

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Dişhekimliği Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Birimi  
Referent ve Birim Başkanı:  
Doç.Dr.Namık SOYDAN

750428

EHDP (ETHANE-1-HYDROXY-1,1-DIPHOSPHONATE)'NİN  
BIYOMİNERALİZASYON ÜZERİNE ETKİSİNİN DENTİNDE  
(SIÇAN) ULTRASTRÜKTÜREL İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Dişhekimi  
Sevtap Gürsu

İstanbul - 1984

150428

## İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
GİRİŞ . . . . .	1
GEREÇ VE YÖNTEM . . . . .	6
BULGULAR . . . . .	9
TARTIŞMA . . . . .	12
SONUÇ . . . . .	19
ÖZET . . . . .	21
KAYNAKLAR . . . . .	23
RESİMLER VE AÇIKLAMALARI . . . . .	33
ÖZGEÇMİŞ . . . . .	43

## G İ R İ Ş

Sert dokular matris denilen hücreler arası madde ile bunu salgılayan hücrelerden oluşur. Matris hücrelere göre daha geniş bir alanı kapsar ve iki bölümden oluşur. Bunlar organik matris ve inorganik matrislerdir.

Organik matrisi kollagen ve esas madde yapar, % 95'i kollagendir. Bu protein, matris içinde ileri derecede örgütlenmiş lifsel bir yapı oluşturur. Kollagen üzerine sert dokularda mineral matris çökeldiğinden bu diğer bağ doku kollagenleri arasında ayrı bir yer tutar. Ancak bu ayrıcalığını açıklayıcı biyokimyasal, morfolojik ya da immunolojik bir özellik taşımadığı görülmektedir. Kollagen lifciklerinin arasını esas madde doldurur. Esas madde daha çok hücre ve kanalcıkları çevresinde yoğunlaşmış gözükür. Kimyasal yapısına değişik protein-karbonhidrat bileşimi moleküller girer.

Mineral matrisin yapısına başta kalsiyum ve fosfor olmak üzere sitrat, karbonat, magnezyum, sodyum, fluor ve su girer. İnorganik fazın organik matrise oranı gelişime ve patolojik nedenlere bağlı olarak değişir. X ışınları saçılması yöntemiyle yapılan gözlemler mineral matrisin büyük ölçüde kalsiyum fosfat kristallerinden oluştuğunu göstermiştir. Diğer kısmını da amorf kalsiyum fosfat yapar. Kristaller mineral hidroksiapatittir ( $Ca_{10}(PO_4)_6 OH_2$ ). Yassı, iğne biçiminde ya da altıgen olabilir. Genellikle uzun eksenleri kollagen

lifcikler doğrultusunda olacak şekilde bunların üzerlerinde ya da içlerinde yerleşmişlerdir. Ancak hepsinde kollagen lifciklerle yakın ilişki gözlenmez ve bunlardan ayrı olarak esas madde içinde yerleşmiş kristallere de sıklıkla rastlanır. Kristaller birbiriyle bitişik değildir ve aralarında değişik kalınlıklarda amorf alanlar bırakırlar(37).

Organik matris yapımını hücrelerin dışında kalsifikasyon izler. Bu bölgeye kalsifikasyon çizgisi denir. Kalsifikasyon çizgisiyle hücreler arasında mineral yapı içermeyen bir halka yer alır. Bu halka içinde kollagen lifciklerin değişik olgunlaşma şekilleri ve vesiküller gözlenir. Vesiküller (matris vesikülleri) değişen boyutlarda yuvarlak ve hücre membranına benzer bir membranla çevrili keseciklerdir. Kalsiyuma kolayca birleşme özelliğiyle bilinen fosfolipidler, kalsiyum, alkali fosfataz ve ATP enzimi içerirler. Vesiküllerin organik matris içinde kalsifikasyonu başlatıcı yerel bir sistem oluşturdukları öne sürülmüştür(1). Ancak bunlar kalsifikasyona uğramayan hyalin kıkırdak gibi dokularda da gözlenmektedir(7). Organik matris oluşumunu kalsifikasyon izler.

Organik matris üzerine mineral matrisin çökmesi: Önce kalsiyum ve fosforun doku sıvısı içinde yerel birikimi veya organik matrisin bazı fiziksel ya da kimyasal özellikleriyle doku sıvısından seçici biçimde bu iyonları tutarak suda çözünmez amorf tuzların oluşması ve bunların da hidroksiapatite benzer kristallere dönüşmesi evrelerini kapsar. Bu evrelere ilişkin ayrıntılar henüz bilinmemektedir. Herbiriyle ilgili değişik varsayımlar öne sürülmüştür:

- Kalsiyum ve fosforun yerel birikimi: İn vitro kalsiyum ve fosfat iyonlarının yoğunluğu belirli bir değere yükseltildiğinde bunlar suda erimez kalsiyum fosfat tuzu şeklinde çökelmeye başlar. Bu değer altında ise çökme olmaz. Ekstrasellüler sıvıyı bu yönden incelemeye yönelik çalışma-

lar; kalsiyum ve fosfat yoğunluğunun, çökelme için gerekli olan değerin çok altında olduğunu göstermiştir(36).

Robinson ve ark. (1930) kalsiyum ve fosforun organik matriste enzim yoluyla aktif biçimde artabileceği tezini ortaya atmışlardır. Bu araştırmacılara göre alkali fosfataz enzimi fosfat iyonlarını serbestleştirerek bunların yerel birikimine ve çökmesine neden hazırlar. Ancak kalsifikasyonun normal gelişmediği raşitizm olgusunda ve birçok yumuşak doku da da bu enzimin bulunması varsayıma ters düşmektedir(71).

- Organik matris mineral matris ilişkisi ile ilgili varsayımlar: Bunlar birikim olmaksızın organik matrisin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleriyle doku sıvısından bu iyonları seçici biçimde tutmasını ön plana alır. Başlıca iki varsayım bulunmaktadır. İlkine kristallerle yakın ilişkileri nedeniyle kollagen lifcikler dayanak oluşturur(37). Buna ilişkin varsayımlar arasında kristallerin, moleküllerin içinde; bunların uçları arasındaki açıklıklarda; ya da lifciklerin yüzeyinde ve enine çizgilenmelere uyacak biçimde yerleştikleri yer alır. İkinci varsayım ise kollagen dışındaki amorf matris proteinlerinin minerali bağlaması oluşturur. Buna göre matris proteinleri önce kalsiyum iyonlarını; oluşan kalsiyum-protein kompleksi de fosfat iyonlarını bağlar ve daha sonra kalsiyum fosfat, proteinden ayrılır; serbest kalan protein yeniden başka bir kompleksi bağlar(9). Kalsifikasyon bu olay zinciri içinde gerçekleşir. Ancak önceki gibi bu varsayım da diğer bağ dokularının neden sertleşmediğini açıklamaz.

- Hücre-mineral matris ilişkisi: Morfolojik çalışmalar matrisi oluşturan hücrelerin mitokondriyon veya veziküllerinde kalsiyumun yoğunlaştığını göstermiştir. Bu bulgulara dayanılarak kalsiyumun, hücre içinden mineralleşme alanına veziküller içinde salgılanabileceği savı ortaya atılmıştır(47).

- Nükleasyon: Glimcher'in(34) ortaya atmış olduğu nükleasyon varsayımı bunlar arasında en çok ilgi çekenidir. İn vitro uygun çözelti içine bir kristal çekirdeği eklenmesiyle, bu madde çözeltinin dengesini bozar ve moleküllerde yığılmalarla küçük çekirdekler oluşur (nükleasyon). Bunlar da giderek irileşir ve kristallere dönüşür. Sert dokularda kalsiyum ve fosforun nükleasyonunu başlatıcı olarak kollagen lifcikler üzerinde durulmaktadır. Mineral matris oluşumu, nükleasyon, için uygun alanları kapsadıkları ve ilk oluşan kristallerin lifcikler içine, uçuca aynı yönde sıralanan polimerler arasındaki kısa aralıklara çökeldikleri sanılmaktadır(6).

- Kalsifikasyon inhibitörleri: Organik matris yönünden birbirinin aynı olan bağ dokuları arasındaki sertleşme ayrıcalığından kalsifikasyon inhibitörleri sorumlu tutulur. Buna göre pirofosfat, fosfonat gibi inhibitörler diğer yumuşak bağ dokularında kalsiyum çökmesini engeller(19,20,22,26).

Pirofosfatın dokularda bir kalsifikasyon inhibitörü olarak bulunduğu tartışma konusudur. Bu varsayımdan hareket ederek son yıllarda pirofosfata benzer yapıdaki sentetik difosfonatlar sert dokular üzerinde değişik amaçlarla ve değişik alanlarda kullanılmaktadır. Bunların arasında en uygun olanı EHDP (ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate) dir.

EHDP kimyasal olarak inorganik pirofosfatlara çok benzer, ancak P-O-P bağları yerine P-C-P bağları içerir(17,18). EHDP'nin deneysel ve klinik açıdan değişik kullanım alanları vardır. Deneysel olarak sert dokularda amorf ve kristal kalsiyum fosfat üzerine(4,27,30,31,38,42,58) ve buna bağlı olarak da mineralizasyon(5,30,40,43,44,52,64,68) ve rezorpsiyon üzerine(24,43,52,54,64,65,68) etkileri incelenmiştir.

Klinik olarak da 3 amaçla: 1) Nükleer tıpta tanı için "iskelet marker"ları olarak(33,48); 2) Yumuşak doku kalsifikasyonlarının önlenmesinde(2,12,29,72); 3) Kemik yıkımını ön-

lemek için, terapötik olarak kullanılmıştır(41). Bu alanda en önemli uygulamayı kemik turnover ile karakterize Paget's hastalığında yeni kemik yapımı ve rezorpsiyonunu durdurarak biyolojik bir düzelme meydana getirmesi oluşturur(11,67).

Bu çalışmada EHDP'nin mineralleşme üzerine bilinen etkisinden yararlanılarak dentin oluşumunun engellenmesine bağlı morfolojik değişimlerin ince yapı düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yetiştirilen 72 adet erkek 3 aylık Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanların herbiri  $200 \pm 10$  gr. ağırlığındaydı. EHDP (Procter and Gamble Company, Cincinnati, USA) % 0,9 luk NaCl eriyiği içinde  $500 \mu\text{g/ml}$  lik yoğunlukta hazırlandıktan sonra intraperitoneal yoldan şırınga edildi.

Deneyler 4 grup halinde yapıldı:

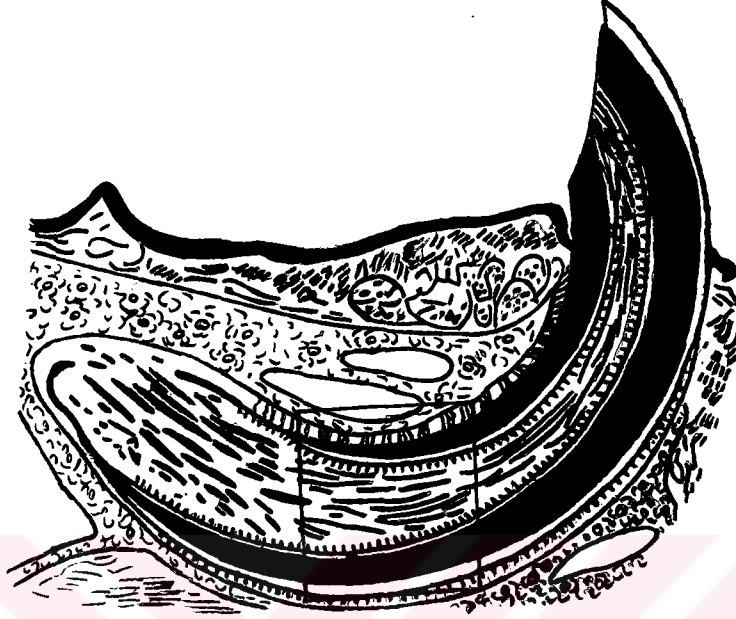
1. Grup: Kontrol	% 0,9 luk NaCl	4 gün
2. Grup: Deney I	2,5 mg/kg (Vücut ağı.)	4 gün
3. Grup: Deney II	5 mg/kg (Vücut ağı.)	4 gün
4. Grup: Deney III	5 mg/kg (Vücut ağı.)	8 gün

2. Grupta  $500 \mu\text{g/ml}$ . EHDP'den sıçanların her 100 gr'ı için 0,5 cc. (2,5 mg/kg/gün EHDP), 3. ve 4. grupta 1 cc. (5 mg/kg/gün EHDP) verildi.

Deneyler 4 kez tekrarlandı. Her kontrol grubu için 3, deney grupları için 5 er hayvan kullanıldı.

Sıçanların alt kesicileri çıkarılarak sürekli büyüyen apeks (odontogen) bölgeleri (Resim 1)  $2-3 \text{ mm}^3$  lük parçalar halinde kesildi.





RESİM 1- Sıçan ön alt kesici dişinin alveolü içinde görünümü (çizim) ve odontogen bölge (kare içinde). The Rat in Laboratory Investigation'dan alınmıştır(69).

Parçalar önce % 2 lik glutaraldehid-phosphat tamponunda 2 saat, % 1 lik  $O_3 O_4$  te (Palade) 1 saat tesbit edildi. Tesbit işlemi tamamlandıktan sonra fosfat tamponunda (Sörensen pH:7.2-7.4) yıkanmaları için bir gece bırakıldı. Bunu dehidratasyon için aseton serilerinden geçirilmeleri ve Westopal'de inklüzyon ve bloklanmaları izledi:

- % 30 asetonda (70 cc. izotonik sol.+30 cc.aseton)  
10 dakika,
- % 50 asetonda (50 cc. izotonik sol.+50 cc.aseton)  
10 dakika,
- % 70 asetonda (30 cc. izotonik sol.+70 cc.aseton)  
30 dakika,
- % 90 asetonda (10 cc. izotonik sol.+90 cc.aseton) 3  
defa 30 dakika,
- % 100 asetonunda (suyu alınmış aseton) 45 dakika 3 de-  
fa değişti.

- % 100 asetonda (suyu alınmış aseton) 45 dakika 3 defa değişti.

- Wes.I de (3 kısım % 100 aseton+1 kısım Wes) 1 saat,

- Wes.II de (1 kısım % 100 aseton+1 kısım Wes) 1 saat,

- Wes:III de (Saf Wes.+% 1 i inisyatör+% 1 i aktivatör) 1 saat,

- Wes.IV de (Saf Wes.+% 1 i inisyatör+% 1 i aktivatör) 1 saat,

- Wes.V de (Saf Wes.+% 1 i inisyatör+% 1 i aktivatör) 1 saat.

Jelatin kapsüllerde bloklandıktan sonra sertleşmeleri için 24 saat 60°C de etüvde bırakıldı.

Bloklama işleminde sonra kesitler LKB ultramikrotomunda cam bıçaklarla alındı. Işık mikroskobu için hazırlanan 1 µ luk kesitler toluidin mavisiyle boyandı. Elektron mikroskobunda incelenecek 400-600 Å luk ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlandırıldıktan sonra JEOL 100 C elektron mikroskobunda incelendi.

Bütün bu işlemler İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

## B U L G U L A R

### IŞIK MİKROSKOBU

Kalın kesitler üzerinde (1  $\mu$ ) ışık mikroskobu düzeyinde yapılan gözlemler ve ölçümlerde her iki grup arasında fark gözlenmedi. Predentinin kalınlığı hepsinde yaklaşık 15  $\mu$  idi.

Predentin ve dentin aynı boyanma özellikleriyle belirgindiler. Ancak her iki grupta da kontrollere göre ne predentinin ne de dentinin boyanma özellikleri değişiyordu (Resim 2a ve b).

### ELEKTRON MİKROSKOBU

Kontrol grubuna ait bir kesitten alınan mikrografta (Resim 3) odontoblast ve predentin alanı görülmektedir. Odontoblastlar, yuvarlak nukleusları ve geniş, çok sayıda GER kesecikleri ile belirgindir. Bu hücreler arasında membran tutucu sistemlere sık rastlanmıştır. Mitokondrionlar ufak yuvarlak ve sıkı kretlidir. Golgi oldukça gelişmiştir. Özellikle sitoplazmanın apeksine doğru irili ufaklı elektron-aydınlık veziküllerin yoğun oldukları dikkati çekmiştir.

Predentinde iki ayrı bölge ayırt edilmektedir: Bunlardan ilki odontoblastlara komşu amorf tabaka; diğeri kollagen lifciklerin belirgin oldukları fibröz tabaka. Amorf tabakada

odontoblastların içindekilere benzer veziküllerin varlığı dikkati çekmiştir. Her iki tabaka arasında kesin bir sınır yoktur; başka bir deyişle amorf tabakanın kalınlığı değişkendir. Buradan fibröz görünümdeki asıl predentine geçişte lif yoğunluğu ve büyüklüğü açısından bir derecelenmenin varlığı dikkati çekmiştir. Amorf tabakaya en yakın olan lifcikler ince, kısa ve seyrek, daha yukarlarda ise daha kalın, uzun ve sık düzenlenmişlerdir.

Resim 4 yine kontrol grubuna ait bir kesitten alınmıştır ve odontoblastları uzantılarıyla birlikte göstermektedir. Uzantıları bazı veziküler yapılar dışında organelden yoksun ve filamentöz görünümündedir. Aralık bırakmayacak şekilde kanalcıkları doldurmaktadırlar.

Predentinin lifsel yapısı örgümsü niteliktedir. Enine çizgilenmeleri karakteristik kollagen lifciklerle bunların arasını dolduran amorf alanlardan oluşmaktadır. Kollagen lifcikler değişik büyüklüktedir. Matris içindeki dağılımı homojen görünmemektedir. Yer yer seyrek ya da yoğun alanlar oluşturmaktadır (Resim 5).

Predentin-dentin sınırı (Resim 6) düzensizdir. Bu alanda predentin içinde bazı mineral doku odaklarına rastlanmıştır. Bunun yanında dentine komşu bölgede henüz kollagen niteliğini koruyan ancak yoğun lifciklerin oluşturduğu alanlar bulunmaktadır. Başka bir deyişle mineralleşme bölgesi yaygın ve düzensiz bir görünüm vermektedir (Resim 6 ve 7). Yeni oluşan kristallerin kalınlığı  $30 \text{ \AA}$  olarak hesaplanmıştır. Kristalleşme çizgisinden itibaren giderek matrisin lifsel (kollagen) görünümü kaybolmaktadır.

2,5 mg/kg/gün EHDP (4 gün) uygulanan deney grubu üzerindeki gözlemlerde kontrol grubuna göre belirgin ince yapı farkı gözlenmedi. Odontoblastlar bilinen organel özelliklerini taşıyor, GER den zengin ve gelişkin karakterdeydi (Resim 8).

Bu tabakadan predentine geçişte, ne odontoblast uzantılarının ne de predentinin amorf ve lifsel görünümü değişmiyordu. Predentin-dentin sınırı yine düzensizdi ve yer yer predentin içinde mineral doku adacıklarına rastlanıyordu (Resim 9). Bu alanda predentin içinde daha yoğun ancak enine çizgilenmeleri fark edilebilen kollagen lifcik alanları yer almaktaydı. Lif yapısı, yoğunluğu ve dentin kontrol grubunda olduğu gibiydi (Resim 10).

5 mg/kg/gün EHDP (4 gün) uygulanan deney grubunda odontoblastlar daha hipertrofik, predentinin amorf tabakası kalın, lifsel tabaka düzensizdi. Kollagen lifcikler düzensiz, dağınık ve inceydi (Resim 11,12).

Mineralleşme alanında yoğun odakların dışında predentin içinde tek tek serpilmiş ince kristaller dikkati çekiyordu. Dentin, kontrol grubunda olduğu gibi kompakt ve düzenli görünüyordu (Resim 13).

En yüksek doz olarak verilen 5 mg/kg/gün EHDP (8 gün) deney grubunda organik matris değişimi daha belirgindi. Odontoblastlar şişmiş görünüyordu. Predentinde amorf alanlar geniş yer tutuyordu. Lifcikleri seyrek, ince ve kısaydı (Resim 14). Dentin düzensiz, kristaller ince ve kısa; gevşek yapısı içinde kollagen paterni oldukça belirgindi (Resim 15). Ayrıca yer yer geniş dentin oluşumu defektlerine rastlanıyordu (Resim 16). Bu alanlarda organik matrisin ve kanalcıkların çok daha düzensiz olduğu dikkati çekiyordu. Bu değişimlere karşın ne predentin ne de mineral matrisin kalınlığı değişmiyordu.

## T A R T I Ő M A

EHDP (ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate) nin sert do-  
ku mineralizasyonu üzerine etkilerini incelemek amacıyla çok  
sayıda in vitro(4,8,15,23,24,27,30,38,42,50,54,65) ve in vi-  
vo(5,13,23,24,30,40,43,44,46,52,57,59,61,65,68) çalışmalar  
yapılmıştır.

Yine deneysel olarak da dentin biyomineralizasyonu  
üzerine EHDP'nin etkileri bazı araştırıcılar tarafından ışık  
ve elektron mikroskopik düzeyde sıçanların molar germleri çı-  
karılarak gözlenmiştir(44,46). Çalışmamızda farklı olarak ke-  
sicilerin sürekli büyüyen odontogen bölgelerindeki (Resim 1)  
dentin biyomineralizasyonunu incelemeyi daha uygun gördük.

Işık mikroskobu düzeyinde yapılan bazı çalışmalarda  
difosfonatların predentin kalınlığı ve boyanması üzerine et-  
kilerine yer verilmiştir.

Düşük dozlarda (0,5-2,5 mg/kg/gün) kalınlıkta değişme  
olmamasına karşın(46) daha yüksek dozlarda (7,5-10 mg/kg/gün)  
predentinde belirgin bir kalınlaşma olduğu ileri sürülmüş-  
tür(44). Buna karşılık yine aynı dozda yapılan başka bir ça-  
lışmada (10 mg/kg/gün) predentinin dentine göre kalınlığının  
değişmediği bildirilmiştir(59).

Bulgular bölümünde de açıkladığımız gibi kullandığımız

her iki dozda da predentin bölgesinin kontrol gruplarına göre kalınlığında herhangi bir değişme gözlenmemiştir. Bu da EHDP'nin mineralizasyon üzerine tam bir frenleyici etkisinin olmadığını gösterir.

Yine ışık mikroskobu için toluidin mavisiyle boyanmış kesitlerde dentin oluşumu sırasında predentin ve dentinin ayrı boyanma özelliklerine sahip alanlar içerdiği ve bu alanlarda EHDP verilmesiyle boyanma affinitesinde değişmeler gözleendiği, buna bağlı olarak da kalitatif yönden her iki bölgenin de bu maddeden etkilendiği bildirilmiştir(44).

Bizim toluidin mavisiyle boyadığımız kesitlerde kontrollere göre boyanmada değişme görülmemiştir. Bu da uygulanan boyanın pH'larının farklı derecelerde olmasından kaynaklanabilir.

Vücut tarafından tutulan difosfonatların hemen hemen tümü sert dokularda birikir; çok azı yumuşak dokularda bulunmuştur. Başka deyişle kemik ve dişler difosfonatlar için birer hedef organdır ve orada hidroksiapatit kristalleri üzerine çeşitli etkiler yaparlar(51).

Difosfonatların in vitro(4,15,23,24,27,30,31,38,50,60) ve in vivo(5,23,24,30,31,40) kristal üzerine etkilerini inceleyen araştırmacılar, bu maddelerin amorf kalsiyum fosfatın kristal haline geçişini, yani olgunlaşmasını(8,23,27,30), hidroksiapatit kristallerinin kümelenmesini(4,27,38), büyümesini(8,28,30,31,50), çözülmesini(15,24,65) inhibe ettiği ya da yavaşlattığını ve hidroksiapatit kristal kümelerini parçalayarak kristalleri kolloidal bir duruma geçirdiğini(4,42,60) göstermişlerdir. Ayrıca deneysel olarak kalsiyum oksalat kristallerinin(32,49) ve diştasının(10,27,31,56,58) oluşmasını da önlemektedir.

Difosfonatların kristaller üzerine etkilerinin bilinmesinden sonra kristal büyümesi ve çözülmesine bağlı olarak da in vivo sert dokularda kalsifikasyon mekanizması üzerine etkileri incelenmiştir.

Kristal üzerine inhibe edici etkileri ile sert doku mineralizasyonu üzerine etkileri(5,23,30,40,43,44,46,52,66,73) ve çözülmeyi durdurucu etkileri ile de rezorpsiyonu önlemesi arasında(15,24,41,52,54) yakın bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür.

Buna göre kemik dokusunda mineralleşmeyi engeller, osteoid madde alanları genişler(40,43,61,62,68) ve kemik yapımı azalır(13,40,43,46,52,61,62,64), kırıldak mineralizasyonunu engelleyerek epifiz plağının genişlemesine ve gelişim sırasında kemik şekillenmesinin bozulmasına neden olur(5,43,52,59,64,68).

Buna karşılık difosfonatlar daha düşük dozlarda kristallerin çözülmesini inhibe eder, buna bağlı olarak da kemik turnoverinde azalmaya neden olur(40,62,64,67); immobilizasyonla meydana getirilen osteoporozis(25,39) ve PTH gibi(24,54,65) çeşitli ajanlarla meydana getirilen kemik rezorpsiyonunu önler. Fakat düşük kalsiyum diyetiyle meydana getirilen rezorpsiyon üzerine etkili değildir(55).

Dentin gelişimi üzerine etkilerini inceleyen bazı araştırmacılar da preentin kalsifikasyonunda kesin olarak inhibisyon meydana geldiğini bildirmişlerdir(44,46). Dentindeki kristal büyümesinin inhibisyonunun hem mineralizasyon bölgesindeki yeni, hem de intertubuler dentindeki eski kristallerin büyümesinin inhibisyonuyla birlikte olduğu bildirilmiştir(46).

Bizim de 5 mg/kg/gün EHDP (8 gün) uyguladığımız deney grubunda dentinin düzensiz, kristallerin daha ince ve kısa,



gevşek yapısı içinde kollagen paterninin oldukça belirgin olması önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi EHDP'nin kristal düzeyinde etkin bir inhibitör olduğunu gösterir.

Çoğu araştırmacılar sert dokulardaki bu etkilerin tümünü difosfonatların kristal yüzeyi üzerinde kuvvetli bağlar oluşturarak kristal büyümesi ve çözülmesini durdurmalarına bağlamışlardır(21,27,30,42,50,66).

Russell ve ark.(66)'na göre difosfonatların kristalizasyon üzerine etkileri nukleasyonun inhibisyonunu kapsar ve hidroksiapatit kristal nukleuslarının birikimi ve büyümesi durur. Bu maddeler kalsiyum ve fosfatın sadece birkaç atomunu içeren ilk kristal nukleuslarına tutunur ve böylece bu küçük partiküllerin özelliklerini değiştirerek kristal büyümesi ve olgunlaşması gibi sonraki safhaları engeller.

Yapılan incelemelerle yüksek dozlardaki osteoid doku artışının normalden fazla kalsiyum ve fosfor alan hayvanlarda bile gözlenmesini(43) ve serumda kalsiyum ve fosfor düzeyinin yüksek olmasına karşın osteoid alanın artışını(40,41) EHDP'nin kristal üzerine olan fiziko-kimyasal etkilerine bağlamışlar ve bunu osteoid maddenin artması değil de kristalizasyonun yavaşlaması şeklinde yorumlamışlardır(46). Predentindeki genişlemeyi de kemikteki osteoid doku artışına benzetmişlerdir(44).

Buna karşın bazıları da kristaller üzerine bu etkilerden başka EHDP'nin kemik hücrelerinin metabolizmasını da etkileyerek lizozomal enzim aktivitesinde azalma(13) ve hiperaktif osteoblast karakterinde atipik osteositler görüldüğünü bildirmişlerdir(57).

Minkin ve ark.(54) matris mineralizasyon derecesi ile osteoblastik aktivitenin regülasyonu ve indüksiyonu arasında

bir ilişki olabileceğini varsayarak difosfonatların kemik oluşumunu etkilemesinin bu yolla olabileceğini bildirmişlerdir. Bazıları da EHDP'nin kristallere bağlanmasıyla yerel iyon konsantrasyonlarındaki değişmelerin hücre metabolizmasında değişmelere yol açabileceğini ileri sürmüşlerdir(53, 66,67).

EHDP etkisinde *in vitro*(35) ve *in vivo*(57) olarak mitokondrion içindeki granüllerde artma olduğu gösterilmiştir. Buna dayanarak EHDP'nin mitokondrionlardan mineralleşme alanına kalsiyum iyonlarının pompalanmasını etkileyebileceği öne sürülmüştür(35).

*In vitro* bir çalışmada da EHDP'nin lipid moleküllerinin düzenini ve yapısal özelliklerini değiştiren sürfaktanlar gibi etki ettiği ve bu yolla dokudaki hücre ve matris vezikül membranlarını etkileyebileceği düşünülmüştür(8).

EHDP düşük dozlarda rezorpsiyonu inhibe etmektedir. Bu dozlarla ilgili olarak bazen osteoklastlarda vakuollerde azalma(52,57,68), kırışık kenarların büzülmesi(57); bazen de sayılarının ve nukleuslarının artması ve sitoplazmanın daha iri olması(52,53,57,63,68) gibi karşıt bulgular bu maddenin osteoblast metabolizmasını da etkileyebildiğini gösterir niteliktedir.

Ayrıca bir çalışmada lizozomlarla ilişkisi yönünden bir başka olasılık üzerinde durulmuştur. Buna göre EHDP kemikten serbestleşen kristallerle birlikte fagosite olarak osteoklastların sekonder lizozomlarında çözülür ve orada yoğunlaşarak asit hidrolazları etkisiz duruma getirir(16). Doku kültürlerinde ve *in vivo* rezorpsiyonu yavaşlatıcı etkisi bu yoldan da açıklanmaya çalışılmıştır.

Biyomineralizasyonla ilgili enzimler üzerine etkilerine

ilişkin de çalışmalar yapılmıştır: EHDP'nin kristalleri direkt olarak etkilemesine ek olarak kollagenin kalsifiye olması için gerekli görülen pirofosfataz aktivitesini(19,20) inhibe edebileceği bildirilmiştir(23,73). Fakat EHDP, bu enzimle aynı etkiye sahip alkali fosfatazı inhibe etmeksizin kalsifikasyonu durdurmaktadır(70).

Difosfonatların sert doku mineralizasyonu üzerine etkisinin D<sub>3</sub> vitamininin 25-hidroksi metabolitine dönüşmesinin inhibisyonuyla da ilgili olabileceği ileri sürülmüştür(21,23).

Şimdiye kadar EHDP'nin dentin oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelik çalışmalarda odontoblastlarla ilgili morfolojik değişmelere ilişkin bir bulguya rastlanmamaktadır.

Çalışmamızda 5 mg/kg/gün EHDP (4 gün) verilen hayvanlarda bu hücrelerin kontrollara ve düşük doza göre daha hipertrofik olması odontoblastlara da diğer etkilenmeler arasında yer verilmesini gerektirir niteliktedir.

Dentinde mineralizasyon üzerine düşük dozla (2,5 mg/kg/gün) yapılan bir çalışmada predentin matrisi içindeki veziküllerde kristalitlerin düzeninin bozulduğu(46) daha yüksek dozlarda bu değişmeye ek olarak odontoblastlar içindeki veziküllerin granüler içerik kazanmalarıyla hücre içi düzeyde kollagen sentezinin bozulabileceğini de ileri sürmüşler, fakat bunların lizozomal kökenli yapılar olması ihtimali üzerinde de durmuşlardır(44).

Çalışmamızda 5 mg/kg/gün EHDP (8 gün) verilen deney grubunda diğer gruplara göre predentinin amorf tabakasının kalınlaşması ve kollagen lifciklerin düzensiz ve dağınık olması değişimin predentinde kollagenle de ilişkili olduğunu gösterir. Odontoblastlardaki hipertrofik durum kollagen sen-

tezindeki bozukluğun hücre içinde mi yoksa dışında mı sorusunu ortaya çıkarır. Predentindeki amorf tabakanın yer yer kalınlaşması, bunun daha çok hücre dışında tropokollagen makromoleküllerinin polimerizasyonundaki bir bozukluğa bağlı olabileceğini düşündürür.

İlk kristal yapıların odontoblast uzantılarındaki membranla örtülü veziküllerde kollagenle bir ilişki söz konusu olmaksızın ortaya çıktıkları, daha sonra bunların hücre dışındaki matriste kollagen lifciklerle sarılı ve onlara paralel olarak aralarında diziler yaptıkları ve sonra birleşip büyüyerek kalsifiye dentin damarlarını oluşturdukları gösterilmiştir. Böylece nukleasyon olayında organik matrisin rolü kadar hücrelerin de bu olayı başlatmada ilk görevi üstlendikleri bildirilmiştir(3,14,45).

EHDP ile dentin mineralizasyonunun ilişkisini araştırmaya yönelik çalışmalar veziküllerin içindeki kristalitlerin bu maddeden önemli derecede etkilendiğini göstermiştir(46).

Çalışmamızda predentindeki kollagen lifciklerin düzensiz, dağınık ve ince oluşu bu maddenin hücre içindeki veziküllerde ilk kristalitlerin oluşumu üzerine etkisine ek olarak kollagen düzenini bozarak da matristeki nukleasyonu etkileyebileceğini düşündürmektedir.

5 mg/kg/gün EHDP (8 gün) uygulanan deney grubunda hücreler ve organik matriste 4 günlüklere göre değişme daha belirgindir. Odontoblastların şişkin ve lifciklerin daha düzensiz olduğu saptanmıştır. Kemik üzerinde yapılan çalışmalar EHDP'nin etkilerinin doza ve süreye bağlı olduğunu göstermiştir(43,52,62,64). Bizim de bulgularımız bunu kanıtlar niteliktedir.

## S O N U Ç

EHDP'nin dentinogenesis üzerine ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde etkisini araştırmaya yönelik bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar alınmıştır:

1- Kullandığımız dozlarda pre dentin kalınlığında bir değişme gözlenmemiştir.

2- Toluidin mavisiyle boyanan kalın kesitlerde ışık mikroskobu düzeyinde kontroller ve deney grubu ve bunların değişik dozları arasında mineral dentin alanlarında bir yapı farkına bağlanabilecek boya affinitesi değişimleri saptanmamıştır.

3- 5 mg/kg/gün EHDP dozda 4 günden itibaren elektron mikroskobu düzeyinde odontoblastların kontrollere ve daha düşük dozlara göre hipertrofik görünüm aldıkları dikkati çekmiştir.

4- Aynı dozda ve sürede pre dentinin ince yapısı içinde amorf alanların daha geniş yer kapladığı, kollagen lifciklerin düzensiz ve dağınık oldukları gözlenmiştir.

5- 8 gün süreyle 5 mg/kg/gün EHDP verilen deney grubunda hücreler ve organik matrisle ilgili değişimlerin daha belirgin oldukları görülmüştür.

6- Yine aynı deney grubunda mineral dentinin düzensiz, kristallerin daha ince ve kısa ve mineral dentin içinde kol-lagen paterninin belirgin olduğu izlenmiştir.



## Ö Z E T

Bu çalışmada EHDP (Ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphate)'nin sert doku mineralizasyonu üzerine bilinen etkilerinden yararlanılarak dentin oluşumunun engellenmesine bağlı morfolojik değişimlerin ince yapı düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

Deneyler 72 adet 3 aylık erkek Wistar albino sıçanlara uygulandı. EHDP % 0.9'luk NaCl eriyiği içinde 500 µg/ml'lik yoğunlukta hazırlandıktan sonra intraperitoneal yoldan şırınga edildi. Sıçanların her 100 gr'ı için 1. deney grubunda 0,5 cc (2,5 mg/kg/gün) 4 gün, 2. deney grubunda 1 cc (5 mg/kg/gün) 4 gün ve 3. deney grubunda 1 cc 8 gün süreyle verildi. Kontrol grubuna aynı miktarda % 0,9'luk NaCl şırınga edildi. Deneyler 4 kez tekrarlandı. Her kontrol grubu için 3, deney grupları için 5'er hayvan kullanıldı. Sıçanların alt kesicileri çıkarılarak elektron mikroskobu için tesbit ve takip işlemlerinden sonra cam bıçaklarla kalın (1 µ) ve ince (400 - 600 A<sup>0</sup>) kesitler alındı. Kalın kesitler ışık mikroskobu için toluidin mavisiyle boyandı. İnce kesitler kontrastlandırıldıktan sonra elektron mikroskobunda incelendi.

Işık mikroskobu düzeyinde yapılan gözlem ve ölçümlerde kontrol ve deney grupları arasında predentinin kalınlık ve boyanma özellikleri arasında fark gözlenmedi.

İnce yapı düzeyinde elektronmikrografların kontrol grubuyla karşılaştırılarak değerlendirilmesi sonucunda:

4 gün süreyle 2,5 mg/kg/gün EHDP uygulanan deney grubunda kontrol grubuna göre belirgin bir ince yapı farkı gözlenmedi. Odontoblastlar bilinen organel özelliklerini taşıyordu. Uzantılarının ve predentinin amorf ve lifsel görünümü değişmiyordu. Predentin-dentin sınırı kontrol grubundakiler gibi düzensizdi. Buralarda predentin içinde enine çizgilenmeleri fark edilebilen kollagen lifciklerin yapısı, yoğunluğu ve dentin kontrol grubunda olduğu gibiydi.

4 gün süreyle 5 mg/kg/gün EHDP uygulanan deney grubunda odontoblastlar daha hipertrofik, predentinin amorf tabakası daha kalın, lifsel tabaka düzensizdi. Kollagen lifcikler ise düzensiz, dağınık ve inceydi. Dentin kontrol grubunda olduğu gibi kompakt ve düzenliydi.

8 gün süreyle 5 mg/kg/gün EHDP uygulanan deney grubunda ise organik matris değişimi daha belirgindi. Odontoblastlar şişkindi. Predentindeki amorf alanlar daha genişti. Dentin düzensizdi ve gevşek yapısı içinde kollagen lifcikler oldukça belirgindi. Yer yer dentin oluşumu defektlerine rastlanıyordu.

Bulgular, EHDP'nin sert dokuların mineralizasyonu üzerine etkilerine ilişkin literatür bilgileriyle karşılaştırılarak değerlendirildi.



## KAYNAKLAR

- 1- Anderson, H.C.: Matrix vesicles of cartilage and bone. In: The Biochemistry and Physiology of Bone. Ed. by G.H. Bourne, 2. ed., vol.4, New York, Academic Press, 1976 (p.135).
- 2- Bassett, C.A.L., Donath, A., Macagno, F., Preisig, R. and Fleisch, H.: Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. Lancet 2:845, 1969.
- 3- Bernard, G.W.: Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel. J. Ultrastruct. Res. 41:1-17, 1972.
- 4- Bisaz, S., Felix, R., Hansen, N.B. and Fleisch, H.: Disaggregation of hydroxyapatite crystals. Biochim. Biophys. Acta 451:560-566, 1976.
- 5- Bisaz, S., Schenk, R., Kunin, A.S., Russell, R.G.G., Mühlbauer, R. and Fleisch, H.: The comparative effects of vitamin D deficiency and ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate administration on the histology and glycolysis of chick epiphyseal and articular cartilage. Calc. Tiss. Res. 19:139-152, 1975.
- 6- Bloom, W. and Fawcett, W.D.: The mechanism of calcification. In: A Textbook of Histology. 2. ed., W.B. Saunders Comp., Philadelphia, 1972 (p.269-272).

- 7- Bonucci, E.: The locus of initial calcification in cartilage and bone. Clin. Orthop. 78:108-139, 1971.
- 8- Boskey, A.L., Goldberg, M.R. and Posner, A.S.: Effect of diphosphonates on hydroxyapatite formation induced by calcium-phospholipid-phosphate complexes. Calc. Tiss. Intl. 27:83-88, 1979.
- 9- Bowness, J.M.: Present concepts of the role of ground substance in calcification. Clin. Orthop. 59:233, 1968.
- 10- Briner, W.W., Francis, M.D. and Widder, J.S.: The control of dental calculus in experimental animals. Int. Dent. J. 21:61-73, 1971.
- 11- Chapuy, M.C., Briançon, D., Vignon, E., Durhon, S. and Meunier, P.J.: The short-term effects of intravenous EHDP in Paget's disease of bone. Calc. Tiss. Intl., Suppl. to 34:S29, 1982.
- 12- Cram, R.L., Barmada, R., Geho, W.B., and Ray, R.D.: Diphosphate treatment of calcinosis universalis. N. Engl. J. Med. 285:1012-1013, 1972.
- 13- Doty, S.B., Jones, R. and Finerman, G.A.: Diphosphonate influence on bone cell structure and lysosomal activity. J. Bone Joint Surg. 54A:1128-1129, 1972.
- 14- Eisenmann, D.R. and Glick, P.L.: Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. J. Ultrastruct. Res. 41:18 - 28, 1972.
- 15- Evans, J.R., Robertson, W.G., Morgan, D.B. and Fleisch, H.: Effects of pyrophosphate and diphosphonates on the dissolution of hydroxyapatites using a flow system. Calc. Tiss. Intl. 31:153-159, 1980.

- 16- Felix,R., Russell,R.G.G. and Fleisch,H.: The effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 429:429 - 438, 1976.
- 17- Fleisch,H.: Diphosphonates: History and mechanisms of action. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.* 4-5:279-288, 1981.
- 18- Fleisch,H.: Bisphosphonates: Mechanism of action and clinical applications. In: *Bone and Mineral Research*. Ed. by William A.Peck. *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1983 (p. 319-357).
- 19- Fleisch,H. and Bisaz,S.: Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Amer. J. Physiol.* 203:671-675, 1962.
- 20- Fleisch,H. and Bisaz,S.: Mechanism of calcification: Inhibitory role of pyrophosphate. *Nature*, London 195: 911, 1962.
- 21- Fleisch,H. and Felix,R.: Diphosphonates. *Calc. Tiss. Intl.* 27:91-94, 1979.
- 22- Fleisch,H., Maerki,J. and Russell,R.G.G.: Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122:317-320, 1966.
- 23- Fleisch,H., Russel,R.G.G., Bisaz,S., Mühlbauer,R.C. and Williams,D.A.: The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Europ. J. Clin. Invest.* 1:12-18, 1970.

- 24- Fleisch,H., Russell,R.G.G. and Francis,M.D.: Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. Science 165:1262-1264, 1969.
- 25- Fleisch,H., Russell,R.G.G., Simpson,B. and Mühlbauer,R. C.: Prevention by a diphosphonate of immobilization "osteoporosis" in rats. Nature 223:211-212, 1969.
- 26- Fleisch,H., Straumann,F., Schenk,R., Bisaz,S. and Allgöver,M.: Effect of condensed phosphates on calcification of chick embryo femurs in tissue culture. Amer. J. Physiol. 211:821-825, 1966.
- 27- Francis,M.D.: The inhibition of calcium hydroxyapatite crystal growth by polyphosphonates and polyphosphates. Calc. Tiss. Res. 3:151-162, 1969.
- 28- Francis,M.D. and Briner,W.W.: The effect of phosphonates on dental enamel in vitro and calculus formation in vivo. Calc. Tiss. Res. 11:1-9, 1973.
- 29- Francis,M.D., Flora,L. and King,W.R.: The effects of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate on adjuvant - induced arthritis in rats. Calc. Tiss. Res. 9:109-121, 1972.
- 30- Francis,M.D., Russell,R.G.G. and Fleisch,H.: Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. Science 165: 1264-1266, 1969.
- 31- Francis,M.D., Slough,C.L., Briner,W.W. and Oertel,R.P.: An in vitro and in vivo investigation of mellitate and ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate in calcium phosphate systems. Calc. Tiss. Res. 23:53-60, 1977.

- 32- Fraser,D., Russell,R.G.G., Pohler,O., Robertson,W.G. and Fleisch,H.: The influence of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on the development of experimentally induced urinary stones in rats. Clin. Sci. 42:197 - 207, 1972.
- 33- Geusens,P., De Vos,P. and Dequeker,J.: 24-hour Technetium-99m-methylene diphosphonate-retention in metabolic bone disease, with special reference to symptomatic idiopathic postmenopausal osteoporosis. Calc. Tiss. Intl., Suppl. to 33:138, 1981.
- 34- Glimcher,M.J. and Krane,S.M.: The organization and structure of bone and the mechanism of calcification. In: Treatise on collagen. IIB: Biology of Collagen. Eds. by G.N.Ramachandran and B.S.Gould. London, Academic Press, 1968.
- 35- Guillard,D.F., Sallis,J.D. and Fleisch,H.: The effect of two diphosphonates on the handling of calcium by rat kidney mitochondria in vitro. Calc. Tiss. Res. 15:303 - 314, 1974.
- 36- Ham,A.W.: Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. J. Bone Joint Surg. 34-A:701, 1952.
- 37- Ham,A.W. and Cormack,D.: Histophysiology of cartilage, bone and joints. In: Histology, 8. ed., J.P. Lippincott Comp., Philadelphia, 1979 (p.396-401).
- 38- Hansen,N.B., Felix,R., Bisaz,S. and Fleisch,H.: Aggregation of hydroxyapatite crystals. Biochim. Biophys. Acta 451:549-559, 1976.

- 39- Jowsey, J. and Holley, K.E.: Influence of diphosphonates on progress of experimentally induced osteoporosis. *J. Lab. Clin. Med.* 82:567-575, 1973.
- 40- Jowsey, J., Holley, K.E. and Linman, J.W.: Effect of sodium etidronate in adult cats. *J. Lab. Clin. Med.* 76:126-133, 1970.
- 41- Jowsey, J., Riggs, B.L., Kelly, P.J., Hoffman, D.L. and Bordier, P.: The treatment of osteoporosis with disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate. *J. Lab. Clin. Med.* 78:574-584, 1971.
- 42- Jung, A., Bisaz, S. and Fleisch, H.: The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calc. Tiss. Res.* 11:269-280, 1973.
- 43- King, W.R., Francis, M.D. and Michael, W.R.: Effect of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate on bone formation. *Clin. Orthop.* 78:251-270, 1971.
- 44- Larsson, A.: The short-term effects of high doses of ethylene-1-hydroxy-1,1-diphosphonate upon early dentin formation. *Calc. Tiss. Res.* 16:109-127, 1974.
- 45- Larsson, A. and Bloom, G.D.: Studies on dentinogenesis in the rat. Fine structure of developing odontoblasts and predentin in relation to the mineralization process. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 139:227-246, 1973.
- 46- Larsson, A. and Larsson, S.E.: Studies on dentinogenesis in the rat. Ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) inhibits crystal growth in predentin calcification. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* 360:315-325, 1973.


- 47- Lehninger, L.A.: In: Biochimie, 2.ed. Paris, Flammarion, 1977 (p.527-528).
- 48- Mazess, R.B., Bendsen, H. and Davros, W.:  $^{99m}\text{Tc}$ -diphosphate retention by whole-body profile scanning. Calc. Tiss. Intl., Suppl. to 34:S34, 1982.
- 49- Meyer, J.L., Lee, K.E. and Bergert, J.H.: The inhibition of calcium oxalate crystal growth by multidentate organic phosphonates. Effect of pH. Calc. Tiss. Res. 28:83-86, 1977.
- 50- Meyer, J.L. and Nancollas, G.H.: The influence of multidentate organic phosphonates on the crystal growth of hydroxyapatite. Calc. Tiss. Res. 13:295-303, 1973.
- 51- Michael, W.R., King, W.R. and Wakim, J.M.: Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphate (disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and monkey. Toxicol, Appl. Pharmacol. 21:503-515, 1972.
- 52- Miller, S.C. and Jee, W.S.S.: Ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphate (EHDP) effects on growth and modeling of the rat tibia. Calc. Tiss. Res. 18:215-231, 1975.
- 53- Miller, S.C., Jee, W.S.S., Kimmel, D.B. and Woodbury, L.: Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphate (EHDP) effects on incorporation and accumulation of osteoclast nuclei. Calc. Tiss. Res. 22:243-252, 1977.
- 54- Minkin, C., Rabadjija, L. and Goldhaber, P.: Bone remodeling in vitro: The effects of two diphosphonates on osteoid synthesis and bone resorption in mouse calvaria. Calc. Tiss. Res. 14:164-168, 1974.

- 55- Morgan,D.B., Gasser,A., Largiader,U., Jung,A. and Fleisch, H.: Effect of a diphosphonate on calcium metabolism in calcium-deprived rats. *Amer. J. Physiol.* 228:1750-1756, 1975.
- 56- Mühlemann,H.R., Bowles,D., Schait,A. and Bernimoulin,J. P.: Effect of diphosphonate on human supragingival calculus. *Helv. Odont. Acta* 14:31-33, 1970.
- 57- Plasmans,C.M.T., Jap.P.H.K., Kuijpers,W. and Sloof,T.J. J.H.: Influence of a diphosphonate on the cellular aspect of young bone tissue. *Calc. Tiss. Intl.* 32:247-256, 1980.
- 58- Regolati,B., and Mühlemann,H.R.: Effects of diphosphonate and fluoride on caries, fluorine content and dissolution of rat molars. *Helv. Odont. Acta* 14:37-43, 1970.
- 59- Reynolds,J.J., Murphy,H., Mühlbauer,R.C., Morgan,D.B. and Fleisch,H.: Inhibition by diphosphonates on bone resorption in mice and comparison with grey-lethal osteopetrosis. *Calc. Tiss. Res.* 12:59-71, 1973.
- 60- Robertson,W.G., Morgan,D.B., Fleisch,H. and Francis,M.D.: The effects of diphosphonates on the exchangeable and non-exchangeable calcium and phosphate of hydroxyapatite. *Biochim. Biophys. Acta* 261:517-525, 1972.
- 61- Rosenblum,I.Y.: The effects of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) on bone and serum chemistry in rabbits. *Calc. Tiss. Res.* 16:145-152, 1974.
- 62- Rosenblum,I.Y.: The effects of disodium ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) on mineral and organic components of rat bone. *Calc. Tiss. Res.* 16:239-250, 1974.

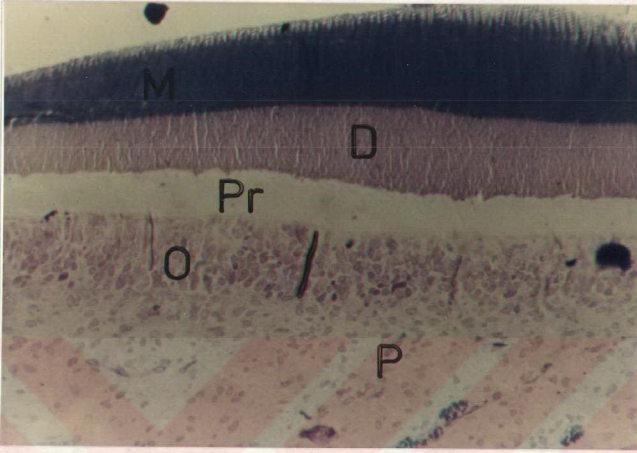


- 63- Rowe, D.J. and Hausmann, E.: The alteration of osteoclast morphology by diphosphonates in bone organ culture. *Calc. Tiss. Res.* 20:53-60, 1976.
- 64- Russell, R.G.G., Kislign, A.M., Casey, P.A., Fleisch, H., Thornton, J., Schenk, R. and Williams, D.A.: Effect of diphosphonates and calcitonin on the chemistry and quantitative histology of rat bone. *Calc. Tiss. Res.* 11:179 - 195, 1973.
- 65- Russell, R.G.G., Mühlbauer, R.C., Bisaz, S., Williams, D.A. and Fleisch, H.: The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calc. Tiss. Res.* 6:183-196, 1970.
- 66- Russell, R.G.G. and Smith, R.: Diphosphonates. Experimental and clinical aspects. *J. Bone Joint Surg.* B55:66-86, 1973.
- 67- Russell, R.G.G., Smith, R., Preston, C., Walton, R.J. and Woods, C.G.: Diphosphonates in Paget's disease. *Lancet* 1: 894-898, 1974.
- 68- Schenk, R., Merz, W.A., Mühlbauer, R., Russell, R.G.G. and Fleisch, H.: Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate and dichloromethylene diphosphonate on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calc. Tiss. Res.* 11: 196-214, 1973.
- 69- Schour, I. and Massler, M.: The Teeth. In: *The Rat in Laboratory Investigation*. Eds. by E.J. Farris and J.Q. Griffith, 2. ed., J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1949 (p.156-157).

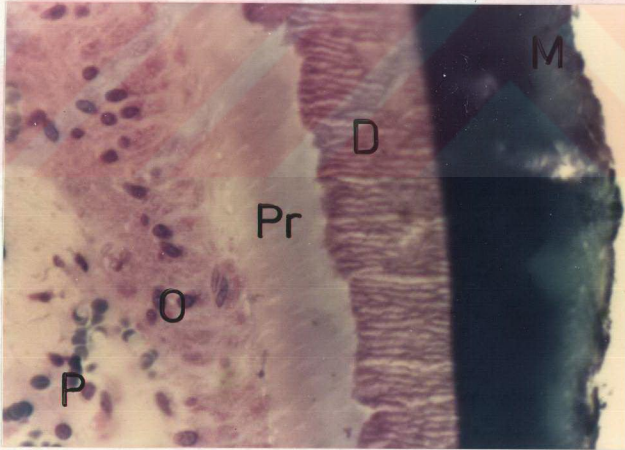
- 70- Strates, B.S., Firschein, H.E. and Urist, M.R.: Alkaline phosphatase and failure of calcification under the influence of a diphosphonate. *Biochim. Biophys. Acta* 244: 121-124, 1971.
- 71- Urist, M.R.: Biochemistry of calcification. In: *The Biochemistry and Physiology of Bone*. Ed. by G.H. Bourne, 2. ed., vol. 4, New York, Academic Press, 1976 (p. 2).
- 72- Weinstein, R.S.: Focal mineralization defect during disodium etidronate treatment of calcinosis. *Calc. Tiss. Intl.* 34:224-228, 1982.
- 73- Wöltgens, J.H.M., Bonting, S.L., and Bijvoet, O.L.M.: Inorganic pyrophosphatase in mineralizing hamster molars. III. Influence of diphosphonates. *Calc. Tiss. Res.* 13: 151-157, 1973.



RESİMLER VE AÇIKLAMALARI



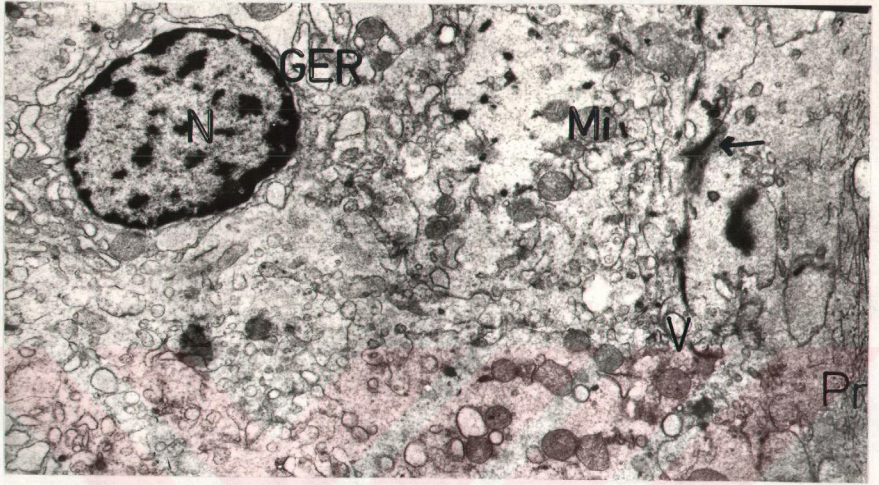
Resim 2 (a)



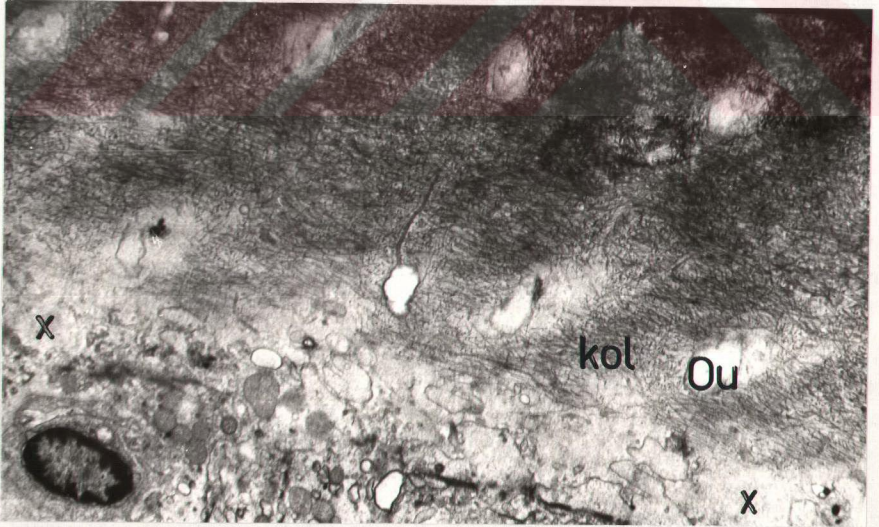
Resim 2 (b)

RESİM 2 a-b: Westopal kalın kesit. Mine (M); Dentin (D); Pre-dentin (Pr); Odontoblastlar (O) ve Pulpa (P). Toluidin mavisi. Büyütme: X 120 (a) ve 350 (b).



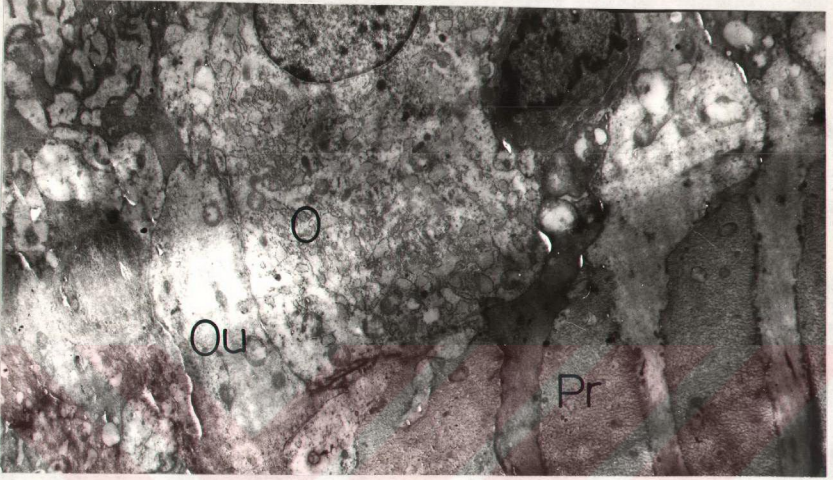


esim 3 a- Kontrol grubundan alınmış bu elektron mikrografta odontoblast hücre tabakası ve predentinin gözlenmektedir. Nukleus (N); Mitokondrion (Mi); Granulalı endoplazma retikulumu (GER); Odontoblastlar arası tutucu bağlar (+); Veziküller (V) ve Predentin (Pr). X 15.000.

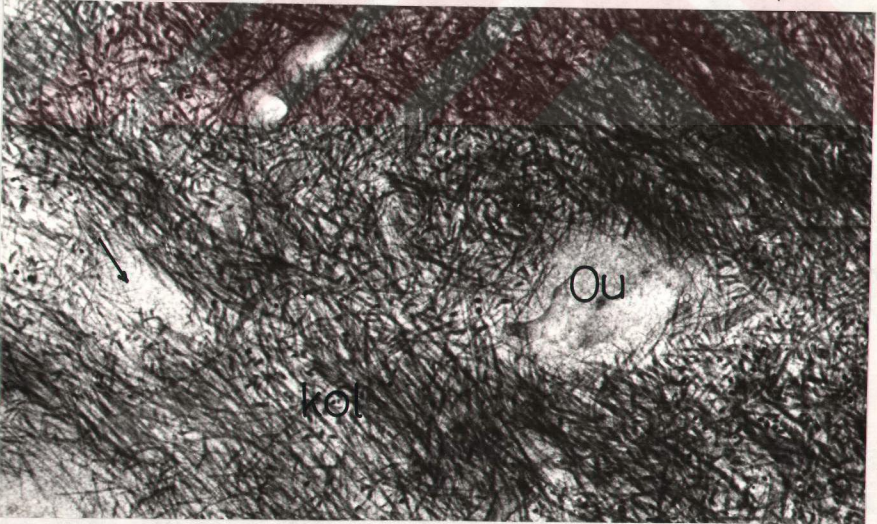


esim 3 b- Kontrol grubunda predentinin görünümü. Amorf (x), lifsel tabaka (kol) ve enlemesine kesilmiş odontoblast uzantıları (Ou). X 10.000.



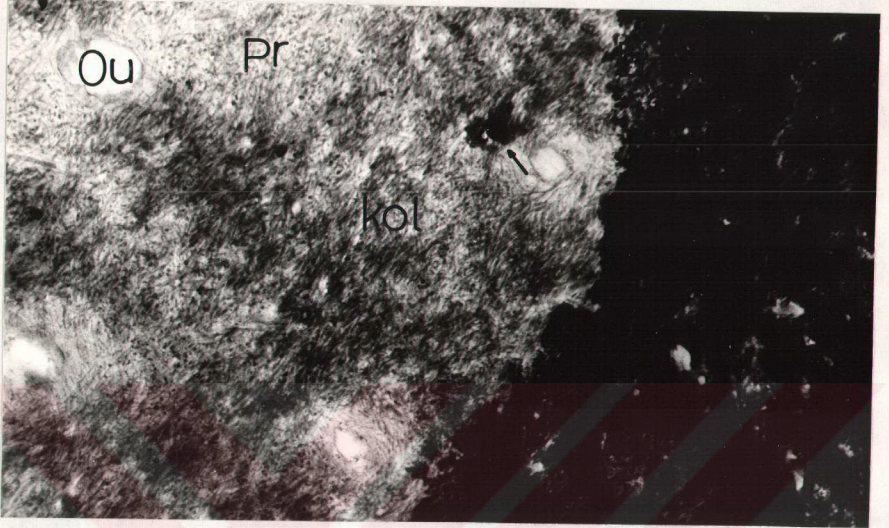


ESİM 4- Kontrol grubu. Odontoblast-predentin sınırı. Odontoblast uzantılarının predentin içinde uzunlamasına görünümü. Odontoblast (O); Predentin (Pr); Odontoblast uzantıları (Ou). X 10.000.

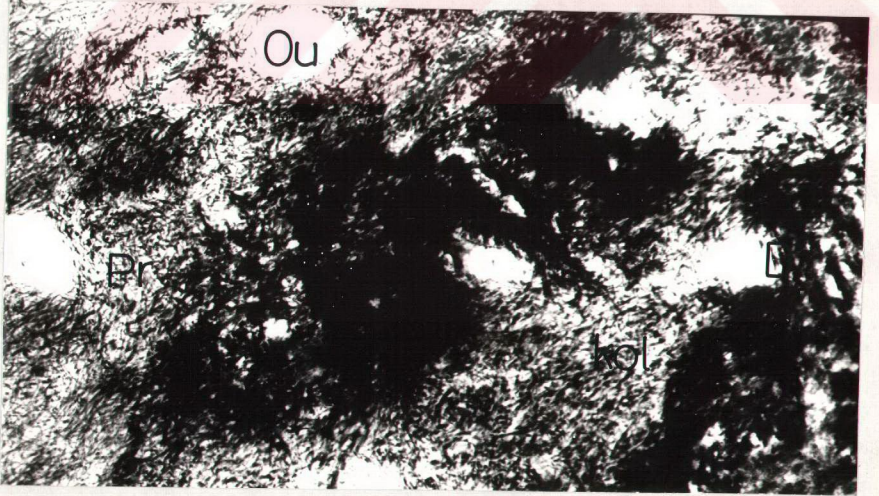


ESİM 5- Kontrol grubu. Predentinin lifsel görünümü. Kollagen lifler (kol); Esas madde (+); Odontoblast uzantısı (Ou). X 25.000.



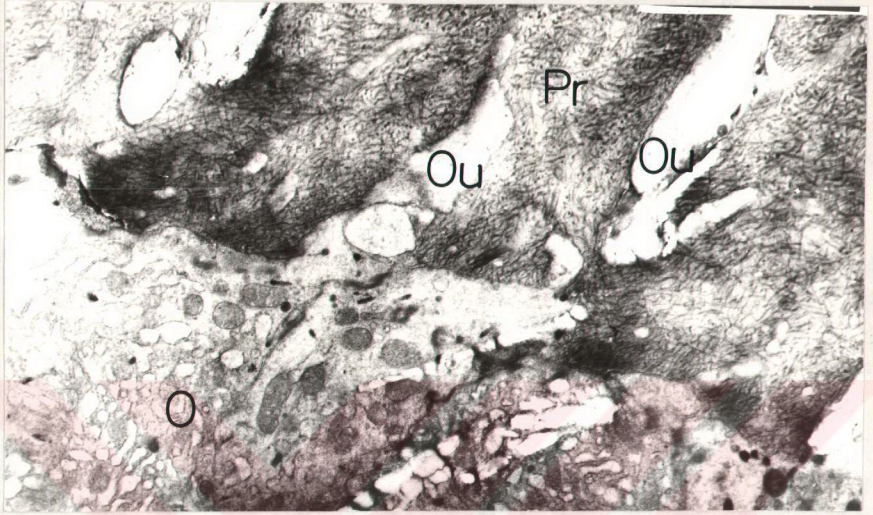


ESİM 6- Kontrol grubu. Predentin-dentin sınırı. Predentin (Pr); Kollagen lifler (kol); Odontoblast uzantıları (Ou); Predentin içinde mineral doku odakları (+); Dentin (D). X 15.000.

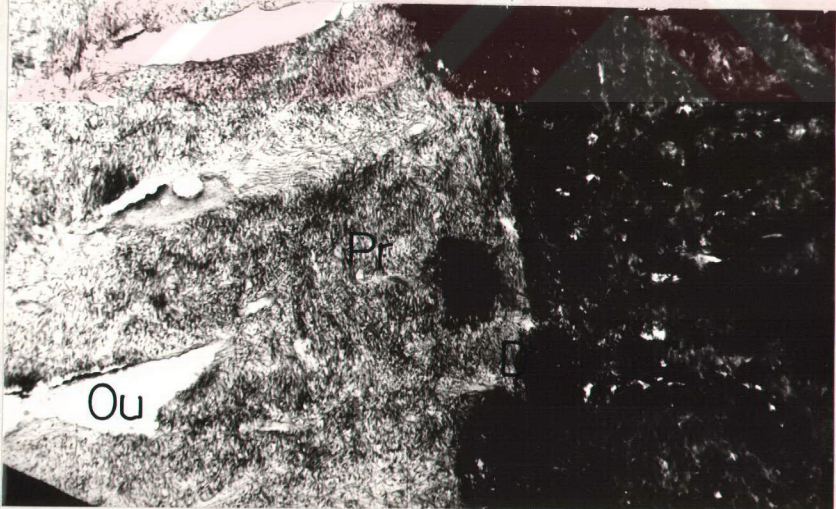


SİM 7- Kontrol grubu. Predentin içinde mineral doku oluşumu alanları. Predentin (Pr); Kollagen lifler (kol); Odontoblast uzantıları (Ou); Dentin (D). X 15.000.



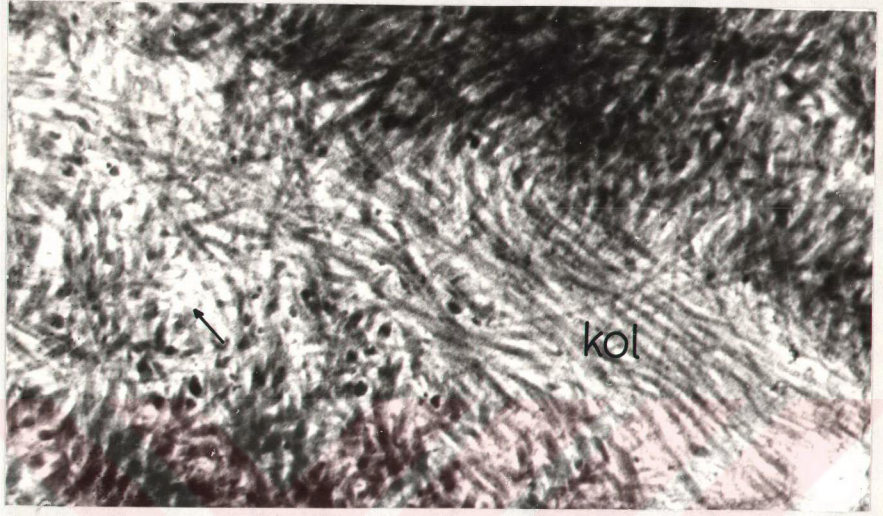


ESİM 8- Deneş grubu. 2,5 mg/kg/gün EHDP. Deneş süresi 4 gün. Odontoblast-predentin sınırı. Her iki yapı da kontrol grubuyla aynı morfolojik özellikleri taşımaktadır. Odontoblast (O); Odontoblast uzantıları (Ou); Predentin (Pr). X 15.000.

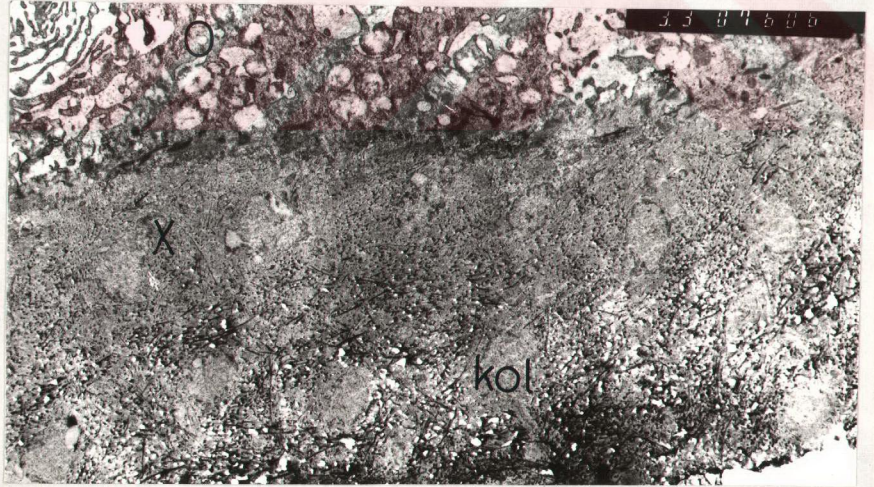


ESİM 9- Aynı deneş grubundan alınmış bu elektron mikrografta, predentin-dentin bölgesinin kontrol grubuna benzer görünümde olduğu dikkati çekmektedir. Predentin (Pr); Odontoblast uzantıları (Ou); Dentin (D). X 10.000.

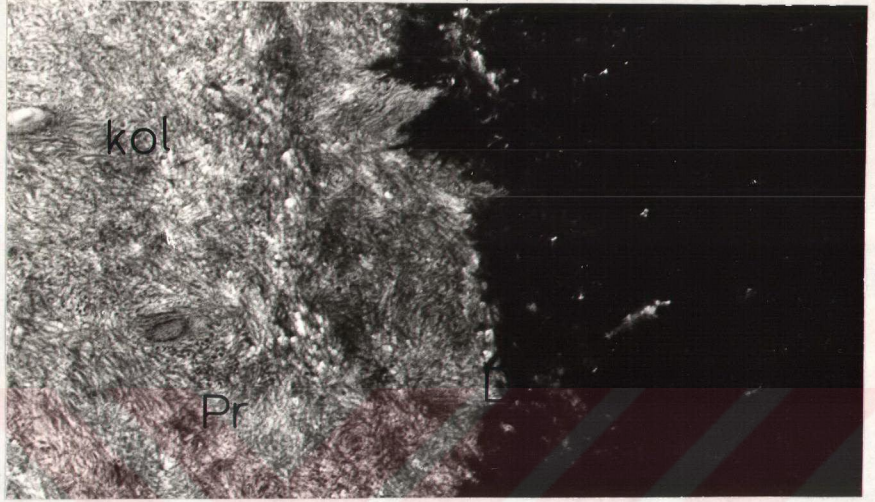




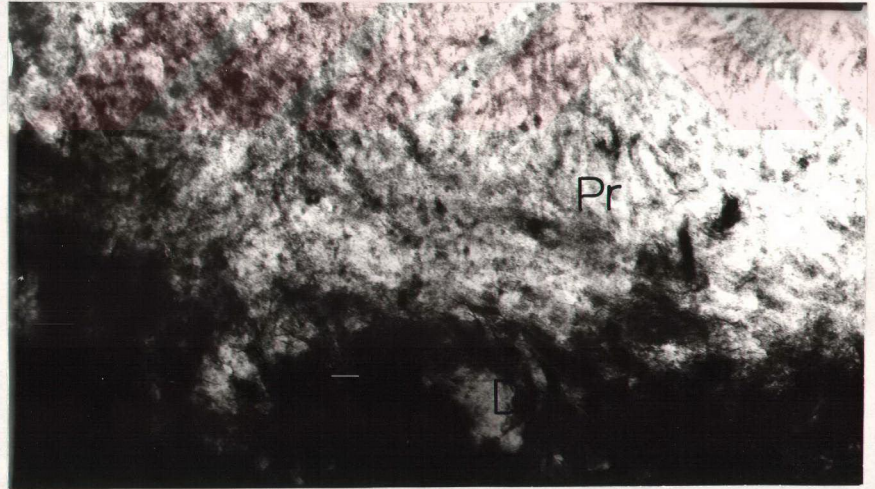
ESİM 10- 4 gün süreyle günde 2,5 mg/kg/EHDP verilmiş deney hayvanlarında predentinde kontrol grubuna benzer kollagen yapısını gösteren elektron mikrograf. Kollagen lifler (kol); Esas madde (→), X 50.000.



ESİM 11- 4 gün süreyle 5 mg/kg/gün EHDP verilen deney grubu. Odontoblast-Predentin sınırı. Odontoblastlar (O) da hipertrofi, predentinin amorf tabakasının (X) kalınlaşmış ve lifsel alanların (kol) seyrekleşmiş olduğu dikati çekmektedir. X 10.000.

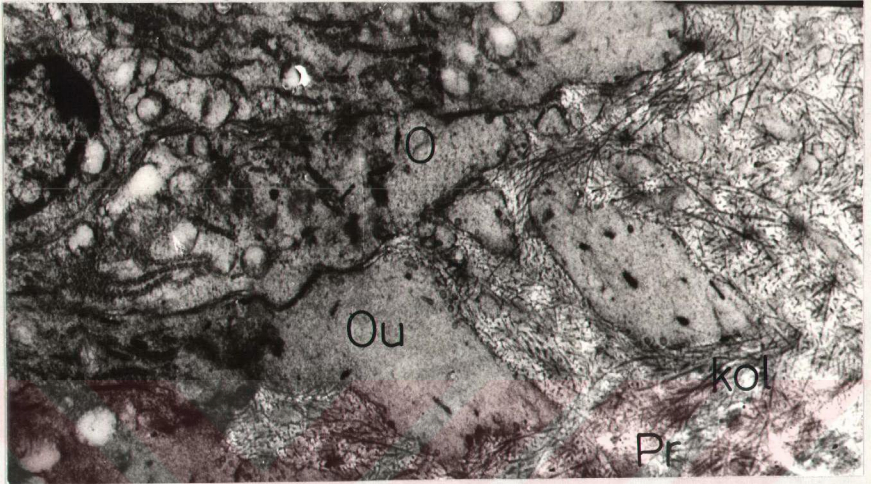


RESİM 12- Aynı deney grubundan alınmış predentin ve dentini birlikte gösteren bu elektron mikrografta predentin içindeki kollagen lifciklerde (kol) yapısal değişiklikler gözlenmektedir. Predentin (Pr); Dentin (D). X 15.000.

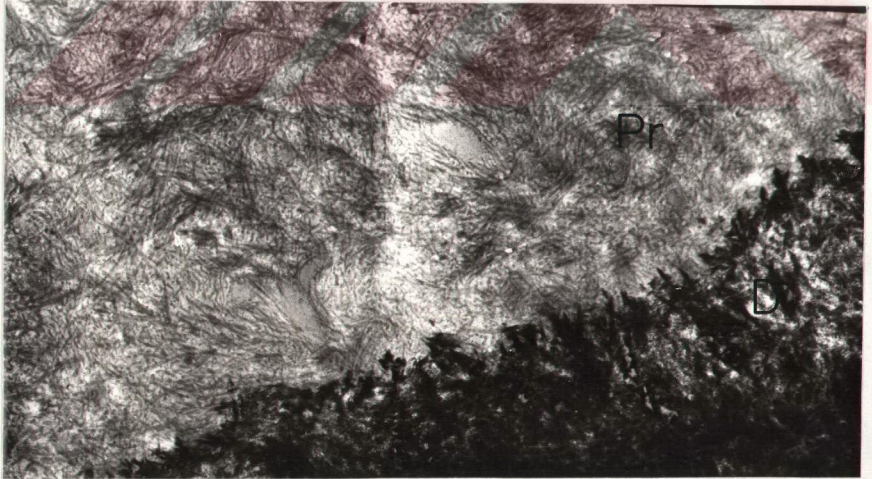


RESİM 13- 5 mg/kg/gün EHDP. Deney süresi 4 gün. Predentin-dentin sınırında düzensiz mineral doku alanları. Predentin (Pr); Dentin (D). X 25.000.

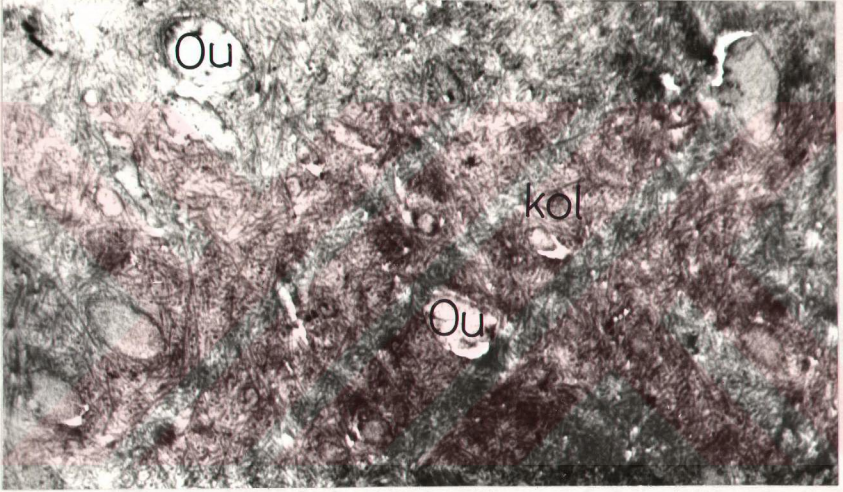




ESİM 14- 8 gün süreyle 5 mg/kg/gün EHDP verilen deney grubu. Odontoblast-predentin tabakasının bu deney grubunda daha belirgin biçimde etkilendiği görülmektedir. Odontoblast (O); Predentin (Pr); Kollagen lifcikler (kol); Odontoblast uzantıları (Ou). X 15.000.



ESİM 15- Aynı deney grubundan alınmış bu elektron mikrografta dentinin gevşek ve düzensiz yapısı görülmektedir. Predentin (Pr); Dentin (D). X 15.000.



ESİM 16- Aynı deney grubundan alınmış ve bozuk dentin oluşumu alanlarını gösteren elektronmikrograf. Kollagen lifcikler (kol); Odontoblast uzantıları (Ou). X 15.000.



## Ö Z G E Ç M İ Ş İ M

13.6.1955 yılında İzmit'te doğdum. İlk, Orta ve Lise öğrenimimi İzmit'te yaptım.

1971 yılında İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'ne girdim, 1976 yılında mezun oldum. Aynı yıl bu fakültenin Patoloji Biriminde volonter asistan olarak çalışmaya başladım. 16 ay çalıştıktan sonra 1978 yılında Histoloji ve Embriyoloji Birimine girdim. Halen bu birimde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

Evliyim, eşim Kâmil Gürsu, Patoloji Biriminde Doktor Asistan olarak görev yapmaktadır. Gediz isimli bir oğlumuz var.