
2.2.5. Statinlerin Yan Etkileri	22
2.2.6. Statinlerin Pleiotropik Etkileri	23
2.2.7. Statinlerin Kemik Üzerine Etkileri	24
2.3. Polimer Taşıyıcılar	25
2.3.1. Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)	26
2.3.2. Sulfobutil eter7-β-Siklodekstrin (SBE7-β-CD)	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Kullanılan Biyomateryaller	31
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Operasyon Öncesi Hazırlık	31
3.2.1.1. Genel bilgi	31
3.2.1.2. Hazırlık işlemleri	32
3.2.1.3. Deney Hayvanları ve Grupları	32
3.2.1.4. Deney Hayvanı Olarak Kobaylar (Dunkin-Hartley Guinea-pig)	35
3.2.1.5. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	35
3.2.1.6. Simvastatin Tabletlerinin Hazırlanması	36
3.2.1.7. SIM-PLGA mikrokürelerinden ve SIM-SBE7-β-CD komplekslerinden <i>in vitro</i> simvastatin salım hızının saptanması	37

3.2.2. Cerrahi İşlemler	38
3.2.2.1. Kemik defektlerinin oluşturulması :	38
3.2.3. Operasyon Sonrası	42
3.2.3.1. Post-operatif Bakım	42
3.2.3.2. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmeleri	43
3.2.4. Histolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler için örneklerin hazırlanması	44
4. BULGULAR.....	46
4.1. Salım Deneyi Bulguları.....	46
4.2. Klinik gözlemler	48
4.3. Histolojik Bulgular.....	48
4.3.1. Işık Mikroskobu Değerlendirmeleri.....	48
4.3.1.1. 15. Gün Kontrol Grubu	48
4.3.1.2. 15. Gün SIM-PLGA Grubu.....	49
4.3.1.3. 15. Gün Simvastatin Grubu.....	50
4.3.1.4. 15. Gün SIM-SBE7- β -CD Grubu	51
4.3.1.5. 45. Gün Kontrol Grubu	52
4.3.1.6. 45. Gün SIM-PLGA Grubu.....	53
4.3.1.7. 45. Gün Simvastatin Grubu.....	54
4.3.1.8. 45. Gün SIM-SBE7- β -CD Grubu	55
4.4. İstatistiksel Bulgular	56
5. TARTIŞMA	67
SONUÇLAR.....	83
KAYNAKLAR	86
ETİK KURUL KARARI	99
ÖZGEÇMİŞ.....	100

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3-1: Oluşturulan kemik defektlerine yerleştirilen materyaller	33
Tablo 3-2: Her iki alt grupta da yer alan deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarında oluşturulan alt ve üst defetlere uygulanan materyaller	34
Tablo 3-3: Her iki alt grupta da yer alan deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarında oluşturulan alt ve üst defetlere uygulanan materyaller:	34
Tablo 3-4: Her iki alt grupta da yer alan deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarında oluşturulan alt ve üst defetlere uygulanan materyaller:	34
Tablo 3-5: Her iki alt grupta da yer alan deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarında oluşturulan alt ve üst defetlere uygulanan materyaller:	35
Tablo 3-6: Allen'in kırık iyileşmesi skora sistemi (152).....	45
Tablo 4-1: SIM-PLGA mikrokürelerinden simvastatinin zamana bağlı <i>in vitro</i> salım miktarları.....	46
Tablo 4-2: SIM-SBE7-β-CD kompleksinden simvastatinin zamana bağlı <i>in vitro</i> salım miktarları.....	47
Tablo 4-3: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki İltihap Düzeylerinin Değerlendirilmesi	56
Tablo 4-4: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki İltihap Düzeylerinin Post Hoc Değerlendirilmesi.....	57
Tablo 4-5: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Fibrozis Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	58
Tablo 4-6: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Fibrozis Düzeylerinin Post Hoc Değerlendirilmesi.....	59
Tablo 4-7: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Yeni Kemik Oluşumu Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	60
Tablo 4-8: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Yeni Kemik Düzeylerinin Post Hoc Değerlendirilmesi.....	61
Tablo 4-9: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Kemik İyileşmesi Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	62
Tablo 4-10: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Kemik İyileşmesi Düzeylerinin Post Hoc Değerlendirilmesi.....	63

Tablo 4-11: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Nekroz Varlığının Değerlendirilmesi	65
---	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kemik hücrelerinin ve farklılaşma yollarının şematik gösterimi (24).....	5
Şekil 2-2: Havers Kanallarının Şematik Görüntüsü (42).....	9
Şekil 2-3: İntramembranöz ve endokondral kemik oluşumlarının karşılaştırılması (60).	11
Şekil 2-4: Yeniden Şekillenme Safhalarının Şematik Görüntüsü A.İnflamasyon, B.Tamir, C.Yeniden Şekillenme (62).	12
Şekil 2-5: Kortikal kemiklerde kemik iyileşme süreci (75).....	14
Şekil 2-6: Statinlerin kimyasal yapısı	20
Şekil 2-7: Asetil CoA'dan kolesterole dönüşüm şeması.(Mevalonat yolu) CoA: koenzim A, PP: pirofosfat.	21
Şekil 2-8: PLGA'nın Hidrolizinin şematik gösterimi (139).....	27
Şekil 2-9: Krebs siklüsünün şematik görünümü.....	27
Şekil 2-10:Siklodekstrinlerin kesik koni şeklindeki görüntüsü ve açık formülü.....	28
Şekil 3-1: Mem-Lok Rezorbe olabilen kollajen membranın görüntüsü.....	31
Şekil 3-2: Deney hayvanı olarak kullanılan kobayın görüntüsü.....	32
Şekil 3-3: Povidon iyot solüsyonu (batikon) sürülmüş tibianın görüntüsü	36
Şekil 3-4: A. İnsizyon yapılmış tibianın görüntüsü B. Açığa çıkarılmış tibianın görüntüsü	38
Şekil 3-5: 3 mm çapındaki trefin frezin görüntüsü.....	39
Şekil 3-6: A: 3 mm çapında açılan defektlerin görüntüsü B: İki defekt arası bırakılan 5 mm mesafenin görüntüsü.....	39
Şekil 3-7: Defektlere yerleştirilen tabletlerin görüntüsü.....	40
Şekil 3-8: Defektlerin üzerine yerleştirilen kollajen membranın görüntüsü.....	41
Şekil 3-9: Dikişle primere kapatılmış flebin görüntüsü.....	41
Şekil 3-10: Flasterle sarılmış tibianın görüntüsü	42
Şekil 3-11: %10'luk formaldehit bulunan biyopsi kapları ve 15. günde kurban edilen kobayların tibiaları	43
Şekil 3-12: %10'luk formaldehit bulunan biyopsi kapları ve 45. günde kurban edilen kobayların tibiaları	44
Şekil 4-1: SIM-PLGA mikrokürelerinden zamana bağlı salım miktarlarının yüzde değerleri	47

Şekil 4-2: SIM-SBE7- β -CD kompleksinden zamana bağlı salım miktarlarının yüzde değerleri	48
Şekil 4-3: 15.gün boş bırakılan grupta defekt bölgesinde genç mezenkim hücreleri arasında defekti kapatmaya yönelik oluşan ince trabeküler yeni kemik dokusu (Oklar) (H&EX100).	49
Şekil 4-4: 15.gün SIM-PLGA grubunda kanama alanları, iltihap hücresi infiltrasyonu içeren bağ dokusu içinde yeni kemik trabekülleri (ince ok) ve yabancı madde artıkları (kalın ok)(H&EX100).	50
Şekil 4-5: 15 gün simvastatin grubunda residüel madde altında, aktif bağ dokusu içinde yeni kemik trabekülleri (Oklar) (H&EX200).	51
Şekil 4-6: 15 gün SIM-SBE7- β -CD grubunda damardan zengin bağ dokusu içinde yeni kemik trabekülleri (beyaz ok) (H&EX100).	52
Şekil 4-7: 45 gün boş grubunda defekt bölgesini kapatan yeni kemik trabekülleri (H&EX100).	53
Şekil 4-8: 45. gün SIM-PLGA grubunda defekt bölgesini tama yakın kapatan yeni kemik dokusu arasında aktif fibröz doku alanı (Yıldız) (H&E X100).	54
Şekil 4-9: 45. gün Simvastatin grubunda defekt bölgesinde, residüel madde altında ince kemik trabekülleri (oklar) (H&EX100).	55
Şekil 4-10: 45. gün SIM-SBE7- β -CD grubunda defekt bölgesinde damardan zengin, aktif fibröz doku içinde yeni kemik trabekülleri (Oklar) (H&EX100).	56
Şekil 4-11: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki İltihap Düzeylerinin Grafiği	57
Şekil 4-12: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Fibrozis Düzeylerinin Grafiği	59
Şekil 4-13: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Yeni Kemik Düzeylerinin Grafiği ...	61
Şekil 4-14: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Kemik İyileşmesi Düzeylerinin Grafiği	63
Şekil 4-15: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Nekroz Varlığının Grafiği	65

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HIV: İnsan immün yetersizlik virüsü

HMG CoA redüktaz: Hidroksimetilglutaril-koenzim A redüktaz

BMP-2: Bone Morfojenetik Protein-2

VEBF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

FDA: Gıda ve ilaç dairesi

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

CK: Kreatin kinaz

PLA: Poli(L-laktik asit)

PLGA: Polilaktik-ko-glikolik asit

HP- β -CD: Hidroksipropil- β -siklodekstrin

SBE7- β -CD: Sulfobutil eter7- β -siklodekstrin

FPF: Farnesil pirofosfat

GGPF: Geranil geranil pirofosfat

PVA: Polivinil alkol

TKP: Trikalsiyum Fosfat

ÖZET

ŞENOL GÜVEN G. Lokal Simvastatin Uygulamasının İn Vivo Olarak Kemik Yapımı Üzerine Etkisinin Deneysel Olarak Araştırılması:KOBAY (GUİNEA PİG) ÇALIŞMASI. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.2014

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

Çalışmamızın amacı, kobayların tibiasında oluşturulan kemik defektlerine uygun dozda ve uygun taşıyıcı ile lokal simvastatin uygulaması sonrası oluşacak değişikliklerin histolojik ve histomorfometrik olarak değerlendirerek simvastatinin kemik defektlerinin tedavisindeki rolünü incelemektir.

Simvastatinin PLGA mikrokürelerinden (SIM-PLGA) ve simvastatin-SBE7- β -CD (SIM-SBE7- β -CD) komplekslerinden yapılan in vitro salım deneyinin ardından, 24 adet kobayın, sağ ve sol tibialarında yer almak üzere her hayvanda toplam 4 adet kemik defekti oluşturulmuştur. Bu defektler her kobayda, 1. ve 2. deney, aktif ve pasif kontrol bölgelerini oluşturdu. Buna göre randomize olarak 1. deney bölgesinde SIM-PLGA mikroküreleri, 2. deney bölgesinde SIM-SBE7- β -CD kompleksleri uygulanırken, aktif kontrol bölgesinde sadece simvastatin yerleştirilmiş ve pasif kontrol bölgesi boş bırakılmıştır. Kollajen membranlar, defektlerin üzerini örtecek şekilde yerleştirilmiştir. Operasyonların ardından her grupta 12 adet olmak üzere kobaylar, 15. günde erken ve 45. günde geç dönemde sakrifiye edilmişlerdir.

SIM-SBE7- β -CD kompleksleri grubunun erken ve geç dönem yeni kemik oluşumu düzeyi, SIM-PLGA mikroküreleri grubundan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. SIM-PLGA mikroküreleri grubunun erken dönem kemik iyileşmesi düzeyi, SIM-SBE7- β -CD kompleksleri grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Geç dönemde ise SIM-SBE7- β -CD kompleksleri grubu SIM-PLGA mikroküreleri grubunu yakalamıştır. SIM-PLGA mikroküreleri ve SIM-SBE7- β -CD kompleksleri gruplarının geç dönem kemik iyileşmesi düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızın limitleri dahilinde, PLGA mikrokürelerine yüklenen simvastatinin lokal uygulanımı kobayların tibiasında açılan kemik defektlerinde yeni kemik formasyonunu artırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Simvastatin, Deneysel Kemik Defekti, PLGA, SBE7- β -CD, Mikroküreler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31323

ABSTRACT

Soyadı, A.B. Tezin İngilizce Adı. İstanbul University, Institute of Health Science, Anabilim Dalının İngilizce Adı. Doktora Tezi. İstanbul.2014

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

The aim of this study was to evaluate the effect of local application of PLGA microspheres loaded with simvastatin (SIM-PLGA) and simvastatin-SBE7- β -CD (SIM-SBE7- β -CD) complex at the treatment of tibial bone defects by using histologic and histomorphometric techniques.

Following *in vitro* simvastatin delivery experiment from two carriers, four bone defects were created at the right and left tibiae of 24 guinea pigs. These defects created first and second experimental, active and passive control regions in each guinea pig. The first experimental region were filled with SIM-PLGA microspheres whereas the second filled with SIM-SBE7- β -CD complex with simvastatin. Simvastatin applied alone at the active control region and the last defect was left empty as the passive control region. Resorbable membranes were placed over these defects. Each group of 12 guinea pigs were sacrificed at 15th for early and 45th day for late evaluation after surgery.

The new bone formation level at early and late stage SIM-SBE7- β -CD group was significantly lower than SIM-PLGA group. Bone healing level at early stage SIM-PLGA group was significantly higher than SIM-SBE7- β -CD group. At late stage of bone healing SIM-SBE7- β -CD group caught SIM-PLGA group.

In conclusion, within the limitations of this study, local administration of PLGA microspheres loaded with simvastatin promoted new bone formation in tibial defects of guinea pigs.

Key Words: Simvastatin, Experimental Bone Defect, PLGA, SBE7- β -CD, Microspheres

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 31323

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağız, diş ve çene cerrahisinde temel prensip, operasyon sırasında çevre dokulara zarar vermeden atravmatik çalışmak olmalıdır. Ancak tümöral oluşumların tedavisi amacı ile gerçekleştirilen rezektif cerrahiler ve kist entükleasyonları sonrası ya da enfeksiyöz, enflamatuvar ve neoplastik nedenler ile ortaya çıkan patolojik durumlarda, travma ve konjenital deformitelerde kemik dokusunun yeniden yapılandırılması için kemik ogmentasyon prosedürlerine başvurulmaktadır (1,2,3,4,5).

Kemik iyileşmesi, diş hekimliğini ve bir çok tıp dalını yakından ilgilendirdiği için, literatürde en fazla çalışma yapılmış konulardan biridir (6). Uzun yıllardır çeşitli araştırmacılar, yeni kemik yapımını uyaracak nitelikte olan greftler ve biyomateryaller üzerinde çalışmaktadırlar. Bu araştırmalar, kemik defektlerinde yeni kemik oluşturulması ile eski fonksiyon ve estetik yapıya dönüştürülmesini hedeflemektedirler.

Kemik defektlerinin önlenmesi ve rekonstrüksiyonu amacıyla gerçekleştirilen bir çok cerrahi yöntemin yanı sıra lokal veya sistemik olarak etkili ilaç ve materyaller de geliştirilerek incelenmiştir (7,8). Bunlar arasında yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniği, otojen kemik greftleri, allogreftler, ksenogreftler, alloplastlar, mine matriks proteinleri ve büyüme faktörleri yer almıştır. Rejeneratif tedavilerde kullanılan biyomateryaller; osteogenezisi başlatmalı, alıcı tarafından tamamen kabul edilmeli, elde edilebilmesi ve bulunabilmesi kolay olmalı ve maliyeti düşük olmalıdır (9). Greft materyalleri ile çeşitli oranlarda başarı sağlanmışsa da, otojen kemik greftleri ikinci operasyon bölgesi oluşturması ve kısıtlı miktarda kemik elde edilebilmesi gibi dezavantajlara sahiptir. Allogreftlerin ise başta hepatit ve HIV gibi çeşitli kan hastalıkları olmak üzere bazı hastalıkları taşıma riskinin bulunması, maliyetlerinin çok yüksek olması ve dokuların tam olarak rekonstrüksiyonunu sağlayamamaları gibi dezavantajları bulunmaktadır (10,11). Bu olumsuz etkilerden kurtulabilmek, büyük kemik defektlerinin de kendiliğinden iyileşmesini sağlamak veya bölgeye uygulanan kemik greftlerinin entegrasyonunu hızlandırmak amacı ile büyüme faktörlerinin kemik iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu büyüme faktörlerinin osteoindüktif etkisi ispatlanmış, ancak teknolojinin pahalı olması nedeni ile kullanımı kliniğe yeterince yansımamıştır (12,13,14).

Hücresel temelde görev yapan bu yapıların dışında kalsiyum iyon yoğunluğundan sorumlu paratiroid hormon gibi sistemik hormonların belirli koşullar altında kemik iyileşmesi üzerine etkileri de araştırılan konular arasındadır. Paratiroid hormon erkek ve kadınlarda görülen osteoporoz durumlarında vertebral ve vertebral olmayan kırıkların oluşma riskini %35-%65 oranında azaltmakta kullanılan anabolik bir ajandır (15,16). Elde edilmeleri, taşıma ve saklama koşulları zor ve pahalı olan bu yöntem dışında farmakolojik ajanların kemik iyileşmesini uyarıcı etkileri de araştırılan konular arasındadır (17).

Son yıllarda kemik defektlerinde lokal kemik oluşumunun uyarılması için, sistemik olarak kullanılan bazı ilaçların lokal uygulamasının alternatif bir yöntem olabileceği ileri sürülmüştür (18).

Simvastatin, Hidroksimetilglutaril-koenzim A redüktaz (HMG CoA redüktaz) inhibitörü ve antihiperlipidemik statin grubu içerisinde yer alan bir etken maddedir. Yüksek kan kolesterol seviyesi bulunan hastalarda serum kolesterol konsantrasyonunu düşürmek için kullanılmaktadırlar (19). Farmakolojide pleiotropik etki, herhangi bir ilacın geliştirilme amacının dışında gösterdiği etkiler için kullanılan bir terimdir. Statin grubu ilaçların, kolesterol düşürücü etkilerinin dışında sinir sistemi, immün sistem ve iskelet sistemi üzerinde de bazı yararlı pleiotropik etkilere neden olduğu belirtilmektedir (20). Statinler, osteoklastların aktivasyonunu inhibe ederler ve kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) geninin açığa çıkmasını sağlarlar. Bu şekilde iskelet sistemi üzerinde kemik oluşumunu arttırarak yararlı etki göstermektedirler (19,21).

Çalışmamızın amacı, kobayların tibiasında kritik boyutlarda oluşturulan kemik defektlerine uygun dozda ve uygun taşıyıcı ile lokal simvastatinin uygulaması sonrası oluşacak değişikliklerin histolojik olarak değerlendirilerek simvastatinin bu kemik defektlerinin tedavisindeki rolünü incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK

2.1.1. Kemik Dokusu

Kemik, biyomekanik ve mekanik özellikleri nedeniyle insan vücudu için yapısal önem taşıyan, vücuda mekanik dayanıklılık sağlayan, yumuşak dokulardan meydana gelmiş yapıları destekleyen, kalsiyum-fosfat dengesini sağlayan, hematopoez için uygun çevreyi sağlayan özelleşmiş bir bağ dokusudur. Kemik aynı zamanda kendisini yapısal olarak tamir edebilen, mineral depolama özelliği sayesinde hücre dışı sıvı dengesinin korunmasında rol oynayan bir yapıya sahiptir (22–24).

Kemik dokusu, kemik matriksi ve çeşitli kemik hücrelerinden (osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar) meydana gelmiştir.

2.1.2. Kemik Hücreleri

Kemiğin gelişiminde 4 tip hücre vardır.

- 1)Osteoprogenitör hücre
- 2)Osteoblastlar
- 3)Osteoklastlar
- 4)Osteositler

2.1.2.1. Osteoprogenitör Hücreler

Embriyonel mezenkimden kaynağını alan ve periost ile endost tabakalarında bulunan osteoprogenitör hücreler, stromal hücrelerin farklılaşması ile oluşurlar. Mitoz bölünme ile çoğalırlar (25).

Büyüme–gelişme döneminde aktif olan bu hücreler, erişkin hayatta kırık iyileşmesinde ya da farklı yaralanma türlerinde aktifleşip; osteoblast veya osteoklast gibi diğer kemik hücrelerine dönüşebilirler (26).

2.1.2.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasıyla oluşan kübik şekilli hücrelerdir. Kemik matriksi sentezinden, yeniden şekillenmeden (remodeling) ve

kemiğin onarımından sorumludurlar. Kemiğin herhangi bir travma sonucu yaralanması sonrasında kemiğin formunu ve fonksiyonunu geri kazanmaya çalışırlar (27–29).

Osteoblastlar metabolik olarak aktif salgılayıcı hücrelerdir. Kollajen, kollajen yapıda olmayan proteinler, birçok sitokin, alkali fosfataz, prostaglandinler ve nötral proteazlar salgılamaktadırlar (23). Sentezledikleri kollajenle mineralize olmayan kemik matriksi oluşturmakta ve daha sonra bu yapının kalsifiye olmasını sağlamak için kalsiyum ve fosfat iyonlarının kemik içine ve dışına salınımlarını düzenlemektedirler (30).

Elektron mikroskopunda osteoblastların serbest ribozomu, gelişmiş golgi bölgesi çok sayıda girintili çıkıntılı endoplazmik retikulumları ve mitokondrileri görülebilmektedir. Geniş ovoid çekirdek, dış merkezli olarak yerleşmiştir (24,31).

Osteoblastlar, osteoklastlarla birlikte kemik yapım–yıkım döngüsünde rol almaktadırlar. Osteoblastlar, paratiroid hormonu, prostaglandinler, D vitamini metabolitleri, adrenal ve gonadal steroidler, sitokinler ve lenfokinler gibi moleküllere özel reseptörler içermektedirler (32).

Osteoblastların aktif yaşam ömrü 1-10 hafta arasındadır. Bazıları kemik yüzeyini döşeyen hücrelere, %15’lik bir kısmı ise osteosite dönüşür (24,31).

2.1.2.3. Osteoklastlar

Kemik dokusunun rezorpsiyonu ve yeniden şekillenmesini sağlayan, sitoplazmik uzantıları olan çok çekirdekli, dev hücrelerdir (23). Kemik iliğindeki granülosit-makrofaj hücrelerinden kaynağını alan osteoklastlar, kemik rezorpsiyonunun başladığı bölgelerde yer alan rezorpsiyon kavitelerinde ve Howship lakünleri adı verilen boşluklarda bulunurlar. Osteoklastların kemik yüzeyine yakın olan kısımları, mineralize yüzeye tutunarak rezorpsiyon bölgesini belirlemektedir. Bu özellikleriyle osteoklastlar, kemik matriksinin hem organik hem de inorganik kısımlarının çözünmesini sağlamaktadır. Osteoklastlar osteoblastlarla birlikte mekanik streslere bağlı olarak kemiğin şekillenmesine olanak sağlamaktadırlar.

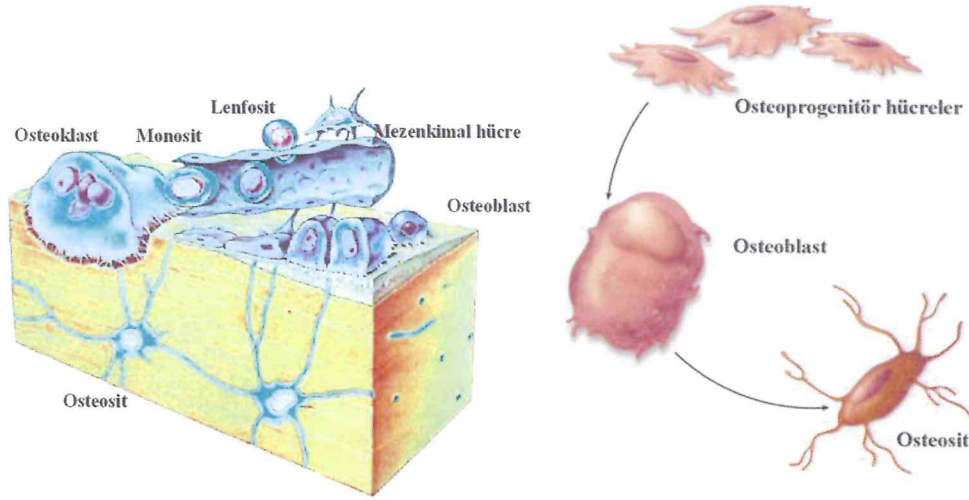
Kemik mineral yapısını çözerek kalsiyumun açığa çıkmasını sağlayan osteoklastların etkileri bifosfonatlar, kalsitonin östrojen hormonlarının etkileriyle azalırken; paratiroid, tiroksin hormonları ve D vitamini ile artmaktadır (33,34).

2.1.2.4. Osteositler

Osteositler kemik matriksindeki lakünler içerisinde bulunan olgun osteoblastlardır. Her lakünde sadece bir osteosit bulunmaktadır. Ortalama olarak 1mm^3 kemikte 20000 ile 30000 arasında bulunarak olgun kemik dokusunda en fazla bulunan hücre tipidir.

Osteositler boyut olarak kaynak hücreleri osteoblastlara göre küçülürken kanülükuliler içinde sitoplazmik uzantılara sahip olurlar. Bu şekilde osteositler hücre lakünası içinde gömülü kalmayıp komşu osteositlerle, osteoblastlarla, kemik yüzeyini döşeyen hücrelerle, periosta ait hücrelerle ve damarsal yapıyla iletişim halinde olurlar (Şekil 2.1). Bu yapılar aracılığıyla moleküller hücreden hücreye aktarılırlar. Kemik matriksinin yapısal ve metabolik bütünlüğünün korunmasını sağlarlar.

Yaşam süreleri kemik turn-over hızına bağlı olmakla birlikte genellikle uzun ömürlüdürler. Ortalama ömürleri birkaç yıldır. Yaşlanmayla, östrojen hormonunun azalmasıyla ve glukokortikoid yapıda hormonların artmasıyla osteositlerin sayısı azalmaktadır (23,33,35,36).



Şekil 2-1: Kemik hücrelerinin ve farklılaşma yollarının şematik gösterimi (24).

2.1.3. Kemik Matriksleri

Kemik dokusunun matriks kısmı organik matriks ve inorganik matriks olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Her iki bölümde de kemiğin fiziksel özellikleri önemlidir (37).

2.1.3.1. Organik Matriks

Kemiğin kuru ağırlığının %35'ini oluşturan organik matriksine osteoid madde denir. Kemiğin formunu veren ve inorganik tuzların şekillenmesini sağlayan organik matriks, %90'dan fazla bir oranda Tip I kollajenden oluşmaktadır. Bu kollajen osteoblastlar tarafından üretilmektedir (38). Kollajen ve hidroksiapatitin oran ve dizilimleri kemiğin mekanik kuvvetlere karşı olan direncini belirlemektedir. Kollajen, kemiğe çekme kuvvetlerine karşı direnç ve esneklik kazandırmaktadır. Kemik içinde bulunan kollajenin ortadan kaldırılması halinde kemiğin orjinal şekli bozulmamakta ancak kolayca kırılabilir hale gelmektedir (35).

Organik matriksin geriye kalan %10'luk kısmı kollajen yapıda olmayan proteinlerden oluşmaktadır. En sık rastlanılan nonkollajen proteinler osteokalsin, osteonektin, osteopontin ve kemik siyaloproteinleridir. Nonkollajenöz proteinler büyüme faktörlerinin regülasyonunda, organik matrikse tutunmalarında ve organik matriksin kalsifikasyonunda görevlidir. Fibronektin temel ekstrasellüler matriks adezyon molekülüdür. Osteopontin ise osteoklastların kemik yüzeyine tutunmalarını sağlar (39).

2.1.3.2. İnorganik Matriks

Kemiğin inorganik matriksi, kemiğin mineralize kısmıdır ve kemik kuru ağırlığının %65'i kadardır. İnorganik maddeler içinde kalsiyum ve fosfat tuzları en yüksek oranda bulunurken, daha sonra bikarbonat ve sitrat tuzları gelmektedir. Ayrıca magnezyum, potasyum, sodyum gibi elementlerin tuzları da bulunmaktadır (24).

Elektron mikroskobu çalışmaları, kollajen fibrilleri arasındaki hidroksiapatit kristallerinin yüzey iyonlarının hidrate olarak su ve iyonlardan oluşabilen bir tabaka bulundurduğunu ortaya çıkarmışlardır. Böylelikle doğal halinden çok daha kolay çözünebilen kristallerin gerektiğinde kalsiyum, fosfat veya magnezyum iyonlarını ekstrasellüler sıvıya aktarması ile vücut iyon dengesi sağlanmaktadır (40).

Hidroksiapatit, kemiğe sertlik katarak, kemiğin baskı kuvvetlerine karşı direnç göstermesini sağlar. Dekalsifiye olup mineralize yapısından kurtulmuş olan kemik örnekleri, şekillerini kaybetmez ama bir kırık gibi esnek hale gelirler (35).

2.1.4. Kemik Zarları

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan oluşan zarlarla örtülüdür. Dıştakine periosteum, içtekine endosteum denir.

2.1.4.1. Periosteum (Periost)

Periost, vasküler konnektif bağ dokusudur. Eklem yüzeyleri dışında tüm kemik yüzeylerini dıştan çevreler. Bu tabaka kemiğe destek sağlar, kemiğin beslenmesi, gelişimi ve tamiri gibi önemli olgularda büyük rol oynar. Dışta fibröz, içte osteojenik olmak üzere iki tabakadan oluşur. Fibröz tabaka kollajen fibriller ve fibroblastlardan oluşur. Osteojenik tabaka ise daha ince ve zayıftır. Gevşek bağ dokusunda olup, osteojenik potansiyele sahip osteoprogenitör hücreden zengindir.

Tabakaların her birinin fonksiyonu farklıdır. Fibröz tabaka (dış tabaka), metabolizmada rol alan damarları ve lenfatikleri içerir. Osteojenik tabaka (iç tabaka) hücreleri ise kemik hasarında osteoblast haline dönüşerek yeni kemik oluşumunu sağlar. Kemik onarımına katılan bu hücreler normal koşullarda aktif değildirler (41,42,43).

2.1.4.2. Endosteum (Endost)

Endost tabakası kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemlerini çevreleyen retiküler bağ dokusudur. Periosteumdan daha incedir ve tek tabaka osteojenik hücre içerir. Bu tabakanın kemik doku yanında hematopoetik hücreleri yapabilme özelliği vardır (41,42,43).

Periost ve endostun temel işlevi, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastların aralıksız olarak üretilmesidir. Bu nedenle kemik cerrahisinde periosteum ve endosteumun korunmasına çok dikkat edilmelidir (24).

2.1.5. Kemik Tipleri

Kemik mikroskobik olarak incelendiğinde 2 farklı tipte olduğu görülmüştür.

- 1) Primer, *olgunlaşmamış*, kemik
- 2) Sekonder, *olgun veya lameller*, kemik

2.1.5.1. Primer Kemik Dokusu

Primer kemik, embriyolojik gelişim sürecinde kırık ve diğer onarım işlemlerinde ilk ortaya çıkan kemik türüdür. Primer kemik geçicidir ve yetişkinlerde kafadaki yassı kemik eklemleri, diş alveolleri ve tendonların kemiğe tutunduğu yerler gibi birkaç yer dışında yerini sekonder kemiğe bırakır (44). Primer kemik dokusunda kollajen lifleri düzensiz bir yapıda bulunmaktadır. Mineral içeriği sekonder kemiğe göre daha düşükken içerdiği osteosit oranı daha yüksektir (40). Mineral içeriği az olması

nedeniyle mekanik direnci düşüktür. Bu kemik tipi oldukça hızlı (günde 30-50 μm) oluşur (45).

2.1.5.2. Sekonder Kemik Dokusu

Olgunlaşmış kemik olarak adlandırılan sekonder kemik daha çok yetişkinlerde primer kemiğin remodeling sonrası yerini sekonder kemiğe bırakması sonucu oluşmaktadır. 3-7 μm kalınlığında lamellerden oluşmaktadır. Sekonder kemik matriksi primer kemik matriksine göre daha kalsifiedir. İyi organize olmuş kollajen protein ve mineralizasyon, sekonder kemiği son derece kuvvetli ve dayanıklı bir kemik haline getirmektedir. Sekonder kemik (günlük ortalama 0,6–1 mm hızla) primer kemiğe oranla çok daha yavaş oluşmaktadır (40,46).

Sekonder kemik, kortikal (kompakt) kemik ve kansellöz (spongiyöz ya da trabeküler) kemik olarak iki farklı yapıdadır.

A)Kansellöz (Spongiöz) Kemik

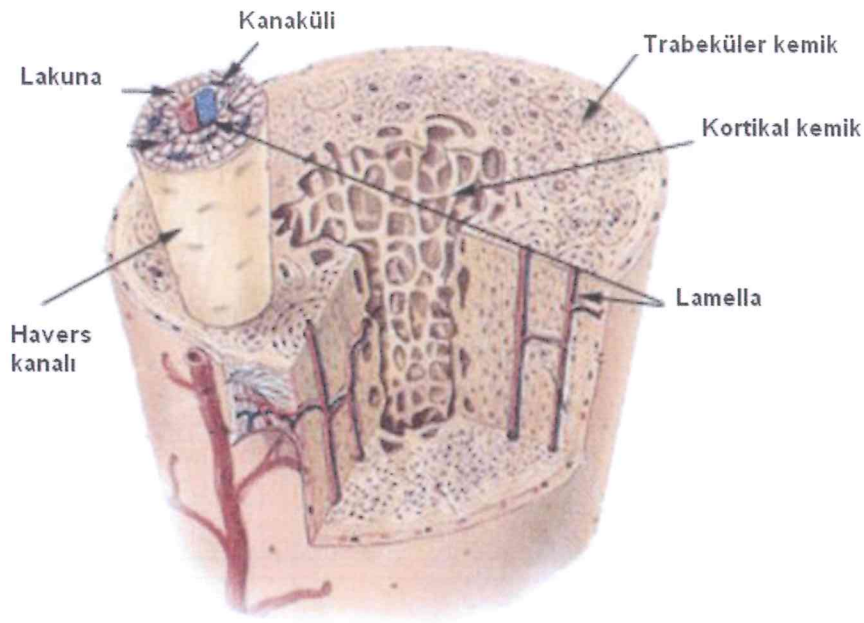
Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ve yassı kemiklerin iç yüzlerinde bulunan kansellöz kemik, trabeküler ya da spongiöz kemik olarak da adlandırılır. Vücut kemiklerinin hacimsel olarak %20'sini oluşturmaktadır. İki kortikal kemik tabakası arasında bulunan süngerimsi kemiktir. Makroskopik olarak gözlenebilen ve trabekül adı verilen üç boyutlu her biri yaklaşık 200 μm kalınlığında kafes tarzında yapısal elementlerden oluşur. Trabeküllerin arası kan ve kemik iliğiyle doludur. Kan damarları kansellöz kemiğin medial kemik kavitesindeki kemik iliğine besin taşır (6, 47, 48).

B)Kortikal (Kompakt) Kemik

Kompakt kemik olarak da isimlendirilen kortikal kemik yassı kemiklerin iç ve dış tabakalarını, uzun kemiklerin ise yalnız dış yüzünü oluşturmaktadır. İskelet sisteminin yaklaşık %80'nini oluşturmaktadır. Homojen, sıkı ve kompakt bir yapıdadır. Gelen kuvvetlere karşı direnç gösterme ve hayati organları korumak gibi görevleri bulunmaktadır (49).

Kompakt kemik iç içe geçmiş halkalar biçiminde, kemiğin uzun eksenini boyunca lamel adı verilen mikroskopik matriks tabakaları içerir. Kanallar ve onu çevreleyen bu lamellerin bütününe Havers sistemi ya da osteon adı verilir (50). Havers kanal sistemleri kemiğin uzun eksenine paralel olarak dizilmişlerdir. Osteonlar ortalama olarak 200 μm

çapındadırlar ve osteonların ortasında kan damarları ve sinirleri barındıran yaklaşık 50 µm çapında Haversian kanalları bulunmaktadır. Havers kanal sistemi içerisindeki damar-sinir paketi ile bağlantılı, osteonların kendi aralarında ve kemik dış yüzeyi ile iletişimini sağlayan kemik yüzeyine dik seyreden Volkmann Kanalları bulunmaktadır. Bu kanal sistemleri Havers kanallarına dik veya oblik olarak bağlanırlar. Bu kanalların çevresinde herhangi bir lamel oluşumu bulunmamaktadır. Lameller yapının içerisinde osteositler bulunmaktadır. Havers ve Volkman kanalları ile osteositlerin kendi arasındaki iletişimini, kanaküli adı verilen ayrı bir ağ sistemi sağlamaktadır (40,51,52)(Şekil 2.2).



Şekil 2-2: Havers Kanallarının Şematik Görüntüsü (42).

2.1.6. Kemik Büyümesi ve Gelişiminin Evreleri

Kemikte büyüme ve gelişme embriyonik dönemde başlayıp, genç erişkin döneme kadar devam eder. İntramembranöz ve endokondral olmak üzere 2 tür kemikleşme vardır.

2.1.6.1. İntramembranöz Kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme, mezenkimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesidir (59). Mezenkim membran giderek kan damarlarından zenginleşir. Mezenkim hücreleri hızlı bölünme göstererek, kemikleşme merkezinde osteoid madde sentezini yapan osteoblastlara farklılaşırlar. Osteoid madde mineralize olur.

Mineralizasyon ilerledikçe lakünalar içinde hapis olan osteoblastlar osteositlere dönüşürler ve osteositler arası ince sitoplazmik uzantılarla bağlantı kurulur. Kemikleşme merkezinin yüzeyindeki osteoblastlar mitozla çoğalarak kemik oluşumu artar. Bu şekilde oluşan kemik birikimi ışınsal yayılım gösterir ve komşu olan kemikleşme merkezlerini birleştirirerek yeni kemik oluşumunu sağlarlar. Kollajen liflerinin düzensiz olduğu bu yapı, osteoklastların rezorpsiyonu ve osteoblastların yeni kemik oluşturmasıyla yeni kansellöz ya da kompakt kemiğe dönüşürler. Gelişmekte olan kemik dokusu içinde kalan ilkel mezenkim dokusu da kemik iliğini oluşturur (23,53)(Şekil 2.3-A).

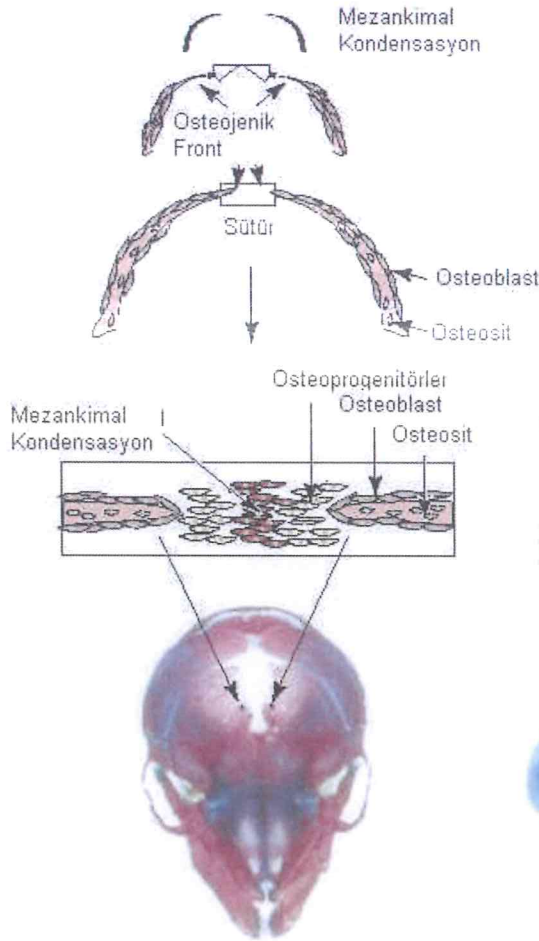
Kafatasının frontal, parietal kemikleri, oksipital ve temporal kemiklerin bir kısmı, mandibula ve maksiller kemiklerin bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile meydana gelmektedir (23,53,54,55).

2.1.6.2. Endokondral Kemikleşme

Uzun ve kısa kemiklerde görülen endokondral kemikleşme, doğum öncesi başlar ve büyüme tamamlanıncaya kadar devam eder. Endokondral kemikleşmede, mezenkim doku kemiğin yetişkin şeklinin küçük bir hiyalin kıkırdak modelini oluşturur ve kemikleşme bu kıkırdak model içinde başlar (56). Endokondral kemikleşme iki aşamada gerçekleşir. İlk aşama kemik modelindeki kondrositlerin hipertrofisi ve harabiyetidir. İkinci aşama ise, indifferent mezenkim hücrelerinin kıkırdağı rezorbe etmeleri ve osteoblastların oluşmasıdır (57,58)(Şekil 2.3-B).

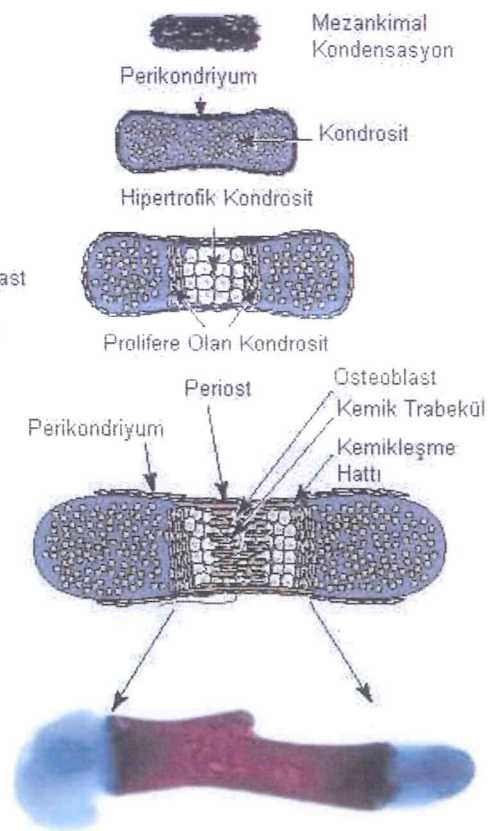
Endokondral kemikleşme uzun kemiklerdeki epifiz bölgesinde ve mandibula kondil başında oluşur. Gelişimde kemiğin uzunlamasına büyümesini sağlar. Kemiğin enine büyümesi ise apozisyonel kemik oluşumuyla gerçekleşir. Kemikleşme sona erinceye kadar kıkırdak hücreleri bölünüp çoğalarak devamlı kıkırdak dokusu yapar, bu kıkırdak da yerini kemik dokusuna bırakır. Böylece kemikler belli bir yaşa kadar uzamaya devam eder (59,60).

Intramembranöz Osifikasyon



A

Endokondral Osifikasyon



B

Şekil 2-3: İntramembranöz ve endokondral kemik oluşumlarının karşılaştırılması (60).

2.1.7. Kemiğin Şekillenmesi

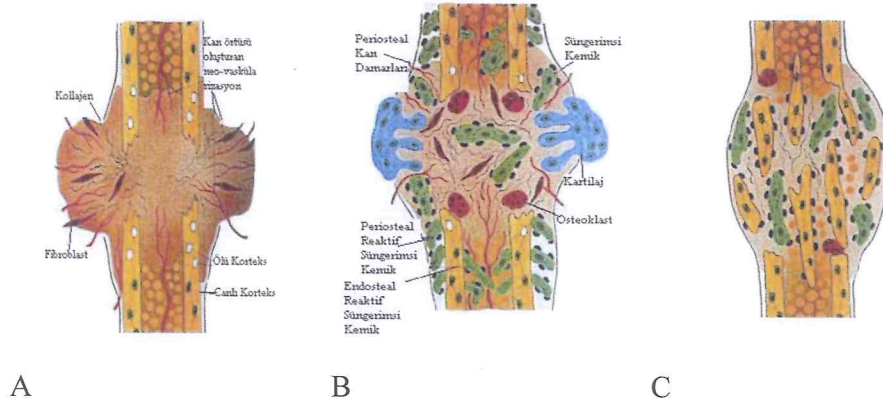
Kemiğin şekillenmesi (modeling) ve büyümesi birbirini takip eden olaylardır. Büyüme kontrol eden yerel etkenler aynı zamanda bu yapılanmaya uygun bir kemik şekillenmesi de başlatırlar. Şekillenme süreci genel olarak, rezorpsiyon ve yeni kemik oluşumu mekanizmaları sayesinde kemik yüzeylerine daha fazla kemik dokusu eklenmesi ya da var olan kemik dokusunun azalması şeklinde tanımlanabilir. Büyüme sırasında yeni kemik oluşumu kemik yıkımından daha fazladır. Şekillenme olayı kemiklerin büyümesini, şeklini, direncini ve anatomik özelliklerini belirler. Bununla birlikte şekillenme, kortikal tabakanın kalınlığını artırarak ve kemik iliğinin bulunduğu boşluğun çapını genişleterek uzun kemiklerin uç kısımlarını şekillendirir. Ayrıca

kafatası konturlarının değişmesinden de sorumludur. Erişkinlik dönemi ile beraber etkinliğini yitirmektedir (23,61).

2.1.8. Kemiğin Yeniden Şekillenmesi (Remodeling)

Kemiğin yeniden şekillenmesi (remodeling) ile kemiğin metabolik ve biyomekanik olarak çevre şartlarında varlığını sürdürebilecek yapıda olabilmesi sağlanmaktadır. Metafizde oluşan olgunlaşmamış kemik, yapısal olarak olgun kemikten daha kalitesizdir. Bununla birlikte ilerleyen yaşla birlikte erişkin bireylerde kemik kalitesi düşer. Bu nedenle eksilen kemiğin yerine konması veya yenilenmesi gerekir. Bu işlem, kalitesi düşük olan kemiğin yerine, sırasıyla yıkım ve yeni lameller kemik yapımıyla gerçekleşen yeniden şekillenme ile olur (Şekil 2.4). Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun daha düzenli lameller kemiğe dönüşümüdür (62).

Bu yeniden şekillenme süreci aylar hatta yıllarca sürebilir. Ancak genellikle yeterli kuvvetteki bir kemiğin oluşumu yaklaşık 6 ayda tamamlanır. Erişkin bir bireye ait kortikal kemiğin turnover (kendini yenileme) hızı 20 yıl, kansellöz kemiğin ise 1-4 yıldır (63,64).



Şekil 2-4: Yeniden Şekillenme Safhalarının Şematik Görüntüsü A.İnflamasyon, B.Tamir, C.Yeniden Şekillenme (62).

2.1.9. Kemik İyileşmesi

Kemik iyileşmesi, skar dokusu oluşmasına neden olmaksızın kemik anatomisinin ve fonksiyonun tam olarak geri dönmesi ile sonuçlanan karmaşık bir süreçtir. Kemik dokusunun iyileşmesi iki şekilde gerçekleşir. Birincil (Primer) iyileşmede (direk temas iyileşmesi) intramembranöz kemikleşme gözlenmektedir. Fragmanlar arası boşluk yoktur ve rijit stabilizasyonda gerçekleşir. Primer iyileşmede kartilaj oluşma safhası yoktur. Osteoklastlar iki fragmanın ucundaki nekrotik dokuları

rezorbe ederken; osteoblastlar lameller kemiği kemiğin uzun eksenine paralel olacak bir şekilde oluştururlar (40,65,66). İkincil (sekonder) iyileşmede ise organizma kırık bölgesini dışarıdan saran bir kallus oluşumu ile hareketsizliği sağlar ve kırık bölgesini endokondral kemikleşme ile tamir eder (67).

Sekonder kemiğin iyileşmesi, yangı (enflamasyon) fazı, onarım (reperasyon) fazı ve yeniden şekillenme (remodeling) fazı olmak üzere 3 fazda oluşmaktadır (Şekil 2.5).

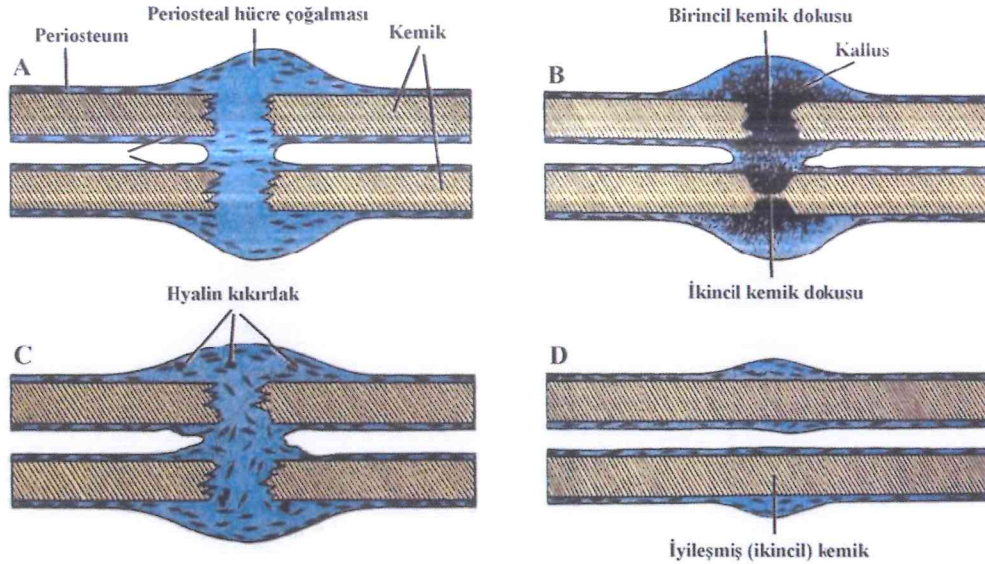
Enflamasyon fazı, travmadan sonra birkaç saat içinde başlar ve gelişen yumuşak kallusla yer değiştirene kadar bir kaç gün devam eder (68). Vazokonstriksiyon, vazodilatasyon, pıhtı oluşumu (hemostaz), fagositoz (lökositöz), yeniden damarlanma ve granülasyon dokusunun sentezini içerir (69). Vazodilatasyon ile kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşur. Polimorf çekirdekli lökositler, monosit ve lenfositleri içeren enflamasyon hücreleri ödemli bölgeye doğru göç eder. Bu sırada ortama interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-11 (IL-11) gibi iltihapsal sitokinler ve TGF- β gibi büyüme faktörleri salgılanır (70).

Yaralanma sonrası periostun yırtılması ve çevre dokulardaki damarların hasar görmesi ile kanama meydana gelir. Kanama sonucu bölgede hematoma oluşur ve trombosit ve trombotik faktörlerin ortama salınmasıyla hızla pıhtılaşır. Hematomun basıncı ile kırık uçlarının bir arada tutulması sağlanır. Ortama toplanan mezenkim hücreleri pıhtıyı organize ettikten sonra içe doğru büyüyen kapillerler ile birlikte pıhtı, 3 ya da 4 gün içerisinde granülasyon dokusu ile yer değiştirir (71).

Onarım fazında, mezenkimal kaynaklı, çok yönlü gelişebilme özelliği olan hücreler rol almaktadır. Organize hematoma çevresindeki damarlardan fibroblast infiltrasyonu gelişerek osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar 7 gün içinde immatür vaskülarize kallus dokusunu oluşturur. Bu yapı; fibröz dokudan, kırıldaktan ve olgunlaşmamış kemik dokusundan oluşur ve damarlanması çoktur. Osteoblastlar tropokollajen salgılayarak kollajen liflerin dizilimini düzenlerler. Bunların üzerine kalsiyum iyonları çökerek sert kallus oluşur. Kallusun etkisiz kısımlarının rezorpsiyonu ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzaması ile yeniden şekillenme evresi başlar (55,72,73).

Şekillenme fazı, kemik iyileşmesinin en son ve en uzun süren fazıdır. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun daha düzenli lameller kemiğe dönüşümüdür. Onarım evresinin ortasında başlayıp insanlarda 4-16 hafta sürerken, yıllar boyunca da devam

eder (62). Osteoblastlar sinyal faktörleri ile aktive olurlar ve bir kemik bölgesini boşaltırlar. Ardından osteoklastlar stimule olur ve osteoblastların açığa çıkardığı alana tutunarak rezorpsiyona başlarlar (74). Osteoklastik rezorpsiyon alanları (howship's lakünleri) osteoblastlar tarafından doldurulur ve daha sonra kalsifiye olup kemik oluşturacak osteoidi salgırlarlar (Şekil 2.5)(75).



Şekil 2-5: Kortikal kemiklerde kemik iyileşme süreci (75).

2.1.9.1. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kemik iyileşmesini etkileyen faktörler, lokal ve genel faktörler olarak iki ana başlık altında toplanır. Lokal faktörler travmanın derecesi, yara uçlarının konumu, yara bölgesinin kanlanması, kemiğin tipi, immobilizasyon derecesi, lokal nekroz, yumuşak doku hasarının derecesi ve enfeksiyon varlığından oluşmaktadır. Yaş, diabet, anemi, tüberküloz gibi sistemik hastalıklar, paratiroid hormonu, kalsitonin, insülin, büyüme hormonu gibi hormonlar ve A, C ve D vitaminleri ise genel faktörleri oluşturmaktadır (76,77).

2.1.10. Kemik Greftleri

Doku ve organların kazanılmış veya konjenital defektlerinin rekonstrüksiyonunda yer tutucu ve kemik yapımını uyarıcı etkisi olan materyallere greft adı verilir. Dental enfeksiyonlar, alveolar travma, komplikasyonlu diş çekimleri ve periodontal hastalıklar, lokalize ya da yaygın kemik defektlerine neden olabilmektedir (78-80). Bu noktada kemik grefti uygulamaları, uygun kemik hacmi ve morfolojisinin yeniden oluşturulması için tedavi seçeneklerinden birini oluşturmaktadır (81,82). Kemik

doku mühendisliğinin temeli, kemiğin istenen anatomik bölgesinde kemik iyileşmesi için yanıt oluşmasına dayanmaktadır. Klinik başarı, oluşan kemiğin yeniden şekillenme sonucu çevre kemik dokusu ile yapısal olarak bütünleşmesi (integrasyon) ve oluşan kemiğin fonksiyon görmek için yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olması ile belirlenir. Kemik greftlerinin biyolojisinin anlaşılması için osteointegrasyon, osteokondüksiyon, osteoindüksiyon ve osteogenezis kavramlarının açıklanması gerekir (83-85).

Osteointegrasyon: Greftin arada fibröz doku oluşumuna yol açmayacak şekilde alıcı kemik yüzeyine kimyasal olarak tutunabilmesidir.

Osteokondüksiyon: Alıcı kemikten vasküler ve perivasküler yapıların grefte ilerlemesi için greftin çatı görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilmesidir.

Osteoindüksiyon: Plüripotent hücrelerin çevre dokuda osteoblastik fenotipe dönmelerini uyurabilmektir.

Osteogenezis: greft materyali içerisindeki hücrel elemanların transplantasyon sonrası hayatta kalarak, nakledilen alanda yeni kemik oluşturabilmesidir. Yeni kemik dokusu ortaya çıkabilmesi için öncelikle kemiği meydana getirebilecek yeterli sayıda “osteojenik progenitor hücreler” ortamda bulunmalıdır.

İdeal kemik greft materyalinin özellikleri şu şekilde özetlenebilir:

1. Antijenik özellik taşımamalı,
2. Karsinojenik ve toksik olmamalı,
3. Yapısal olarak güçlü ve dayanıklı olmalı; yeterli destek ve stabiliteyi sağlayabilmeli,
4. Enfeksiyona dayanıklı olmalı,
5. Kök rezorpsiyonu ya da ankiloza neden olmamalı,
6. Kolay uygulanabilmeli ve istenilen forma kolayca getirilebilmeli,
7. Hızlı ve yeterli miktarda elde edilebilmeli,
8. Minimal cerrahi işlemle kullanılabilmesi,
9. Maliyeti ucuz olmalı,
10. Osteoindüktif ve kondüktif özellikleri olmalı,
11. Yeni ataşmanı tetiklemelidir (143).

Organ veya doku grefti uygulamalarında transplante edilen materyaller immünolojik orijinlerine göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır (1,88):

1. Otojen greftler: Aynı canlıdan alınan dokulardır.

2. Allojenik greftler (Allogreftler) veya implantlar: Aynı türden fakat genetik olarak alıcıyla hiçbir benzerliği olmayan canlılardan alınan dokulardır.

3. İzogen greft veya implantlar (İzogreft ya da Syngenesioplastik greft): Alıcı ile aynı genetik yapıya sahip canlılardan alınan dokulardır.

4. Xenojenik implantlar (Xenogreftler): Alıcıdan farklı bir türden olan vericiden alınan dokulardır.

5. Alloplast greftler: Bu greftler sentetik olarak üretilirler.

Küçük defeklerde partiküler kemik greftlerinin kullanımı önerilirken; kemik defekti orta dereceli olduğunda kortiko-kansellöz blok greft kullanımı önerilmektedir (89-94).

Otojen greftler: Alveoler atrofi ve kemik defektlerinin tedavisinde halen en başarılı seçenek olmaya devam etmektedir ve ağız içinden kolaylıkla elde edilebilmektedir. Otojen dokuların transplantasyonları bazı cerrahi ve teknik problemler taşısalar da immünolojik komplikasyona neden olmazlar. Taze otojen greftin osteojenik hücreler bulundurması ve immünolojik reaksiyona neden olmaması en önemli avantajlarıdır (88,95,96).

Allojenik greftler: Aynı türden fakat genetik olarak farklı bireylerden alınan greftlerdir. 3 grupta incelenirler. Bunlar: Dondurulmuş (frozen), dondurulmuş kurutulmuş (frozen-dried) ve dondurulmuş-kurutulmuş-demineralize (freze-dried demineralized) allojen greftlerdir (78).

Xenogreftler diğer türden canlılardan alınan greft çeşitleridir. Organik yapılar tamamıyla çıkartılır. Bu sebeple immünolojik reaksiyon ile ilgili herhangi bir olumsuzluk yaşanmamaktadır. İnorganik bölümden iyi bir kalsiyum kaynağı olarak doğal bir iskelet matriks görevi görmesi beklenmektedir. Bu inorganik yapı aynı zamanda, ogmentasyon sırasındaki remodelling için fiziksel boyutta iyileşmeye yardımcı olur (78,97).

Alloplast kemik greftleri ise sentetik olarak üretilirler. Osseöz defektlerin tamirinde ve kemik kalınlığının artırılmasında kullanılırlar. Kimyasal yapısı, fiziksel formu ve yüzey konfigürasyonundaki değişiklikler ile biorezorpsiyon seviyeleri çeşitlenmektedir (78,98).

2.1.11. Bariyer Membranlar

Bariyer membranların mekanizması ilk olarak 1980 yılında periodontal dokuların cerrahi sonrası iyileşmesini inceleyen Nyman ve ark. tarafından açıklanmıştır (99). Araştırmaları sonucunda yaraya gelen ve migrasyona uğrayan hücrelerin o bölgedeki doku rejenerasyonun tipini belirlediğini söylemişlerdir. İstenilen hücrelerin yara bölgesine girmesine izin verilmesi, istenmeyen hücrelerin de engellenmesi amacıyla bariyer membranlar kullanılmaya başlanmıştır (99,100).

Bariyer membranlar rezorbe olmayan ve rezorbe olabilen membranlar olmak üzere iki grupta incelenirler.

2.1.11.1. Rezorbe Olmayan Membranlar

Rezorbe olmayan bariyerler klinikte ilk kullanılan materyallerdir. Dokuya yerleştirildiği andan itibaren yapısal bütünlüğünü korur. İçeriğindeki ve dizaynındaki bu stabilite, uygulama süresince cerraha tam bir kontrol imkanı verir.

Rezorbe olmayan membranların en büyük dezavantajı, materyali çıkarmak için ikinci bir cerrahi işlem gerektirmesidir. İkinci cerrahi beraberinde hasta anlayışını ve uyumunu, zamanı, maliyeti ve morbiditeyi getirir. Diğer yandan membranın ekspoze olma riski yüksektir (%31'den fazla)(101). Bu da potansiyel komplikasyonlara ve başarısızlıklara neden olmaktadır. Membranın ekspoze olması, oral çevre ile yeni oluşan dokular arasında bir geçiş oluşmasına neden olur. Enfeksiyon riski artmakla birlikte kemik rejenerasyonu potansiyeli de azalır. Bu dezavantajlar rezorbe olan membranların gelişmesine neden olmuştur (91,101).

2.1.11.2. Rezorbe Olabilen Membranlar

Rezorbe olabilen membranlarda degradasyon genellikle hidroliz yoluyla olur. Bu da kemik formasyonu üzerinde negatif etkisi olan asit çevrenin oluşmasına neden olur. Sadece kollajen membranlar normal doku döngüsüne benzer şekilde katabolik süreç ile rezorbe olurlar. Bu sayede hasta konforunu azaltan ikinci cerrahi gereksinimi ortadan kalkar.

Sinüs membranı perforasyonu onarımında olduğu gibi yeniden opere edilerek membranın çıkarılamayacağı bazı durumlarda, rezorbe olmayan membranların kullanılması kontrendikedir.

Rezorbe olabilen membranların sahip olması gereken özellikler şu şekilde sıralanmıştır:

1. Toksik ve antijenik olmamalıdır.
 2. Kabul edilebilir kullanım özelliklerine sahip olmalıdır.
 - Dokuyu destekleyebilecek yumuşaklığa sahip olmalıdır.
 - Boşluk oluşturabilmesi ve bunu koruyabilmesi gereklidir.
 - Defekt şekline uyabilme özelliğine sahip olmalıdır.
 3. Doku örtümünü desteklemeli ve bariyerin açığa çıkma oranını azaltmalıdır.
 4. Cerrahi sırasında flep ataçmanını artırmalıdır.
Flep ve bariyer arasında cep ve torba oluşum sıklığını azaltmalıdır.
 5. Bakteri ekimine ve kontaminasyonuna dirençli olmalıdır.
 6. Defekt içine seçilmiş hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu artırmalıdır.
- (102)

Rezorbe olabilen materyaller doğal ve sentetik olarak 2'ye ayrılırlar.

- 1) Doğal Ürünler: Kollajen, biyolojik ve fiziksel özellikleri ile kolay temin edilebilirliği nedeniyle biyomateryallerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekstrinsik kollajen hemostatik aktiviteyi artırarak fibroblastları çekebilme ve aktive edebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca yara iyileşmesi ve remodelinginde çeşitli hücrelerle etkileşime girer. Bu biyolojik aktiviteler düşük immünojenite ile birleşince kollajen tercih edilen bir materyal olmaktadır. Amerikan FDA (Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından kollajen materyalinin güvenilir ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda kullanılabilir olduğu sonucuna varılmıştır.
- 2) Sentetik Ürünler: Sentetik absorbe olabilen materyaller genellikle alifatik termoplastik polimerlerden imal edilirler. Materyallerden en yaygın kullanılanı α -hidroksi asitlerdir. Bunlar poli (laktik asit), poli (glikolik asit) ve bunların polimerleri poli (glikolid-laktid) asitlerdir. Poli (glikolik asit) ve poli (laktik asit) monomerlerin katalitik polimerizasyonu ile üretilirler.

Bariyer membranlarla ilgili özellikleri göz önünde bulundurarak, her hasta ve defekt için uygun olan rejeneratif bariyer seçilmelidir (6,91).

2.2. Statinler

Statinler olarak bilinen 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri, yüksek kan kolesterol seviyesi bulunan hastalarda ve

kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan, güvenilirlikleri kanıtlanmış, en etkili ajanlardır (103,104).

Statinler elde edilişleri, karaciğer metabolizması ve fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmıştır (105).

Farmakolojik özelliklerine göre lovastatin, mevastatin, pravastatin, simvastatin, fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve cerivastatin olmak üzere 9 farklı HMG–CoA redüktaz inhibitörü mevcuttur. Cerivastatin olumsuz yan etkilerinden dolayı 2001 yılında dünya farmasötik marketinden kaldırılmıştır. Bu nedenle şu an piyasada klinik kullanımda 8 adet statin türü bulunmaktadır. Mantar fermantasyonundan elde edilen doğal statinler lovastatin, mevastatin, pravastatin ve simvastatindir. Fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ise, kimyasal statinlerdir. Doğal statinler arasından simvastatinin, lovastatin ve pravastatinden yaklaşık iki kat daha güçlü olduğu bildirilmiştir (103,19,107).

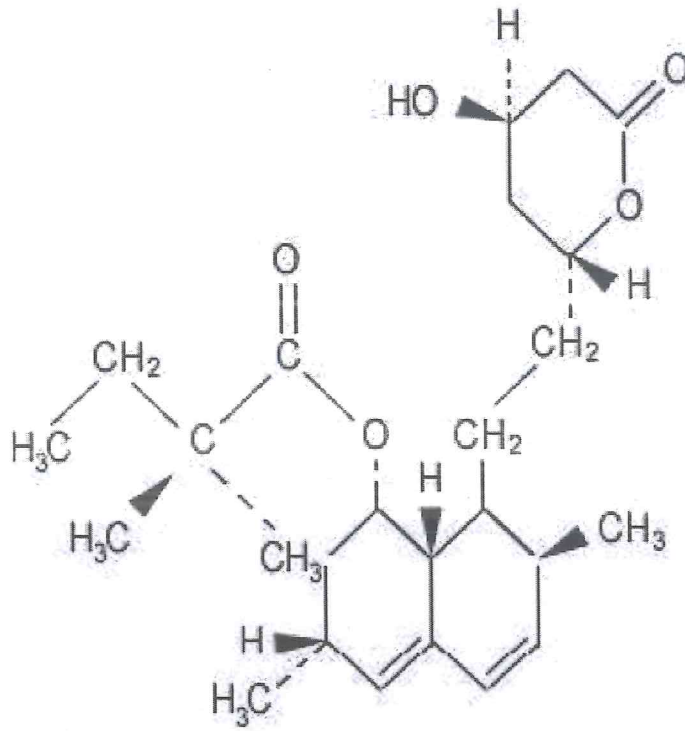
Karaciğer, bütün statinlerin hedef organıdır ve hepatositler hedeflenir. Statinlerin tümü, karaciğerde benzer şekilde metabolize olurlar. Fluvastatin ve lovastatininin %70'inden fazlası, simvastatinin %80'ininden fazlası ve pravastatinin %46'sı karaciğerde tutulmaktadır (105,107).

Fizikokimyasal özelliklerine göre bakılacak olursa, pravastatin ve rosuvastatin hidrofilik iken; lovastatin, simvastatin ve atorvastatinin lipofilik olduğu görülür (103). Fluvastatin ise her iki özelliğe de sahiptir (105). Lipofilik statinler hücre içine girmek için hücre membranından pasif difüzyonla geçebilirler. Hidrofilik statinler ise bunun için spesifik taşıyıcı mekanizmaya ihtiyaç duyarlar (106).

2.2.1. Statinlerin Farmakolojik Özellikleri

Statinlerin kimyasal yapısı:

1. Hedef enzimin substratı olan HMG–CoA analogu kısım
2. Substrat analogu olan kısma kovalent bağlı olan ve statini enzime bağlama işlevini gören kompleks bir hidrofobik halka yapısı
3. İlaçların çözünme özelliklerini, dolayısıyla pek çok farmakokinetik özelliklerini belirleyen halka yapılarına bağlı yan gruplar olarak üç kısma ayrılabilir (108)(Şekil 2.6).



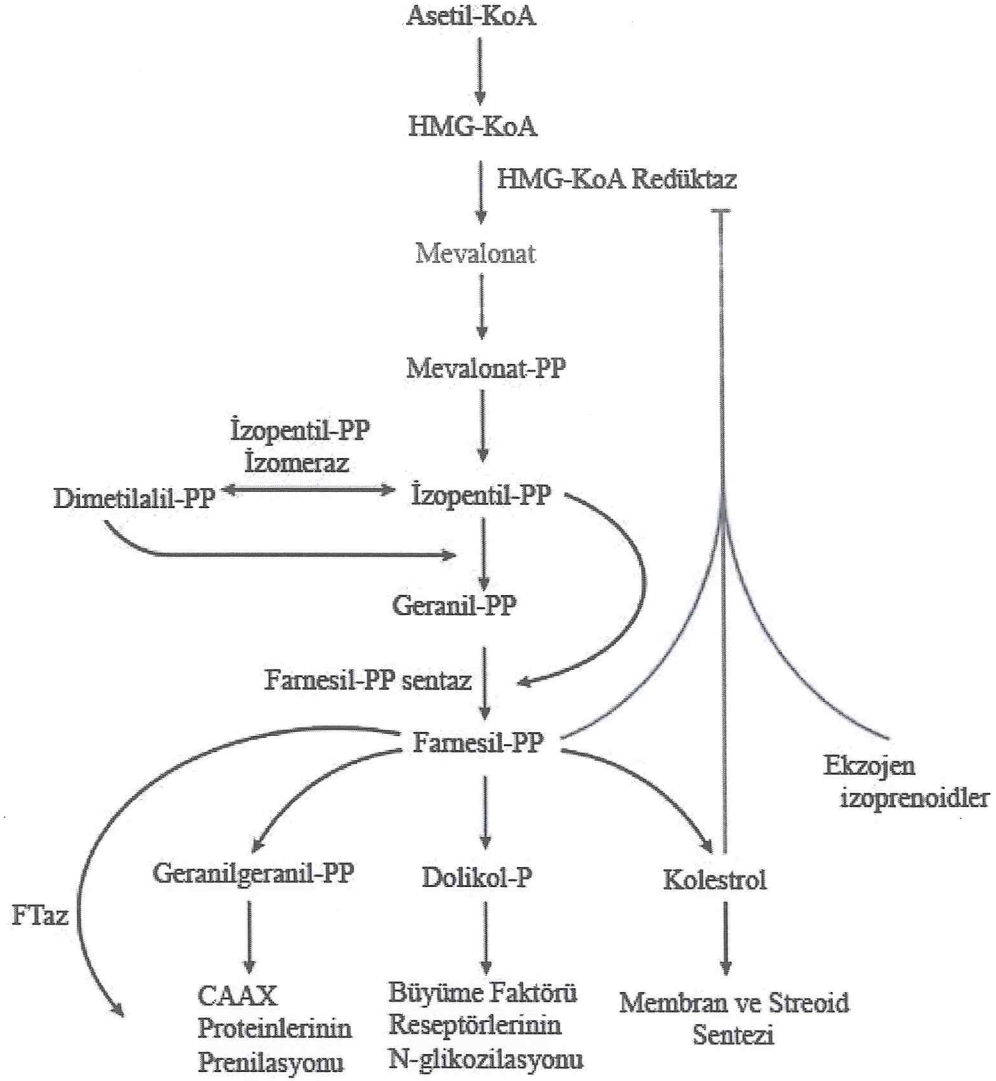
Şekil 2-6: Statinlerin kimyasal yapısı

Statinler %60–80 oranında emilime uğrar. Uygulanan dozun %5'i sistemik dolaşıma geçer. Statinlerin atılımı %13 oranında idrarla, %60 oranında ise feçesle olur. Yarılanma ömrü 3 saattir. Kolesterol sentezi gece daha fazla olduğundan gece kullanımının sabah kullanımından daha etkili olduğu rapor edilmiştir (109).

2.2.2. Statinlerin Etki Mekanizması

HMG–CoA redüktaz, insanda hepatik ve ekstrahepatik kolesterol biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamağı oluşturan HMG–CoA'nın mevalonat'a dönüşme olayını katalize eder. Statinler ise kolesterol sentezinde rol alan HMG–CoA redüktaz enzimini kompetitif olarak inhibe edip mevalonatın oluşmasını engelleyerek karaciğerde kolesterol sentezini azaltırlar (Şekil 2.7). Hüresel bazda kolesterol sentezinin azalması sonucu karaciğerden kolesterol üretimi düşer. Hücre içi kolesterol ve lipoprotein seviyelerinin düşmesi ise hücre membranı düzeyinde düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörlerinin sayısının artmasına neden olarak LDL'nin karaciğerden direkt alımını uyarır ve serumda LDL kolesterol seviyesinin azalmasını sağlar. Sonuç olarak statinler, HDL kolesterol düzeyini artırırken; LDL kolesterol, VLDL (çok düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol ve trigliserid düzeylerini azaltır (110,111). Kan trigliserid

düzeyini de düşürürler. 250 mg/dl'nin üzerindeki trigliserid seviyeleri statinler tarafından büyük oranda düşürülür ve düşme oranı LDL kolesterolde sağlanan düşme yüzdesine benzerdir (112-114).



Şekil 2-7: Asetil CoA'dan kolesterole dönüşüm şeması.(Mevalonat yolu) CoA: koenzim A, PP: pirofosfat.

2.2.3. Statinlerin Endikasyonları

Hiperkolesterolemi, koroner kalp hastalığında önemli risk faktörlerindedir ve ateroskleroza yol açar. Simvastatin, ateroskleroz gelişmesini yavaşlatarak koroner arter hastalığı gelişme riskini azaltır. Aterosklerotik lezyonların gelişmesini yavaşlattıkları ve hatta geriletebildikleri koroner anjiyografisi ile de doğrulanmıştır. Ayrıca statinler

serebral damarlardaki ateroskleroz gelişmesini yavaşlatarak inme ve geçici iskemik atak insidansını azaltırlar (111,115).

2.2.4. Statinlerin Kontrendikasyonları

Statinler, preparat içerisindeki herhangi bir bileşene aşırı duyarlılık durumunda ve aktif karaciğer hastalığında, teratojenik etkiye sahip oldukları için hamilelerde ve laktasyonda kullanılması kontrendikedir (120). Pediyatrik kullanım ile ilgili güvenilirlik ortaya konmadığından çocuklarda kullanımı önerilmemektedir (116).

2.2.5. Statinlerin Yan Etkileri

Statinlerin klinik etkinliklerinin yüksek oluşu ve diğer ilaçlara göre yan etkilerinin az oluşu bu ilaçların avantajlarıdır (105,111). Karaciğer ve kas toksisiteleri en önemli yan etkilerdendir. Karaciğer yetmezliği ilacın birikimine neden olabilir. Tüm hastalarda tedaviye başlamadan önce ve başladıktan sonra periyodik olarak karaciğer fonksiyon testlerinin yapılması ve serum transaminazlarının ölçülmesi gerekmektedir. Serum transaminaz seviyesi, normalin üç katına çıkıyorsa ve bu seviyesini koruyorsa ilaç kesilmelidir (116). Alkol tüketen kişilerde ve karaciğer hastalığı öyküsü bulunanlarda dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır (109). Nadir olmakla birlikte statin kullanımıyla oluşan ciddi karaciğer patolojisi de bildirilmiştir (117).

Statin kullanımıyla ilişkili, klinik anlamı olan tek büyük yan etki miyopatidir. Miyopati, kol ve baldırlardan başlayarak yayılan grip benzeri ağrılardır (40). Bütün statinler miyopati ve rabdomyolizle ilişkilidir ve kreatin kinaz (CK) yükselmesi statine bağlı miyopatinin en iyi göstergesidir. Ancak CK değerlerinde artış olmadan da bu tip ağrılar gözlenebilir. CK değerlerinin normalin 10 katı üzerine çıkması, miyotoksisite oluşmasına neden olur. İlaç tedavisine devam edilmesi ile rabdomyoliz gelişir. Yaşlı hastalarda, statinlerin çeşitli ilaçlarla (niasin, siklosporin, makrolid grubu antibiyotikler, ve fibratlar gibi) birlikte kullanımında, enfeksiyon varlığında ve aşırı alkol tüketiminde miyopati riski artmaktadır (113,118).

Daha az sıklıkla mide-bağırsak tahrişine bağlı ortaya çıkan konstipasyon, diyare, dispepsi, karın ağrısı ve bulantı gözlenir (119). Baş ağrısı, üst solunum yolu enfeksiyonu, halsizlik, göğüs ağrısı, anjina gibi diğer yan etkiler de gözlenebilir (17,109).

2.2.6. Statinlerin Pleiotropik Etkileri

Statinlerin inhibe ettiği HMG–CoA redüktaz reaksiyonunun ürünü olan mevalonat, sadece kolesterol için değil aynı zamanda farnesil pirofosfat (FPF) ve geranilgeranil pirofosfat (GGPF) gibi birçok bileşik için de öncüdür. Yapılan klinik çalışmalarda bu enzimin inhibisyonuyla statinlerin kolesterol düşürme etkilerinden bağımsız olarak çeşitli sistemik yararlı etkileri olduğu görülmüştür. Bu yararlı etkiler ‘‘pleiotropik etkiler’’ olarak isimlendirilmektedir. Statinlerin pleiotropik etkileri aşağıda ifade edilmiştir:

a)Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisi, primer ve sekonder olarak önlenmesinde yararlı etkileri bulunmaktadır (120-122). Statinlerin aterosklerotik lezyonların boyutunda ve miyokard enfarktüsü geçirme riskinde azalma sağladığı bir çok çalışmada gösterilmiştir.

b)T lenfosit aktivasyonunu azaltarak immunosupresif etki, simvastatin ve fluvastatin gibi lipofilik statinlerin doğal öldürücü hücreleri baskılayarak bir immünosupresan etki gösterebildikleri ortaya konmuştur (123).

c)Alzheimer hastalığının kontrolü, bu hastalığın tedavisinde rutin olarak asetilkolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Kan–beyin bariyerini geçebilen simvastatin, kolinesteraz aktivitesinde artışa neden olarak hastalığın kontrol edilmesine olanak sağlamaktadır (124).

d)Antienflamatuar özellik, statinler nötrofillerin kemotaksis ve transendotelyal migrasyonunu inhibe ederek antienflamatuar etki gösterirler (105).

e)Antioksidan etki, statinlerin plazmadaki antioksidan kapasiteyi artırdıkları yönünde veriler bulunmaktadır. Ayrıca, simvastatin tedavisi altındaki hiperkolesterolemili hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla antioksidan özelliği bulunan alfa tokoferolün arttığı tespit edilmiştir (125,126).

Statinlerin kan kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsız olarak trombosit agregasyonu ve trombus birikiminde azalma, anjiogenezde artma, nefropati ve diabet gelişiminde azalma gibi pleiotropik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (106,127).

Osteoklastik aktiviteyi azaltarak kemik oluşumunu artırma gibi kemik dokusu üzerine anabolik etkileri olduğu birçok çalışmayla kanıtlanmıştır (106).

2.2.7. Statinlerin Kemik Üzerine Etkileri

Statinler karaciğeri etkiledikleri gibi kemiği etkilemezler. Çünkü karaciğer hedef organdır; burada ilk geçiş etkisine uğrarlar ve kemiğe düşük konsantrasyonda ulaşırlar. Kemik döngüsünü nasıl etkiledikleri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Pravastatin gibi hidrofilik statinlerin kemik hücreleri tarafından alımı az olduğu için, kemiğe etkileri yoktur. Simvastatin gibi lipofilik statinler ise kemik iyileşmesi ve metabolizması üzerinde etkili bulunmuştur (109,17,128,129).

Statinlerin kemik metabolizması üzerine olan etkileri ilk kez Mundy ve ark. tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmayla ortaya konmuştur. BMP-2 salınımını artıracak molekül bulabilmek için 30000'den fazla maddeyi *in vitro* ortamda incelemişler ve statinler arasında simvastatin ve lovastatin'in en iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir (17).

Statinlerin kemik metabolizmasına etkileri tam olarak açıklanamamasına rağmen iki farklı mekanizmayla kemik üzerine etki gösterdikleri düşünülmektedir.

1. Osteoklast Aktivasyonunun Engellenmesi ile Kemik Rezorbsiyonunun Azaltılması

Kolesterol sentezi ve osteoklast aktivasyonu aynı biyokimyasal akışı içermektedir. Kolesterol sentezi birkaç adımda gerçekleşir. Bu adımlardan birinde HMG-CoA, HMG-CoA redüktaz enzimi ile mevalanata dönüşür. Statinler bu basamakta HMG-CoA'nın mevalonata dönüşümünü engellerler. Bu basamağın statinlerin kemik üzerindeki etkilerinde anahtar rolü olduğu belirtilmiştir (130). Ayrıca HMG-CoA redüktaz yolundaki ara ürün olan farnesil pirofosfat (FPP) ve farnesil PP kaynaklı geranilgeranil pirofosfatlar (GGPP), osteoklastların hücre membranı işlevinden sorumlu Rho, Rac ve Rab gibi bazı proteinleri aktive etmek için kullanırlar. Bu FPP ve GGPP oluşamaz ise osteoklastik aktivasyon engellenir. Osteoklastik aktivitenin engellenmesiyle kemik rezorbsiyonu azalır (131,132)(Şekil 2.7).

Antirezorptif etkiye sahip olan diğer çok bilinen ilaç ise bifosfonatlardır (133). Ancak statinler ve bifosfonatlar kolesterol sentezindeki mevalonat yolunun farklı basamaklarında rol oynarlar (134). Bifosfonatlar, farnesil sentezaz enzimini inhibe ederek; statinler ise HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe ederek bu ürünlerin oluşumunu engellerler. Sonuçta statin veya bifosfonatlarla karşılaşan osteoklastların apoptozuyla kemik turn-overı yavaşlar; kemik yıkımı azalır (21,135).

Bifosfonatlar ile statinler yapısal olarak farklılık gösterirler. Bifosfonatların yüzeyinde pirofosfata benzer bir yapı bulunur ve bu sayede karşılaştıkları osteoklastların yüzeylerine sıkıca bağlanarak etki gösterirler ancak statinlerde böyle bir yapı yoktur (135).

2. Kemik Morfojenetik Protein-2 (BMP-2) Aktivasyonu ile Kemik Hacminde Artış

Kemik Morfojenetik Protein-2 (BMP-2) osteoblastların proliferasyonu, olgunlaşması ve yeni kemik oluşmasını sağlayan bir büyüme faktörüdür (40). Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEBF), anjiogenik bir sitokin olup; endotel hücreleri üzerine direk etkiye sahiptir ve anjiogenezin güçlü bir düzenleyicisidir (136). Statinlerin kemik oluşumunu arttırmasındaki ikinci mekanizma, BMP-2 öncüsünü aktive etmesidir. 1999 yılında Mundy ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada osteoblastların farklılaşmasını ve kemik oluşumunu arttıracak ajanlar araştırılmış ve 30000 doğal bileşik arasından sadece statinlerin BMP-2 geni öncüsünü aktive ettiği belirtilmiştir (17).

Statine bağlı osteogenezde erken iyileşmenin araştırıldığı bir çalışmada immunlokalizasyon tekniği ile statin uygulanan ve uygulanmayan kemik defektlerinin iyileşmesinde VEBF ve BMP-2'nin erken histolojik ekspresyonu incelenmiştir. Çalışma sonucunda lokal olarak uygulanan statinlerin, anjiogenezi arttırarak ve osteogenezi düzenleyen büyüme faktörlerinin erken açığa çıkmasını sağlayarak kemik oluşumunu arttırdığı bulunmuştur (136).

2.3. Polimer Taşıyıcılar

Simvastatinin lokal uygulanımı için bir taşıyıcıya gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle taşıyıcı seçimine özen gösterilmesi gerekmektedir. Simvastatinin yerleştirilen bölgede uzun süreli kalmasını sağlayacak ve farmakolojik etkilerini sürekli olarak gösterecek bir taşıyıcı ile defekt alanına uygulanması, istenen etkiyi elde etmemizi sağlayacaktır. Kemik defektlerinin tedavisinde kemik rejenerasyonunu indükleyebilen ilaçların bölgeye uygulanmalarına yardımcı olacak biyolojik olarak parçalanabilen materyaller kullanılmaktadır. Taşıyıcılar arasında sentetik, doğal polimerler ve biyoseramiklerle desteklenmiş ilaç içeren salımı güçlendirilmiş sistemler bulunmaktadır (137).

Polimer teknolojisindeki artışla birlikte ilaç salım sistemlerinde biyolojik olarak uyumlu çeşitli polimerler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu polimerler,

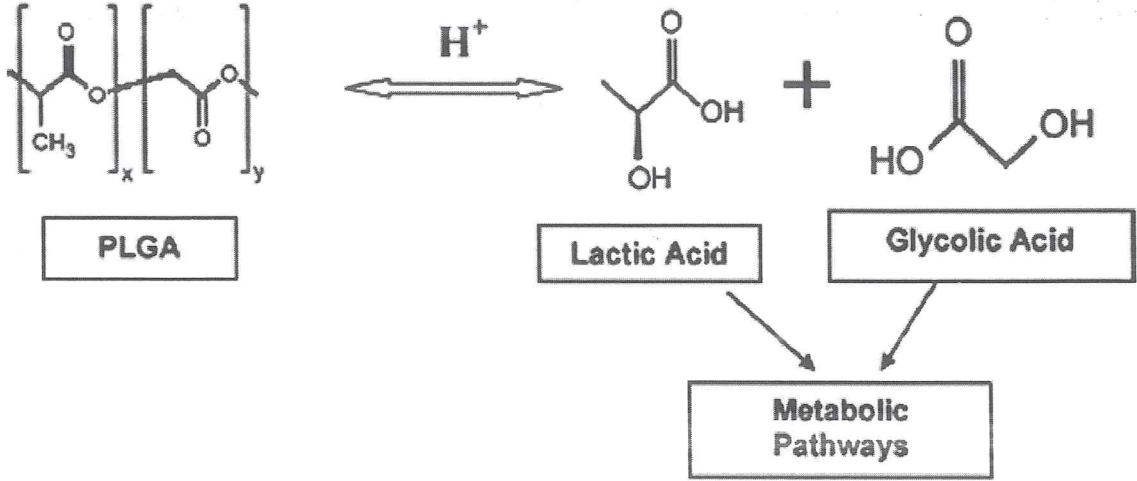
içlerine yerleştirilen ilaçları kontrollü salma ve istenilen etkiyi elde etmek için düşük miktarda ilaca gerek duyulması gibi avantajlara sahiptir. Biyolojik olarak parçalanabilen materyaller içinde taşınan ilaçlar, uzun zaman periyodunda uygulandıkları bölgede istenen konsantrasyonda bulunabilir ve farmakolojik etkilerini sürekli olarak gösterebilirler (138).

İlaç taşıyıcı sistemler genel olarak şu özellikleri sağladıkları için ideal ilaç taşıyıcıları olarak nitelendirilmektedirler (143):

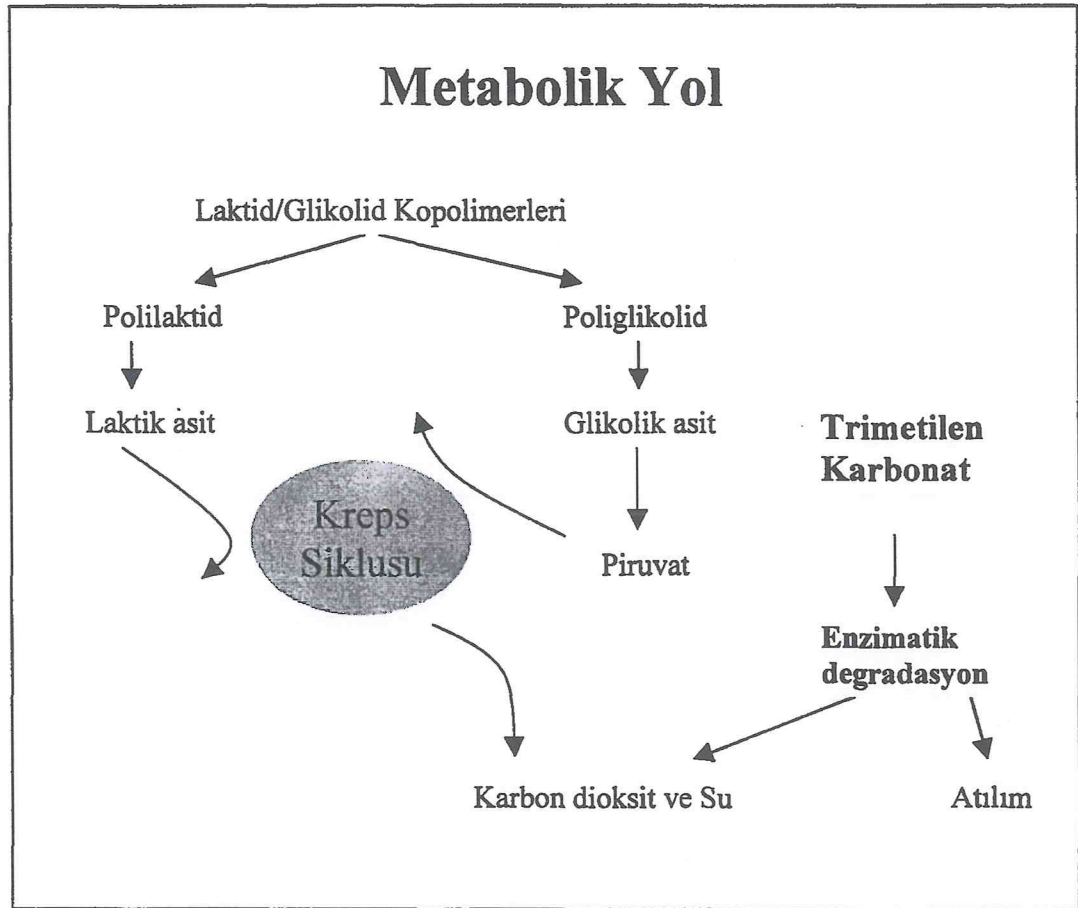
- Ucuz ve kolay hazırlanabilme,
- Biyoparçalanır ve biyouyumlu olma,
- Küçük parçacık boyutu,
- Yüksek ilaç yükleme kapasitesi,
- Kan dolaşımında uzun süre kalabilme,
- Etkinin istenen bölgede toplanabilmesi,
- İlacı kontrollü olarak salabilme,
- Kararlılık sorunu olmama.

2.3.1. Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)

Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), hidrolizi ile laktik asit ve glikolik asit gibi metabolit monomerlerine ayrılabilirdiği için başarılı bir şekilde kullanılan biodegrade (biyo bozunur) olabilen bir polimerdir (Şekil 2.8). Bu iki monomer Krebs siklusu ile vücut tarafından kolaylıkla metabolize edilebildiğinden PLGA'nın ilaç taşıyıcısı olarak ya da biyomateryal olarak kullanımıyla ilgili minimal sistemik toksisite oluşturduğu bilinmektedir (Şekil 2.9)(139). PLGA, insanlarda çeşitli ilaç taşıma sistemleri için Amerikan FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onay almıştır. Polimerler farklı moleküler ağırlıklarda ve kopolimer kompozisyonlarda mevcuttur. Degredasyon zamanı, moleküler ağırlığa ve kopolimer oranına bağlı olarak bir kaç aydan bir kaç seneye kadar değişkenlik gösterir (140,141). PLGA'nın formu, genellikle kullanılan monomer oranına göre tanımlanır. Örneğin, PLGA 50:50, kompozisyonu, %50 laktik asit, %50 glikolik asitten oluşan kopolimeri tanımlamaktadır. PLGA polimerleri özellikleri nedeniyle ilaç taşımında ve hedeflendirilmesinde, üzerinde en çok çalışılan polimer grubudur (142).



Şekil 2-8: PLGA'nın Hidrolizinin şematik gösterimi (139)

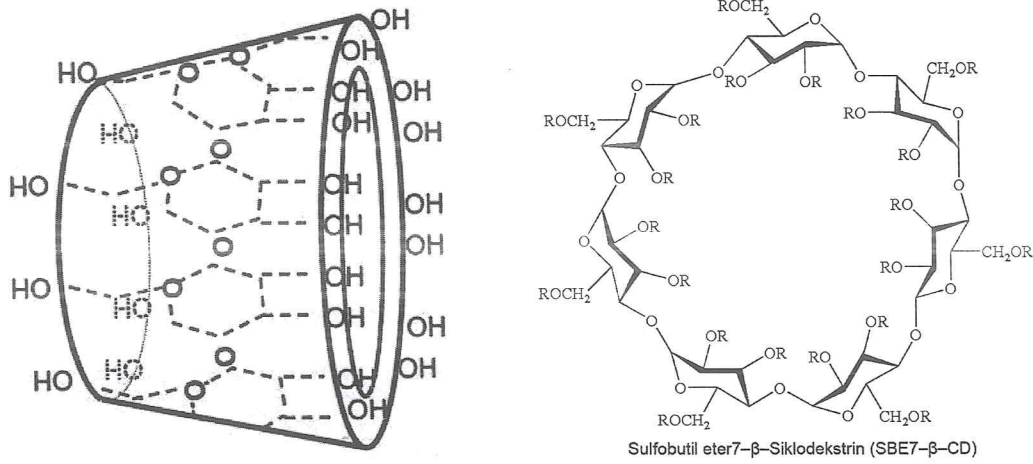


Şekil 2-9: Krebs siklüsünün şematik görünümü

2.3.2. Sulfobutil eter7-β-Siklodekstrin (SBE7-β-CD)

Siklodekstrinler, hidrofobik bir iç boşluğa ve hidrofilik bir dış yüzeye sahip, 6-8 arası dekstroz birimi içeren siklooligosakkarit yapısında maddelerdir. İçerdikleri dekstroz birimi sayısına göre isimlendirilirler. α-, β- ve γ-siklodekstrinler sırasıyla 6, 7

ve 8 dekstroz birimi içerir. Farmasötik değeri yüksek ve toksik olmayan hidroksipropil- β -siklodekstrin (HP- β -CD), metil- β -siklodekstrin (Met- β -CD) ve sulfobutileter7- β -siklodekstrin (SBE7- β -CD) gibi siklodekstrin türevleri sentezlenmiştir (144).



Şekil 2-10: Siklodekstrinlerin kesik koni şeklindeki görüntüsü ve açık formülü

Siklodekstrin boşluğunun içi hidrojen atomları ve oksijen köprüleri ile kaplıdır (Şekil 2.10). Siklodekstrinlerin glukopiranoz birimlerinin hidroksil grupları dış yüzeye hidrofilik bir özellik vermektedir. Boşluğun glikozidik oksijen köprüleri ile sıralanması ve C2 ile C3 atomlarındaki sekonder hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağları ise boşluğa hidrofobik bir özellik kazandırmaktadır. Bu özellikler siklodekstrinlere siklodekstrin boşluğuna uyum sağlayan molekülleri çevreleyebilecek yapıyı kazandırmaktadır (145).

Siklodekstrinler beyaz, kokusuz, tatlı lezzette, nem çekmeyen, kristal toz yapısında maddelerdir. Nişasta veya şeker kadar stabil olan siklodekstrinler bozulmadan yıllarca muhafaza edilebilirler (146). Kristal kafes yapılarına bağlı olarak α , β ve γ -CD'lerin erime dereceleri 240°C ile 265°C arasında değişir (147).

HP- β -CD ve SBE7- β -CD gibi hidrofilik siklodekstrinler oral ve intravenöz yolla uygulandığında toksik değildir. HP- β -CD doğal β -CD'den çok daha fazla suda çözünür ve toksikolojik olarak da daha zararsızdır. HP- β -CD'nin 14 günlük kullanımında 16-24 g/gün dozda ishal gibi basit yan etkileri olmasına rağmen; insanlar tarafından iyi tolere edilebildiği görülmüştür. (148,149). Siklodekstrinlerle sıçan ve tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalarda hiçbir teratojenik ve mutajenik etki gözlenmemiştir (150).

Amacımız, kobayların tibiasında 3 mm kritik boyutlarda oluşturulan kemik defektlerine Simvastatin-PLGA mikrokürelerini içeren implant tableti ve Simvastatin-SBE7- β -CD komplekslerini içeren implant tableti uygulaması sonrası oluşacak değişikliklerin histolojik ve histomorfometrik olarak değerlendirilerek simvastatinin bu kemik defektlerinin tedavisindeki rolünü incelemektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmamızda 24 adet Dunkin-Hartley guinea pig türü, yaklaşık 500-700 gr ağırlığında ve 10-12 haftalık dişi ve erkek kobaylar değerlendirmeye alınmıştır.

Çalışmamızda kullanılan gereçlerin listesi aşağıda gösterilmiştir.

- 24 adet Dunkin–Hartley cinsi, 500–700 gr ağırlığında ve 10–12 haftalık dişi ve erkek kobay (Guinea Pig)
- Ketalar flakon (Ketamin HCL, Parke Davis, Berlin, Almanya)
- Rompun® flakon (Xylazin hidroklorid, Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti, İstanbul, Türkiye)
- Sefazol Flakon 500 mg. (Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş., Türkiye)
- Novalgin Ampül 2 mg. (Sanofi Aventis İlaç San. A.Ş., Türkiye)
- Steril cerrahi el aletleri seti (8’li)
- Fizyo dispanser, mikromotor ve anguldruva
- Bistüri ucu (15 numara)
- 3.0 ve 4.0 vicryl rapide dikiş ipliği (Polyglactin 910, Ethicon, ABD)
- 3 mm. çapında trefin frez
- Steril ameliyat örtü seti
- İnsülin Enjektörleri
- %0,9 Serum Fizyolojik
- Formaldehit Çözeltisi (% 10)
- Batikon (povidon iyot solüsyonu) (Bonmed Sağlık Ürünleri ve Makina San. Tic. Ltd.Şti., Türkiye)
- Steril gaz tamponlar
- Tıbbi elastik flaster (Nova Fix, Adana, Türkiye)

- Tıraş makinesi

3.1.1. Kullanılan Biyomateryaller

Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda, 3 mm çapında simvastatin içeren PLGA (SIM-PLGA) mikroküreleri, simvastatin-SBE7- β -CD kompleksleri (SIM-SBE7- β -CD) ve yalnız simvastatin (SIM) içeren implant tabletleri kullanılmıştır.

Ayrıca defekt içerisine epitel göçünü engellemek amacıyla defektlerin üzerini örtecek şekilde Mem-Lok® Rezorbe Olabilen Kollajen Membran (30 mm X 40 mm) kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3-1: Mem-Lok Rezorbe olabilen kollajen membranın görüntüsü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Operasyon Öncesi Hazırlık

3.2.1.1. Genel bilgi

Çalışmamızın deney hayvanlarının ameliyatları ve sakrifikasyonlarını içeren deneysel kısmı İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı Laboratuvarında, kemik dokularının histolojik ve histomorfometrik incelemeleri İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bu proje kapsamındaki hayvan deneyleri için, İ.Ü Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alınmıştır. (25.01 2013 tarih ve 2013/11 sayılı karar)

Çalışmamız, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir. (Proje no: 31323)

3.2.1.2. Hazırlık işlemleri

Deneysel aşamada cerrahi operasyonların gerçekleştirilmesi için ekip halinde çalışılmıştır. Bu ekip; 1 adet veteriner hekim, 4 adet diş hekimi ve 2 adet yardımcı personelden oluşmaktadır.

Deneyleerin yapımından önce, deney hayvanlarının tibiaları hakkında bilgi edinmek, açılacak defekt boyutlarını ve sayısını tayin edebilmek amacıyla veteriner hekim eşliğinde pilot çalışma yapılmıştır.

3.2.1.3. Deney Hayvanları ve Grupları

Deney hayvanları (kobaylar), İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir (Şekil 3.2). Deneyleerin cerrahi aşamaları bu Anabilim Dalı'nın ameliyathanesinde gerçekleştirilip, operasyon sonrası bakımları Anabilim Dalı bünyesindeki hayvan barınaklarında yapılmış, iyileşme dönemi boyunca gözlem altında tutulmuşlardır.



Şekil 3-2: Deney hayvanı olarak kullanılan kobayın görüntüsü

Deney hayvanları 21 °C sıcaklıkta, bağıl nem oranı %40-60, ışık periyodu 12 saat aydınlık 12 saat karanlık standardını sağlayacak şekilde ortamda, deney süreleri boyunca her metal kafes içerisinde 3 kobay olacak şekilde muhafaza edilmiş, İstanbul Yem Sanayi tarafından üretilen %21 oranında protein içeren standart kobay yemi ve distile su ile ad libitum beslenmişlerdir.

Çalışmamızda kobayların sağ ve sol tibiaları deney protokolüne dahil edilmiş ve her tibiada 2'şer adet olmak üzere toplamda 4 adet kemik defekti oluşturulmuştur. Bu defektler her kobayda, 1. ve 2. deney, aktif ve pasif kontrol bölgelerini oluşturdu. (Tablo 3.1) Buna göre randomize olarak 1.deney bölgesinde Simvastatin içeren PLGA (SIM-PLGA) mikroküreleri, 2.deney bölgesinde simvastatin-SBE7- β -CD (SIM-SBE7- β -CD) kompleksleri uygulanırken, aktif kontrol bölgesinde sadece simvastatin etken maddesi yerleştirilmiş ve pasif kontrol bölgesi boş bırakılmıştır.

Tablo 3-1: Oluşturulan kemik defektlerine yerleştirilen materyaller

Bölge	Sağ Tibia	Sol Tibia
Üst	1. Deney Bölgesi Simvastatin+ polilaktik-ko- glikolikasit mikroküreleri (SIM-PLGA)	2. Deney Bölgesi Simvastatin+ Sulfobutileter7- β - Siklodekstrin kompleksi (SIM- SBE7- β -CD)
Alt	Sadece Simvastatin	Pasif Kontrol Bölgesi: Boş

Her iki taşıyıcı materyal arasında etkileşim olabileceği için randomizasyonda 1. ve 2. deney grubunun aynı tibiada alt alta olmamasına dikkat edilmiştir. Bu esaslar göz önüne alınarak tüm deney grupları deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarında, kritik boyutlarda, deneysel olarak yaratılmış sağ-sol-alt-üst defektlere randomize bir şekilde uygulanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 24 adet deney hayvanı 4 ana grup ve 15.-45. günlerde sakrifikasyon dönemlerine göre düzenlenmiş 8 alt gruba ayrılmıştır.

1. Ana Grup: 6 deney hayvanından oluşan bu grup 15. ve 45. günde sakrifiye edilecek iki alt gruba ayrıldı.

a) 15. günde sakrifiye edilecek alt grup (3 adet kobay)

b) 45. günde sakrifiye edilecek alt grup (3 adet kobay)

Tablo 3-2: Her iki alt grupta da yer alan deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarında oluşturulan alt ve üst defetlere uygulanan materyaller

Grup 1	Sağ Tibia	Sol Tibia
Üst Defekt	SIM-PLGA	SIM-SBE7-β-CD
Alt Defekt	Simvastatin	Boş

2. Ana Grup: 6 deney hayvanından oluşan bu grup 15. ve 45. günde sakrifiye edilecek iki alt gruba ayrıldı.

- a) 15. günde sakrifiye edilecek alt grup (3 adet kobay)
- b) 45. günde sakrifiye edilecek alt grup (3 adet kobay)

Tablo 3-3: Her iki alt grupta da yer alan deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarında oluşturulan alt ve üst defetlere uygulanan materyaller:

Grup 2	Sağ Tibia	Sol Tibia
Üst Defekt	Simvastatin	Boş
Alt Defekt	SIM-PLGA	SIM-SBE7-β-CD

3. Ana Grup: 6 deney hayvanından oluşan bu grup 15. ve 45. günde sakrifiye edilecek iki alt gruba ayrıldı.

- a) 15. günde sakrifiye edilecek alt grup (3 adet kobay)
- b) 45. günde sakrifiye edilecek alt grup (3 adet kobay)

Tablo 3-4: Her iki alt grupta da yer alan deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarında oluşturulan alt ve üst defetlere uygulanan materyaller:

Grup 3	Sağ Tibia	Sol Tibia
Üst Defekt	SIM-PLGA	SIM-SBE7-β-CD
Alt Defekt	Boş	Simvastatin

4. Ana Grup: 6 deney hayvanından oluşan bu grup 15. ve 45. günde sakrifiye edilecek iki alt gruba ayrıldı.

a) 15. günde sakrifiye edilecek alt grup (3 adet kobay)

b) 45. günde sakrifiye edilecek alt grup (3 adet kobay)

Tablo 3-5: Her iki alt grupta da yer alan deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarında oluşturulan alt ve üst defetlere uygulanan materyaller:

Grup 4	Sağ Tibia	Sol Tibia
Üst Defekt	Boş	Simvastatin
Alt Defekt	SIM-PLGA	SIM-SBE7-β-CD

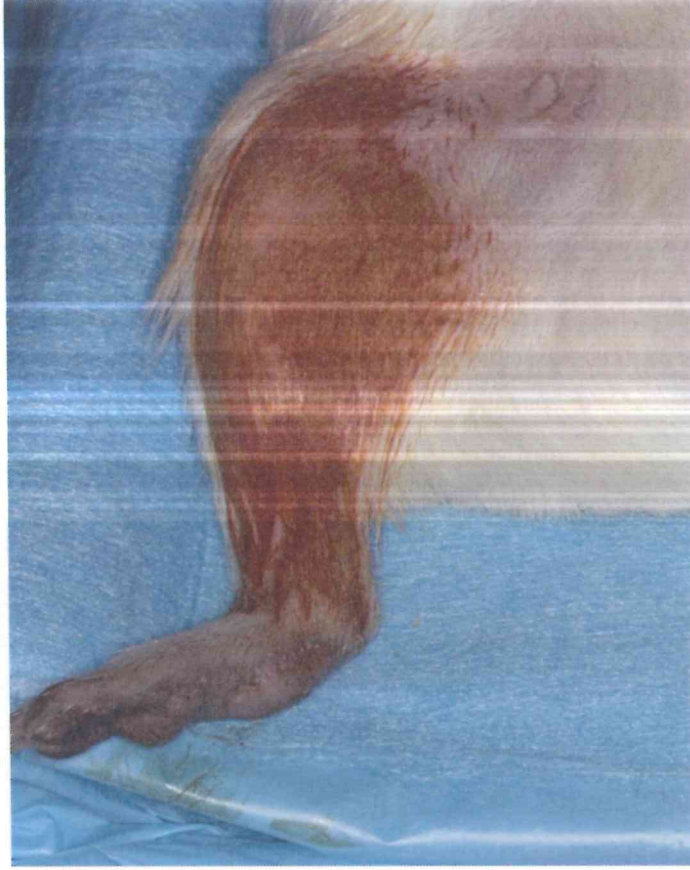
3.2.1.4. Deney Hayvanı Olarak Kobaylar (Dunkin-Hartley Guinea-pig)

Çalışmamızda deney hayvanı olarak Dunkin-Hartley guinea pig türü kobaylar, tercih edilmiştir. Kobayların tibia kemiklerinin diğer daha küçük deney hayvanlarına göre (örneğin sıçan, fare) aynı anda birkaç defekt oluşturulmasına daha uygun olması, morbidite ve fraktür riskinin nispeten daha düşük olması tercih edilme nedenleri arasındadır.

Ayrıca kobayların daha büyük deney hayvanlarına göre (örneğin koyun, domuz) genel anesteziye alınırken entübasyona ihtiyaç duyulmaması nedeniyle anestezisinin nispeten daha basit olması, operasyon sonrası bakım ve barınmalarının daha kolay olması gibi avantajları da bulunmaktadır.

3.2.1.5. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

4 ana gruba ayrılan deney hayvanları her sakrifikasyon dönemine göre toplam 8 alt gruba ayrılmış ve her kafeste 3'er adet olacak şekilde kafeslere yerleştirilmiştir. Deney hayvanlarına katı gıda verilmesi operasyondan 2 saat önce pre-operatif olarak durdurulmuştur. Her gruptaki deney hayvanlarına genel anestezi, 15mg/kg Ksilazin Hidroklorür ve 85 mg/kg Ketamin Hidroklorür'ün veteriner hekim tarafından intraperitoneal olarak uygulanması ile sağlanmıştır. Ardından deney hayvanlarının sağ ve sol tibialarının medial yüzleri tıraşlanarak povidon iyot solüsyonu (batikon) sürülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3-3: Povidon iyot solüsyonu (batikon) sürülmüş tibiannın görüntüsü

3.2.1.6. Simvastatin Tabletlerinin Hazırlanması

Simvastatin içeren PLGA (SIM-PLGA) mikrokürelerini, simvastatin-SBE7- β -CD komplekslerini (SIM-SBE7- β -CD) ve kontrol grubu olarak yalnız simvastatin içeren implant tabletler İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

1. Simvastatin-PLGA mikrokürelerini içeren implant tabletlerinin hazırlanması:

İmplant tabletler, emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlandı (151). 100 mg simvastatin ve 200 mg PLGA (RG502, Laktik asit/glikolik asit oranı: 50:50; Molekül ağırlığı: 7.000-17.000 Da) 25 mL diklometan içerisinde çözündürüldü. PLGA çözeltisi, soğukta 8000 rpm'de yüksek devirli homojenizatör (CAT,x620) ile karıştırılan 120 mL %0.5 (a/h)'lik PVA (Molekül ağırlığı: 36.000-72.000 Da) çözeltisine damla damla eklendi. Hazırlanan emülsiyon iki saat boyunca oda sıcaklığında 400 rpm'de manyetik karıştırıcı da karıştırıldı ve mikroküreler sertleştikten sonra içerisinde kalan diklometanın tamamı rota evaporatörde 35 mBar da uçuruldu. Mikroküreler 10.000

rpm'de santrifüj ile ayrıldı ve liyofilizatörde 24 saat süresince kurutuldu. Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, İngiltere) ile partikül boyutu tayin edilen mikrokürelerin (partikül boyutu=39.3 μm) içerisinde bulunan simvastatin miktarı spektrofotometrik yöntem (dalga boyu 238 nm) ile tayin edildikten sonra, 3 mg simvastatine eşdeğer miktarda mikroküre tartıldı ve üzerine %1 (a/a) oranında kaydırıcı (magnezyum stearat) eklenerek 3 mm çapında zımba ile 200 psi basınçta tablet haline getirildi.

2. Simvastatin-SBE7- β -CD kompleksleri içeren implant tabletlerin hazırlanması:

100 mg simvastatin ve 200 mg SBE7- β -CD tartılıp havanda karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 0.1 mL %50 (h/h) metanol eklenip 10 dakika boyunca havan eli ile karıştırıldı. Hazırlanan pat halindeki kütle 24 saat boyunca etüvde 30°C'de kurutuldu. Elde edilen kuru SIM-SBE7- β -CD kompleksleri 125 mesh elekten geçirildi. 3 mg simvastatine eşdeğer miktarda SIM-SBE7- β -CD kompleksi tartıldı ve üzerine %1 (a/a) oranında kaydırıcı (magnezyum stearat) eklenerek 3 mm çapında zımba ile 200 psi basınçta tablet haline getirildi.

3. Simvastatin içeren tabletlerin hazırlanması:

100 mg simvastatin hassas terzide tartıldı, üzerine 200 mg mikrokristal selüloz (Avicel®PH-101) eklenip karıştırıldı. Bu karışımın üzerine %1 (a/a) oranında magnezyum stearat ilave edildi. Elde edilen karışımdan 3 mg simvastatine eşdeğer miktar tartıldı ve karışım 3 mm çapında zımba ile 200 psi basınçta tablet haline getirildi.

SIM-PLGA mikrokürelerini, SIM-SBE7- β -CD komplekslerini ve yalnız simvastatin içeren implant tabletler, hazırlandıktan sonra Gamma-Pak Sterilizasyon San. ve Tic. A.Ş. de 25 kilogray ⁶⁰Co gama ışını altında sterilize edildi.

3.2.1.7. SIM-PLGA mikrokürelerinden ve SIM-SBE7- β -CD komplekslerinden *in vitro* simvastatin salım hızının saptanması

In vitro salım çalışmaları, 37°C'de, 100 rpm'e ayarlanmış orbital karıştırıcıda (Forma Orbital Karıştırıcı, Thermo, ABD) 1 mL pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde yapıldı. Ortam çözeltisinden belirli zaman aralıklarında (1, 2, 24, 48, 72, 144, 192, 288, 336, 480, 600, 672, 744, 816, 888, 960, 1032, 1104. saatlerde) 0.1 mL örnek alındı ve ortama aynı miktarda pH 7.4 fosfat tamponu ilave edildi. Alınan örneklerde UV

spektrofotometre yöntemiyle simvastatin miktarı tayin edildi (n=3) ve birim zamanda kümülatif salınan simvastatin miktarı hesaplandı.

3.2.2. Cerrahi İşlemler

Operasyonların tüm safhalarında asepsi ve antisepsi kurallarına dikkat edilmiştir. Genel anestezisi tamamlanan deney hayvanlarının tibiaları tıraş makinesi ile tıraşlandıktan ve povidon iyot solüsyonu (batikon) ile silindikten sonra sağ ve sol bacakları fleksiyon pozisyonuna getirilmiş ve tibianın medial yüzeyine ulaşmak amacıyla kretin orta hattına Bard–Parker 15 numaralı bistüri ucu kullanılarak 20-25 mm. uzunluğunda longitudinal yönde cilt ve cilt altı insizyonu yapılmıştır (Şekil 3.4-A). İnsizyonu takiben flep, periost elevatörü ile mukoperiostal olarak kaldırılarak kemik açığa çıkarıldı (Şekil 3.4-B).

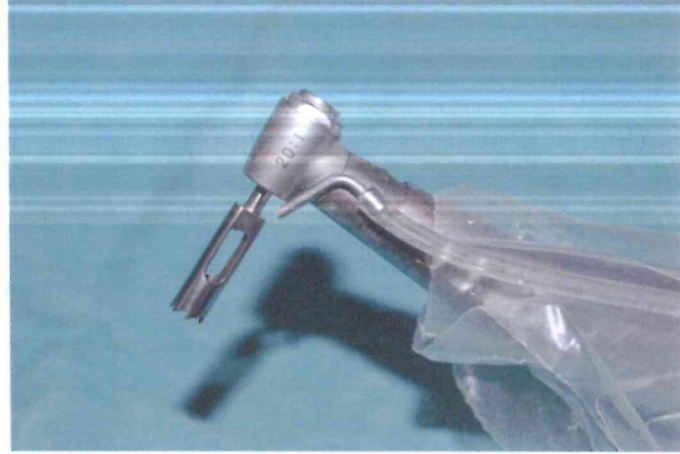


Şekil 3-4: A. İnsizyon yapılmış tibianın görüntüsü B. Açığa çıkarılmış tibianın görüntüsü

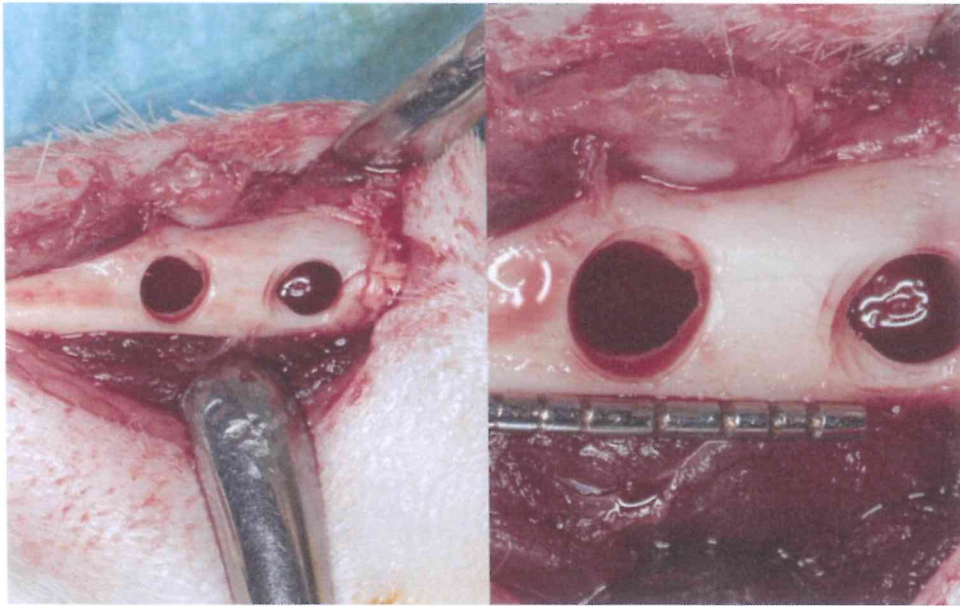
3.2.2.1. Kemik defektlerinin oluşturulması :

Kemiğin rahatça görüldüğü geniş bir çalışma ortamı sağlandıktan sonra fizyodispensere bağlı mikromotor-anguldruva ve ucundaki 3 mm. çapındaki trefin frezle (Şekil 3.5) 200–400 devir/dakika’da serum fizyolojikle soğutma altında defektler

oluşturulmuştur (Şekil 3.6-A). Kullanılacak trefin frezin ucu 2 mm'ye işaretlenmiştir. Açılan defektler arasında bırakılan 5 mm'lik mesafe, periodontal sonda yardımı ile kontrol edilmiştir(Şekil 3.6-B). Bu işlemi takiben defekt alanı içerisindeki kemik, universal küret yardımıyla blok halinde çıkarılmıştır. Her tibiada alt ve üst olmak üzere 2'şer adet, her deney hayvanında toplam 4'er adet defekt oluşturulmuştur.



Şekil 3-5: 3 mm çapındaki trefin frezin görüntüsü

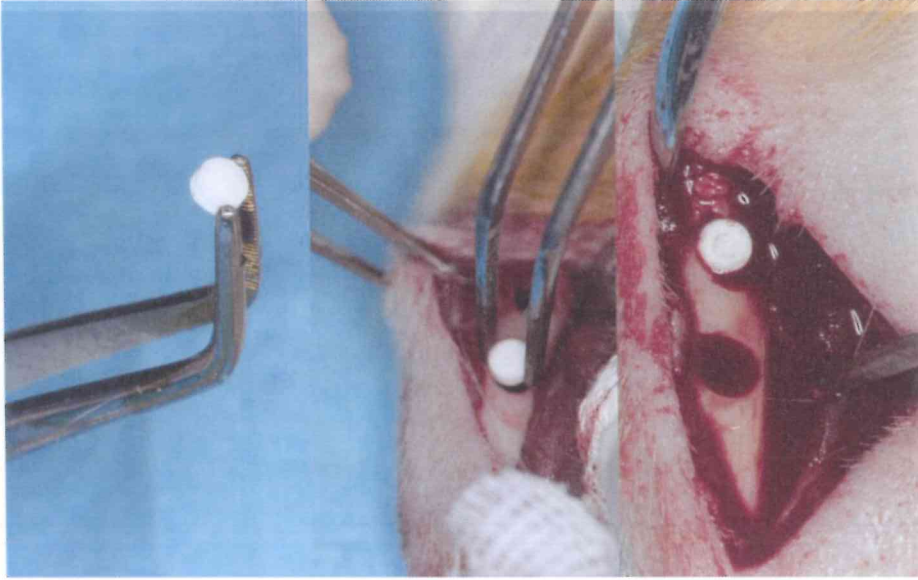


A

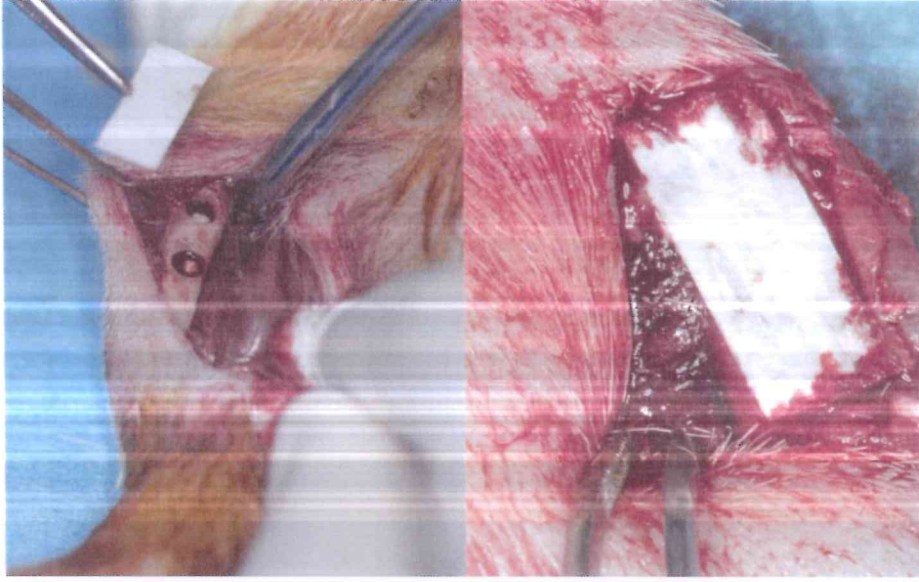
B

Şekil 3-6: A: 3 mm çapında açılan defektlerin görüntüsü B: İki defekt arası bırakılan 5 mm mesafenin görüntüsü

Defektler yıkanıp kanama kontrolünün yapılmasının ardından her hayvanda oluşturulan kemik defektlerine Tablo 3.1'de açıklandığı şekilde sırası ile SIM-PLGA mikrokürelerini, SIM-SBE7- β -CD komplekslerini ve yalnız simvastatin içeren tabletler belirlenen randomizasyonda uygulanmıştır (Şekil 3.7). Pasif kontrol grubu ise boş bırakılmıştır. Önceden uygun boyutlara getirilmiş kollajen membranlar, defektlerin üzerini örtecek şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.8). Ardından periost 4.0 Vicryl, deri ise 3.0 Vicryl suture kullanılarak primer olarak kapatılmıştır (Şekil 3.9). Son olarak, postoperatif kırık riskinin azaltılması amacıyla deney hayvanlarının tibiaları delikli flaster ile sarılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3-7: Defektlere yerleştirilen tabletlerin görüntüsü



Şekil 3-8: Defektlerin üzerine yerleştirilen kollajen membranın görüntüsü



Şekil 3-9: Dikişle primere kapatılmış flebin görüntüsü



Şekil 3-10: Flasterle sarılmış tibiannın görüntüsü

3.2.3. Operasyon Sonrası

3.2.3.1. Post-operatif Bakım

Operasyon sonrasında deney hayvanlarına veteriner hekim tarafından post-operatif enfeksiyonu engellemek amacıyla Sefazol Flakon 500 mg. (Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş.-Türkiye) tek doz (50 mg/kg) (yaklaşık 37.5 mg her hayvan başına) intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Post-operatif ağrıyı azaltmak amacıyla ise, Novalgin Ampül 2 mg. (Sanofi Aventis İlaç San. A.Ş.-Türkiye) tek doz (1 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Operasyondan 1 hafta sonra deney hayvanlarının tibialarına sarılan flasterler çıkartılmış; post-operatif 10 gün sonra ise deri üzerindeki dikişler postoperatif enfeksiyon gelişebileceğinden alınmıştır. İyileşme süreci boyunca deney hayvanlarının genel sağlık durumları, özellikle yara bölgeleri herhangi bir enfeksiyon gelişmemesi açısından kontrol edilmiştir. Bu şekilde iyileşme dönemi sorunsuz atlatılmış, tüm deney hayvanları sağlıklı şekilde iyileşme dönemini tamamlamışlardır.

İyileşme dönemi boyunca deney hayvanlarının yem ve sularının gerekli miktar ve zamanında verilip değiştirilmesi, kafeslerin bakım ve temizliği gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmeleri

4 ana gruba ayrılan deney hayvanları iyileşme periyodunu sorunsuz atlattıktan sonra 2 alt gruba daha ayrılarak operasyonu takiben 15. ve 45. günlerde sakrifiye edilmişlerdir. Deney hayvanlarına yüksek doz Ketamin HCL ve Xylazine enjekte edilerek, sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Sakrifikasyonun ardından deney hayvanlarının tibiaları içerisinde %10'luk formaldehit bulunan daha önceden hangi gruba ait olduğu etiketlenerek belirtilmiş kaplara sırasıyla yerleştirilmiştir (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12). Kobaylardan alınan doku materyalleri histopatolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler için İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında takibe alınmıştır.



Şekil 3-11: %10'luk formaldehit bulunan biyopsi kapları ve 15. günde sakrifiye edilen kobayların tibiaları



Şekil 3-12: %10'luk formaldehit bulunan biyopsi kapları ve 45. günde sakrifiye edilen kobayların tibiaları

3.2.4. Histolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler için örneklerin hazırlanması

Gönderilen materyal %'10 luk tamponlanmış formalinde 1 hafta süre ile fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra tüm materyal %50'lik formik asit ve %20'lik sodyum sitrat çözeltilerinden 1'er ölçek alınarak hazırlanan solüsyonda dekalsifiye edildi. Dekalsifiye parçalar rutin doku takibinden geçirildikten sonra hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5-7 mikron kalınlığındaki kesitler hematoksilen–eozin yöntemiyle boyanıp ışık mikroskopunda incelenmiştir.

İncelememiz sırasında “Olympus Soft imaging system analySIS FIVE” (Tokyo Japan) görüntü analiz sistemi kullanılmıştır. İncelenen kesitlerde 400 büyütme altında tüm görüntü alanını kaplayan üçer saha esas alınarak dijital görüntüler elde edilmiş ve bu alanlarda iltihap, nekroz, fibrozis, yabancı cisim reaksiyonu, residüel greft materyalinin varlığı, membranöz ve kondral kemik yapımı göz önünde bulundurularak yeni kemik yapımının kapladığı alanlar ve kemik iyileşmesinin evresi incelenmiştir. Fibrozis ve yeni kemik yapımı incelenirken, bir büyük büyütme alanında kapladıkları bölgenin yüzdesine göre 0 (-), %5-30 (+), %30-60 (++) ve <%60 (+++) olmak üzere değer verilmiştir. Kemik iyileşmesi değerlendirmesinde Allen' in kırık iyileşmesi metodu kullanılmıştır (152) (Tablo 3.7). Yabancı cisim reaksiyonu, residüel greft materyalinin varlığı ve nekroz incelenirken yok (0), var (1) olarak değer verilmiştir.

Tablo 3-6: Allen'in kırık iyileşmesi skortlama sistemi (152)

İyileşme Safhaları	Skortlama
Birleşme yok	0
Tamamlanmamış kırıkta birleşimi	1
Tamamlanmış kırıkta birleşimi	2
Osifikasyon fazında tamamlanmamış kemik birleşimi	3
Osifikasyon intermediat fazında tamamlanmamış kemik birleşimi	4
Osifikasyon geç fazında tamamlanmamış kemik birleşimi	5
Tamamlanmış kemik birleşimi	6

İstatistiksel Analiz :

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U testinden yararlanıldı. Parametrelerin 15. gün, 45. gün arası karşılaştırmaları Mann Whitney U testi ile yapıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi, Fisher's Exact Ki-Kare testi ve Continuity (Yates) Correction kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Salım Deneyi Bulguları

Araştırmamızda kullanılan 3 mg simvastatinin PLGA mikropartiküllerinden 1, 2, 8, 24, 48, 72, 120, 168, 216, 264, 336, 408, 480, 600, 672, 744, 816, 888, 960, 1032 ve 1104 saat sonraki salım miktarları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: SIM-PLGA mikrokürelerinden simvastatinin zamana bağlı *in vitro* salım miktarları

saat	gün	ortalama	SD
1		4.901767	0.012588
2		5.135953	0.070161
8		5.498133	0.046079
24	1	5.7666	0.047599
48	2	8.452467	0.069404
72	3	11.4273	0.270325
120	5	15.90737	0.121896
168	7	20.33337	0.394488
216	9	23.62893	0.236682
264	11	26.38498	0.310466
336	14	30.13873	0.329296
408	17	34.05857	0.424088
480	20	37.07329	0.114431
600	25	40.40343	0.172375
672	28	43.42633	0.301654
744	31	46.3689	0.089613
816	34	49.50947	0.540098
888	37	53.39867	0.27944
960	40	56.60327	0.469391
1032	43	58.89797	0.142759
1104	46	61.40267	0.253717

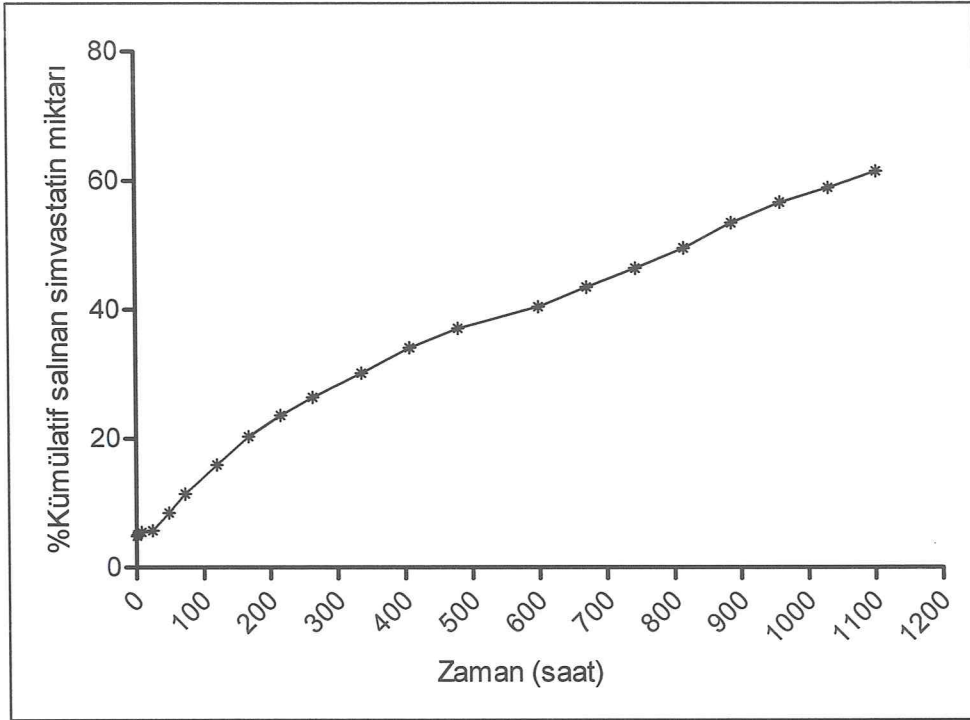
*SD: Standart sapma

Araştırmamızda kullanılan 3 mg simvastatinin SBE7- β -CD kompleksinden 1, 2, 4, 8 ve 24 saat sonraki salım miktarları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

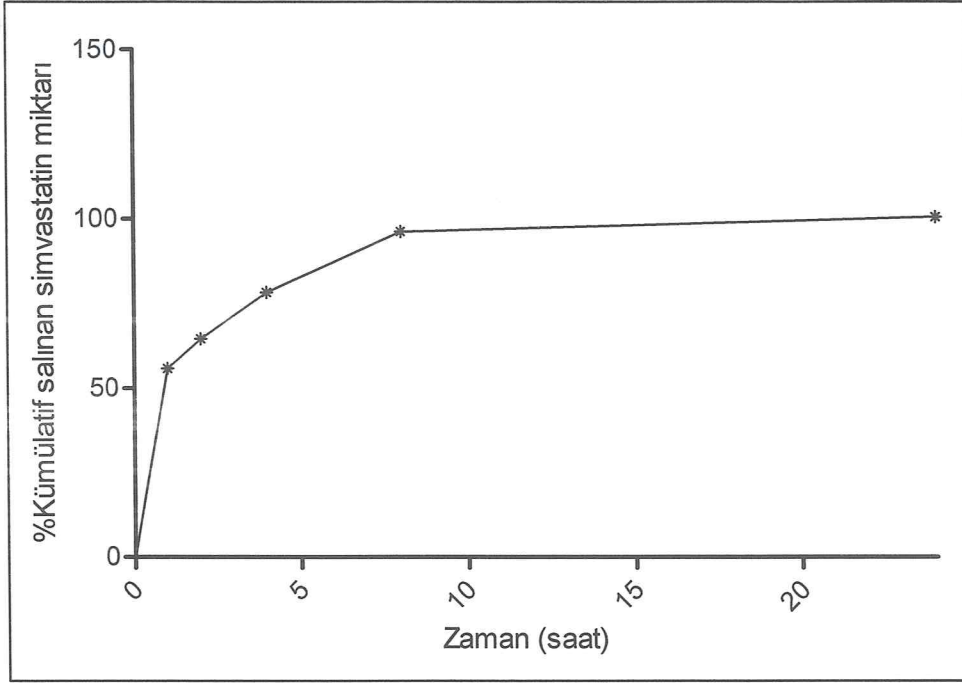
Tablo 4-2: SIM-SBE7- β -CD kompleksinden simvastatinin zamana bağı *in vitro* salım miktarları

saat	ortalama	SD
1	55.72667	0.338066
2	64.50333	0.489648
4	78.12	0.335062
8	96.15	0.256645
24	100.3967	0.29409

*SD: Standart sapma



Şekil 4-1: SIM-PLGA mikrokürelerinden zamana bağı salım miktarlarının yüzde değerleri



Şekil 4-2: SIM-SBE7-β-CD kompleksinden zamana bağlı salım miktarlarının yüzde değerleri

Buna göre, *in vitro* şartlarda 1104 saat sonra (46 gün) simvastatinin PLGA mikrokürelerinden yaklaşık % 61'inin salımınının gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.1). SIM-SBE7-β-CD kompleksinden ise 24 saat sonunda simvastatinin tamamının salındığı görülmüştür (Şekil 4.2).

4.2. Klinik gözlemler

Operasyon sonrası deney hayvanları sorunsuz bir şekilde iyileşmiştir. Yara kenarlarında makroskopik enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Paraliz, konvülsiyon, solunum, ya da ağrı ile ilgili bir komplikasyon yaşanmamıştır.

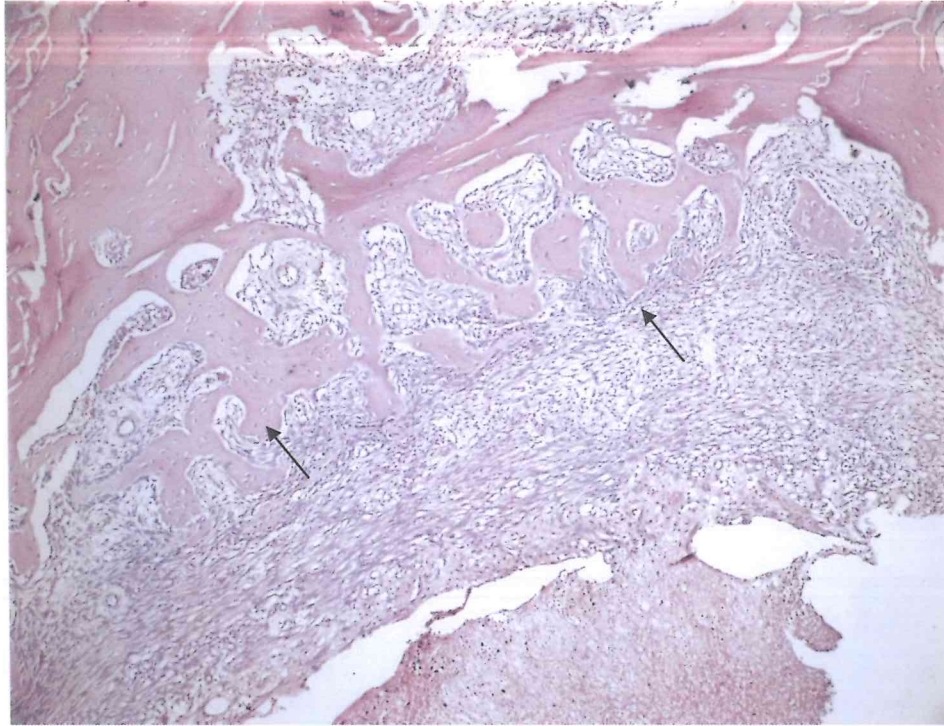
4.3. Histolojik Bulgular

4.3.1. Işık Mikroskobu Değerlendirmeleri

4.3.1.1. 15. Gün Kontrol Grubu

15. gün boş bırakılan grupta iltihap ve nekroz açısından değerlendirmede denek hayvanlarının 7'sinde iltihap alanı %5-30 arasında iken, 2'sinde nekroz gözlenmiştir. Grubun yarısında %5-30 arası fibrozis görülürken diğer yarısında fibrozis alanlarının miktarı defekt alanının %30-60'ı arasındadır. Yeni kemik yapımı 2 denek hayvanında

%5-30 oranında, 8 denek hayvanında %30-60 oranında iken, 2 denek hayvanında bu oranın %60'tan fazla olduğu belirtilmiştir. Kemik iyileşmesi Allen'in kırık iyileşmesi skorumuna göre yapılmıştır. Buna göre 2 denek hayvanında tamamlanmamış kırık birleşimi, 6'sında tamamlanmış kırık birleşimi, 3'ünde osifikasyonun intermediat fazında tamamlanmamış kemik birleşimi olduğu gözlenmiştir. Yabancı cisim reaksiyonuna hiçbir denek hayvanında rastlanmamıştır. Rezidüel greft materyali bu grupta hiçbir hayvanda saptanmamıştır.



Şekil 4-3: 15.gün boş bırakılan grupta defekt bölgesinde genç mezenkim hücreleri arasında defekti kapatmaya yönelik oluşan ince trabeküler yeni kemik dokusu (Oklar) (H&EX100).

4.3.1.2. 15. Gün SIM-PLGA Grubu

Deney hayvanlarının 6'sında %5-30 oranında, 2'sinde ise %30-60 oranında iltihap alanı gözlenirken, 4'ünde defekt alanlarında iltihap gözlenmemiştir. Hayvanların 8'inde nekroz varlığı, yarısında %5-30 oranında, diğer yarısında ise %30-60 oranında fibrozis alanı belirlenmiştir. Yeni kemik yapımı 3 denek hayvanında %5-30 oranında, 6'sında %30-60 oranında, 2'sinde %60'tan fazladır. Kemik iyileşmesine bakılacak olursa 2 denek hayvanında birleşmenin olmadığı, 2'sinde tamamlanmamış kırık birleşimi, 4'ünde tamamlanmış kırık birleşimi, 4'ünde osifikasyon fazında

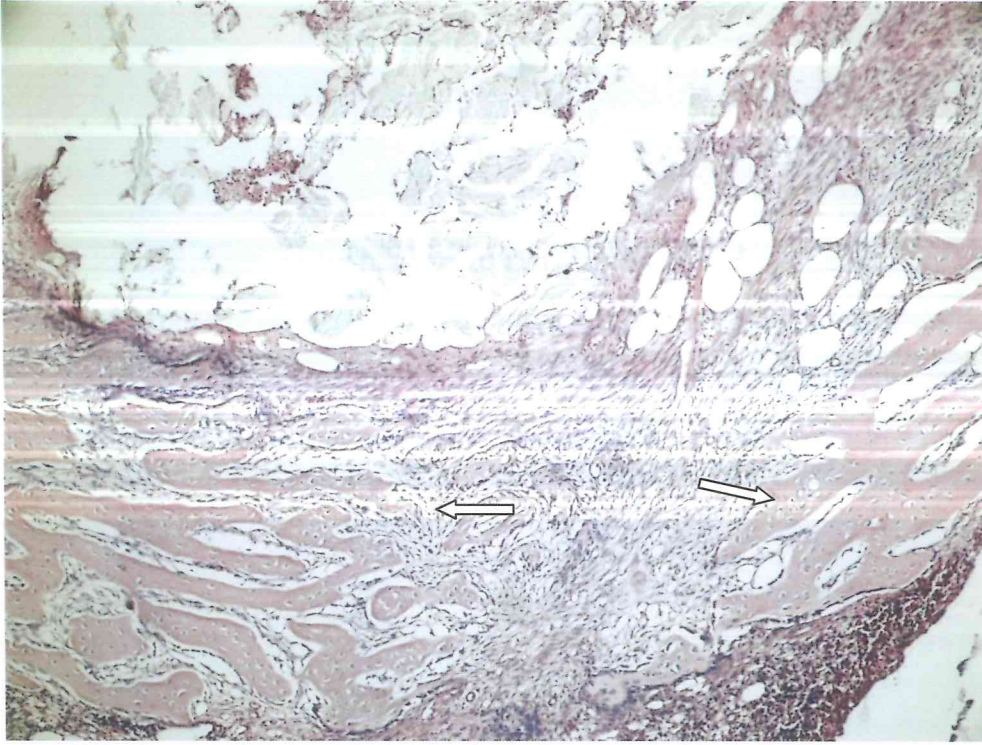
tamamlanmamış kemik birleşimi gözlenmiştir. Gruptaki hayvanların hiçbirinde yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir. Bu grupta bir miktar rezidüel greft materyali saptanmıştır.



Şekil 4-4: 15.gün SIM-PLGA grubunda kanama alanları, iltihap hücresi infiltrasyonu içeren bağ dokusu içinde yeni kemik trabekülleri (ince ok) ve yabancı madde artıkları (kalın ok)(H&EX100).

4.3.1.3. 15. Gün Simvastatin Grubu

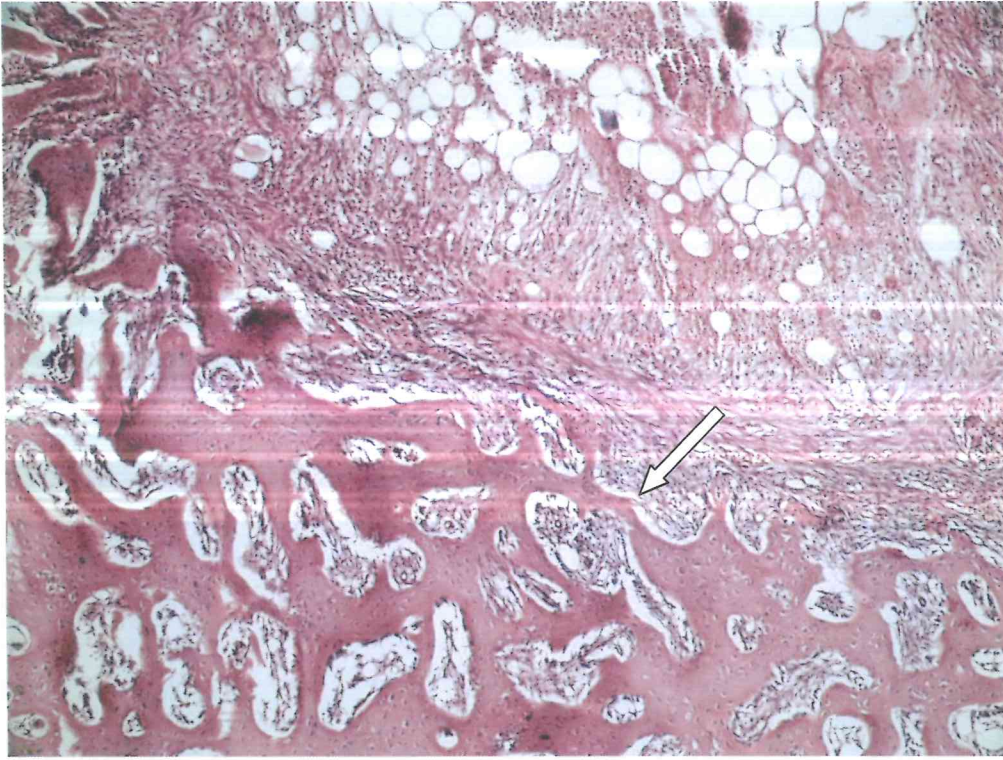
Hayvanların 10'unda %5-30 arasında iltihap ve nekroz gözlenirken, 2 denek hayvanında iltihap ve nekroz gözlenmemiştir. Kobayların 7'sinde %5-30, 2'sinde %30-60 fibrozis alanı belirlenirken, 3 denek hayvanında fibrozis belirlenmemiştir. Yeni kemik yapımı hayvanların 5'inde %5-30, 2'sinde %30-60 oranında iken 5'inde tespit edilmemiştir. Kemik iyileşmesinde defektlerin 8'inde hiç birleşmenin olmadığı, 4'ünde ise tamamlanmamış kırıldak birleşimi gözlenmiştir. Gruptaki hayvanların hiçbirinde yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir. Bu grupta bir miktar rezidüel greft materyali saptanmıştır.



Şekil 4-5: 15 gün simvastatin grubunda residüel madde altında, aktif bağ dokusu içinde yeni kemik trabekülleri (Oklar) (H&EX200).

4.3.1.4. 15. Gün SIM-SBE7- β -CD Grubu

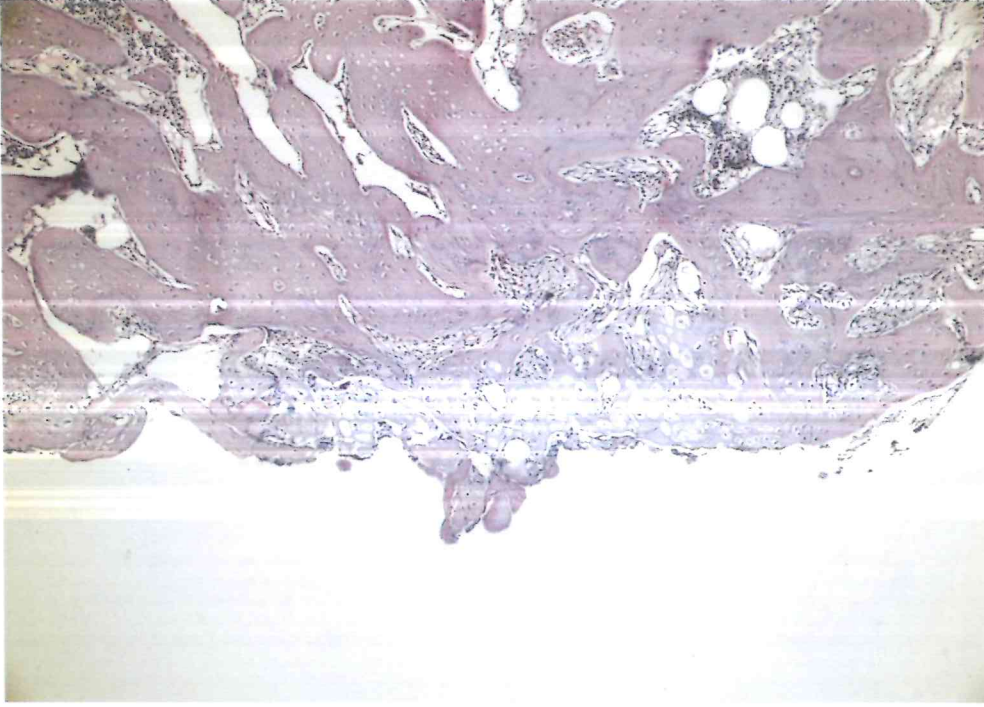
SBE7- β -CD grubunda iltihap açısından sadece 3 denek hayvanında %5-30 oranında iltihap alanı gözlenmiştir. Hayvanların sadece 1 tanesinde nekroz görülmemiştir. Denek hayvanlarının 7'sinde %5-30 ve sadece 1'inde %30-60 oranında fibrozis alanı görülürken, 4'ünde fibrozis saptanmamıştır. 2 tanesinde %5-30, 5'inde %30-60 oranında yeni kemik alanı gözlenirken 5 tanesinde yeni kemik yapımı gözlenmemiştir. Kemik iyileşmesi bakımından denek hayvanlarının yarısında hiç birleşmenin olmadığı diğer yarısında ise tamamlanmamış kırıkta birleşimi olduğu belirtilmiştir. Gruptaki hayvanların hiçbirinde yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir. Bu grupta bir miktar rezidüel greft materyali saptanmıştır.



Şekil 4-6: 15 gün SIM-SBE7-β-CD grubunda damardan zengin bağ dokusu içinde yeni kemik trabekülleri (beyaz ok) (H&EX100).

4.3.1.5. 45. Gün Kontrol Grubu

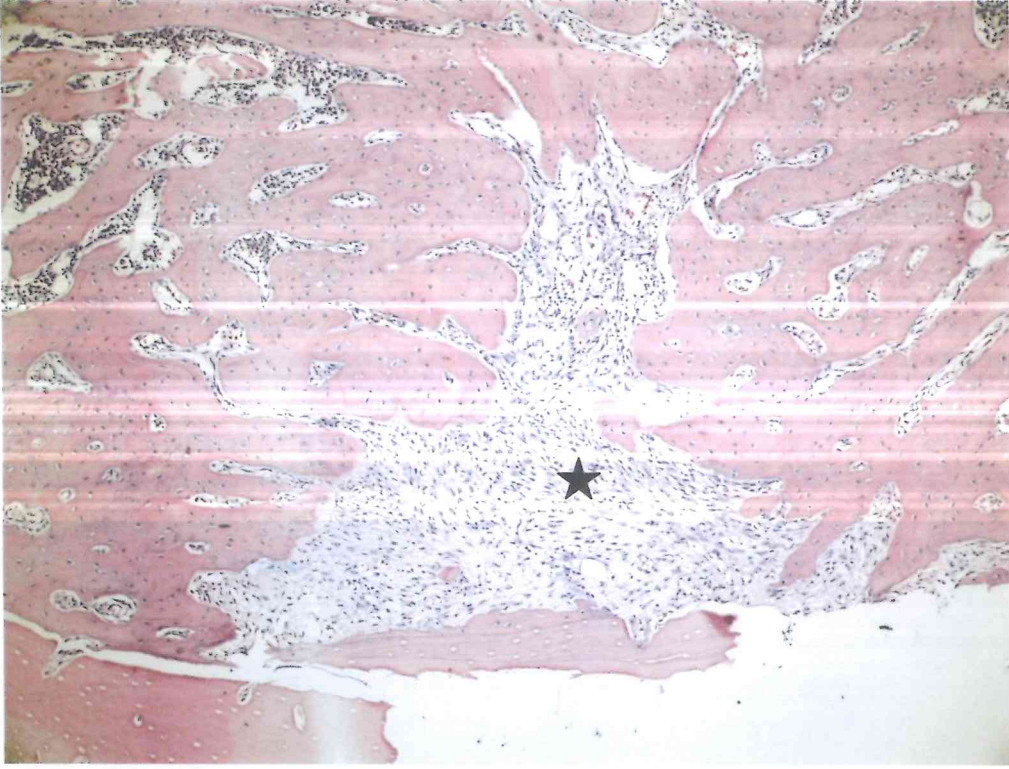
45. gün boş bırakılan grupta iltihap açısından sadece 1 denek hayvanında %5-30 oranında iltihap ve nekroz gözlenmiştir. Grubun yarısında fibrozis alanları %5-30'luk bir alanı kaplarken, diğer yarısında fibrozis görülmemiştir. Grubun yarısında yeni kemik oluşumu %30-60, diğer yarısında ise %60'tan fazladır. Kemik iyileşmesi açısından hayvanların 3'ünde osifikasyon fazında tamamlanmamış kemik birleşimi, 2'sinde osifikasyon intermediat fazında tamamlanmamış kemik birleşimi, 7'sinde osifikasyon geç fazında tamamlanmamış kemik birleşimi olarak belirtilmiştir. Gruptaki hayvanların hiçbirinde yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir. Rezidüel greft materyali bu grupta hiçbir hayvanda gözlenmemiştir.



Şekil 4-7: 45 gün boş grubunda defekt bölgesini kapatan yeni kemik trabekülleri (H&EX100).

4.3.1.6. 45. Gün SIM-PLGA Grubu

Bu grupta denek hayvanlarının yarısında %5-30 oranında gözlenirken, diğer yarısında iltihap gözlenmemiştir. Hayvanların 4'ünde nekroz var iken, 8'inde yoktur. 1 hayvanda fibrozis görülmemiş ancak fibrozis alanları hayvanların 8'inde %5-30 oranında, 3'ünde ise %30-60 oranında görülmüştür. Yeni kemik oluşumu hayvanların 3'ünde %30-60, 8'inde %60'tan fazla bulunmuşken 1'inde gözlenmemiştir. Kemik iyileşmesinde ise, 1'inde birleşmenin olmadığı, 5'inde tamamlanmış kırıkta birleşimi, 3'ünde osifikasyon fazında tamamlanmamış kemik birleşimi, 3'ünde osifikasyonun intermediat fazında tamamlanmamış kemik birleşimi olduğu görülmüştür. Gruptaki hayvanların hiçbirinde yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir. Bu grupta bir miktar rezidüel greft materyali saptanmıştır.



Şekil 4-8: 45. gün SIM-PLGA grubunda defekt bölgesini tama yakın kapatan yeni kemik dokusu arasında aktif fibröz doku alanı (Yıldız) (H&E X100).

4.3.1.7. 45. Gün Simvastatin Grubu

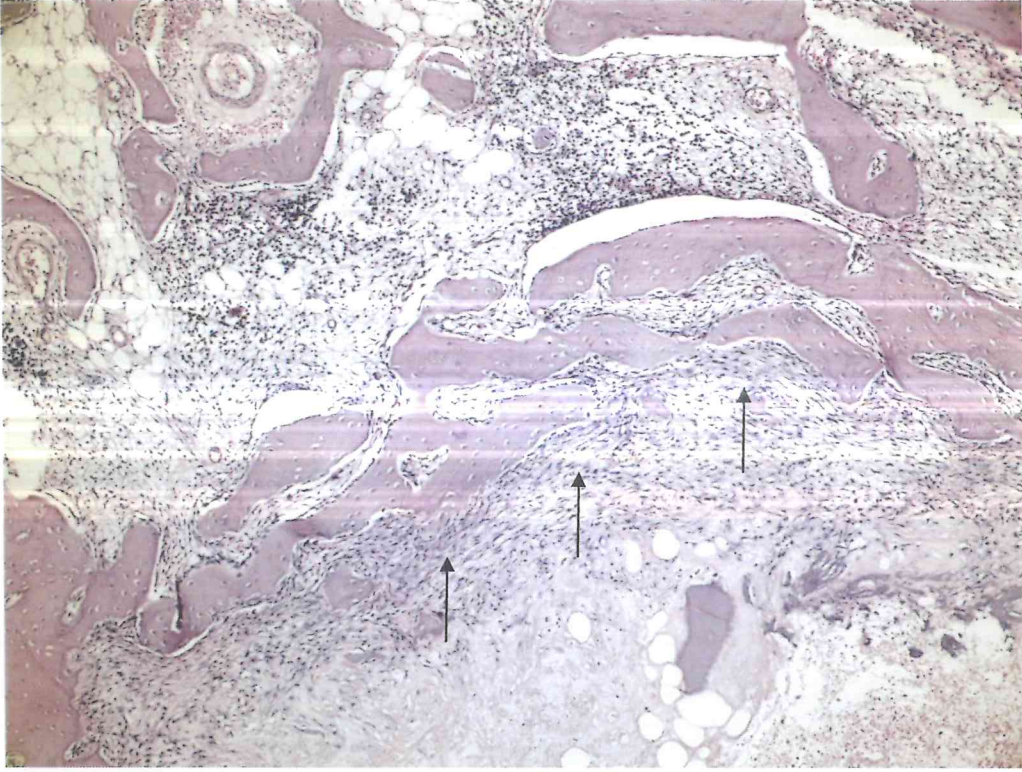
Bu grupta denek hayvanlarının yarısında iltihap gözlenmezken, diğer yarısında %5-30 oranında gözlenmiştir. 10'unda nekroz varken, geri kalan 2'sinde nekroz görülmemektedir. 8'inde fibrozis alanları %5-30 oranında iken, 4'ünde fibrozis saptanmamıştır. Yeni kemik oluşumu hayvanların 4'ünde %5-30, 4'ünde %30-60 arasında iken, 4'ünde yoktur. Kemik iyileşmesi açısından 2'sinde tamamlanmamış kıkırdak birleşimi ve 10'unda tamamlanmış kıkırdak birleşimi olduğu belirtilmiştir. Gruptaki hayvanların hiçbirinde yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir. Bu grupta bir miktar rezidüel greft materyali saptanmıştır.



Şekil 4-9: 45. gün Simvastatin grubunda defekt bölgesinde, residüel madde altında ince kemik trabekülleri (oklar) (H&EX100).

4.3.1.8. 45. Gün SIM-SBE7- β -CD Grubu

45. gün SIM-SBE7- β -CD grubunda denek hayvanlarının yarısında %5-30 arasında iltihap ve bir miktar nekroz gözlenirken diğer yarısında iltihap ve nekroz gözlenmemiştir. 9'unda fibrozis alanları %5-30, 2'sinde %30-60 arasında bulunurken, 1'inde fibrozis saptanmamıştır. Yeni kemik oluşumu hayvanların 5'inde %5-30, 5'inde %30-60, 2'sinde ise %60'tan fazla bir orandadır. Kemik iyileşmesi bakımından 4'ünde tamamlanmamış kıkırdak birleşimi, 2'sinde tamamlanmış kıkırdak birleşimi, 4'ünde osifikasyonun intermediat fazında tamamlanmamış kemik birleşimi, 2'sinde ise osifikasyonun geç fazında tamamlanmamış kemik birleşimi olduğu görülmüştür. Gruptaki hayvanların hiçbirinde yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir. Residüel materyal bu grupta hiç bir hayvanda gözlenmemiştir.



Şekil 4-10: 45. gün SIM-SBE7-β-CD grubunda defekt bölgesinde damardan zengin, aktif fibröz doku içinde yeni kemik trabekülleri (Oklar) (H&EX100).

4.4. İstatistiksel Bulgular

Tablo 4-3: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki İltihap Düzeylerinin Değerlendirilmesi

İltihap	15. gün		+p
	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)	
Simvastatin	0,83±0,39 (1)	0,50±0,52 (0,5)	0,090
SIM-PLGA	0,83±0,72 (1)	0,50±0,52 (0,5)	0,246
SIM-SBE7-β- CD	0,25±0,45 (0)	0,55±0,52 (1)	0,156
Boş	0,67±0,65 (1)	0,08±0,29 (0)	0,011*
++p	0,044*	0,078	

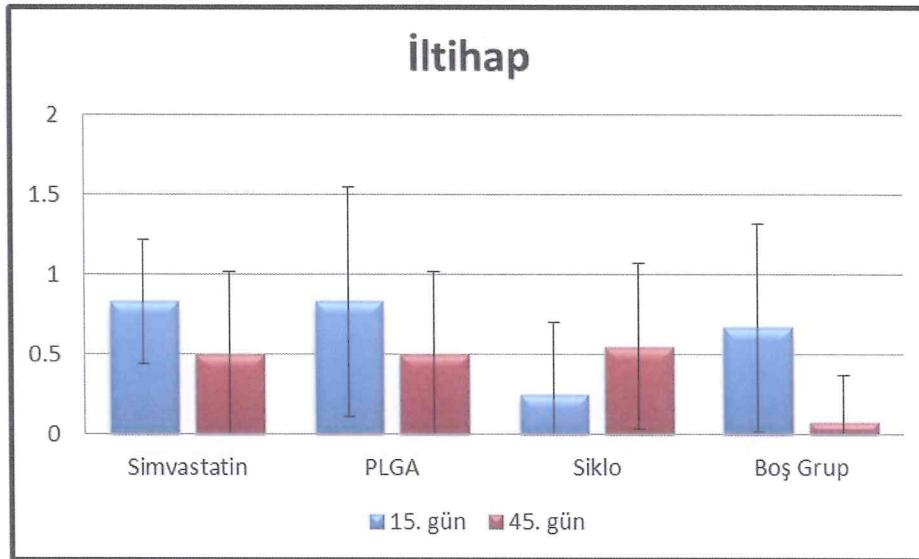
+ Mann Whitney U Test

++ Kruskal Wallis Test

* p<0.05

Tablo 4-4: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki İltihap Düzeylerinin Post Hoc Değerlendirilmesi

İltihap	15. gün	45. gün
	P	p
Simvastatin/SIM-PLGA	0,889	1,000
Simvastatin/SIM-SBE7-β-CD	0,005**	0,831
Simvastatin/Boş	0,363	0,028*
SIM-PLGA/SIM-SBE7-β-CD	0,032*	0,831
SIM-PLGA/Boş	0,567	0,028*
SIM-SBE7-β-CD/Boş	0,089	0,019*
<i>Mann Whitney U Test</i>	<i>* p<0.05</i>	<i>** p<0.01</i>



*Siklo: SBE7-β-CD

Şekil 4-11: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki İltihap Düzeylerinin Grafiği

Grupların 15. gün iltihap düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.044$; $p<0.05$). Yapılan ikili değerlendirmelerde SIM-SBE7-β-CD grubunun 15. gün iltihap düzeyi, Simvastatin ($p:0.005$; $p<0.01$) ve SIM-PLGA ($p:0.032$; $p<0.05$) gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Diğer grupların 15. Gün iltihap düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grupların 45. gün iltihap düzeyleri arasında anlamlılığa yakın olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p:0.079$; $p<0.05$). Dört grup arası farklılık anlamlı bulunmamakla birlikte yapılan ikili değerlendirmelerde boş grubun 45. gün iltihap düzeyi, Simvastatin ($p:0.028$; $p<0.05$), SIM-PLGA ($p:0.028$; $p<0.05$) ve SIM-SBE7- β -CD ($p:0.019$; $p<0.05$) gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Simvastatin, SIM-PLGA ve SIM-SBE7- β -CD gruplarının 45. gün iltihap düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Simvastatin Grubunda; 15. gün iltihap düzeyine göre 45. günde bir düşüş görülmekle birlikte, bu düşüş anlamlılığa yakın ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

SIM-PLGA Grubunda; 15. gün iltihap düzeyine göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

SIM-SBE7- β -CD Grubunda; 15. gün iltihap düzeyine göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

Boş Grupta; 15. gün iltihap düzeyine göre 45. günde görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p:0.011$; $p<0.05$).

Tablo 4-5: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Fibrozis Düzeylerinin Değerlendirilmesi

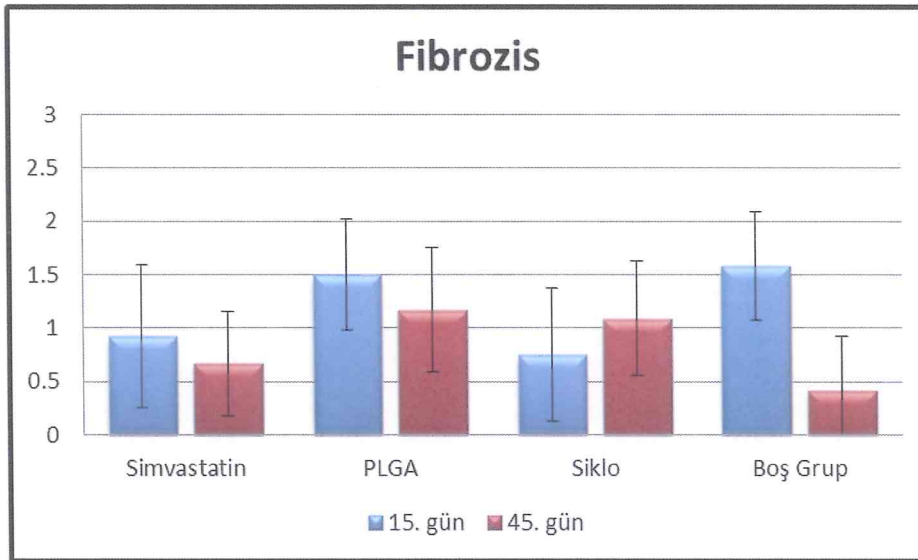
Fibrozis	15. gün	45. gün	⁺ p
	Ort \pm SS (Medyan)	Ort \pm SS (Medyan)	
Simvastatin	0,92 \pm 0,67 (1)	0,67 \pm 0,49 (1)	0,345
SIM-PLGA	1,50 \pm 0,52 (1,5)	1,17 \pm 0,58 (1)	0,162
SIM-SBE7- β - CD	0,75 \pm 0,62 (1)	1,09 \pm 0,54 (1)	0,166
Boş	1,58 \pm 0,51 (2)	0,42 \pm 0,51 (0)	0,001**
⁺⁺ p	0,004**	0,006**	

⁺ Mann Whitney U Test ⁺⁺ Kruskal Wallis Test ** $p<0.01$

Tablo 4-6: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Fibrozis Düzeylerinin Post Hoc Değerlendirilmesi

Fibrozis	15. gün	45. gün
	P	p
Simvastatin/SIM-PLGA	0,034*	0,038*
Simvastatin/SIM-SBE7-β-CD	0,534	0,068
Simvastatin/Boş	0,017*	0,229
SIM-PLGA/SIM-SBE7-β-CD	0,007**	0,732
SIM-PLGA/Boş	0,688	0,005**
SIM-SBE7-β-CD/Boş	0,004**	0,009**

Mann Whitney U Test * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$



*Siklo: SBE7-β-CD

Şekil 4-12: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Fibrozis Düzeylerinin Grafiği

Grupların 15. gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p < 0.01$). Yapılan ikili değerlendirmelerde SIM-PLGA grubunun 15. gün fibrozis düzeyi, Simvastatin ($p:0.034$; $p < 0.05$) ve SIM-SBE7-β-CD

($p:0.007$; $p<0.01$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Boş grubun 15. gün fibrozis düzeyi, Simvastatin ($p:0.017$; $p<0.05$) ve SIM-SBE7- β -CD ($p:0.004$; $p<0.01$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Diğer grupların 15. gün fibrozis düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grupların 45. gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.006$; $p<0.01$). Yapılan ikili değerlendirmelerde SIM-PLGA grubunun 45. gün fibrozis düzeyi, Simvastatin ($p:0.038$; $p<0.05$) ve Boş Gruptan ($p:0.005$; $p<0.01$) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. SIM-SBE7- β -CD grubunun 45. gün fibrozis düzeyi, Boş gruptan ($p:0.009$; $p<0.01$) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Diğer grupların 45. gün fibrozis düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Simvastatin Grubunda; 15. gün fibrozis düzeyine göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

SIM-PLGA Grubunda; 15. gün fibrozis düzeyine göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

SIM-SBE7- β -CD Grubunda; 15. gün fibrozis düzeyine göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

Boş Grupta; 15. gün fibrozis düzeyine göre 45. günde görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p:0.001$; $p<0.01$).

Tablo 4-7: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Yeni Kemik Oluşumu Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Yeni Kemik	15. gün	45. gün	⁺ p
	Ort \pm SS (Medyan)	Ort \pm SS (Medyan)	
Simvastatin	0,75 \pm 0,75 (1)	1,00 \pm 0,85 (1)	0,460
SIM-PLGA	1,67 \pm 0,98 (2)	2,50 \pm 0,9 (3)	0,019*
SIM-SBE7- β -CD	1,00 \pm 0,95 (1)	1,82 \pm 0,75 (2)	0,049*
Boş	2,00 \pm 0,6 (2)	2,50 \pm 0,52 (2,5)	0,048*
⁺⁺ p	0,004**	0,001**	

⁻ Mann Whitney U Test

⁺⁺ Kruskal Wallis Test

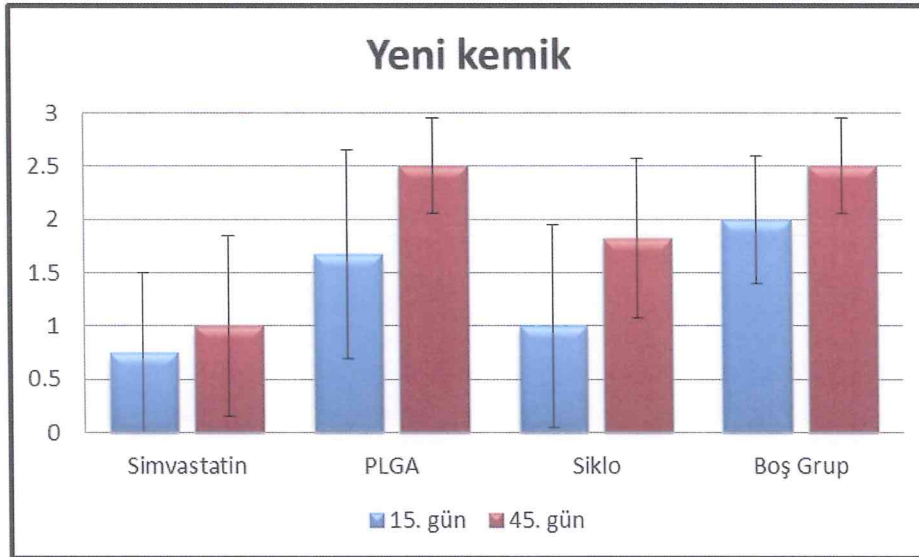
* $p<0.05$

** $p<0.01$

Tablo 4-8: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Yeni Kemik Düzeylerinin Post Hoc Değerlendirilmesi

Yeni Kemik	15. gün	45. gün
	P	p
Simvastatin/SIM-PLGA	0,022*	0,001**
Simvastatin/SIM-SBE7-β-CD	0,518	0,037*
Simvastatin/Boş	0,001**	0,001**
SIM-PLGA/SIM-SBE7-β-CD	0,109	0,027*
SIM-PLGA/Boş	0,437	0,549
SIM-SBE7-β-CD/Boş	0,011*	0,027*

Mann Whitney U Test * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$



*Siklo: SBE7-β-CD

Şekil 4-13: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Yeni Kemik Düzeylerinin Grafiği

Grupların 15. gün yeni kemik oluşumu düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.004$; $p < 0.01$). Yapılan ikili değerlendirmelerde Simvastatin grubunun 15. gün yeni kemik oluşumu düzeyi, SIM-PLGA ($p < 0.022$; $p < 0.05$) ve Boş gruptan ($p < 0.001$; $p < 0.01$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. SIM-

SBE7- β -CD grubunun 15. gün yeni kemik oluşumu düzeyi, Boş Gruptan ($p:0.011$; $p<0.05$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Diğer grupların 15. gün yeni kemik oluşumu düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grupların 45. gün yeni kemik oluşumu düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.001$; $p<0.01$). Yapılan ikili değerlendirmelerde Simvastatin grubunun 45. gün yeni kemik oluşumu düzeyi, SIM-PLGA ($p:0.001$; $p<0.01$), SIM-SBE7- β -CD ($p:0.037$; $p<0.05$) ve Boş gruptan ($p:0.001$; $p<0.01$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. SIM-SBE7- β -CD grubunun 45. gün yeni kemik oluşumu düzeyi, SIM-PLGA ($p:0.027$; $p<0.05$) ve Boş gruptan ($p:0.027$; $p<0.05$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Diğer grupların 45. gün yeni kemik oluşumu düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Simvastatin Grubunda; 15. gün yeni kemik oluşumu düzeyine göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

SIM-PLGA Grubunda; 15. gün yeni kemik oluşumu düzeyine göre 45. günde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

SIM-SBE7- β -CD Grubunda; 15. gün yeni kemik oluşumu düzeyine göre 45. günde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Boş Grupta; 15. gün yeni kemik oluşumu düzeyine göre 45. günde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 4-9: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Kemik İyileşmesi Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Kemik iyileşmesi	15. gün	45. gün	+p
	Ort \pm SS (Medyan)	Ort \pm SS (Medyan)	
Simvastatin	0,33 \pm 0,49 (0)	1,00 \pm 0,95 (1)	0,074
SIM-PLGA	1,83 \pm 1,11 (2)	2,58 \pm 1,16 (2,5)	0,132
SIM-SBE7- β -CD	0,50 \pm 0,52 (0,5)	3,00 \pm 1,61 (4)	0,001**
Boş Grup	2,42 \pm 1,08 (2)	4,25 \pm 1,06 (5)	0,001**
++p	0,001**	0,001**	

⁻ Mann Whitney U Test

⁻⁻ Kruskal Wallis Test

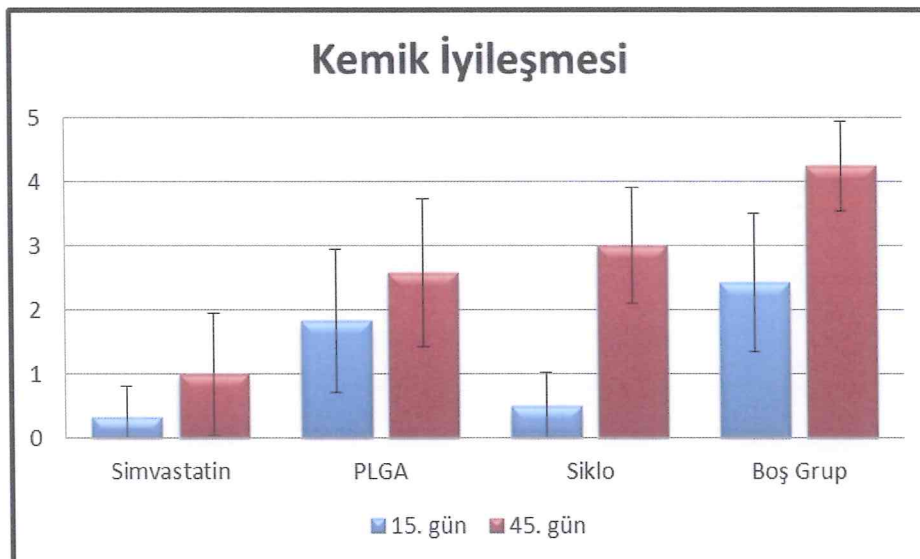
* $p<0.05$

** $p<0.01$

Tablo 4-10: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Kemik İyileşmesi Düzeylerinin Post Hoc Değerlendirilmesi

Kemik iyileşmesi	15. gün	45. gün
	P	p
Simvastatin/SIM-PLGA	0,002**	0,002**
Simvastatin/SIM-SBE7-β-CD	0,418	0,007**
Simvastatin/Boş	0,001**	0,001**
SIM-PLGA/SIM-SBE7-β-CD	0,004**	0,526
SIM-PLGA/Boş	0,334	0,002**
SIM-SBE7-β-CD/Boş	0,001**	0,040*

Mann Whitney U Test * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$



*Siklo: SBE7-β-CD

Şekil 4-14: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Kemik İyileşmesi Düzeylerinin Grafiği

Grupların 15. gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.001$; $p<0.01$). Yapılan ikili değerlendirmelerde SIM-PLGA grubunun 15. gün kemik iyileşmesi düzeyi, Simvastatin ($p:0.002$; $p<0.01$) ve SIM-SBE7- β -CD ($p:0.004$; $p<0.01$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Boş grubun 15. gün kemik iyileşmesi düzeyi, Simvastatin ($p:0.001$; $p<0.01$) ve SIM-SBE7- β -CD ($p:0.001$; $p<0.01$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Diğer grupların 15. gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grupların 45. gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.001$; $p<0.01$). Yapılan ikili değerlendirmelerde Simvastatin grubunun 45. gün kemik iyileşmesi düzeyi, SIM-PLGA ($p:0.002$; $p<0.01$), SIM-SBE7- β -CD ($p:0.007$; $p<0.01$) ve Boş gruptan ($p:0.001$; $p<0.01$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Boş grubun 45. gün kemik iyileşmesi düzeyi, SIM-PLGA ($p:0.002$; $p<0.01$) ve SIM-SBE7- β -CD ($p:0.040$; $p<0.05$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. SIM-PLGA ve SIM-SBE7- β -CD gruplarının 45. gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Simvastatin Grubunda; 15. gün kemik iyileşmesi düzeyine göre 45. günde bir artış görülmekle birlikte, bu artış anlamlılığa yakın ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

SIM-PLGA Grubunda; 15. gün kemik iyileşmesi düzeyine göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

SIM-SBE7- β -CD Grubunda; 15. gün kemik iyileşmesine göre 45. günde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$).

Boş Grupta; 15. gün kemik iyileşmesine göre 45. günde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$).

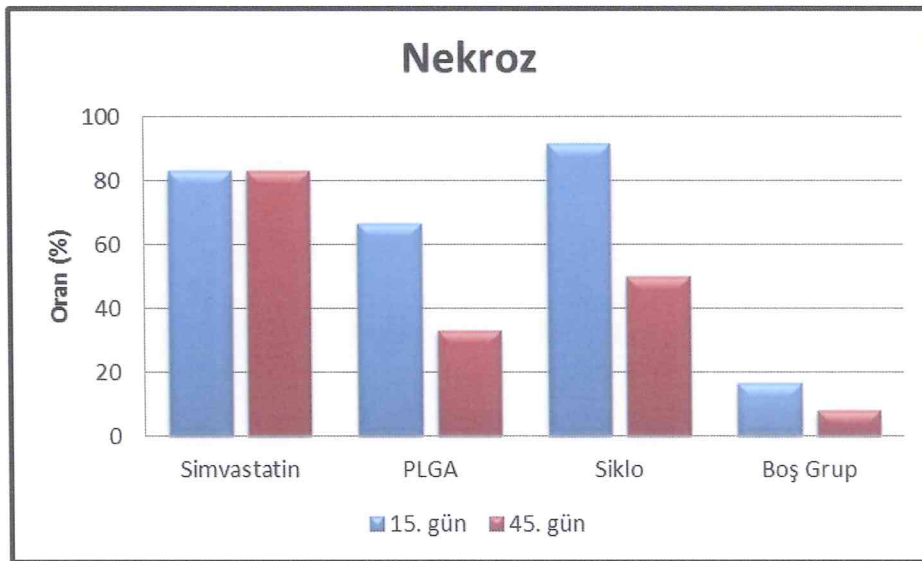
Tablo 4-11: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Nekroz Varlığının Değerlendirilmesi

Nekroz	Simvastatin	SIM-PLGA	SIM-SBE7- β - CD	Boş Grup	⁺ p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
15. gün	10 (%83,3)	8 (%66,7)	11 (%91,7)	2 (%16,7)	0,001**
45. gün	10 (%83,3)	4 (%33,3)	6 (%50,0)	1 (%8,3)	0,002**
⁺⁺ p	1,000	0,221	0,069	1,000	

⁺ Ki-kare Test

⁺⁺ Fisher's Exact ve/veya Continuity (yates) correction

** $p < 0.01$



*Siklo: SBE7- β -CD

Şekil 4-15: Grupların 15. Gün ve 45. Günlerdeki Nekroz Varlığının Grafiği

Gruplar arasında 15. günde nekroz görülme oranları açısından istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Farklılık boş gruptan kaynaklanmaktadır. Boş grupta 15. günde nekroz görülme oranı (%16.7) diğer gruplardan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p: 0.043$; $p < 0.05$). Simvastatin, SIM-PLGA ve SIM-SBE7- β -CD gruplarında 15. günde nekroz görülme oranları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

Gruplar arasında 45. günde nekroz görülme oranları açısından istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Farklılık Simvastatin grubundan kaynaklanmaktadır. Simvastatin grubunda 45. günde nekroz görülme oranı (%83.3),

PLGA ($p:0.038$; $p<0.05$) ve Boş gruptan ($p:0.001$; $p<0.01$) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında 45. günde nekroz görülme oranları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Simvastatin Grubunda; 15. günde nekroz görülme oranına göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

SIM-PLGA Grubunda; 15. günde nekroz görülme oranına göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

SIM-SBE7- β -CD Grubunda; 15. gün nekroz görülme oranına(%91.7) göre 45. günde (%50) bir düşüş görülmekle birlikte, bu düşüş anlamlılığa yakın ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Boş Grupta; 15. günde nekroz görülme oranına göre 45. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda kobayların tibiasında 3 mm kritik boyutlarda oluşturulan kemik defektlerine uygun dozda ve uygun taşıyıcı ile lokal simvastatin uygulaması sonrası oluşacak değişikliklerin 15. ve 45. günlerde histopatolojik olarak değerlendirerek simvastatinin kemik iyileşmesi ve kemik yapımı üzerine etkisini incelemek amaçlanmıştır. Mundy ve ark. 1999 yılında yaptıkları çalışmada statinlerin kemik metabolizmasına olumlu etkilerini belirttiklerinden (17) bu yana bu konu üzerinde bir çok çalışma yapılmıştır (18-21,128-136). Ancak literatürde yapılan çoğu çalışmada, simvastatin dozaj ve formunun terapötik doza ulaşması, *in vitro* çalışmalarla standardize edilememiştir (154,155,156). Bu çalışmada uygun simvastatin dozaj ve formunun bulunabilmesi için *in vitro* ön çalışma yapılmıştır. PLGA mikrokürelerinden ve SBE7- β -CD inklüzyon komplekslerinden simvastatinin *in vitro* olarak birim zamanda salımı incelenmiştir. Yine literatür incelendiğinde statinlerin uygulama dozu ve kullanılan taşıyıcı ile ilgili tartışmaların devam ettiği ancak bu konularda net bir sonuca varılamadığı görülmüştür (18,157,158).

In vitro ortamda hesaplanarak hazırlanan formülasyonun *in vivo* ortamda etkinliğinin de araştırılması gerekmektedir. Simvastatinin güvenirliliği ve etkinliği deneysel olarak yeterli ölçüde desteklenmediğinden klinik kullanım öncesi hayvan çalışması yapılması önerilmektedir. Hayvan çalışmalarında insanla yapılan çalışmalara göre daha kısa sürede sonuç alınmaktadır. Ayrıca insanla yapılan çalışmalarda hastaların programa uyumunu sağlayabilmek zordur. Yapılan çalışmaların histopatolojik incelemesinin yapılabilmesi için, hastadan biyopsi alınması gerekebilir ve bu da hastanın tekrar opere edilmesini gerektirir.

Literatürde kemik rejenerasyonunu artırmaya yönelik araştırılan materyallerin klinik kullanımlarından önce biyolojik potansiyellerini ve uygulanabilirliklerini ortaya koymak için sıçan ve kobay gibi kemirgenler hayvan modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (159,160,161). Bu nedenle çalışmamızda deney hayvanı olarak Dunkin-Hartley guinea pig türü kobaylar tercih edilmiştir. Kobayların tibia kemiklerinin sıçan ve fare gibi diğer daha küçük deney hayvanlarına göre aynı anda birkaç defekt oluşturulmasına daha uygun olması, morbidite ve fraktür riskinin nispeten daha düşük olması kobayın deney hayvanı olarak seçilme nedenleri arasındadır. Ayrıca kobayların

koyun ya da domuz gibi daha büyük deney hayvanlarına göre genel anesteziye alınırken entübasyona ihtiyaç duyulmaması nedeniyle anestezisinin nispeten daha basit olması, kolay bakım ve barınma imkanı ve düşük maliyet gibi avantajları da bulunmaktadır.

Çalışmamıza 10-12 haftalık erişkin kobaylar seçilerek yaşa bağlı osteojenik potansiyelin değişkenliği elimine edilmeye çalışılmıştır (162,163).

Çalışmamızdaki denek sayısının belirlenmesinde önceden yapılmış olan çalışmalardaki fark değerler referans alınmıştır (164). Bu amaçla 15 ve 45 günlük iyileşme grupları arasında %30 luk bir kemik rejenerasyonu farkının %80 istatistiksel güç ve $\alpha=0,05$ anlamlılık seviyesinde tespit edilebilmesi için grup başına en az 9.65 (10) hayvan gerektiği hesaplanmıştır. Tek bir deney hayvanında oluşturulacak 4 defektle tüm materyaller değerlendirilebilecektir. 2 farklı sakrifikasyon zamanında eşit sayıda deney hayvanının sakrifiye edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle çalışmaya toplamda 24 adet deney hayvanı dahil edilmiştir.

Çalışmamızda deney ve kontrol grubunu oluşturan defektlerin aynı kobayda oluşturulmasına dikkat edilmiştir. Bu sayede denek farklılıklarından doğabilecek ve çalışma sonuçlarını etkileyebilecek faktörler elimine edilmiştir. Ayrıca her iki taşıyıcı materyal arasında etkileşim olabileceği ve sonuçları etkileyebileceği için simvastatin yüklenmiş PLGA mikrokürelerini ve simvastatin-SBE7- β -CD inklüzyon komplekslerini içeren implant formülasyonlarının aynı tibiada alt alta olmamasına dikkat edilmiştir.

Literatürde guineapiglerle yapılan çalışmalar incelendiğinde, yapay kemik defektlerinin genellikle guineapig kalvaryasında ya da tibiasında yapıldığı görülmektedir. Taga ve ark. sığır kaynaklı rezorbe olabilen membranların etkinliğini inceledikleri bir çalışmada guineapiglerin kalvaryalarına açılan kemik defektlerinde çalışmışlardır (159). Bongio ve ark tarafından yapılan bir çalışmada ise guineapiglerin tibialarının distal ve proksimal uçlarında açılan 1.8 mm kemik defektlerinde kalsiyum fosfatla güçlendirilmiş hidrojellerin osteojenik performansı incelenmiştir (160). Kalvaryada tibiaya oranla daha büyük çaplarda defekt oluşturulabilmesine karşın defektin trefin frezle açılması sırasında beyin orta hat damarları ve serebral korteksin zedelenme olasılığı morbidite oranını artırmaktadır. Ayrıca kalvaryada oluşturulan kemik defektleri kısıtlı derinlikte açılabilmektedir.

Çalışmamızda hazırlamış olduğumuz simvastatin implant tabletleri beyin zarına bası uygulabileceğinden guineapigin tibiasında çalışmak uygun bulunmuştur. Jansen & De Groot guineapigin, tibial implantların peri-implant kemiği üzerindeki etkilerini çalışabilmek için uygun bir hayvan modeli olduğunu bildirmişlerdir (165).

Kritik boyutta defekt, bir canlının tüm yaşam süresi boyunca herhangi bir materyal ya da dış etken olmadan spontan olarak kemik yapımıyla iyileşme göstermeyen en küçük boyuttaki kemik defektini tanımlamaktadır. Bu defektler fibröz bağ dokusuyla iyileşme eğilimindedir (166,167). Ancak deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda süre kısıtlılığı, hayvanların doğal yoldan ölümünün beklenmemesi gibi nedenlerden kritik boyuttaki defekt, çalışma süresi boyunca spontan iyileşmenin görülmediği defektler olarak kabul edilir (168). De Smet ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 10 adet guineapigin tibialarına 1.8 mm çapında dental implantlar yerleştirilerek, erken yükleme prosedürleri incelenmiştir (161). Yine başka bir çalışmada 22 adet guineapig tibialarına 2 adet 1.8 mm çapında defektler açılıp kalsiyum fosfat hidrojel enjekte edilmiştir (160). Çalışmamızda pilot ön çalışmayla kobayın tibiasında açılan 3 mm çapında 2 mm derinliğindeki defektler kritik boyutta defekt olarak belirlenmiştir. Kobaylar çok hareketli kemirgenler olduklarından ve tibiaları ince olduğundan tibialarında daha büyük çapta açılan defektlerde fraktür riski artmaktadır.

Statinler olarak bilinen 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri, mevalonatın oluşmasını engelleyerek karaciğerde kolesterol sentezini azaltırlar. Yüksek kan kolesterol seviyesi bulunan hastalarda ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (103,104).

1999 yılında yapılan bir çalışmada BMP-2 salınımını artıracak düşük moleküler ağırlıklı kemik anabolik bileşiği bulabilmek için 30 000'den fazla madde *in vitro* ortamda incelenmiş ve statinler arasında simvastatin ve lovastatin'in en iyi sonuç verdiği belirtilmiştir (17).

Maeda ve ark. farelerin osteoblast ve kemik iliği hücrelerini kullanarak simvastatinin osteoblast farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Simvastatinin BMP-2'yi ve alkalen fosfatazı indüklediğini ve tip I kollajenin akümülyasyonunu doza ve zamana bağlı olarak artırdığını göstermişlerdir (169). Ayrıca statin grubu ilaçlar

arasından hidrofilik olanların değil, simvastatin, atorvastatin ve cerivastatin gibi lipofilik statinlerin osteoblastlarda kemik anabolik faktörü olan VEBF'ün açığa çıkmasını artırdıklarını bulmuşlardır (170). Maeda ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada, statinlerin fare osteoblast hücrelerinin BMP-2 açığa çıkarmasını uyardığını ve alkalin fosfataz aktivitesi, VEBF, tip I kollajen, osteokalsin ve kemik siyaloproteini artırırken kollajenaz-1 ve kollajenaz-3'ün açığa çıkmasını baskılayarak osteoblast fonksiyonunu düzenledikleri belirtilmiştir (171).

Sugiyama ve ark. yaptıkları bir çalışmada, pravastatin gibi hidrofilik statinlerin osteoblast hücrelerinde BMP-2 açığa çıkarıcı etkisinin olmadığını, simvastatin ve mevastatin gibi lipofilik statinlerin ise BMP-2 salınımını artırdığını göstermişlerdir. Ortama mevalonatın eklenmesiyle BMP-2 öncüsünün simvastatine bağlı aktivasyonu ortadan kalkmıştır (129).

Wong ve ark. statinlere bağlı kemik oluşum mekanizmasını incelemek üzere yaptıkları bir çalışmada, simvastatinle doldurulan kemik defektlerinin erken dönem iyileşmesini araştırmışlar ve greftlemeden sonra 3.günde VEBF'in, 4.günde BMP-2'nin, 5.günde ise yeni kemik yapımının görüldüğünü tespit etmişlerdir (136).

Statin türleri arasında simvastatin lipofilik yapıdadır. Hidrofilik statinlere göre kemik dokusuna afinitesi daha fazla olup hücre içerisine daha kolay girebilmektedir (172). Yapılan diğer çalışmalarda da kemik yapımı üzerindeki olumlu etkileri gösterildiğinden statin grubu ilaçlar arasından simvastatin çalışmamızda kullanılmıştır (17,18,128,158,172).

Kandaki kolesterol seviyesini düşürerek kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan statinlerin klinik uygulanımı sistemik yollardan olmaktadır (19,158). Sistemik uygulanımda statinler, karaciğeri hedef organ olarak görerek ona spesifite gösterirler. Bu nedenle periferik kan dolaşımına çok az oranda katılırlar. Lokal uygulanımda ise bu durumun aksine, statinler enterohepatik dolaşıma katılmayıp uygulanan bölgede yüksek konsantrasyonlara ulaşırlar (19). Gutierrez ve ark. statin grubu ilaçlar arasından lovastatini sıçanlara dermal olarak uygulamış ve HMG-KoA redüktaz enziminin aktivitesini ölçmüşlerdir. Sonuç olarak kemik oluşumu açısından topikal uygulamaların sistemik uygulamalardan daha fazla kemik yapımını artırdığını ve hepatoksisite ve miyotoksisite riskini önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir (173).

Kemik ogmentasyon işlemlerinde spesifik kemik defektleri hedeflendiği için, ayrıca yapılan çalışmalarda lokal simvastatin uygulamasının sistemik uygulamaya üstünlüğünün belirtilmesi nedenleriyle çalışmamızda lokal simvastatin uygulaması tercih edilmiştir.

Kemik defektlerinde etkili bir iyileşme sağlanması için simvastatinin ortamda uzun bir süre kalması gerekmektedir. Simvastatinin PLGA mikrokürelerinden ve SBE7-β-CD inklüzyon komplekslerinden ortama salındığını teyit etmek ve maddelerin salım hızı hakkında bilgi sahibi olabilmek amacıyla *in vivo* çalışma öncesinde *in vitro* salım deneyleri de yapılmıştır.

Lokal simvastatin uygulamalarında doz ayarlaması önemli bir parametreyi oluşturmaktadır. Optimal dozun belirlenebilmesi amacıyla *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda bir çok çalışma yapılmıştır (18,157,158,174-184). Mundy ve ark. overektomize ratlara 35 gün boyunca günlük 5-10 mg/kg dozda simvastatin vererek yaptıkları çalışmada trabeküler kemik hacminde artış gözlemlemişlerdir (17). Hayvan çalışmaları yüksek dozda verilen simvastatinin (20 mg/kg/gün) kemik formasyonunu artırdığını, düşük doz simvastatinin (1 mg/kg/gün) ise kemik formasyonunu azalttığını ve kemik rezorbsiyonunu artırdığını göstermiştir (174). Yazarlar, kemirgenlerin metabolizması insanlardan 10 kat daha hızlı olduğundan farmakokinetik özelliklere bağlı olarak ratlara verilen 10 mg/kg/gün dozun insanlara verilen 70 mg/kg günlük dozla eş değer olduğunu bildirmişlerdir (175).

Topikal dozda simvastatin uygulamasının 70 kg insanda ya da 0,3 kg sıçanda kemiğin lokalize alanlarını etkilediği rapor edilmiştir (176).

Wang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 5-10 mg/kg/gün lokal olarak kırık bölgesine uygulanmıştır. Post-op 5 gün boyunca enjeksiyon yapılan 10 mg/kg/gün doz simvastatinin kırık iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna varılmıştır (175).

Başarır ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada tavşan tibialarına dental implant yerleştirildikten sonra 6 hafta boyunca 50 mg/kg/gün olacak şekilde yüksek dozda simvastatin subkütanoz yolla verilmiştir. Sonuç olarak implantlara kemik tutunma oranları simvastatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı bulunmuştur (177).

Thylin ve ark. 2002 yılında fare kalvaryalarında yaptıkları bir çalışmada, bir grup hayvana 2.2 mg simvastatin içeren metilselülöz jel enjekte edip diğer bir grup hayvana 2.2 mg simvastatin içeren metilselülöz jel ile polilaktid membran (PLA) implante etmişlerdir. Sonuç olarak, PLA membranla implante edilen grupta kontrol grubuna göre %159-%172 oranlarında kemik yapımında artış tespit etmişlerdir. 2.2 mg simvastatin jelinin kemik formasyonunu sitümile edebilecek bir doz olduğunu belirtmişlerdir. Yumuşak dokuda görülen inflamasyonu ise kemik oluşumu ile ilişkilendirmişlerdir (18). Bu çalışmada görülen lokal inflamasyon nedeniyle takip eden çalışmalarda 2.2 mg doz düşürülmeye çalışılmıştır.

Wong ve Rabie 2003 yılında yaptıkları çalışmada 9 adet tavşanın parietal kemiklerinde defektler oluşturmuşlardır. Bu defektlere 0,5 mg simvastatin içeren 0,2 ml simvastatin solüsyonu emdirilmiş kollajen greftleri yerleştirmişlerdir. Tavşanlar 14. günde sakrifiye edilerek histolojik incelemeler yapılmıştır. Sonuç olarak, simvastatinli kollajen greft uygulanan defektte, kontrol grubuna göre %308 daha fazla yeni kemik oluştuğunu belirtmişlerdir (178). Bu araştırmacılar benzer bir çalışma daha yaparak simvastatine bağlı kemik formasyonunun erken dönem iyileşmesini (1-6 günler arasında) immünohistokimyasal olarak incelemişlerdir. Simvastatin içeren grupta kemik iyileşmesinin kontrol grubundan 1 gün önce başladığı bildirilmiştir. Lokal simvastatin uygulamasının kemik formasyonunu indükleyip hızlandırdığını ve anjiogenezi düzenleyen büyüme faktörlerinin aktifleşmesini, kemik hücrelerinin farklılaşmasını ve osteogenezi tetiklediğini belirtmişlerdir (136).

Stein ve ark. yaptıkları çalışmada sıçan mandibulalarında 0,1, 0,5, 1, 1,5 ve 2,2 mg gibi farklı dozlardaki simvastatini PLA membran ve metil selüloz jel taşıyıcılığında uygulamışlar ve kemik formasyonu ile inflamasyon derecesi açısından incelemişlerdir. Histomorfometrik inceleme 3. 7. ve 24. günlerde yapılmıştır. 0,1 mg'lık doz dışında diğer tüm dozların inflamasyon yarattığı görülmüştür. Ancak 0,1 mg'lık dozun kemik formasyonunu uyarmadığı belirtilmiştir. 0,5 mg'lık dozun ise kontrol grubuna göre kemik formasyonunu %45 oranında artırdığı bildirilmiş ve bu dozun yüksek dozlardakine oranla inflamasyonu düşürmesi nedeniyle optimal doz olabileceği belirtilmiştir (157). Aynı araştırmacılar bir sonraki çalışmalarında simvastatinin taşıma sisteminin (jel ile enjeksiyonu ya da jel/membran implantları) kemik formasyonu ve inflamasyona etkisi açısından değerlendirmişlerdir. Bu amaçla sıçan mandibulalarına bir

gruba 0,5 mg tek enjeksiyon, bir gruba 3 hafta süresince 0,1 mg enjeksiyon bir diğer gruba ise metilselüloz jel taşıyıcılığında 0,5 mg simvastatin yerleştirmişlerdir. Sıçanlar 7., 24., ve 90. günde sakrifiye edilmişlerdir. Sonuç olarak, 0,5 mg'lık simvastatinin birden çok enjeksiyonu yapılan grupta jel/membran implantasyonu yapılan gruba göre yumuşak doku inflamasyonu düşük iken, kemik formasyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (179).

Özeç ve ark. 2007 yılında 23 sıçan mandibulasında yaptıkları çalışmada, açılan 3 mm boyutlarındaki kemik defektlerine jelatin süngere emdirilmiş 0,5 mg'lık simvastatin solüsyonu yerleştirmişlerdir. Aktif kontrol grubuna sadece jelatin sünger yerleştirilmiş, pasif kontrol grubu ise boş bırakılmıştır. Deney hayvanları 14. günde sakrifiye edilmiştir. Sonuç olarak deney grubunda kontrol gruplarına göre %240 oranında daha fazla yeni kemik dokusu olduğunu belirtmişlerdir (158).

Nyan ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmalarında sıçan kalvaryalarında 8 mm boyutlarında oluşturulmuş kemik defektlerine kalsiyum sülfat taşıyıcılığında 1 mg simvastatin yerleştirmişlerdir. 2. ve 4. haftalarda gözle görülür bir kemik oluşumu olmadığı halde, yumuşak doku inflamasyonu görülmüştür. 8. Haftada ise, kemik oluşumunun kayda değer olduğu belirtilmiştir (180). Aynı araştırmacılar bu çalışmadan 2 yıl sonra yayınladıkları çalışmada yine sıçan kalvaryalarına açılan 5 mm kemik defektlerine α -trikalsiyum fosfat (TKF) taşıyıcılığında 0,01, 0,1, 0,25, ve 0,5 mg simvastatin yerleştirmişlerdir. Sıçanlar 2, 4 ve 8 hafta sonra sakrifiye edilip histolojik, radyolojik ve histomorfometrik analizler yapılmıştır. 0,25 ve 0,5 mg'lık dozların yumuşak dokuda inflamasyona yol açtığı, 0,1 mg'lık dozun kullanıldığı grupta ise inflamasyon gözlenmediği belirtilmiştir. Ayrıca 0,1 mg'lık dozun kullanıldığı grupta 2., 4. ve 8. haftalarda diğer gruplara oranla kemik hacminde, defektin iyileşmesinde, kemik mineral içeriğinde ve yoğunluğunda artış gözlenmiştir. Sonuç olarak, 0,1 mg'lık simvastatinin TKF ile kombine uygulananının inflamasyon oluşturmadan maksimum kemik oluşturabilecek optimal doz olduğu sonucuna ulaşılmıştır (181). Rojbani ve Nyan tarafından 2011 yılında yayınlanan çalışmada, α -trikalsiyum fosfat, β -trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatit ile 0,1 mg'lık simvastatinin kombinasyonu sıçanların kalvaryalarına yerleştirilmiştir. Deney hayvanları 6. ve 8. haftalarda sakrifiye edilmişlerdir. Sonuç olarak α -TKF ile kombine simvastatin uygulananının, α -TKF'nin diğer kullanılan materyallere göre degradasyon süresinin kısa olması nedeniyle daha fazla kemik

yapımına izin verdiği gösterilmiştir (182).

Allon ve ark. tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada, 20 adet sıçan kalvaryasında 8 mm kemik defekti oluşturulduktan sonra 0,5 mg simvastatin sentetik kemik grefti (cam esaslı putty) ile karıştırılarak uygulanmıştır. Deney hayvanları post-op 4. haftada sakrifiye edilmişlerdir. Sonuç olarak, deney grubunun inflamasyon derecesini artırmadan, osteojenik ve anjiyojenik özellikleri anlamlı derecede geliştirdiği belirtilmiştir (183).

Ayukawa ve ark. yaptıkları çalışmada, 60 adet sıçan kalvaryasında lokal simvastatin uygulamasının kemik formasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Sıçan tibialarına 3 mm defekt açıldıktan sonra 1 mg simvastatin solüsyonu enjekte edilmiştir. Deney hayvanları 5. ve 10. günlerde sakrifiye edilmiştir. 5. günde statin grubunda kemik yapımında artış görülmüştür. Statin grubunda alkalik fosfat ve kemik morfogenetik protein 2 (BMP-2) mRNA ekspresyonları önemli derecede artmıştır. 10. günde ise, histomorfometrik analizlerde statin grubuyla kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (184).

Calixto ve ark. yaptıkları çalışmada, 64 sıçan kalvaryasına 5 mm defekt açıldıktan sonra 0,5 ve 2,2 mg simvastatin solüsyonları kollajen süngerlere emdirilerek defektlere yerleştirilmiştir. Sıçanların sakrifikasyonu 30. ve 60. günlerde yapılmıştır. 30.günde deney gruplarıyla kontrol grubu arasında kemik formasyonu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, 60.günde sadece kollajen sünger yerleştirilen grupta ve 0,5 mg simvastatin yerleştirilen grupta daha az miktarda kemik formasyonu gözlenmiştir. Yazarlar, lokal simvastatin uygulamasının sıçanların kalvaryasına açılan defektlerin tamiri için zararlı olduğu sonucuna varmışlardır (155).

Maciel-Oliveira ve ark. yaptıkları çalışmada, 27 adet sıçan mandibulasına 0.8 mm kemik defektleri açılmıştır. Açılan defektlere %2.5 simvastatin içeren jel yerleştirilmiştir. Deney hayvanlarının 7, 9, 11 ve 14. günlerde sakrifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, %2.5 simvastatin jelinin topikal uygulamasının yeni kemik yapımını artırdığı, kemik rezorpsiyonunu ise azalttığı belirtilmiştir (156).

Morris ve ark. 7 adet köpekte yaptıkları çalışmada, köpeklerin mandibularına kemik içi ve furkasyon defektleri oluşturulup, bu bölgelere haftada 3 kez olmak üzere

0,5 mg ve 2 mg simvastatin metilselülöz jelle enjekte edilmiştir. 2 ay sonra deney hayvanları sakrifiye edilerek histomorfometrik analizler yapılmıştır. Sonuç olarak, çoklu simvastatin enjeksiyonlarının kemik içi ya da furkasyon defektlerinin tedavisi için uygun bir yöntem olmadığı belirtilmiştir (185).

Yapılan bir çok hayvan ve insan çalışmasında, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ile kollajen membran kullanımının kemik defektlerinin iyileşmesinde etkinliği gösterilmiştir (186,187). Çalışmamızda kullanılan simvastatin implant tabletlerinin sadece defekt bölgesine salım yapması istendiğinden rezorbe olabilen kollajen membranlar kullanılmıştır. Çalışmamızda rezorbe olabilen kollajen membran kullanımıyla sakrifikasyondan sonra defektlerde stabilizasyonun sağlandığı ve defekt bölgesine epitel göçünün engellendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca sakrifikasyondan sonra defektler ortaya çıkarıldığında simvastatin implant tabletinin çevreye dağılmamış ve partiküllerin periosta yapışarak diseksiyon sırasında defektin doku bütünlüğünü bozmadığı görülmüştür. Bütün bu avantajlara ek olarak, doku entegrasyonunu ve yaranın stabilizasyonunu sağlayan materyal, olgunlaşmakta olan pıhtı örtüsünün stabilizasyonu ve korunmasını sağlamaktadır. Bu özelliklerin, kullanılan kollajen membranın avantajları olabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürde yapılan hayvan çalışmalarında kemik iyileşmesinin histopatolojik olarak değerlendirilmesinin çok farklı sakrifikasyon zamanlarında yapıldığı görülmektedir. Benzer deneysel çalışma literatür bulgularında, genel olarak kemikleşmenin 1-2 haftalarda başladığı, 6-8 haftalarda ise olgun kemiğin oluştuğu bildirilmektedir (136). Özeç ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sıçanlarda açılan mandibular defektlere simvastatin, kollajen taşıyıcı ile uygulanmış, erken dönem kemik iyileşmesini incelemek amacıyla sıçanlar 14. günde sakrifiye edilmiştir (158). Ezirganlı ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sıçanların kalvaryalarına açılan kemik defektlerine simvastatin kollajen sünger grefti yerleştirilmiş ve yeni kemik oluşumunun histomorfometrik analizi yapılabilmesi için sıçanlar 30. günde sakrifiye edilmiştir (188). Anbinder ve ark. sıçan tibialarında kemik iyileşmesini inceledikleri çalışmada sakrifikasyon günleri için 15. ve 30. günler seçilmiştir (168). Kobaylarda yapılan bir çalışmada kobayların mandibulalarında oluşturulan kemik defektlerine polimer taşıyıcı ile kombine edilen simvastatin yerleştirilmiştir. Histopatolojik inceleme için sakrifikasyon günleri erken dönem için 7. ve 14., geç dönem için 30. ve 45. günler

olarak belirlenmiştir (131). Çalışmamızda simvastatinin erken ve geç dönemde kemik defektlerinin iyileşme kapasitesine etkisini karşılaştırmalı olarak inceleyebilmek için erken dönem için 15., geç dönem için 45. gün değerlendirme periyodları olarak seçildi.

Simvastatinin *in vivo* ortamda kemik formasyonunu başlatabilmesi, simvastatinin lokal konsantrasyonuna bağlıdır. Bu nedenle uygun taşıma sisteminin bulunabilmesi için bir çok çalışma yapılmıştır (189). Uygun taşıyıcının bir çok avantajı vardır. Molekülün uygulandığı bölgede kalmasını ve o bölgeye tutunmasını sağlayarak yüklemeye dozunun azaltılması ve mezenkimal hücre infiltrasyonu için matriks, hücre büyümesi ve farklılaşması için ise substrat görevi görmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Taşıyıcı ayrıca yeni oluşacak kemiğin son şeklini belirlemeye yardımcı olur. Optimal taşıyıcı, kemik büyümesini inhibe etmeyecek ve fibröz doku oluşumunu önleyecek bir degradasyon süresine sahip olmalıdır (190).

Simvastatinin farklı taşıyıcılarla hayvan modellerinde lokal uygulamanın kemik yapımını artırıcı etkisini gösteren bir çok çalışma yapılmıştır. Jelatin sünger biyouyumlu ve biyorezorbe bir materyal olup sünger benzeri formu sayesinde kolaylıkla defektin şekline uyum sağlar (158). Özeç ve ark. yaptıkları bir çalışmada, 3 mm boyutlarındaki kemik defektlerine simvastatin jelatin sünger grefti yerleştirilmiş ve kontrol grubuna göre %240 daha fazla yeni kemik üretimi olduğu görülmüştür (158). Nyan ve ark. sıçan kalvaryalarında oluşturulmuş defektlere kalsiyum sülfat taşıyıcılığında simvastatin yerleştirmişlerdir. Aynı araştırmacılar α -trikalsiyum fosfat (TKF) ile simvastatinin kombine uygulamanının kemik yapımını anlamlı dercede artırdığı sonucuna varmışlardır (181). Mukozawa ve ark. tavşanların nazal kemiğinde açtıkları 5 mm kemik defektlerine simvastatinin iki farklı taşıyıcı (hidrojel ve atelokollajen sünger) ile yerleştirmişlerdir. 1, 2, 4, 8 ve 12 hafta sonra yapılan incelemelerde BMP-2 ekspresyonu ve yeni kemik formasyonu bakımından hidrojel taşıyıcılığındaki simvastatin ile atelokollajen sünger taşıyıcılığındaki simvastatin arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (154).

Polimer teknolojisindeki artışla birlikte ilaç salım sistemlerinde biyolojik olarak uyumlu çeşitli polimerler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu polimerler, içlerine yerleştirilen ilaçları kontrollü salma ve istenilen etkiyi elde etmek için düşük miktarda ilaca gerek duyulması gibi avantajlara sahiptir (131). Thylin ve ark. yaptıkları

çalışmada simvastatinin, polimer ailesinin bir üyesi olan metil selüloz jel ile kontrollü salımının kemik oluşumunu önemli derecede artırdığı belirtilmiştir (18). Wu ve ark. yaptıkları çalışmada ise polilaktik asit/poliglikolik asit kopolimer taşıyıcılığında simvastatin, sıçanların diş çekim soketlerine yerleştirilmiş ve çekim soketlerinde kemik formasyonunun arttığı, rezidüel alveolar kemik hacminin korunduğu bildirilmiştir (189).

Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), hidrolitik parçalanma sonucu laktik asit ve glikolik asit monomerlerine ayrılan bir biyobozunur polimerdir. Bu iki monomer Krebs siklusu ile vücut tarafından kolaylıkla metabolize edilebildiğinden PLGA'nın ilaç taşıyıcısı olarak ya da biyomateryal olarak kullanımıyla ilgili minimal sistemik toksisite oluşturduğu bilinmektedir (139). PLGA, insanlarda çeşitli ilaç taşıma sistemleri için Amerikan FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onay almıştır. Bu olumlu özelliklerinden dolayı çalışmamızda taşıyıcı olarak PLGA kullanıldı.

Tai ve ark. yaptıkları çalışmada PLGA/hidroksiapatit mikroküreciklerine 3 mg ve 5 mg simvastatin yükleyerek oluşturdukları formülasyonu, fare hücre kültüründe incelemişlerdir. Bu formülasyonun 2 hafta sonunda kallus formasyonunu uyardığını ve yeni damar oluşumunu artırdığını belirtmişlerdir (191). Jiang ve ark. ise PLGA/hidroksiapatit taşıyıcılığındaki simvastatinin etkisini *in vivo* olarak araştırabilmek için bu formülasyonu, hayvan kalvaryaya modeline yerleştirmişlerdir. Sonuç olarak PLGA/hidroksiapatit/simvastatin'in kemik formasyonunu indüklediği bu nedenle kemik defektlerinin iyileşmesine yardımcı olabileceği gösterilmiştir (192). Naito ve ark. simvastatin yüklenen PLGA mikroküreciklerini tavşan kalvaryasına açtıkları kritik boyuttaki kemik defektlerine yerleştirmişler ve kemik formasyonunun anlamlı derecede arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bu mikroküreciklerin biyobozunur özelliklerinden dolayı yavaş salım gösterdiği ve salım süresinin 1 aydan fazla sürdüğü belirtilmektedir (193). Çalışmamızda yapılan *in vitro* salım çalışmalarında 45. gün sonunda PLGA'dan simvastatinin %61'inin salındığı tespit edilmiştir.

Siklodekstrinler, düşük çözünürlüğe sahip ilaçların çözünürlüklerinin artırılmasında ve biyoyararlanımlarının düzenlenmesinde sıkça kullanılmaktadır (194). Jun ve ark. yaptıkları bir çalışmada lipofilik ve bu nedenle zor çözünebilir bir ilaç olan

simvastatinin aköz çözünürlüğünü artırmak için simvastatin/hidroksipropil- β -SBE7- β -siklodekstrin (HP- β -CD) inklüzyon kompleksi hazırlamışlardır. Sonuç olarak, bu kompleks ile simvastatinin çözünürlüğünün artmasının yanı sıra hipolipidemik aktivitenin de arttığı kaydedilmiştir (195). Ungaro ve ark. tarafından yapılmış bir başka çalışmada, simvastatinin çözünürlüğünü artırabilmek için yine SBE7- β -CD dekstrinler kullanılmıştır. Hidroksipropil- β -SBE7- β -CD dekstrinin (HP- β -CD) simvastatinin lakton formundan hidroksi asit formuna geçişini yani suda çözünürlüğünü artırdığını belirtmişlerdir (196). Price ve ark. 24 sıçan modeli üzerinde yaptıkları çalışmada hayvanlarda önce periodontitis oluşturulmuş ve bu bölgelere suda çözülen 0,5 mg simvastatin ile 3,75 mg Alendronat-SBE7- β -CD dekstrin kompleksi enjekte edilmiştir. Sonuç olarak bu kompleksin periodontal kemik kayıplarının önlenmesinde potansiyel bir etkisi olabileceği belirtilmiştir (197). HP- β -CD ve SBE7- β -CD gibi hidrofilik siklodekstrinler oral ve intravenöz yolla uygulandığında toksik değildir (148,149). Ayrıca sıçan ve tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalarda hiçbir teratojenik ve mutajenik etki gözlenmemiştir (150). Literatürde *in vivo* şartlarda simvastatin-SBE7- β -CD inklüzyon komplekslerinin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, simvastatinin çözünürlüğünün artırılmasının terapötik etkinliğine katkısını incelemek için simvastatin-SBE7- β -CD inklüzyon komplekslerini içeren implant formülasyonları geliştirdik ve *in vitro/in vivo* etkinliğini uzatılmış etkili PLGA mikroküre formülasyonları ile karşılaştırdık.

Kemik defektleri ile ilgili çalışmalarda iyileşmenin hücresele seviyede tespiti açısından en geçerli ve uygun değerlendirme şeklinin histoloji ve histomorfometrik yöntemler olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda kobayların tibialarında oluşturulan 3 mm kemik defektlerine yerleştirilen simvastatin yüklü PLGA mikrokürelerini ve simvastatin-SBE7- β -CD inklüzyon kompleksini içeren implant formülasyonlarının, bu alanlarda histolojik olarak iltihap, nekroz, fibrozis, yabancı cisim reaksiyonu, residüel greft materyalinin varlığı, membranöz ve kondral kemik yapımı göz önünde bulundurularak yeni kemik yapımının kapladığı alanlar ve kemik iyileşmesinin evresi 15. ve 45. günlerde (erken ve geç dönem) histolojik olarak incelenmiştir.

İltihap açısından değerlendirildiğinde 15. gün erken dönemde simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant grubunun 15. gün iltihap düzeyi, simvastatin yüklü PLGA mikroküre ($p:0.032$; $p<0.05$) grubundan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Geç

dönemde (45.günde) ise iltihap bakımından simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubu ile simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Nekroz açısından iki deney grubu karşılaştırıldığında erken ve geç dönemde simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubunda da simvastatin-SBE7- β -CD grubunda da aynı oranda nekroz görülmüştür ($p>0.05$). Ancak Simvastatin grubunda geç dönemde nekroz görülme oranı (%83.3), simvastatin yüklü PLGA mikroküre ($p:0.038$; $p<0.05$) ve simvastatin-SBE7- β -CD gruplarından ($p:0.001$; $p<0.01$) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Fibrozis açısından değerlendirildiğinde 15. ve 45. günde simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubunda simvastatin-SBE7- β -CD grubuna ($p:0.007$; $p<0.01$) göre daha fazla fibrozis alanı görülmüştür.

Yeni kemik yapımı bakımından simvastatin-SBE7- β -CD grubunun erken ve geç dönem yeni kemik oluşumu düzeyi, simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubundan ($p:0.011$; $p<0.05$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Simvastatin grubunun geç dönem yeni kemik oluşumu düzeyi, simvastatin yüklü PLGA mikroküre ($p:0.001$; $p<0.01$) ve simvastatin-SBE7- β -CD gruplarından ($p:0.037$; $p<0.05$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur.

Kemik iyileşmesi açısından iki deney grubu karşılaştırıldığında simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubunun erken dönem kemik iyileşmesi düzeyi, simvastatin-SBE7- β -CD ($p:0.004$; $p<0.01$) grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Geç dönemde ise simvastatin-SBE7- β -CD grubu simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubunu yakalamıştır. Simvastatin yüklü PLGA mikroküre ve simvastatin-SBE7- β -CD gruplarının geç dönem kemik iyileşmesi düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Simvastatin grubunun geç dönem kemik iyileşmesi düzeyi, simvastatin yüklü PLGA mikroküre ($p:0.002$; $p<0.01$) ve simvastatin-SBE7- β -CD ($p:0.007$; $p<0.01$) anlamlı şekilde düşük bulunmuştur.

Rezidüel greft materyali açısından bakıldığında erken dönemde tüm gruplarda bir miktar rezidüel greft materyali bulunmuştur. Geç dönemde ise, simvastatin-SBE7- β -CD grubunda rezidüel greft materyali görülmezken, simvastatin ve simvastatin yüklü

PLGA mikroküre gruplarında görülmüştür. *In vitro* salım çalışmalarında da görüldüğü gibi, SBE7- β -CD inklüzyon kompleksi simvastatinin çözünürlüğünü önemli derecede arttırmış ve 45. günde ortamda herhangi bir kalıntı bırakmamıştır. Defekt bölgesinde sıvı miktarının az olması ve hidrolitik parçalanmanın yavaş olması nedeniyle uygulama bölgesinde PLGA kalıntıları görülmüştür. Lipofilik bir ilaç olan simvastatin tek başına uygulandığında, ilacın düşük çözünürlüğe bağlı olarak uygulama bölgesinde kalıntı gözlenmiştir.

Bütün bu sonuçlara dayanarak, SIM-SBE7- β -CD ve SIM-PLGA'nın simvastatin için biyouyumlu ve biyobozunur bir taşıyıcı doku iskelesi olduğu sonucuna varmaktayız.

İltihap açısından değerlendirmede 15. gün ile 45. günlerde gruplar arası anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Sadece boş bırakılan kontrol grubunda 45. günde 15. güne göre anlamlı derecede azalma gözlenmiştir.

Nekroz açısından gruplar arası değerlendirmede iki zaman aralığında da anlamlı farklılık bulunamamıştır. Grupların kendi içlerindeki değerlendirmede ise 15. günde boş bırakılan grupta nekroz görülme oranı diğer gruplardan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. 45. günde ise Simvastatin grubunda nekroz görülme oranı diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Fibrozis açısından değerlendirmede 15. gün ile 45. günlerde gruplar arası anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

Yeni kemik oluşumu açısından gruplar arası değerlendirmede simvastatin grubu hariç diğer gruplarda 15. gün yeni kemik oluşumu düzeyine göre 45. günde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Kemik iyileşmesi açısından simvastatin ve simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubunda 15. gün ile 45. gün arasında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Ancak simvastatin-SBE7- β -CD ve boş bırakılan grupta 15. gün kemik iyileşmesine göre 45. günde görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Grupların hiç birinde 15. ve 45. günlerde yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir.

Wong ve Rabie yaptıkları çalışmada tavşanların parietal kemiklerine açılan 10X5 mm boyutundaki kemik defektlerine 0,5 mg simvastatin taşıyan kollajen greftler yerleştirmişlerdir. Histolojik incelemelerde 14. günde simvastatin uygulanan deney grubunda defekt kenarlarının karşıdan karşıya birleşme eğiliminin yüksek olduğu gözlenmiştir. Aktif kontrol grubunda ise çok az miktarda greft konak kemik yüzeyi arasında yeni kemik izlenmiştir. Pasif kontrol grubunda defekt alanının fibröz doku ile dolduğu görülmüştür (178).

Özeç ve ark. yaptıkları çalışmada sıçanların mandibularına açılan 3 mm boyutundaki kemik defektlerine 0,5 mg simvastatin taşıyan kollajen greftler yerleştirip, 14. günde histolojik olarak incelemiştir. Simvastatin uygulanan deney grubunda konak kemik ile greft yüzeyi arasında yeni kemik oluştuğu ve bu oluşan kemiğin defekt ortasına doğru ilerlediği görülmüştür. Pasif kontrol grubunda defekt alanının fibröz bağ dokusu ile dolduğu belirtilmiştir (158).

Thylin ve ark. yaptıkları çalışmada sıçanların kalvaryasına 2,2 mg simvastatini lokal olarak uygulamışlar ve histolojik incelemede inflamasyon ve deri bölgesinde kabuklanma görmüşlerdir (18).

Stein ve ark. ise yaptıkları çalışmada 0,1, 0,5, 1, 1,5 ve 2,2 mg gibi farklı dozlardaki simvastatini sıçan mandibulasına yerleştirmişlerdir. Histolojik incelemede 0,1 mg'lık doz dışında diğer tüm dozların inflamasyon yarattığı görülmüştür. 0,5 mg dozda uygulanan simvastatinin inflamasyonu azaltarak kemik formasyonunu artırdığını bildirmişlerdir (157).

Lee ve ark. yaptıkları çalışmada sıçan mandibularına 0,1, 0,5 ve 1 mg metil selülöz taşııcılığında simvastatin yerleştirmişlerdir. 0,5 mg simvastatin dozu ile en iyi kemik formasyonu/inflamasyon derecesi elde edildiğini bildirmişlerdir (179).

Nyan ve ark. tarafından yapılan çalışmada sıçan kalvaryalarına açılan 8 mm boyutundaki defektlere 1 mg simvastatin yerleştirilmiş ve histolojik incelemede yara bölgesinde 5 haftaya kadar süren inflamasyon ve deri bölgesinde kabuklanma izlenmiştir. Ancak inflamasyon 8. haftada azalmaya başlayınca anlamlı derecede kemik formasyonunun oluştuğu gözlenmiştir (180). Aynı yazarların simvastatini farklı dozlarda uyguladıkları bir başka çalışmalarında sadece 0,1 mg'lık grupta inflamasyonun

izlenmediği belirtilmiştir (181).

Calixto ve ark. 2011 yılında yayınladıkları bir çalışmada sıçan kalvaryalarına 0,5 ve 2,2 mg simvastatin içeren kollajen sünger yerleştirmişler. 30. ve 60. günlerde yapılan histopatolojik inceleme sonucunda lokal simvastatin uygulamasının deney grubundaki defektlerin iyileşmesine olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir (155).

Ezirganlı ve ark. tarafından 2013 yılında yayınlanan bir başka çalışmada diabetik sıçanların kalvaryasına 8 mm boyutunda açılan defektlere 0,5, 1 ve 1,5 mg simvastatin yerleştirilmiş. 30 gün sonunda yapılan histolojik incelemede sadece 0,5 mg'lık grupta inflamasyon görülmemiştir. Defekt alanında sert, kalın fibröz bağ dokusu ve mineralize kemik alanları tüm deney gruplarında gözlenmiştir. Sonuç olarak, rejenere olan kemik dansitesi deney grubunda kontrol grubuna göre düşük bulunmakla birlikte yeni kemik formasyonunun deney grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (188).

SONUÇLAR

- Çalışmamız süresince hayvan modeli olarak kullandığımız guineapig tibiası herhangi bir olumsuzluk, komplikasyon ve enfeksiyon yaşanmadan başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Guineapig tibiasının, kemik rejenerasyonu çalışmalarında kullanılabilir uygun bir deney modeli olduğu sonucuna varılmıştır.
- Simvastatinin defekt ortamına yerleştirilmesi için hazırlanan taşıyıcıların kullanımında sorun yaşanmadı. Simvastatin yüklü PLGA mikroküre ve simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant formülasyonlarının uygun bir taşıyıcı olduğu görülmüştür.
- Simvastatin yüklü PLGA mikroküreleri ve simvastatin içeren SBE7- β -CD kompleksleri hazırlandıktan sonra cerrahi uygulama öncesi *in vitro* salım deneyleri yapıldı. Buna göre, *in vitro* şartlarda 1104 saat sonra (46 gün) simvastatinin PLGA mikrokürelerinden yaklaşık %61'inin salımının gerçekleştiği görülmüştür. SBE7- β -CD inklüzyon komplekslerinden ise 24 saat sonunda simvastatinin tamamının salındığı görülmüştür.
- Çalışmamızda rezorbe olabilen kollajen membran kullanımıyla sakrifikasyondan sonra defektlerde stabilizasyonun sağlandığı ve defekt bölgesine epitel göçünün engellendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca sakrifikasyondan sonra defektler ortaya çıkarıldığında simvastatin implant tabletinin çevreye dağılmamış ve partiküllerin periosta yapışarak diseksiyon sırasında defektin doku bütünlüğünü bozmadığı görülmüştür.
- Simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant grubunun 15. gün iltihap düzeyi, simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubundan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. 45.günde ise iltihap bakımından simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubu ile simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.
- Fibrozis açısından değerlendirildiğinde 15. ve 45. günde simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubunda simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant grubuna göre daha fazla fibrozis alanı görülmüştür.

- Simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant grubunun erken ve geç dönem yeni kemik oluşumu düzeyi, simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubundan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur.
- Kemik iyileşmesi açısından iki deney grubu karşılaştırıldığında simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubunun erken dönem kemik iyileşmesi düzeyi, simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Geç dönemde ise simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant grubu simvastatin yüklü PLGA mikroküre grubunu yakalamıştır. Simvastatin yüklü PLGA mikroküre ve simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant gruplarının geç dönem kemik iyileşmesi düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.
- Erken dönemde tüm gruplarda bir miktar rezidüel greft materyali bulunmuştur. Geç dönemde ise, simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant grubunda rezidüel greft materyali görülmezken, simvastatin ve simvastatin yüklü PLGA mikroküre gruplarında görülmüştür.
- Simvastatin lipofilik bir ilaç olduğu için taşıyıcısız yerleştirildiği durumda kanda çözölemeyerek rezidüel greft materyali olarak kalmıştır. Simvastatin grubunun geç dönem yeni kemik oluşumu ve kemik iyileşmesi düzeyi, simvastatin yüklü PLGA mikroküre ve simvastatin-SBE7- β -CD içeren implant gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Bu olumsuzluklara dayanarak simvastatinin taşıyıcısız bir şekilde kullanımının kemik rejenerasyonu açısından uygun olmadığı sonucuna varılabilir.
- Grupların hiç birinde 15. ve 45. günlerde yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir.
- Çalışmamız limitleri dahilinde gruplar arasında yeni kemik oluşumunun 1. ve 2. deney gruplarında kontrol bölgelerine oranla istatistiksel anlamlı olmak üzere yüksek bulgulanması simvastatinin kemik rejenerasyonunda katkısı olabilecek bir madde olduğunu göstermiştir.
- Sonuç olarak, literatürdeki çalışmalara paralel olarak simvastatinin kemik metabolizmasına ve iyileşmesine katkıları olduğu ancak maksimum kemik rejenerasyonunu en az inflamasyonla elde edebilmek için optimal dozda ve en

uygun taşıyıcı ile uygulanması için farklı taşıyıcılarla ya da mevcut taşıyıcılarla daha fazla ve detaylı araştırmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Archer WH. *Oral and Maxillofacial Surgery*. W.B.Saunders Publishing, Philadelphia, 1975: 1427-1453
2. Carlsson GE. Responses of jawbone to pressure. *Gerodontology* 2004; 21 :65-70
3. Carranza FA. Bone Loss and Patterns of Bone Destruction. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA (Eds). *Carranza's Clinical Periodontology*. 9.ed. W.B. Saunders Publishing, Philadelphia, 2002; 354-358
4. Lindqvist C. Mandibular reconstruction with free bone grafts. *Curr Opin Dent* 1992; 2: 25-37
5. Stellingsma C, Vissink A, Meijer HJ, Kuiper C, Raghoobar GM. Implantology and the severely resorbed edentulous mandible. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15 :240-248
6. Garg AK. *Bone Biology, Harvesting and Grafting for dental Implants*. Chigago: Quintessence Publishing Co, Inc; 2004
7. Gupta M.C., Maitra S. Bone graft substitutes; Past, present, future. *J Postgrad Med*. 2002; 48 : 142-148
8. Lynch S.E., Genco R.J., Marx, R.E. Spector M. Basic Principles of Tissue Engineering. In "Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial
9. Aichelmann-Reidy M.E., Yukna R.A. Bone replacement grafts. The bone substitutes. *Dent Clin North Am*. 1998; 42 : 491-503
10. Jeon JH, Thomas MV, Puleo DA. Bioerodible devices for intermittent release of simvastatin acid. *Int J of Pharma* 2007; 12: 1-7.
11. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Rekombinant human bone morphognetic protein-7 induces healing in a canine long- bone segmental defect model. *Clin Orthoped Related Resarch* 1993; 301: 302-12.
12. Boden SD: Bioactive factors for the bone tissue engineering. *Clin Orthop*. 367: 84-94, 1999
13. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM: Bone growth factors. *Orthop Clin North Am*. 31: 375-388, 2000
14. Mathes SJ: Repair and grafting of bone. In: Plastic surgery. 2nd ed. Saunders Elsevier Inc, Philadelphia, 639-718, 2006
15. Colo'n-Emeric CS, Saag KG. Osteoporotic fractures in older adults. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2006; 20(4): 695-706
16. Neer R, Arnaud C, Zanchetta J, Jose R, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsmann AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England Journal of Medicine* 2001; 344: 1434-1441
17. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G ve ark. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1946-9.

18. Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, Reckling RR, Ojha J, Bhattacharyya I, et al. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *J Periodontol* 2002; 73 (10):1141-8.
19. Horiuchi N, Maeda T. Statins and Bone Metabolism. *Oral diseases* 2006; 12: 85-101.
20. Grasser WA, Baumann AP, Petras SF, Harwood HJ Jr, Devalaraja R, Renkiewicz R, et al. Regulation of osteoclast differentiation by Statins. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2003; 3(1): 53-62.
21. Cruz AC, Gruber BL. Statins and osteoporosis: Can these lipid-lowering drugs also bolster bones. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2002; 69(4): 277- 88.
22. Bernard GW. Healing and repair of osseous defects. *Dent Clin North Am* 1991 35:469-477
23. Jee WSS. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: Cowin SC (ed). *Bone Mechanics Handbook*. 2. ed. CRC Press, Florida, 2001 1-68
24. Junguera L.C, Carneiro J, Kelly R.O. Temel Histoloji 8. Baskı İstanbul: Barış Kitabevi Ltd. Şti. 1998 132- 151
25. Tuskan C, Yaltırık M. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan Biyomateryaller. Bölüm I,II, İ.Ü. Dishekimliği Fakültesi Yayınları, İstanbul, 2002
26. Bloom W, Fawcett DW. *A textbook of histology*. 10th ed, W.B. Saunders Philadelphia, 1975; chap 10.
27. Escarot-Charrier B, Glorieux FH, Vanderrest M, et al. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 1983; 96: 639.
28. Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res* 1978; 25: 205.
29. Marie P.J. Cellular and molecular alterations of osteoblasts in human disorders of bone formation. *Histol. Histopathol*,1999; 14, 525.
30. Borovecki F, Pecina-Slaus N, Vukicevic S. Biological mechanisms of bone and cartilage remodelling--genomic perspective. *Int Orthop*. 2007 Dec;31(6):799-805
31. Puzas, F. J. and Lewis, G. D., Biology of osteoclasts and osteoblasts, in Orthopaedics. Principles of Basic and Clinical Science, Bronner, F., and Worrell, R. V., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1999, chap. 3.
32. Deng HW, Liu YZ. *Current Topics in Bone Biology*. Singapur: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 2005
33. Şirin SY. Deneysel olarak meydana getirilen kemik defektlerine yerleştirilen farklı tipteki yapay kaynaklı greft materyallerinin kemikleşmesinde hiperbarik oksijen uygulamasının etkilerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2005.
34. Soydan N. *Genel Histoloji*. İstanbul, İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi, 1982

35. Çankaya AB. *Deneyisel olarak oluşturulan kemik defektlerinde sıvı nitrojen ve karbondioksit gazı uygulamasının kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi* İstanbul: İÜ Dişhekimliği Fak.; 2006
36. Deng HW, Liu YZ. *Current Topics in Bone Biology*. Singapur: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 2005
37. Soydan, N. Genel Histoloji. Ğ. Ü. Dişhekimliği Fakültesi. İstanbul: Ğ.Ü.Basımevi ve Film Merkezi.1992; ISBN 975-404-276-4.
38. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, et al. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Med* 1979; 301: 13.
39. Hollinger J.O., Buck C.D., Bruder P.S. Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy. In "Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics". Lynch S.E., Genco R.J., Marx, R.E. 1st edition Quintessence Publishing, 1999, chap 1.
40. Dindar B. *Deneyisel Kemik Defektlerinde Lokal Olarak Uygulanan Simvastatinin İyileşme Üzerine Etkilerinin Histopatolojik Yöntemler İle İncelenmesi* İstanbul : İÜ Dişhekimliği Fak. ; 2012
41. Bancroft JD, Stevens A: *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th ed. Churchill Livingstone, Newyork, Chapter 15, page 309-339, 1996.
42. Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter 8, page: 144-146, 2003
43. Kierszenbaum AL: *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*, 1st ed. Mosby Inc., St. Louis, Chapter 5, page 131, 2002
44. Sandy C. Marks, J.R. and Steven N. Popoff: *Bone cell biology: The regulation of development, structure and function in the skeleton*. *The American Journal Of Anatomy* 1988; 1 83: 1-44.
45. Marks S.C., Popoff S.N. *Bone cell biology: The regulation of development , structure, and function in the skeleton*. *The American Journal of Anatomy* 1988; 183: 1-44.
46. Cibickova L, Palicka V, Cibicek N, Cermakova E, Micuda S, Bartosova L, Jun D. Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. *Physiol Res*. 2007;56(6):765-70. Epub 2006 Nov 6.
47. Alturfan, A. K., Akalın, Y. (2002). *Ortopedik Travmatoloji*. İstanbul : Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Sti. 10-14.
48. Gehron-Robey, P., Boskey, A. L. (1996) *The biochemistry of bone, in Osteoporosis*. Marcus, E., Feldman, D., Kelsey, J., Eds., Academic Pres, San Diego, chap.4. page 74-8
49. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res*. 2010 Jul;132:15-30.
50. Cowin, S. C. *Bone Mechanics Handbook*. 2nd edn. Boca, Raton, London, New York, Washington: CRC Press. 2001; Bölüm 1: 1-68, Bölüm 2: 1-24.
51. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of Histology*. Philadelphia: Saunders,Elsevier;;2001

52. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology Text & Atlas*. New York: The McGraw-Hill Co., 2007 Chap. 8
53. Erimoğlu C. *İnsan Anatomisi*. İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi , İstanbul, 1990 6-7.
54. Schenk RK. , Buser D, Dahlin C, Schenk RK (eds) *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Quintessence publishing, Hong Kong , 1994 :49 – 100.
55. Işık D., *ER,CR:YSGG Lazer ve Cerrahi Frezle Oluşturulan Kemik Defektlerinde Kemik Morfogenetik Protein (BMP) ve Greft Materyali (B-TCP+HA) Uygulanarak Kemik İyileşmesinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi* İstanbul : İÜ Dişhekimliği Fak. ; 2008
56. Buckwalter J.A., Einhorn T.A., Simon S.R., Eds., *Orthopaedic Basic Science: The Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*. 2nd Edition. Rosemont, Illinois, 2000, chap. 8.
57. Ham AW, Harris WR. Repair and transplantation. In: Bourne GH (ed): *Biochemistry and Physiology of Bone*. Vol I. New York, Academic Press, 1971, pp.338-399.
58. Paker, S. Histoloji. Baskı 2; Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın no: 32. Basımevi-1993.1.-----. 21.
59. Soydan N. (1985) Genel Histoloji. İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul, 100-119.
60. Caplan A.I., Pechak D. The cellular and molecular biology of bone formation. In: Peck W.A.(Ed). *Bone and Mineral Research*. New York: Elsevier, 1987:117.
61. Hüsmani T. Siklosporin-A uygulanan sıçanlarda, antioksidanların (selenium ve vitamin E), çekim yarası iyileşmesi üzerine etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2007
62. Baron R., *Anatomy and ultrastructure of bone*, in *Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorder of Mineral Metabolism*, 4th ed., Favus, M. 1., Ed., Lippincottwilliams & Wilkins, 1999, chap. 1
63. Rosenberg E, Rose LF. Biologic And Clinical Considerations For Autografts And Allografts On Periodontal Regeneration Therapy. *Dental Clinics Of North America* 1998; 42(3): 467-490
64. Bafiarır, S., Selek , H., Yıldız., Salık , Y. Ortopedik onkolojide kemik defektlerinin onarımında vaskülarize olmayan fibula greftleri. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*, 2005; 39(4): 300-306.
65. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 2008 Apr 1;15:53-76.
66. Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament. *Fractures* 2nd ed. Philadelphia, Lippincott Co, 1984; 1: 147-167.
67. Kılıçoğlu, SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 2002; 55: 143-150

68. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing *Injury, Int. J. Care Injured* 42 (2011) 551–555
69. Kabisch, W.T., De Bruyn, P.P., Pabuwal, S. N. Quantitative characteristics of phagocytic organs. *Anat Rec.* (1968) Jun; 161(2): 197-210.
70. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88(5):873–84.
71. Comproresi EM. Hyperbaric oxygen Therapy : A committee Report, Undersea and Hyperbaric Medical Society, 1999
72. Brond AR, Rubin TC. Fracture Healing. In: Surgery of the Musculoskeletal System 2.ed. *Churchill Livingstone*, New York, 1990 93-114.
73. Çetingül E. *Çene ve Yüz Travmatolojisi*. İzmir Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları, İzmir, 1997 5-45.
74. Baron T, Tran Van P, Vignery A. Local control of bone remodelling: a suggested role for receptor mediated endocytosis. *New York, Excerpta Medica* 1982; 123-1. 8-6.
75. Isogai Y, Akatsu T, Ishizuya T, Yamaguchi A, et al. Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation positively or negatively depending on the differentiation stages. *T Bone Miner Res* 1996; 11:;1384-1393.
76. Parfitt, A. M. The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data, in *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation*. Recker, R. R., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, (1983) s 143.
77. Kabaca G. Diabetik Sıçanlarda Selenyumun Kemik İyileşmesi Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2007
78. Hoexter DL. Bone regeneration graft materials. *J Oral Implantol.* 2002;28:290-4.
79. Sorní M, Guarínós J, García O, Peñarrocha M. Implant rehabilitation of the atrophic upper jaw: a review of the literature since 1999. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10 Suppl 1:E45-56.
80. Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21:696-710.
81. González-García R, Naval-Gías L, Muñoz-Guerra MF, Sastre-Pérez J, Rodríguez-Campo FJ, Gil-Díez-Usandizaga JL. Preprosthetic and implantological surgery in patients with severe maxillary atrophy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10:343-54.
82. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17 Suppl 2:136-59.
83. Moore WR, Graves SE, Bain GI: Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001, 71(6):354-61.
84. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop* 2000, 371:10-27.

85. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi, 2004 • Cilt: 3 Sayı: 3-4.
86. Kruger GO. Text Book of Oral and Maksillofacial Surgery. The C V Mosby Company, 1984.
87. Kökden A, Türker M. Oral Ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Kemik Greftleri Ve Biyomateryaller. Cumhuriyet Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi Cilt 2, Sayı 2, 1999.
88. Ersu B. İmplant diş hekimliğinde kullanılan ağız içi otojen kemik greftleri. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi Cilt: 10 Sayı:2 2007.
89. Von Arx T, Wallkamm B, Hardt N. Localized ridge augmentation using a micro titanium mesh: a report on 27 implants followed from 1 to 3 years after functional loading. Clin Oral Implants Res. 1998;9:123-30.
90. McAllister BS, Haghghat K. Bone augmentation techniques. J Periodontol. 2007;78:377-96.
91. Beniç GI, Jung RE, Siegenthaler DW, Hämmerle CH. Clinical and radiographic comparison of implants in regenerated or native bone: 5-year results. Clin Oral Implants Res. 2009;20:507-13.
92. Block MS, Degen M. Horizontal ridge augmentation using human mineralized particulate bone: preliminary results. J Oral Maxillofac Surg. 2004;62:67-72.
93. Louis PJ, Gutta R, Said-Al-Naief N, Bartolucci AA. Reconstruction of the maxilla and mandible with particulate bone graft and titanium mesh for implant placement. J Oral Maxillofac Surg. 2008;66:235-45.
94. Trombelli L, Farina R, Marzola A, Itró A, Calura G. GBR and autogenous cortical bone particulate by bone scraper for alveolar ridge augmentation: a 2-case report. Int J Oral Maxillofac Implants. 2008;23:111-6.
95. Hammack BL, Ennekng WF. Comparative vascularization of autogenous and homogenous-bone transplants. J Bone Joint Surg Am 1960; 42-A: 811-7.
96. Marx RE. Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. Clin Plast Surg 1994; 21: 377-92.
97. Zaner DJ, Yukna RA. Particle size of periodontal bone grafting materials. J Periodontol. 1984;55:406-409.
98. Rabalais ML, Yukna RA, Mayer ET. Evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects. I. initial six-month results. J Periodontol. 1981;52:680-689.
99. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. J Clin Periodontol 1980; 7: 394-401.
100. Hammerle CHF, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. Periodontology 2000, Vol. 33, 2003, 36-53.
101. Lang NP, Hammede CH, Bragger U, Lehman B, Nyman SR. Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement. Clin Oral Implant Res, 1994;5:92-97.

102. Wang H.L., Mac Neil L. Guided tissue regeneration. *Dent Clin of North Am* 1998;3: 505-522. Görmez U. Dental İmplant Çevresinde Cerrahi Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinde Sığır Kaynaklı Laktoferrinin Kemik Rejenerasyonuna Etkisi. Doktora Tezi Adana 2008.
103. Alegret M, Silvestre JS. Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006; 28(9): 627- 56.
104. Gryn SE, Hegele RA. Pharmacogenomics, Lipid Disorders and Treatment Options. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Apr 10.
105. Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR. Statins and bone formation. *Current Pharmaceutical Design* 2001; 7: 715 -36.
106. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 2001; 5(4): 378-92.
107. Blumenthal RS. Statins: effective antiatherosclerotic therapy. *Am Heart J.* 2000 Apr;139(4):577-83.
108. Gaw A, Packard CJ, Shepherd J Statins The HMG-CoA Reductase Inhibitors in Perspective Taylor & Francis e-Library, 2005. Chap.3
109. Havsa T: Ooferektomili sıçanlarda simvastatinin, kemik, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarına etkisinin incelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD Yüksek Lisans Tezi, 2002.
110. Lupattelli G, Scarponi AM, Vaudo G, Siepi D, Roscini AR, Gemelli F ve ark. Simvastatin increases bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Metabolism.* 2004 Jun;53(6):744-8.
111. Kayaalp O: Tıbbi Farmakoloji. 10. Baskı, Hacettepe-Tas, Ankara, s: 553-82, 2002.
112. Brown MS, Goldstein JL. A receptor – mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232: 34-47.
113. Mosca L. Therapy of hyperlipidemia (1st ed). JP Mosby, England 2001.
114. Stein EA, Lane M, Laskarzewski P. Comparison of statins in hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol* 1998;81:66-9.
115. Erdemli E, Serin S, Tekiloglu M: Osteoporozu yeni çözüm. AÜ Tıp Fak Derg, 55(1): 11-6, 2002.
116. Abacıoğlu N: Güncel Farma List Türkiye Tıbbi İlaç Rehberi, 2004
117. Nakad A, Bataille L, Hamoir V, Sempoux C, Horsmans Y. Atorvastatin induced acute hepatitis with absence of cross toxicity with simvastatin. *Lancet* 1999;353: 1763-4.
118. Christians U, Jacobsen W, Floren LC. Metabolism and drug interactions of 3- hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar? *Pharmacol Ther* 1998;80:1-34.
119. Serin S. Simvastatinin in vivo kırık iyileşmesi üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2001.
120. Davignon J . Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* June 2004 109 (23 Suppl 1): III39–43

121. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA ve ark. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*. 1998 May 27;279(20):1615-22
122. Lancet. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994 Nov 19;344(8934):1383-9.
123. Tanaka T, Porter CM, Horvath-Arcidiacono JA, Bloom ET. Lipophilic statins suppress cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells through modulation of granule exocytosis. *Int Immunol*. 2007 Feb;19(2):163-73.
124. Cibickova L, Palicka V, Cibicek N, Cermakova E, Micuda S, Bartosova L, Jun D. Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. *Physiol Res*. 2007;56(6):765-70.
125. Koh KK. Effects of statins vascular wall: vasomotor function, inflammation and plaque stability. *Cardiov Research* 2000;47:648-57.
126. Human JA, Ubbink JB, Jerling JJ, Delport R, Vermaak WJ, Vorster HH. The effect of Simvastatin on the plasma antioxidant concentrations in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Chim Acta* 1997;263:67-77.
127. McFarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR. Pleiotropic effects of statins: Lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1451-8.
128. Kılıç E. Lokal ve Sitemik Simvastatin Uygulamalarının Distraksiyon Osteogenezisi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Doktora tezi. Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi; 2005.
129. Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271(3):688-92.
130. Edwards CJ, Russel RGG, Spector TD: Statins and bone: myth or reality. *Calcif Tissue Int*, 69: 63-6, 2001.
131. Aykan T. *Simvastatinin Deneysel Alveol Defektlerine Etkilerinin Değerlendirilmesi* Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007
132. Sarakatsianou V, Merendino D, Sferrazza S, Maggio C Mevalonate Pathway: Role of Bisphosphonates and Statins *Acta Medica Mediterranea*, 2006, 22: 15
133. Pytlik M, Janiec W, Misiarz-Myrta M, Gubala I. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol* 2003; 55(1):63-71.
134. Tikiz C, Unlu Z, Tikiz H, Ay K, Angin A, Onur E, et al. The effect of simvastatin on serum cytokine levels and bone metabolism in postmenopausal subjects: Negative correlation between TNF-alpha and anabolic bone parameters. *J Bone Miner Metab* 2004; 22(4): 365-71.

135. Saridoğan ME, Özkul İ. Statinlerin kemik üzerine etkileri. *Osteoporoz Dünyasından* 2003, 9(3): 114-9.
136. Wong RW, Rabie AB. Early Healing Pattern of Statin-induced Osteogenesis. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2005; 43(1): 46- 50.
137. Martins VCA, Goissis G, Ribeiro AC, Marcantonio Jr E, Bet MR. The controlled release of antibiotic by hydroxapatite: Anionic collagen composites. *Artif Organs* 1998; 22 (3) :215- 21.
138. Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: New role for old drugs. *J Pharm Pharmacol* 2006;58 (1) :3-18.
139. A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 75 (2010) 1–18.
140. A. Prokop, J.M. Davidson, Nanovehicular intracellular delivery systems, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 3518–3590.
141. M. Vert, J. Mauduit, S. Li, Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity, *Biomaterials* 15 (1994) 1209–1213.
142. Torchilin, V., *Nanoparticulates as drug carriers*. 2006: Imperial College Pr.
143. Rosenberg, E., Rose, LF. (1998). Biologic and clinical considerations for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. *Dental Clinics of North America*, 42, 467-490.
144. Stella, VJ., Rajewski, R.A. Derivatives of Cyclodextrins Exhibiting Enhanced Aqueous Solubility and the Use Thereof. US Patent 1992. 5,134,127.
145. Szejtli, J. Downstream processing using cyclodextrins. *Trends in Biotechnology*, TIBTRCH 1989;7:171–4.
146. Wade, A., Weller, P. J. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. The Pharmaceutical Press, (2nd ed.). London: American Pharmaceutical Association;1994.145-148.
147. Nash, R.A. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Wade, A., Weller, P.J. (Eds). London: Am. Pharm. Assoc. & Phar. Press; 1994.145-148.
148. Irie, T., Uekama, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation, *J Pharm Sci* 1997; 86(2), 147-162.
149. Brewster, M.E., Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007; 59, 645–666.
150. Frömring, K.H., Szejtli J. *Cyclodextrins In Pharmacy. Topics in inclusion science*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers;1994.
151. E. Cauchetier, M. Deniau, H. Fessi, A. Astier, A. Paul. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the polymer on their in vitro characteristics. *Int J Pharm.*, 2003;250:273- 281.
152. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 1980;51: 595-600.

153. Estai MA, Soelaiman IN, Shuid AN, Das S, Ali AM, Suhaimi FH. Histological Changes in the Fracture Callus Following the Administration of Water Extract of Piper Sarmentosum (Daun Kadok) in Estrogen-Deficient Rats. *Iran J Med Sci.* 2011;36(4):281-8.
154. Mukozawa A1, Ueki K, Marukawa K, Okabe K, Moroi A, Nakagawa K. Bone healing of critical-sized nasal defects in rabbits by statins in two different carriers. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(11):1327-35.
155. 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.
156. Maciel-Oliveira N, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(2):170-9.
157. Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N ve ark. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol.* 2005;76(11):1861-70.
158. Ozec I, Kilic E, Gumus C, Goze F. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *J Craniofac Surg* 2007;18 (3):546-50.
159. Taga ML, Granjeiro JM, Cestari TM, Taga R Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2008, 23(3):427-436.
160. Bongio M, van den Beucken JJ, Nejadnik MR, Tahmasebi Birgani Z, Habibovic P, Kinard LA, Kasper FK, Mikos AG, Leeuwenburgh SC, Jansen JA Subcutaneous tissue response and osteogenic performance of calcium phosphate nanoparticle-enriched hydrogels in the tibial medullary cavity of guinea pigs. *Acta Biomaterialia* 2013, 9(3):5464-5474.
161. De Smet E, Jaecques S, Vandamme K, Vander Sloten J, Naert I. Positive effect of early loading on implant stability in the bi-cortical guinea-pig model. *Clin Oral Implants Res.* 2005 ; 16(4):402-407.
162. Hosny M, Sharawy M. Osteoinduction in young and old rats using demineralized bone powder allografts. *J Oral Maxillofac Surg.* 1985;43(12):925-31.
163. Irving JT, LeBolt SA, Schneider EL. Ectopic bone formation and aging. *Clin Orthop Relat Res.* 1981;(154):249-53.
164. Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. A histological and histometrical study in rats. *Clin Oral Impl Res,* 15: 346-50, 2004.
165. Jansen JA, De Groot K. Guinea pig and rabbit model for the histological evaluation of permanent percutaneous implants. *Biomaterials* 1988;9:268-272.
166. Proyor ME, Susin C, Wikesjö UME. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodont* 2006; 33:455- 60.

167. Develioğlu H. Kritik Boyutlu Ve Kritik Boyutlu Olmayan Defektler. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2003; 6(1):60-3.
168. Anbinder AL, Junqueira JC, Mancini MNG, Balducci I, Rocha RF, Carvalho YR. Influence of simvastatin on bone regeneration of tibial defects and blood cholesterol level in rats. Braz Dent Journal 2006 ; 17(4): 267-73.
169. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 Cells. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 280(3):874-7.
170. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. Endocrinology 2003; 144: 681-92.
171. Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. J Cell Biochem 2004; 92(3):458-71.
172. Ismail FA. Design and in vitro evaluation of polymeric formulae of simvastatin for local bone induction. Drug Development and Industrial Pharmacy 2006 ; 32 : 1199-206.
173. Gutierrez GE, Lalka D, Garrett IR, Rossini G, Mundy GR. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. Osteoporos Int. 2006;17(7):1033-42.
174. Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21:1636-41.
175. Wang JW, Xu SW, Yang DS, Lv RK. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in overiectomized raet. Osteoporos Int. 2007;18:1641-50.
176. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. Fundam Clin Pharmacol. 2005;19:117-25.
177. Basarir K, Erdemli B, Can A, Erdemli E, Zeyrek T. Osseointegration in arthroplasty: can simvastatin promote bone response to implants? Int Orthop. 2009;33(3):855-9.
178. Wong RW, Rabie AB. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. Br J Oral Maxillofac Surg. 2003;41(4):244-8.
179. Lee Y, Schmid MJ, Marx DB, Beatty MW, Cullen DM, Collins ME, Reinhardt RA. The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. Biomaterials. 2008;29(12):1940-9.
180. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. J Pharmacol Sci. 2007;104(4):384-6.
181. Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S. Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. Clin Oral Implants Res. 2009;20(3):280-7.

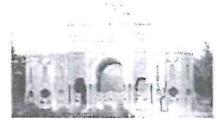
182. Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of α -tricalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Sep 15;98(4):488-98.
183. Allon I, Anavi Y, Allon DM. Topical simvastatin improves the pro-angiogenic and pro-osteogenic properties of bioglass putty in the rat calvaria critical-size model. *J Oral Implantol*. 2012;12.
184. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, Koyano K. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(3):336-42.
185. Morris MS1, Lee Y, Lavin MT, Giannini PJ, Schmid MJ, Marx DB, Reinhardt RA. Injectable simvastatin in periodontal defects and alveolar ridges: pilot studies. *J Periodontol*. 2008;79(8):1465-73.
186. Bunyaratavej P1, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol*. 2001;72(2):215-29.
187. Colangelo P1, Piattelli A, Barrucci S, Trisi P, Formisano G, Caiazza S. Bone regeneration guided by resorbable collagen membranes in rabbits: a pilot study. *Implant Dent*. 1993;2(2):101-5.
188. Ezirganlı S1, Kazancıoğlu HO, Mihmanlı A, Aydın MS, Sharifov R, Alkan A. The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats. *Clin Oral Impl Res*. 00,2013,1-8.
189. Wu Z, Liu C, Zang G, Sun H. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(2):170-6.
190. Park JB. The use of simvastatin in bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 1;14(9):e485-8.
191. I-Chun Tai1, Yin-Chih Fu, Chih-Kuang Wang, Je-Ken Chang, Mei-Ling Hol. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA /HA p microspheres enhances bone repair. *Int J Nanomedicine* 2013;8 3895–3905.
192. Jiang L, Sun H, Yuan A, Zhang K, Li D, Li C, Shi C, Li X, Gao K, Zheng C, Yang B, Sun H. Enhancement of osteoinduction by continual simvastatin release from poly(lactic-co-glycolic acid)-hydroxyapatite-simvastatin nano-fibrous scaffold. *J Biomed Nanotechnol*. 2013;9(11):1921-8.
193. Naito Y, Terukina T, Galli S, Kozai Y, Vandeweghe S, Tagami T, Ozeki T, Ichikawa T, Coelho PG, Jimbo R. The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria. *Int J Pharm*. 2014 30;461(1-2):157-62.
194. Bekers O1, Beijnen JH, Tank MJ, Bult A, Underberg WJ. Effect of cyclodextrins on the chemical stability of mitomycins in alkaline solution. *J Pharm Biomed Anal*. 1991;9(10-12):1055-60.

195. Jun SW¹, Kim MS, Kim JS, Park HJ, Lee S, Woo JS, Hwang SJ. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;66(3):413-21.
196. Ungaro F¹, Giovino C, Catanzano O, Miro A, Mele A, Quaglia F, La Rotonda MI. Use of cyclodextrins as solubilizing agents for simvastatin: effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on lactone/hydroxyacid aqueous equilibrium. *Int J Pharm.* 2011 14;404(1-2):49-56.
197. Price U¹, Le HO, Powell SE, Schmid MJ, Marx DB, Zhang Y, Wang D, Narayana N, Reinhardt RA. Effects of local simvastatin-alendronate conjugate in preventing periodontitis bone loss. *J Periodontal Res.* 2013;48(5):541-8.

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2013/ 44

31/01/2013

Sn: Prof. Dr. Gülsüm AK
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Karar No :2013/ 44

Başvuru :29.01.2013

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Dok.Öğr. Gamze Şenol GÜVEN**'e ait "Lokal Simvastatin Uygulamasının İn vivo Olarak Kemik Yapımı Üzerine Etkisinin Deneysel Olarak Araştırılması : Kobay (Guinea pig) Çalışması." isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Kobay
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	24
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	Şubat 2013/Şubat 2014	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İ.Ü.HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İ.Ü.HADYEK Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Mak.Yük.Müh. Yard.Doç.Dr.Burak OLGUN
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	GAMZE	Soyadı	ŞENOL GÜVEN
Doğ.Yeri	ANTALYA	Doğ.Tar.	18.05.1985
Uyruğu	T.C	TC Kim No	18154440344
Email	gamzesenol@gmail.com	Tel	0535 2943775

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ	2014
Yük.Lis.	MARMARA ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ	2009
Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ	
Lise	ANTALYA ANADOLU LİSESİ	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	ÇOK İYİ	İYİ	ÇOK İYİ	87.5	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Uygulamaları	ÇOK İYİ
Profesyonel Programlar: Windows XP, Windows Vista, Adobe Photoshop	ÇOK İYİ

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri