

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**KİTOSAN TAŞIYICI İLE UYGULANAN SİMVASTATİN
VE KEMİK MORFOJENİK PROTEİN-2 (BMP-2)'NİN
KEMİK REJENERASYONUNA ETKİSİNİN HİSTOLOJİK
VE HİSTOMORFOMETRİK OLARAK İNCELENMESİ**

MAZLUME CEREN SEZEN

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SELİM ERSANLI

ORAL İMPLANTOLOJİ ANABİLİM DALI
ORAL İMPLANTOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Oral İmplantoloji Anabilim Dalı Doktora Programında Mazlume Ceren Sezen tarafından hazırlanan Kitosan taşıyıcı ile uygulanan Simvastatin ve Kemik Morfojenik Protein-2'nin kemik rejenerasyonuna etkisinin histolojik ve histomorfometrik olarak incelenmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

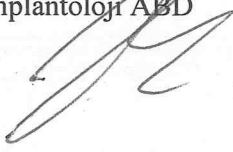
15 / 04 / 2014

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

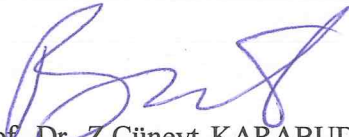
1.Doç.Dr.Selim ERSANLI (Tez Danışmanı) İstanbul Üniv., Diş Hekimliği Fak., Oral İmplantoloji ABD



2.Prof.Dr.Serdar YALÇIN (Tez İzleme Komitesi), İstanbul Üniv., Diş Hekimliği Fak., Oral İmplantoloji ABD



3. Prof. Dr. Buket AYBAR (Tez İzleme Komitesi), İstanbul Üniv., Diş Hekimliği Fak., Ağız Dis Çene Hastalıkları ve Cerrahisi ABD.



4. Prof. Dr. Z.Cüneyt KARABUDA İstanbul Üniv., Diş Hekimliği Fak., Oral İmplantoloji ABD



5.Doç.Dr.Erdal Cevher (İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Farmasötik 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.

Mazlume Ceren Sezen



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleri ile beni her zaman destekleyen, bana güvenen, bilimsel ve insani yönlerini hayat boyu örnek alacağım değerli danışman hocam Doç. Dr. Selim Ersanlı'ya,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Tayfun Özdemir, Prof. Dr. Serdar Yalçın, Prof. Dr. Z. Cüneyt Karabuda, Doç. Dr. Volkan Arısan'a,

Çalışmamın deneysel bölümünün yapılmasında büyük emeği geçen İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalından Doç. Dr. Erdal Cevher'e

Tezimin histolojik inceleme aşamasındaki yardımlarından dolayı İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Patoloji Bölümünden Doç. Dr. Vakur Olgaç'a

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, desteğini esirgemeyen değerli meslektaşım Dr. B. Alper Gültekin'e

Aynı çalışma ortamını paylaşmaktan keyif aldığım, değerli arkadaşlarım, Oral İmplantoloji Anabilim Dalı araştırma görevlileri, asistanları ve tüm personeline, Tez projemi destekleyerek bu tezin gerçekleşmesine mali destek sağlayan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

Beni yetiştiren ve bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman yanımda olan kıymetli Annem ve Babam'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:19647

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik dokusu.....	4
2.1.1. Kemik dokusunun kimyasal yapısı.....	4
2.1.1.1. İnorganik matriks.....	4
2.1.1.2. Organik matriks.....	5
2.1.2. Kemik hücreleri.....	5
2.1.2.1. Osteoblast.....	5
2.1.2.2. Osteosit.....	7
2.1.2.3. Kemik döşeme hücreleri.....	8
2.1.2.4. Osteoklast.....	8
2.1.3. Kemik dokusu tipleri.....	10
2.1.3.1. Primer kemik dokusu.....	10
2.1.3.2. Sekonder kemik dokusu.....	10
2.1.4. Kemik damar yapısı.....	11
2.1.5. Kemikleşme tipleri.....	12
2.1.6. Kemik büyüme ve gelişiminin evreleri.....	14
2.1.6.1. Şekillendirme.....	14
2.1.6.2. Modelling.....	14
2.1.7. Kemik dokusu iyileşmesi.....	15
2.1.7.1. Yangı (Enflamasyon) Fazı.....	16

2.1.7.2. Onarım (Reperasyon) Fazı	17
2.1.7.3. Yeniden Şekillenme (Remodelasyon) Fazı	18
2.1.8. Kemik Greftleri	19
2.2. Kemik morfojenik proteinler	20
2.3. Statinler	28
2.3.1. Statinlerin kimyası ve fonksiyonel özellikleri	29
2.3.2. Statinlerin etki mekanizması ve farmakokinetik özellikleri	30
2.3.3. Statinlerin antiinflamatuvar etkileri	31
2.3.4. Statinlerin iskeletsel etkileri ile ilgili temel oluşturan çalışmalar	32
2.3.5. Simvastatin	35
2.4. Kitosan	38
2.5. Histolojik değerlendirme kriterleri	41
2.5.1. Enflamasyon:	41
2.5.2. Fibrozis	41
2.5.3. Yabancı cisim reaksiyonu	42
2.5.4. Nekroz	43
2.5.5. Kalan greft	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. GEREÇ	44
3.2. YÖNTEM	45
3.2.1. Deney Hayvanları ve grupları	45
3.2.2. Boş kitosan partiküllerinin hazırlanması	46
3.2.3. Simvastatin içeren kitosan nano partiküllerinin hazırlanması	47
3.2.4. BMP-2 içeren kitosan partiküllerinin hazırlanması	47
3.2.5. Cerrahi Uygulamalar	48
3.2.6. Histolojik ve Histomorfometrik Analiz	49
3.2.7. İstatistiksel İnceleme	52
4. BULGULAR	54
4.1. 14.gün bulguları	54
4.2. 28.gün bulguları	57
4.3. Histolojik kesit örnekleri	71
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇLAR	101

KAYNAKLAR	103
ETİK KURUL KARARI	123
ÖZGEÇMİŞ	124

TABLOLAR LİSTESİ

1)	Tablo 3-1: Deney hayvanlarına verilen katı yemin içeriği.....	45
2)	Tablo 4-1: Grupların 14.gün bulgularının değerlendirilmesi.....	54
3)	Tablo 4-2: Grupların 28.gün bulgularının değerlendirilmesi.....	57
4)	Tablo 4-3: Grupların ayrı ayrı 14. ve 28. gündeki enflamasyon düzeylerinin değerlendirilmesi.....	62
5)	Tablo 4-4: Grupların ayrı ayrı 14. ve 28. gündeki nekroz bulgularının değerlendirilmesi.....	63
6)	Tablo 4-5: Gruplarda ayrı ayrı 14. gün ve 28. gündeki fibrozis düzeylerinin değerlendirilmesi.....	64
7)	Tablo 4-6: Gruplarda ayrı ayrı 14.gün ve 28.günde yabancı cisim değerlendirilmesi.....	65
8)	Tablo 4-7: Grupların yeni kemik yüzdesi ortalamalarının değerlendirilmesi.....	66
9)	Tablo 4-7a: Grupların Post hoc değerlendirilmesi test sonuçları.....	66
10)	Tablo 4-8: Gruplarda ayrı ayrı 14. gün ve 28. günlerdeki yeni kemik yüzdesi ortalamalarının değerlendirilmesi.....	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

1) Şekil 2-1: BMP'lerin yapısı (A) BMP'lerin şematik yapısı (B) BMP-2'nin ve reseptörü BRIA'nın üç boyutlu yapısı.....	24
2) Şekil 2-2: BMP sinyal iletimi.....	26
3) Şekil 2-3: Simvastatinin kimyasal yapısı.....	32
4) Şekil 3-1: Deri ve periostu kaldırılmış sıçan tibiası.....	50
5) Şekil 3-2: Sıçan tibiasında oluşturulmuş defektler.....	50
6) Şekil 3-3: Graft materyallerinin defektlere yerleştirilmesi.....	51
7) Şekil 3-4: Ameliyat bölgesinin dikilmesi.....	51
8) Şekil 3-5: Sakrifikasyondan sonra defektlerin görüntüsü.....	52
9) Şekil 3-6: Sakrifikasyondan sonra defektlerin görüntüsü.....	52
10) Şekil 4-1: 14.gün enflamasyon bulguları.....	55
11) Şekil 4-2: 14.gün nekroz bulguları.....	55
12) Şekil 4-3: 14.gün fibrozis bulguları.....	56
13) Şekil 4-4: 14.gün yabancı cisim bulguları.....	56
14) Şekil 4-5: 14.gün kalan greft bulguları.....	57
15) Şekil 4-6: 28.gün enflamasyon bulguları.....	58
16) Şekil 4-7: 28.gün nekroz bulguları.....	59
17) Şekil 4-8: 28.gün fibrozis bulguları.....	59
18) Şekil 4-9: 28.gün yabancı cisim bulguları.....	60
19) Şekil 4-10: 28.gün kalan greft bulguları.....	61
20) Şekil 4-11: Gruplar arasında 14.gündeki yeni kemik yüzde dağılımı.....	67
21) Şekil 4-12: Gruplar arasında 28.gündeki yeni kemik yüzde dağılımı.....	68
22) Şekil 4-13: 14. ve 28. gündeki grupların yeni kemik yüzde dağılımı.....	69
23) Şekil 4-14: 14. günde defekt bölgesinde aktif fibröz doku içinde greft artıkları ve altında yeni kemik trabekülleri, BMP-2/kitosan taşıyıcı grubu (H&E x100)...	71
24) Şekil 4-15: Defekt bölgesinde geniş alanlarda rezidüel greft materyali ve çevresinde ince band biçiminde yeni kemik trabekülleri, Kitosan taşıyıcı grubu (H&E x40).....	71

- 25) Şekil 4-16: 14. günde defekt bölgesinde kırık uçlarından ilerleyen yeni kemik trabekülleri ve ortada aktif fibröz doku, Simvastatin/kitosan taşıyıcı grubu (H&E x100).....72
- 26) Şekil 4-17: 14. günde defekt bölgesinde fibröz doku içinde ince, yeni kemik trabekülleri, Kontrol grubu (H&E x100).....72
- 27) Şekil 4-18: 28. günde defekt bölgesinde defekti dolduran yeni kemik trabekülleri ve ortada greft artıkları, BMP-2/Kitosan taşıyıcı grubu (H&E x100).....73
- 28) Şekil 4-19: 28. günde defekt bölgesinde köprü oluşturan yeni kemik trabekülleri çevresinde, yoğun iltihapsal infiltrasyon içeren fibröz bağ dokusu içinde rezidüel greft materyali, kitosan taşıyıcı grubu (H&E x100).....73
- 29) Şekil 4-20: 28. günde defekt bölgesini kapatan yeni kemik trabekülleri, arada kemik iliği, Simvastatin/Kitosan taşıyıcı grubu (H&E x100).....74
- 30) Şekil 4-21: 28. günde defekt bölgesinde defekt bölgesini kapatan ince, yer yer lameller görünümü almış yeni kemik dokusu, Kontrol grubu (H&E x100)...74

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- HMG-CoA:** Hidroksimetilglutaril koenzim A
- RhBMP-2:** Rekombinant İnsan Kemik Morfogenetik Protein-2
- TGF β :** Dönüştürücü Büyüme Faktörü β
- BMP:** Kemik Morfogenetik Protein
- MMP:** Matriks Metalloproteinaz
- VEGF :** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
- FGF :** Fibroblast Büyüme Faktörü
- PDGF:** Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
- EGF:** Epidermal Büyüme Faktörü
- ATPaz:** Adenozin trifosfataz
- PTH:** Paratiroid Hormonu
- PGE2:** Prostoglandin E 2
- PMN:** Polimorfonükleer lökosit
- OP-1:** Osteogenic protein-1
- OP-2:** Osteogenic protein-2
- BMPR-II:** Kemik Morfogenetik Protein reseptör tip II
- BMPR-IA:** Kemik Morfogenetik Protein reseptör tip I A
- BMPR-IB:** Kemik Morfogenetik Protein reseptör tip I B
- ActR-II:** Aktivin tip II reseptörü
- ActR-IIB:** Aktivin tip II B reseptörü
- ALK-3:** Aktivin reseptörü benzeri kinaz -3
- ALK-6:** Aktivin reseptörü benzeri kinaz -6
- ACVRI/ALK-2:** Aktivin reseptörü benzeri kinaz -2
- MAP:** Mitogen-activated protein
- ATF-2:** Aktivasyon transkripsiyon faktör-2
- Erk MAP:** Extracellular signal regulated MAP
- EGF:** Epidermal büyüme faktörü
- AP-1:** Aktivating protein tip-1

- LDL:** Low density lipoprotein (kötü kolesterol)
VLDL: Very Low Density Lipoprotein
HDL: High Density Lipoprotein (iyi kolesterol)
FDA: Food and Drug Administration
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid phosphate
MAPK: Mitojen-Aktiveli Protein Kinaz
NO: Nitrik oksit
CRP: C-Reaktif Protein
MMP: matris metalloproteinaz
PLLA: Polilaktitin
OVX: Overektomize
HAP : Hydroxyapatite (Hidroksiapatit)
TCP : Trikasliyum fosfat
AHP: Amonyum hidrojen fosfat
PLAGA: Polilaktik asit glikolik asit
PDLLA: Poly (D,L-lactide)
PEG: Polietilen glikol
MSC: Mezenkimal kök hücre
¹²⁵I: Iodine 125
ACS: Absorbable kollajen sponge
ALN: Alendronate
BIC: Kemik implant kontağı
BA: Kemik alanı
BD: Kemik yoğunluğu

ÖZET

Sezen, M.C. (2014). Kitosan taşıyıcı ile uygulanan Simvastatin ve Kemik Morfojenik Protein-2'nin kemik rejenerasyonuna etkisinin histolojik ve histomorfometrik olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Oral İmplantoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kemik morfojenik proteinler (BMP) osteojenik farklılaşma için önemli bir regülatördür. Büyüme faktörlerinin klinik olarak uygulanması için lokal, tanımlanmış ve kontrollü kemik formasyonu sağlayacak uygun bir taşıyıcı sistem gerekmektedir. Bu teori aynı zamanda çalışmamızda kullanılacak olan lokal simvastatin uygulamaları için de gereklidir. Statinlerin, osteoklastların aktivasyonunu inhibe ederek ve kemik morfojenetik protein-2 (BMP-2) geninin açığa çıkmasını sağlayarak kemik oluşumunu artırdığı birçok çalışmada ileri sürülmektedir. Bu bilgilerin ışığında çalışmamızın amacı, sıçanlarda oluşturulan deneysel kemik defektlerine, yavaş salınan biyolojik olarak eriyebilen kitosan taşıyıcı materyal kullanılarak simvastatin veya rhBMP-2 implantasyonundan sonra histolojik ve histomorfometrik yöntemlerle kemik oluşumunu değerlendirmek ve simvastatinin ve rhBMP-2'nin bu kemik defektlerinin tedavisindeki rolünü incelemektir. 20 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan (s:20; yaş:4 ay; kilo:300+/-20) 3 deney ve 1 kontrol grubuna ayrılmıştır. Tibia kemiklerinde toplam 80 adet defect açılmıştır. Deney gruplarında, ilk gruba 0.5 mg simvastatin içeren kitosan nano partikül taşıyıcı, ikinci gruba 1.5 µg rhBMP-2 içeren kitosan nano partikül taşıyıcı, üçüncü gruba yalnız kitosan nano partikül taşıyıcı yerleştirilmiştir. Kontrol grubu boş bırakılmıştır. Deney hayvanları ikinci ve dördüncü haftalarda sakrifiye edilmiştir. Deney hayvanlarından alınan örnekler histolojik ve histomorfometrik incelemeye alınmıştır.

Histolojik değerlendirme sonucunda tüm gruplarda yeni kemik oluşumu görülmüştür. 4 hafta sonunda simvastatin içeren nano partikül şeklinde kitosan taşıyıcı grubunda en fazla kemik oluşum yüzdesi görülmüştür.

Bu çalışma, simvastatin ve rhBMP-2 içeren nano partikül kitosan taşıyıcı kemik greft materyali olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Simvastatin, kitosan, rhBMP-2, kemik indüksiyonu, kemik grefleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19647

ABSTRACT

Sezen, M.C. (2014). Histologic and histomorphometric evaluation of bone regeneration capacity of simvastatin or rhBMP-2 using chitosan carrier. İstanbul University, Institute of Health Science, Oral Implantology Department. Doctoral thesis. İstanbul.

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) is a molecule that powerfully induces osteogenic differentiation. However to optimize delivery at the bone repair site, BMP-2 requires a local, controlled suitable carrier which is not obstruct bone formation. The formation of new bone by local use of statins is also depends on the delivery system used. A lot of researches reported that Statins can inhibit osteoclast activation and increase bone formation by providing BMP-2 secretion. Statins are usually used systemically so there is a few study about local use of statins. Chitosan which is a natural, biodegradable, less toxics polymer used in this study as a carrier. According to this informations, the aim of this study is to evaluate the bone regeneration of local application of simvastatin and rhBMP-2 carried with biodegradable and slow releasing chitosan carrier at the treatment of alveolar bone defects in rat tibia by using histologic, histomorphometric techniques and to improve the materials using in implantation and to improve the success of surgical and dental implant operations. Twenty adult male Wistar albino rats (n:20; age:4months; weight:300+/-20) were divided into 3 experimental groups and 1 control group. A total of 80 bone defects, 4 per rat, were created in the tibial bone. In the experimental groups, first group was implanted with 0.5 mg simvastatin with chitosan carrier, second group was implanted with 1.5 µg rhBMP-2 with chitosan, and in the third group only the chitosan carrier was implanted. No material was implanted in the control group. Animals were killed at second and fourth weeks postoperatively and the specimens were processed for histologic and histomorphometric assessments.

According to the histological evaluation new bone formation was seen in all experimental groups. The bone regeneration of the simvastatin with chitosan carrier was, however, greater than the other test groups at the end of four week.

The present study provides the evidence that simvastatin and rhBMP-2 chitosan grafts can be used as a material for bone grafts in vivo.

Key Words: Simvastatin, chitosan, rhBMP-2, bone induction, bone grafts

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No:19647

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oral implantoloji ve maksillofasial cerrahide çeşitli nedenlerle kaybedilen dişlerin yerine konması ile ideal fonksiyon ve estetiğin sağlanması amacıyla oral implantların kullanımı günümüzde en önemli tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. Diş kayıplarından sonra meydana gelen rezorpsiyonlar çoğu kez dental implantların ideal konum ve boyutlarda yerleştirilmesini güçleştirmektedir. Bu amaçla implant operasyonu yapılacak bölgede yeterli kemik hacmini elde etmek için çeşitli greft materyalleri kullanılmaktadır (1,2). Otojen kemik, iskeletsel defektlerin tedavisinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak elde edilen kemiğin sınırlı olması, rezorpsiyon süresinin kısa olması ve ikinci cerrahi prosedür gerektirmesi çeşitli alternatif metodların araştırılmasına neden olmuştur (3). Kemik greftleri ile kemik oluşumu arzulanan bölgede, bir veya birkaç çeşit stimülasyon yapılabilmektedir. Greftlenen defekt bölgesinde kullanılacak kemik greftinin osteoindüktif karakteristiği iyileşmeyi artırmak için gereken en önemli özelliktir. Osteoindüktif materyaller primitif kök hücrelerin kemik oluşturuıcı hücrelere farklılaşmasını indükleyerek ve osteokondüktif materyalleri iskelet olarak kullanarak yeni kemik oluşumunu stimule etmektedir (4). Etkili bir kemik greft malzemesi oluşturmak için hem osteoindüktif hem de osteokondüktif özelliklerin geliştirilmesi gerekmektedir. Kemik morfojenik proteinler (BMP) osteojenik farklılaşma için önemli bir regülatördür ve kemik morfojenik protein-2 (BMP-2) osteoindüktif faktörlerin en güçlüsüdür. Wozney ve ark. 1980'li yılların sonlarında rekombinant teknolojiler kullanarak Rekombinant insan kemik morfojenik protein -2 (rhBMP-2)'yi sentezlemeyi başarmışlardır. Bu tarihten sonra da rhBMP-2'nin; kemik oluşumu üzerine olumlu etkileri çok sayıda in vitro ve klinik çalışmada gösterilerek klinik kullanım için güvenilirliği kabul edilmiştir (5). Büyüme faktörlerinin klinik olarak uygulanması için lokal, tanımlanmış ve kontrollü kemik formasyonu sağlayacak uygun bir taşıyıcı sistem gerekmektedir (6,7). Bu teori aynı zamanda çalışmamızda kullanılacak olan lokal simvastatin uygulamaları için de gereklidir (8,9).

Statinler, hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörüdür (8,9). Doğal kaynaklı lovastatin; kimyasal olarak modifiye edilen simvastatin ve paravastatin; sentetik kaynaklı atorvastatin, fluvastatin, cerivastatinden oluşmaktadır. Statinler kolesterol düşürücü olarak kullanılırlar ve hiperlipidemi ile arterioskleroz tedavisinde önemli etkileri bulunmaktadır (9,10). Aynı zamanda kemik oluşumunu, iltihabı ve damarlanmayı düzenlemektedir. Statinlerin, osteoklastların aktivasyonunu inhibe ederek ve kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) geninin açığa çıkmasını sağlayarak kemik oluşumunu artırdığı birçok çalışmada yer almaktadır (10,11). Ayrıca statinlerin kemik greft materyallerine göre daha düşük maliyetinin olması ile birlikte; yan etkilerinin azlığı ve kolay elde edilebilir olması gibi avantajları da bulunmaktadır (12). Statin grubu ilaçların kemik metabolizması üzerindeki etkilerini araştıran bir çok çalışma (13,14,15,16) bulunmasına rağmen, bu etkiler üzerine çelişkili bilgiler elde edilmektedir. Statinler genellikle sistemik olarak kullanıldığı için literatürde lokal uygulanmalarına ilişkin pek fazla bilimsel çalışma bulunmamaktadır. Simvastatin ile yapılan in vitro çalışmalarda kemik büyümesini stimule etmede en güçlü statin olduğu belirtilmiştir (13, 14, 15, 17, 18, 19).

Doğal, biodegradable düşük toksisiteli bir polimer olan kitosan çalışmamızda mikroküre şeklinde taşıyıcı materyal olarak kullanılacaktır. Kitosan, osteokondüksiyon, hemostatik etki ve yara iyileştirme özelliklerine sahiptir (20, 21, 22, 23). Biouyumluluk özellikleri, düşük toksisitesi nedeni ile ilaç ve araştırma alanlarında taşıyıcı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle ilaçların kontrollü yavaş salınım çalışmalarında mikroküre, poröz blok veya jelatin şeklinde taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (24).

Bütün bu bilgiler göz önünde alındığında, simvastatinin kemik defektlerine uygulanmasıyla pozitif sonuçlar elde edilebileceği izlenimi olmasına karşın, konuyla ilgili çalışmaların simvastatinin klinik kullanımını henüz desteklemediği ve birçok bilinmeyen var olduğu görülmektedir. Buna ek olarak BMP'lerin osteojenik farklılaşma için önemli bir regülatör olduğu ve osteoindüktif etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu bilgilerin ışığında; çalışmamızın amacı, sıçanlarda oluşturulan deneysel kemik defektlerine, yavaş salınan biyolojik olarak eriyebilen mikroküre

şeklinde kitosan taşıyıcı materyal kullanılarak simvastatin veya rhBMP-2 uygulanması sonrasında histolojik ve histomorfometrik yöntemlerle kemik oluşumunu değerlendirmek, bu faktörlerin kemik rejenerasyon kapasitelerini hayvan modelinde karşılaştırmak ve simvastatinin ve rhBMP-2'nin bu kemik defektlerinin tedavisindeki rolünü incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik dokusu

Kemik dokusu, yetişkin iskeletin temelini oluşturan kan hücrelerini meydana getiren kemik iliğini içeren özel bir bağ dokusudur (25, 26). İskelet oluşturma, iskelet kaslarına destek sağlama ve hayati organları koruma gibi mekanik görevlerinin yanında birçok metabolizma olaylarında rol oynamaktadır (25, 26, 27, 28). Ayrıca kalsiyum fosfat ve diğer iyonların vücut sıvılarındaki miktarlarını dengede tutabilmek için depo edilmelerini ya da kontrollü olarak salınımlarını sağlamaktadır (25, 26). Kıkırdak dokusundan farkı damar içermesidir (25).

2.1.1. Kemik dokusunun kimyasal yapısı

Kemik; inorganik matriks, organik matriks, hücreler ve sudan oluşmaktadır (29).

2.1.1.1. İnorganik matriks

Kemik dokusunun %65'i kollagen lifler arasında veya içinde yer alan tabaka, iğne ve çubuk şeklindeki küçük kristallerden meydana gelen inorganik yapıdan oluşmaktadır. Büyük oranda saf olmayan ve kristal yapı içerisine dağılmış karbonat, sitrat, magnezyum, flor ve stronsiyum içeren hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ten oluşmaktadır (30, 31). Hidroksiapatit kristallerinin kollagen lif segmentlerine sıkıca bağlı olması sayesinde kemikte kristal ve kollagenin yerlerinden ayrılması engellenir. Böylelikle kemik yapısı gerilme ve sıkışmaya karşı direnç kazanmaktadır (25, 32).

2.1.1.2. Organik matriks

Organik matriks %90 oranında Tip 1 kollagenden, %10 oranında ise proteoglikan ve glikoprotein olarak adlandırılan non kollagen bileşenlerden meydana gelmektedir (30). Kollagen kemiğe kuvvetli bir gerilme direnci sağlamaktadır (32). Kemikte bulunan glikoproteinler; osteonektin, fibronektin, vitronektin, fibrilin, osteopontin ve kemik sialoproteininden oluşmaktadır (33). Kemiğin organik matriksine osteoit madde denir ve kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık olarak %35'ini oluşturmaktadır (26).

2.1.2. Kemik hücreleri

Kemiğin temel hücresel elemanları osteoklastlar, osteoblastlar, osteositler; kemik yüzeyini döşeyen hücreler ile kemik büyüme ve tamirini düzenleyen bağışıklık sistemine ait hücrelerden oluşmaktadır. Osteoblastlar, osteositler ve kemik yüzeyini döşeyen hücreler tek bir hücre türünün olgunlaşma sırasındaki farklı evrelerini temsil eden benzer yapıda hücrelerdir (34).

2.1.2.1. Osteoblast

Osteoblast hücreleri kemik metabolizmasında, organik matriksin sentezlenmesinde ve mineralizasyonunda görev almaktadır. Buna ek olarak, kemik oluşumunda ve hücreler arası iletişimde, kendilerinin ve diğer kemik iliği hücrelerinin salgıladıkları sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonların işlev görmesinden sorumludurlar (35,36). Osteoblastlar büyük bir çekirdek, hücresel uzantılar, hücreler arası bağlantılar, sık endoplazmik retikulum, gelişmiş golgi apareyi ve içleri kollajenle dolu salgı kesecikleri içermektedir. Mezenkimde veya temel ilik dokusunda yer alan kök hücrelerden oluşmaktadır. Etkin hallerinde kübik şekilli olan osteoblastlar, kemikte birbirlerine çok yakın dizilerek 15-30µm kalınlığında bir tabaka oluşturmaktadır (26,37,38,39). Kollajen yapıda olan ve olmayan kemik proteinlerini sentezleyen tek

çekirdekli hücrelerdir. Kemik matriksinin depolandığı, büyüyen kemiğin sınırlarında bulunurlar. Osteoblastlar aynı zamanda ekstrasellüler kemik matriksi içine matriksmetalloproteinaz (MMP) salgırlar. Osteoblastlar salgıladıkları regülatör sitokinler ve büyüme faktörleri yardımı ile osteoklastların ve çeşitli hemopoetik hücrelerin değişimini sağlamaktadır (35,36). Kemikteki özel proteinler olan osteokalsin ve kemik sialoproteinlerinin salgılanmasının yanında, yüksek alkalin fosfataz aktivitesi, kollajen salgılanması ve kollajen yapıda olmayan proteinlerin sentezlenmesi, mekanik ve kimyasal uyarılara karşı yanıt geliştirilmesi gibi özellikleri bulunmaktadır (26,38,39,40).

Osteoblastlar kalsiyum pompası olarak da bilinen plazma adenozin trifosfataz (ATPaz) içerirler ve ATP hidrolizinden kazandıkları enerji ile ekstrasellüler matrikse Ca^{++} pompalarlar. Kemiğin inorganik kısımlarının yapılabilmesi canlı osteoblastların varlığına bağlıdır (35). Osteoblastlar kemik yüzeylerinde epitel hücrelerini andıran şekilde yan yana dizilirler. Komşu hücreler arasında tutucu membran farklılaşmaları gözlenir. Salgıladıkları osteoit madde yönünde sitoplazma uzantıları yaparlar; bu uzantılar diğer hücrelerinkilerle ilişkidir (26). Paratiroid hormonu (PTH), prostaglandin E2 (PGE2) ve dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) osteoblastlar arasındaki birleşimleri fazlaştırmaktadır (41). Mineral matriksin çökmesi ile uzantıların bulunduğu yerlerde kanalcıklar oluşmaktadır, osteoblastlar kemik yapımı ilerlediğinde doku içinde kalırlar ve osteositlere dönüşürler (26). Osteoblastların alttaki kemik yüzeyine yapışmaları plazma membranı integrinleri sayesinde olmaktadır. Değişmekte olan osteoblastların ilk salgılarından olan fibronektin, hücrelerin kemiğin dış tarafındaki ekstrasellüler matrikse yapışmalarından sorumludur. Matriks sentezini yapmaya başladıklarında şekilleri kübikten prizmatığe kadar değişebilir. Alkali fosfataz aktivitesi artar ve sitoplazma bazofilik hale gelir. Sentez faaliyetleri azaldıkça yassılaşırlar ve bazofilik özellikleri de azalmaktadır (35). Elektron mikroskopunda osteoblastların çok sayıda pürtlü endoplazmik retikulumları ve bol serbest ribozom ve poliribozomları olduğu görülmektedir. Golgi aygıtı gelişmiştir ve mitokondrileri çok sayıdadır (26). Osteoblastların salgıladığı büyüme faktörlerinden insüline benzer büyüme faktörü-I (IGF-I), TGF- β ve Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü β (PDGF- β)'nın kemik oluşumunu belirgin bir şekilde hızlandırdığını gösteren çalışmalar

bulunmaktadır. Kemik yapımından çok kemik yıkımının desteklendiği fizyolojik koşullarda osteoblastlar; lenfokinler ve prostoglandin tarafından, osteoklastların rezorbsiyon aktivitesini arttıran interlökin-6 (IL-6) üretmek üzere uyarılabilirler (35).

2.1.2.2. Osteosit

Osteoblastlar kemik trabeküllerinin yüzeyinde yer alarak kollajen fibrili ve matriksten oluşan osteoiti sentezlemektedir. Kemik matriksi olan osteoid kalsifikasyona uğrayarak hidroksiapatit kristallerini oluşturmaktadır. Bu süreç sırasında bazı osteoblastlar kemik içinde kalarak osteosite dönüşürler. Osteosite dönüşen osteoblastların sayısı kemik oluşum hızına bağlıdır. Oluşum hızı arttıkça bölge hacmi içinde kalan osteosit sayısı da artmaktadır. Genel bir kural olarak woven kemik ve tamir kemiği lameller kemiğe göre daha fazla sayıda osteosit içermektedir (42,43). Osteositler kemik sıvısı, mineralize olmamış kollajen fibrilleri ve proteoglikanlarla birlikte laküner bölgede bulunmaktadır. Kemik içerisine hapsedikten sonra sentetik ve sekretuar yetenekleri kaybolmaya başlamaktadır. Osteositler besin gereksiminin en fazla olduğu yerlere yani osteoblastlara ve kemik yüzeyini döşeyen hücrelere sitoplazmik uzantılar göndermektedir. Çevrelerindeki lakünler ve kanalcıklar kemik sıvısının en derin osteositin çevresine kadar ulaşabilmelerini sağlamaktadır. Bu şekilde metabolitlerin ve iyonların transferi sağlanmaktadır (35). Osteositler kalsiyum homeostazında görev almaktadır. Osteositlerin kemik matriksindeki kalsiyum ve diğer iyonları serbestlediği; sitoplazmik uzantılar ve kanalcıklar aracılığı ile kemik yüzeyindeki sıvılarla değiş tokuş yapmak için osteoblastlara ve kemik yüzeyini döşeyen hücrelere transfer ettiği düşünülmektedir. Hücreler sistemik ihtiyaca göre kalsiyumu kemik matriksinden serbestleyebildikleri gibi kemik matriksi içine de transfer edebilirler (42). Kemik hücre kültüründeki gelişmeler sayesinde osteositlerin izolasyonu ve kültür edilebilmeleri mümkündür. Osteositler, lokal osteoblastların ve osteoklastların kemik remodelasyonunu sağlayacak fiziksel değişikliklerini kimyasal sinyallere çevirmektedir. Bu kapasiteleriyle kemik üzerine gelen fiziksel baskılara karşı kemiği güçlendirirler. Kemik rezorbsiyonu sırasında osteoklastlar yardımı ile kemik matriksinden serbestlenirler. Serbestlenen osteositlerin tümünün apoptotik süreçte yıkıma uğrayıp uğramadıkları veya osteojenik hücrelere geri dönüp dönmedikleri bilinmemektedir.

Kemik trabekülleri gelişirken kemik fizyolojik kalınlığa ulaştığında kemik yüzeyine yeni preosteoblastların yerleşimi durmaktadır. Bu durumda ne zaman yeni bir osteosit oluşursa osteoblastlar kemik yüzeyinde daha geniş bir alana yayılmaktadır ve o bölgede kemik yapımı durur ve bölgeyi kemik yüzeyini döşeyen hücreler kaplamaktadır. Bu hücreler ve mineralize kemik yüzeyinde osteoid bulunmaz. Osteoidin osteojenik üretimindeki azalma, derin bölgelerdeki osteositlerin yüzeyden gelen hormon sinyalleri ve besinleri almakta yaşadıkları zorlukla düzenlenmektedir (34).

2.1.2.3. Kemik döşeme hücreleri

Yassı ince uzun kemik hücreleridir. Erişkin iskeletin büyük bir kısmını örterler. Osteoblastlar kemik yapımını bitirdiğinde kemik yüzeyindeki hücreler yassılaşır, bu eski osteoblastlara kemik döşeme hücreleri denmektedir. Potansiyel osteoblast kaynakları arasında oldukları, kemik ve ekstrasellüler sıvı kompartmanı arasında bariyer oluşturdıkları ve kemikte kristal büyümesini düzenledikleri tahmin edilmektedir (44).

2.1.2.4. Osteoklast

Osteoklastlar kemik yıkımından sorumludur. Osteoklastlar trabeküler ve kompakt kemiklerin iç yüzeylerinde tek başlarına veya küçük gruplar halinde bulunan, çok çekirdekli hücrelerdir (45). Osteoklastların kaç çekirdekli olduğu ya da genişliğinin ne kadar olduğu rezorbe edilen kemik matriksinin daha önceden ne kadar iyi mineralize olduğuna bağlıdır. (34). Osteoklast hücrelerinin dalları oldukça düzensiz, farklı biçimde ve kalınlıktadır. Bu hücreler, kemik yıkımının başladığı bölgelerde enzimatik olarak açılmış, Howship Lakünası adı verilen çukurcularda bulunmaktadır (36). Osteoklastlar, kökenini hemopoetik kök hücrelerden alan monositlerin birleşmesi ile oluştukları için "mononükleer fagositik sistem" in kapsamı içinde yer almaktadır. Osteoklast ve osteoblastların farklı prekürsörlerden geldiğini destekleyen teori, stromal hücrelerin ve hemopoetik hücrelerin ortak bir soya sahip olduğu görüşünün önerilmesi ile yıkılmıştır (35). Osteoklastların sitoplazmalarında asit fosfataz içeren granüller bulunmaktadır.

Aktif osteoklastlarda kemik matriksine bakan yüzey düzensiz olarak katlanıp çoğu kez dallanarak girintili çıkıntılı hale gelen fırçamsı bir kenar oluşturmaktadır. Fırçamsı kenarın etrafında organel içermeyen sitoplazmik bir bölge -şeffaf bölge- bulunmaktadır, bu bölge aktin filamanlar (mikrofilamanlar) açısından zengindir. Burası, osteoklastın kemik matriksine tutunduğu alandır ve kemik rezorpsiyonu için mikro çevre oluşturmaktadır (42).

Aktif kemik yıkımı, kemik yüzeyindeki Howship lakünalarında osteoklastların varlığı ile tanımlanmaktadır. Bu şekildeki yıkım alanları düzensiz bir görünümde ve osteoid içermez. Bu durum osteoklastların sadece mineralize kemik matriksinin bulunduğu alanlarda aktif olduğu düşüncesini doğurmaktadır (35).

Ultrastrüktüel çalışmalar osteoklast hücreleri içinde çok sayıda lizozom, granüllü endoplazmik retikulum, çok miktarda mitokondri ve iyi gelişmiş bir golgi kompleksi bulunduğunu göstermektedir (45). Osteoklastlar büyüklükleri ve gruplar halinde konumlanmaları nedeni ile ışık mikroskobunda kolayca ayırt edilebilirler. Ayrıca asit fosfataz enzimleri ile de makrofajlardan ve dev hücrelerden ayrılmaktadırlar (36).

Yıkıma uğrayacak bölgenin ne tür bir mekanizma ile seçildiği henüz kesinlik kazanmamıştır. Yüzeyi döşeyen hücrelerin büzülmesi ve koruyucu osteoid tabakayı çözmesi ile mineral yüzeyin açığa çıktığı öne sürülmektedir. İntegrin adı verilen hücre zarına ait reseptörlerin hücre dışı matriks proteinleri ile etkileşerek işlev gördüğü düşünülmektedir (36).

Kendine özgü fenotipin yanı sıra osteoklastlar kalsitonine duyarlı reseptörlere sahiptirler. Osteoklastların paratiroid hormon reseptörleri bulunmadığından, PTH'a olan bu duyarlılığın osteoblast dizilimindeki hücreler tarafından yönlendirildiği ve emilimin yeri, uyarılması ve engellenmesinin bu mekanizma yardımı ile kontrol edildiği fikri ortaya atılmıştır (35).

2.1.3. Kemik dokusu tipleri

Kollagen liflerin doku içindeki dağılımı yönünden farklı iki kemik dokusu çeşidi vardır. Bunlar primer ve sekonder kemik dokularıdır. Bu iki kemik dokusu çeşidi aynı yapı taşlarından oluşur, ancak liflerinin farklı konumu nedeni ile histolojik farklılık göstermektedir (26).

2.1.3.1. Primer kemik dokusu

Embriyonel süreçte gözlenen ve ilk oluşan kemik şeklidir. Zamanla yetişkindeki kemik şekli olan lamelli kemiğe dönüşmektedir. Primer kemik dokusu yetişkindeki kemiğin bilinen mekanik özelliklerini taşımaz. Hücreden oldukça zengin olan bu tip kemikte organik matriks belli bir düzen göstermez (25,26). Primer kemik dokusuna doğum sonrası yaşamda ender rastlanmaktadır. Erişkinde ve normal koşullarda kafa kemikleri ek yerlerinde, tendon ve procesus alveolarislerde sınırlanmıştır, bu kısımlarda primer ve sekonder kemik iç içe bulunmaktadır. Postnatal yaşamda bu kemik dokusuna kırık onarımı, hiperparatiroidizm, paget hastalığı gibi kemik yapımının normal dışı olduğu koşullarda rastlanmaktadır. Primer kemik dokusu erişkin kemiğin bilinen mekanik niteliklerini taşımaz (26).

2.1.3.2. Sekonder kemik dokusu

Kemik dokusunun gelişimi sürecinde primer kemiğin yerinde matriksi lamelli düzenleme gösteren sekonder kemik gelişmektedir. Post-natal kemik iskeletinin tamamına yakını oluşturur. Mikroskopik özelliğini 3-7 mikrometre kalınlığındaki lameller oluşturmaktadır. Lamelli görüntüye matriksin birbiri ardına oluşumu neden olmaktadır. Lameller arasını amorf görünümdeki sementimsi membran doldurmaktadır. Osteositler primer kemiğe göre daha azdır ve komşu lameller arasında yer almaktadır. Sekonder kemik makroskopik yönden spongios (süngerimsi) ve

kompakt (kortikal) kemik olmak üzere iki tip düzenlenme göstermektedir. Süngerimsi kemikte, ince ve düzensiz trabeküllerin gözeneklerini kemik iliği ve kan damarları doldurmaktadır. Trabeküller kan damarı içermeyen ince şekilsiz kemik alanlarıdır. Erişkin iskeletin süngerimsi kemik alanları metabolik yönden en aktif olan kısımlardır ve başta parathormon olmak üzere hormonal etki ve sistemik bozukluklarla ilk önce değişime uğrarlar. Kompakt kemikte lameller düzenlemeyi kan damarlarının dağılımı belirlemektedir. Kan damarları kemiği uzunlamasına kateden ve birbirine enlemesine kollarla anastomozlaşmış havers kanalları içinden geçmektedir. Bunlar periost ve endosttan kemiğe dik biçimde uzanan Volkmann kanallarıyla birleşmiştir. Birbirinden farklı doğrultudaki bu iki kanal sisteminin bütün kemik kalınlığında oluşturduğu üç boyutlu ağ içinde bağ dokusu, kan damarları ve sinir lifleri yer almaktadır. Bunlar ile kanal duvarları arasında osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlar bulunmaktadır. Lameller, havers kanalları ve çevresinde değişik sayıda halkalar oluşturmaktadır. Kemik lamelleri ve çevreledikleri kanal birlikte kompakt kemiğin yapı ünitesini oluşturur ve havers sistemi ya da 'osteon' olarak tanımlanmaktadır (26).

2.1.4. Kemiğin damar yapısı

Kemik büyümesi, şekillendirme ve yeniden şekillendirme doğrudan damarsal yapıya bağlıdır. Bütün hücrelerin oksijen ihtiyacını karşılamasının yanında damar yapısı kemik hücreleri için de kaynak oluşturmaktadır (46). Embriyogenez safhasında primer ossifikasyonda kıkırdığın damarlanması, iskeletsel gelişimin postnatal evresinde büyüme plağının vasküler invazyonundan ayrılmaktadır. Embriyoda endotelial hücreler olgunlaşmamış damarsal ağa genişleyen kortikal kemiğin kıkırdak kanalları aracılığı ile kemik yapısına girmektedir (47). Postnatal kemik gelişiminde kan damarları için kanal formasyonu, büyüme plağının damar gelişimi ile uyum içinde gerçekleşmektedir (48). Uzun kemiklerin damar ağı besleyici arter, metafiz, epifiz ve periostal arter ağını içermektedir (49). Kemiğin kanlanması, kapillerin ve sinusoid damarların kompleks anastomoz ağından oluşan bir arteriolden oluşmaktadır (50). Kemik iliğindeki sinusoid damarlar, vasküler membran, perisit ve retiküler hücreler ile desteklenen tek tabakalı endotelial hücreden oluşan yüksek geçirgenlikte ince bir duvar olarak nitelendirilebilir (51). Retiküler hücrelerle çevrili sinüzoidler, insan kök hücrelerinin idamesi için gerekli

olan yüksek miktarda kemokin salgılamaktadır (52). Bu kapillerler, ardından aynı yoldan geri döner ve tek bir venüle bağlanır ki bu da perikondral pleksusa dönen arteriol yolunu takip etmektedir (53). Bu vasküler damar ağı, fonksiyonel olarak ikinci bir ossifikasyon alanı sağlamak için kondrogenezis ve osteogenez için kondrosit ve mezenkimal hücrelere gereken besinleri sağlamaktadır (54). Bu nedenle bu damar ağının gelişiminin kemiğin kanlanması ile iç içe olduğu belirtilmektedir (55).

2.1.5. Kemikleşme tipleri

Embriyoda mezenkim içinde gelişen intramembranöz kemikleşme ve bir hiyalin kıkırdak modelin yerinde gelişen endokondral kemikleşme olmak üzere iki ayrı kemikleşme şekli görülmektedir (26).

Hem intramembranöz hemde endokondral kemikleşmede kemiğin sertleşmesi damarsal büyümeye yakın şekilde oluşmaktadır. İntramebranöz kemikleşme, kapillerin mezenkimal bölgeye invazyonu ve mezenkimal hücrelerin olgun osteoblastlara farklılaşması ile karakterize olmaktadır. Bu osteoblastlar, kemik çıkıntılarının oluşumuna izin verecek şekilde sürekli olarak kemik matriksi depolamaktadır. Bu kemik çıkıntıları gelişir ve trabekül oluşturmak için birleşmektedir (56). Aynı anda birçok yerde oluşan bu trabeküllerin birbirleri ile birleşmeleri ile kemik süngerimsi görünüm almaktadır. Süngerimsi ve sekonder tipteki bir kemiğin kompakt kemiğe dönüşmesi, trabeküller boyunca kemiği çevreleyen osteoblastların apozisyonel biçimde yeni kemik lamelleri oluşturması şeklinde olmaktadır (26). Trabeküllerin sayısı ve boyutu artıkça yüksek oranda osteosit içeren disorganize, zayıf bir yapı olan woven kemiği oluşturmak üzere birleşirler, ki bu da sonunda daha organize ve güçlü bir kemik olan lameller kemiğe dönüşmektedir. Bu şekilde oluşan intramembranöz kemikleşme tipi embriyonik gelişmede görülmektedir ve kafatasındaki yassı kemiklerde, çeşitli yüz kemiklerinde, mandibulada ve klavikulada ve uzun kemiklerin diafizinde görülmektedir. Buna zıt olarak eklem etrafında yüklere dayanan kemiklerde endokondral kemikleşme görülmektedir (56). Endokondral kemikleşme, iskeletin gelişim ve formasyon mekanizması için kıkırdak ve kemikte fonksiyonel özellikleri

sağlamaktadır. Kemik sertliğinin oranını belirleyen osteogenez ve kondrogenezin birlikteliği uzun kemik uçlarında yer alan ve boyuna uzamanın gerçekleştiği büyüme plağının vaskülarizasyon miktarına bağlıdır (48). Endokondral kemikleşmede, mezenkim dokusu kemiğin erişkindeki şeklinin küçük bir hyalin kıkırdak model içinden başlamaktadır. Kemiğin kıkırdak model içinde gelişmesi önce bu kıkırdak dokunun yıkılmasını gerektirmektedir. Kıkırdak yıkımı ve kemik yapımının yan yana seyretmesi nedeniyle endokondral kemik oluşumu daha karmaşık seyretmektedir (26). Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) izoformları endokondral kemik gelişimi boyunca metafiz ve epifiz vaskülarizasyonunu, kıkırdak ve kemik oluşumunu kordine etmede önemlidir (57). Embriyonal hücrelerden bir kısmı osteoblastlara dönüşerek, kalsifiye kıkırdak matriksi üzerinde önce osteoit dokuyu sonra da mineral dokuyu yaparak primer kemikleşme alanını meydana getirmektedir. Bununla birlikte periostal kemik halkası kalınlaşarak diyafizin iki ucuna doğru uzanmaktadır. Periostal kemik belli bir kalınlığa ulaştığında primer kemikleşme odağı osteoklastlar tarafından eritilir; bunun yerine de periostal tomurcuktan diyafize göç etmiş mezenkim hücreleri myeloit dokuyu oluşturmaktadır. Myeloit doku stroması içindeki hücrelerden bir kısmı osteogen hücrelere dönüşmektedir. Periostal tomurcuk ile başlayan diyafiz kemikleşmesi epifizler arasındaki bütün diyafiz kıkırdağını kaplamaktadır. Periostal kemik halkası da buna dışarıda eşlik eder ve epifizlere doğru uzanmaktadır (26). Uzun kemiklerde kıkırdak bölgesinin damarlanması, gelişimin farklı aşamalarında gerçekleşmektedir. İlk olarak, erken embriyonik gelişimde perikondriumdan gelen kan damarları kıkırdak yapılarının içine girmektedir. İkinci olarak, postnatal büyüme boyunca, kapiller damarlar uzun kemik uçlarında yer alan ve boyuna uzamanın gerçekleştiği büyüme plağının içine ilerler, üçüncü olarak, erişkinlik döneminde romatoid artrit veya osteoartrit gibi patolojik durumlar veya travmaya cevap olarak anjiogenez periodik olarak devreye girmektedir (48).

2.1.6. Kemik büyüme ve gelişiminin evreleri

2.1.6.1. Şekillendirme

Kemiğin yeniden şekillendirilmesi ile biyomekanik ve metabolik olarak çevre şartlarında varlığını sürdürebilen kemik üretimi elde edilmektedir. Metafizde oluşan olgunlaşmamış kemik, yapısal olarak olgun kemikten daha kalitesizdir. Bununla birlikte ilerleyen yaşla birlikte erişkin bireylerde kemik kalitesi düşer. Eksilen kemiğin yerine konması veya yenilenmesi; sırasıyla yıkım ve yeni lameller kemik yapımıyla gerçekleşen yeniden şekillendirme ile oluşmaktadır. Kemiğin yeniden şekillendirme işlemlerinin ürünleri katlanmış sement çizgileri, sekonder osteonlar, trabeküler katmanlar ve dokular arası yapraklardır. İnsanlarda iki-üç yaşından sonra primer kemik emilerek yerini ikincil kemiğe bırakmaktadır. Birincil süngersi yapıdan ikincil süngersi yapıya geçişte remodelasyona bağlı kemik kaybı şeklinde tanımlanan aşırı miktarda madde kaybı oluşmaktadır. Bu geçiş sırasında kemiğin mimarisinde meydana gelen değişimler dikkat çekmektedir. Birincil kemiğin yerini alan ikincil kemik sürekli olarak yok edilir ve yeni kuşak kemikle yer değiştirir, yeniden şekillendirme olgusu bireyin hayatı boyunca devam etmektedir. Erişkin bir bireye ait kortikal kemiğin kendini yenileme hızı 20 yıl, kansellöz kemiğin ise 1-4 yıldır. Yeniden şekillendirme mikro hasarların giderilmesinde, ölü veya aşırı mineralleşmiş kemiğin yenilenmesinde ve yerel baskılar karşısında kemiğin mikro-mimari yapısının düzenlenmesine yardımcı olmaktadır (58).

2.1.6.2. Modelling

Büyüme ve şekillendirme birbirlerine eşlik eden olgulardır. Yerel etmenler, büyüme fonksiyonel ve mekanik olarak ihtiyaç duyulan mimari yapı doğrultusunda yönlendirmektedir. Şekillendirme, geniş kemik yüzeylerinde kemik yapım ya da yıkım olaylarını içine almaktadır. Şekillendirme kemiklerin ve eklemlerin büyüklük, şekil, hacim, anatomi ve büyümesini kontrol etmektedir. Korteks ve ilik kavitelerinin genişlemesi, uzun kemiklerin uç kısımlarının şekillendirilmesi, trabeküllerin kayması ve

kraniyal boşluğun genişlemesi şekillendirme olgusunun birer sonucudur. Fiziksel konturun değişen mekanik şartlara uyumu şekillendirme işlevleriyle elde edilmektedir. Doğumdan olgunlaşma dönemine uzanan süreçte kemikleri etkileyen kuvvetler 20 kat artarken şekillendirme işlevleri sayesinde kemikler sürekli güçlendirilmekte ve mikro-makro hasarlardan korunmaktadır (58).

2.1.7. Kemik dokusu iyileşmesi

Kemik dokusundaki iyileşmede yaralanmayı takiben bir dizi fizyolojik olay görülmektedir. Kemik büyümesi, daha önce oluşmuş kemik dokusunun bir bölümünün yıkılırken aynı anda başka bir bölümünün yapımı ile gerçekleşmektedir (59). Fizyolojik reaksiyonlar, bozulan kemik bütünlüğünün yeniden sağlanmasına yöneliktir. Yumuşak doku iyileşmesinden farklı olarak bu iyileşme tipinde skar dokusu oluşmamaktadır. Alıcı bölgenin desteği, yeterli kanlanma ve kemik segmentlerinin stabilitesi gibi faktörler kemik gelişimi için önemlidir (60). İyileşme evreleri kesin sınırlarla birbirinden ayrılamaz ve her evre birbirinden önceki ya da sonraki evre içerisinde gerçekleşmektedir (61).

Kemik dokusundaki yaralanmalar genel olarak 2 şekilde iyileşmektedir. Primer iyileşmede kırık parçalar birbirine temas ederler. Bu iyileşmeye doğrudan kemik iyileşmesi veya intramembranöz kemikleşme de denmektedir (61). Dolaylı kemik oluşumu veya sekonder iyileşme olarak belirtilen endokondral kemikleşmede ise kalsifiye olarak yerini kemik dokuya bırakan bir kıkırdak doku oluşumu söz konusudur. Sekonder kırık iyileşmesi fazlarını klasik olarak kabul edilen şekilde sıralayacak olursak (61).

- Yangı (Enflamasyon) fazı
- Onarım (Reperasyon) fazı
- Yeniden şekillenme (Remodelasyon) fazı

2.1.7.1. Yangı (Enflamasyon) Fazı

Enflamasyon sahası travmadan sonra birkaç saat içinde başlar ve gelişen yumuşak kallusla yer değiştirene kadar bir kaç gün devam etmektedir. Bu faz, vazokonstriksiyon, vazodilatasyon, pıhtı oluşumu (hemostaz), fagositoz (lökositöz), yeniden damarlanma ve granülasyon dokusu sentezini içermektedir. Damar yaralanmasının sebep olduğu kanama ve bunu takiben oluşan hematomla başlayan ve yaralanma sonrasındaki ilk 2 haftayı kapsayan safhadır. Oluşan hematoma, çevre yumuşak doku sahalarıyla sınırlanmış hipoksik asidik bir oluşumdur. Trombositler hızla, kan sızan hasarlı damarları tıkar ve hematoma içinde nekrotik pıhtı oluşturmak üzere fibrin depo edilmektedir (62). Enflamasyon sahasında ilk görülen hücreler mezenkimal kök hücre adı verilen ve birçok hücreye farklılaşma yeteneğine sahip öncü hücrelerdir. Pıhtı, önce akut inflamasyon hücreleri ile birkaç gün içinde kronik enfeksiyon hücreleri ve makrofajlar ile dolmaktadır. Toplanan mezenkimal kök hücreleri pıhtıyı organize eder. Hematom, sağlam yumuşak dokular tarafından sarılmaktadır. Kemotaktik kalıntılar monositleri ve makrofajları yara bölgesine doğru yönlendirmektedir. Endotelial hücreler plazminojen aktivatör ve prokollagen sentezler. Degranülasyona uğramış trombositlerin α -granüllerinden salgılanan büyüme faktörleri polimorfonükleer lökositler (PMN), lenfositler, monositler ve makrofajları yönlendirmektedir (63).

Bu dönemde oksijen seviyesinde ve pH derecesinde bir azalma oluşmaktadır ve makrofajların görev yapabilecekleri bir ortam yaratılmaktadır. PM'ler mikrobiyal istilayı ve mikrobebrisi uzaklaştırırken makrofajlar birleşerek çok çekirdekli dev hücreler oluşturmaktadır. Aynı zamanda makrofajlar sellüler aktiviteyi ve mitozu arttıracak faktörlerin salınmasına neden olmaktadır (64).

Bir kaç gün içinde hematoma organize olmaktadır, fagositler ve lizozomal mekanizma ile nekrotik dokular uzaklaştırılmaktadır. Fibroblastların bölgeye gelmesinden sonra içe doğru büyüyen kapillerler ile birlikte pıhtı 3 ya da 4 gün içinde reperatif fibrovasküler granülasyon dokusu ile yer değiştirmektedir (65).

2.1.7.2. Onarım (Reperasyon) Fazı

Granulasyon dokusu oluşumu iyileşme sürecinde önemli bir yer tutmaktadır. İlk adım hematoma organizasyonudur. Lokal uyarılara cevap veren öncü hücrelerin farklılaşmaya başlaması, oluşmuş olan hematoma organize etmeye başlamaktadır (66). Granulasyon dokusu içindeki osteoprogenitor hücrelerce sağlanan osteoblastlar, ağı kemik organik matriksini oluştururlar ve iki faz ile mineralizasyonu başlatırlar (67).

Birinci faz, organik matriks oluşumudur. Bu fazda osteoblastların tüm yüzeyinden kollajen I (prokollajen) ve amorf madde salgılanıp, “kalsifikasyon frontu” denilen yerde başlar. Amorf yapı içinde kollajen lifleri proteoglikanlar, proteinpeptitler ve lipidlerden oluşan makro moleküller özel bir yapılanma göstermektedir. Düzenli bir kesinti ile dizilerek, inorganik kristalleri barındırmak için kanallar veya delikler oluştururlar. Mineral birikimiyle birlikte proteoglikan ve proteinpeptitlerin bir kısmı doku sıvısıyla uzaklaştığından, organik matriksin mineralizasyonu ile hacminde artış görülmemektedir (68). Bu devrede bölge pH’sı asidiktir (66). Tamir sürecinde rol oynayan hücrelerin mezenkimal orijinli olduğu bilinmektedir (69).

İkinci faz, kalsifikasyon dönemidir. İnflamasyon safhasında olduğu gibi tamir sürecinde rol oynayan hücrelerin de mezenkimal kaynaklı olduğu; bunların kollajen, kıkırdak ve kemik dokusunu yaptıkları bilinmektedir (70). Çekirdek oluşumu kemik minerallerinden özellikle kalsiyum ve fosfatın lokal olarak depolanması ve buradan mineralizasyonun yayılması ile oluşmaktadır. Mineralizasyon matriks vezikülleri ile başlamakta ve osteoid doku kollajen fibrillerinin önce içinde sonra aralarında fibrillere paralel olarak oluşmaktadır (68). Matriks vezikülleri, lipid, yoğunlaşmış kalsiyum fosfat, alkali fosfataz, alkali adenozintrifosfat ve profosfataz enzimleri içermektedir (66). Hücrelerin farklılaşması, hücrelerin salgıları ile haftalar sonunda, ekstrasellüler matriksin olgunlaşması ile yeni oluşan ve yapısal olarak düzensiz dokuya kallus denmektedir. Kallus; vasküler elementler, stromal ürünler, kıkırdak ve hücrelerden oluşmaktadır. Kıkırdak, woven kemik ile yer değiştirir. Woven kemik daha sonra kemik segmentelerini güçlendirmek üzere kemik yaprakları gibi tabakalardan oluşan lameller kemiğe dönüşmektedir (71).

Tamir safhası bu kallusun oluşumu ile karakterizedir ve damarsal büyüme, osteoid sekresyonu ve fibrokollajen liflerin hazırlanması ile başlamaktadır. Yara bölgesinde kırıkta meydana gelen geçici bir kallus üretilmektedir. İlk 4-6 hafta arasında birleşme başlamaktadır. Defekt bölgesinde mezenkimal hücre çoğalması ilk 16 saatte saptanmıştır. Bu çoğalma, kırık sonrası 32 saatte en üst düzeye çıkmaktadır. Oluşmaya başlayan kan damarları 2-3 günde ışık mikroskopik düzeyde görülür hale gelirler ve birinci haftada belirginleşmektedirler. Osteojenik hücrelerin çoğalma sürecine paralel olarak kapiller tomurcuklanma başlamaktadır. İlk dönemlerinde periostal damarlar, kapiller tomurcuklanmasına yardımcı olmaktadır (69). Kemik iyileşmesinin ilk dönemlerinde periosteal damarlar, geç dönemde ise besleyici damarlar, kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olurlar. Fakat kapiller gelişimi osteojenik hücre gelişimi kadar hızlı olmadığından beslenmenin daha iyi olduğu kemiğe yakın derin seviyedeki hücreler osteoblastlara dönüşür. Kemiğe yakın olmayan granülasyon dokusu kuşağının üzerinde yerleşen hücreler dolaşım yönünden fakirdirler. Bu bölgedeki kapiller gelişim hızı hücre çoğalmasına uyum gösteremediğinden hücreler bazen kondrositlere farklılaşır. Kuşağın dış yüzeyinde kırıkta dokusu meydana gelir (72). Onarım evresinin ilk zamanlarında kırıkta oluşumu (kırıkta kallus) belirginleşmektedir. Damar yenilenmesi, mevcut kan damarlarında tomurcuklanmayla oluşmaktadır ve kanla beslenme yeterli olursa osteoblastlar kallus içinde normal kemik gelişimine elverişli matriksi sağlamış olurlar. Osteoblast aktivitesi devam eder ve kırıkta kırık fragmanlar arasında köprü görevi gören kanselloz kemik ile yer değiştirir. Osteoid birikiminin devamı ile kanselloz kemik kortikal kemik ile yer değiştirebilir (60). Proteoglikanlar, polipeptidler, lipidler ve osteoblastların yüzeyinden salgılanan amorf madde osteid dokuda özel moleküller halinde yerleşir. Organik matriks mineralizasyonuna uygun olacak şekilde özel yapılanma göstermektedir (73).

2.1.7.3. Yeniden Şekillenme (Remodelasyon) Fazı

Kemiğin yeniden şekillendirilmesi ile biyomekanik ve metabolik olarak çevre şartlarında varlığını sürdürebilen kemik üretimi elde edilmektedir. Bununla birlikte ilerleyen yaşla erişkin bireylerde kemik kalitesi düşmektedir. Bu nedenle eksilen kemiğin yerine konması veya yenilenmesi gerekmektedir. Bu işlem, kalitesi düşük olan

kemiğin yerine, sırasıyla yıkım ve yeni lameller kemik yapımıyla gerçekleşen yeniden şekillendirme ile oluşmaktadır. Bu evre onarım evresinin ortasında başlayıp normalde insanlarda 4-16 hafta sürerken, yıllar boyunca da devam etmektedir. Güçlü ve düzensiz sert kallusun daha düzenli lameller kemiğe dönüşümüdür (74). Zaman içinde, kemiği yeniden şekillendirmekle görevli üniteler iyileşen bölgeyi istila ettiğinde, ağısı kemiğin yerini lameller kemik almaya başlamaktadır. Bu mekanizma normal büyüklük, şekil ve kuvvetteki kemik oluşana kadar devam etmektedir. Tüm bu reaksiyonlar aktivasyon-rezorpsiyon-formasyon olarak bilinmektedir. Osteoblastlar sinyal faktörleri ile aktive olmaktadır ve bir kemik bölgesini boşaltırlar; osteoklastlar stimule olurlar ve osteoblastların açığa çıkardığı alana tutunarak rezorpsiyona başlamaktadır (75). Howship's lakünleri adı verilen osteoklastik rezorpsiyon alanları daha sonra osteoblastlar tarafından doldurulmaktadır. Zamanla kalsifiye olarak yeni kemik oluşturacak osteoidi salgırlar (76).

Bu yeniden şekillenme süreci aylar hatta yıllarca sürebilmektedir. Ancak genellikle yeterli kuvvetteki bir kemiğin oluşumu yaklaşık 6 ayda tamamlanmaktadır. Erişkin bir bireye ait kortikal kemiğin kendini yenileme hızı 20 yıl, kansellöz kemiğin ise 1-4 yıl olarak bilinmektedir. Kemiğin belirli bir zaman dilimi içinde tamamen kendisini yenilemesi kuvvetlere direnç gösterilmesine ve ömür boyunca yapısal hasarların giderilebilmesi için gerekli kalsiyum dengesinin iskelet sistemi tarafından düzenlenip karşılanmasına olanak sağlamaktadır (77).

2.1.8. Kemik Greftleri

Kemik defekti meydana geldiğinde, bu defekt bölgesi spontan iyileşmeye bırakılırsa, bölgenin hızla bağ dokusu ile dolması sonucu kemik iyileşmesi olumsuz yönde etkilenmekte ve yeni kemik oluşumu engellenmektedir. Kemik defekti iyileşmesini etkileyen faktörlerden birisi de defekt büyüklüğüdür. Deneğin hayatı boyunca spontan olarak iyileşmesi mümkün olmayan en küçük kemik içi yara kritik boyutta defekt olarak tanımlanmaktadır. Bu kritik boyuttan daha büyük bir defekt olduğu zaman iyileşme kemik dokudan daha çok fibröz doku iyileşmesi şeklinde

olmaktadır. Kritik defekt boyutu canlıdan canlıya farklılık göstermektedir İskeletsel bir defektin rekonstrüksiyonunda asıl amaçlanan, defektin doğal kemikle veya zamanla yerini doğal kemiğe bırakacak olan greftlerle onarılmasıdır (78).

Canlı organizmadaki herhangi bir etken sonucu meydana gelen eksikliğin giderilmesine ve fonksiyona dönebilmesine ya da bu eksikliğin organizma tarafından düzenli ve hızlı bir şekilde tamamlanmasına yardımcı olan tüm maddelere biyomateryal denilmektedir. Kemik dokusu yerine kullanılan biyomateryaller kemik yapısına yakın görünümde olmalıdır. Greft materyallerinin mekanik ve biyolojik fonksiyonları vardır. Kemik greftlerinin mekanik fonksiyonları; iskeletsel defektlerin yeniden yapılanması, kırık tamiri ve kemik tümörlerinin çıkarılmasından sonra ortaya çıkan defektin doldurulmasıdır. Biyolojik fonksiyon ise kemiğin iyileşmesini ilgilendirir. Bu biyolojik aktivite canlı hücreler ile onların ürünlerini, çevre dokuların biyoaktif faktörlerle aktif hale geçirilmesini, alıcı dokunun gelişiminin desteklenmesini ve yapısal bütünlüğünün korunmasını kapsamaktadır. Kısaca özetlersek kemik grefti yapısal bütünlük, osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokonduksiyonun kombinasyonu olan aktiviteleri ifade etmektedir (79).

2.2. Kemik morfojenik proteinler

Kemik morfojenik proteinler (BMP'ler) ilk olarak 1965 yılında Marshall Urist tarafından demineralize kemik matriksinin kemirgenlerde kemik bulunmayan kas bölgelerine yerleştirilmesi sonucu ektopik osteogenezin oluşması ile belirlenmiştir (80). BMP'ler transforming growth factor- β (TGF- β) süper ailesindendir ve osteoindüktif protein olarak rolleri yoğun bir araştırma konusu haline gelmiştir (81). BMP'ler demineralize kemikte gözlenen ve demineralize kemiğin saflaştırılması ile elde edilen büyüme ve farklılaşma faktörleridir (82). BMP'lerin esas rolleri ektopik ossifikasyon çalışmaları ile anlaşılmaya başlanmıştır. BMP'lerin aktiviteleri ilk olarak 1960'lı yıllarda tanımlanmasına rağmen kemik indüklenmesinden sorumlu proteinler 1980'li yılların sonlarına kadar sığır kaynaklı BMP-3'ün (osteogenin) saflaştırılması ve insan BMP-2 ve BMP-4'ün kolanlanması kadar bulunamamıştır (83,84).

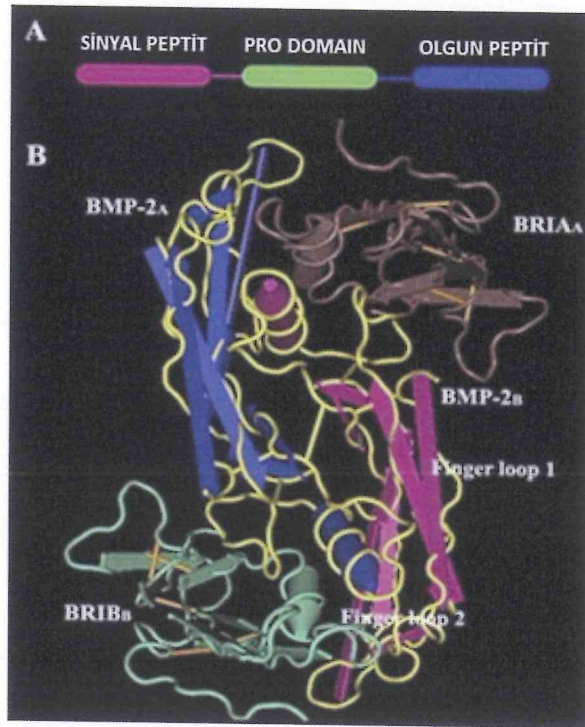
Ektopik osteogenez süreci 1965 yılında Urist tarafından açıklanmıştır ve bu süreci açıklamada otoindüksiyon terimi kullanılmıştır. 1971 yılında Urist ve Strates, kemik morfogenetik protein ve osteoindüksiyon terimlerini klinik ve bilimsel topluluğa lanse etmiştir (85). 1973 yılında Reddi ve Huggins ektopik osteogenezin hücresele ve moleküler biyolojisini açıklamıştır (86). 1988 yılında Muthukumaran ve ark. kemiğin içindeki çözünebilen maddeleri tanımlamış ve bu faktörlerden birisi osteogenin olarak adlandırılmıştır (87). Osteogenin sonraki yıllarda BMP-3 olarak da tanımlanmıştır. BMP-3, demineralize kemik matriksinde en fazla bulunan BMP'dir (88).

Demineralize kemik matriksi ile ilgili bu geniş kapsamlı araştırmalar rhBMP'lerin klonlanmasını ve salınımını sağlamıştır (86,87). Reddi ve ark. yaptığı çalışmalarda, 1988 yılında BMP-2 ve BMP-4'ü klonlayan Wozney ve ark.'nın çalışmalarına benzer sonuçlar elde etmiştir (89). Bu sonuçlar, 1990 yılında BMP-7 ve BMP-8'i (sırasıyla OP-1 ve OP-2) klonlayan Özkaynak ve ark. tarafından da elde edilmiştir (90).

Günümüze kadar yaklaşık olarak 20 farklı BMP türü tanımlanmıştır. BMP'lerin embriyogenez safhasında kıkırdak ve kemik gelişiminin yanı sıra yetişkin iskelet sisteminin tamir ve remodelasyonunda kilit faktör oldukları belirtilmiştir (82).

1988 yılında Wozney tarafından BMP'nin klonlanması ile 32.000 molekül ağırlığında dimerik bir protein olduğu keşfedilmiştir (91). BMP'ler olgun proteini oluşturan bir sinyal peptit, bir prodomain ve bir karboksi-terminal domainden oluşan prekürsör moleküller olarak sentezlenmektedirler (Şekil 2-1) (92). Olgun domainde sistein düğümü olarak bilinen proteinlerin hidrolizinden meydana gelen aminoasit kökü anlamına gelen 7 adet sistein kökü bulunmaktadır. Bu 7 sistein bütün BMP'lerde bulunmaktadır (93). BMP moleküllerinin önemli bir ortak özelliği karboksil uçları ile ilişkide olan sistein rezidülerinin pozisyonlarıdır. Bu yedi sistein molekülünün aminoasitleri TGF- β ile aynıdır, ki bu da BMP moleküllerinin TGF- β ailesinden olduğunu göstermektedir (94). BMP'ler bu ailenin diğer üyeleri gibi sistein bağ yapısı oluşturan üç intrachain disulfid bağı ve kovalent dimer oluşturan bir interchain disulfid

bağından oluşan, iki küçük monomerin birleşmesi ile meydana gelen molekül anlamına gelen dimerik proteindir (95). Bu yüksek disulfid bağı yapı yüksek stabilitede BMP-2 molekülü oluşturmaktadır. Proteinlerin dimerik yapısından dolayı, TGF- β ailesinin üyeleri homodimer veya heterodimerler şeklinde oluşabilir. RhBMP-2, iki BMP-2 protein alt biriminden oluşan bir homodimerik proteindir. BMP-2 alt birimlerinin, BMP-6 ve BMP-7 gibi rekombinant salınım sistemlerinde, ailenin diğer üyeleri ile heterodimerize olabildiği bildirilmiştir (96). BMP'ler embriyogenez, büyüme ve olgunluk dönemlerinde kemik formasyonunu sağlamaktadır. Kırık iyileşmesinde, osteoprogenitör hücreler BMP'ye cevap verir ve osteoblastlara dönüşürler. BMP, progenitör hücrelerdeki reseptörlerine bağlanır ve aşağıda anlatıldığı şekilde bir hücreden diğerine genetik materyal transferini başlatmaktadır (97).

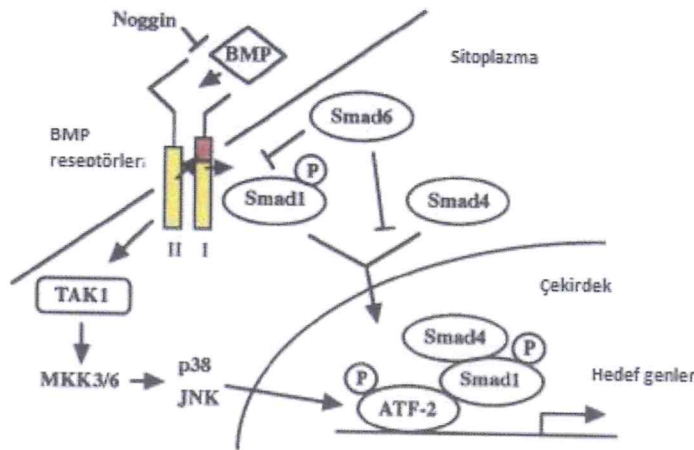


Şekil 2-1: BMP'lerin yapısı (A) BMP'lerin şematik yapısı (B) BMP-2'nin ve reseptörü BRIA'nın üç boyutlu yapısı (92).

RhBMP-2 duyarlı hücre tiplerinin yüzeyindeki reseptörlere yapışan lokal bir bioaktif faktördür. RhBMP-2 reseptörleri bir çok tipte heterodimerik serin/treonin kinaz içermektedir (98). Molekülün sinyal oluşturabilmesi için hem tip I hem tip II kinaz reseptörüne bağlanması gerekmektedir. RhBMP-2'nin yapışabileceği tip II reseptörleri

BMP reseptör tip II (BMPR-II), aktivin tip II reseptörü (ActR-II) ve aktivin tip IIB reseptörü (ActR-IIB) iken (99) tip I reseptörleri BMP reseptör tip IA/aktivin reseptörü benzeri kinaz 3 (BMPR-IA/ALK-3) ve BMP reseptör tip IB/aktivin reseptörü benzeri kinaz 6 (BMPR-IB/ALK-6) moleküllerini ve aktivin reseptör kinaz 2 (ALK-2) moleküllerini içermektedir. RhBMP-2 aynı zamanda aktivin tip I (ACVRI) reseptörüne de yapışabilir. Kirsch ve ark. tarafından hem tip I ile tip II reseptörlerine birlikte yapışan hemde tip I reseptörlerine ligand bağlar ile yapışan BMP-2'nin kristal yapısı belirlenmiştir (100). Reseptör kompleksi, iki adet tip I ve iki adet tip II reseptörleri ile bir adet dimerik BMP içermektedir. BMP'lerin reseptörlere ardışık olarak yapışabildikleri veya önceden şekillendirilmiş multimerik reseptör komplekslerine yapışabildikleri bildirilmiştir. Bu üçlü sinyal yolunun yapışma tipinden etkilenebildiği bildirilmiştir (101). Tip I ve tip II reseptörleri bağımsız olarak BMP'ye yapışabilmektedir fakat iki tip reseptör bir arada bulunduğu yapışma afinitesi önemli derecede artmaktadır (102). Reseptörlere ardışık olarak bağlandıkları durumlarda, BMP-2 öncelikle yüksek afinitede tip I reseptörüne bağlanır ve düşük afiniteli tip II reseptörlerini komplekse toplar (Şekil 2-2). Ardından tip II reseptörü tip I reseptörüne fosforilleşir böylelikle SMAD adı verilen aracı hücre içi sinyal transfer proteinini fosforilleştirerek BMP sinyalini transfer etme özelliğini kazanmaktadır (98). SMAD'lar, hücre çekirdeği içine sinyal taşıyan ve özel olarak DNA'ya bağlanma kabiliyeti ile transkripsiyonel kompleks oluşturan orijinal bir protein ailesidir (103). Smadlar fonksiyonlarına göre üç ayrı alt gruba ayrılır. R-Smad; reseptörü regüle eden smadlar (smad -1,-2,-3,-5,-8), Co-Smad; ortak mediatör smad (smad-4), I-smad; inhibitör smadlar (smad-6,-7) (104). BMP reseptörleri SMAD 1, 5 ve 8'i fosforilleştirirken, TGFβ1 gibi TGFβ ailesinin diğer üyeleri SMAD-2 ve 3 aracılığı ile sinyal göndermektedir. Böylelikle TGFβ ailesinin proteinlerinin iki ayrı ve birbiriyle yarışan hücre içi sinyal yolu bulunmaktadır. Fosforilleşmiş SMAD 1,5 ve 8 ard arda coSMAD (SMAD 4) ile dimerizasyon adı verilen olay ile benzer moleküllerin kombine olmasını sağlamaktadır. Ardından bu kompleks çeşitli BMP-2'ye duyarlı genleri aktive ederek çekirdek içerisine girmektedir. Reseptörün SMAD ve coSMAD'lara yapışmasına ek olarak coSMAD'ların iyileşmesine müdahale eden ve sinyal iletimini durduran, durdurucu veya antiSMAD'lar (SMAD 6-7) olarak da adlandırılan I-smadlar (smad-6,7) bulunmaktadır. SMAD 6 geni aslında BMP-2 tarafından stimule olmakla birlikte, kendi içerisinde bulunan negatif bir feedback mekanizması ile BMP-2 sinyalinin hafiflemesi

işlevini gerçekleştirmektedir (105). Smad6, BMPRI'ya yapışarak fosforilleşme basamaklarını bloklar. Fosforilasyonu takiben smadlar, smad4'e yapışır ve çekirdeğe yapışmaktadır (97). Reseptör kompleksin ligand aktivasyonundan sonra tip I reseptör kinazlar spesifik SMAD'ları fosforile ederler, bu fosforile olan SMAD'lar daha sonra Smad4 ile birleşerek hücre çekirdeğine taşınırlar. Bu kompleksler çekirdek içinde yalnız veya DNA (Deoksiribonükleik asit)-bağlanma alt birimi ile birleşik halde bulunabilir ve spesifik promotor elemanlarına bağlanarak hedef genleri aktive ederler (103,104). Diğer taraftan, smadlar, smad 6'ya yapıştığında sinyal sona ermektedir. Bir kez osteoblast çekirdeğinin içerisine girdiğinde smadlar, smad hedef gen transkripsiyonunu başlatır ve aktive eder (97). I-smadlar ise R-ve Co smadların potansiyel olarak hücre içi antagonistidir. Smad 6- 7 gibi hücre içi BMP inhibitörleri dışında hücre dışı bölgelerde çeşitli BMP inhibitörleri bulunmaktadır. Bu proteinler BMP'lerle yapışır ve BMP'lerin kendi reseptörlerine yapışmasına engel olmaktadır.



Şekil 2-2: BMP sinyal iletimi

TGF- β ailesi sinyal iletiminin en önemli araçları olan SMAD'lar, sinyal iletimini hücrenin durumuna göre tamamlamak ve adapte etmek için farklı tipte düzenleme mekanizmalarına maruz kalırlar. Düzenleme mekanizmalarından bir tanesi, bağlantı bölgesindeki "mitogen-activated protein (MAP)"-kinaz alanlarının fosforlanmasıyla SMAD'ların hücre çekirdeği içindeki birikiminin inhibe edilmesidir. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve hepatosit büyüme faktörü gibi agonistler "Extracellular signal regulated MAP-kinases (Erk MAP-kinazı)" aktive ederek Smad1'in bağlantı bölgesinde 4 PXSP motifindeki serinlerin hızlı bir şekilde

fosforilasyonuna yol açarlar. Bu fosforilasyon Erk MAP-kinaz tarafından katalizlenir ve Smad1'in fosforilasyonu BMP-reseptör aracılığı ile fosforilasyonundan bağımsız olarak gerçekleşir. Erk aracılığı ile fosforilasyon Smad1'in hücre çekirdeğindeki birikimini inhibe eder, ayrıca Smad1 ile Smad4'ün birleşmesini de engeller. Smad1'in hücre çekirdeğinde birikimine bağlı olan BMP uyarılarının antagonisti, Erk MAP-kinaz yolunun aktivasyonudur. Diğer RSmad'larında bağlantı bölgelerinde MAP-kinaz fosforilasyon alanları mevcuttur. MAP kinazlar ile SMAD'ların regülasyonu, TGF- β sinyal iletiminin düzenlenmesinde gereklidir (103). MAP aktivasyonu sonucunda Fos/Jun ailesi ve aktivasyon transkripsiyon faktör-2 (ATF-2)'leri artış gösterir ve çeşitli genlerdeki aktivating protein tip-1 (AP-1) ile etkileşime girer. P38 MAPK aktivasyonu tip I kollajen, osteokalsin ve alkalen fosfotazın BMP-2 reseptörlerinin artışında etkilidir. P38 MAPK ve ERK aktivasyonu osteopontin ve fibronektin reseptörlerinin artışında da etkilidir. MAPK'ler Smad sinyal yolunda ve Smad fosforilasyonunda birbirine bağlı olarak görev yapabilirler bununla birlikte bağımsız sinyal yollarını da aktive edebilirler (106).

BMP'lerin ana kaynağı, osteoprogenitor hücreler, mezenkimal hücreler, osteoblastlar ve kondroblastlar tarafından üretilen ekstraselüler matrikstir. BMPler, kondro-osteogenez için gerekli ardışık olarak sıralanan biyolojik olaylar zincirini başlatırlar. Bu yolda kemotaksis, mezenkimal ve osteoprogenitor hücre proliferasyonu ve farklılaşması, anjiyogenez ve kontrollü ekstraselüler matriks sentezi yer almaktadır (107). Düzenleyici etkileri ise, hedef hücre tipi, hücrenin farklılaşma basamağı, ligandın lokal konsantrasyonu ve çevredeki diğer faktörlerle etkileşimi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (108). BMP ailesinin üyeleri yapısal ve fonksiyonel olarak büyük benzerlikler göstermekle birlikte, fare ve sıçanlar ile yapılan birçok çalışmada herbirinin kemik iyileşmesi sürecindeki etkisi ve üstlendiği görevin farklı olduğu gösterilmiştir (109).

BMP'ler aminoasit diziliş benzerliklerine göre alt gruplara ayrılmışlardır. BMP-2 ve 4 birinci alt grubu, BMP-5, BMP-6, BMP-7 ve 8 ikinci alt grubu oluşturmaktadır. BMP-14, GDF-6 (BMP-13) ve GDF-7 (BMP-12) üçüncü grupta, BMP-3 (osteogenin) ve GDF-10 (BMP3b) dördüncü grupta yer almaktadır (110). BMP-2, BMP-4 ve BMP-7'nin en etkin osteoindüktif özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinler

arasında bone morphogenetic protein-2' nin osteoindüktif özelliği en fazla olan protein olduğu belirtilmiştir (111). Urist, Akay ve Archer tarafından yapılan birçok hayvan çalışmalarında BMP'lerin heterotopik bölgelerde endokondral yol ile kemik oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (112-114). BMPler, etkilerini tip-I reseptörleri transfosforile eden tip-II serin/treonin kinaz reseptörlerine bağlanarak gösterirler (115). Bu yolla hücre çekirdeği içindeki hedef gen transkripsiyonunu düzenleyen BMP'ler, osteoblast, kondroblast, nöron ve epitel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinin büyüme, farklılaşma ve apoptoz aşamalarında kritik rol oynamaktadır (110). Buna ek olarak BMP-4/BMP-7 ve BMP-2/BMP-7 gibi heterodimerlerin, mezenkimal hücrelerin proliferasyonu ve osteoblastlara farklılaşması aşamalarında artmış osteoindüktif etkiye sahip olduğu in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir (96).

Bioaktif faktörler çeşitli yollar ile hücreleri aktive edebilmektedir. PDGF, insülin benzeri büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü hücreleri bölünmesi için stimule etmektedir (116). Bu faktörlerin aksine BMP-2, mezenkimal kök hücrelerini osteoblastlara ve kondroblastlara değiştirdiği gibi prekürsör hücrelerin fenotipini değiştiren bir farklılaşma faktörüdür. Bu durum BMP-2'nin hücre tiplerine etkisini in vitro olarak belirlerken ortaya konulmuştur. BMP-2 'nin W-20 hücreleri (117), embriyonik kök hücreler 10TI/2 (118), embriyonik uzuv hücreleri C14 hücreleri (119) de dahil olmak üzere sıçan osteoprogenitör hücrelerinde kemik alkalen fosfotaz ve osteokalsin gibi osteoblastik fenotip belirleyicilerinin salınımını indüklediği gösterilmiştir. Buna ek olarak BMP-2, osteokalsin ve alkalen fosfotaz da dahil olmak üzere osteoblastik belirleyicilerin ortama salınmasını sağlayan miyoblast prekürsör hücre dizisinin (C2C12) farklılaşma potansiyelini değiştirebilir (120). İn vivo olarak birçok çalışmada hücre tipi ve dokunun kemik hücrelerine dönüşerek rhBMP-2'ye cevap verdiği ortaya konmuştur. Bunlar genellikle peristeal hücreler, kemik iliği stromal hücreleri, yumuşak doku, dişeti ve perivasküler dokulardan oluşan hücreleri içermektedir (121).

BMP-2'nin in vivo mekanizması büyüme faktörlerinden ayrıdır. Büyüme faktörleri var olan kemik hücrelerinde veya progenitör kemik hücrelerinde hücresel popülasyonu genişletmeye yönelik davranabilir. Böylece kemik defektine lokal olarak

uygulandığında kemik büyümesini stimüle edebilir. Buna alternatif olarak rhBMP-2 prekürsör hücreleri kemik oluşturuvcu hücrelere dönüştürür ve böylece kemik veya yumuşak doku bölgelerinde lokal kemik oluşumunu indükleyecek şekilde farklılaşabilir (121).

Hücresel seviyede, rhBMP-2 hem endokondral yol ile hem de direk olarak intramembranöz yol ile kemik indüksiyonu yapar. Bu süreç ilk olarak sıçanların demineralize edilen kemik matriksi ile rhBMP-2 kombine edilerek sıçanlara subkütanöz olarak implante edildiğinde, ektopik sistemlerinde gözlenmiştir (122). Öncelikle çok sayıda farklılaşmamış mezenkim hücrelerinin implante edilen bölgeye çoğalması ile kemotaksis ve bu hücrelerin proliferasyonunu içeren hücresel olaylar dizisi devitalize kemik ve kemik benzeri maddelerde gözlenenlerden farksız bir şekilde gerçekleşmektedir. Çoğalma etkisinin rhBMP'nin direk ya da indirek etkisi ile oluşup oluşmadığı belirsiz olsa da rhBMP-2 varlığına cevap olarak mezenkimal hücreler kondrositlere dönüşmektedir. Çok sayıda kan damarı bölgeye infitre olur ve kırıkta kemik ile yer değiştirmeye başlamaktadır. Bu güçlü anjiogenik cevap BMP'ye cevap veren hücrelerin içindeki vasküler endotelial büyüme faktörünün indüksiyonu aracılığı ile oluşan indirek etkidir. Kemik iliği elemanları oluşur, bu elemanların varlığı ile osteoklastlar da dahil olmak üzere implant, kemik yapılarına remodelo olur ve hematopoetik kemik iliği daha adipogenic kemik iliğine dönüşür. Zaman ile ektopik kemik biomekanik olarak yüklenmediği için indüklenen kemik biçim değiştirir. Gözlenen hücresel olaylar rhBMP-2 verilmesi ile başlar ve birçok büyüme faktörü ve hormonun etkisi ile gelişir. Yapılan hayvan çalışmalarına göre intramembranöz ve endokondral aşamaya katkısı rhBMP-2 dozuna, taşıyıcıya ve implante edilecek bölgeye bağlıdır. Örneğin, köpek mandibulasında yapılan erken bir histolojik değerlendirmede kırıkta formasyonu oluşmadan direk kemik formasyonu gözlenmiştir. Diğer taraftan uzun kemiklerde veya kırık bölgelerinde hem endokondral hem de direk kemik formasyonu oluşmuştur (123).

BMP'ler içerisinde BMP-2 ve 4 yüksek oranda kemik indükleme kapasitesine sahiptir. Bu BMP molekülleri DNA rekombinasyon (yeniden birleşme) teknikleri ile başarılı bir şekilde sentezlenebilir ve bu protein ürünlerinin (rBMP) BMP'nin kemik

indükleyici etkilerine sahip olduğu gösterilmiştir (84,122) böylelikle insan-tipi BMP'nin (rhBMP) medikal kullanım potansiyeli doğmuştur. Kemik defekterinin iyileşmesinde ve kırık iyileşmesini hızlandırmada rhBMP-2'nin etkinliğini araştıran bir çok çalışma yapılmaktadır (124).

Mundy ve arkadaşları, BMP-2 salınımı gerçekleştiren bileşikler bulmak için, 30000'den fazla bileşiği incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda statinlerin (lovastatin ve simvastatin) BMP-2 mRNA salınımını arttırdığını ve kemik formasyonunu stimüle ettiğini bildirmişlerdir (17).

2.3. Statinler

Statinler, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörüdür (3,125,126). Yüksek kan kolesterol seviyesi bulunan hastalarda ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan, güvenilirlikleri kanıtlanmış, en etkili ajanlardır (126).

Statinler ilk olarak 1976'da Endo ve meslektaşları tarafından bir küf olan *Penicillium citrinum*'dan izole edilmişler ve kolesterol sentezi inhibitörü olarak tanımlanmışlardır (127). Ardından 1978 yılında Brown ve arkadaşları tarafından statinlerin HMGCoA redüktaz enzimini inhibe ederek etki ettiği ortaya çıkarılmıştır (128). Bu güne kadar farmakolojik özelliklerine göre 9 farklı HMG-CoA redüktaz inhibitörü geliştirilmiştir (129). Lovastatin, pravastatin, mevastatin ve simvastatin mantar fermentasyonundan sonra elde edilen doğal statinlerdir. Fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve cerivastatin ise kimyasal sentez yoluyla elde edilmektedir (3,126). Cerivastatin, akut renal yetmezlik nedeniyle ölüme sebebiyet vermesi sonucunda 2001 yılında üretimden kaldırılmıştır. Mevastatin ise yan etkileri sebebiyle yalnızca pravastatin üretiminde kullanılmaktadır (126). Şu anda klinik kullanımında sadece 7 adet statin bulunmaktadır. Bunlar; lovastatin, simvastatin, pravastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin ve fluvastatindir (130). Statinlerin elde ediliş yolunun farklı davranış mekanizması yaratabileceği ileri sürülmüştür. Fakat doğal

statinlerin sentetik olarak üretilen sitatinlerden daha etkili olduğunu gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (131).

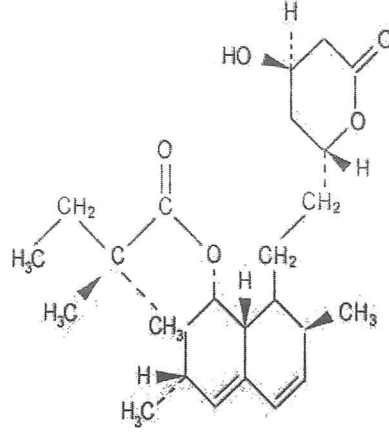
Tüm bu ajanlar büyük oranda kolesterolü düşürmek amacı ile kullanılmaktadır (3). Hiperlipidemi ve arteriosklorosis tedavisinde önemli ve etkili bir yöntem sağlamaktadır. Bununla birlikte, statinler kemik formasyonunu, iltihap ve damar gelişimini düzenlemektedir (17). Serum lipit konsantrasyonunun düşmesine yardımcı olmakla birlikte trombosit kümelenmesini ve trombus (kan pıhtısı) çökmesini artırabilirler (132). Statinlerin alzheimer hastalığı ile ilişkili olan B-amiloid peptide üretimini azalttığı (133) ve T lenfosit aktivasyonunu baskıladığı söylenmektedir (134).

2.3.1. Statinlerin kimyası ve fonksiyonel özellikleri

Statinlerin kimyasal şekilleri kabaca üç parçaya ayrılabilir; 1. hedef enzimin substratı olan HMGCoA analogu kısım, 2. substrat analogu olan kısma kovalent bağlı olan ve statini enzime bağlama işlevini gören kompleks bir hidrofobik halka yapısı 3. ilaçların çözünme özelliklerini, dolayısıyla pek çok farmakokinetik özelliklerini belirleyen halka yapılarına bağlı yan gruplar (şekil 2-3). Simvastatin, atorvastatin, fluvastatin ve lovastatin nispeten lipofilik bileşikler iken, pravastatin ve rosuvastatin sırasıyla hidroksil ve metan sülfonamid grupları sebebiyle daha hidrofilik yapıdadırlar (135).

Tüm statinler substratla yarışarak HMGCoA redüktazı inhibe ederler ancak reaksiyonda koenzim olan NADPH'a etki etmezler, bu durum HMGCoA benzeri parçaların enzimin aktif bölgesine bağlandığını düşündürmektedir. Statinlerin HMGCoA redüktaz üzerindeki inhibisyonunun yapısal mekanizmasıyla ilgili çalışmalar, statinlerin enzimin aktif bölgesine bağlanarak substrat bağlanmasını önlediğini göstermiştir. Ayrıca enzimin substrat bağlayıcı cebi, statinlerin rijit hidrofobik halka yapısına uyacak tarzda yeniden şekillenmektedir. Farklı statin enzim kompleksleri bağlanma şekilleri açısından sadece küçük farklılıklara sahiptirler. Atorvastatin ve rosuvastatinin enzim kompleksinde ek bir hidrojen bağı gösterilmiştir.

Ayrıca rosuvastatin enzimle polar etkileşimi olan tek statindir ve en fazla bağlanma etkileşimi içinde olmaktadır. Bu farklılıkların önemi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte statinlerin enzime bağlanmalarındaki ek özelliklerin ilaç potansiyelindeki artmayla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (136).



Şekil 2-3: Simvastatinin kimyasal yapısı

2.3.2. Statinlerin etki mekanizması ve farmakokinetik özellikleri

Statinler karaciğerde kolesterol sentezini inhibe ederek kan kolesterol düzeyini değiştirirler ve kötü kolesterol (LDL) reseptör geninin ekspresyonunda artışa sebep olurlar (137). Karaciğerde VLDL (çok düşük ögül ağırlığa sahip lipoprotein) üretiminin statinler tarafından inhibe edilmesinin kolesterol sentezindeki düşme sebebiyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu mekanizmanın statinlerin trigliserit düşürücü etkilerinden de sorumlu olduğu düşünülmektedir (138).

İleri derecede ilk geçiş eliminasyonundan dolayı, genellikle statinlerin sistemik biyoyararlanımları düşüktür. Belirtildiği gibi statinler için hedef organ karaciğerdir ve ilk geçişte alınmaları etkileri açısından biyoyararlanımlarından daha önemlidir (136).

Pravastatin dışındaki tüm statinler büyük oranda plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Bu sebeple bağlı olmayan yani sistemik olarak aktif ilaca maruziyet nispeten azdır (139) Statinler ağırlıklı olarak otuzun üzerinde üyesi bulunan sitokrom P450 (CYP450) enzim ailesi tarafından metabolize edilmektedir. Statinler ağırlıklı olarak karaciğer tarafından metabolize edildikten sonra safra yoluyla atılmaktadır (140).

2.3.3. Statinlerin antiinflamatuvar etkileri

Statinlerin kardiyovasküler hastalık riskini azaltma nedenlerinden biri de C-Reaktif Protein (CRP), matris metalloproteinazlar (MMP) ve TNF- α 'nın inhibisyonuna neden olarak antiinflamatuvar özellik göstermeleridir (141). Arterioskleroz ve miyokard enfaktusu gibi koroner kalp hastalıklarının başlangıcında ve ilerlemesinde inflamatuvar süreç önemli bir rol oynamaktadır. TNF- α ve interlekin 6 gibi sitokinler; nöronlar, glia ve endotel hücreleri tarafından üretilirler ve beyindeki immünolojik ve inflamatuvar cevapların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bu sitokinler serebral iskemi esnasında lökosit göçü ve yapışmasını uyarırlar ayrıca doku faktörü ekspresyonu ve trombosit aktive edici faktörü artırarak trombogenezi artırmaktadırlar (142). Statinlerin, bu sitokinlerin makrofajlardan salınmalarını azaltarak muhtemel yıkıcı etkilerini zayıflatıkları düşünülmektedir. Vasküler yaralanma ile endotelin işlevinin bozulması kardiyovasküler risk faktörlerine cevap olarak monosit, makrofaj ve t lenfositleri dahil olmak üzere lokosit migrasyonu ile başlatılmaktadır (142).

NO bu antiinflamatuvar etkide aracı rolünü üstlenmiştir. Yeni bir statin olan rosuvastatinin endotelial hücreler ile P-selektin sentezini inhibe ederek önemli bir anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Statinin koruyucu etkisi vasküler endotelial NO aracılığı ile gerçekleşmektedir (143). Statin tedavisi ile inflamasyonun baskılanması, CRP üretimini azaltmaktadır (144). CRP, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlere karşı karaciğerden üretilen bir klinik inflamasyon belirtisidir. CRP salınımı koroner kalp hastalığı olan bireylerde artış göstermektedir. Statinler tedaviden 6 hafta sonra plazma CRP konsantrasyonu düşürmektedirler. Statinler serumdaki CRP

konsantrasyonunu artırdığı için statin kullanımı inflamatuvar hastalığın önlenmesini sağlamaktadır (145).

Arterioskleroz gibi hastalıklarda, düz kas hücreleri (SMCs)'nin proliferasyonu önemli bir olay olarak görülmektedir. İn vitro olarak statinler (simvastatin, fluvastatin), uygulanan doza bağımlı olarak SMC göçünü ve proliferasyonunu azaltmaktadır (146).

SCM'ler ve makrofajlar tarafından matriks metalloproteinaz (MMPs) gibi proteolitik enzimler salınmaktadır. Bu enzimler, arteriosklerotik lezyonların fibröz içeriğini ve dengesini etkilemektedir. Statinler, arteriosklerotik plağın hücresel kompozisyonunu ve fizyolojik özelliklerini modifiye ederek plak stabilitesine katkıda bulunmaktadır. Statinler damarın en iç tabakasına (neointima) monosit/makrofaj infiltrasyonunu, SCM proliferasyonunu ve migrasyonunu baskılamaktadır. Statinler aynı zamanda makrofajlar ve SCM 'ler ile MMP-1, MMP-3 MMP-9 dahil olmak üzere MMP salınımını azaltmaktadır (147). Bu nedenle statinler arteriosklerotik plakanın kopmasını olumsuz yönde etkileyen enflamatuvar sürecin ilerlemesini inhibe edebilir bu durum kardiovasküler hastalıklardaki faydalarını açıklamaktadır (4). MMP'ler kemiğin hem fizyolojik hem de patolojik sürecinde önemli role sahip enzimlerdir. MMP-9 kemik gelişiminde önemli role sahiptir. MMP-9 kemiğin patolojik yıkım sürecine katılmaktadır. Statinler makrofaj ve endotel hücrelerinden MMP'lerin açığa çıkmasını baskılamaktadırlar. Thunyakitpisal ve arkadaşları simvastatinin osteoblast ve fibrosarkom hücrelerinden doza ve zamana bağlı olarak MMP-9 salgılanmasını baskıladığını göstermişlerdir (148).

2.3.4. Statinlerin iskeletsel etkileri ile ilgili temel oluşturan çalışmalar

Statinlerin kemik metabolizması üzerine etkileri ilk olarak 1999 yılında Mundy in vitro olarak statinlerin kemik formasyonunu stimule etme potansiyalini keşfetmesi ile bildirilmiştir. BMP'leri aktive etme kapasitesini araştırmak için 30.000'in üzerinde bileşik incelenmiştir. Osteoblast farklılaşmasının BMP ailesinin üyeleri tarafından

artırıldığı düşünülmüştür. TGF- β ve fibroblast büyüme faktörü gibi diğer büyüme faktörlerinin ise osteoblast çoğalmasını stimüle ettiği ve farklılaşmayı inhibe ettiği belirtilmiştir (17). Bir çalışmada, statinlerin fare ve insan kemik hücrelerinde BMP-2 mRNA salınımını artırdığını ve sıçan kafatasında kemik formasyonunu artırdığını belirtmiştir. Başka bir çalışma ise, simvastatinin ve lovastatinin sıçan kafatasına subkutanöz olarak enjekte edildiğinde kemik formasyonu sağladığını ve osteopenik OVX sıçanlara oral yoldan uygulandığında trabeküler kemik hacmini artırdığını göstermiştir (110). Sugiyama ve ark. 2000 yılında, simvastatin ve mevastatin gibi lipofilik statinlerin BMP-2 mRNA ve osteosarkom hücrelerinden bazı proteinlerin salınımını artırdığını bildirmiştir. Böylece simvastatinin luciferas genine bağlı BMP-2 düzenleyicisini aktive ettiği bildirilmiştir. BMP-2'nin statin aracılığı ile aktive olması HMG-CoA'nın alt metaboliti olan mevalonate eklenmesi ile önlenilmektedir. Bazı araştırmacılar Pravastatin gibi hidrofilik statinlerin osteoblastlarda BMP-2 salınımını indüklemeye kapasitelerinin olmadığı belirtmiştir. Bu gözlemler statinlerin lipofilik özelliklerinin kemik formasyonu sağlamada önemli olduğunu desteklemektedir (149).

Maeda ve ark. 2000 yılında simvastatinin osteoblastların farklılaşmasına ve fonksiyonuna etkisini araştırmıştır. Bu araştırmanın sonuçları simvastatinin doza ve zamana bağlı olarak alkalin fosfataz aktivitesini ve mineralizasyonu artırdığını göstermektedir (150). Maeda ve ark. 2004 yılında yaptığı bir çalışmada ise simvastatin ve cerivastatin gibi statinlerin kemik sialoproteini (BSP), osteokalsin (OCN), ve tip 1 kollagen salınımı artırarak ve MMP-1 MMP-13 gibi kollagenazları baskılayarak osteoblast fonksiyonunu düzenlediği bildirilmiştir (151). Statinler aynı zamanda kemik iliği stromal hücreleri ile osteoblast farklılaşmasını desteklemektedir. Parhami ve ark. 2002 yılında yaptığı bir çalışmada Mevastatin kullanımı ile farelerde kemik iliği stromal hücrelerinin tedavisi, bu hücrelerin fonksiyonel osteoblastlara olgunlaşmasını inhibe etmiştir (152). Bu durum osteoblast farklılaşmasında statinlerin ne kadar önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Maeda ve ark. BMP-2 dışındaki kemik anabolik faktörlerin statinler ile indüklenip indüklenmediği araştırmıştır. Simvastatin, cerivastatin ve atorvastatin gibi lipofilik statinlerin osteoblastlarda, bir anabolik faktör olan, VEGF salınımını artırdığı belirlenmiştir (153). Bazı çalışmalar, VEGF'nin damar gelişimini, kemikleşmeyi ve kemik turnoverını geliştirerek kemikte autocrine/paracrine faktörü gibi

davrandığını göstermiştir. Bu durum, VEGF'nin statin ile indüklenen kemik gelişiminde rol oynadığını göstermektedir (4).

Embriyonik kök hücreler, in vitro olarak osteoblast ve yağ hücreleri gibi bir çok hücre tipine dönüşebilmektedir. Phillips ve ark. 2001 yılında mevastatinin, BMP-2 salınımını farklılaşmanın geç bir evresinde stimule ettiğini ve bu nedenle osteoblastik farklılaşmayı ve kemik formasyonunu geliştirdiğini göstermiştir. Ohnaka ve ark. 2001 yılında yeni gelişen bir statin olan pitavastatin kullanılarak BMP-2 salınımının artırılma mekanizması ile ilgili bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada primer olarak kültüre edilen insan osteoblast hücrelerinde pitavastatin, BMP-2 mRNA salınımı artırmıştır (154).

Maritz ve ark. 2001 yılında, statinin kemik formasyonunu inhibe ettiğini ve sıçanlarda kemik yoğunluğunda azalma oluşturduğunu ve simvastatinin overektomi sebebi ile oluşan kemik kaybını önlemediğini belirtmişlerdir. Niceliksel kemik histomorfometrisi ile değerlendirme yapılan bir çalışmada yüksek dozda simvastatin (20mg/kg/gün) uygulanması ile kemik formasyonu ve rezorpsiyonun artırdığı bildirilmiştir. Bu çalışma, statinlerin kemirgenlerde in vivo olarak kemik üzerinde anabolik etkisi olmadığını göstermektedir (155). Bu çalışmaya zıt olarak Oxlund ve ark. 2001 yılında 10 mg/kg oral doz simvastatinin, overektomi yapılmamış yetişkin dişi sıçanların vertebral kemiğinde kansellöz kemik miktarını %23 oranında ve kansellöz kemiğin baskı kuvvetini %24 oranında artırdığını bildirmiştir (156). Simvastatinin titanyum implantların etrafında osteogenezi geliştirmesinin in vivo etkisi Ayukawa ve ark. tarafından 2004 yılında yetişkin sıçanlar üzerine yapılan bir çalışmada değerlendirilmiştir. 30 gün boyunca 10 m/kg dozunda intraperitoneal simvastatin uygulanması implant etrafındaki kemik yoğunluğunu ve kemik implant kontak oranını artırmıştır. Araştırmacılar bu durumun statinlerin osseointegrasyonu artırdığının bir göstergesi olduğunu bildirmiştir (155). Skoglund ve ark. 2002 yılında yaptıkları in vivo bir çalışmada simvastatinin kırık iyileşmesini artırdığını belirtmiştir (157). Bu gözlem, statinlerin in vivo olarak yeni kemik oluşumunu artırdığını desteklemektedir.

Oral yoldan kullanılan statinler, çoğunlukla ilk geçişte karaciğerden metabolize olmaktadır. Sıçanlarda atorvastatinin metabolizması ile ilgili yapılan bir çalışmada statinlerin oral dozunun %73'ünün safradan boşaltıldığı ve çoklu dozların verilmesinin

safranin metabolik profilini değiştirmediği belirtilmiştir (158). Başka bir in vivo çalışmada statinlerin transdermal uygulanmasının oral uygulamaya gre kemik metabolizmasını daha fazla etkilediği ortaya çıkarılmıştır (159). OVX sıçanlarda atorvastatin uygulanmasının ile kemik mineral yoğunluğunu veya trabeküler kemik hacmini geliştirmediği belirtilmiştir. 10 hafta boyunca (10mg/kg) atorvastatinin subkütanöz verilmesi ile kemik üzerinde anabolik etki görülmemiştir. Bu alışma Maritz ve ark. 2001 yılında yaptiğı çalışma ile benzerlik göstermektedir. Buna zıt olarak Kawane ve ark.'nın 2004 yılında OVX sıçanlarda yaptiğı bir çalışmada atorvastatinin enjeksiyonu (2mg/kg) yapılmıştır. Bu çalışmada femoral metafiz gibi trabeküler kemiğin zengin olduğu dokularda atorvastatinin kemik mineral yoğunluğu (BMD)'nu artırdiğı bildirilmiştir (160). Bu gözlemlere dayanarak özellikle kemikte uygulamak üzere geliştirilen statinlerin osteoporoz tedavisi için kullanımlarının geliştirilmesi düşünülmektedir (4).

Gimble ve ark. tarafından 1996 yılında yapılan bir çalışmaya göre lovastatin, yağ hcreti genlerinin salınımını baskılayarak yağ dokusu hcreti farklılaşmasını inhibe etmektedir (161). Burkhard ve ark. alışmasında trabeküler kemik yoğunluğu ile kemik iliğinde yağ dokusu oluşum miktarı arasında ters bir ilişki bulunduğu belirtilmiştir (162). Bazı araştırmacılar tarafından kemik iliğinde yağ birikiminin artışı, yaş ile ilişkili kemik kaybı ile ilişkilendirilmektedir (161). Bu nedenle statinlerin yağ hcreti farklılaşmasındaki inhibitör etkileri ile osteoporoz tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (4).

2.3.5. Simvastatin

Simvastatin, lovastatinin 2-methyl-butyryl yan zincirinin 2,2-dimethyl-butyryl grubu ile değiştirilerek kimyasal olarak modifiye edilmesi ile elde edilmektedir. Simvastatin oral uygulamadan sonra karaciğerde sitokrom P450 enzimi ile aktif forma dönüşmektedir (163). Simvastatinin oral dozunun %5'inden azı sistemik dolaşıma katılmaktadır. Oral dozun ardından kemik iliğindeki statin konsantrasyonu tam olarak

belirlenmemiştir fakat osteoblast ve osteoklastların çok düşük konsantrasyondaki statinlere maruz kalmış olabileceği bildirilmiştir (164). Simvastatinlerin osteoblastik aktiviteyi artırdığı ve osteoklastik aktiviteyi baskıladığı bildirilmiştir. Bu aktivitenin mekanizması ile ilgili bazı fikirler bulunmaktadır. Simvastatinin kemik morfogenetik protein ile indüklenen osteoblast farklılaşmasını desteklediği bildirilmiştir. Bu olay TNF- α 'yı Ras/Rho ile aktive olan protein kinaza çevirerek ve BMP-Smad sinyal yolu ile gerçekleşmektedir (165). Simvastatin, tümör nekrosis faktörün baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmaktadır. Simvastatin aynı zamanda Smad 1, 5 ve 8 fosforilasyonu aracılığı ile gerçekleşen BMP-2 inhibisyonunu önlemektedir. Oral kullanımdan sonra osteoklast sayısındaki azalma ve asit fosfataz 5b aktivitesindeki azalma osteoklast aktivitesinin azaldığını göstermektedir (17).

Literatürde simvastatinin titanyum implant etrafında osteogenez gelişimine etkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır (156,166).

Ayukawa ve ark. başka bir çalışmalarında simvastatinin titanyum implant etrafında osteogenez gelişimine etkisini değerlendirmiştir. Sıçanların tibiasına 1 mm çapında ve 1.5 mm uzunluğunda saf titanyum implantlar yerleştirilmiştir. Deney grubuna periton altına günlük 10 mg/kg simvastatin enjekte edilmiştir. Kontrol grubuna ise salin solusyonu enjekte edilmiştir. Denekler 30 gün sonunda sakrifiye edilmiştir. Kontrol grubunda, implant yüzeyi ile direk kontak halinde yeni kemik oluşumu ile birlikte mineralize olmayan bağ dokusu fibroblast benzeri hücreler ve kan damarları gözlenmiştir. Deney grubunda ise medullar kanalın bol miktarda trabeküler kemikle dolduğu görülmüştür. Histomorfometrik incelemede kontrol grubunda % 31.7 deney grubunda ise % 58.4 kemik-implant kontağı yüzdesi görüldüğü bildirilmiştir. Kemik yoğunluğu ise kontrol grubunda % 17.4 ve deney grubunda ise % 44.3 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar, simvastatin uygulanan grupta kemik-implant kontağı ve kemik yoğunluğu değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda yüksek olduğunu bildirmiştir (156).

Ayukawa ve ark. yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde simvastatinin titanyum implant etrafında osteogenez gelişimine etkisini değerlendirmiştir. 1 mm çapında ve 1,5 mm derinliğinde saf titanyum implantlar yerleştirilmiştir. Deneklere intraperitonel olarak günlük 0.125, 1, 5 veya 10 mg/kg dozlarında simvastatin enjekte edilmiştir. 5 ve 10 mg simvastatin kullanılan gruplarda medüller kanalda yeni oluşan trabeküler kemik varlığı gözlenmiştir. Kontrol grubu ile 0.125, 1 mg simvastatin kullanılan gruplar arasında histolojik bir farklılık görülmediği bildirilmiştir. Kontrol (%33.3), 0.125 mg (%35.2) ve 1 mg (%37) simvastatin kullanılan gruplarda kemik-implant kontağında bir farklılık görülmemiştir. 5 mg (%49.4) ve 10 mg (%60) simvastatin uygulanan gruplarda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kemik implant kontağı istatistiksel anlamda yüksek görülmüştür. Bu çalışmada serum kimyası, statinin kemik oluşum belirteçlerini artırdığını ve kemik rezorpsiyon belirteçlerini azalttığını göstermektedir. Gruplar arasında kortikal kemik yüzdesinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu çalışmada 0,125 ve 1 mg simvastatin dozlarının implant etrafında kemik oluşumuna etkisi olmadığı, 5 veya 10 mg simvastatin dozlarının titanyum etrafındaki medüller kemik formasyonunu artırdığı bildirilmiştir (166).

Du ve ark. 54 adet sprague dawley cinsi osteoporotik sıçanda titanyum implantlar etrafında kemik iyileşmesini araştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Sıçanlar saf titanyum implant implantasyondan sonraki 28. ve 84. günlerde sakrifiye edilmiştir. İmplant yivleri arasındaki kemik implant kontağı (BIC), kemik alanı (BA) ve kemik yoğunluğu (BD) ölçülmüştür. Araştırmacılar simvastatinin kansellöz kemikteki implant etrafındaki iyileşmeyi artırdığını ve titanyum implantların osseointegrasyonunda osteoporozun negatif etkisini geri döndürdüğü sonucuna ulaşmıştır (167).

Killeen ve ark. lokal veya sistemik alendronat (ALN) uygulanmasının periodontal bir defekt etrafında, simvastatin (SIM) ile indüklenen kemik büyümesini artırıp artıramayacağını araştırmıştır (168). Alendronate (ALN), nitrojen içeren bifosfanat sınıfında yer almaktadır ve lokal olarak uygulandığında osteoklastların protein prenelasyonunu etkileyerek simvastatin gibi mevalonate yolunu inhibe etmek aracılığı ile kemik rezorpsiyonunu etkilemektedir (169). Araştırmacılar, kısa dönemde postopatatif sistemik ALN uygulanması lokal ALN uygulaması ve kısa dönem (21 gün)

etanol içinde Simvastatin uygulaması ile karşılaştırıldığında kemik kalınlığında önemli miktarda artış sağlandığı sonucuna ulaşmıştır (168). Son yıllarda yapılan insan çalışmalarında lokal olarak uygulanan simvastatin ve ALN'nin periodontitisin klinik ve radyografik parametrelerini geliştirmede etkili olduğu bildirilmiştir (168).

Simvastatinin doza bağlı olarak vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salınımını artırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar VEGF salınımını stimüle ederek statinlerin osteoblast farklılaşmasını ve kemik formasyonunu artırabildiğini belirtmiştir (169). İn vivo olarak kemik formasyonu oluşturabilmesi simvastatinin lokal konsantrasyon miktarına ve taşıyıcı sisteme bağlıdır (171). Taşıyıcıların, mezenkimal hücre infiltrasyonu için matriks oluşumunu sağlaması, hücre büyümesi ve farklılaşması için substrat sağlanması gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Taşıyıcı sistem aynı zamanda yeni oluşan kemiğin şeklini tayin etmede yardımcı olmaktadır. Optimum taşıyıcının kemik büyümesine engel olmayacak şekilde çözünmeli ve fibröz doku oluşumunu önlemelidir. Farklı taşıyıcılar uygulanarak hayvanlar üzerinde yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (172).

2.4. Kitosan

Kitosan $\beta(1-4)$ glukozamin (2-amino-2-deoksi-D-glukoz)-N-asetil-Dglukozamin (2-asetamido-2-deoksi-D-glukoz); kitin maddesinden elde edilebilen doğal bir polimerdir. Doğada selülozdan sonra en çok bulunan protein olan kitin, deniz kabuklularının ve mantarların hücre duvarında yer almaktadır. Kitosan, kitinin yüksek alkali ortamda kısmi deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Kaynağına ve hazırlanış işlemlerine bağlı olarak moleküler ağırlığı 300 kD ile 1000 kD aralığında değişmektedir. Ticari olarak ise %50 ile %90 arasında değişen deasetilasyon derecelerine sahip formları bulunmaktadır. Kitosan, kristalin yapıda bir amino-polisakkarit olup pH 7'nin üstünde suda çözünmez formdadır. Bununla beraber, seyreltik asitlerde (pH<6), serbest amino grupları protonlaşır ve kitosan suda çözünür forma girmektedir. Bu pH bağımlı çözünürlük, ılımlı koşullarda kitosana kolay işlenebilme özelliği sağlamaktadır (173).

Muzzarelli ve ark, kitosanın bağ dokusu elemanlarından glukozaminoglikan (GAG) benzeri yapısıyla, yara iyileşmesi sırasında dokunun stabilitesini ve yapısını desteklediğini ve üç boyutlu bir iskele oluşturduğunu bildirmişlerdir (174). Lahiji ve ark. kitosan kaplı plastik yüzeylerde osteoblastların canlılıklarını %90 oranında koruduklarını, osteoblastik hücre morfolojilerini ve fonksiyonlarını sürdürdüklerini göstermişlerdir (175). Araştırmacılar bu bulgularla, osteoblastik hücrelerin kullanıldığı doku mühendisliği çalışmalarında kitosanın uygun bir taşıyıcı olduğu sonucuna varmışlardır. Kitosanın katyonik yapısı, hücre yapışması için önemli bir faktör olup deasetilasyon derecesi de hücre yapışma mekanizmasını etkilemektedir. Kitosanın yara iyileşme süreci üzerindeki olumlu etkilerinden birisi de antibakteriyel ve antifungal özelliğinin olmasıdır. Kitosanın; *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ve *Porphyromonas gingivalis* gibi önemli periodontopatojenler, *Streptococcus mutans* ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etkileri olduğu bildirilmiştir (176). Antibakteriyel özellikleri kitosanın in vivo kullanımlar için uygunluğunu desteklemektedir. Kitosanın biyomateriyal olarak kullanıldığında başarısını etkileyen diğer bir faktör, materyalin biyobozunurluğudur. Kitosanın bozunum hızının, deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı gibi faktörlerle kontrol edilebilir oluşu, doku iskelesi materyali olarak kullanılması açısından önemli bir avantajdır. Bunun yanı sıra, kullanılan materyalin gözenek boyutu doku iskelesi uygulamalarında işlemin başarısını önemli ölçüde etkilemektedir (177).

Kitosan osteokondüktif özelliklere sahip, hemostatik etkisi olan doğal, bioparçalanabilen, nontoksik bir polimerdir ve yara iyileşmesini artırmaktadır (178). Biyoyumnluluk ve düşük toksik özellikleri nedeni ile ilaç uygulamalarında taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (179). Kitosan jel, damla, kolloid, fiber şeklinde kullanılabilir. Kitosan kontrollü yavaş salınım çalışmalarında mikrokapsül, porozblok veya jelatin şeklinde taşıyıcı olarak kullanılabilir (24).

Gözenekli kitosan doku iskeleleri çok farklı yöntemlerle üretilmektedir. Bu yöntemler arasında “dondurarak kurutma” yöntemi pek çok araştırmacı tarafından başarıyla uygulanmış ve 100-300 µm aralığında gözenek boyutu elde edilmiştir. Söz

konusu yöntemde, oluşan buz kristalleri donmuş kitosan çözeltisinden liyofilizasyon sonucu uzaklaştırılarak gözenekli ve gözenekler arası içsel bağlantıları olan matris yapı elde edilmesi mümkün olmaktadır. Elde edilen kitosan matrisin etkin olarak kullanılabilmesi için hazırlanan iskele, çeşitli biyolojik aracı moleküller ile modifiye edilebilmektedir. Kemik doku mühendisliğinde, osteoindüktif büyüme faktörlerinin iskele ile birleşmesi sonucu, osteojenik hücreler için uygun osteoindüktif ortam yaratılacağı bilinmektedir. Dolayısıyla, BMP gibi osteoindüktif büyüme faktörleri ve bFGF gibi çeşitli biyosinyal moleküllerinin doku iskeleleriyle birleştirilmesi, kemik doku oluşumu için önemli bir basamaktır (173). Kolkkevold ve ark, farelerden elde edilen kök hücre kültürlerine asetik asitte çözülerek uygulanan 2 mg/ml'lik kitosanın, kontrol grubuna göre iki kat daha fazla mineralize nodül oluşumunu sağladığını göstermişlerdir (21). Lee ve ark, kemik rejenerasyonu için dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen kitosan iskelelerden PDGF-BB büyüme faktörü salım kinetiğini incelenmişler ve kullanılan modifiye edilmiş kitosan iskeleden büyüme faktör salımının 21. güne kadar devam ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, kraniyal defektlere yerleştirilen PDGF-BB yüklü kitosan sünger uygulamasının kemik rejenerasyonunu artırdığını da göstermişlerdir (20). Seol ve ark, tarafından yapılan çalışmada, dondurarak kurutma yöntemiyle üretilmiş kitosan doku iskelesinin kemik oluşumu üzerine etkisi incelenerek, 100-200 µm aralığında elde edilen gözenek boyutunun hücre çoğalmasına olanak sağladığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla in vitro ortamda kemik oluşumu için, kitosan doku iskelesinin etkin bir şekilde kullanılabileceği vurgulanmıştır (180). Ho ve ark, tarafından yapılan çalışmada, dondurarak kurutma yöntemiyle, RGD (Arg-Gly-Asp) ile immobilize edilen kitosan doku iskelelerinin üretimi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda, RGD ile immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin osteoblast kültür çalışmalarında ve kemik doku rejenerasyonunda etkili olduğu saptanmıştır (181).

Literatürde rhBMP-2 ve kitosanın osseointegrasyonu artırmak amacı ile titanyum kaplama materyali olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (182,183).

Abarrategi ve ark. kitosan filmin rhBMP-2 taşıyıcısı olarak salınım profilini incelemiş ve titanyum kaplama materyali olarak kullanımı üzerine bir çalışma yapmıştır. Farelerin sırt kaslarına 6 mm çapında rhBMP-2/kitosan kaplı implantlar

yerleştirilmiştir. İmplant başına 4 µm ve 100 µg rhBMP-2 kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, kitosan filmler hücre adezyonu, farklılaşma ve materyal özellikleri açısından yeterli özelliklere sahiptir. İn vivo ve in vitro olarak kitosan/rhBMP-2 filmin titanyum materyali için umut verici osteoindüktif özelliği olan bir kaplama olduğu sonucuna ulaşılmıştır (182). Abarrageti ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada tavşanların tibiasında 3.75 mm çapında açılan defektlere rhBMP-2/kitosan film kaplı titanyum implantlar yerleştirmiştir. 3 haftalık değerlendirmenin sonunda rhBMP-2/kitosan film kaplı implantlarda daha fazla kemik oluşumu görüldüğü bildirilmiştir (183).

2.5. Histolojik değerlendirme kriterleri

2.5.1. Enflamasyon:

Canlı dokuların çeşitli zedelenmelere karşı gösterdiği bir reaksiyondur. Enflamasyon, koruyucu bir yanıttır ve temel amacı, organizmayı hem hücre zedelenmesinin baş etkeni olan mikrop ve toksinlerden korumak hem de, zedelenmenin sonuçları olarak ortaya çıkan nekrotik hücre ve doku artıklarından temizlemektir. Başlangıçtaki iltihabi stimulus hücrelerden “kimyasal medyatör” ler olarak adlandırılan bazı maddelerin açığa çıkmasına neden olur. Bu medyatörler, vasküler ve hücrel yanıtın ortaya çıkmasını sağlamaktadır. İltihabi yanıtı başlatan medyatörlerin çıkışına bakteriler neden olduğu kadar, nekrotik hücre ve dokuların kendileri de neden olabilir. Enflamasyon, rejenerasyon süreci ile iç içedir. Enflamasyon tahrip etmeye, sulandırmaya veya zedeleyici etkeni izole etmeye çalışırken, aynı zamanda sırayla bir dizi olayları da başlatarak hasar gören dokuyu onarmaya çalışır (184).

2.5.2. Fibrozis

Enflamasyon oluşumu ile zedelenen doku parankimal hücre rejenerasyonu ile yenilenir veya fibroblastik skar dokusu (nedbeleşme) ile defekt alanı doldurulur. Defekt

açılmasını takiben bölgede akut inflamatuvar reaksiyon gelişmektedir. Onarım yara yerinde defekt içine dolan kan ile başlamaktadır. Kan ve lenf damarları parçalanarak dokular arasına kan ve lenf sıvısı birikiminin ardından bölgede hematoma oluşmaktadır. Burada kümelenen trombositler ve koagülasyon sistemi etkisiyle pıhtılaşır. Ortaya çıkan bu koagulum kitlesi içinde fibrin liflerinden oluşan bir ağ şekillenir. Zarar gören doku hücreleri ile çevredeki mast hücrelerinden salgılanan histamin ve diğer enzimler, çevredeki kapillerlerde vasodilatasyona neden olur. Serum eksudasyonu, beyaz hücreler ve bunu takiben makrofajlar zedelenen bölgede toplanır. Çevrede toplanan bu hücrelerden salgılanan bazı kimyasal medyatörlerin etkileriyle fibroblastların proliferasyonu ve büyümeleri hızlanmaktadır. Hematomun çevresindeki damarlardan hematoma içine fibroblast infiltrasyonu gelişmektedir. Mevcut fibrin pıhtısı içine fibroblastlarla birlikte yeni oluşan kapillerler invaze olur. İki-dört gün içinde, iyileşmenin temel işareti olan “granulasyon dokusu” ortaya çıkar. Bu terim; yumuşak, kolay parçalanabilir ve makroskopik görünümde pembe- kırmızı granüller bir yapıda olmasından dolayı kullanılmaktadır. Özel bir tip doku olan granulasyon dokusunda her bir granül, ayrı bir grup kapiller yumağı yansıtmaktadır. Bunun histolojik görünümü; gevşek dizilimli-ödemli ekstrasellüler matriks içinde, fibroblastların proliferasyonu ve yeni oluşmuş ince duvarlı kapiller yumak ile karakterizedir. Az sayıda iltihabi elemanlar vardır. Kontrollü fibrin birikimi, granulasyon dokusunun oluşumu için gereklidir ve bu granulasyon dokusu da normal yara iyileşmesi için şarttır. Aşırı miktarlardaki fibrinin, hücre migrasyonu üzerinde inhibitör etkisi vardır ve bu nedenle fazla fibrin, yara iyileşmelerinde geçikmelere neden olur (17). Kemik iyileşmesinin ikinci fazında granulasyon dokusu, meydana gelecek sert doku için bir iskelet görevi görmektedir. Periosttaki istirahat halindeki hücreler uyarılarak yeni kemik yapımına başlamaktadır (185).

2.5.3. Yabancı cisim reaksiyonu

Cerrahi işlem sırasında kullanılan her türlü yabancı materyal, sıçanların kemirgen hayvanlar olması nedeniyle kontaminasyona bağlı olarak örneklerde deneğe ait kıllar gibi maddeler yabancı cisim reaksiyonu oluşturabilmektedir (186).

2.5.4. Nekroz

Canlı bir organizmada hücre ve dokunun patolojik ölümü nekroz olarak adlandırılmaktadır. Nekrozu yapan başlıca etken iskemi, yani kanlanma bozukluğudur. Isı değişimleri (yanma ve donma) ile zehirler ve bazı bakteriler sık rastlanan nekroz nedenleri olarak gösterilmektedir (187).

2.5.5. Kalan greft

Greft yerleştirildikten sonra deney süresi sonunda doku tarafından emilmeyen, rezorbe olmayan ve kemikleşmeden kalan greft materyali (188).

Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda oluşturulan deneysel kemik defektlerine, yavaş salınan biyolojik olarak eriyebilen mikroküre şeklinde kitosan taşıyıcı materyal kullanılarak simvastatin veya rhBMP-2 uygulanması sonrasında histolojik ve histomorfometrik yöntemlerle kemik oluşumunu değerlendirmek, bu faktörlerin kemik rejenerasyon kapasitelerini hayvan modelinde karşılaştırmak ve simvastatinin ve rhBMP-2'nin bu kemik defektlerinin tedavisindeki rolünü incelemektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya ait deneysel cerrahi prosedür 'İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29/09/2011 tarihli ve 2011/118 sayılı izni ile İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Üretim ve Cerrahi Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi.

3.1. GEREÇ

Çalışmamızda kullanılan gereçler listesi aşağıdaki gibidir:

- 5 kutu Bone Morfogenetik protein 2 human B3555 (Sigma-Adrich, Missouri, Amerika) ürün numarası:B3555-10UG
- Simvastatin (Xiamen Fine Chemical Import & Export, Xiamen, Çin)
- Kitosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 20 adet 4 aylık erkek Wistar-Albino cinsi 300 ± 20 g ağırlığında erkek sıçan
- Ketamin-HCL (Alfamine® i.m. Alfasan İnt. B.V.Woerden, Hollanda)
- Ksilazin-HCL (Alfazyne® i.m. Alfasan İnt. B.V.Woerden, Hollanda)
- Steril ameliyat seti
- 3.0 ipek dikiş ipliği
- %0.9 serum fizyolojik
- Metabolik kafesler
- Steril cam gode
- Oral cerrahi mikromotoru, cerrahi piyasemen ve fizyodispenser
- 3 mm çapında yuvarlak uçlu paslanmaz çelik frez (Gebr. Brasseler GmbH&Co.KG.Lemgo,Almanya)
- Formaldehit (%10'luk formol)
- Derin dondurucu

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deney Hayvanları ve grupları

Çalışmamızda deney hayvanlarının ameliyatlarını İ.Ü. Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı laboratuvarında, kemik dokuların histopatolojik incelemelerini İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, kitosan temelli doku iskelelerinin hazırlanması ile simvastatin ve BMP yüklenmesi İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışma İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri'nce desteklenmiştir. Bu proje kapsamındaki hayvan deneyleri İ.Ü. Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurul onayı almıştır (proje no:19647).

Çalışmamızda kullanılan 20 adet Wistar-Albino cinsi 300 ± 20 g ağırlığında 4 aylık erkek sıçanlar kullanıldı. Denekleri bağıl nem oranı %40-60, 21°C sıcaklıkta 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamı sağlayacak şekilde otomatize edilmiş odada, deney süreleri boyunca metal kafesler içerisinde muhafaza edilmişlerdir. Deney hayvanları İstanbul Yem Sanayii tarafından üretilen standart laboratuvar yemi ve çeşme suyu ile ad libitum beslenmişlerdir (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Deney hayvanlarına verilen katı yemin içeriği

Ham protein	En az	% 24
Ham selüloz	En az	% 7
HCl de çözünmeyen kül	En çok	% 2
Kalsiyum	En az-en çok	% 1- % 2.8
Fosfor	En az	% 0.9
Sodyum	En az	% 0.5- % 0.7
Sodyum klorür	En çok	% 1
Lizin		% 1
Metiyonin	En az	% 0.6
Enerji	2650kcal/kg	

Çalışmamızda kullanılan deney hayvanlarının sağ ve sol tibiaları deney protokolüne dahil edilmiştir. Araştırmamızda 20 deney hayvanı kullanılmıştır. Denekler yerleştirilen greft materyaline göre 4 gruba ayrılmıştır.

1. Grup: kontrol grubu olarak boş bırakılmıştır.
2. Grup: 1,5µg BMP-2 içeren kitosan nano partikül taşıyıcı ile yerleştirilmiştir.
3. Grup: 16,5mg kitosan nano partikül taşıyıcı yerleştirilmiştir.
4. Grup: 0,5 mg simvastatin içeren kitosan nano partikül taşıyıcı ile yerleştirilmiştir.

Deney hayvanlarının sağ tibiasına 2, sol tibiasına 2 adet olmak üzere toplam 4 adet kemik defekti oluşturulmuştur. Uygulanan materyallerin farklı zaman birimlerindeki etkinliklerini incelemek üzere denekler 14. günde ve 28. günde sakrifiye edilmiştir. Denek sayısının belirlenmesinde önceden yapılmış olan çalışmalarda fark değerler referans alınmıştır. Bu amaçla 5 ve 10 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 (189).

3.2.2. Boş kitosan partiküllerinin hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan kitozan mikropartikülleri, iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır. Mikropartiküllerin hazırlanmasında orta molekül ağırlıklı kitosan (MW:190-310kDa, deacetylation degree:75-85%), (Sigma-Aldrich, Missouri, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılmıştır. Kitosan, %1 (h/h)lik asetik asit içerisinde çözündürüldü ve denge konsantrasyonuna ulaşması için 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Çözünmeyen maddeleri veya kirlilikleri uzaklaştırmak amacıyla, kitozanın asetik asit içerisindeki %0.5 (a/h) lik çözeltisi 0,45µm'lik membran filtreden süzüldü. Mikropartikül formülasyonlarının hazırlanmasında, çapraz bağlayıcı olarak %0.5 (a/h)liktripolifosfat (TPP;Sigma-Aldrich, Missouri, Amerika Birleşik Devletleri) çözeltisi kullanılmıştır. Nanopartiküller, 3:1 (kitosan:TPP) oranında

hazırlanmıştır. Mikropartikülleri hazırlamak için, %0.5 (a/h) likkitozan çözeltisine 600 rpm de manyetik karıştırıcıda karıştırılırken damlalık yardımıyla dakikada 1 mL hızda TPP çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşan partiküllerin sertleşmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırmaya devam edilmiştir ve daha sonra partikül süspansiyonu, püskürterek kurutma yöntemi ile (akış hızı: 4 mL/dk, giriş sıcaklığı: 160°C, çıkış sıcaklığı: 90°C, aspirasyon: 400NI/saat) Mini SprayDryer'da (Buchi 190, İsviçre) kurutulmuştur. Elde edilen mikropartiküler, ^{60}Co kaynağından yayınlanan gamma ışınlarıyla 25 KGy'de Gamma-Pak Sterilizasyon Sanayi ve Ticaret A.Ş. de sterilize edilmiştir ve kullanıma kadar 4°C de saklanmıştır.

3.2.3. Simvastatin içeren kitosan nano partiküllerinin hazırlanması

Simvastatin (Xiamen Fine Chemical, Xiamen, Çin) içeren kitozan mikropartikülleri, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında boş kitosan partiküllerinin hazırlanmasında kullanılan yöntem ile hazırlandı. simvastatin içeren %0.5 (a/h) likkitozan çözeltisine, 600 rpm de manyetik karıştırıcıda karıştırılırken, damlalık yardımıyla dakikada 1 mL hızda TPP çözeltisi ilave edildi. Oluşan partiküllerin sertleşmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırmaya devam edildi ve daha sonra partikül süspansiyonu, püskürterek kurutma yöntemi ile (akış hızı: 4 mL/dk, giriş sıcaklığı: 160°C, çıkış sıcaklığı: 90°C, aspirasyon: 400NI/saat) Mini SprayDryer (Buchi 190, İsviçre) da kurutuldu. Elde edilen mikropartiküler, ^{60}Co kaynağından yayınlanan gamma ışınlarıyla 25 KGy'de Gamma-Pak Sterilizasyon Sanayi ve Ticaret A.Ş. de sterilize edildi ve kullanıma kadar 4°C de saklanmıştır.

3.2.4. BMP-2 içeren kitosan partiküllerinin hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan BMP-2 (SigmaAldrich, B3555-10UG, Missouri, Amerika Birleşik Devletleri) içeren kitosan-fukoidan mikropartikülleri polielektrolit kompleksi oluşturma yöntemi ile hazırlanmıştır. Pozitif yüklü polimer kitosanın %1 (a/h)lik asetik asit içerisindeki %0.5'lik çözeltisi hazırlanmıştır. Negatif yüklü

fukoidanın (Sigma-Aldrich, Missouri, Amerika Birleşik Devletleri) %0.5(a/h)'lik çözeltisi ise distile su içerisinde hazırlanmıştır. BMP-2, fukoidan çözeltisine eklendi ve 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Mikropartiküller, 2:1 (kitozan:fukoidan) oranında hazırlanmıştır. Mikropartiküleri hazırlamak için, 600 rpm de manyetik karıştırıcıda karıştırılan kitozan çözeltisine damlalık yardımıyla dakikada 1 mL hızla BMP-2 içeren fukoidan çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan partiküllerinin stabilizasyonu için karıştırma işlemine 2 saat devam edilmiştir ve daha sonra liyofilizasyon (Virtis, Advantage Plus, İngiltere) işlemi ile kurutulmuştur. Elde edilen mikropartiküler, ⁶⁰Co kaynağından yayınlanan gamma ışınlarıyla 25 KGy'de Gamma-Pak Sterilizasyon Sanayi ve Ticaret A.Ş. de sterilize edilmiştir ve kullanıma kadar 4°C de saklanmıştır.

3.2.5. Cerrahi Uygulamalar

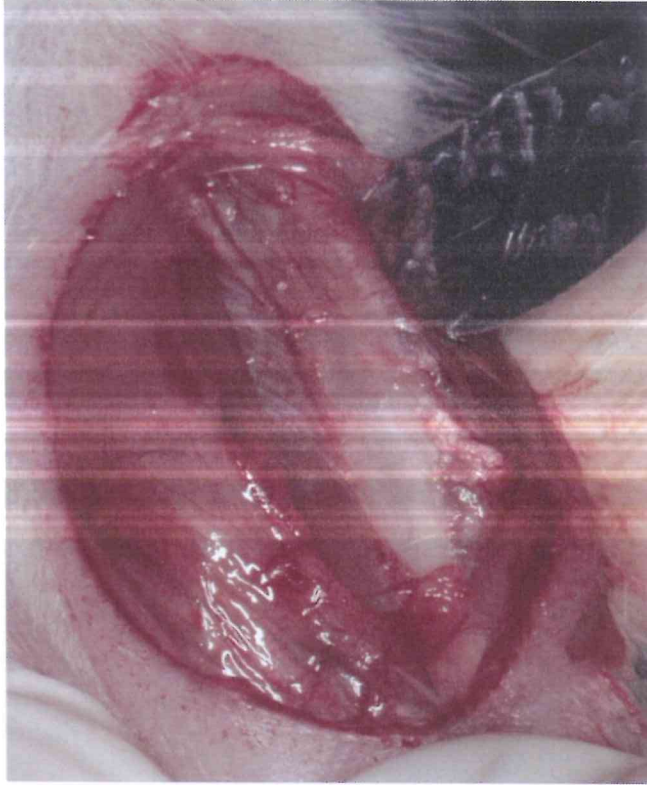
Cerrahi girişimler, denek başına 45mg/kg ketamin hidroklorür (Alfamine® i.m. Alfasan International B.V. Woerden, Hollanda) ve 5-10mg/kg IM ksilazin hidroklorür (Alfazyne® %2 i.m. Alfasan International B.V. Woerden, Hollanda) uygulaması ile genel anestezi altında gerçekleştirilmiştir. Standart postürde tespit edilen deneklerin sağ ve sol tibialarının medial yüzleri tıraşlanıp povidon iyot solüsyonu ile silindi. Sağ ve sol bacak fleksiyon pozisyonuna getirilerek tibianın medial yüzeyine ulaşmak için 20-25 mm uzunluğunda longitudinal yönde cilt, cilt altı kesisi yapıldı. Künt diseksiyon ile tibiaların medial yüzleri açığa çıkarılıp yumuşak dokular ekarte edildi. Tur motoruna bağlı piyasemene takılan yuvarlak uçlu paslanmaz çelik frezle, steril serum fizyolojik çözeltisi irrigasyonu altında 5 mm aralıklarla 2 adet olmak üzere dış çapı 3 mm olan kemiğin korteks ve medulla tabakalarını içine alan dairesel kemik defektleri oluşturuldu. Defekt derinliğinin periodontal sond yardımı ile kontrol edilmesinin ardından steril cam godeye konan greft materyalleri taşmayacak şekilde defektlere yerleştirildi. Yerleştirilirken greft partiküllerini ezmemek için aşırı basınçtan kaçınıldı. Operasyon sahası 3.0 ipek dikişlerle primer olarak kapatılmıştır. Denekler 14. ve 28. günlerde yüksek doz Ketamine HCL ve Xylazine enjekte edilerek kurban edilmektedir.

Cerrahi işlem sonrası deney hayvanlarına antibakteriyel ajan olarak 3 gün boyunca günde tek doz vankomisin (13,3mg/kg/gün) İV (Vancotek 1.0 g I.V, Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş) verilmiştir. Vankomisin verilme amacı antibiyotiğin %50'sinin plazma proteinlerine yapışması, kemik enfeksiyonlarında ve stafilokok enfeksiyonlarında kullanılması ile post operatif enfeksiyonu engellemektir (199). Uygulanan materyallerin farklı zaman birimlerindeki etkinliklerini incelemek üzere denekler 14. günde ve 28. günde kurban edilmektedir. Defektlerin bulunduğu tibia kesilerek %10 formalin solusyonunda histolojik işlemlere başlanması için muhafaza edilmiştir.

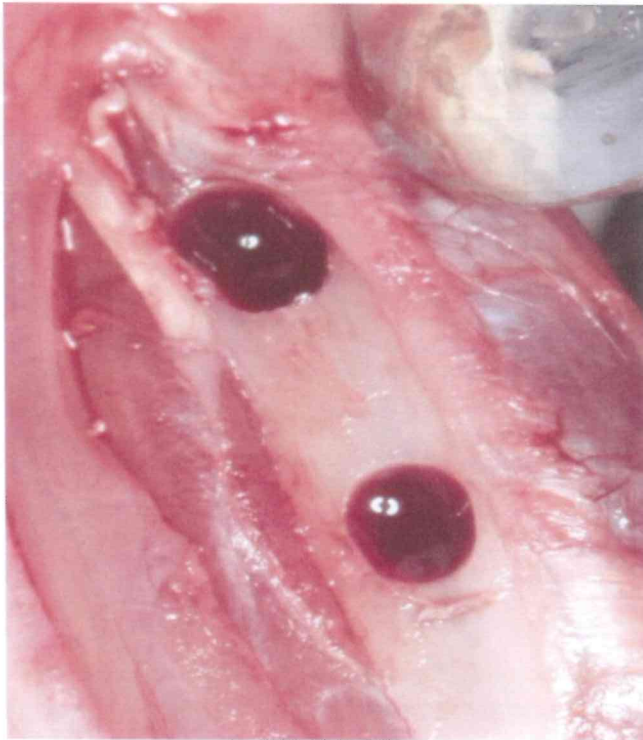
3.2.6. Histolojik ve Histomorfometrik Analiz

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Patoloji Laboratuvarına gönderilen materyaller %10'luk tamponlanmış formalinde 1 hafta süre ile fiske edilmiştir. Fiksasyondan sonra tüm materyal %50'lik formik asit ve %20'lik sodyum sitrat çözeltilerinden 1'er ölçek alınarak hazırlanan solusyonda dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifiye edilen parçalar rutin doku takibinden geçirildikten sonra hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5-7 mikron kalınlığındaki kesitler hematoksilin ve eozin yöntemiyle boyanıp ışık mikroskopunda incelenmiştir.

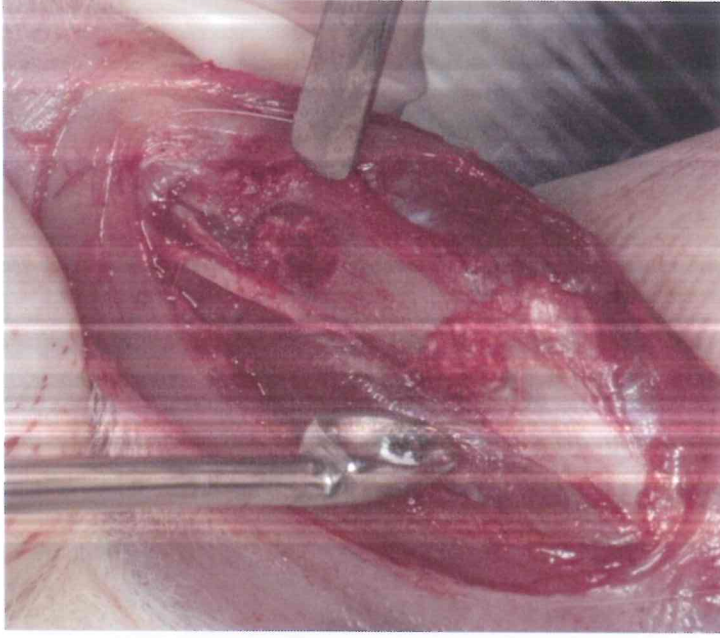
Kesitler enflamasyon, nekroz, fibrozis, yabancı cisim reaksiyonu, greft materyalinin varlığını sürdürmesi ve yeni kemik yapımı kriter alınarak incelendi. Bu bulgulara bir büyük büyütme alanında kapladıkları bölgenin yüzdesine göre %1-30 (+), %31-60 (++) ve <%60 (+++) olmak üzere değer verildi. Örneklerin kesilmesi esnasındaki kayıplar tam olarak belirlenemeyeceği için kalan greft miktarı varsa (+) yoksa (-) olarak belirtildi. İnceleme sırasında, yeni oluşan kemik dokusunun kapladığı alan yüzdeleri 'Olympus Analysis Five' (Olympus Corporation Tokyo, Japan) görüntü analiz programı kullanılarak incelendi. Ölçüm işlemi her bloktan elde edilen 4'er kesitte ayrı ayrı 5 alan ölçülüp ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3-1: Deri ve periostu kaldırılmış sıçan tibiası



Şekil 3-2: Sıçan tibiasında oluşturulmuş defektler



Şekil 3-3: Greft materyallerinin defektlere yerleştirilmesi



Şekil 3-4: Ameliyat bölgesinin dikilmesi



Şekil 3-5: Sakrifikasyondan sonra defektlerin görüntüsü



Şekil 3-6: Sakrifikasyondan sonra defektlerin görüntüsü

3.2.7. İstatistiksel İnceleme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanıldı.

Çalışma verileri değerlendirilirken niceliksel verilerin karşılaştırılmasında parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Parametrelerin iki grup arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Fisher's Exact Ki-Kare testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. 14.gün bulguları

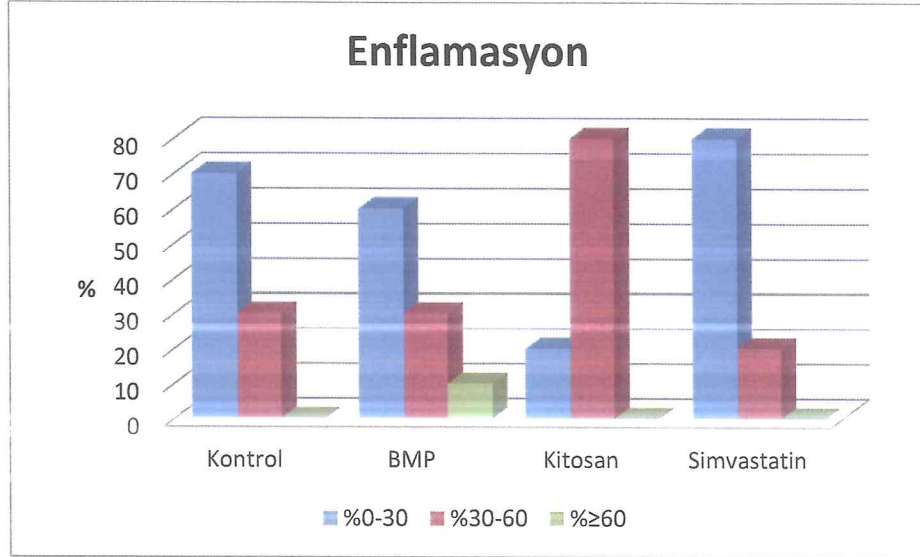
Tablo 4-1: Grupların 14. gün bulgularının değerlendirilmesi

14. Gün		Kontrol	BMP-2 içeren kitosan nanopartikül	Kitosan nanopartikül	Simvastatin içeren kitosan nanopartikül	p
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Enflamasyon	%0-30	7 (%70,0)	6 (%60,0)	2 (%20,0)	8 (%80,0)	0,060
	%30-60	3 (%30,0)	3 (%30,0)	8 (%80,0)	2 (%20,0)	
	%≥60	0 (%0,0)	1 (%10,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
Nekroz	Var	2 (%20,0)	3 (%30,0)	7 (%70,0)	2 (%20,0)	0,058
	Yok	8 (%80,0)	7 (%70,0)	3 (%30,0)	8 (%80,0)	
Fibrozis	%0-30	10 (%100,0)	0 (%0,0)	1 (%0,0)	2 (%20,0)	0,001**
	%30-60	0 (%0,0)	7 (%70,0)	9 (%90,0)	8 (%80,0)	
	%≥60	0 (%0,0)	3 (%30,0)	0 (%)	0 (%0,0)	
Yabancı cisim	Var	0 (%0,0)	9 (%90,0)	10 (%100,0)	10 (%100,0)	0,001**
	Yok	10 (%100,0)	1 (%10,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
Kalan greft	Var	0 (%0,0)	10 (%100,0)	10 (%100,0)	10 (%100,0)	0,001**
	Yok	10 (%100,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	

Ki-kare test kullanıldı

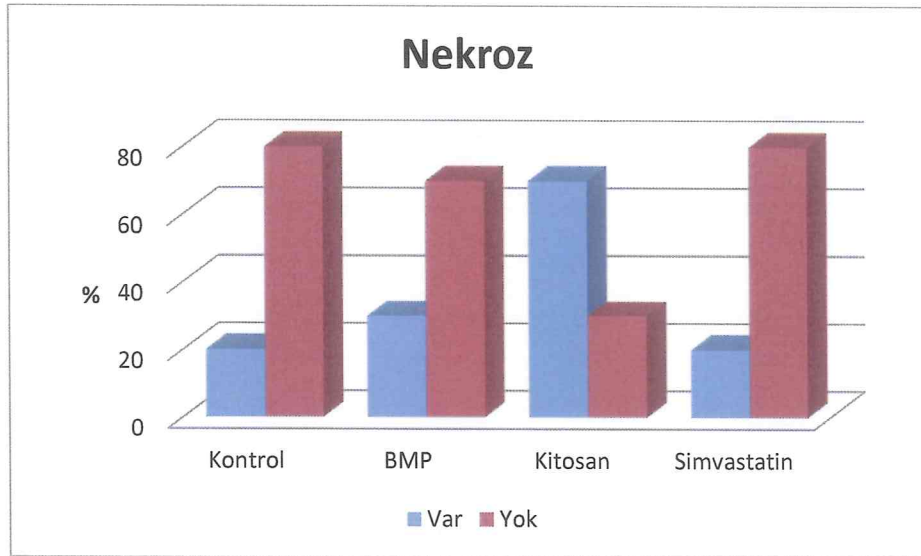
** $p < 0.01$

Grupların 14. gündeki enflamasyon düzeyleri arasında anlamlılığa yakın olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$). Anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte kitosan nanopartikül içeren grupta %30-60 düzeyinde enflamasyon görülme oranının diğer gruplardan daha yüksek oluşu dikkat çekicidir.



Şekil 4-1: 14.gün enflamasyon bulguları

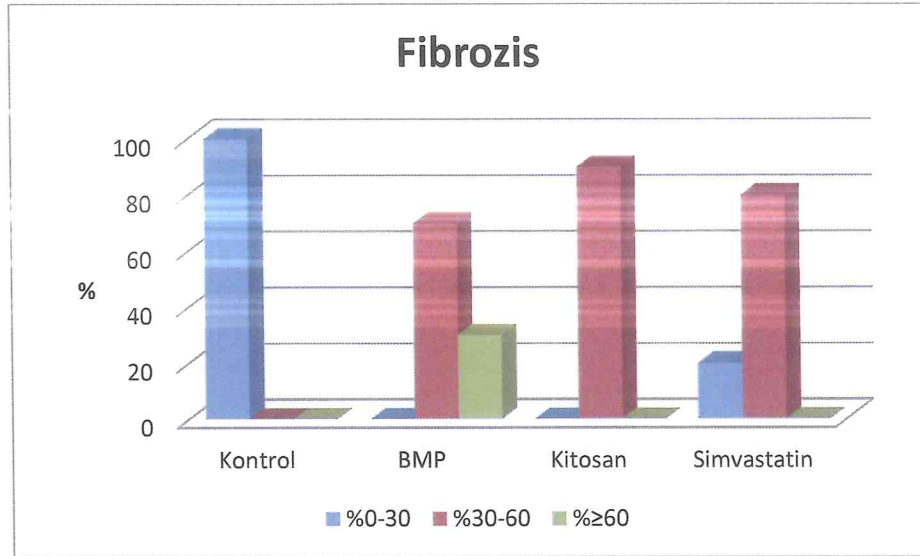
14. günde nekroz görülme oranlarına göre gruplar arasında anlamlılığa yakın olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte kitosan nanopartikül grubunda nekroz görülme oranının diğer gruplardan daha yüksek oluşu dikkat çekicidir.



Şekil 4-2: 14.gün nekroz bulguları

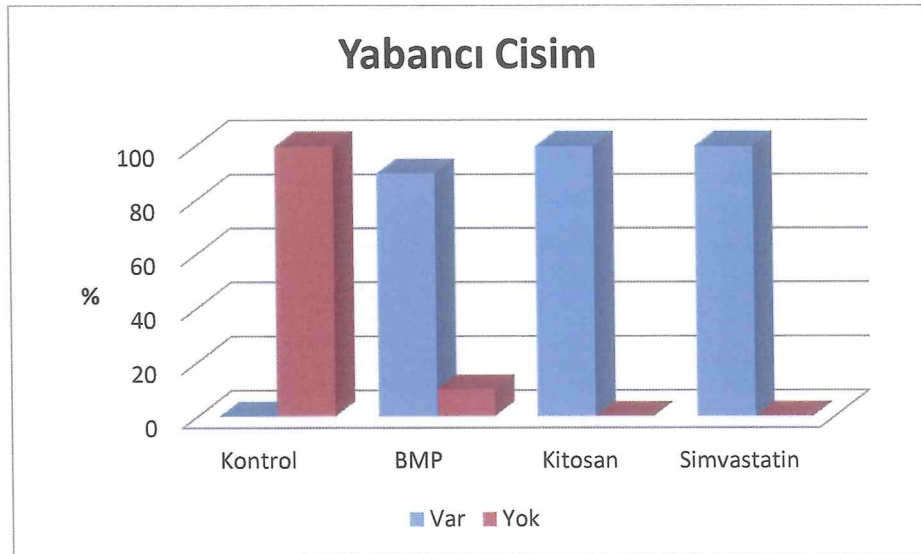
14. günde fibrozis görülme düzeylerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Kontrol grubunda tüm

deneklerde fibrozis düzeyi %0-30 arasında iken, BMP-2 içeren kitosan nanopartikül grubunda %30-60 ve %60'dan fazla, kitosan nanopartikül ve simvastatin içeren kitosan nanopartikül gruplarında ise %30-60 düzeyinde fibrozis görülme oranı yüksektir.



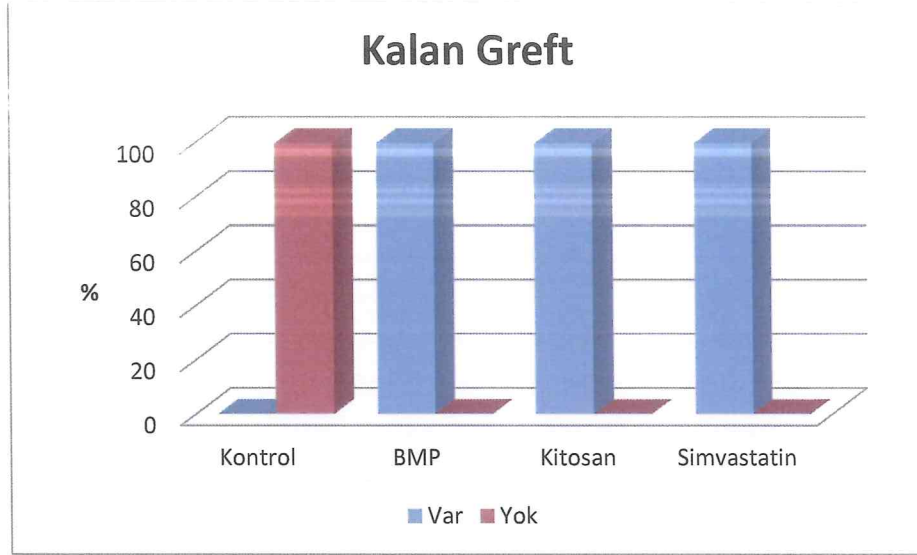
Şekil 4-3: 14.gün fibrozis bulguları

14. günde yabancı cisim görülme oranlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Kontrol grubunda hiçbir denekte yabancı cisim görülmezken, diğer gruplardaki deneklerin tamamına yakınında yabancı cisim görülmüştür.



Şekil 4-4: 14.gün yabancı cisim bulguları

14. günde kalan greft görülme oranlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Kontrol grubunda hiçbir denekte kalan greft görülmezken, diğer gruplardaki deneklerin tamamında kalan greft görülmüştür.



Şekil 4-5: 14.gün kalan greft bulguları

4.2. 28.gün bulguları

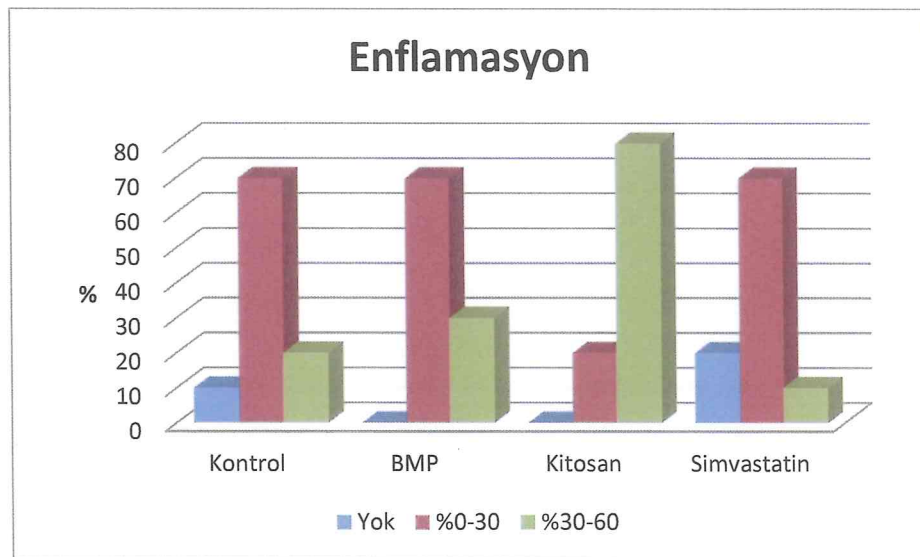
Tablo 4-2: Grupların 28. gün bulgularının değerlendirilmesi

28. Gün		Kontrol	BMP-2 içeren kitosan nanopartikül	Kitosan nanopartikül	Simvastatin içeren kitosan nanopartikül	<i>p</i>
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Enflamasyon	Yok	1 (%10,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	2 (%20,0)	0,019*
	%0-30	7 (%70,0)	7 (%70,0)	2 (%20,0)	7 (%70,0)	
	%30-60	2 (%20,0)	3 (%30,0)	8 (%80,0)	1 (%10,0)	
Nekroz	Var	1 (%10,0)	2 (%20,0)	8 (%80,0)	2 (%20,0)	0,003**
	Yok	9 (%90,0)	8 (%80,0)	2 (%20,0)	8 (%80,0)	

	Yok	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	1 (%10,0)	
Fibrozis	%0-30	2 (%20,0)	1 (%10,0)	1 (%10,0)	8 (%80,0)	0,001**
	%30-60	6 (%60,0)	9 (%90,0)	5 (%50,0)	1 (%10,0)	
	%≥60	2 (%20,0)	0 (%0,0)	4 (%40,0)	0 (%0,0)	
Yabancı cisim	Var	0 (%0,0)	6 (%60,0)	10 (%100,0)	6 (%60,0)	
	Yok	10 (%100,0)	4 (%40,0)	0 (%0,0)	4 (%40,0)	0,001**
Kalan greft	Var	0 (%0,0)	10 (%100,0)	10 (%100,0)	10 (%100,0)	
	Yok	10 (%100,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0,001**

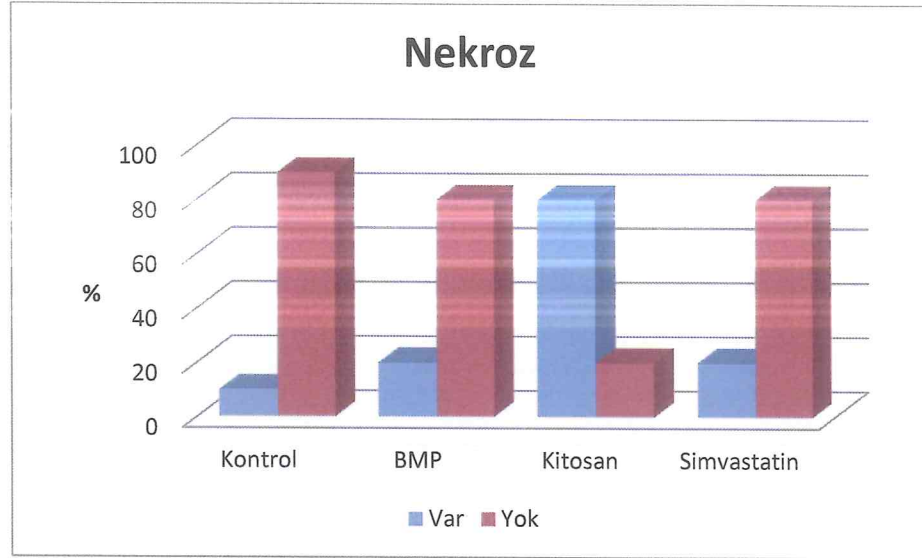
Ki-kare test kullanıldı * $p<0.05$ ** $p<0.01$

28. günde enflamasyon görülme düzeylerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$). Kontrol, BMP-2 içeren kitosan nanopartikül ve simvastatin içeren kitosan nanopartikül gruplarında %0-30 düzeyinde enflamasyon görülme oranı yüksekken; kitosan nanopartikül grubunda 28. günde %30-60 düzeyinde enflamasyon görülme oranı diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksektir.



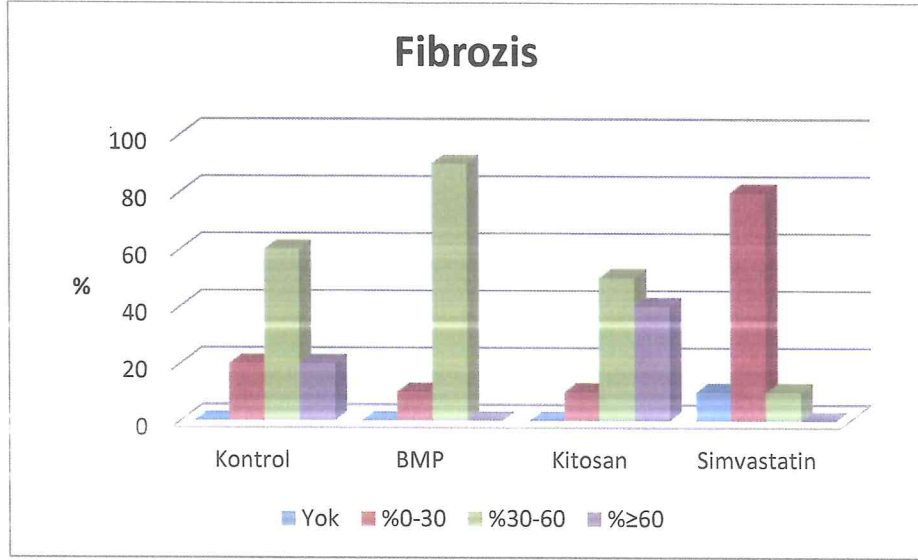
Şekil 4-6: 28.gün enflamasyon bulguları

28. günde nekroz görülme oranlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Kitosan nanopartikül grubunda nekroz görülme oranı diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksektir.



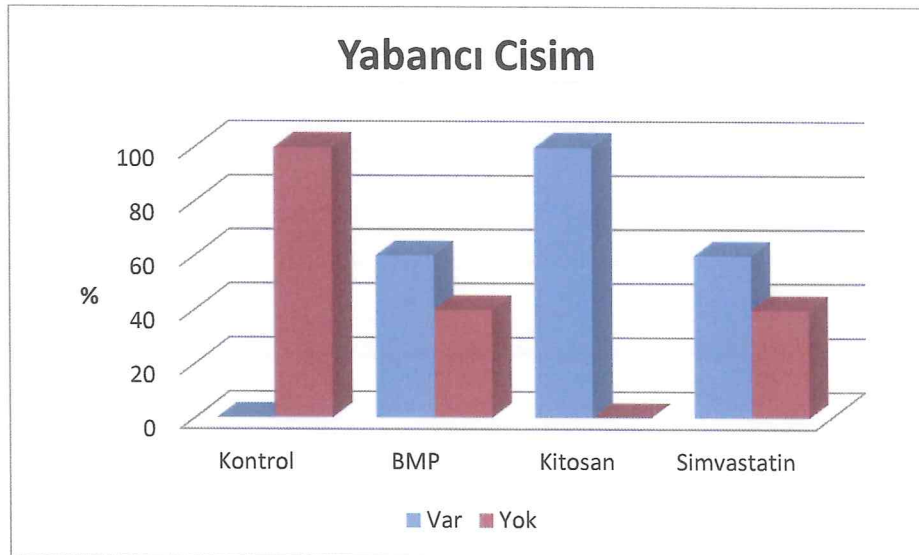
Şekil 4-7: 28.gün nekroz bulguları

28. günde fibrozis görülme düzeylerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Kontrol grubunda ve BMP-2 içeren kitosan nanopartikül grubunda 28. günde %30-60 düzeyinde fibrozis görülme oranı yüksekken; kitosan nanopartikül grubunda %30-60 ve %60'dan fazla, simvastatin içeren kitosan nanopartikül grubunda ise %0-30 düzeyinde fibrozis görülme oranı yüksektir.



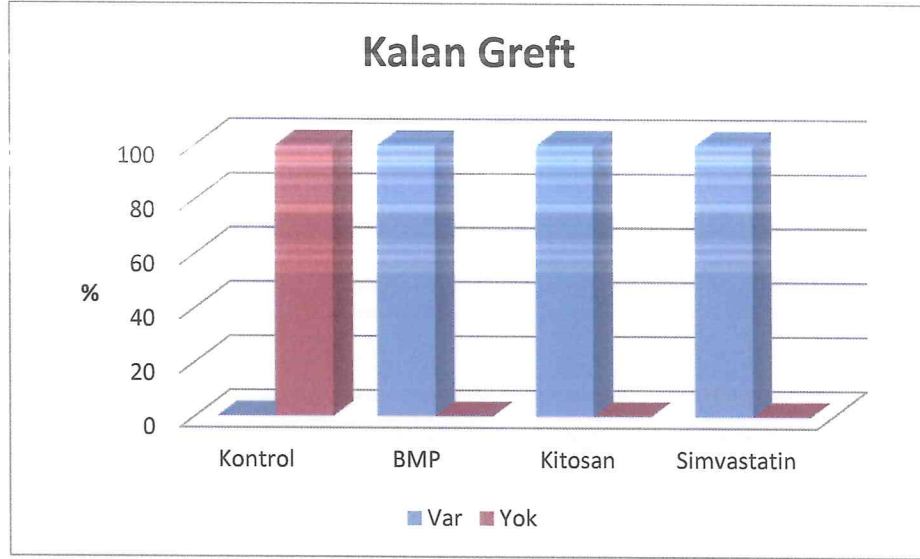
Şekil 4-8: 28.gün fibrozis bulguları

28. günde yabancı cisim görülme oranlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). Kontrol grubunda hiçbir denekte yabancı cisim görülmezken, BMP-2 içeren kitosan nanopartikül ve simvastatin içeren kitosan nanopartikül gruplarının %60'ında, kitosan nanopartikül grubunun ise %100'ünde yabancı cisim görülmüştür.



Şekil 4-9: 28.gün yabancı cisim bulguları

28. günde kalan greft görülme oranlarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Kontrol grubunda hiçbir denekte kalan greft görülmezken, diğer gruplardaki deneklerin tamamında kalan greft görülmüştür.



Şekil 4-10: 28.gün kalan greft bulguları

Tablo 4-3: Gruplarda ayrı ayrı 14. gün ve 28. gündeki enflamasyon düzeylerinin değerlendirilmesi

Enflamasyon		14. Gün n (%)	28. Gün n (%)	P
Kontrol	Yok	0 (%0,0)	1 (%10,0)	0,549
	%0-30	7 (%70,0)	7 (%70,0)	
	%30-60	3 (%30,0)	2 (%20,0)	
BMP-2 içeren kitosan nanopartikül	%0-30	6 (%60,0)	7 (%70,0)	0,584
	%30-60	3 (%30,0)	3 (%30,0)	
	%≥60	1 (%10,0)	0 (%0,0)	
Kitosan içeren nanopartikül	%0-30	2 (%20,0)	2 (%20,0)	1,000
	%30-60	8 (%80,0)	8 (%80,0)	
Simvastatin içeren kitosan nanopartikül	Yok	0 (%0,0)	2 (%20,0)	0,301
	%0-30	8 (%80,0)	7 (%70,0)	
	%30-60	2 (%20,0)	1 (%10,0)	

Ki-kare test kullanıldı

Kontrol grubunda 14. gün ve 28. günlerdeki enflamasyon görülme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

BMP-2 içeren kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerdeki enflamasyon görülme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerdeki enflamasyon görülme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Simvastatin içeren kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerdeki enflamasyon görülme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4-4: Gruplarda ayrı ayrı 14. gün ve 28. günde nekroz değerlendirilmesi

Nekroz		14. Gün n (%)	28. Gün n (%)	P
Kontrol	Var	2 (%20,0)	1 (%10,0)	1,000
	Yok	8 (%80,0)	9 (%90,0)	
BMP-2 içeren kitosan nanopartikül	Var	3 (%30,0)	2 (%20,0)	1,000
	Yok	7 (%70,0)	8 (%80,0)	
Kitosan nanopartikül	Var	7 (%70,0)	8 (%80,0)	1,000
	Yok	3 (%30,0)	2 (%20,0)	
Simvastatin içeren kitosan nanopartikül	Var	2 (%20,0)	2 (%20,0)	1,000
	Yok	8 (%80,0)	8 (%80,0)	

Fisher's Exact test kullanıldı

Kontrol grubunda 14. gün ve 28. günlerde nekroz görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

BMP-2 içeren kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerde nekroz görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerde nekroz görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Simvastatin içeren kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerde nekroz görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4-5: Gruplarda ayrı ayrı 14. gün ve 28. gündeki fibrozis düzeylerinin değerlendirilmesi

Fibrozis		14. Gün n (%)	28. Gün n (%)	<i>p</i>
Kontrol	%0-30	10 (%100,0)	2 (%20,0)	0,001**
	%30-60	0 (%0,0)	6 (%60,0)	
	%≥60	0 (%0,0)	2 (%20,0)	
BMP-2 içeren kitosan nanopartikül	%0-30	0 (%0,0)	1 (%10,0)	0,119
	%30-60	7 (%70,0)	9 (%90,0)	
	%≥60	3 (%30,0)	0 (%0,0)	
Kitosan nanopartikül	%0-30	1 (%0,0)	1 (%10,0)	0,076
	%30-60	9 (%90,0)	5 (%50,0)	
	%≥60	0 (%0)	4 (%40,0)	
Simvastatin içeren kitosan nanopartikül	0	0 (%0,0)	1 (%10,0)	0,007**
	%0-30	2 (%20,0)	8 (%80,0)	
	%30-60	8 (%80,0)	1 (%10,0)	

Ki-kare test kullanıldı

**** $p < 0.01$**

Kontrol grubunda 14. gün ve 28. günlerdeki fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$). 14. Günde tüm deneklerdeki fibrozis düzeyleri %0-30 arasında iken, 28. Günde fibrozis düzeyinin %30 ile 60 arasında olma oranı yüksektir.

BMP-2 içeren kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerdeki fibrozis görülme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

Kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerdeki fibrozis görülme düzeyleri arasında anlamlılığa yakın olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$). Anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte 14. günde %30-60 arasında fibrozis görülme düzeyi yüksekken, 28. günde %60 ve üzerinde fibrozis görülme oranının da yüksek oluşu dikkat çekicidir.

Simvastatin içeren kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerdeki fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). 14. günde %30-60 düzeylerinde fibrozis görülme oranı yüksekken, 28. günde fibrozis düzeyinin %0 ile 30 arasında olma oranı yüksektir.

Tablo 4-6: Gruplarda ayrı ayrı 14.gün ve 28.günde yabancı cisim değerlendirilmesi

Yabancı Cisim		14. gün n (%)	28. gün n (%)	p
Kontrol	Var	-	-	-
	Yok	10 (%100,0)	10 (%100,0)	
BMP-2 içeren kitosan nanopartikül	Var	9 (%90,0)	6 (%60,0)	0,303
	Yok	1 (%10,0)	4 (%40,0)	
Kitosan nanopartikül	Var	10 (%100,0)	10 (%100,0)	-
	Yok	-	-	
Simvastatin içeren kitosan nanopartikül	Var	10 (%100,0)	6 (%60,0)	0,087
	Yok	0 (%0,0)	4 (%40,0)	

Fisher's Exact test kullanıldı

Kontrol grubunda 14. gün ve 28.günlerde hiçbir denekte yabancı cisim görülmemiştir.

BMP-2 içeren kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerde yabancı cisim görülme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerde tüm deneklerde yabancı cisim görülmüştür.

Simvastatin içeren kitosan nanopartikül grubunda 14. gün ve 28. günlerde yabancı cisim görülme düzeyleri arasında anlamlılığa yakın olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Anlamlı bir farklılık

bulunmamakla birlikte, 14. günde tüm deneklerde yabancı cisim görülürken, 28. günde yabancı cisim görülme oranı %60'tır.

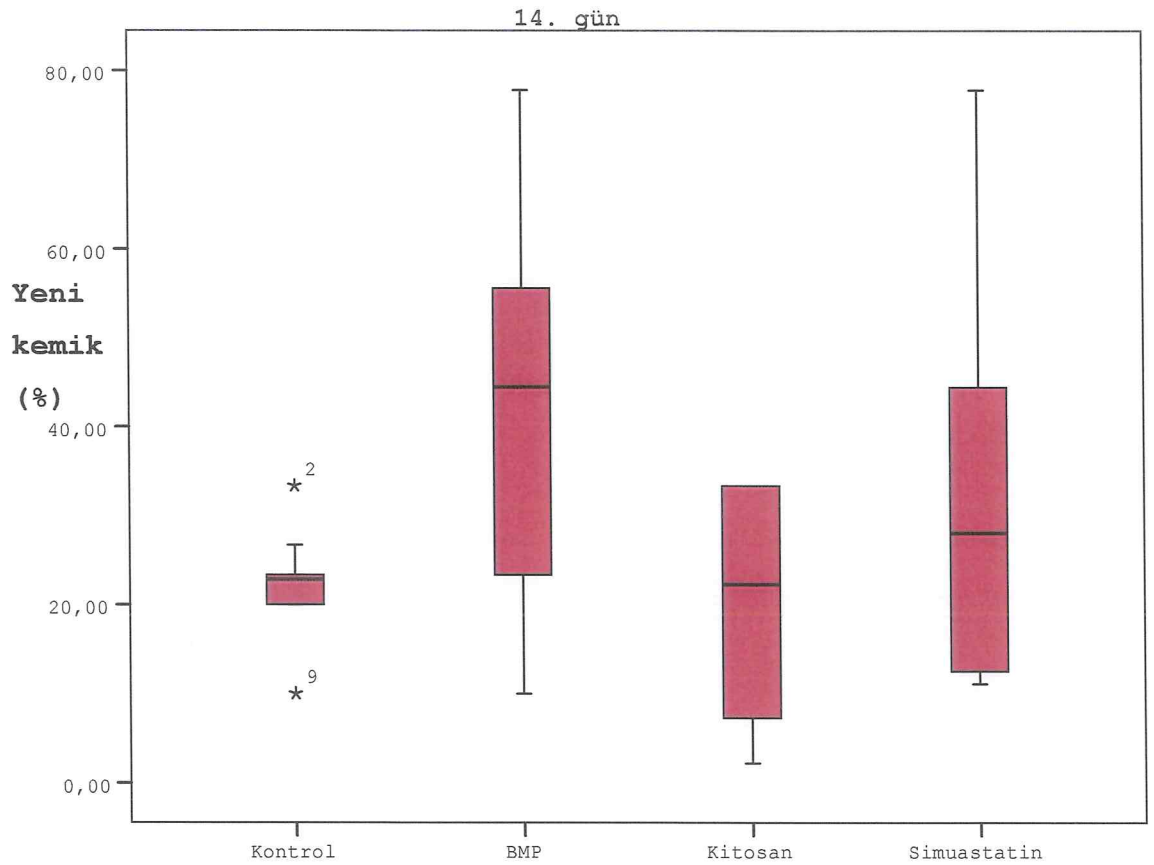
Tablo 4-7: Grupların yeni kemik yüzdesi ortalamalarının değerlendirilmesi

Yeni Kemik %	Kontrol	BMP-2 içeren kitosan nanopartikül	Kitosan nanopartikül	Simvastatin içeren kitosan nanopartikül	<i>p</i>
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
	(Medyan)	(Medyan)	(Medyan)	(Medyan)	
14. gün	22,22±5,87 (22,77)	41,22±23,42 (44,44)	20,22±11,79 (22,22)	34,41±23,65 (28,03)	0,118
28. gün	27,99±4,76 (28,33)	44,17±22,55 (44,16)	33,10±15,26 (33,33)	67,39±14,96 (70,89)	0,001**
Kruskal Wallis Test		* $p < 0.05$	** $p < 0.01$		

Tablo 4-7a: Grupların Post hoc değerlendirilmesi test sonuçları

Yeni Kemik %	
⁺⁺ <i>p</i>	
14. gün	
Kontrol / BMP	0,061
Kontrol / Kitosan	0,760
Kontrol / Simvastatin	0,447
BMP / Kitosan	0,023*
BMP / Simvastatin	0,493
Kitosan / Simvastatin	0,183
28. gün	
Kontrol / BMP	0,159
Kontrol / Kitosan	0,205
Kontrol / Simvastatin	0,001**
BMP / Kitosan	0,342
BMP / Simvastatin	0,014*
Kitosan / Simvastatin	0,001**
Mann Whitney U	
* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$	

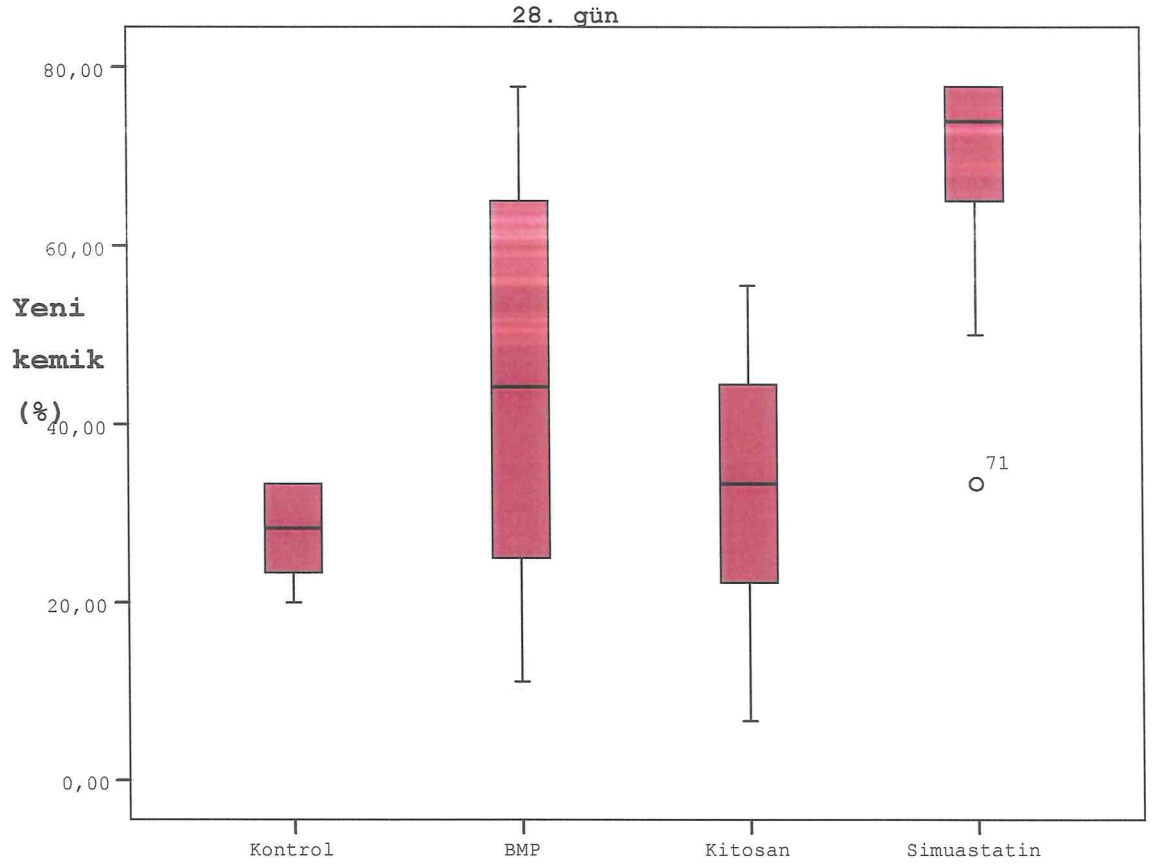
Grupların 14. Gündeki yeni kemik oluşumu yüzde ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Dört grup bir arada değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte, grupların ikili değerlendirmeleri yapıldığında BMP-2 içeren kitosan nanopartikül grubunun yeni kemik oluşumu yüzde ortalamasının, kitosan nanopartikül grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4-11: Gruplar arasında 14.gündeki yeni kemik yüzde dağılımı

Grupların 28. gündeki yeni kemik oluşumu yüzde ortalamaları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Simvastatin içeren kitosan nanopartikül grubunun 28. gündeki yeni kemik oluşumu yüzde ortalaması, kontrol, BMP-2 içeren kitosan nanopartikül ve kitosan nanopartikül

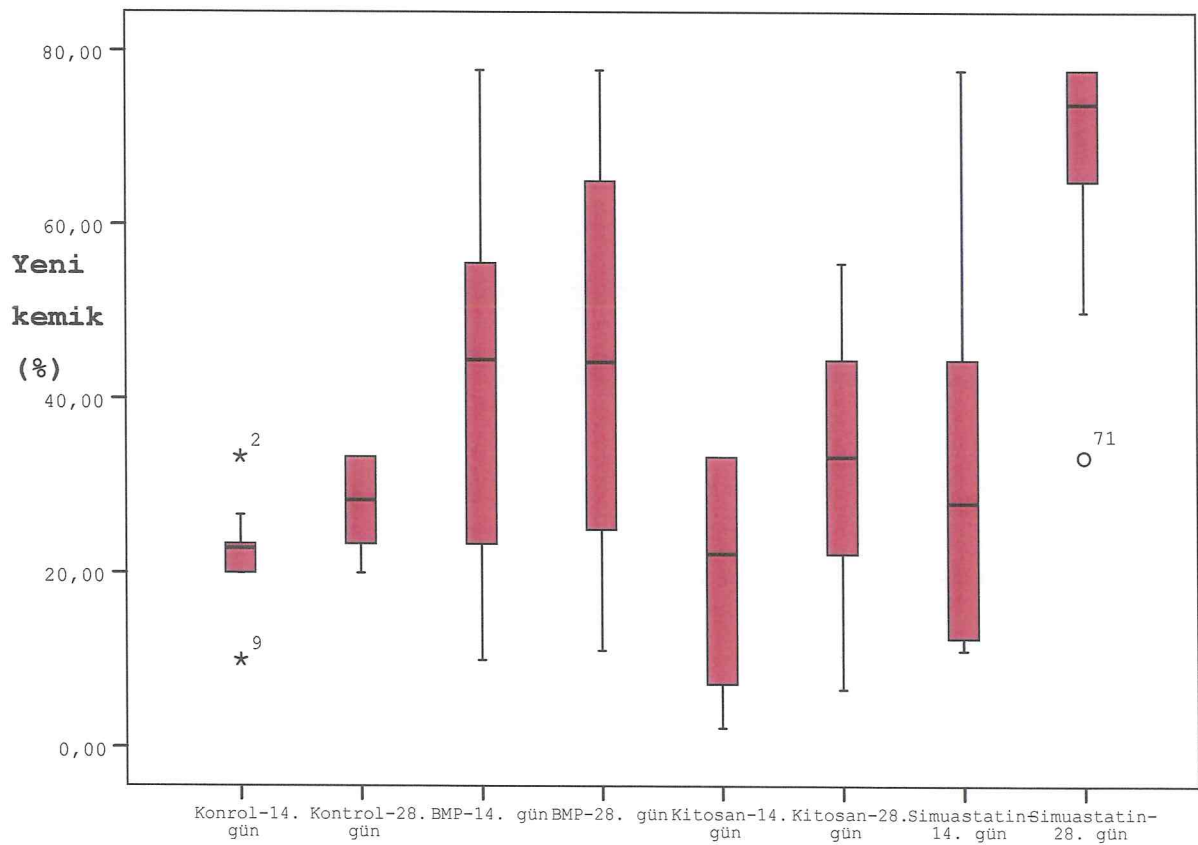
gruplarından anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.05$; $p<0.01$). Diğer grupların 28. gündeki yeni kemik oluşumu yüzde ortalamaları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9a).



Şekil 4-12: Gruplar arasında 28.gündeki yeni kemik yüzde dağılımı

Tablo 4-8: Gruplarda ayrı ayrı 14. gün ve 28. günlerdeki yeni kemik yüzdesi ortalamalarının değerlendirilmesi

Yeni Kemik %	14. Gün	28. Gün	<i>p</i>
	Ort±SS (Medyan)	Ort±SS (Medyan)	
Kontrol	22,22±5,87 (22,77)	27,99±4,76 (28,33)	0,026*
BMP-2 içeren kitosan nanopartikül	41,22±23,42 (44,44)	44,17±22,55 (44,16)	0,733
Kitosan nanopartikül	20,22±11,79 (22,22)	33,10±15,26 (33,33)	0,045*
Simvastatin içeren kitosan nanopartikül	34,41±23,65 (28,03)	67,39±14,96 (70,89)	0,005**
Mann Whitney U			
	* $p < 0.05$	** $p < 0.01$	



Şekil 4-13: 14. ve 28. gündeki grupların yeni kemik yüzde dağılımı

Kontrol grubunda;

28. gündeki yeni kemik oluşumu yüzde ortalaması, 14. günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p<0.05$).

BMP-2 içeren kitosan nanopartikül grubunda;

14. ve 28. günlerdeki yeni kemik oluşumu yüzde ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

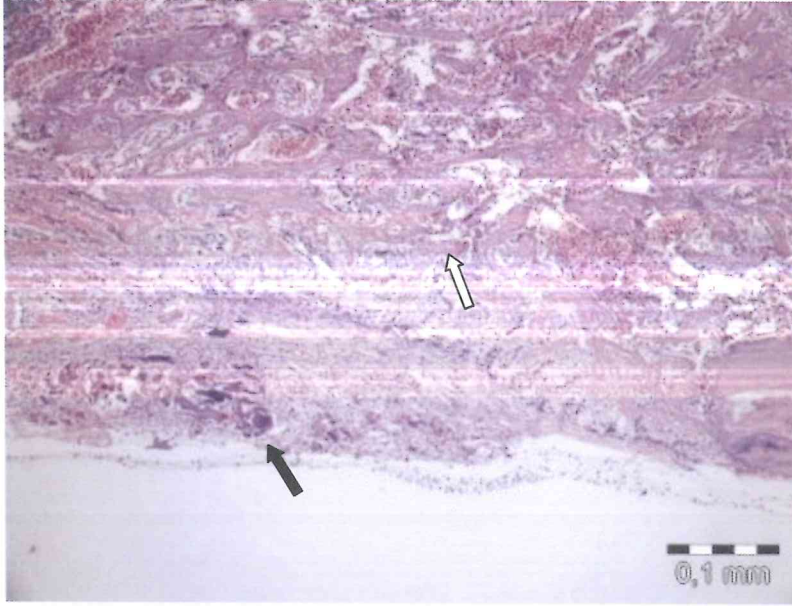
Kitosan nanopartikül grubunda;

28. gündeki yeni kemik oluşumu yüzde ortalaması, 14. Günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p<0.05$).

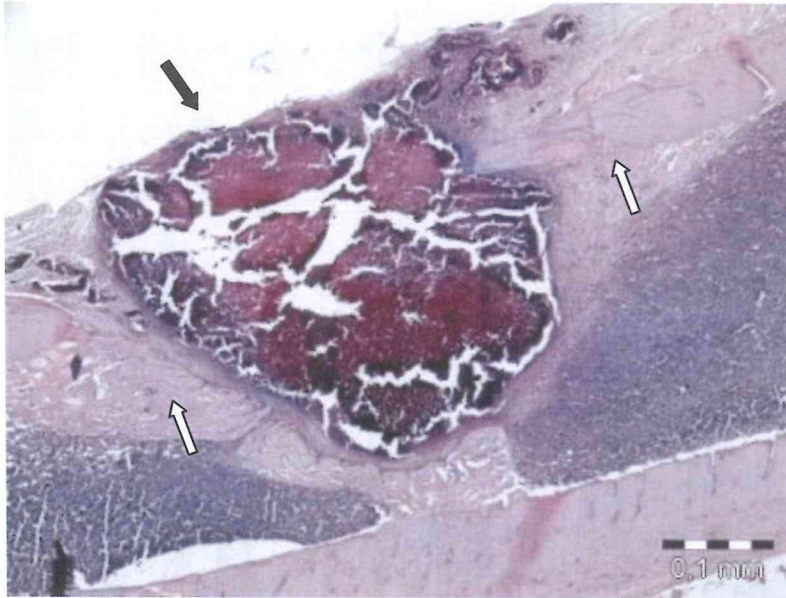
Simvastatin içeren kitosan nanopartikül grubunda;

28. gündeki yeni kemik oluşumu yüzde ortalaması, 14. günden istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı yüksektir ($p<0.01$).

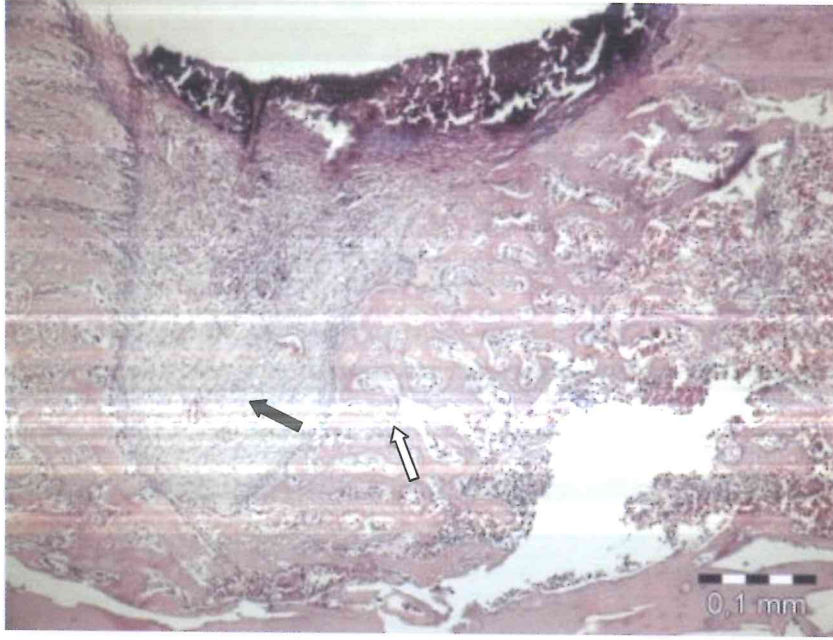
4.3. Histolojik kesit örnekleri



Şekil 4-14: (BMP-2/kitosan taşıyıcı grubu) 14. günde defekt bölgesinde aktif fibröz doku içinde greft artıkları (siyah ok) ve altında yeni kemik trabekülleri (beyaz ok) (H&E x100).



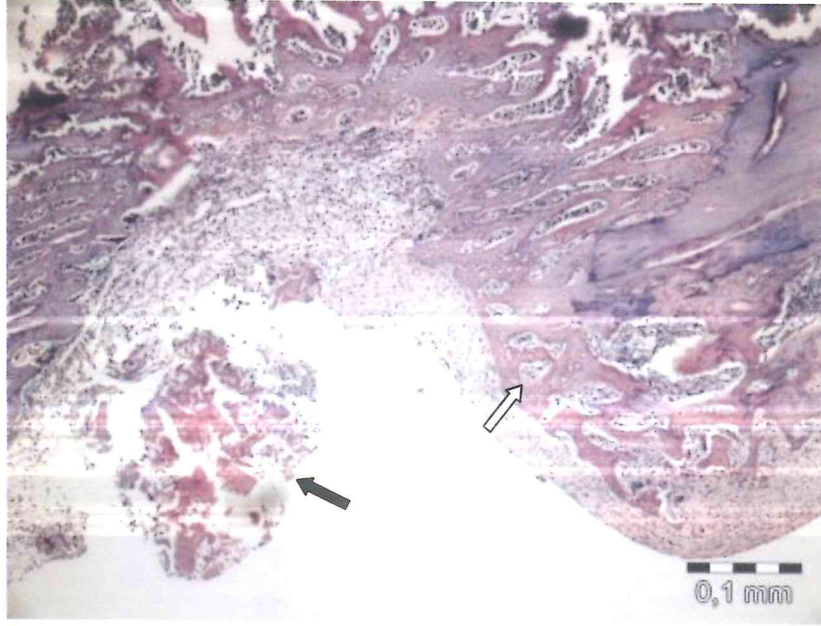
Şekil 2-2: (Kitosan taşıyıcı grubu) defekt bölgesinde geniş alanlarda rezidüel greft materyali (siyah ok) ve çevresinde ince band biçiminde yeni kemik trabekülleri (beyaz ok) (H&E x40).



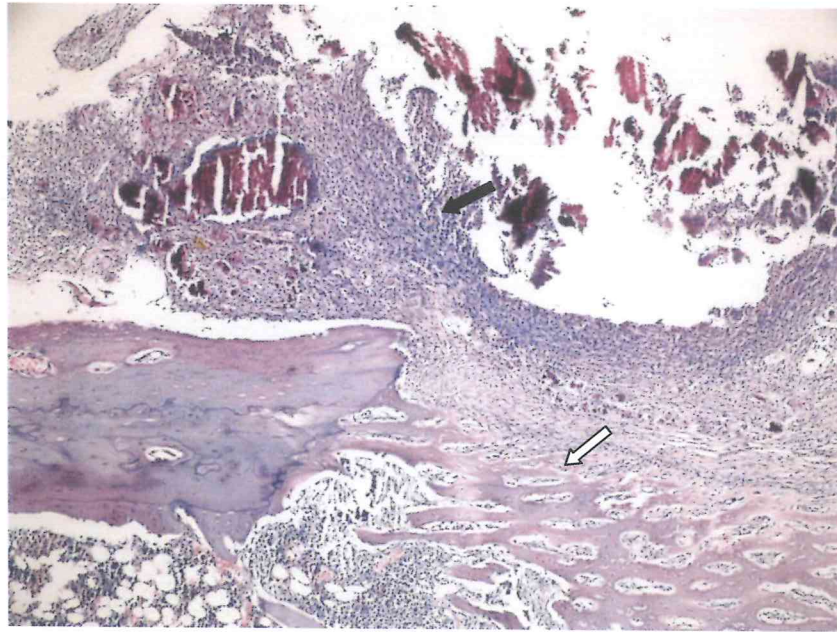
Şekil 2-3: (Simvastatin/kitosan taşıyıcı grubu) 14. günde defekt bölgesinde kırık uçlarından ilerleyen yeni kemik trabekülleri (beyaz ok) ve ortada aktif fibröz doku (siyah ok) (H&E x100).



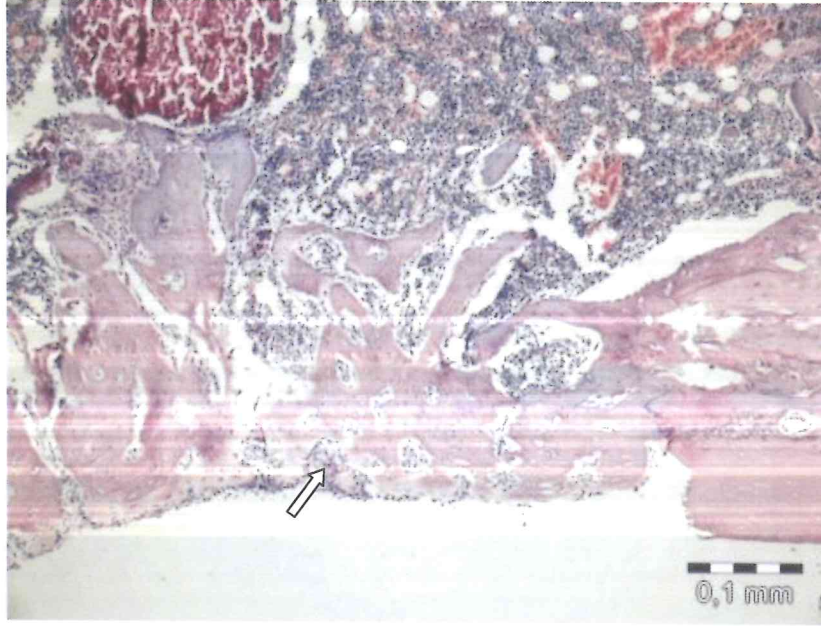
Şekil 2-4: (Kontrol grubu) 14. günde defekt bölgesinde fibröz doku içinde ince, yeni kemik trabekülleri (beyaz ok) (H&E x100).



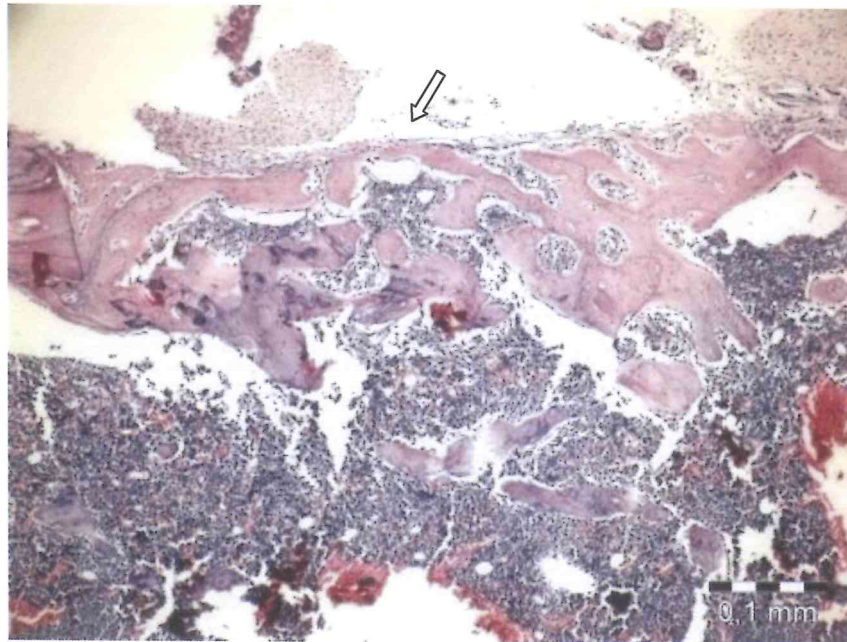
Şekil 2-5: (BMP-2/Kitosan taşıyıcı grubu) 28. günde defekt bölgesinde defekti dolduran yeni kemik trabekülleri (beyaz ok) ve ortada greft artıkları (siyah ok) (H&E x100).



Şekil 2-6: (Kitosan taşıyıcı grubu) 28. günde defekt bölgesinde köprü oluşturan yeni kemik trabekülleri (beyaz ok) çevresinde, yoğun iltihapsal infiltrasyon içeren fibröz bağ dokusu içinde rezidüel greft materyali (siyah ok) (H&E x100).



Şekil 2-7: (Simvastatin/Kitosan taşıyıcı grubu) 28. günde defekt bölgesini kapatan yeni kemik trabekülleri (beyaz ok), arada kemik iliği (H&E x100).



Şekil 2-8: (Kontrol grubu) 28. günde defekt bölgesinde defekt bölgesini kapatan ince, yer yer lameller görünümü almış yeni kemik dokusu (beyaz ok) (H&E x100)

5. TARTIŞMA

Kemik greft uygulamalarında rezorpsiyon hızı ve mekanizmasının anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Kemik dokusu yıkım, kayıp veya rezeksiyon sonrası eski orijinal boyutuna skar bırakmadan dönme kapasitesine sahiptir. Uygulanacak olan malzeme, yeni kemik yapımında osteoindüktif ve osteokondüktif etki gösterirken zaman içerisinde ortamdan tamamen uzaklaştırılarak yeni kemikle yer değiştirebilmelidir. Kemik morfogenetik protein (BMP) de bu sürece aktif olarak katkıda bulunmaktadır. İyileşme sürecinde mezenkimal kök hücrelerini osteoblastlara ve kondroblastlara değiştiren BMP-2, kemik veya yumuşak doku bölgelerinde lokal kemik oluşumunu indükleyecek şekilde farklılaşmayı sağlamada anahtar role sahiptir. (190). BMP'lerin uygun bir taşıyıcı ile implante edildikleri zaman; diferansiye olmayan mezenkimal hücrelerin kemotaksis ile aktive edilerek göçlerine ve osteoblastlara dönüşmelerine, kemik matriksi depolanmasına, yeni depo edilen kemik matriksinin mineralizasyonuna ve kemik iliği diferansiyasyonuna neden oldukları bildirilmiştir (191).

Son yıllarda literatürde araştırılan diğer bir alternatif ise, sistemik hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bazı ilaçların lokal olarak kemik defekt alanına uygulanmasıdır (13). Hidroksimetilglutaril-koenzim A redüktaz inhibitörleri olarak da bilinen statinler, yüksek serum kolesterolünü düşürmek amacıyla tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde statinlerin kolesterol düşürme özelliklerine ilave olarak özellikle antiinflamatuvar etki, anjiogenezisi artırma ve kemik oluşumunu uyarma gibi etkileri olduğu belirtilmiştir (4). Ayrıca statinlerin kemik greft materyallerine göre daha düşük maliyetinin olması ile birlikte; yan etkilerinin azlığı ve kolay elde edilebilir olması gibi avantajları da bulunmaktadır (130). Statin grubu ilaçların kemik metabolizması üzerindeki etkilerini araştıran bir çok çalışma (13-16) bulunmasına rağmen, bu etkiler üzerine çelişkili bilgiler elde edilmektedir.

Çalışmamızın amacı kemik rejenerasyonunda da görev alan kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) ve simvastatinin kitosan taşıyıcı ile kullanımını karşılaştırarak

incelemek ve yeni kemik oluşturma potansiyelini karşılaştırmaktır. Bunun yanı sıra kitosanın bu greft materyallerinin uygulanmasında uygun bir taşıyıcı olup olmadığı incelendi. BMP-2 ve simvastatinin kitosan taşıyıcı ile kullanımı sonrası rezorpsiyon sũreleri incelenerek kemik greft materyallerinin 14. ve 28. gũnlerde yeni kemik oluşturma potansiyelleri eşit koşullarda, aynı hayvan modellerinde karşılaştırıldı.

Kemik Morfogenetik Proteinler (BMP) kıkırdak ve kemik formasyonunu etkileyen sitokinlerden TGF- β sũper ailesinin ũyesidir (94). BMP kemik iliğinde diğer non-kollajen proteinlere nazaran daha az miktarda bulunması ve gũreceli olarak cũzũnmez olması nedeni ile saflaştırılması zor bir proteindir. 1980'li yıllarda BMP'nin 4 M guandine hidroklorid (192) ve 6 M ũre (193) içinde saflaştırılabildiği bulunmuştur bũylece izolasyonu ve saflaştırılması hızlanmıştır. Bircok BMP klonlama ve genetik mũhendislięi alanlarında kullanılabılır hale gelmiştir.

Literatũr incelendiğinde statinlerin kemik defektlerinin tedavisindeki rolũ, uygulama dozu ve kullanılan taşıyıcı gibi pek cok faktũre ait tartışmaların devam ettiği ancak bu konularda net bir sonuca varılamadığı gũrũlmektedir. Aynı durum BMP-2 uygulamaları içinde geğerlidir. Son zamanlarda BMP-2 ile ilgili yapılan calışmaların yoğunlaştığı temel nokta uygulanacak doz miktarı ve taşıyıcı seğimidir.

Maeda ve ark. 2004 yılında yaptıkları bir calışmada simvastatin ve cerivastatin gibi statinlerin osteoblast fonksiyonunu dũzenledięini bildirmiştir (151).

Bazı araştırmacılar ise Pravastatin gibi hidrofilik statinlerin osteoblastlarda BMP-2 salınımını indũkleme kapasitelerinin olmadığını belirtmiştir (136).

Bu sonuğlardan yola cıkarak yaptığımız calışmada; lipofilik bir statin olan simvastatinin hidrofilik statinlere gũre kemik dokusuna afinitesinin daha fazla olması, yağda cũzũnebildięi için hũcrelere daha kolay girebilmesi (18) ve yapılan calışmaların

(13-16) sonucuna göre kemik üzerine olumlu etkilerinin diğer statin grubu ilaçlara göre daha yüksek bulunması nedeniyle statinler arasından simvastatin kullanıldı.

Statinlerin lokal uygulamaları ile ilgili literatürde az sayıda ve çelişkili araştırmanın bulunması ve klinik kullanımlarını sağlayacak yeterli sayıda çalışmanın bulunmaması, diğer biyolojik mediatörlerle karşılaştırmalı çalışma sayısının az olması buna ek olarak osteoindüktif özelliklerini araştırmak amacıyla çalışmamız deneysel hayvan modeli üzerinde planlanmıştır.

Statinler klinik olarak sistemik yoldan verilmektedir (15). Piyasada bulunan statinler kemik aktivasyonunu sağlamak amacı ile sistemik kullanım için ideal değildir. Bu statinler kolesterol düşürücü etki kapasitesine sahip olduğu için kullanılmaktadır. Sistemik kullanımlarında karaciğere spesifite göstermeleri ve perifer dolaşıma çok düşük oranda dağılmaları nedeniyle kemik dokusuna çok az düzeyde ulaşmaktadırlar (163). Lokal uygulamalarda ise statinler enterohepatik dolaşıma girmez ve uygulanan bölgedeki kemik dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (4). Lokal uygulamada bu ilk geçiş etkisi gerçekleşmeyeceğinden, metabolize olmayan ilacın plazma proteinlerine daha sıkıca bağlanabildiği düşünülmektedir. Böylece lokal olarak uygulandıklarında kemik gibi perifer dokularda daha yüksek kan seviyelerine ulaşacakları ve sistemik uygulamaya göre kemik dokusunda daha kuvvetli etki gösterecekleri belirtilmiştir (159). Skoglund ve Oxlund sistemik yoldan verilen statinlerin, belli bir miktarının karaciğeri geçip kemik hücrelerine ulaşabilmesi için yüksek dozlarda uygulanması gerektiğini belirtmiştir (157, 194). Gutierrez ve ark. farelerde statinlerin topikal uygulamalarının, kemik oluşumu açısından, sistemik uygulamalarından daha etkili olduğunu göstermiştir (159).

Literatürde yeni kemik oluşumu açısından lokal uygulamanın sistemik uygulamaya göre daha etkili olduğu gösterildiğinden çalışmamızda simvastatin lokal olarak uygulandı.

Literatür bilgileri incelendiğinde osteojenik, osteoindüktif veya osteokondüktif olmaya aday materyallerin klinik kullanımlarından önce biyolojik potansiyellerini ve uygulanabilirliklerini ortaya koymak ve kemik rejenerasyonu ile ilgili tedavi girişimlerini değerlendirmek amacıyla kemirgenlerin, köpeklerin ve primat modellerin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (195,196). Çalışmamızda; yeterli sayıda ve deneye uygun özellikler barındıran hayvan elde edilebilirliği, deney bölgesinde hayati önem taşıyan damar ve sinir bulunmaması, değerlendirme yöntemlerinin basit, çabuk ve hassas şekilde uygulanabilirliği, deney alanına cerrahi erişim kolaylığı bulundurması, deneklerin genel fizyolojisi ve kemik iyileşmesi hakkında yeterli bilgi bulunması, bakım kolaylığı, ucuz ve kolay elde edilebilir olması gibi kriterler göz önüne alınmıştır. Deney hayvanları etik kurulunun izni doğrultusunda deney hayvanı olarak kemirgenlerden Wistar Albino cinsi sıçanlar tercih edilmiştir.

En sık kullanılan deney hayvanı kemirgenlerdir. Kemirgenler her türlü araştırma alanında kullanılmaktadır. Bu nedenle kemik turnoverları iyi bilinmektedir. Ancak dezavantajları da bulunmaktadır. Erişkin kemirgenlerde haversian sistem bulunmasına rağmen doğal remodelasyonu sınırlıdır. Bir çalışmanın odak noktası biomekanik değerlendirme ise büyük hayvan modeli daha faydalı olacaktır ancak biyoloji ile ilgili soruları yanıtlamada istenen avantajı sağlamadıkları düşünülmektedir. İskeletsel olarak olgunlaşmış küçük hayvanlar; maliyet azlığı, hızlı iyileşme kapasitesi, geniş bir veri havuzu sağlamaları nedeni ile biyolojik çalışmalarda daha faydalı olarak görülmektedir (197).

Çalışmamızda model olarak kullanıldığımız sıçanlarda, belirlenen süre zarfında herhangi bir komplikasyona ve istenmeyen yan etkilere rastlanmamıştır. Sakrifikasyondan sonra elde edilen tibiaların makroskopik olarak bütünlüğünü koruduğu gözlemlenilmiştir. Bu durum benzer bir çok çalışmada olduğu gibi kemirgenlerin büyüme faktörü ve ilaç çalışmalarında uygun bir deney hayvanı olduğunu göstermektedir.

Literatür bilgisi incelendiğinde, osteojenik potansiyelin yaşa göre değiştiği bildirilmesi (198,199) sebebiyle çalışmamızda tüm deney hayvanlarının erişkin olmasına dikkat edilerek yaş farklılığının kemik oluşumu üzerine göstereceği değişikliklerin elimine edilmesine çalışılmıştır. Araştırmamızda erkek deney hayvanı seçme nedeni, dişi ratların menstrual sikluslarına bağlı hormonal değişimlerinin yara iyileşmesini etkileme olasılığını elimine etmektir (200).

Denek farklılığından kaynaklanabilecek, iyileşmeyi ve çalışma sonuçlarını etkileyebilecek faktörlerin gruplar üzerine olan etkilerinin eşitlenebilmesi amacıyla, literatürde yer aldığı gibi (201) çalışmamızda da, deney ve kontrol grubunu oluşturan defektler aynı sıçanda oluşturulmuştur. Çalışmamızda her sıçanda tibia bölgesine sağ ve sol bacakta 2'şer adet olmak üzere toplam dört adet kemik defekti oluşturuldu. Benzer çalışmalarda yer aldığı gibi deney gruplarına ek olarak taşıyıcının tek başına etkisini izleyebilmek amacı ile kitosan grubu ve herhangi bir materyal yerleştirilmeden iyileşmenin şeklini görebilmek amacıyla defekt boş bırakılarak kontrol bölgesi oluşturuldu.

Sıçanların kemirgen hayvanlar olması nedeniyle örneklerin çoğunda deneğe ait kıllar gibi maddeler ile kontaminasyona bağlı olarak yabancı cisim reaksiyonu izlendi. Yabancı cisim bulunan örneklerde, yabancı cisim reaksiyonu nedeniyle defekt alanındaki bağ dokuda inflamasyon görüldü.

Literatürde histopatolojik değerlendirme günlerinin farklılıklar gösterdiği görülmektedir (202). Benzer deneysel çalışmalarda literatür bulguları, genel olarak kemikleşmenin 1. - 2. haftalarda başladığını (203,204), 6. - 8. haftalarda olgun kemiğin oluştuğunu bildirmektedir (205,206). Ruhe ve ark, rhBMP-2 yüklü poroz Ca-P sementin salınımını in vivo ve in vitro olarak değerlendirdikleri çalışmalarında rhBMP-2'nin yaşam döngüsünün 4 haftayı geçmediğini ve proteinin daha fazla kalması için ek bir bioaktivite beklenmemesi gerektiğini bildirmiştir (207). Bu nedenlerle simvastatinin ve rhBMP-2'nin erken ve geç dönemde kemik defeklerinin iyileşme kapasitesine etkisini

karşılaştırmalı olarak inceleyebilmek için erken dönem için 14. geç dönem için 28. günler değerlendirme periodları olarak seçildi.

Kemik defektleri ile ilgili çalışmalarda iyileşmenin hücresele seviyede tespiti açısından en geçerli ve en uygun değerlendirme şeklinin histoloji ve histomorfometrik yöntemlerin kullanılması olduğu bilinmektedir (208). Bu nedenle çalışmamızda simvastatinin kemik defektlerinin iyileşmesi üzerindeki etkisi histolojik ve histomorfometrik değerlendirme ile yapılmıştır.

Literatürde optimum rhBMP-2 dozu ile ilgili bir fikir birliği bulunmamaktadır. Yang ve ark. 20 µg BMP-2 dozu içeren heparin enjekte edilmiş fibrin jel taşıyıcı kullanarak kemik formasyonu oluşturmuştur (209). Bessa ve ark. yaptıkları bir çalışmada ipek fibrin mikropartikül kullanılarak 5-12.5 µg BMP-2 dozu ile kemik formasyonu oluşturduğunu bildirmiştir (210). McLaughlin ve ark. yaptıkları bir çalışmada sıçanların dorsum bölgesinde 4 µg/mL rhBMP-2 konsantrasyonu ile yeni kemik oluşumu bildirmiştir (211). Sığır kaynaklı kollajen matriks kullanımı ile optimum klinik BMP-2 dozunun 1.5mg/ml olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (210,211). Canter ve ark kitosan/allogreft/rhBMP-2 yerleştirdikleri defektlerde 1.125 µg rhBMP-2 kullanarak yeni kemik oluşumu sağlamıştır (24). Stephan ve ark kitosan taşıyıcı kullanarak 2 µg rhBMP-2 dozu ile yeni kemik oluşumu sağlamıştır (212). Benzer olarak Park ve ark. 2 µg rhBMP-2 dozu ile kitosan taşıyıcı kullanarak kemik oluşumu sağlamıştır (213). Bizim çalışmamızda kullandığımız 1.5 µg rhBMP-2 dozu bu literatürlerdeki doz miktarları referans alınarak belirlenmiştir.

Tylin ve arkadaşları bir çalışmalarında farelerin kafatasına 2.2 mg simvastatini lokal uygulandıklarında inflamasyon, apse ve deri bölgesinde kabuklaşma görüldüğünü bildirmiştir (13). Stein ve arkadaşları ise bir çalışmada 2.2 mg simvastatin dozunu 0.5 mg'a düşürmenin klinik inflamasyon belirtilerini azalttığını bildirmişlerdir. 0.5 mg gibi düşük doz simvastatin uygulamasının kemiğin anabolik etkisine zarar vermeden inflamasyon seviyesini düşürdüğünü bildirmişlerdir (8). Aykan ve ark, 2007 yılında kobaylar üzerinde 2,2 mg simvastatin dozu ile 0.5 mg simvastatin dozunu

karşılaştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Kobaylarda 1. deney bölgesinde uyguladıkları yüksek doz olan 2.2 mg simvastatinin özellikle erken dönemde klinik olarak yumuşak dokuda inflamasyon, ödem ve apseye neden olduğunu, 0.5 mg simvastatinin uygulanan bölgede ve kontrol bölgelerinde iyileşmenin sorunsuz gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Yazarlara göre, 0.5 mg simvastatinin in vitro ortamda 7. günde salımının tamamlanmasının izlenmesi, deney ortamında 2.2 mg'a göre daha az kaldığını düşündürmektedir. Bu nedenle klinik açıdan sorunsuz iyileşmenin gözlenmiş olabileceğini savunmuşlardır. Ancak 2.2 mg simvastatin ile inflamasyon, apse ve ödem görülsede, 30. günden itibaren yumuşak dokudaki bu reaksiyon giderek azalmıştır (214). Çalışmamızda 0.5 mg simvastatin kullanımı ile deneklerde yumuşak dokuda deney süresince herhangi bir abse, deri bölgesinde kabuklaşma bulgusuna rastlanmamıştır.

Doku mühendisliği ile ilgili süre gelen çalışmalar osteokondüktif iskelet, osteoindüktif büyüme faktörü olan sitokinler ve kemik gelişiminde, rejenerasyonunda ve tamirinde görev alan osteoprogenitör hücrelere odaklanmaktadır. Herhangi bir taşıyıcı sistem kullanılmadan tek doz büyüme faktörü uygulanmasının yalnızca belli bir oranda kemik iyileşmesi sağlayabileceği bildirilmiştir. İskelet sisteminin yapısal bütünlüğü sağlanana kadar kemik rejenerasyonunun devamı; rejenerasyon süresince büyüme faktörlerinin salınmasını sağlayacak kontrollü ilaç salım sistemleri kullanılması ile elde edilmektedir (215).

Simvastatinin ve BMP-2'nin lokal uygulama için bir taşıyıcıya gerek duyulması taşıyıcı seçimine özen gösterilmesi zorunluluğunu getirmektedir. Bu bilgilere dayanarak salınım süresi, büyüme faktörlerinin tedavi uygulanacak bölgeye taşınması ve kullanılan taşıyıcı maddeler birçok araştırmada tartışma konusu olmuştur. İstenen etkiyi elde edebilmek için, bu materyallerin yerleştirilen bölgede kemik oluşumunu sağlayacak süre boyu salınması ve farmakolojik etkilerini gösterecek bir taşıyıcı ile defekt alanına uygulanması gerekmektedir. Kemik defektlerinin tedavisinde kemik rejenerasyonunu indükleyebilen ilaçların bölgeye uygulanmalarına yardımcı olan, biyolojik olarak parçalanabilen materyaller kullanılmaktadır. İnorganik materyaller (kalsiyum fosfat gibi seramikler, kalsiyum sülfat, metaller, bioglass), sentetik polimerler, doğal polimerler ve

bunların birleşimi literatürde taşıyıcılar arasında yer almaktadır. Bazı araştırmacılar BMP'nin yalnızca HAP (hidroksiapatit) ile kombine edilmesinin kemik indüksiyonunda başarısızlığa sebep olduğunu savunmaktadır (216). Bunun sebebi aralarında sıkı bir bağ oluşması ve HAP'ın rezorbe olmaması olarak belirtilmektedir. HAP genellikle TCP veya kollajen ile kombine edilmektedir (217). Doğal polimerlere örnek olarak hiyalüronik asit, fibrin, kitosan, aljinat ve diğer polisakkaritler sayılmaktadır. Bir çok çalışmada, büyüme faktörünün lokal konsantrasyonun taşıyıcıdan salınma kinetiğine bağlı olduğu ve kemikleşme sürecinde önem teşkil ettiği bildirilmiştir (218).

Kitosan, osteokondüksiyon, hemostatik etki ve yara iyileştirme özelliklerine sahiptir (20-23). Biouyumluluk özellikleri, düşük toksisitesi nedeni ile ilaç ve araştırma alanlarında sıklıkla taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (24). Kitosan bu özellikleri nedeni ile çalışmamızda BMP-2 ve simvastatinin yavaş salınımı için taşıyıcı sistem olarak seçilmiştir. Lee ve ark. kitosanı trikalsiyum fosfat ile kombine ederek osteokondüktif matrix yapısında önemli sonuçlar elde etmiştir (20). Klokkevold ve ark. kitosanın osteogenezi artırdığını bildirmiştir (21). Literatürde birçok ilacın ve büyüme faktörünün kontrollü salınımında kitosanın kullanılabildiği bildirilmiştir (219). Lee ve ark, I radiolabelled trombosit kaynaklı büyüme faktörü yüklü kitosan kullanarak kitosanın salınım kinetiğini belirlemiştir. (220).

Literatürde kitosan taşıyıcı kullanılarak simvastatin ve rhBMP-2'nin kemik üzerine etkisini karşılaştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır fakat Alam ve ark. tarafından atelopektit kollajen tip 1 sünger (ACS) taşıyıcı kullanılarak benzer bir çalışma yapılmıştır. 12 adet tavşanın nazal kemiğinde açılan 5 mm çaplı defektlere ACS taşıyıcı ile uygulanan pravastatin (10mg) ile ACS taşıyıcı ile uygulanan rhBMP-2'nin (5µg) kemik rejenerasyonuna etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada pravastatin/ACS taşıyıcı, rhBMP-2/ACS taşıyıcı, yalnız ACS taşıyıcı ve boş defekt olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur ve her grup 7.gün, 14.gün, 28.gün olmak üzere 3 gözlem perioduna ayrılmıştır. Cerrahiden sonraki 1 hafta içinde iltihap varlığını gösteren herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. 3 gözlem periodunda da pravastatin/ACS ve rhBMP-2/ACS arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak pravastatin/ACS grubu, yalnız ACS ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre sayısının 3 gözlem

periodunda da istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha fazla olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde rhBMP-2/ACS grubu yalnız ACS grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre sayısının 3 gözlem periodunda da istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha fazla olduğu bildirilmiştir. 14. Günde ACS/pravastatin ve ACS/rhBMP-2 gruplarında operasyon alanının kısmi olarak fibroz doku ile kaplı olduğu gözlenmiştir. 28.günde operasyon alanındaki ACS'nin tamamen rezorbe olmadığı ve bölgenin tamamen kemikle dolmadığı bildirilmiştir. Osteoblast ve fibroblastların cerrahiden 4 hafta sonra açık bir şekilde görüldüğü bildirilmiştir. BMP-2'nin her iki grupta ilk hafta daha fazla salgılandığı belirtilmiştir. İmmunohistokimyasal olarak, pravastatin ve rhBMP-2'nin tavşanların nazal kemiklerine implante edildikten sonra BMP-2'nin bağ dokulardan ve periosttan fazla miktarda salındığı belirlenmiştir. Pravastatin/ACS'nin rhBMP-2/ACS ile benzer BMP-2 salınımı ve osteoindüktif aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Çalışmada kısa gözlem periodu nedeni ile yeni kemik oluşumunun açık bir şekilde gözlenemediği, daha fazla sayıda örnek ile daha büyük bir çalışma yapılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır (3).

Bizim çalışmamızda yalnızca 28. günde simvastatin içeren kitosan nanopartikül taşıyıcı grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda fazla yeni kemik alanı yüzdesi gözlenmiştir. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın seçilen statin türünden ve taşıyıcı materyalin hazırlanış şekli nedeni ile kontrollü yavaş salınım yapmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Buna ek olarak, Alam ve ark. çalışmasında kullanılan pravastatin gibi statinlerin osteoblastlarda BMP-2 salınımını indüklemeye kapasitelerinin olmadığını belirten çalışmalar bulunmaktadır (149). Bizim çalışmamızda da bu çalışma ile benzer olarak 28. günde kitosan taşıyıcının tamamen rezorbe olmadığı ve bölgenin tamamen kemikle dolmadığı gözlenmiştir.

Literatürde BMP-2'nin ve farklı büyüme faktörlerinin kitosandan salınımı üzerine birçok çalışma bulunmaktadır (24,221-224).

Canter ve ark. 240 adet wistar albino rat üzerinde yaptıkları bir çalışmada defekt tamirinde kemik oluşumunu artırmak ve doku cevabını incelemek üzere kitosan taşıyıcı

ile allogreft, BMP-2 ve TGF β -2 uygulamıştır. Deneklerin kafatası üzerinde 7 mm genişliğinde defekt açılmıştır. Denekler; (1) boş, (2) otojen grubu, (3) allogreft grubu, (4) kitosan grubu, (5) allogreft-kitosan grubu, (6) allogreft-kitosan- TGF β -2 grubu, (7) allogreft-kitosan- BMP-2 grubu ve (8) allogreft-kitosan-TGF β -2 - BMP-2 grubu olmak üzere 8 gruba ayrılmıştır. Histolojik incelemede, 1.125 μ g rhBMP-2 kullanılan BMP-2 grubunda, 2. ve 8. haftalarda otojen greft uygulanan gruptan daha fazla kemik spiküllerinin defekt alanına genişlediği ve TGF β -2 grubu ile BMP-2'nin beraber kullanılmasının herhangi bir sinerjistik etki oluşturmadığı gözlenmiştir. Kitosan grubunda 2. ve 8. haftalarda yeni kemik oluşumu görülmediği bildirilmiştir. Kitosanın kemikleşme sürecine olumlu veya olumsuz herhangi bir etkisi olmadığı, bölgede boşluk doldurucu görev gördüğü ve defekt içine fibröz doku oluşumunu önlediği bildirilmiştir. Histolojik değerlendirmede 2. haftada kitosana komşu kollajen liflerin ve kan damarlarının görüldüğü bildirilmiştir. Erken dönemde kitosan, minimal akut enflamasyon göstermesine rağmen geç dönemde herhangi bir yabancı cisim reaksiyonuna yol açmadığı ve elementlerine ayrıldığı bildirilmiştir. Bu nedenle kitosanın doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilecek biyo-uyumlu bir materyal olduğu ve uzun süren osseointegrasyon sürecine uygun olduğu sonucuna varılmıştır. BMP-2 dışındaki, allogreftin kitosan ile uygulandığı tüm gruplarda demineralizasyon gecikmiştir ve erken dönemdeki ölçümlerde istatistiksel farklılık görülmüştür fakat ilerleyen dönemlerde otojen ve allogreft gruplarına yaklaştığı ve demineralizasyonda daha çabuk azalma görüldüğü bildirilmiştir. Bu durum araştırmacılar tarafından kitosanın ve büyüme faktörlerinin osteoindüktif ve osteokondüktif etkilerine bağlanmıştır. BMP-2 grubunda ise 2. haftadaki istatistiksel farklılık 8. haftada kaybolmuş ve 14. haftada tekrar ortaya çıkmıştır. Bu grupta histolojik değerlendirmede en iyi kemik oluşumu gözlenmiştir. 8. haftada, BMP-2 ve/veya TGF β -2 grupları karşılaştırıldığında allogreft ve/veya kitosan gruplarında defekt içinde daha organize olmayan fibröz konnektif doku dolumu ile beraber düşük miktarda iyileşme gözlenmiştir. BMP-2/Kitosan/allogreft grubunda ise kavitenin kortikal sınırlarından iç kısımlara doğru yeni kemik oluşumunun başladığı bildirilmiştir (24).

Kemik defektlerindeki iyileşmeyi inceleyen çalışmalara (15,204) benzer olarak çalışmamızda 14. günde, kontrol grubu dahil olmak üzere tüm örneklerde, periost ve

kemik iliğinden gelen farklılaşmamış hücrelerin proliferasyonu ve diferansiyasyonu sonucunda konak kemik kenarlarından itibaren değişen oranlarda yeni kemik yapımı izlendi.

Bizim çalışmamızda da bu çalışmada kullanılan rhBMP-2 materyali (B3555-10UG, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), benzer dozda (1.5µg rhBMP-2) kullanılmıştır. rhBMP-2'nin kitosan taşıyıcı ile uygulandığı grupta fibroz doku oluşumunda 2. ve 4.hafta arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemekle birlikte, 2. haftada fibröz doku oluşumunun rhBMP-2 grubunda diğer gruplardan daha fazla olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlenmiştir. Kitosan grubunda 2. haftada yüksek miktarda görülen fibroz doku oluşumu 4. haftada da artış gösterdiği fakat bu grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmediği belirlenmiştir. Yukarıdaki çalışmadan farklı olarak çalışmamızda, yalnız kitosan taşıyıcı uygulanan defekt grubunda 2. haftada kitosanın defekt bölgesinde bulunması ve yeni kemiğin %20 oranında oluşması nedeni ile, kitosanın yavaş çözünmesi sonucunda defekt bölgesinde geç rezorbe olduğu, yeni kemik oluşumunu ve iyileşmeyi geciktirebildiği sonucuna ulaşmaktayız.

Yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde çalışmamızda 2 gözlem periodunda da cerrahi olarak oluşturulan defeklerde kontrol grubu hariç tüm gruplarda yabancı cisim oluşumu görülmüştür. 4. haftada BMP içeren nanopartikül taşıyıcı ve simvastatin içeren kitosan nanopartikül taşıyıcı gruplarının %60'ında, kitosan nanopartikül taşıyıcı grubunun ise %100'ünde yabancı cisim görülmüştür. Kitosan nanopartikül taşıyıcı grubunda 2. ve 4.hafta arasında iltihap görülme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Canter ve ark. çalışmasına benzer şekilde kitosanın erken dönemde (2. hafta) enflamasyon gösterdiğini düşünmekteyiz. 4.haftada yalnız kitosan taşıyıcı uygulanan grupta diğer gruplara göre enflamasyon görülme oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olması Canter ve ark. bulgularından farklı olarak, kitosanın kemikleşme sürecine olumsuz etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Kitosan taşıyıcı ile rhBMP-2 yerleştirilen grupta, yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde, 2. haftada yalnız kitosan taşıyıcı (%20) uygulanan gruptan istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha fazla kemik oluşumu (%41) gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak 2. haftada kitosan taşıyıcıdan rhBMP-2 salınımının gerçekleştiğini bununla osteojenik hücre migrasyonunu hızlandırdığını ve rhBMP-2'nin bölgede kemik oluşumuna erken dönemde olumlu destek verdiğini düşünmekteyiz.

Simvastatin içeren nanopartikül taşıyıcı grubunda ise 4. haftada fibroz doku görülme oranının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş gösterdiği ve fibroz dokunun yerini yeni kemiğin doldurduğu gözlenmiştir. Bu verilere dayanarak kitosan taşıyıcının simvastatin ile birlikte kullanımı ile fibröz doku oluşumunu azalttığı, kemik oluşumuna olumlu yönde etkisi olduğu gözlenmiştir.

Kitosan temelli iskeletler, partikül filtreleme veya dondurma kurutma teknikleri ile üretilmektedir. Bunlar kemik rejenerasyonunda umut verici olsada genellikle biomekanik özellikler bakımından sorun oluşturabildikleri bildirilmiştir (21,22). İdeal doku iskelesinin eksikliği yeni biomateryallerin araştırılmasına ve yeni iskelet üretme tekniklerinin araştırılmasına sebep olmaktadır. Jiang ve ark. heparin ile modifiye edilmiş kitosan/polilaktik asit/glikolik asit (HP-CS)/PLAGA iskelet ile rhBMP-2'nin kemik rejenerasyon kapasitesini araştırmıştır. 72 adet New Zeland tavşanın ulnar kemiğine yaklaşık olarak 20 mm uzunluğunda defekt açılmıştır. 6. ve 12. haftalarda sakrifikasyon yapılmıştır. HP-CS-PLAGA-BMP-2 grubu ile CS-PLAGA grubu arasında yeni oluşan kemik miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir fakat 6 haftalık incelemede heparin ile rhBMP-2'nin sinerjit etki ederek olgun kemik formasyonunu hızlandırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Kitosan/PLAGA kaplı implantlarda, mekanik stabilitede yetersizlik, doku mineralizasyonunda ve kemik formasyonunda gecikme görüldüğü bildirilmiştir. Araştırmacılar bu durumun kronik iltihapsal reaksiyon nedeni ile olabileceğini düşünmektedir (221). Kitosana karşı minimal iltihapsal reaksiyon olduğunu gösteren yayınlarla (222,174) birlikte kitin ve kitosanın yüksek oranda iltihapsal reaksiyon oluşturduğunu (223,224), bu durumun uzun süre devam edeceğini (225) gösteren çalışmalar da bulunmaktadır.

McLaughlin ve ark. enjekte edilebilen termojel kitosan/amonyum hidrojen fosfat (AHP) solüsyonunun rhBMP-2 taşıyıcısı olarak etkisini in vivo olarak incelemiştir. 4 µg/ml rhBMP-2 içeren taşıyıcı, sıçanlara subkütanöz olarak enjekte edilmiştir. 2,4,8 ve 12. haftalarda sakrifikasyon yapılmıştır. Defekt bölgesine yalnızca kitosan-AHP jel enjekte edilen grupta 2 haftada orta derecede kronik iltihap gözlendiği belirtilmiştir. Jel yapısının çoğunlukla bozulmadığı; makrofaj, lenfosit ve fibroblast içeren fibröz kapsül gözlendiği, 4. haftada ise 2. hafta ile karşılaştırıldığında nötrofil sayısında anlamlı miktarda artış görüldüğü bildirilmiştir. Kitosan-AHP-rhBMP-2 jel enjekte edilen grupta ise 4. haftada fibröz kapsülün varlığını koruduğu, bölgede lenfosit ve makrofaj varlığı nedeni ile kronik enflamasyon olduğu bildirilmiştir. 8. haftada diğer gruptan farklı olarak olgunlaşmamış kemik varlığı ile birlikte küçük kan damarları ve osteoblast varlığı gözlenmiştir. Termojelin tipik bir yabancı cisim reaksiyonu gösterdiği bildirilmiştir. 4-8 hafta sonra bile jel içinde nötrofil infiltrasyonu gözlenmiştir (211). Literatürde kitosan iskelette devamlı nötrofil varlığı belirten bir çok çalışma bulunmaktadır (226,227).

Çalışmamızda yalnız kitosan nanoprtikül taşıyıcı uygulanan grupta 28. günde iltihap görülme oranı %30-60 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olarak belirlenmiştir (kontrol, BMP ve simvastatin gruplarında iltihap görülme oranı %0-30 düzeyinde). Histolojik incelemede kemik hücrelerinin kitosan taşıyıcının etrafından dolanarak oluştuğu gözlenmiş, taşıyıcı içerisinde kan damarı oluşumu gözlenmemiştir. Kitosan bu çalışmada biyoparçalanabilir olması ve zararsız ve kalıntısız olarak parçalanabilmesi nedeni ile kullanılmıştır. Kitosanın en önemli özelliği yara iyileşmesinde yara örtüsü olarak kullanılmasıdır. Hazırlanan kitosan taşıyıcı uzun süre salınım yaptığı için, dokuda sıvı miktarına bağlı olarak patiküler sistemin kaldığı, bölgede bulunan sıvı miktarı az olduğu için kitosanın parçalanmadığını düşünmekteyiz. Deneklerde en fazla yabancı cisim reaksiyonunun yalnız kitosan yerleştirilen defektlerde görülmesi nedeni ile kitosanın simvastatin veya rhBMP-2 taşıyıcı ile uygulanması ile sinerjistik etki ettiği sonucuna varmaktayız.

Niu ve ark. kitosan (CM), nanohidroksiapatit kollajen (nHAC) ve polilaktitin (PLLA) kemik tamir kapasitesini araştırmıştır. RhBMP-2 taşıyan sentetik peptit, kitosan

mikroküreler ile sarmalanmıştır. Bu yapı nHAC ve temelli matriks ile birleştirilmiştir. Tavşanların femur kondiline açılan 6 mm'lik defektlere yerleştirilen CM/nHAC/PLLA komposit iskelet ile nHAC/PLLA komposit iskeletin kemik rejenerasyon kapasitesi karşılaştırılmıştır. 4,8, 12 haftalık değerlendirmeler yapılmıştır. CMs/nHAC/PLLA'in daha iyi biyouyumluluk gösterdiği, kansellöz kemik rejenerasyonunu artırdığı bu durumun kitosanın içeriğine bağlanabileceği bildirilmiştir (228).

Park ve ark. kitosan/aljinat jel/ mezenkimal kök hücre/ BMP-2 kompozit greftin yeni kemik oluşumu için potansiyel enjekte edilebilen bir materyal olup olmadığını araştırmıştır. Farelerin dorsum bölgesine subkütanöz olarak 2 µg rhBMP-2 içeren bu kompozit materyal enjekte edilmiştir. 12 haftalık histolojik inceleme yapılmıştır. Araştırmacılar kitosan aljinat jelin yalnızca BMP-2 veya yalnızca mezenkimal kök hücre içerdiğinde yeni kemik oluşumu görülmeden rezorbe olduğunu gözlemlemiştir. En etkili kemik oluşumunun ise kitosan aljinat jel, mezenkimal kök hücre ve BMP-2 ile birlikte kullanıldığında görüldüğü bildirilmiştir. Bu grupta kemik oluşan alanın miktarı %44.7 olarak bildirilmiştir (213).

Literatürde rhBMP-2 ile yapılan çalışmalara elde edilen kemik yüzdesinin çoğunlukla belirtilmediğini görmekteyiz. Birçok literatürde kemik oluşumunun; tablo şeklinde kemik mineral yoğunluğu, tablo şeklinde kemik mineral içeriği, micro CT kemik hacmi tablosu ile değerlendirildiğini görmekteyiz (3,203,212,213,229). Bu çalışmada bizim çalışmamıza benzer dozda rhBMP-2 (2µg) kullanıldığı görülmektedir. Buna ek olarak elde edilen kemik yüzdesi (%44.7), bizim çalışmamızda elde edilen yeni kemik yüzdesi (%44) ile benzerlik göstermektedir. Çalışmalar arasındaki farklılıklardan birisi ise bekleme süresidir. Bizim çalışmamızda 4 hafta sonu çalışmaları değerlendirilirken, bu çalışmada ise süre 12 haftaya çıkarılmıştır. Daha uzun bekleme süresi daha fazla kemik oluşumuna sebep olmaktadır. Bizim çalışmamızda rhBMP-2 kemik içi defektlere yerleştirilirken bu çalışmada materyaller enjeksiyon yöntemi ile deneklerin dorsum bölgesine yerleştirilmiştir. Bizim çalışmamızda yalnızca kitosan taşıyıcı materyal olarak kullanılırken bu çalışmada kitosan ile birlikte aljinatın taşıyıcı materyal olarak kullanılmasının sonuçlarda farklılık oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

Stephan ve ark, sıçan kafatasında BMP ile kitosan jeli taşıyıcı olarak kullanarak kemik oluşumunu incelemiştir. Her bir sıçanın kafatasına 8x1 mm boyutunda açılan defektler 5 gruba ayırmıştır. Deney gruplarında defektlere; kitosan jel, MSC (mezenkimal kök hücre) yüklenmiş jel, BMP-2 yüklü jel (2 µg/defekt) veya MSC/BMP-2 yüklü jel enjeksiyon şeklinde uygulanmış kontrol grubunda ise defekt boş bırakılmıştır. 4 hafta sonra in vivo CT analizi gerçekleştirilmiştir. 8 hafta sonundaki histolojik ve immunohistokimyasal analizlerde tüm hayvanların defektlerinde yeni kemik oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir. Gruplar arasında 4. ve 8. Haftalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. 4. hafta sonunda görülen kemik rejenerasyonu BMP/MSJ/jel grubunda diğer gruplardan ve 8. haftadan daha fazla görülmüştür. 8 hafta sonunda oluşan kemik miktarı BMP ve MSC birlikte kullanılan grupta 3 kat daha fazla olarak gözlenmiştir. Kemik formasyonunun lokasyonu incelenecek olursa, aralıklı kemik oluşumunun defektin periferine lokalize olduğu bildirilmiştir. Deney süresi sonunda tüm defektlerde rezidüel kalıntılar görülmüştür. Jel grubunda minimal miktarda kemik oluşumu ve büyük miktarda jelin rezorbe olmadığı görülmüştür. Diğer gruplarda ise jelin büyük çoğunluğu rezorbe olmuştur kalanları ise fibrin ve kan ile karışık halde görülmüştür. BMP/jel grubunda ise diğer gruplara göre daha fazla jel rezorpsiyonu olduğu görülmüştür. Defekt bölgesine BMP eklenmesinin periferik kemik formasyonunu artırdığı ve mezenkimal hücreleri osteoblastlara dönüştüren bir faktör salgıladığı düşünülmektedir. Anjiogenesis için gerekli sinyallerin bölgede var olduğu ve kemiğin gelişmeye başlayan bölgelerinde revaskularizasyon için hazır bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin anjiogenesis için büyüme faktörü salgıladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada kemik rejenerasyonunda önemli bir sınırlama oluşturan durumun damarsal yapının eksikliği olduğu bildirilmiştir. Hücrelerin besinleri alamadığı bir difüzyon bariyeri olduğu düşünülmektedir (212).

Çalışmamızda kullanılan rhBMP-2 dozu Stephan ve ark. çalışması ile benzerlik göstermektedir. rhBMP-2 kullanılan grupta 4. haftada 8. haftaya göre daha fazla kemik oluşumu görüldüğü bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda RhBMP-2 grubunda, 2.(%41) ve 4.haftalarda (%44) yeni kemik oluşumu yüzde ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır 2. haftada yapılan değerlendirmede rhBMP-2/kitosan taşıyıcı uygulanan grubun yeni kemik oluşumu yüzde ortalamasının (%41),

yalnız kitosan taşıyıcı grubundan (%20) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlenirken 4. haftada bu farklılığın devam etmediği görülmüştür. Bu verilere dayanarak 4. haftada rhBMP-2'nin taşıyıcıdan salınımının bitmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

BMP-2'nin çözünmeye yatkın olan sınırlı bir stabilitesi bulunmaktadır. Bu nedenle optimum taşıyıcının proteinin biyolojik aktivitesini oluşum esnasında ve in vivo uygulamadan sonra koruması gerekmektedir. RhBMP-2'nin defekte yerleştirilirken kan ile teması sonucu hızlı çözülerek ortamdan uzaklaşabilmesi söz konusudur. Bu nedenle defektteki kanama kontrol altına alındığı takdirde daha başarılı sonuçlar elde edilebileceğini tahmin etmekteyiz.

Literatürde birçok hayvan çalışmalarında farklı taşıyıcı materyaller ile BMP uygulamasına yer verilmiştir. Bir çok çalışmada rezorbe olabilen kollajen süngerin rhBMP-2'nin taşınması için kullanılabildiği bildirilmiştir (230,231). Fakat yan etkileri olduğunu belirten araştırmacılar da bulunmaktadır (232-234). Bu durum yüksek doz rhBMP-2 kullanılmasından veya proteinin kollajen süngere yetersiz retansiyonundan kaynaklanabilmektedir (235).

Wen ve ark polietilen glikol hidrojel (PEG-hidrojel) BMP taşıyıcısı olarak kullanarak in vivo ve in vitro bir çalışma yapmışlardır. PEG-hidrojel'den BMP-2'nin salınımının in vivo çalışmada en yüksek, in vitro çalışmada daha düşük ve kontrollü olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar biomateryalin potansiyel olarak etkin, fakat mekanik gücünün yetersiz olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir (236).

Kuroda ve ark. 96 adet wistar albino rat üzerinde bir çalışma yapmıştır. Her sıçanın sağ femoral metafizinde 3 mm genişliğinde kortikal kemik defektleri açılmıştır. Defektler atelokollajen tip 1 sünger (ACS) taşıyıcı ile rhBMP-2, ACS ile rhBMP-12 yalnız ACS yerleştirilmiş ve boş olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Operasyondan 2, 4 ve 8 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Yalnızca BMP-12 uygulanan grupta 2-4 hafta arasında yoğun fibroz doku varlığı bildirilmiştir. 2-8 haftada yeni kemik

oluşumunun sağlandığı ve 4 hafta sonra alınan örneklerde BMP-2 grubunda kollajen taşıyıcı kalıntısı varlığına rağmen kemik formasyonu oluştuğu görülmüştür. Çalışmanın sonucunda atelokollajen iskeletin vücutta yavaş çözünmesi nedeni ile kemik iyileşmesini geciktirebildiği, yeni kemik miktarının rhBMP-2'nin ağır basan aktivitesi sayesinde arttığı düşünülmüştür. 8 hafta sonunda ise tüm defektlerin kemikle dolduğu görülmüştür (237). Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer şekilde wistar albino ratlar üzerinde 3 mm çapında kortikal kemik defekti açılmıştır, 2. ve 4. haftalarda sakrifikasyon yapılmış ve yeni kemik oluşumunun sağlandığı bildirilmiştir. 4 hafta sonra alınan örneklerde bizim çalışmamızda da kitosan taşıyıcı madde kalıntısı varlığına rağmen kemik formasyonu oluştuğu gözlenmiştir. Çalışmalarda kullanılan taşıyıcı farklılığına rağmen benzer olarak taşıyıcının vücutta yavaş çözünmesi nedeni ile kemik iyileşmesini geciktirebildiği yeni kemik miktarının rhBMP-2 aktivitesi sayesinde oluştuğu düşünülmektedir.

Ruhe ve ark tarafından yapılan bir çalışmada rhBMP-2 /ACS ile rhBMP-2 poroz kalsiyum fosfat (Ca-P) taşıyıcı karşılaştırılmıştır. Tavşanların kafatasında açılan 8 mm genişliğindeki defektlere, 10 µg rhBMP-2 ile yüklenmiş 8 mm çapında diskler yerleştirilmiştir. Ca-P sementin uygun bir taşıyıcı olduğu ve lipolize rhBMP-2 ile kemik formasyonunun artırılabilceği, poroz Ca-P'in çözünürlülüğünün türe, uygulanan bölgeye ve uygulanan materyal boyutlarına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. ACS diskler su ile nemlendirilmiş ve ardından tabakalar lipolize edilmiştir. Araştırmacılar çalışmanın amacının, lipolize Ca-P sement iskeletin kemik formasyonu yapıp yapmadığını incelemek olduğundan kritik boyutta defekt yaratmaya çalışılmadığını bildirmiştir. RhBMP/ ACS iskeletin çok iyi osteoindüktif özellikleri olmasına rağmen şeklini koruyamamasının dezavantaj olduğunu, poroz Ca-P'in fizyolojik kemik iyileşmesini engellemediği ve implant etrafında fibröz kapsül oluşturmadığı bildirilmiştir. Diğer çalışmalarla tutarlı olarak bir kaç iltihap hücresi gözlendiği bildirilmiştir (207).

Çalışmamızda kullandığımız diğer materyal olan simvastatin, serum kolesterolünü düşürmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (13). Araştırmacılar bu özelliklerine ilave olarak kemik oluşturma etkileri olduğunu bildirmektedir (15).

Literatürde birçok hayvan çalışmalarında farklı taşıyıcı materyaller ile simvastatin uygulamasına yer verilmiştir. Araştırmacılar, simvastatinin 2.2mg (13), 0.5mg (15,203); 0.1mg, 0.5mg, 1mg, 1.5mg ve 2.2mg (8) dozlarını değerlendirmiştir. Metilselüloz jel (13), kollajen bovine (204), jelatin sünger (14,15), polilaktik asit/poliglaktik asit kopolimer (171), kalsiyum sülfat (238). taşıyıcılar kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Wong ve arkadaşları 2005 yılında New Zealand beyaz tavşanın parietal kemiklerinde simvastatinin kemik iyileşmesine etkisini erken dönemde histolojik olarak değerlendirmiştir. Statin grubundaki defektler kollajen matriks taşıyıcı ile simvastatin solüsyonu kullanılarak greftlenmiştir. Statin solüsyonu ise ticari olarak piyasada bulunan 10 mg'lık Zocor® tablet (MERCK & CO, Inc, NJ, USA), 2.5 mg/ml suda çözünerek elde edilmiştir. Kollajen matriks grubunda ise defektler kollajen matriks taşıyıcı, su ile karıştırılarak greftlenmiştir. Deney grubunda BMP-2'nin 4. Günde salındığı, 5. günde defekt kenarında yeni kemik oluşumu gözlemlendiği ve 6. günün sonunda yeni kemik miktarının artarak defekt merkezine doğru ilerlemeye başladığı bildirilmiştir. Statinin defekt bölgesine lokal olarak uygulanmasının kemik oluşumunu indüklediği ve hızlandırdığı aynı zamanda anjionezisi, kemik farklılaşmasını ve osteogenezisi regüle eden büyüme faktörlerinin erken salınmasını tetiklediği bildirilmiştir (203). Araştırmacılar bu çalışmanın simvastatinin suda çözünebildiğini ve çevre dokularda direk olarak BMP-2 salınımını indüklediğini gösterdiğini bildirmiştir.

Liu ve ark, simvastatinin TGFβ1 'in, BMP-2'nin VEGF'nin mRNA salınımına etkisini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Polilaktik asit/poliglaktik asit taşıyıcı, simvastatin eklenerek ya da eklenmeden mandibular kesici dişlerin çekim soketlerine implante edilmiştir. Deney grubunda 1. haftanın sonunda yüksek miktarda TGFβ1, BMP-2 ve VEGF mRNA salınımı gözlemlendiği bildirilmiştir. En fazla salınım miktarının 2 hafta sonunda görüldüğü bildirilmiştir. Araştırmacılar taşıyıcıdan salınan simvastatinin bu 3 osteoindüktif büyüme faktörünün salınımını artırabildiği ve yeni kemik oluşumunu artırabildiği sonucuna varmıştır. Araştırmacılar Wong ve ark.'nın 3. ve 4. günlerde kemik defektinde simvastatinin BMP-2 ve VEGF'nin erken salınımı

tetiklediğini belirten çalışmasından farklı olarak bu çalışmada bu erken salınım paterninin gözlenmediğini bildirmiştir (239).

Nyan ve ark. α -TCP ve simvastatin ile kemik oluşumu üzerine yaptıkları bir çalışmalarında bilateral olarak wistar albino cinsi sıçanların parietal kemiklerine 5 mm çapında defektler açmıştır. PCR analizinde 3.günde simvastatin/ α -TCP grubunda önemli derecede BMP-2 artışı görülmüştür. Bu grupta BMP-2 artışının migrasyonun başlaması ve osteojenik hücrelerin dura materden toplanması sonucu olduğu bildirilmiştir. Simvastatin grubunda BMP-2 salınımının 3. günde ve 14. günde önemli derecede artış gösterdiği ve 21. güne kadar salınımın devam ettiği bildirilmiştir. Yazarlar, 14. günden 21. güne kadar BMP-2'nin osteojenik hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasına ve osteogenezin artışına katkıda bulunabileceği sonucuna varmışlardır. Simvastatin grubunda yeni kemik oluşumunun 14. ve 21. günlerde önemli derecede artış gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar bu bulguların, kemik iyileşmesinin erken aşamasında önemli rol oynayan osteoprogenitör hücrelerin çoğalması ve temininin simvastatin tarafından stimule olan TGF- β 1 ve BMP-2 ile artırılabilirliğini gösterdiği sonucuna ulaşmıştır (240).

Bizim çalışmamızda simvastatin/kitosan grubunda yeni kemik oluşum yüzdesinin 14. günden (%34,41), 28. güne (%67,39) istatistiksel artış gösterdiği gözlenmiştir. Nyan ve ark. çalışmasına benzer olarak simvastatinin grubunda 14. günden 28. güne kemik iyileşmesini arttığı gözlemlenmiştir.

Literatürde birçok hayvan çalışmasında simvastatinin kemik oluşumuna etkisi piyasada bulunan Zocor® tablet (MERCK & CO, Inc, NJ, USA) kullanılarak araştırılmıştır (15,203).

Özeç ve arkadaşları 2007 yılında jelatin sünger taşıyıcı kullanarak simvastatinin yeni kemik oluşumuna etkisini araştırmıştır. Wistar Albino cinsi sıçanların angulus mandibulasına 3 mm çapında açılan defektler jelatin sünger ve suda çözünen simvastatin grefti ile doldurulmuştur. Deney grubunda 10 mg simvastatin içeren

Zocor® tableti (MERCK & CO, Inc, NJ, USA) ile 0.02 g kollajen matriks süngere 0.2 ml statin solüsyonu eklenerek simvastatin grefti hazırlanmıştır. Denekler 14. günde sakrifiye edilmiş ve herhangi bir yan etki veya inflamasyon gözlenmediği bildirilmiştir. Radyografik olarak kemik oluşan alanın yoğunluğu simvastatin uygulanan grupta kontrol grubuna göre %240, yalnız taşıyıcı grubuna göre %190 oranında fazla bulunmuştur. Histolojik değerlendirmede ise defekt alanın kenarında ve ortasında yeni kemik oluşumu gözlenmiştir. Yalnız taşıyıcı uygulanan grupta defekt kenarında dar bir alanda kemik oluşumu gözlenirken kontrol grubunda defektler fibröz bağ doku ile dolmuştur. Her üç grupta da defektin tamamen yeni kemik ile dolmadığı bildirilmiştir (15).

Özeç ve ark çalışmasında açılan defekt boyutu ile açtığımız defekt boyutu benzerlik göstermektedir. Taşıyıcı farklılığına rağmen çalışmalar arasında uygulanan simvastatin dozları (0.5mg) benzerlik göstermektedir. Bizim çalışmamız ile bu çalışmalar arasındaki en belirgin farklardan birisi farklı taşıyıcı materyal kullanılması ve bu taşıyıcının hazırlanış şeklidir. Bu çalışmalarda simvastatin piyasada bulunan Zocor® tablet (MERCK & CO, Inc, NJ, USA) suda çözünerek ve taşıyıcı olarak kullanılan kollajen süngere emdirilerek hazırlanmıştır. Kitosan taşıyıcı kullandığımız çalışmada 14 gün sonunda % 34 yeni kemik oluşum yüzdesi gözlenmiştir. Kitosan taşıyıcı kontrollü yavaş salınım yapması için mikroküre şeklinde hazırlanmıştır. 2.2 mg simvastatini sıçan kafatasında 50 µl metilselüloz jel enjeksiyon ile kullanan Thylin ve ark. 22 gün sonunda kemik kalınlığında %53 artış gözlemlemiştir. Jel simvastatin polilaktit membran altına implante edildiğinde kemik kalınlığında %159-172 artış ve kemik alanında %140-180 artış görüldüğü bildirilmiştir (13). Çalışmalar arasındaki bu farklılığın, simvastatinin uygulandığı doz, kullanılan taşıyıcı ve hazırlanış şeklinin farklılığından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Calixto ve ark. sıçanların kafatasında oluşturulan 5mm'lik defektlerde yaptıkları bir çalışmada simvastatinin kollajen sünger taşıyıcı ile kemik formasyonuna etkisi değerlendirilmiştir. 30 gün sonunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. 60 gün sonunda ise yalnız taşıyıcı uygulanan grup ile 0.5 mg simvastatin uygulanan grupta daha az kemik oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra

simvastatin uygulanan deneklerde kontrol grubuna göre kabuklanma, nekroz ve daha yüksek oranda enflamasyon varlığı gözlenmiştir. 0.5mg simvastatin uygulanan grupta enflamasyon ve kabuklanma belirtisinin 30 günden sonra azaldığı fakat kemik formasyonunda kontrol grubuna göre farklılık gözlenmediği bildirilmiştir. Araştırmacılar, yüksek simvastatin dozu (2.2mg/50ul) ile taşıyıcı materyal arasındaki ilişkinin, enflamatuvar reaksiyon yaratmış olabileceğini ve bu durumun özellikle yumuşak dokuda kabuklanma olan deneklerde kemik formasyonu yerine doku yıkımına yol açmış olabileceğini düşünmektedir (241).

Nyan ve ark. simvastatinin lokal uygulamada kemik stimülasyonu yapmasına rağmen yüksek dozda uygulandığında iltihabı indüklemesi nedeni ile α -trikalsiyum fosfat (α -TCP) ile simvastatini kombine edilerek çift taraflı Wistar albino sıçanların kafatası defektlerinde uygulamıştır. 5 mm çapında açılan defektlere (0, 0.01, 0.1, 0.25 ve 0.5 mg) farklı dozlarda simvastatin α -TCP partikülleri ile yerleştirilmiştir. Denekler 2. 4. ve 8. haftalarda sakrifiye edilmiştir. 0.25 ve 0.5 mg simvastatin dozları, greftlenen bölgede yumuşak dokuda enflamasyona neden olmuştur ve mikro CT analizinde α -TCP ve 0.1 mg simvastatin uygulanan grupta daha yüksek kemik hacmi görülmüştür. Defekt kapanması, kemik mineral içeriği ve kemik mineral yoğunluğu bu grupta diğerlerinden daha fazla olarak bildirilmiştir (242).

Nyan ve ark. simvastatin ve kalsiyum sülfatın kemik iyileşmesine etkisini araştırdıkları çalışmalarında sıçan kafatasında 8 mm çapında ve 1 mm kalınlığında kemik defekti açmışlardır. Bu defektlere kalsiyum sülfat yalnız veya 1mg simvastatin ile kombine edilerek uygulanmıştır. Yumuşak doku enflamasyonu en fazla kalsiyum sülfat/simvastatin grubunda gözlenmiştir. Defekt bölgesinde yumuşak dokuda 1. haftadan 5. haftaya kadar enflamasyon oluşumu gözlenmesine rağmen 8 hafta sonunda özellikle kalsiyum sülfat/simvastatin grubunda önemli miktarda kemik oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir (171).

Bizim çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan defektlerden birine Calixto ve Nyan'ın çalışmasına benzer olarak 0.5 mg simvastatin kitosan taşıyıcı ile uygulanmıştır.

14. ve 28. günlerde değerlendirmeler yapılmıştır. Her iki sakrifikasyon döneminde de deneklerde deride herhangi bir kabuklanma bulgusuna rastlanmamıştır. Fakat histolojik incelemede iltihap bulgusuna rastlanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmasada en fazla iltihabın yalnız kitosan taşıyıcı kullanılan grupta görüldüğü gözlenmiştir. Calixto'nun çalışmasında 30 günde gruplar arasında kemik oluşumunda farklılık görülmezken bizim çalışmamızda 4 hafta sonundaki değerlendirmede yalnız kitosan nanopartikül taşıyıcı uygulanan grup (%33) ve kontrol grubunda (%27) kemik oluşumunun benzer olduğu görülmüş ve simvastatin içeren kitosan nanopartikül taşıyıcı grubundan (%67) istatistiksel olarak anlamlı miktarda düşük yeni kemik alanı yüzdesi gözlenmiştir.

Kılıç ve ark. çalışmasında 18 adet new zealand beyaz tavşana çift taraflı mandibular distraksiyon osteogenezi yapılmıştır. Çalışmada 7 günlük boş (nötr) fiksasyondan sonra 10 gün boyunca günde 2 kez 0.4 mm distraksiyon yapılmıştır. Simvastatin osteotomi fazı boyunca lokal olarak jelatin sünger taşıyıcı ile oral yoldan (gavaj ile) uygulanmıştır. Simvastatinin lokal olarak uygulandığı grupta boşluk 0.2 ml statin solüsyonu 10 mg Zocor® tablet (Merck&Co, Inc, NJ, USA) suda çözülerek hazırlanmıştır ve 0.02 g jelatin sünger ile karıştırılmıştır. Sistemik uygulanama grubunda 10 mg simvastatin tabletler ezilip su içerisinde bekletilip operasyondan sonraki 1.günden itibaren gastrik tüp ile uygulanmıştır. 14 günlük konsolidasyon süresi sonunda tüm denekler sakrifiye edilmiştir. Radyolojik değerlendirmede simvastatin grubunda %9.6 oranında daha fazla rejenerasyon görülmüştür. Histomorfometrik değerlendirmede kemik hacmi ve fibröz doku oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Gutierrez ve ark. lovastatinin sıçanlara oral yoldan verildiğinde statinlerde yaklaşık 6 saatte dağılan geçici bir artış belirlemiştir. Bu bilgiye dayanarak çalışmada simvastatin 6 saatlik aralıklara uygulanmıştır. Yazarlar bu nedenle aralıklı kemik stimülasyonu görüldüğünün düşünülebileceğini bildirmiştir (159). Kılıç ve ark. bu çalışmada statinlerin osteoklast inhibisyonunun etkisini gözlemlememiştir. Kılıç ve ark, mandibular distraksiyonda 0.5 mg simvastatin jelatin sünger ile kullanıldığında histolojik değerlendirmede deney ve kontrol grubunda herhangi bir istatistiksel farklılık gözlemlememiştir. Bu bulgular bizim bulgularımızdan farklılık göstermektedir. Bu farklılık aynı doz uygulanmasına rağmen simvastatinin taşıyıcısından ve hazırlanış

şeklinden kaynaklanabilir. Bu çalışmada taşıyıcı piyasada bulunan tablet formundaki ilaç kullanılarak elde edilmiştir. Zocor® tablet (Merck&Co, Inc, NJ, USA) etkin madde olan simvastatin dışında çeşitli yardımcı maddeler içermektedir. Bu maddelerin defekt alanında kemik oluşumuna etki edebileceği nedeni ile simvastatinin saf halde kullanımının daha doğru sonuçlar ortaya koyabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda kullanılan simvastatin saf halde üretici firmadan temin edilmiştir ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Bölümünde kitosan taşıyıcılar ile hazırlanarak uygulanmaya hazır hale getirilmiştir.

Lima ve ark. bir çalışmalarında sıçan kafatasına açılan defektlerin tamirinde simvastatin ve DBBM'in etkisini araştırmıştır. 64 adet sıçanın kafatasına 4 adet defekt açılmıştır. Denekler; kontrol grubu, DBBM uygulanan grup, simvastatin (2.2mg/50ul) /DBBM ve simvastatin (0.5mg/50ul) /DBBM uygulanan grup olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Denekler 30. ve 60. gün sonunda sakrifiye edilmiştir. 30.günün sonunda en düşük doz simvastatin uygulanan grupta en düşük kemik yoğunluğu görülürken 60.günde ise doza bakmaksızın simvastatin uygulanan gruplarda daha az kemik oluşumu gözlenmiştir. Histomorfometrik analizde, 30.günde DBBM ve DBBM/simvast (2.2mg) grubunda kemik formasyonuna negatif etkisi olduğu bildirilmiştir. 60. Günde test edilen birleşimlerden hiçbirisi kemik oluşumunu bozmamıştır. Bu sonuçlar, DBBM ve simvastatin kombinasyonunun kemik tamirine negatif etkisi olduğunu göstermektedir (243). Ma ve ark, çalışmasında da lokal olarak 0.1, 0.9 ve 1.7 mg simvastatin tibial implantlara beta trikalsiyum fosfat ile kombine edilerek kullanılmıştır ve kemik iyileşmesine negatif etkisinin bulunduğu gözlemlenmiştir (244).

Galus ve ark. farelerin intramusküler ceplerine sıçan kaynaklı demineralize kemik matriksi (DBM) yerleştirilerek heterotropik ossifikasyon modeli oluşturdıkları çalışmalarında, deney grubuna 25 gün boyunca günde 3.6 mg/kg dozunda fluvastatin enjekte edilirken kontrol grubuna placebo verilmiştir. Araştırmacılar, fluvastatin uygulanan grupta alkaline fosfatın serum konsantrasyonunda artış gösterdiği ve heterotropik ossifikasyonu etkileyebildiği sonucuna ulaşmıştır (245).

Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak statin grubu ilaçlardan fluvastatin kullanılmıştır. Çalışmada enjeksiyon yöntemi ile heterotropik ossifikasyon modeli oluşturulması ve farklı bir statin kullanılması nedeni ile çalışmamız ile kıyaslanamamıştır.

Wu ve ark. çalışmalarında wistar albino cinsi sıçanlar üzerinde diş çekiminin ardından rezidüel kret rezorpsiyonuna simvastatinin etkisini araştırmıştır. Simvastatin polilaktik asit/poliglikolik asit kopolimer taşıyıcılar kullanılarak deneklerin çekim soketlerine implante edilmiştir. Denekler 1. 2. 4. 8. ve 12. haftalarda sakrifiye edilmiştir. PLGA/simvastatin grubunda 4. 8. ve 12. haftalarda kontrol grubuna göre kemik mineral yoğunluğunun daha fazla olduğu ve yeni oluşan kemik adaları varlığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, çekim soketlerinde 8 hafta sonunda PLGA taşıyıcı partiküllerinin gözlendiğini, 12 hafta sonunda ise bu partiküllerin rezorbe olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, 1 hafta sonunda kontrol grubunda PLGA/simvastatin grubuna göre daha fazla inflamatuvar hücre görüldüğünü bildirmiştir. Deney grubunda görülen kemik formasyonunun simvastatinin osteoindüktif karakteristiğine bağlanabileceği ve simvastatinin sürekli salınımının osteoblastlarda matriks üretimini ve kalsifikasyonu artıracak bir seri büyüme faktörü salınmasını artırdığı bildirilmiştir (171).

Seto ve ark. 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada in vitro olarak kültüre edilen sıçan kafatası hücrelerinde osteoblastik farklılaşmada simvastatinin etkisini araştırmıştır. In vivo olarak ise sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan periodontitis nedeni ile alveolar kemik kaybının tedavisinde topikal simvastatin uygulamasının etkisi araştırılmıştır. 15 adet fischer cinsi sıçanın maksiller 2.molar dişinin servikal bölgesi ligatüre edilmiştir. 5 adet sıçan 20 günün ardından sakrifiye edilmiş ve maksillaları kontrol grubu olarak ele alınmıştır. Diğer deneklere 70 gün boyunca 2.molarların bukkaline haftada 2 kez 0.2mg simvastatin enjekte edilmiştir. Bu çalışmada 0.2mg/50uL topikal simvastatin uygulamasının periodontal dokularda herhangi bir inflamasyona yol açmadan alveolar kemik hacmini artırdığı bildirilmiştir (246).

Pauly ve ark. 200 adet sprague-dawley sıçanın tibiasında oluşturulan kırıkları intramedüller olarak simvastatin veya rhBMP-2 kaplanmış veya kaplanmamış kirschner telleri ile stabilize ettikleri bir çalışma yapmıştır. Deneklere uygulanan titanyum kirschner teller; kaplanmamış olarak, PDLLA ile kaplanmış olarak, düşük doz simvastatin/PDLLA ile kaplanmış ($3\mu\text{g}$) olarak, yüksek doz simvastatin/PDLLA ($50\mu\text{g}$) ile kaplanmış olarak, PDLLA/rhBMP-2 ($50\mu\text{g}$) ile kaplanmış olarak 5 gruba ayrılmıştır. Denekler 28. ve 42. günlerde sakrifiye edilmiştir. 28 gün sonra yapılan sakrifikasyonda BMP-2 uygulaması ve yüksek oranda simvastatin uygulaması ile biomekanik stabilitenin ve kallus mineralizasyonunun geliştirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır. BMP-2 uygulamasının statine göre daha erken kemik stimülasyonu yaptığı bildirilmiştir. 42. günde yüksek doz statin uygulanan deneklerde daha fazla mekanik stabilite ve daha az kırık oluşumu gözlenmiştir. Simvastatinin lokal olarak uygulandığında BMP-2 ile benzer şekilde faydalı etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Araştırmacılar BMP-2'nin simvastatine göre erken etki göstermesinin; simvastatin, BMP-2'nin endojen salınımını stimule ederken BMP-2'nin, direk olarak progenitör hücrelerin ve osteoblastların stimülasyonunu sağlamasına bağlı olduğunu düşünmektedir (247). Mundy, statinlerin 3-5 gün içinde çabucak BMP-2 cevabı oluşturduğunu fakat bu etkide herhangi bir durasyon veya yoğunluk gözlenmediğini bildirmiştir (17).

Çalışmamızda 28. günde Pauly ve ark. farklı olarak simvastatin uygulanan grupta rhBMP-2 uygulanan gruptan istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha fazla yeni kemik alanı görülmüştür. Çalışmalar arasındaki farklılıklardan biri takip süresidir. Uzun bekleme süresinin kemik oluşumunu artırdığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da BMP-2 içeren kitosan nanopartikül taşıyıcı grubunda 14.günde yalnız kitosan taşıyıcı uygulanan gruptan anlamlı şekilde yüksek yeni kemik alanı yüzdesi görülmüştür. Bunun sebebi Pauly ve ark. çalışmasındaki gibi BMP-2'nin direk olarak osteoblast stimülasyonu sağlaması nedeni ile olduğu düşünülebilir.

BMP ailesi osteoindüktif özelliklerini en etkili şekilde kullanmak amacıyla çeşitli çalışmalarla araştırılmaktadır. Moleküler biyoloji alanındaki teknikler geliştikçe bu proteinlerin fonksiyonlarının daha iyi anlaşılabilceğini ve taşıyıcı sistemler

geliştikçe BMP'lerin ve statinlerin, iskeletsel defektlerin tedavisinde hekimler için daha güçlü araçlar haline geleceğini düşünmekteyiz. Bu çalışmadan yola çıkarak statinlerin kemik greft materyallerine göre daha düşük maliyetinin olması, yan etkilerinin azlığı ve kolay elde edilebilir olması gibi avantajları nedeniyle kemik greft materyali olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Kemik defektlerinde deneysel yönden taşıyıcının rezorpsiyon süresi, dokuda simvastatinin ve BMP'nin doza bağlı salınım zamanı gibi konuya ait açık yönlerinin çok iyi araştırılmasının gerektiğine inanıyoruz. Benzer materyal ve methodla daha fazla sayıda hayvan modellerinde BMP'nin ve simvastatinin etkinliğinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

1. Histomorfometrik olarak incelendiğinde defekt alanlarına ait yeni kemik alanı yüzdesinin deney ve kontrol bölgelerinde 14. günden 28.güne artış gösterdiği izlenmiştir.
2. Simvastatin içeren kitosan nanopartikül ve rhBMP-2 içeren kitosan nanopartikülün defekt ortamına yerleştirilmesi için hazırlanan kitosan nanopartikül taşıyıcının kullanımında sorun yaşanmadığı ve uygun bir taşıyıcı olduğu görülmüştür.
3. Yalnız kitosan nanopartikül taşıyıcı uygulanan defektlerde yabancı cisim reaksiyonu, enflamasyon görülme oranının istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha fazla olduğu görülmüştür.
4. Grupların ikili değerlendirilmesinde 2. haftada RhBMP-2 içeren kitosan nanopartikül taşıyıcı grubunda kemik oluşum yüzdesinin yalnız kitosan nanopartikül taşıyıcı uygulanan gruptan istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha fazla olduğu görülmüştür.
5. RhBMP-2 içeren kitosan nanopartikül taşıyıcı grubunda 2. hafta ile 4. hafta arasında kemik oluşumu yüzdesinin benzer olması nedeni ile rhBMP-2'nin salınım miktarının 2. haftadan sonra azaldığı ya da bittiği düşünülebilir.
6. Simvastatin içeren kitosan nanopartikül taşıyıcı grubunda 4 haftalık deney süresi sonunda istatistiksel olarak anlamlı miktarda en yüksek değerde kemik oluşumu yüzdesi görülmüştür.

7. Kitosan nanopartikül taşıyıcı yalnız başına kullanıldığında kemik oluşum değerleri açısından kontrol grubundan farklı olmamakla birlikte rhBMP-2 veya simvastatin ile birlikte uygulandığında kemik oluşumunda artış görülmüştür.

8. Çalışma sonuçlarına göre ileriki çalışmalarda in vitro olarak kullanılacak taşıyıcının partikül miktarı etkin madde salınım çalışmaları yapılarak salınımın optimizasyonu sağlanmalıdır. Bu sayede etkin madde veya partikülün biyoparçalanımı kontrol edilebilecektir.

9. Simvastatin veya rhBMP-2'nin, insan çalışmalarında horizontal/vertikal augmentasyon işlemlerinde, sinus lifting gibi ileri cerrahi ameliyatlarda greft materyali olarak kullanılması için daha fazla sayıda hayvan ve klinik çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Gomez-Roman GJ (2001). Influence of flap design on peri-implant interproximal crestal bone loss around single-tooth implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 16 (1):61-7.
2. Misch CE (1990). Divisions of available bone in implant dentistry. *Int J Oral Implantol*, 7: 9-17.
3. Alam S, Ueki K, Nakagawa K, Marukawa K, Hashiba Y, Yamamoto E, Sakulsak N, Iseki S (2009). Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107: 22-29.
4. Horiuchi N, Maeda T (2006). Statins and Bone Metabolism. *Oral diseases*, 12: 85-101.
5. Wikesjö UM, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Shanaman RH, Rohrer MD, Wozney JM, Hall J (2008). Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J Clin Periodontol*, 35(11): 1001-10.
6. Bosch C, Melsen B, Gibbons R, et al. (1996). Human recombinant transforming growth factor-beta 1 in healing of calvarial bone defects. *J Craniofac Surg*.;7:300 -310.
7. Hong L, Tabata Y, Miyamoto S, et al. (2000). Promoted bone healing at a rabbit skull gap between autologous bone fragment and the surrounding intact bone with biodegradable microspheres containing transforming growth factor-beta1. *Tissue Eng*, 6: 331-340.
8. Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N, Marx DB, Cullen DM, Reinhardt RA (2005). Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation *J. Periodontol*, 76 (11): 1861-702.
9. Hunninghake DB (1998). Therapeutic efficacy of the lipid-lowering armamentarium: The clinical benefits of aggressive lipid-lowering therapy. *Am J Med*, 104: 9-13.
10. Grasser WA, Baumann AP, Petras SF, Harwood HJ, Devalaraja R, Renkiewicz R (2003). Regulation of osteoclast differentiation by Statins. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 3(1): 53-62.

11. Cruz AC, Gruber BL (2002). Statins and osteoporosis: Can these lipid-lowering drugs also bolster bones. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 69(4): 277- 88.
12. Stancu C, Sima A (2001). Statins: Mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*, 5(4):378-87.
13. Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, Reckling RR, Ojha J, Bhattacharyya I (2002). Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *J Periodonto*, 73 (10): 1141-8.
14. Kılıç E (2005). Lokal ve Sitemik Simvastatin Uygulamalarının Distraksiyon Osteogenezi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak incelenmesi. Doktora tezi. Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi;
15. Ozeç I, Kilic E, Gumus C, Goze F (2007). Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *J Craniofac Surg*, 18 (3): 546-50.
16. Van Staa TP, Wegman S, De Vries F, Leufkens B, Cooper C (2000). Use of statins and risk of fractures. *J Am Med Assoc*, 285: 1850-5.
17. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G (1999). Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*, 286 (5446): 1946-9.
18. Ismail FA (2006). Design and in vitro evaluation of polymeric formulae of simvastatin for local bone induction. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32 : 1199-206.
19. Havsa T (2002). Overektomili sıçanlarda simvastatinin kemik, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarına etkisinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi.
20. Lee YM, Park YJ, Lee SJ (2000). Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol*. 71:410–417.
21. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB (1996). Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodontol*. 67: 1170–1175.
22. Klokkevold PR, Lew DS, Ellis DG (1991). Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*, 49: 858–863.
23. Klokkevold PR, Fukayama H, Sung EC (1999). The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*, 57:49 –52.
24. Canter Hİ, Vargel İ, Korkusuz P, Öner F, Günördük DB, Çil B, Karabulut E, Sargon MF, Erk Y (2010). Effect of Use of Slow Release of Bone Morphogenetic

- Protein-2 and Transforming Growth Factor-Beta-2 in a Chitosan Gel Matrix on Cranial Bone Graft Survival in Experimental Cranial Critical Size Defect Model. *Ann Plast Surg*, 64: 342-350
25. Junguiera, LC, Carneiro, J, Kelley, RO (1998). *Temel Histoloji*. 8.Baskı. İstanbul: Barış Kitabevi Ltd. Sti. pp132-151.
 26. Soydan N (1982) *Genel Histoloji*. İstanbul, İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi
 27. Çakarer S. Sıçan tibialarında oluşturulan distraksiyon osteogenezisinde trombin peptidi (TP508) uygulamasının kemik üzerindeki histopatolojik etkilerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2008
 28. Hüsmani T. Siklosporin-A uygulanan sıçanlarda, antioksidanların (selenium ve vitamin E), çekim yarası iyileşmesi izerine etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2007
 29. Tanakol R. Fizyopatolojik Etmenler içinde Gökçe Kutsal Y(Ed.) *Osteoporoz* Günes Kitabevi Ltd.Sti., Ankara,2005:3-70
 30. Gehron-Robey, P. and Boskey, AL, The biochemistry of bone, in *Osteoporosis*, Marcus, E, Feldman, D., and Kelsey, J., Eds., Academic Press, San Diego, 1996, chap 4.
 31. Bloom W, Fawcett DW. A textbook of histology. 10th ed, W.B. Saunders Philadelphia, 1975, chap 10.
 32. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. 9.baskı, Nobel, 1996; 901-902.
 33. Hollinger JO, Buck CD, Bruder PS. Biology of bone healing:it's Impact On Clinical Therapy.In "Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics" Lynch S.E., Genco R.J., Marx, R.E. 1st ed, Quintessence Publishing, 1999, chap 1.
 34. Biologic growth factors and bone morphogens in bone regeneration procedures pp Bone 253-267.
 35. Dimitrios J & Androulakis I, Bone Remodeling, N.Y. Acad. Sci. 1092, pp. 385-296,2006.
 36. Garant PR. Oral Cells and Tissues. Quintessence Publishing Co. Inc. Illinois: 2003, chapter7-8
 37. Jee WSS (2001). Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: Cowin SC (ed). *Bone Mechanics Handbook*. 2. ed. CRC Press, Florida, 1- 68.

38. Meade JB, Cowin SC, Klawitter JJ, Van Buskirk WC, Skinner HB (1984) Bone remodeling due to continuously applied loads. *Calcif Tissue Int* 36: 25-30.
39. Puzas FJ, Lewis GD (1999) Biology of osteoclasts and osteoblasts, in *Orthopaedics. Principles of Basic and Clinical Science*, chapter 3.
40. Themistocleous GS, Katopodis H, Sourla A, Lembessis P, Doillon CJ, Soucacos PN, Koutsilieris M (2004) Three-dimensional type I collagen cell culture systems for the study of bone pathophysiology. *In Vivo*; 18:687-696.
41. Boyan B & Ranly D (2006) Use of Growth Factors to Modify Osteoinductivity of Demineralized Bone Allografts: Lessons for Tissue Engineering of Bone, *Dent Clin N Am* 50; 217-228.
42. Jorgensen N (2005), *Supplementum No.118, VOL. 113*,
43. Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J (1990) Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. *Calcif Tissue Int Jan*;46(1):46-56
44. Aytekin Y, Solakoğlu S (2003) *Temel Histoloji*.10. Baskı. İstanbul Nobel Tıp Kitapevi Ltd. Şti. 41-56;.
45. Goldstein S (2006). *Tissue Engineering Solutions for Traumatic Bone Loss*, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*;152-156.
46. Bevelander G. *Essentials of Histology*, The C.V.Mosby Company, 6th ed, 1970, chap 5.
47. Burkus JK, Ganey TM, Ogden JA (1993). Development of the cartilage canals and the secondary center of ossification in the distal chondroepiphysis of the prenatal human femur. *Yale J Biol Med* 66: 193-202.
48. Gerber HP, Ferrara N (2000). Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10: 223-228.
49. Clemens TL Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (1996). Vasoactive Agents and Bone metabolism. In: *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego. pp. 597-605.
50. Visco DM, Van S, Hill MA, Kincaid SA (1989). The vascular supply of the chondro-epiphyses of the elbow joint in young swine. *J Anat* 163: 215-229.
51. Nikolova G, Strilic B, Lammert E (2006). The vascular niche and its basement membrane. *Trends Cell Biol*, 17:19-25.

52. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25: 977-988.
53. Hayashi K (1992). Three-dimensional organization of the cartilage canal—a scanning electron-microscopic study by vascular cast of the rabbit's femoral head. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 66: 548-559.
54. Ytrehus B, Carlson CS, Lundeheim N, Mathisen L, Reinholt FP, Teige J, Ekman S (2004). Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs—development with age, growth rate, weight and joint shape. *Bone*, 34: 454-465.
55. Kanczler JM, Oreffo ROC (2008). Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *European cells And Materials*, 15:100-114.
56. Marks SC, Hermey DC Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (1996). The Structure and Development of Bone. In: *Principles of Bone Biology*. Academic Press, SanDiego. pp. 3-24.
57. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, Bouillon R, Carmeliet G (2002). Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev*, 111: 61-73.
58. Dedeoglu RK. DBM ve Beta trikalsiyum fosfatın deneysel kemik defektlerinde ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında iyileşme üzerine olan etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniv. Dishekimligi Fakültesi, 2004; İstanbul
59. Cheung A, Phillips AM (2006). Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery, *Current orthopaedics*, 20: 424-429
60. Rosenberg E, Rose LF (1998). Biologic And Clinical Considerations For Autografts And Allografts and Periodontal Regeneration Therapy. *Dental Clinics Of North America*, 42(3): 467-490
61. Kılıçoğlu SS (2002). Mikroskopik düzeyde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2:143-150.
62. Fellah BH, Josselin N, Chappard D, Weiss P, Layrolle P (2007). Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate microparticles *J Mater Sci Mater Med*, 18(2):287-94

63. Errikson RA, Alberktsson T (1983). Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury. Avital microscopic study in rabbit. *J Prosthet Dent*, 50:101-7
64. Dörtbudak-Kneissl E, Dörtbudak O, Benhart R (2000). Die Photo-dynamische Therapie zur Keimreduction bei paradontalen Erkrankungen. *Z. Stomatol*, 1:1-4
65. Betz RR (2002). Limitations of autograft and allograft. New synthetic solutions. *Orthopedics*, 25:561-70.
66. Frost HM (1989). The biology of fracture healing on over view for clinicians part 1. *Clin Orthop Rel Res*, 248:283-293
67. Firatli E, Ozyuvaci H, Nelsen K (2004). Histological evaluation of sinus lifting procedures with various graft materials *IADR/AADR/CADR 82nd General*, 82:10-13
68. Byrd HS, Hobar PC (1993). Augmentation of craniofacial skeleton with porous hydroxylapatite granules. *Reconst Surg*, 91: 15-22
69. Oral O (2000). L-Dopa'nın kemik greftlerinin iyileşmesi üzerine olan etkilerinin deneysel araştırılması-Doktora tezi. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. İstanbul; 4-22
70. Fleet JC, Cashman K, Cox K, Rosen V (1996). The effects of aging on the bone inductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology*, 37: 4605-10.
71. Fleisch H (1997). Bisphosphonates in Bone Diseases. From the Laboratory to the Patient. 3rd ed, Parthenon Publishing Group, New York, chap1.
72. Ham AW, Harris WR (1971). Repair and transplantation. In: Bourne GH (ed): *Biochemistry and Physiology of Bone*. Vol I. New York, Academic Press, pp.338-399.
73. Robert B, Bently D, Bently G (1983). *Mercer's Orthopaedic Surgery*. London, 8th ed. 1983 27-65.
74. El Montaser MA, Devlin H, Sloan P, Dickinson MR (1997). Pattern of healing of calvarial bone in the rat following application of the erbium-YAG laser. *Lasers Surg Med*, 21(3):255-61.
75. Baron T, Tran Van P, Vignery A (1982). Local control of bone remodelling: a suggested role for receptor mediated endocytosis. New York, Excerpta Medica, 123-1. 8-6.
76. Galletti G (1991). Low-Energy Density Carbondioxide laser AS Deep Tissue Medicine & Surgery-June

77. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R (2007). Bone morphogenetic proteins in clinical 175 applications, *ANZ J Surg*, 77(8):626-31.
78. Viljanen VV, Lindholm TC, Gao TJ, Lindholm TS (1997). Low dosage of native allogenic bone morphogenetic protein in repair of sheep calvarial defects. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 26:389-93
79. Tuz HH, Akal UK, Cambazoğlu M, Kisnisci RS (2004). Use of Spongious Bone Chips And Fascia Temporalis Dn Alveolar Bone Defects. *Turk J Med Sci*, 34:179-185.
80. Urist M (1965). Bone:Formation by autoinduction. *Science*, 12;150(3698):893-9
81. Kain MS, Einhorn TA (2005). Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures. *Foot Ankle Clin*, 10(4):639-50
82. Majumdar MK, Wang E, Morris EA (2001). BMP-2 and BMP-9 promote chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcome the inhibitory effect of IL-1. *J Cellular Physiol*, 189: 275-84.
83. Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, Woods WL, Reddi AH (1989). Purification and partial amino acidsequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem*, 264(23): 13377-80.
84. Wozney JM (1992). The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*, 32(2): 160-67.
85. Urist MR, Strates BS (1971). Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*,50:1392-1406.
86. Reddi AH, Huggins CB (1973), Influence of geometry of transplanted tooth and bone on transformation of fibroblasts. *Proc. Soc Exp Biol Med*,143:634-637
87. Muthukumaran N, Ma S, Reddi AH (1988). Dose dependence of and threshold for optimal bone induction by collagenous bone matrix and osteogenin-enriched fraction. *Coll Relat Res*, 8:433-441
88. Bahamonde ME, Lyons K (2001). BMP3: To be or not to be a BMP3? *J Bone Joint Surgery Am*,83-A:56-62
89. Reddi AH (2000). Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage:Inductive signals, stem cells and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng*, 6:35-359
90. Özkaynak E, Rueger DC, Drier EA (1990). OP-1CDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO J*, 9:2085-2093

91. Takaoka K, Yoshikawa H, Hashimoto J, Miyamoto S, Masuhara K, Nakahara H, Matsui M, Ono K (1993). Purification and characterization of a bone-inducing protein from a murine osteosarcoma. *Clin. Orthop*, 292:122–129.
92. Xiao Y, Xiang L, Shao J (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3):550-553
93. Hogan BL (1999). Morphogenesis. *Cell*, 96:225-233
94. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM (1990). Identification of transforming growth factor β family members present in bone inductive protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 87:9843–9847.
95. Scheufler C, Sebald W, Hulsmeier M (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 287:103-115.
96. Israel DI, Nove J, Kerns KM (1996). Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors*, 13:291-300.
97. Kirker-Head CA (2000). Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 43:65–92.
98. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H (2001). Divergence and convergence of TGF- β /BMP signaling. *J Cell Physiol*, 187:265-276.
99. Shore EM, Xu M, Feldman GJ (2006). A recurrent mutation in the BMP type 1 receptor ACVRI causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet*, 38:525-527
100. Kirsch T, Sebald W, Dreyer MK (2000). Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol*, 7:492-496
101. Hassel S, Schmitt S, Hartung A (2003). Initiation of Smad-dependent and Smad independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am*, 85A:44-51
102. Ten Dijke P, Korchynskyi O, Valdimarsdottir G (2003). Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 211:105-113.
103. Massague J (1998). TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67:753-91.
104. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P (2000). Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*, 267:6954-67

105. Caplan AI, Pechak D. The cellular and molecular biology of bone formation. In: Peck W.A.(Ed). Bone and Mineral Research. New York: Elsevier, 1987:117.
106. Lai CF, Cheng SL (2002). Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 277:15514–15522
107. Reddi AH (2001). Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg*, 83S:1-6.
108. Groeneveld EHJ, Burger EH (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*, 142:9-21.
109. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A (1995). Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res*, 13:357-67.
110. Sakou T (1998). Bone morphogenetic proteines: from basic studies to clinical approaches, *Bone*, 22: 591– 603. 110
111. Levent Y, Guero S, Guillemain G Utilisation du Corail en Remplacement de Greffes asseuses en Chirurgie Faciale Quatre ans de Recul. *Annales de Chirurgie Plastique et Esthetique* 33 (3) :279-282.
112. Akay MC, Günbay S, Ertürk S (1999). Benign Odontojen Tümörlerin SDAS Kemik Greftları ile Tedavisi (2 Olgu Nedeniyle). *Akademik Dental* 1(3): 100- 4.
113. Archer WH (1994). Oral and Maxillofacial Surgery Vol II VVBSaunders Company. 197525. Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG.: Bone Grafts, Derivates and Substitutes. Utterworth-Helemann Company.Oxford, 3- 80.
114. Urist MR, Silverman BF, Buring K (1967). The Bone Induction Principle. *Clin Orthop Rel Res*, 53: 243-283.
115. Fujii M, Takeda K, Imamura T (1999). Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell*, 10:3801-13.
116. Cochran DL, Wozney JM (1999). Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontal* 2000, 19:40-58
117. Thies RS, Bauduy M, Ashton BA (1992). Recombinant humsn bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation via W-2017 stromal cells. *Endocrinology*, 130:1318-1324

118. Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T (1990). The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 172:295-299
119. Rosen V, Nove J, Song JJ (1994). Responsiveness of clonal limb bud cell lines to bone morphogenetic protein 2 reveals a sequential relationship between cartilage and bone cell phenotypes. *J Bone Miner Res*, 9: 1759-1768
120. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 127:1755-1766
121. Samuel E. Lynch, Robert Max, Myron Nevins, Leslie Lynch. *Tissue Engineering* 2.edition;2008 page: xiv
122. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc.Natl Acad Sci USA*; 87:2220-2224
123. Seeherman H (2001). The influence of delivery vehicles and their properties on the repair of segmental defects and fractures with osteogenic factors. *J Bone Joint Surg Am*; 83A:79-81
124. Saito N, Murakami N, Takahashi J, Horiuchi H, Ota H, Kato H, Okada T. Nozaki K, Takaoka K (2005). Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:1037-1048
125. Kishida Y, Naito A, Iwado S, Terahara A, Tsujita Y (1991). Research and development of pravastatin. *Yakugaku Zasshi*;111:469-87.
126. Alegret M, Silvestre JS (2006). Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 28(9): 627- 56.
127. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y (1976). ML-236A, ML-236B, ML-236C new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* 29: 1346-1348,
128. Brown MS, Faust JR, Goldstein JL (1978). Induction of 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J Biol Chem*, 253: 1121-1128.

129. Davidson MH (2002). Rosuvastatin: a highly efficacious statin for the treatment of dyslipidaemia. *Expert Opin Invest Drugs*. 11: 125–141,
130. Stancu C, Sima A (2001). Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*, 5(4): 378-87.
131. Blumenthal RS (2000). Statins: Effective antiatherosclerotic therapy. *Am Heart J*, 139 c(4):577-83.
132. Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D (1995). Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation*, 92: 3172–3177.
133. Fassbender K, Simons M, Bergmann C et al (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease b-amyloid peptides Ab42 and Ab40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 5856–5861.
134. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F (2000). Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*, 6:1399–1402.
135. McTavish D, Sorkin EM (1991). Pravastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 42:65–89.
136. Aktürk O. Hiperkolesterolemi oluşturulan ratlarda HMGCoA redüktaz inhibitörü ilaçlarla (statinler) tedavinin hipokampal NMDA reseptörü subunitlerine etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı 2006, Isparta
137. Brown MS, Goldstein JL (1986). A receptor – mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232: 34-47,
138. Ginsberg HN (1998). Effects of statins on triglyceride metabolism. *Am J Cardiol*, 81: 32B-35B,
139. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F (1999). New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*, 84:413–428,
140. Knopp RH (1999). Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med*, 341:498–511.
141. Cunha-Cruz J, Saver B, Maupome G, Hujoel PP (2006). Statin use and tooth loss in chronic periodontitis patients. *J Periodontol*, 77(6): 1061-6.
142. Pantoni L, Garcia JH (1997). Cognitive impairment and cellularrrvascular changes in the cerebral white matter. *Ann N Y Acad Sci*, 826: 92–102.

143. Stalker TJ, Lefer AM, Scalia R (2001). A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br J Pharmacol*, 133: 406–412.
144. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M et al (2001). Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med*, 344: 1959–1965.
145. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E (1999). Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*, 100:230–235
146. Hidaka Y, Eda T, Yonemoto M, Kamei T (1992). Inhibition of cultured vascular smooth muscle cell migration by simvastatin (MK-733). *Atherosclerosis*, 95: 87–94.
147. Aikawa M, Rabkin E, Voglic SJ et al (1998). Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res*, 83: 1015–1026.
148. Thunyakitpisal PD, Chaisuparat R (2004). Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduced the expression of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase b) in osteoblastic cells and ht1080 fibrosarcoma cells. *J Pharmacol Sci*, 94(4):403-9.
149. Human JA, Ubbink JB, Jerling JJ, Delport R, Vermaak WJ, Vorster HH (1999). The effect of Simvastatin on the plasma antioxidant concentrations in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Chim Acta*, 263 (1):67–77,
150. Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S (2000). Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 271: 688–692.
151. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N (2001). Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 280: 874–877.
152. Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N (2004). Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem*, 92: 458–471
153. Parhami F, Mody N, Gharavi N, Ballard AJ, Tintut Y, Demer LL (2002). Role of the cholesterol biosynthetic pathway in osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 17: 1997–2003.

154. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N (2003). Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology*, 144: 681–692
155. Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H et al (2001). Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 287: 337–342
156. Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S (2001). Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 1636–1641
157. Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K (2004). Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. *Clin Oral Implants Res*, 15: 346–350.
158. Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P (2002). Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res* 17:2004–2008
159. Black AE, Hayes RN, Roth BD, Woo P, Woolf TF (1999). Metabolism and excretion of atorvastatin in rats and dogs. *Drug Metab Dispos*, 27: 916–923.
160. Kılıç E, Özeç İ, Yeler H, Korkmaz A (2008). Effects of Simvastatin on Mandibular Distraction Osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 2233–2238,
161. Kawane T, Terashima S, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N (2004). Atorvastatin enhances bone density in ovariectomized rats given 17beta-estradiol or human parathyroid hormone (1–34). *Endocrine* 24: 121–129.
162. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA (1996). The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*, 19: 421–428.
163. Burkhardt R, Kettner G, Bohm W et al (1987). Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone*, 8:157–164.
164. Jadhav SB, Jain GK (2006). Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol*, 58:3–18.
165. Gutierrez GE, Lalka D, Garrett IR, Rossini G, Mundy GR (2006). Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. *Osteoporos Int*, 17:1033–42
166. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T (2008). Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor-alpha inhibition of bone morphogenetic

- proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol*, 196:601-13.
167. Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama I (2010). Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. *Journal of Oral Rehabilitation*, 37; 123-130
168. Du Z, Chen J, Yan F, Xiao Y (2009). Effects of Simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats *Clin. Oral Impl. Res.*, 20; 145-150.
169. Killeen AC, Rakes PA, Schmid MJ, Zhang Y et al (2012). Impact of Local and Systemic Alendronate on Simvastatin-Induced New Bone Around Periodontal Defects. *J Periodontol*, 83:1463-1471.
170. Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FH, Russell RG, Rogers MJ (1998). Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: Evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res*, 13:1668-1678
171. Takenaka M, Hirade K, Tanabe K et al (2003). Simvastatin stimulates VEGF release via p44/p42 MAP kinase in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 301: 198-203.
172. Wu Z, Liu C, Zang G, Sun H (2008). The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 37:170-6.
173. Park JB (2009). The use of simvastatin in bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Sep, 1;14 (9):485-8
174. Akman AC (2007). Periodontal doku mühendisliği uygulamaları için kitosan temelli doku iskelelerinin üretilmesi, kemik morfojenik protein-2 (BMP-2), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), deksametazon (DEX) salınım kinetiklerinin ve in vitro etkinliklerinin tayini, doktora tezi, Ankara, Hacettepe Üniversitesi
175. Muzzarelli RA, Baldassarre V, Conti F, Ferrara P, Biagini G, Gazzanelli G, Vasi V (1988). Biological activity of chitosan: Ultrastructural study. *Biomaterials*, 9,247-52.
176. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG (2000). Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *Journal of Biomedical Material Research*, 51,586-95.
177. İkinci G, Senel S, Akincibay H, Kas S, Ercis S, Wilson CG ve Hincal AA (2002). Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Pharmaceutics*, 235;121-7.

178. Di Martino A, Sittering M ve Risbud MV (2005). Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26;5983-90.
179. Nicholas RW, Lange TA (1994). Granular tricalcium phosphate grafting of cavitory lesions in human bone. *Clin Orthop*, 306:197-192.
180. Dodane V, Vilivalam VD (1998). Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Technol Today* 1, 6:246-253.
181. Seol YJ, Lee JY, Park YJ, Lee YM, Young-Ku, Rhyu IC (2004). Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters*, 26,1037-41.
182. Ho MH, Wang DM, Hsieh HJ, Liu HC, Hsien TY, Lai JY ve Hou LT (2005). Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomaterials*, 26: 3197-206.
183. Abarrategi A, Garcı-Cantalejo J, Moreno-Vicente C, Civantos A, Ramos V (2009). Gene expression profile on chitosan/rhBMP-2 films: A novel osteoinductive coating for implantable materials. *Acta Biomaterialia*, 5: 2633-2646
184. Abarrategi A, Civantos A, Ramos V, Sanz Casado JV (2008). Chitosan Film as rhBMP2 Carrier: Delivery Properties for Bone Tissue Application. *Biomacromolecules*, 9, 711-718
185. Ünal T (2012), Ege Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Patoloji Birimi, İzmir http://dent.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/301_patoloji/14.pdf
186. Çakalaoglu F, Ercan S, Gürses İ, Demirel D, Yüksel M (1999). Türkiye Ekopatoloji Dergisi, 5(1-2):1-5 http://web.deu.edu.tr/tepd/pdf/5_12/5_12-01-05.pdf
187. Proskuryakov SY, Karaplyannikov AG (2003). Necrosis: A specific form of programmed cell death. *Experimental Cell Research* 283:1-16 doi;10.1016/s0014-4827(02)00027-7
188. Aykan T (2007). Simvastatinin deneysel alveol defektlerine etkilerinin değerlendirilmesi. Ankara, doktora tezi, Gazi Üniversitesi
189. Yonamine Y, Matsuyama T, Sonomura T et al (2010). Effectable application of vascular endothelial growth factor to critical sized rat calvaria defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, Feb;109(2):225-31
190. Ross R, Vogel A, Davies P, et al. (1979). The Platelet-Derived Growth Factor and Plasma Control Cell Proliferation. In: Sato GH, Ross R, editors. *Hormones and Cell Culture*. New York: Cold Spring Harbor. p. 3-16.

191. Erkoçak A (1980). *Genel Histoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 236-257.
192. Takaoka K, Ono K, Amitani K, Kishimoto R, Nakata Y (1980). Solubilization and concentration of a bone-inducing substance from a murine osteosarcoma. *Clin Orthop*, 148: 274–280.
193. Urist MR, Leitze A, Mizutani H (1982). A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. *Clin Orthop*, 162: 219–232
194. Oxlund H, Andreassen TT (2004). Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone*, 34: 609-18.
195. Uraz A (2002). Kalsiyum karbonat esaslı yeni bir kemik greft materyalinin deneysel olarak invivo değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi.
196. Proyor ME, Susin C, Wikesjö UME (2006). Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodont*, 33:455-60.
197. Liebschner MAK (2004). Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*, 25:1697–1714
198. Hosny M, Sharawy M (1985). Osteoinduction in young and old rats using demineralized bone powder allografts. *J Oral Maxillofac Surg*, 43(12):925-31.
199. Irving JT, LeBolt SA, Schneider EL (1981). Ectopic bone formation and aging. *Clin Orthop Relat Res*, (154):249-53.
200. Khadra M, Kasen N, Haanaes HR, Ellingen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(6):693-700
201. Bartee BK, Carr JA (1995). Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol*, 21(2):88-95.
202. Dogan H (1997). Lokal olarak uygulanan salmon kalsitonin hormonunun kobaylarda olusturdugu osteoblastik aktivite degisimleri. Doktora Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
203. Wong RW, Rabie AB (2005). Early Healing Pattern of Statin-induced Osteogenesis. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 43(1): 46- 50.

204. Wong RW, Rabie AB (2003). Statin Collagen Grafts Used to Repair Defects in the Parietal Bone of Rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 41(4): 244-8.
205. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ (1997). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res*, 76 (8): 1460-70.
206. Glass DA, Mellonig JT, Towle HJ (1989). Histologic evaluation of bone inductive proteins complexed with coralline hydroxylapatite in an extraskelatal site of the rat. *J Periodontol*, 60(3):121-6.
207. Ruhe PQ, Boerman OC, Russel FGM, Mikos AG, Spauwen PHM, Jansen JA (2006). In vivo release of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement pretreated with albumin *J Mater Sci: Mater Med*, 17:919-927
208. Uraz A (2002). Kalsiyum karbonat esaslı yeni bir kemik greft materyalinin deneysel olarak in vivo değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi.
209. Yang HS, La WG, Bhang SH, Jeon JY, Lee JH, Kim BS (2010). Heparin-conjugated fibrin as an injectable system for sustained delivery of bone morphogenetic protein-2 *Tissue Eng Part A*, 16:1225-33.
210. Bessa PC (2010). Silk fibroin microparticles as carriers for delivery of human recombinant bone morphogenetic protein-2: in vitro and in vivo bioactivity. *Tissue Eng Part C*, 16(5):937-45
211. McLaughlin SW, Cui Z, Starnes T, Laurencin CT, Kan HM, Wu Q, Nair LS (2012). Injectable thermogelling chitosan for the local delivery of bone morphogenetic protein. *J Mater Sci: Mater Med*, 23:2141-2149
212. Stephan SJ, Tholpady SS, Gross B (2010). Injectable Tissue-Engineered Bone Repair of a Rat Calvarial Defect. *Laryngoscope*, 120:895-901.
213. Park DJ, Choi BH, Zhu SJ, Huh JY, Kim BY, Lee SH (2005). Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 33: 50-54
214. Aykan T (2007). Simvastatinin deneysel alveol defektlerine etkilerinin değerlendirilmesi. Ankara, doktora tezi, Gazi Üniversitesi
215. Clokie CM, Urist MR (2000). Bone morphogenetic protein excipients: comparative observations on poloxamer. *Plast. Reconstr. Surg*, 105: 628-637
216. Takaoka K (1988). Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop*, 234: 250-254

217. Wang S (2000). Study on the mechanism of bone formation of bioactive materials BMP/ β -TCP restoring bone defects by using quantitative analysis methods. In *Society for Biomaterials, 6th World Biomaterials Congress*, p. 1135.
218. Li R, Wozney JM (2001). Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends in Biotechnology*, 19;7:255-261
219. Berscht PC, Nies B, Liebendorfer A (1994). Incorporation of basic fibroblast growth factor into methylpyrrolidinone chitosan fleeces and determination of the in vitro release characteristics. *Biomaterials*, 15:593– 600
220. Sheridan MH, Shea LD, Peters MC (2000). Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release*, 64(1–3):91–102
221. Jiang T, Nukavarapu SP, Deng M, Jabbarzadeh E (2010). Chitosan–poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering: In vitro degradation and in vivo bone regeneration studies. *Acta Biomaterialia*, 6:3457–3470
222. Chatelet C, Damour O, Domard A (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22:261–8.
223. Hidaka Y, Ito M, Mori K, Yagasaki H, Kafrawy AH (1999). Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria. *J Biomed Mater Res*, 46:418–23.
224. Spin-Neto R, de Freitas RM, Pavone C, Cardoso MB, Campana-Filho SP, Marcantonio RA (2009). Histological evaluation of chitosan-based biomaterials used for the correction of critical-size defects in rat's calvaria. *J Biomed Mater Res A*.
225. Asikainen AJ, Hagstrom J, Sorsa T, Nojonen J, Kellomaki M, Juuti H (2007). Soft tissue reaction to bioactive glass 13–93 combined with chitosan. *J Biomed Mater Res A*, 83:530–7.
226. VandeVord PJ, Mathew HWT, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH (2002). Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res*, 59:585–90.
227. Simard P, Galarneau H, Marois S, Rusu D, Hoemann CD, Poubelle PE, El-Gabalawy H, Fernandes MJ (2009). Neutrophils exhibit distinct phenotypes toward chitosans with different degrees of deacetylation: implications for cartilage repair. *Arthr Res Ther*, 11:R74.

228. Niu X, Fan Y, Liu X, Li X, Li X et al. Repair of Bone Defect in Femoral Condyle Using Microencapsulated Chitosan, Nanohydroxyapatite/Collagen and Poly(L-Lactide)-Based Microsphere-Scaffold Delivery System. *Artificial Organs*, 35(7):119–128
229. Hou J, Wang J, Cao L, Qian X et al (2012). Segmental bone regeneration using rhBMP-2-loaded collagen/chitosan microspheres composite scaffold in a rabbit model *Biomed. Mater*, 7: 035002 (10pp)
230. Joseph V, Rampersaud YR (2007). Heterotopic bone formation with the use of rhBMP2 in posterior minimal access interbody fusion: a CT analysis, *Spine (Phila Pa 1976.)*, 32: 2885–2890.
231. Crawford CH, Carreon LY, McGinnis MD, Campbell MJ (2009). Perioperative complications of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on an absorbable collagen sponge versus iliac crest bone graft for posterior cervical arthrodesis, *Spine (Phila Pa 1976.)* 34: 1390–1394.
232. Shields LB, Raque GH, Glassman SD, Campbell M (2006). Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion, *Spine (Phila Pa 1976.)* 31: 542–547.
233. Carlisle E, Fischgrund JS (2005). Bone morphogenetic proteins for spinal fusion, *Spine J* 15: 240S–249S.
234. Silva AK, Richard C, Bessodes M, Scherman D, Merten OW (2008). Growth Factor Delivery Approaches in Hydrogels, *Biomacromolecules*, 10(1): 9–18.
235. Luca L, Rougemont AL, Walpoth BH, Gurny R, Jordan O (2010). The effects of carrier nature and pH on rhBMP-2-induced ectopic bone formation. *Journal of Controlled Release*, 147:38–44
236. Wen B, Karl M, Pendrys D et al (2011). An evaluation of BMP-2 delivery from scaffolds with miniaturized dental implants in a novel rat mandible model. *Journal of Biomedical Materials Research*, 97:2; DOI: 10.1002/jbm.b.31817
237. Kuroda S, Goto N, Suzuki M et al (2010). Regeneration of Bone-and Tendon/Ligament-Like Tissues Induced by Gene Transfer of Bone Morphogenetic Protein-12 in a Rat Bone Defect. *Journal of Tissue Engineering* doi:10.4061/2010/891049
238. Groeneveld EH, Burger EH (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*, 142(1):9–21

239. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T et al (2007). Bone Formation With the Combination of Simvastatin and Calcium Sulfate in Critical-Sized Rat Calvarial Defect. *J Pharmacol Sci*, 104:384 – 386
240. Liu C, Wu Z, Sun HC. The Effect of Simvastatin on mRNA Expression of Transforming Growth Factor- β 1, Bone Morphogenetic Protein-2 and Vascular Endothelial Growth Factor in Tooth Extraction Socket. doi: 10.4248/IJOS.08011
241. Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J (2009). Molecular and Tissue Responses in the Healing of Rat Calvarial Defects After Local Application of Simvastatin Combined With Alpha Tricalcium Phosphate DOI: 10.1002/jbm.b.31559
242. Calixto JC, Lima C, Frederico L et al (2010). The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 1-6
243. Nyan M, Sato D, Kihara H (2009). Effects of the combination with α -tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration *Clin. Oral Impl. Res*, 20;280–287.
244. Lima C, Calixto J, Anbinder A (2011). Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Braz Oral Res*, 42;25(1):42-8
245. Ma B, Clarke SA, Brooks RA, Rushton N (2008). The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a periimplant defect model. *Acta Biomater*, 4(1):149-55
246. Galus R, Wodarski P, Wodarski KH (2006). Influence of fluvastatin on bone formation induced by demineralized bone matrix in mice. *Pharmacological Reports*, 58: 443-447
247. Seto H, Ohba H, Tokunaga K, Hama H, Horibe M, Nagata T (2008). Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *J Periodont Res*, 43: 261–267
248. Pauly S, Luttosch F, Morawski M, Haas NP et al (2009). Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone*, 45:505–511

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2011/ 118

29/09/2011

Sn: Doç. Dr. Selim ERSANLI
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Karar No :2011/ 118

Başvuru :21.09.2011

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Doktora Öğrencisi Mazlume Ceren SEZEN'e ait
"Kitosan Taşıyıcı İle Uygulanan Simvastatin Ve Kemik Morfojenik Protein-2'nin Kemik
Rejenerasyonuna Etkisinin Histolojik Ve Histomorfometrik Olarak İncelenmesi" isimli
projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

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

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Doç.Dr. Uluk ÇAKATAY
Üye

Yard.Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

Mak.Yük.Müh. Dr.Burak OLGUN
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mazlume Ceren	Soyadı	Sezen
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	20.07.1984
Uyruğu	T.C	TC Kim No	
Email	Cerensezen58@hotmail.com	Tel	05336171455

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Ünv. Dişhek fak.Oral İmplantoloji ABD	2014
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2007
Lise	Beyoglu Anadolu Lisesi	2002

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
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi