

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

BİFOSFONAT İLE DENEYSEL OSTEONEKROZ
OLUŞTURULAN FARELERDE FOSFODİESTERAZ
İNHİBİTÖRLERİNİN KULLANIMININ ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlayan
Yunus BAŞ

Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Olgun TOPAL

Tez No:33

2023 – AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ AĞIZ,

Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

BİFOSFONAT İLE DENEYSEL OSTEONEKROZ
OLUŞTURULAN FARELERDE FOSFODİESTERAZ
İNHİBİTÖRLERİNİN KULLANIMININ ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlayan
Yunus BAŞ
DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Olgun TOPAL

Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 21.DUS.008 kodlu proje ile desteklenmiştir.

2023 - AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Çalışmamızın etik kurul onayı Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AKUHADYEK) Başkanlığı'ndan alınmıştır. (24.08.2021 tarihli 49533702/102 sayılı karar) ((EK-1)



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca akademik bilgisi ve klinik tecrübesiyle her daim yoluma ışık tutan, tezimde emeğini ve desteğini esirgemeyen, hayatımla ilgili attığım her adımda olumlu tavrı ve tecrübesiyle yanımda hissettiğim değerli tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Olgun TOPAL,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini her daim benimle paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Ömer EKİCİ' ye ve Dr. Öğr. Üyesi Handegül KORKMAZ' a,

Tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, yol gösteren, hakkını hiçbir zaman ve hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim saygı değer hocalarım Doç Dr Hasan CAMCI ve Doç. Dr. Mehmet Bilgehan PEKTAŞ' a,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki bütün asistan arkadaşlarıma ve tüm yardımcı sağlık personeline,

Beni bu günlere getiren, hayatım boyunca destek ve sevgileriyle yanımda yer alan, annem, babam ve bütün aileme,

Her daim yanımda olan en büyük destekçim sevgili eşim Özlem BAŞ ' a

Hayatıma yaşama sevinci katan çocuklarım Ertuğrul ve Aysima ' ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yunus BAŞ

Afyonkarahisar, Temmuz,

2023

BİFOSFONAT İLE DENEYSEL OSTEONEKROZ OLUŞTURULAN FARELERDE FOSFODİESTERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN KULLANIMININ ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yunus BAŞ

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Diş
Hekimliğinde Uzmanlık Tezi
Temmuz, 2023
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Olgun TOPAL

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, bifosfonat ile deneysel osteonekroz oluşturulan farelerde fosfodiesteraz inhibitörleri olan sildenafil ve rolipramın kemik ve yumuşak doku üzerindeki etkilerinin moleküler ve morfolojik açıdan araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma için ortalama 30-35 gr ağırlığında, 64 haftalık, 30 adet, erişkin, dişi fare temin edilmiştir. Hayvanlar kontrol, zoledronik asit+sildenafil ve zoledronik asit+rolipram halinde 3 gruba ayrılmıştır. Tüm hayvanlarda 8 hafta boyunca deneysel zoledronik asit verildikten sonra diş çekimi yapılmış olup 4 hafta boyunca gruplarda belirtilen ilaçlar verilmiştir. Üç aylık deney süresi sonunda hayvanların kan örnekleri alınmış ve hayvanların maksiller anterior bölgesi izole edilmiştir. Kan örneklerinde biyokimyasal parametreler ölçülmüş; Maksilla örneklerinde ise rt-qPCR, histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır.

Bulgular: Kontrol grubunda VEGF *Hscore*, kan damar sayısı ve osteosit sayısında diğer gruplara göre azalmıştır. Sildenafil grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak TNF α , IL-1, IL17 ve IL-23 azalma görülmüştür. Bifosfonata bağlı azalan VEGF, RANK mRNA ekspresyonları rolipram ve sildenafil gruplarında artmış olup TRAP ve TNF α ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır.

Sonuç: Çalışma bulguları rolipram ve sildenafilin bifosfonata bağlı kötüleşen değerleri iyileştirdiğini göstermektedir. Gelecek çalışmalarda rolipram ve sildenafilin bifosfonat üzerine etki mekanizmasının tamamen aydınlatılması ve güvenilirliğinin kanıtlanması ile bifosfonat hastalarında cerrahi işlem öncesi ve sonrası kullanımı yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Osteonekroz, Mronj, Sildenafil, Rolipram, Bifosfonat

**EVALUATION OF THE EFFECT OF THE USE OF
PHOSPHODIESTERASE INHIBITORS IN MICE WITH EXPERIMENTAL
OSTONECROSIS WITH BIPHOSPHONATE**

Yunus BAŞ

**Afyonkarahisar Health Sciences University,
Faculty of Dentistry, Department of Oral and Maxillofacial Surgery Dentistry
Specialization Thesis**

June, 2023

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Olgun TOPAL

ABSTRACT

Objective: the aim of this study is to investigate the molecular and morphological effects of phosphodiesterase inhibitors sildenafil and rolipram on bone and soft tissue in mice with experimental osteonecrosis with bisphosphonate.

Materials and Methods: For the study, 30 adult female mice weighing 30-35 g, 64 weeks old, were provided. Animals were divided into 3 groups as control, zoledronic acid +sildenafil and zoledronic acid + rolipram. After giving experimental zoledronic acid for 8 weeks in all animals, tooth extraction was performed and the drugs specified in the groups were given for 4 weeks. At the end of the three-month experiment period, blood samples were taken from the animals and the maxillary anterior region of the animals was isolated. Biochemical parameters were measured in blood samples; *rt-qPCR*, histological and immunohistochemical evaluations were performed on maxilla samples.

Results: VEGHscore, blood vessel count and osteocytes count were decreased in the control group compared to the other groups. $TNF\alpha$, IL-1, IL17 and IL-23 decreased significantly in the sildenafil group compared to the other groups. Decreased VEGF and RANK mRNA expressions due to bisphosphonates increased in rolipram and sildenafil groups, whereas TRAP and $TNF\alpha$ were significantly decreased compared to the control group.

Conclusion: Study findings show that rolipram and sildenafil improve bisphosphonate-induced worsening values. In future studies, the full elucidation of the mechanism of action of rolipram and sildenafil on bisphosphonate and proving its safety, may be beneficial for use before and after the surgical procedure in bisphosphonate patients.

Keywords: Osteonecrosis, Mronj, Sildenafil, Rolipram, Bisphosphonate

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Kemik Fizyolojisi	6
2.2. Bifosfonatlar	8
2.2.1. Bifosfonatların Etki Mekanizması.....	8
2.2.2. Bifosfonatların terapötik ajanlar olarak kullanımı.....	10
2.2.2.1. Kanser	10
2.2.2.2. Osteoporoz	11
2.2.2.3. Paget Hastalığı	12
2.2.2.4. Osteogenezis İmperfekta.....	12
2.2.2.5. Bifosfonatların Diğer Kullanımları.....	13
2.2.3. Bifosfonatların Yan Etkileri	13
2.3. Çenenin Bifosfonatla İlişkili Osteonekrozu (Mronj).....	14
2.3.1. Tanımı ve Risk Faktörleri.....	14
2.3.2. MRONJ İnsidansı	15
2.3.3. MRONJ için Hipotezler.....	16
2.3.4. Bifosfonatların Yumuşak Dokular Üzerindeki Etkisi.....	16
2.3.5. Bifosfonatların Çene Kemliği Vaskülarizasyonuna Etkisi	17
2.3.6. MRONJ Gelişiminde Oral Mikrobiyal Floranın Rolü.....	17
2.3.7. MRONJ Tedavisi	18
2.3.7.1. Konservatif Tedavi.....	19

2.3.7.2. Cerrahi Tedavi	19
2.3.7.3. Bifosfonat Kullanımının Durdurulması	19
2.3.7.4. Vaskülerize Kemik Greftleri	20
2.3.8. Bifosfonatların Yan Etkileri	21
2.3.9. Zoledronik Asit	21
2.3.10. Hayvan Çalışmalarında Deneysel MRONJ	22
2.4. Fosfodiesterazlar Ve İnhibitörleri	23
2.4.1. PDE5 İnhibitörü Sildenafilil	25
2.4.2. PDE4 İnhibitörü Rolipram.....	26
3. MATERYAL METOT	28
3.1. Gruplar Ve Araştırma Protokolü	29
3.2. Zoledronik Asit Ve Deksametazon Uygulama Protokolü	31
3.3. Diş Çekimi Ve Post-Operatif Bakım	31
3.4. Sildenafilil Uygulama Protokolü	33
3.5. Rolipram Uygulama Protokolü	33
3.6. Sakrifikasyon Protokolü	34
3.7. Farelerle İlgili Yapılan Gözlemsel Değerlendirmeler	34
3.8. Histopatolojik İnceleme	34
3.9. İmmunohistokimyasal Yöntem Ve Değerlendirme.....	35
3.10. Biyokimyasal Değerlendirme.....	36
3.11. Gen İfadesi Değerlendirmesi.....	36
3.12. Rna Ekstraksiyonu Ve Saflaştırılması	36
3.13. Tamamlayıcı Dna (cDNA) Sentezi	37
3.14. Western Blot Teknik Uygulama Protokolü	39
3.14.1. Örnek Hazırlamak.....	39
3.14.2. Protein Konsantrasyon Tayini	40
3.14.3. SDS-PAGE	40
3.14.4. Western Blot Analizi	40
3.14.5. Kemilüminesans Algılama.....	41
3.15. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR.....	43
4.1. Histopatolojik Bulgular	43
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	45
4.3. Serumda Biyokimyasal Bulgular.....	48

4.4. Kemik Dokuda mRNA Düzeyleri	52
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
7. KAYNAKLAR	73
EKLER.....	87



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

BF	: Bifosfonat
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ZA	: Zoledronik asit
MRONJ	: Bifosfonatla ilişkili çene osteonekrozu
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
AAOMS	: Amerikan Ağız ve Çene Cerrahları Derneği
NO	: Nitrik oksit
sGC	: Çözünür guanilat siklaz
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
PDE 5	: Fosfodiesteraz 5
cAMP	: Siklik adenosin monofosfat
SDF	: Sildenafil
PDE 4	: Fosfodiesteraz 4
ROL	: Rolipram
OPG	: Osteoprotegerin
RANK	: Nükleer Faktör-Kappa B'nin Reseptör Aktivatörü
RANKL	: Nükleer Faktör-kappa B'nin Reseptör Aktivatörü
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rt-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PTH	: Paratiroid hormonu
DMP1	: Dentin matriks protein 1
F-aktin	: Filamentli aktin
H+ ATPaz	: H ⁺ -adenosin trifosfataz
FPPS	: Farnesil pirofosfat sentetaz
GTPaz	: Guanozin trifosfotaz
IL-6	: İnterlökin 6
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
PSA	: Prostat spesifik antijen (PSA)
PTHrP	: N-terminalinde paratiroid hormonu ile ilişkili peptidinin
u-PA	: Plazminojen aktivatörü
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
ET-1	: Endotelin-1

TNFα	: Tumor nekroz faktör- α
ATP	: Adenozin tri fosfat
RNA	: Ribo Nükleik Asit
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
BMP-2	: Kemik Morfojenik Protein 2
DKK1	: Dickkopf-1
IL-1B	: İnterlökin 1 beta
Ibsp	: Kemik Sialoprotein
Lrp-5	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü Protein 5
RUNX2	: Runt-Related Transcription Factor 2
GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
BMP	: Kemik Morfogenetik Protein
iNOS	: Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz
TGFβ	: Transforme Edici Büyüme Faktör Beta
TGFα	: Transforme Edici Büyüme Faktör Alfa
Ctsk	: Katepsin K
Nfatc1	: Aktive Edilmiş T Hücrelerinin Nükleer Faktörü
OCN	: Osteokalsin
OPN	: Osteopontin
OSN/SPARC	: Osteonektin
OSP	: Diğer Yüzey Proteinleri
TRAP	: Tartarata dirençli asit fosfataz

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Sildenafil kullanımı ile ortaya çıkabilecek olası yan etkiler	26
Tablo 3.1. Deney grupları ve uygulanan işlemler	29
Tablo 3.2. qRT-PCR yöntemiyle mRNA ekspresyonu belirlemesi için kullanılan primer dizileri.....	39
Tablo 4.1. Histolojik incelemeler sonucu çıkan değerler	45



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Pirofosfat ve bifosfonatın kimyasal yapısı	9
Şekil 4.1.	Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında maksiller anterior bölgesi VEGF HScore değerleri.	47
Şekil 4.2.	Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında TNF α değerinin düzeylerinin karşılaştırılması.	48
Şekil 4.3.	Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında IL-17 değerinin düzeylerinin karşılaştırılması.	49
Şekil 4.4.	Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında IL-23 değerinin düzeylerinin karşılaştırılması.	50
Şekil 4.5.	Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında IL-1 β değerinin düzeylerinin karşılaştırılması.	51
Şekil 4.6.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde CTSK mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	52
Şekil 4.7.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde VEGF mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	53
Şekil 4.8.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde TRAP mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	54
Şekil 4.9.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde TGF α mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	55
Şekil 4.10.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde RANK mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	56
Şekil 4.11.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde OPN mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	57
Şekil 4.12.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde OPG mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	58
Şekil 4.13.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde OCN mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	59
Şekil 4.14.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde NFATc1 mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	60
Şekil 4.15.	Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde IL-6 mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	61

Şekil 4.16. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde IL-1 β mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	62
Şekil 4.17. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde TGF β mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.	63



RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.1. Pamukkale Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen balb-c cinsi dişi fareler	28
Resim 3.2. Genel anestezide kullanılan Xylazine ve Ketamin HCl.....	32
Resim 3.3. Farelerde diş çekimi gerçekleştirilmesi.....	32
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait histopatolojik görüntüler.....	43
Resim 4.2. Sildenafil grubuna ait histopatolojik görüntüler.....	44
Resim 4.3. Rolipram grubuna ait histopatolojik görüntüler	44
Resim 4.4. Kontrol grubuna ait immünohistokimyasal görüntüler.	45
Resim 4.5. Sildenafil grubuna ait immünohistokimyasal görüntüler.....	46
Resim 4.6. Rolipram grubuna ait immünohistokimyasal görüntüler	46

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bisfosfonatlar (BF), 1990' lardan beri hem erkeklerde hem de kadınlarda osteoporozu tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir ilaç sınıfını tanımlar. Osteoporoz ve diğer durumların tedavisindeki etkinlikleri, kemik erimesini engelleme yetenekleriyle ilgilidir (1).

Bisfosfonatların Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi(FDA) tarafından onaylı endikasyonları: postmenopozal kadınlarda osteoporoz, erkeklerde osteoporoz, glukokortikoid kaynaklı osteoporoz, malignite hiperkalsemisi, Paget hastalığı ve kemiğe metastazlı malignitelerin tedavilerinde kullanılmaktadır (2). FDA tarafından onaylanmamış endikasyonları ise: yetişkinlerde olduğu kadar çocuklarda da osteogenezis imperfekta tedavisini ve glukokortikoid kaynaklı osteoporozun önlenmesini içerir (2).

Bisfosfonatlar doğal pirofosfata benzer bir yapıya sahiptir ve nitrojen içeren ve içermeyen bifosfonatlar olmak üzere iki gruba ayrılır (3). Azot içeren bifosfonatlar arasında alendronat, risedronat, ibandronat, pamidronat ve zoledronik asit (ZA) bulunur (4). Azot içermeyen bifosfonatlar arasında etidronat, klodronat ve tiludronat bulunur. Tüm bifosfonatlar, özellikle aktif rezorpsiyonlu bölgelerde, kemik üzerindeki hidroksiapatit bağlanma bölgelerine bağlanarak kemik rezorpsiyonunu inhibe eder. Osteoklastlar kemiği rezorbe ederken kemiğe gömülü bifosfonat salınır ve osteoklastın kemik rezorpsiyon sürdürme yeteneğini bozar.

Azot içeren bifosfonatlar osteoklastın kemiğe bağlanmasını teşvik etmede önemli olan farnesil pirofosfat sentezini inhibe ederek etki ederler. Sonuç olarak; osteoklast kemik yüzeyinden ayrılır ve böylece kemik rezorpsiyonunu inhibe etmiş olur. Azot içermeyen bifosfonatlar ise hücre içinde adenosin trifosfatın terminal pirofosfat kısmının yerini alan substratlara metabolize olur ve hücre enerji metabolizmasında adenosin trifosfat ile rekabet eden işlevsel olmayan bir molekül oluşturur (3). Bu durum osteoklast apoptozunu başlatır ve bu da kemik yıkımında genel bir azalmaya yol açar. Azot içeren bifosfonatlar, nitrojen içermeyen bifosfonatlardan çok daha güçlü antirezorptif ajanlardır. Ayrıca nitrojen içermeyen bifosfonatların kemik mineralizasyonunu inhibe etme potansiyelinin yüksek olduğu

ve osteomalaziye neden olabileceği bulunmuştur (5). Bu nedenle artık popüler olarak kullanımda değildir.

Oral veya intravenöz bifosfonatlarla tedavi edilen hastalarda, bifosfonatla ilişkili çene osteonekrozu (MRONJ) göreceli olarak sık değildir; ancak potansiyel olarak ciddi komplikasyonlar bildirilmiş ve bildirilmeye devam etmektedir. Klinik olarak MRONJ; kraniyofasiyal bölgede radyasyon tedavisi görmemiş, halihazırda veya daha önce azot içeren bifosfonatlara maruz kalmış bir hastada altı ile sekiz haftalık bir süre içinde iyileşmeyen maksilla veya mandibulada açıkta kalan bir kemik alanı olarak karakterize edilir (6). MRONJ progresyonu, klinik belirti ve semptomlara göre sınıflanan üç evreyi (Evre 1, Evre 2 ve Evre 3) içermektedir (7). Ancak daha sonra klinik nekrotik kemik varlığı gözlenmeyen; ancak spesifik olmayan klinik belirti ve semptomları olan yüksek riskli hastaları tanımlamak ve bu hastaları sınıflamaya dahil etmek için Evre 0 da tanımlanmıştır (8). Oral olarak uygulandığında, bifosfonat absorpsiyonu, toplam dozun %1.8' ine eşit veya daha düşüktür (9). İntravenöz olarak verildiklerinde, plazma tarafından hızla uzaklaştırılırlar ve ilk 24 saatte metabolize olmadan % 40 renal atılım oranı gösterirler. Bifosfonatların plazmadaki yarı ömrü kısa iken kemikte yaklaşık 10 yıldır (10). Farklı bifosfonat grupları farklı mekanizmalar yoluyla etki edebilir; ancak nihai sonuçlar benzerdir. Yani osteoklastik aktivitede keskin olarak düşüşler ve/ya apoptoz indüksiyonu gözlemlenir. Bifosfonatlar Ca^{2+} iyonlarına yüksek afinite gösterdiğinden mineralize kemik matriksi bu ilaçlar için doğal bir hedeftir. Kimyasal yapıları, enzimatik hidrolize direnç sağlar. Bifosfonatların hidroksiapatit kristallerinin yüzeyine yüksek afinitesi, ilaç ile kemik mineral yüzeyi arasında hızlı ve etkili bir bağlantı oluşturur. Bifosfonatlar bir kez kemik yüzeylerinde biriktikten sonra osteoklastik apoptozu teşvik ederek sonraki herhangi bir osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu engeller (11).

Bifosfonat kullanımının dolaşımdaki vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) seviyelerinde düşüşe yol açtığı, yani antianjiyogenik özelliklerinin olduğuna dair araştırma sonuçları vardır. Zoledronatın antianjiyogenik etkisi, farelerde gösterilmiş ve malign kemik hastalıklarının yanı sıra anjiyogenik bileşenlere sahip kemik hastalıklarının tedavisinde kullanımını desteklenmiştir (12). Oral bifosfonatlar esas olarak osteoporozu tedavi etmek için kullanılır ve malign osteolitik lezyonların

tedavisinde etkili değildir (13). Bifosfonatlar istenmeyen yan etkilere, reaksiyonlara neden olabilir ve bunların çoğu mide bulantısı, kusma, diyare, özofajit gibi gastrointestinal sistemle ilgilidir. Ayrıca diğer olası yan etkileri özofagus ülserlerinde potansiyel ilerleme, kemik, kas, eklem ağrıları ve alerjik reaksiyonlardır. Dış hekimliği mesleğini ilgilendiren komplikasyon ise yukarıda bahsedildiği üzere MRONJ' dur.

Amerikan Ağız ve Çene Cerrahları Derneği' ne (AAOMS) göre MRONJ, "baş ve boyun radyasyon tedavisi görmemiş, bifosfonatlar ile tedavi edilen hastalarda sekiz haftadan fazla süren maksillofasiyal bölgede maruz kalan nekrotik kemik" olarak tanımlanmaktadır. Bu durum maksillomandibular kompleks ile sınırlı gibi görünmektedir, bu nedenle MRONJ adı ve kısaltmasının; vücudun başka yerlerinde benzer lezyonları bildiren hiçbir çalışma bulunmamaktadır (8). Böyle bir gerçeklik; ancak çene kemiklerini dış ortamla bağlantılı hale getiren dişlerin varlığı ile açıklanabilir. Malignite yönetimi için intravenöz bifosfonatlara maruz kalma, MRONJ gelişimi için temel risk faktörü olmaya devam etmektedir. Çünkü bu hastalarda prevalans % 0.8 ila %12 arasında değişmektedir. Aylık olarak intravenöz bifosfonat alan kanser hastalarına kıyasla, oral bifosfonat alan hastalarda MRONJ gelişme riski önemli ölçüde daha düşüktür.

1980'lerin sonlarında endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak nitrik oksidin (NO) keşfi, NO' da çözünür Guanilat siklaz (sGC)-Siklik guanozin monofosfat (cGMP) yolunu anlamının önünü açtı. Bu keşif NO' nun fizyolojisi, farmakolojisi ve patofizyolojisi üzerine yoğun araştırmalara yol açmıştır (14). NO, sGC'yi aktive ederek ve cGMP sentezini artırarak biyolojik etkilerine aracılık eder, bu da belirli proteinleri aktive ederek farklı biyolojik süreçlerin devamlılığını sağlar. cGMP eylemleri zaprinast ve sildenafil (SDF) gibi PDE5 (fosfodiesteraz 5) ve PDE5 inhibitörleri tarafından sonlandırılır.

Seçici bir PDE5 inhibitörü olan sildenafil, nitrik oksidin bozulmasını önler ve güçlü bir anjiyogenez uyarıcısıdır. PDE5, düz kasları gevşeten cGMP bozulmasına neden olur (15). Sildenafil; periferik arter ve venlerin vazodilatörüdür ve tromboz oluşumunu engeller (16). Bu farmakolojik etkileri sayesinde sildenafil; kemik ile ilişkili lezyonların iyileşmesine olumlu katkılar sunabilmektedir. Çünkü yaralanma bölgesinde kanlanma başarılı kemik iyileşmesi için en önemli faktördür (17). Travma

bölgesinde azalmış anjiyogenez ve bölgeye sınırlı kan temininin; kemik iyileşme sürecini geciktirdiği veya bozduğu bilinmektedir (18,19). Anjiyogenez için NO ve vazodilatasyon zorunludur ve nitrik oksidin yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri, muhtemelen anjiyogenez ve inflamasyon üzerindeki fonksiyonel etkilerinden kaynaklanmaktadır (20).

Makrofaj göçü; enfeksiyona ve yara iyileşmesine karşı konak savunmasında önemli bir adımdır. Spesifik olarak cAMP(siklik adenozin monofosfat)' yi bozan enzimler olan fosfodiesteraz 4 (PDE4)' ü inhibe ederek cAMP' nin arttırmasının, aktive edilmiş makrofajlarda çeşitli inflamatuvar yanıtları baskıladığı bilinmektedir (21). PDE4' e özgü bir inhibitör olan rolipram' ın (ROL) kullanımının akut spinal cord yaralanmasından sonra cAMP' de yaralanma kaynaklı azalmaları önlediğini ve ayrıca önemli ölçüde doku koruması sağladığı, anatomik onarımı ve fonksiyonel iyileşmeyi kolaylaştırdığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (22). Asıl olarak depresyonu tedavi etmek için tasarlanan rolipram; hem deneysel modellerde hem de astım, artrit, huntington hastalığı, multipl skleroz, alzheimer hastalığı, insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonu ve travmatik beyin hasarı gibi pek çok hastalığın klinik tedavisinde kullanılmıştır (22).

Osteoblast dengesi ve osteoklastın fizyolojik etkisi, tümü kemiğin şekillenmesini etkileyen farklı moleküler yollar tarafından kontrol edilir. Bu denge bozulursa lokal kemik metabolizmasının stabilitesi bozulur. Osteoprotegerin (OPG), nükleer faktör kappa-B(RANK)' nin reseptör aktivatörü ve RANK ligandının(RANKL) tümü, osteogenez ve kemik rezorpsiyonu ile ilgilidir. OPG, RANK-RANKL-OPG ekseninde ilk bulunan moleküldür. OPG ve RANK'ın rekabeti ve kombinasyonu ile RANKL, osteoklast oluşumunu engelleyecektir. Bu durum, RANKL kemik emilimini artırmak için sinyal kaskad reaksiyonu ile osteoklastı aktive edecek homolog reseptör RANK ile birleşirse gerçekleşecektir (23). Bu üç parçanın kemiğin yeniden şekillenmesi ve emilmesi üzerindeki etkisi göz önüne alındığında, birçok araştırmacı bu gen transkripsiyonlarının miktarını osteoporoz, artrit, vasküler hastalık, tümör ve katalaz tedavi sonuçlarını değerlendirmede referans olarak kullanmışlardır. Kemik ile ilgili bahsedilen çeşitli gen transkripsiyonlarını ölçmek için önceki çalışmalarda sıklıkla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon testleri kullanılmıştır (24,25). Çünkü hassas bir teknik olan gerçek zamanlı PCR

(polimeraz zincir reaksiyonu) hızlı, tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar vermektedir (26).

Yukarıda verilen bilgiler ışığında çalışmamızın amacı; deneysel bifosfanat osteonekrozu oluşturulmuş farelerde fosfodiesteraz inhibitörleri; sildenafil ve rolipram kullanımının kemik iyileşmesine etkilerinin histopatolojik, *rt-PCR* (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ve western blot yöntemlerini kullanarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Fizyolojisi

Kemik; büyüklük, şekil ve yapısal dayanıklılığını korumak için süreklilik adaptif değişiklikler gösteren dinamik bir yapıya sahiptir. Kemik içindeki mineral homeostazının korunulmaya çalışması kemiğin sürekli dinamik yapıda olmasını gerektiren bir başka unsurdur (27). Kemik yapı başlıca iki türdür:

- 1) kortikal kemik ya da kompakt kemik
- 2) trabeküler kemik veya kansellöz kemik

Kortikal kemik; uzun kemiklerin iskelet yapısını oluşturur ve kansellöz kemikleri dışardan bir kabuk gibi sarar. Kortikal kemik dayanıklılığı sağlarken, kansellöz kemik esnekliği sağlayarak kemik yapıya gelen yükün iletilmesine yardımcı olur. Ayrıca kemiğin kansellöz yapıda olması toplam yüzey alanının artmasına olanak tanır. Bu da kansellöz kemiklerin metabolik aktivitelerinin daha yoğun olmasını sağlar.

Kemik; %30 organik ve %45 inorganik içeriğe sahiptir. İnorganik yapıda en çok mineral tuzları ve hidroksiapatit kristalleri bulunur. Kalsiyum ve fosfattan zengin bu kristaller sağlıklı, yetişkin bir insandaki kemiğin dörtte birlik hacmini oluşturur (28). Hidroksiapatit kristalleri kemiğe bir sertlik ve dayanıklılık kazandırır. Hidroksiapatit kemiğe sadece rijit yapısını ve sertliğini vermekle kalmaz, aynı zamanda bu iki minerali depolayarak kandaki fosfat ve kalsiyum konsantrasyonunu düzenlerler. Paratiroid hormonu (PTH) ve kalsitriol gibi sistemik faktörler bu minerallerin salınımını veya yeniden emilimini düzenler (29,30).

Mineral homeostazının ve kemiğin yapısal bütünlüğünün korunması, kemik içindeki çoklu hücre tiplerinin senkronize aktivitelerini gerektirir. Kemiğin yeniden şekillenmesinde aktif rol oynayan hücre türleri şunlardır:

- 1) osteoblastlar
- 2) osteositler
- 3) osteoklastlar

Osteoblastlar; toplam kemik yerleşik hücrelerinin yaklaşık %5'ini temsil eden farklılaşmış mezenkimal kök hücrelerdir (30). PTH ve östrojen gibi faktörlere yanıt olarak, osteoblastlar, kemik hücre dışı matriksinin sentezi, osteoid ve mineralizasyon için önemli olan alkalın fosfataz ve tip I kollajen salgılayarak kemik yapımını sağlarlar (31). Osteoidin mineralizasyonu, hidroksiapatit kristalleri formunda kalsiyum fosfat birikimi yoluyla sağlanır (32). Matriks kireçlenmeye devam ettikçe, apoptoza uğramayan osteoblastların bir kısmı kemik içinde tutulur ve osteositlere dönüşür.

Osteositler, mineralize kemik boyunca uzanan ve kemik hücrelerinin yaklaşık %93' ünü oluşturan dentritik uzantılarıyla kemik içinde bir ağ oluşturan osteoblastların bir alt popülasyonudur (33). Dendritik uzantılar, kemik yüzeyindeki diğer osteositlerle ve osteoblastlarla etkileşime girer (34). Bu süreçler, osteositlerin, kemik mikro hasarı ile ilişkili mekanik yüklemeye ve zorlanmaya tepki vermesine izin vererek, osteositlerin birbirini takip eden yeniden şekillenme süreçlerini başlatmasına ve yönlendirmesine izin verir (35–37). Osteositler, dentin matriks protein 1 (DMP1) ve kromozom X üzerindeki fosfat düzenleyici endopeptidaz yoluyla kemik oluşumunu teşvik edebilir veya osteoklastların sklerostin ve RANKL stimülasyonu ile kemik oluşumunu inhibe edebilir (38). Osteositler, kemik oluşmadığında veya hipoksik hale geldiğinde RANKL ekspresyonunu teşvik eder, her ikisi de diş çekimlerinin neden olduğu kemik hasarında görülür.

Osteoklastlar; kemik hücrelerinin yaklaşık %2'sini oluşturlar ve mineralize kemik matrisini uzaklaştırma konusunda benzersiz bir yeteneğe sahip farklılaşmış miyeloid hücrelerdir (39,40). Bu çok çekirdekli hücreler, osteoklastın kemiğe yapıştığı yerde kıvrımlı bir sınır oluşturarak kendisi ile kemik yüzeyi arasında izole edilmiş bir hücre dışı mikro çevre oluşturur. Bu yapı rezorpsiyon sürecini kolaylaştırır. Ortaya çıkan sızdırmazlık bölgesi, filamentli aktin (F-aktin) ve matris tanıyan integrinleri hücre iskeletine bağlayan vinculin, talin ve a-aktin gibi proteinler bakımından zengindir (41). Kemik demineralizasyonu, hücrenin kıvrımlı zarında bir vakumlu H⁺-adenosin trifosfataz (H⁺ ATPaz) tarafından aracılık edilen bir süreçtir. Bu süreçte iyon pompaları, kemik mineralini harekete geçirerek hücre dışı ortamın asitlenmesine neden olur. Daha sonra, kemiğin demineralize edilmiş organik bileşeni, bir lizozomal proteaz, katepsin K tarafından parçalanır (42,43). Bozulmuş

kemik materyali osteoklast tarafından endositoza tabi tutulur, ardından atık materyal hücrenin antirezorptif yüzeyinde taşınır ve salınır (44). Kemik erimesi gerçekleşikten sonra, osteoklast kemikten ayrılır ve yeni bir kemik rezorpsiyon bölgesine göç eder.

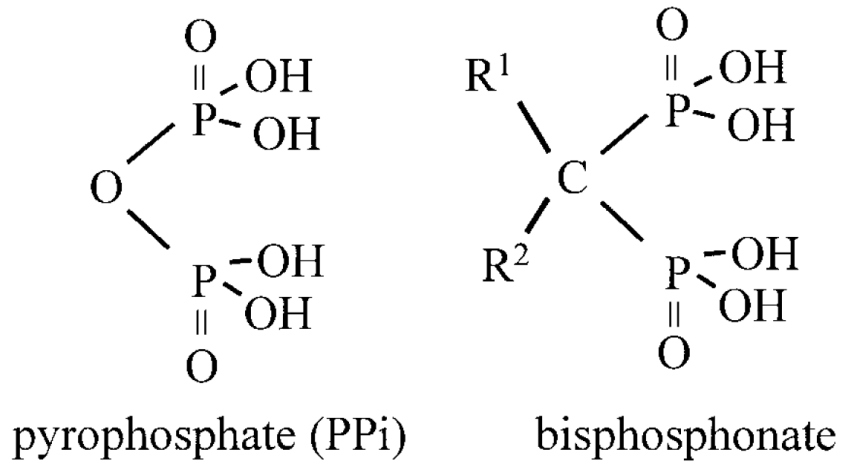
2.2. Bifosfonatlar

Bifosfonatlar 1960' dan bu yana kemik metastazları, akciğer kanseri, multiple myelom, Paget hastalığı ve kalsiyum metabolizma bozukluğu gibi pek çok tedavide kullanılmaktadır (45). Bifosfonatların terapötik etkileri daha çok osteopeni ve osteoporoz hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilaçların dünya genelinde osteoporoz tedavisinde en çok reçete edilen ilaçlar olduğu bilinmektedir. Amerika'da her yıl ortalama 55 milyon ilaç reçete edilmektedir. Bifosfonatlar ise en çok reçete edilen ilaçlar listesinde ikinci sırada yer almaktadır (46).

Bifosfonatlar yüksek kemik afinite kabiliyeti olan ve osteoklastik aktiviteyi inhibe edebilen antirezorptif ajanlardır. Ancak uzun dönem kullanımında bu ilaçların çene kemiklerinde özellikle invaziv dental işlemlerden sonra MRONJ'a yol açtığı bilinmektedir(47).

2.2.1. Bifosfonatların Etki Mekanizması

Bifosfonatlar, kemik rezorpsiyonunun fizyolojik düzenleyicisi olan pirofosfatın (P–O–P) sentetik kararlı analoglarıdır (48). Bir karbon atomunu (P–C–P) paylaşan iki atomlu fosfat grubundan oluşurlar (49) (Şekil 2.1). Bifosfonatlar, etki mekanizmalarına göre iki gruba ayrılır: azot içermeyen Bifosfonatlar (örneğin; klodronat, etidronat, tiludronat) ve azot içeren Bifosfonatlar (örneğin; aldronat, ibandronat, pamidronat, risedronat, zoledronat) (50).



Şekil 2.1. Pirofosfat ve bifosfonatın kimyasal yapısı

Bifosfonatlar, bağırsakta zayıf bir emilim oranına sahiptir. Bu nedenle bifosfonatların parenteral uygulaması daha etkilidir (51). Bifosfonatların yaklaşık üçte biri ile üçte ikisi kemik tarafından emilir ve kemik minerallerine bağlanır. Bifosfonatların kemik alımı, kemik devir hızına bağlıdır (52). Bifosfonatların geri kalanı böbrekler tarafından idrarla değişmeden atılır (50).

Bifosfonatların ana işlevi, hücre içi mekanizmalar yoluyla osteoklastik kemik emilimini engellemektir. Bifosfonatların kemik yüzeyinde birikmesi, onları osteoklastlarla doğrudan temasa sokar (53). Kemiği rezorbe etmek için osteoklast zarlarının periferik sınırına protonları pompalayarak subosteoklastik boşlukta asidik bir mikro ortam (2-4 arasında pH) üretirler (54). Hücre altı boşluktaki bu asidik mikro ortam, hidroksiapatiti çözmek için asit fosfataz gibi salgılanan enzimleri aktive ederek bifosfonatların ayrışmasına yol açar (49). Ayrışan bifosfonat molekülleri daha sonra osteoklastik endositoz yoluyla hücre içine alınır. Daha sonra bifosfonatlar önce endositik veziküllerde sonra sitozolde lokalize olurlar (52). Osteoklast sitozolündeki nitrojen içermeyen bifosfonatlar osteoklast apoptozunu indükleyen adenosin trifosfat (ATP) analoglarına dönüşürler. Azot içeren bifosfonatlar, farnesil pirofosfat sentetaz (FPPS) enzimini inhibe eder ve küçük GTPaz (guanozin trifosfotaz) proteinlerinin prenilasyonunu (hidrofobik moleküllerin eklenmesi) önler, böylece bu proteinler osteoklastların işlevi ve hayatta kalmasıyla bağdaşmayan prenil edilmemiş formlarında birikirler (55).

Önceki çalışmalar, bifosfonatların sadece osteoklastlar üzerinde değil osteoblast ve osteositler üzerinde de bir etki mekanizmasına sahip olabileceğini

düşündürmektedir (56). Bu nedenle, osteoklastları etkilemeyen bir bifosfonat, osteoblastların ve osteositlerin apoptozunu önleyebilir (57). Bifosfonatların osteoblast apoptozunu önlemesi için gerekli olan doz osteoklast apoptozunu indüklemesi için gereken dozdan daha düşüktür (58). Bifosfonatların, konnexin 43 tarafından oluşturulan kanalların geçirgenliğini arttırdığı ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazların aktivasyonu yoluyla osteoblastları ve osteositlerin apoptozunu engellediği görülmektedir (56).

2.2.2. Bifosfonatların terapötik ajanlar olarak kullanımı

Bifosfonatlar ilk olarak 1800'lerde tanıtıldı ve 1960'larda ticari olarak kullanılmaya başlandı. Başlangıçta, endüstride kalsiyum ve magnezyum için korozyon önleyici ajanlar olarak veya deterjan çözeltileri olarak kullanıldılar (59). Bifosfonatlar tıpta özellikle kanser, osteoporoz ve Paget hastalığı v.b. durumlarda kemikteki rezorpsiyonu durdurmak ya da engellemek için kullanılırlar (60).

2.2.2.1. Kanser

Bifosfonatlar sıklıkla prostat kanseri, meme kanseri ve multipl miyelom gibi kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (61). Kemik metastazları osteoblastik, osteolitik veya bunların her ikisi ile olabilir (62). Multipl miyelom ve meme kanserlerinde sıklıkla karşılaşılan osteolitik lezyonlar nedeniyle kemik yapıda aşırı bir yıkım meydana gelir. Meme kanserinde tümör hücreleri, paratiroid hormonu, IL-6 (interlökin 6), prostaglandin E2, tümör nekroz faktörü ve RANKL ekspresyonunu artıran ve osteoklast farklılaşmasını ve aktivasyonunu uyarıcı koloni uyarıcı faktör gibi peptitler üretir ve bu da kemik erimesine neden olur. Kemik erimesi süreci, dönüştürücü büyüme faktörü b, insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), fibroblast büyüme faktörleri, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve kemik morfogenetik proteinleri gibi paratiroid hormonu ile ilişkili peptit üretiminin artmasına neden olan faktörleri serbest bırakır. Bu faktörler ayrıca tümörün büyümesini arttırır. Bu kısır döngü, kemik yıkımının ve tümör büyümesinin daha da artmasına neden olur (63).

Prostat kanseri vb. kanser türleri osteoblastik lezyona ve lokal kemik yapımındaki artışa neden olabilir. Mevcut literatür osteoblastik metastazın artan osteoblast aktivasyonuna ve artan tümör büyümesine yol açan bir kısır döngünün sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Osteoblastik lezyondaki kemik yapım-yıkım

dengesi, kemik rezorpsiyonunun azalması ve kemik yapımının artması şeklindedir. Prostat kanserinde azalan kemik rezorpsiyonu, tümör hücreleri tarafından salınan prostat spesifik antijen (PSA) tarafından N-terminalinde paratiroid hormonu ile ilişkili peptidinin (PTHrP) bölünmesinden kaynaklanır (62). Artan kemik oluşumu, tümör hücrelerinin ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (u-PA), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve Endotelin-1 (ET-1) üretiminin artmasından kaynaklanır. Bu proteinler, kemik metastazını uyarır ve kemik mikro çevresinde insülin benzeri büyüme faktörleri gibi osteoblastik büyüme faktörlerini veya transforme edici büyüme faktörü b (TGF- β gibi osteoblastik büyüme faktörlerini serbest bırakarak osteoblastları aktive eder. u-PA, kemik mikroçevresinde üretilen TGF- β 'yı parçalayabilir ve aktive edebilir. TGF- β aktivasyonu, osteoblast ve osteoklast farklılaşmasını ve tümör hücrelerinin büyümesini düzenler, bu da bir kısır döngüye yol açar (63).

Bifosfonatlar, kanser tedavisinde kemik metabolizması ile ilgili değişen dengeleri düzeltmek için kullanılmaktadır. Tümörün tipine ve etki mekanizmasına bağlı olarak, bifosfonatlar hem in vitro hem de in vivo olarak osteoklast apoptozisine neden olur. Bifosfonatlar, kemik yüzeyindeki osteoklastların sayısını azaltır ve bu nedenle kemik bütünlüğünü korumaya yardımcı olan ve tümör hücreleriyle ilişkili kısır döngüyü kıran osteoklastik aktiviteyi ve dolayısıyla kemik rezorpsiyonunu azaltır. Ayrıca bazı bifosfonatların osteoklastlar dışındaki hücreler üzerinde etkisi vardır. Örneğin, zoledronik asit tümör hücrelerinin istilasını ve çoğalmasını engeller ve T hücrelerini tümör hücrelerine karşı aktive eder (64,65).

2.2.2.2. Osteoporoz

Osteoporoz, azalan kemik kütlesi, azalan kemik gücü ve kırılmaya karşı artan duyarlılıktan kaynaklanan sistemik bir durumdur. En yaygın tip olan primer osteoporoz, kadınlarda erkeklerden daha sık görülür. Sekonder osteoporoz, glukokortikoid veya hiperparatiroidizm uzun süre maruz kalma gibi belirli tıbbi durumların bir sonucu olarak ortaya çıkar (66,67).

Primer osteoporoz; östrojen yetmezliğinin bir sonucu olarak ortaya çıkar ve yaygın olarak postmenopozal dönemdeki kadınlarda görülür. Erkeklerde osteoporoz vakalarının %40 kadarı ikincil nedenlere bağlı olmaksızın ortaya çıkmaktadır (68).

Osteoporotik kemik kırığı ağrıya, geçici sakatlığa ve mortalitede artışa yol açar. Bir kadının yaşam boyu herhangi bir iskelet bölgesinde kemik kırığı geçirme riski %53.2 iken bir erkek için bu oran %20.7' dir (69). Ancak erkeklerde kalça kırığı sonrası ölüm oranı kadınlara göre 4 kat daha fazladır (66). Kalça kırığı yaşayan erkeklerin çoğu, tanısız osteoporotik aralıkta olmayan kadınlardan daha yüksek kemik mineral yoğunluğu değerlerine sahiptir (68).

Bifosfonatlar, osteoporoz tedavisinde kemik erimesini ve hiperkalsemiyi azaltmak ve patolojik kemik kırıklarını önlemek için başarıyla kullanılmaktadır (70). Uzun yaşam beklentisinin artmasıyla birlikte, bifosfonatların osteoporoz için kullanım sıklığının kadınlarda erkeklerden altı kat fazla artması beklenmektedir.

2.2.2.3. Paget Hastalığı

Osteitis deformans olarak da bilinen Paget hastalığı, genç yaşlarda nadirdir ve 40 yaşın üzerindeki bireylerin %3-4' ünde görülür (71). Düşük kaliteli kemiğin aşırı rezorpsiyonu ve aşırı apozisyonun neden olduğu, kemik hipertrofisi ve osteoskleroz ile karakterize kronik ilerleyici iskelet bir hastalıktır (72). Erken evrelerinde Paget hastalığı asemptomatiktir ve hastalarda bir veya birden fazla kemik bu durumdan etkilenebilir (73). Geç evrelerde ağrı, düzensiz kalınlaşma, kemik ve iskelet elemanlarının büyümesi veya deformasyonu ile ilişkilidir (74). Paget hastalığının tedavisinde kemik erimesini ve anormal yeniden şekillenmeyi azaltmak için oral ve intravenöz bifosfonatlar kullanılmaktadır (75). Son araştırmalar, 6 ay süreyle zoledronik asit alan hastaların %96' sında, aynı süre risedronat alan hastaların %74.3' ünde iyileşme gözlenmiştir. Serumdaki alkalın fosfataz seviyeleri, risedronat alan hastaların %57.9' unda zoledronik asit alan hastaların %88.6' sında normale dönmüştür (76) .

2.2.2.4. Osteogenesis İmperfekta

Osteogenesis imperfekta; hücre dışı matrisi etkileyen tip I kollajen liflerinin kalitesinin ve miktarının azalmasıyla karakterize otozomal dominant geçiş gösteren genetik bir hastalıktır. Hastalığın bulguları arasında; vertebral kompresyon, kırılabilir opalesan dişler, kırılabilir kemik yapıları vardır (77). Hastalığın şiddeti, küçük kırıklı çok hafif formlardan, doğumdan kısa süre sonra sık görülen kemik kırıklarına ve ölüme kadar değişir (78). Osteogenesis imperfekta' nın bifosfonatlarla erken tedavisi,

kemik mineral yoğunluğunda artışlarla sonuçlanmıştır. Böylece kırık oranlarında, kronik kemik ağrısında ve hareketsizlikte azalma gözlenmiştir (79). Bifosfonatlar ayrıca tip III ve IV osteogenesis imperfekta tedavisinde de olumlu sonuçlar göstermiştir (80).

2.2.2.5. Bifosfonatların Diğer Kullanımları

Bifosfonatlar ayrıca hiperparatiroidizm vakalarında kemiği korumak, periprostetik kemik kaybını önlemek ve periodontal hastalıklarda kemik kaybını azaltmak için de kullanılabilir (81). Nadir de olsa bazı kalça osteonekrozu, fibröz displazi, juvenil dermatomyozit ve kalsinoz vakalarında da bifosfonatlar kullanılmıştır.

2.2.3. Bifosfonatların Yan Etkileri

Bifosfonatlar genellikle iyi tolere edilirler. Bununla birlikte bu ilaçların yüksek dozlarda ve uzun süreli kullanımı kemik ağrısı, osteomalazi, mide ülseri, nefrotoksisite ve MRONJ gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilmektedir (82,83). Gastrointestinal erozyonlar, ülserler, perforasyonlar ve striktürler dahil olmak üzere bifosfonatların oral uygulaması ile bir dizi olumsuz gastrointestinal yan etki ortaya çıkabilmektedir. Bu yan etkilerin insidansı ilacın dozuna ve kullanım sıklığına bağlıdır. Bu durumlar muhtemelen yüksek lokal bifosfonat konsantrasyonlarının bitişik hücreler için toksik seviyelere ulaşması ile ilgilidir; ancak yukarıda bahsi geçen yan etkiler standart osteoporoz dozlarında da ortaya çıkabilirler. Bifosfonatların tedavisi, özellikle intravenöz olarak uygulandığında bazen kemik ağrısına neden olabilir. Kemik ağrısı genellikle IL-6 ve TNF α (tümör nekroz faktör- α) gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımında ikincil akut faz reaksiyonunun bir parçası olarak kabul edilir (82). Yüksek dozda intravenöz pamidronat veya zoledronat alan hastalarda akut tübüler nekroz durumları da bildirilmiştir (84). Bifosfonatlar böbrekte hızla temizlendiğinden bifosfonat intravenöz infüzyonlarla çok hızlı verilirse böbrek hasarı meydana gelebilir. Geri dönüşü olmayan hasar bildirilmiş olsa da, ilaç kesildiğinde böbrek fonksiyonu genellikle normale döner (84). Son zamanlarda bazı epidemiyolojik çalışmalarda bifosfonatlar ile atriyal fibrilasyon arasında bir ilişki olduğu öne sürmüştür (85,86). Bununla birlikte yaygın olarak dikkat çeken ve son yıllarda en çok endişe uyandıran toksisite MRONJ'dur.

2.3. Çenenin Bifosfonatla İlişkili Osteonekrozu (Mronj)

2.3.1. Tanımı ve Risk Faktörleri

Son yıllarda bifosfonatların uygulanmasıyla ilişkili çene nekrozu vakalarını açıklayan raporların sayısında çarpıcı bir artış meydana geldi (7,87). Bu durum bifosfonatların, özellikle nitrojen içeren bifosfonatların MRONJ ile ilişkili olabileceğine dair genel bir kanı oluşmasına neden oldu. MRONJ' un spontan olarak, diş çekimi veya protez kullanımı gibi dentoalveolar işlemleri takiben gelişebileceği belirtilmektedir (88,89). MRONJ klinik olarak teşhis edilir ve AAOMS tarafından “bir hastada bir sağlık hizmeti sağlayıcısı tarafından tanımlandıktan sonra 8 hafta içinde iyileşmeyen maksillofasiyal bölgede açıkta kalan kemik alanı” olarak tanımlanmıştır. Bifosfonat alan veya bifosfonata maruz kalmış ve kraniyofasiyal bölgeye radyasyon tedavisi almamış olan kişiler için 2022 yılında klinik belirtilere ve buna karşılık gelen tedavi stratejilerine göre 4 evreden oluşan bir evreleme sistemi ile vakalar sınıflandırıldı (8). Kısaca sınıflandırma şu şekildedir:

Evre 0; Klinik olarak nekrotik kemik olmayan ancak spesifik olmayan semptomlar veya klinik ve radyografik bulgular gösteren hastalar.

Evre 1; Asemptomatik olan ve enfeksiyon/enflamasyon kanıtı olmayan hastalarda kemiğe kadar uzanan açıkta ve nekrotik kemik veya fistül.

Evre 2; Açıkta ve nekrotik kemik veya enfeksiyon/enflamasyon kanıtı ile kemiğe doğru uzanan fistül. Bu hastalar semptomatiktir.

Evre 3; Açıkta ve nekrotik kemik veya kemiğe doğru uzanan fistül, enfeksiyon kanıtı ve aşağıdakilerden biri veya daha fazlası:

Alveoler kemik bölgesinin ötesine uzanan açık nekrotik kemik (yani, mandibulada alt sınır ve ramus, maksiller sinüs ve maksillada zigoma)

Patolojik kırık.

Ekstraoral fistül.

Antral-burun yolağı.

Popülasyonda MRONJ insidansı birçok faktörle ilişkilendirilmiştir: bifosfonat potensi, dozu, uygulama yolu, tedavi süresi, dentoalveolar ameliyatların varlığı, mandibular veya palatal torus gibi lokal anatomik farklılıklar, beyaz ırk ve artmış yaş (8). Ancak cinsiyet ve malignite tipi risk faktörü olarak tanımlanmamıştır. Kemoterapötik ve steroid ajanlar gibi ilaçların kemik fizyolojisini önemli ölçüde etkileyebildikleri için risk faktörleri olduğu düşünülmüştür (90). Ancak, diğer çalışmalar bu ilişkiyi doğrulamamıştır (91,92)

2.3.2. MRONJ İnsidansı

Osteoporoz için oral bifosfonatlarla tedavi edilen hastalarda MRONJ insidansı nispeten düşüktür; ancak ihmal edilebilir düzeyde değildir (87). Osteoporoz için oral bifosfonat alan hastaların %0.1' inde MRONJ geliştiği tahmin edilmektedir. Bu yaygınlık, ilgili diş semptomları bildiren ve diş muayenesi yapılan 1.005 anket katılımcısından alınan verilere dayanarak değerlendirilmiştir. Bu vakalardan dokuzu MRONJ olarak tanımlanmıştır (93). Osteoporoz için intravenöz bifosfonat alan hastalarda MRONJ gelişme riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (94).

Paget hastalığı ve osteogenezis imperfekta için tedavi edilen hastalarda MRONJ prevalansı büyük ölçüde tanımlanmamıştır, ancak düşük olması beklenmektedir. Paget hastalığı için bifosfonat etkinliğini değerlendiren önceki klinik çalışmalarda hiçbir çene kemiği nekrozu vakası bildirilmemiştir (76,95). Ek olarak, osteogenezis imperfekta için intravenöz disodyum pamidronat alan 64 hastadan oluşan bir grupta, üçte birinden fazlasının bifosfonat tedavisi sırasında diş çekimi yapılmasına rağmen hiçbir MRONJ vakası tespit edilmemiştir (96).

Bifosfonat kullanan kanser hastalarında MRONJ insidansının %10 civarında olduğu tahmin edilmektedir, bu da yayınlanmış MRONJ vakalarının %94' ünü temsil etmektedir (97)(8). Diğer sistematik incelemelerde, izlemin varlığına ve incelenen çalışmaların kalitesine bağlı olarak, MRONJ' un genel prevalansının % 6.1 (%0,7-13.3) olduğu bildirilmiştir (98). Maligniteler arasında MRONJ prevalansında önemli bir fark kaydedilmemiştir (47). Hastaların genel sağlığına bağlı olarak, MRONJ prevalansı prostat kanseri tedavisi gören hastalarda %2.5-18.6, meme kanseri tedavisi gören hastalarda %1-7 ve multipl miyelom tedavisi gören hastalarda %2-11 arasında değişmektedir (99–102).

2.3.3. MRONJ için Hipotezler

MRONJ' un patofizyolojik süreci tanımlanmamıştır ve osteonekrozun neden ağız boşluğu ile sınırlı olduğuna dair net bir açıklama yoktur (103). Birçok hipotez MRONJ' u açıklamaya çalışmıştır. Bifosfonatların çene kemikleri, mukoza ve çenenin diğer yumuşak dokuları üzerindeki etkisi, ilaçların antianjiyogenik etkileri ve MRONJ gelişiminde bakterilerin rolü gibi hipotetik yaklaşımlar öne sürülmüştür.

Bifosfonatlar, osteoklastların aktivitesini inhibe eder ve çene kemiklerinin yeniden şekillenmesini önemli ölçüde baskılar (104). Mandibula ve uzun kemiklerin benzer uyaranlara farklı tepki verdikleri (105) ve mandibuladaki kemik dönüşüm hızının uzun kemikler ve maksilladakinden daha yüksek olduğu (106) bildirilmiştir. Bifosfonatların çene kemikleri üzerindeki lokalizasyonun onun yeniden şekillenme kapasitesini ciddi oranda bastırdığı ve daha sonra, onu diğer kemiklere göre eksternal travmalara karşı daha duyarlı hale getirdiği düşünülmüştür (97,107,108). Bununla birlikte, sıçanların çene kemiğindeki bifosfonat konsantrasyonunun, iskeletin diğer bölgelerine benzer olduğu gösterilmiştir (109).

2.3.4. Bifosfonatların Yumuşak Dokular Üzerindeki Etkisi

Bifosfonatların endotelial ve subkutan doku üzerindeki toksisitesi daha önce gösterilmiştir (110). Örneğin, pamidronatların in vitro olarak oral mukoza hücrelerinin proliferasyonunu ve yara iyileşmesini önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (111). Bifosfonat uygulamasının, diş çekimlerinden önce lokal bir alendronat enjeksiyonu ile tedavi edilen sıçanların çekim yuvasında yara iyileşmesini ve kemik oluşumunu geciktirdiği gösterilmiştir (112). Son kanıtlar, MRONJ' un bifosfonatlardan etkilenen yumuşak dokuların iyileşme yetersizliği ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (111). Alveolde travma veya diğer nedenler ile ortaya çıkan hasar, bifosfonatların bağlı olduğu yapıyı çevreleyen dokuya lokal olarak salınmasına neden olabilir (113). Düşük bir olasılık da olsa, diş çekimi veya protetik tedaviler gibi uygulamaların travmaya ya da yumuşak dokuların iyileşmesinde bozulmaya yol açabileceği varsayılmıştır. Sonuç olarak, kemik yüzeyi açığa çıkarak ağız ortamına açılır. Bu da kemiğin bakteriyel enfeksiyonuna ve nekrozuna neden olur(111),(114).

2.3.5. Bifosfonatların Çene Kemiği Vaskülarizasyonuna Etkisi

Anjiyogenez, yeni damar ağları oluşturma sürecidir. Bifosfonatların vaskülarizasyon üzerindeki antianjiyogenez etkisi daha önce literatürde bildirilmiştir (115). Dış çekimi ve lokal bir alendronat enjeksiyonu sonrasında sıçanlarda yeni kan damarlarının sayısında ve vasküler alanda geçici bir azalma ile bağlantılı olarak yeni kemik oluşumunda azalma kaydedilmiştir (116). Sonis ve ark. (117) histolojik kesitler kullanarak yaptıkları çalışmada; zoledronik asit ve deksametazon subkutan uygulamasını takiben sıçanların çekim soketindeki vaskülarizasyonun azaldığını bildirmişlerdir. Lopez-Jornet ve ark. (118), sıçanlarda oluşturulan deneysel MRONJ' un azaltılmış bir çene kemiği vaskülarizasyonu ile bağlantılı olabileceğine dair ön görüde bulunmuşlardır. Diğer çalışmalarda bifosfonatların insan göbek damarlarından alınan endotel hücrelerinin vasküler proliferasyonunu in vitro olarak engellediğini gösterilmiştir (12). Başka bir araştırmada, Yamashita ve ark. (119), bifosfonatların sıçanların kemik iliği veya yumuşak dokusundaki anjiyogenik belirteçler üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bildirmiştir. Araştırmacılar bifosfonatların lenfanjiyogenez ile ilişkili genleri baskılayarak kemik iliğinin yeniden şekillenmesini etkilediği sonucuna varmışlardır.

2.3.6. MRONJ Gelişiminde Oral Mikrobiyal Floranın Rolü

MRONJ' un özellikle çene kemiklerinde meydana geldiği kaydedilmiştir. Çeneleri diğer iskelet kemiklerinden ayıran benzersiz bir özellik, dış ortama yakın olmalarıdır. Sadece ince keratinize mukoza tabakaları çene kemiklerini 700' den fazla bakteri türünün bulunduğu bir rezervuar olan ağız boşluğundan ayırır (120). Sağlıklı deneklerden alınan oral bakterilerin zoledronik asit ile in vitro inkübasyonunu takiben 24 saat sonra bakterilerin çoğalma hızında ve beyaz koloni sayısında artış meydana geldiği gözlenmiştir (121). Aynı çalışmada yazarlar, *Streptococcus mutans*'ın hidroksiapatite yapışma oranındaki artıştan söz etmişlerdir. In vivo çalışmalar, MRONJ oluşumunun enfeksiyon varlığı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (122,123). Bifosfonatların MRONJ' a yol açabilecek iyileşmeyen bir inflamatuvar sürecin üretilmesinde rol oynayabilen *Actinomyces* gibi patojenik bakterilere karşı immün yanıt sistemini inhibe edebileceği de öne sürülmüştür (122,123). Ancak deneysel olarak indüklenen MRONJ üzerinde yapılan bir çalışmada, Periyodik Asit Schiff boyaması kullanıldığında nekroza uğrayan

kemiklerin vakalarında hepsinde Actinomyces bulunmamıştır (117,118). Wei ve ark. (124) ise özel bir moleküler bir teknik kullanarak yaptıkları kullanarak yaptıkları çalışmalarında MRONJ hastalarından alınan numunelerin çok azında Actinomyces bulunduğunu bildirmişlerdir. Lodi ve ark. (125) bifosfonat tedavisi gören hastalara dental müdahale öncesinde ve operasyonu takip eden 17 gün boyunca amoksisilin (1 g, 3 kez/gün) vermişler ve 23 hastadan 38 çekim ile ilişkili minimal operasyon sonrası komplikasyon bildirilmişlerdir. Ferlito ve ark. (126) intravenöz zoledronata maruz kalan ve ameliyattan 2 gün önce amoksisilin artı klavulanat (1g, 2 kez/gün) profilaktik protokolü ile tedavi edilen 43 hastada 102 diş çekiminin ardından ameliyatı takip eden 5. güne kadar MRONJ belirtisi gözlemlenmemiştir.

Ancak MRONJ evre 0' da kemik ağız boşluğuna açılmamasına rağmen geliştiğinden, bakterilerin MRONJ gelişimindeki rolü belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca bifosfonat tedavi öyküsü olan hastalarda çenelerin histolojik olarak teşhis edilmiş osteonekrozunun, kemik yüzeyinin açığa çıkarak oral floraya maruz kalması ile direk bir ilişkisinin her zaman olmadığı bildirilmiştir (7,127,128).

2.3.7. MRONJ Tedavisi

MRONJ; iyileşmeyen açıkta kalan kemik, ağrı, mukoza ülserasyonu, enfeksiyon ve bakteri kolonizasyonu ile ilişkili önemli bir klinik problemdir. Hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkiler. MRONJ için tedavi alternatifleri MRONJ' un evresine bağlı olarak konservatif veya cerrahi prosedürler şeklinde değişiklik göstermektedir. Hastaya bifosfonat reçete eden uzmana danışılıp hastanın genel sağlığı da göz önünde bulundurularak bifosfonatlara ara verilmesi düşünülebilir. MRONJ' un patofizyolojisi, ilişkili risk faktörleri ve tedavi alternatifleri hakkında sınırlı bilginin var olduğu düşünüldüğünde, klinik kılavuzlar MRONJ' un tedavisi ve önlenmesi için her zaman etkili olmayabilir. Çünkü bifosfonatlara maruz kalırken dental müdahaleye ihtiyaç duyulan hastalar için herhangi bir önleyici ve tedavi edici alternatifi tanımlayan net bir kılavuz mevcut değildir.

2.3.7.1. Konservatif Tedavi

Mevcut kılavuzlara göre (89); MRONJ' un erken evreleri için konservatif tedavi önerilmektedir. Bu yaklaşım, hasta eğitimi ve ağrı kesici ilaç kullanımı, antibiyotikler, antibakteriyel ağız gargarası, ağız hijyeninin korunması, düzenli klinik takip ve bifosfonat tedavisine devam etmek için endikasyonların gözden geçirilmesini içeren semptomların ameliyatsız yönetimine odaklanır. Bazı araştırmacılar MRONJ evre 1 ve bazı MRONJ evre 2 vakalarının konservatif tedavi yaklaşımları ile başarılı şekilde tedavi edilebildiğini bildirmişlerdir (129,130).

2.3.7.2. Cerrahi Tedavi

Güncel kılavuzlarda ileri MRONJ vakalarında cerrahi tedavi önerilmektedir (89). Semptomatik tedaviye ek olarak travmayı azaltmak ve çevredeki yumuşak dokuların tahrişini gidermek için nekroz alanının debridmanı önerilir. Nekrotik bölgede semptomatik dişlerin çekimi de düşünülmelidir. Ağız dışı fistül veya patolojik kırık ile ilişkili ileri vakalarda nekrotik kemiğin cerrahi debridmanı ve rezeksiyonu önerilmektedir (8). Çalışmalarda cerrahi tedaviyi takiben ileri MRONJ vakalarının iyileştiği gösterilmiştir (131,132). Bununla birlikte, son yıllardaki çalışmalarda vaskülarize kemik kullanılarak başarılı bir kemik rekonstrüksiyonu sağlanabildiği gösterilse de, mevcut kılavuzlara dayanarak potansiyel bir kemik grefti ve rekonstrüktif cerrahinin başarısızlık olasılığı hiçbir zaman unutulmamalıdır (133,134).

2.3.7.3. Bifosfonat Kullanımının Durdurulması

Bifosfonatlar tedavinin kesilmesinden sonra da uzun süre kemik matriksinde kalabilirler. Bifosfonatlara ara verildikten aylar sonra idrarda bifosfonat varlığı saptanabilir (103). Bifosfonatlar kemik matriksinde uzun süre kalabildiklerinden, bifosfonat kesildikten sonra bile kemiğin yeniden şekillenmesi üzerindeki inhibitör etkileri devam edebilir (103). Bu nedenle, kısa bir süre için bifosfonatın kesilmesinin kemiğin yeniden şekillenmesine devam etmesine izin vermesi ve MRONJ geliştirme riskini önemli ölçüde azaltması olası değildir (8,103). Genel hastanın durumu izin veriyorsa, ciddi oral komplikasyonları olan vakalarda ya da dentoalveolar ameliyat gereksinimi olan bireylerde bifosfonatlara ara verilmesi veya maruziyetin azaltılması önerilmiştir (89). MRONJ riskini azaltmada bifosfonatın kesilmesinin yararlı

etkilerini destekleyecek uzun dönem prospektif çalışma verisi olmamasına rağmen, literatürde dental müdahaleden önce bifosfonat maruziyetinin kesilmesi veya azaltılmasının faydalı sonuçları tanımlanmıştır (135,136). Daha önceki bir vaka serisinde, bifosfonatın iki ay bir süreyle kesilmesinin ardından MRONJ' lu 33 hastanın cerrahi tedavilerinin başarıyla yapıldığı bildirilmiştir (136). Corso ve ark. (135) zoledronik asit ile tedavi edilen 55 hastadan oluşan bir grupta üç ayda bir MRONJ vakası rapor ederken, aylık zoledronik asit dozları ile tedavi edilen 51 hastadan oluşan bir grupta 6 vaka rapor etmiştir. Bununla birlikte, bifosfonat kesildikten sonra bile MRONJ oluşan vakalar bildirilmiştir (137,138). Sonuç olarak, MRONJ gelişme riskinde önemli bir azalma elde etmek için bifosfonatın ne kadar süreyle kesilmesi veya azaltılması gerektiği ile ilgili fikir birliğine varılamamıştır (135,139).

2.3.7.4. Vaskülarize Kemik Greftleri

Bifosfonatların sistemik uygulanması ilacın sadece çene kemiklerinde değil aynı zamanda diğer iskelet yapılarında da birikmesine neden olmaktadır. Önceki yıllarda birçok araştırmacı, MRONJ hastalarında vaskülarize kemik flebi kullanımına karşı çıkan argümanlar ortaya koymuşlardır. Halihazırda aynı antirezorptif ilaca maruz kalmış otojen kemik greftinin transfer edilmesinin riskli olacağını öne sürülen çalışmalar mevcuttur (89,140,141). Ancak daha yakın tarihli vaka serilerinde vaskülarize kemik flebi kullanılarak MRONJ' un başarılı bir şekilde tedavi edilebileceği gösterilmiştir (142). Otojen greftlerin başarılı kullanımına örnekler arasında vaskülarize fibula flebi ile mandibular kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu sayılabilir (134). Vaskülarize kemik flebi kullanılarak yapılan rekonstrüksiyon umut verici sonuçlar veriyor gibi görünse de hem klinisyenler hem de hastalar ilaçların osteoklastlar üzerindeki sistemik inhibitör etkisi ve antiosteoklastik ilaçları içeren dokuları transfer etme riski nedeniyle bu tedavi yöntemlerinin potansiyel başarısızlığının farkında olmalıdırlar (89). Yapılan çalışmalarda; sinüse uzanan veya mandibulada patolojik kırıklarla sonuçlanan geniş çene kemiği nekrozunun rekonstrüksiyonu için vaskülarize kemik transferinin kullanımı önerilmektedir (88).

2.3.8. Bifosfonatların Yan Etkileri

İntravenöz verilen bifosfonatların yan etkileri oral bifosfonatlarla benzerdir. özofajit, karın ağrısı veya ishal ile kendini gösterebilen üst gastrointestinal tahrişler gözlemlenebilir. Daha nadir yan etkiler arasında ilaç kesildikten sonra azalan kemik, eklem ve kas ağrısı bulunur (143). Diğer yan etkileri ise çene osteonekrozu, sklerit, üveit veya konjonktivit olarak kendini gösteren oküler inflamasyon, ateş, lökopeni ve nefritik sendrom ile ilişkilidir (144).

2.3.9. Zoledronik Asit

Zoledronik asit (Reclast®, Aclasta®) birincil veya ikincil osteoporozu veya düşük kemik kütlesi olan hastalarda kullanım için ABD, AB ve Japonya da dahil olmak üzere dünya çapında onaylanmış intravenöz, oldukça güçlü bir aminobifosfonattır. Kemiğe yüksek afinite yeteneği, uzun yarı ömrü ve uzun etki süresi nedeniyle bazı vakalarda yılda bir kez uygulanır. Zoledronik asit primer veya sekonder osteoporozlu hastalarda yapılan klinik çalışmalarda; üç yıla kadar yılda bir kez uygulandığında çeşitli iskelet bölgelerinde kemik mineral yoğunluğunu (KMY) iyileştirmiş, kırık riskini azaltmış ve plaseboya göre kemik yapısını ve kütlesini korumuştur (85). Tedaviye 6 yıla kadar devam edildiğinde vertebra kırığı riskinin azalması ve daha yüksek KMY gibi ek faydalar görülse de bu etki minimaldi. Bu nedenle, düşük kırık riski olan hastalarda yaklaşık 5 yıllık tedaviden sonra tedavinin kesilmesi düşünülmelidir. Yılda bir veya iki yılda bir uygulanan zoledronik asit, düşük kemik kütlesi olan hastalarda kemik kaybını önlemede de etkili olmuştur. Zoledronik asit genellikle iyi tolere edilmiştir ve yan etkiler çoğunlukla geçici, hafif ve ilk infüzyon sonrası semptomlardır ve sonraki infüzyonlarla azalmıştır. Sonuç olarak; yılda bir kez yapılan zoledronik asit uygulaması osteoporozlu hastalar için etkili ve genellikle iyi tolere edilen bir tedavi seçeneğidir (145).

Zoledronik asit, mineralize kemik için yüksek afiniteye sahiptir (146), intravenöz uygulamadan sonra tercihen yüksek kemik döngüsünün olduğu bölgelerde lokalize olur (147). Kemik yıkımı sırasında osteoklastların endositik aktivitesi yoluyla rezorpsiyon ve FPPS'yi inhibe ederek ve protein prenilasyonunu önleyerek kemik rezorpsiyonunu inhibe eder (148). Zoledronik asidin mineralize kemik ve

FPPS aktif bölgesi için yüksek bağlanma afinitesinin, uzun etki süresinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (146).

2.3.10. Hayvan Çalışmalarında Deneysel MRONJ

Önceki çalışmalarda bifosfonat tedavisi ile ilişkili kemik değişikliklerini araştırmak için ratlar kullanmıştır. Örneğin; Sonis ve ark. (117), ağzın bir tarafındaki tüm azı dişlerinin çekilmesi ile birlikte zoledronik asit ve deksametazon kombine uygulamasını takiben MRONJ benzeri hastalıklı bir sıçan modeli oluşturmuştur. Ameliyattan 2 ve 4 hafta sonra diş çekimi bölgesinde yüksek oranda (%80-100) açıkta kalan kemik varlığı gözlemlenmiştir. Araştırmacılar nekrotik kemiğe bitişik bölgedeki azalmış vaskülarizasyon ile açıkta kalan kemiğin varlığı arasındaki potansiyel ilişkiye dikkat çekmişlerdir. Ancak; kemik vaskülarizasyonu ile nekroz varlığı arasındaki bu bağlantıyı ispat edememişlerdir (117). Yazarlar bu durumu deney hayvan sayılarının düşük olması ile ilişkilendirmiştir. Bir diğer hayvan çalışmasında; bifosfonat pamidronat ve deksametazonun kombine uygulaması şeklinde daha fazla hayvan çalışmaya dahil ederek test etmişlerdir (118). Bu ilaç kombinasyonun diş çekimini takiben MRONJ' a benzer açıkta kalan kemik alanlarıyla sonuçlanabileceğini göstermişlerdir . Aynı çalışmada araştırmacılar bu kombinasyonla tedavi edilen hayvanların histolojik kesitlerinde vaskülarizasyonda bir azalma olduğunu bildirdiler. Benzer şekilde Gao ve ark. (149), zoledronik asit, deksametazon ve kemoterapinin birlikte uygulanmasının ardından deney farelerinde MRONJ benzeri hastalık oluşturmuştur. Kemoterapi ilaçları ile kombine bifosfonat alan grupta, sadece zoledronik asit ve deksametazon verilen gruba kıyasla iyileşmeyen kemik maruziyeti insidansının daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Başka bir araştırmada sıçanlarda MRONJ benzeri bir durumun artan prevalansı ile D vitamini eksikliği arasında bir bağlantı olduğu öne sürüldü (150). Yalnızca kantitatif histolojik analize dayalı olarak yapılan bir başka çalışmada, Erdem ve ark. (151), zoledronik asit ve deksametazon kombinasyonları enjekte edilen sıçanların ve kontrol grubuna göre diş çekim bölgelerinde kemik oluşumu, iltihaplanma ve nekroz açısından farklılıklar gösterdiğini bildirmiştir. Duman ve ark. (152) bifosfonat uygulanmasının diş çekimi veya başka bir cerrahi prosedürü gerçekleştirmeden bile çene kemiklerindeki enflamatuvar yanıtları artırabildiğini rapor etmişlerdir. Deneysel MRONJ çalışmaların genel olarak limtasyonları şu şekildedir: travmatik yaralanma

faktörünün olmaması, sistemik ilaç uygulaması yerine lokal kullanım, kısa süreli takip, farklı ilaç uygulama programları ve rezidüel bifosfonat etkisinin analizinin olmamasıdır (112,153).

Literatürde MRONJ' u incelemek için çok iyi planlanmış hayvan deneyi çalışmaları çok sınırlıdır (117,118,149). Bu nedenle ideal bir hayvan çalışma modelinin geliştirilmesi, MRONJ' un fizyopatolojisinin ve bifosfonatın kesilmesinin potansiyel olarak faydalı etkisinin değerlendirilmesine yardımcı olacaktır. Ayrıca böyle bir çalışma modeli açıkta kalan kemik bölgesinde bulunabilecek bakteri türlerinin belirlenmesine de yardımcı olacaktır.

2.4. Fosfodiesterazlar Ve İnhibitörleri

Fosfodiesterazlar (PDE); hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) seviyelerini dolaylı olarak artırarak hücre fonksiyonlarını düzenlemede anahtar rol oynayan bir enzim ailesidir.

Fosfodiesteraz inhibitörleri, kan damarlarının gevşemesine ve genişlemesini (vazodilatasyon) sağlayan, dolaşımı iyileştiren ve kan basıncını düşüren ilaçlardır. Bu, onları cildiniz ve eklemleriniz, kalbiniz ve ciğerleriniz ve hatta cinsel işlev bozukluğu dahil olmak üzere çok çeşitli tıbbi durumların tedavisinde yararlı kılar.

Fosfodiesterazlar, kimyasal reaksiyonların normalden çok daha hızlı ve kolay gerçekleşmesini sağlayan enzimlerdir. İnsan organizmasında 11 farklı türde PDE vardır (154). Bu farklı PDE türleri genellikle vücudunuzun belirli yerlerinde bulunur (155). PDE inhibitörleri, bu enzimleri bloke eden ilaçlardır. Bazı PDE inhibitörleri seçicidir, yani belirli bir PDE tipini hedef alırlar. Diğer PDE inhibitörleri seçici değildir, yani tüm PDE' lere bir dereceye kadar müdahale edebilirler.

PDE türlerinin bulundukları doku, organ veya hücreler ve her bir PDE türünü ihhabe eden ilaçlar ve endikasyonları şu şekildedir (156):

- **PDE1:** Beyin, kalp, düz kas ve akciğerde bulunur. PDE1 inhibitörü ilaçlar: Vinpocetine, nikardipin, nimodipin'dir. Bu ilaçlar hafıza kaybı ve demans gibi tıbbi durumlarda kullanılır.

- **PDE2:** Böbrek üstübezi, akciğer, kalp, platelet, beyin, karaciğer de bulunur. PDE2 inhibitörü ilaçlar: EHNA'dır. Bu ilaçlar akut solunum sıkıntısı sendromu, hafıza kaybı ve sepsis gibi tıbbi durumlarda kullanılır.
- **PDE3:** Kalp, karaciğer, akciğer, vasküler düz kas, korpus kavernosum da bulunur. PDE3 inhibitörü ilaçlar: Silostamid, silostazol, milrinon, enoksamon'dur. Bu ilaçların konjestif kalp yetmezliği, pulmoner hipertansiyon, tromboz, glomerülonefrit gibi hastalıklarda kullanımı endikedir.
- **PDE4:** Akciğer, mast hücresi, karaciğer, böbrek, beyin de bulunur. PDE4 inhibitörü ilaçlar: Rolipram, silomilast, roflumilast' dır. Bu ilaçların glomerülonefrit, astım, KOAH, bipolar bozukluk gibi hastalıklarda kullanımı endikedir.
- **PDE5:** Korpus kavernosum, akciğer, vasküler düz kas, platelet, beyin, özafagus dokularında bulunur. PDE5 inhibitörü ilaçlar: Sildenafil, tadalafil, vardenafil, zaprinast, dipiridamol' dır. Bu ilaçların erektil disfonksiyon, iyi huylu prostat hiperplazisi, pulmoner hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği gibi hastalıklarda kullanımı endikedir.
- **PDE6:** Retina da bulunur. PDE6 inhibitörü ilaçlar: Sildenafil, tadalafil, vardenafil, dipiridamol, zaprinast' dır. Bu ilaçların PDE6 inhibitörü olarak herhangi bir klinik kullanım endikasyonu yoktur.
- **PDE7:** İskelet kası, T hücresi, kalp, beyin, pankreas dokularında bulunur. Dipiridamol PDE7 inhibitörü bir ilaçtır. İlacın immünolojik hastalıklar ve akciğer hastalıklarında kullanımı endikedir.
- **PDE8:** Testis, tiroit, göz, karaciğer, böbrek, kalp, iskelet kası, pankreas ve T hücrelerinde bulunur. Dipiridamol PDE8 inhibitörü bir ilaçtır. Bu ilaç immünolojik hastalıklarda kullanılır.
- **PDE9:** Beyin, böbrek, karaciğer, akciğer dokularında bulunur. Zaprinast PDE9 inhibitörü bir ilaçtır. Bu ilacın hiperglisemik olgularda kullanımı endikedir.
- **PDE10:** Beyin ve testiste bulunur. PDE10 inhibitörü ilaçlar: Dipiridamol ve papaverin' dir. Bu ilaçlar şizofreni ve psikiyatrik bozukluk olgularında kullanılır.

- **PDE11:** Prostat, iskelet kası, böbrek, karaciğer, testis, tükürük bezleri, hipofizde bulunur. PDE11 inhibitörü ilaçlar: Tadalafil, zaprinast, dipiridamol'dur. Bu ilaçlar testiküler fonksiyonda muhtemel bir iyileşme sağlayabilir.

2.4.1. PDE5 İnhibitörü Sildenafil

Yaralanma bölgesinde kanama, başarılı kemik iyileşmesi için en önemli faktördür (17). Travma bölgesinde azalmış anjiyogenez ve bölgeye sınırlı kan temininin kemik iyileşme sürecini geciktirdiği veya bozduğu bilinmektedir (18,19). Anjiyogenez için nitrik oksid ve vazodilatasyon zorunludur ve nitrik oksidin yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri, muhtemelen anjiyogenez ve inflamasyon üzerindeki fonksiyonel etkilerinden kaynaklanmaktadır (20).

Özellikle erektil disfonksiyonun tedavisinde kullanılan PDE5 inhibitörleri ilaçlar olmak üzere PDE inhibitörleri ilaçlar sık reçete edilen ilaçlardandır. Yalnızca 2019'da en sık tercih edilen iki PDE5 inhibitörü ilaçlar sildenafil ve tadalafil 4 milyondan fazla kez reçete edilmiştir. Her iki ilaç da Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık reçete edilen ilaçlar listesinde ilk 300' de yer almaktadır.

Seçici bir PDE5 inhibitörü olan sildenafil, nitrik oksidin bozulmasını önler ve güçlü bir anjiyogenez uyarıcısıdır. PDE5, düz kasları gevşeten cGMP'nin bozulmasına neden olur (15). Sildenafil; periferik arter ve venlerin vazodilatörüdür ve tromboz oluşumunu engeller (16). Aynı zamanda erektil disfonksiyonu olan erkekler için en sık reçete edilen ilaçtır (157).

Çalışmalarda sildenafilin VEGF ve çeşitli büyüme faktörlerini etkilediğini ve dolayısıyla kemik iyileşmesini arttırdığı gösterilmiştir (158). Histing ve ark. sildenafilin kemik oluşumunu artırarak kemik iyileşmesini hızlandırdığını bildirmiştir (15). Ancak her ilaçta olduğu gibi sildenafille ait de bir takım yan etkiler mevcuttur (159). Bu yan etkiler tablo 2.1' de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Sildenafil kullanımı ile ortaya çıkabilecek olası yan etkiler

	Hafif ve orta düzey yan etkiler	Ciddi yan etkiler
Sildenafil	• Baş ağrısı. • Kızarmış cilt. • Gastrointestinal problemler (bulantı, hazımsızlık). • Yüksek dozlarda mavi bir renk tonunun yanmasına veya ışıkların normalden daha parlak görünmesine neden olabilir (bu geçicidir). • Baş dönmesi veya sersemlik hissi. • Düşük kan basıncı. • Sırt ağrısı. • Döküntü.	• Priapizm (istemediğiniz veya cinsel uyarılma olmadan gerçekleşen bir ereksiyon; bunlar en az dört saat sürer) • İşitme kaybı (kısmi veya tam). • Karaciğer hasarı. • Özellikle nitroglicerini kullanan hastalarda şiddetli göğüs ağrısı

2.4.2. PDE4 İnhibitörü Rolipram

Rolipram yaygın olarak depresyon tedavisinde kullanılan bir ilaç olarak bilinir. Monoamin oksidaz inhibitörleri olarak adlandırılan ilaç ailesindendir. Daha iyi bir ruh hali kazandıran ve depresyon semptomlarının hafifletilmesini sağlayan norepineferin salınımını destekler. Rolipram, özellikle PDE 4B alt tipi olmak üzere, fosfodiesteraz 4'ün seçici bir inhibitörüdür. Çoğu PDE4 inhibitörü gibi antienflamatuar ilaçtır. Rolipram daha çok antidepresan etkisi ile bilinmektedir; ancak antienflamatuar, immünosupresif ve anti-tümör etkileri de vardır (160). Rolipram ayrıca multipl skleroz tedavisinde de kullanılmaktadır (161).

Bu fosfodiesterazlar, özellikle sinir ve bağışıklık hücrelerinde cAMP ve cGMP siklik nükleotitlerinin hidrolizinden sorumludur. Rolipramın neden olduğu hücre içi cAMP'nin artmasının ile merkezi noradrenerjik iletimi artıran ve proinflamatuar sitokinlerin ve diğer enflamasyon araçlarının ekspresyonunu baskılayan norepinefrin sentezi ve salınımının artar. Çalışmalar gösteriyor ki; rolipram insanlarda ve hayvanlarda çok çeşitli biyolojik etkiler üretebilir. Bu etkiler, merkezi sinir sistemindeki endojen depresyon ve inflamasyonun hafifletilmesini sağlar.

Rolipram ayrıca çeşitli beyin hasarı modellerinde antienflamatuar ve kan-beyin bariyeri stabilize edici etkiler uygular (162). Özellikle deneysel serebral iskemi oluşturulan kemirgenlerde rolipramın biliş arttırıcı etkileri gösterilmiştir (163). Sasaki ve ark. (164) geçici global serebral iskemiye maruz kalan farelerde rolipramın hücre ölümünü azalttığını ve yeni doğan hipokampal nöronların hayatta kalmasını arttırdığını rapor etmişlerdir.

Mevcut kısıtlı çalışmalar, sildenafil ve rolipramın bifosfanatlar üzerine tedavi edici etkilerinin bulunabileceğine işaret etmektedir. Böylelikle, bu tez çalışmasında deneysel bifosfanat modeli oluşturulmuş farelerde sildenafil ve rolipramın etkileri araştırılmıştır.



3. MATERYAL METOT

Bu çalışmanın araştırma protokolü için Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hayvan Deneyleri etik kurulundan 24/08/2021 tarih ve 49533702/102 sıra numarası ile onay alınmıştır. Güç analizi sonuçlarına ($\alpha=0.05$, $(1-\beta)=0.80$) göre her bir grup için 10 tane olmak üzere toplam 30 fare gerektiği belirlenmiştir. Çalışmada 64 haftalık, ortalama 35-45 gram ağırlığında 30 tane balb-c cinsi dişi fare kullanılmıştır. Tüm fareler Pamukkale Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir (Resim 3.1). Farelerin seçiminde genel sağlık durumu, daha önce herhangi bir araştırmada kullanılmamış olması gibi şartlara dikkat edildi. Farelerin uygun koşullarda transfer sürecinin ardından yeni yaşama koşullarına adaptasyonu için denekler uygun nem (%30-40) ve sıcaklık (24°C) koşullarında, 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsü altında standart polikarbonat kafeslerde tutulmuştur. Her bir kafese 10 fare yerleştirilmiş ve tüm farelere yem paletler toz haline getirilip su ile ıslatılarak verilmiştir. Ayrıca farelerin rutin su tüketimini devam ettirmeleri sağlanmıştır.



Resim 3.1. Pamukkale Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen balb-c cinsi dişi fareler

3.1. Gruplar Ve Araştırma Protokolü

Araştırmanın başlangıcında 30 deney hayvanı rastgele her grupta 10 fare olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır (Tablo 3.1). Gruplar ve uygulanan deneysel protokoller aşağıdaki gibidir:

Grup 1 (kontrol = ZA): Bu gruptaki farelere 8 hafta boyunca haftada iki kez 0.2 mg/kg zoledronik asit ve 10mg/kg deksametazon intraperitoneal uygulanmıştır. 8. hafta sonunda sol üç santral diş çekilmiştir. (n=10)

Grup 2 (ZA+ROL): Bu gruptaki farelere 8 hafta boyunca haftada iki kez 0.2 mg/kg zoledronik asit ve 10mg/kg deksametazon intraperitoneal uygulanmıştır. 8. hafta sonunda sol üç santral diş çekilip 4 hafta boyunca, haftada beş kez, günlük 20 mg/kg rolipram intraperitoneal uygulanmıştır. (n=10)

Grup 3 (ZA+SDF): Bu gruptaki farelere 8 hafta boyunca haftada iki kez 0.2 mg/kg zoledronik asit ve 10mg/kg deksametazon intraperitoneal uygulanmıştır. 8. hafta sonunda sol üç santral diş çekilip 4 hafta boyunca, haftada beş kez, günlük 12 mg/kg sildenafil oral gavaj yöntemiyle uygulanmıştır. (n=10)

Tablo 3.1. Deney grupları ve uygulanan işlemler

GRUPLAR	UYGULANAN PROTOKOLLER	Denek sayısı
Grup 1 (Kontrol = ZA)	8 hafta boyunca haftada iki kez intraperitoneal 0.2 mg/kg zoledronik asit + 10mg/kg deksametazon 8. Hafta sonunda sol üç santral diş çekimi	10
Grup 2 (ZA + ROL)	8 hafta boyunca haftada iki kez 0.2 mg/kg zoledronik asit + 10mg/kg deksametazon 8. hafta sonunda sol üç santral diş çekimi - Çekimi takiben 4 hafta boyunca, haftada beş kez, günlük 20 mg/kg intraperitoneal rolipram	10
Grup 3 (ZA + SDF)	8 hafta boyunca haftada iki kez 0.2 mg/kg zoledronik asit + 10mg/kg deksametazon 8. hafta sonunda sol üç santral diş çekimi - Çekimi takiben 4 hafta boyunca haftada beş kez, günlük oral 12 mg/kg sildenafil	10

	1.HAFTA	2. HAFTA	3. HAFTA	4. HAFTA	5. HAFTA	6. HAFTA	7. HAFTA	8. HAFTA	9. HAFTA	10. HAFTA	11. HAFTA	12. HAFTA
Grup 1 (kontrol): Bu gruptaki farelere 8 hafta boyunca haftada iki kez 0.2 mg/kg zoledronik asit ve 10mg/kg deksametazon intraperitonel uygulandı.8. haftada diş çekimi yapıldı.												
ZA												
Grup 2 (zoledronik asit + rolipram): Bu gruptaki farelere 8 hafta boyunca haftada iki kez 0.2 mg/kg zoledronik asit ve 10mg/kg deksametazon intraperitonel uygulandı. Daha sonra diş çekilip 4 hafta boyunca haftada beş kez günde 20 mg/kg rolipram intraperitonel uygulandı.												
ZA												
ROL												
Grup 3 (zoledronik asit + sildenafil): Bu gruptaki farelere 8 hafta boyunca haftada iki kez 0.2 mg/kg zoledronik asit ve 10mg/kg deksametazon intraperitonel uygulandı. Daha sonra diş çekilip 4 hafta boyunca haftada beş kez günde 12 mg/kg sildenafil oral gavaj ile uygulandı.												
ZA												
SDF												

3.2. Zelodronik Asit Ve Deksetazon Uygulama Protokolü

İlaç uygulaması öncesi farelerin ağırlıkları tartılarak kayıt altına alındı ve her bir denek için uygun ilaç dozu hesaplandı. Grup 1, grup 2, grup 3 teki tüm farelere 8 hafta boyunca, haftada 2 kez, 0.2 mg zoledronik asit (Zometa, İ.V. 4 Mg 1 Flakon Novartis, ABD) ve 10mg/kg deksametazon (Dexamethasone®, 4mg/ml, IV, Mylan, ABD) intraperitenal olarak uygulandı. Her ilaç uygulaması öncesinde hayvanların ağırlıkları yeniden ölçülerek uygulanacak dozlarda standardizasyon sağlandı.

3.3. Diş Çekimi Ve Post-Operatif Bakım

Hayvanlara 10-20 mg/kg xylazine (Rompun 2%, Bayer, İstanbul, Turkey) ve 50 mg/kg Ketamin HCl (Ketalar, Eczacıbaşı-Warner Lambert, İstanbul, Turkey) kullanılarak genel anestezileri sağlandı (Resim 3.2). Genel anestezi sağlandıktan sonra diş çekimi yapılacak bölgede post-operatif ağrı ve kanama kontrolü sağlamak için %2'lik lidokain hidroklorid (1/100.000) epinefrin içeren) kullanarak lokal anestezi yapıldı. Hayvanlar sırt üstü yatırıldı. Steril aletler ile ağız açıldıktan sepsi-asepsi koşullarına dikkat edilerek sol üst santral diş çekim işlemine geçildi. Kesici dişler ve çevresi povidon iyot ile temizlendikten sonra sol üst kesici diş PT2 (Hu-Friedy) periotom ile özel modifikasyonlar ve forseps kullanılarak çekim yapıldı. Tüm diş çekimleri tecrübeli tek bir cerrah tarafından yapıldı. Çekimlerin mümkün olduğu kadar atravmatik olmasına ve yumuşak doku yaralanmalarına neden olmamasına özen gösterildi. Ardından ucunda 0.5 mm çapında rond frez takılı klinik piyasemen 1500 rpm devirde kullanılarak çekim bölgesinde defekt oluşturuldu. Tüm çekim soketlerinde benzer büyüklük ve lokalizasyonda defektler aynı cerrah tarafında oluşturuldu (Resim 3.3).



Resim 3.2. Genel anestezi de kullanılan Xylazine ve Ketamin HCl



Resim 3.3. Farelerde diş çekimi gerçekleştirilmesi

Çekimi ve defekt oluşturma prosedürünü takiben ağıza kanama kontrolü sağlamak için çekim bölgesine steril gazlı bez ile tampon uygulandı. Tampon yeterli süre yapıldıktan sonra ve kanama kontrolünün sağlandığından emin olunduktan sonra

gazlı bez atılarak ilave bir işlem yapılmaksızın yara yeri iyileşmeye bırakıldı. Çekim sonrası farelerin rutin yemek tüketim alışkanlıklarını devam ettirebilmeleri için yemler toz haline getirilip su ile ıslatıldıktan sonra farelere verildi.

Araştırma protokolleri hem dış çekimi yapılmadan sadece ilaç uygulanan kontrol grubu tarafından hem de dış çekimi ve farklı ilaç protokollerinin birlikte uygulandığı deney grupları tarafından iyi tolere edildi. Deney süresince hiçbir grupta herhangi bir fare ölümü gözlenmedi.

3.4. Sildenafil Uygulama Protokolü

İlaç uygulaması öncesi farelerin ağırlıkları tartılarak kayıt altına alındı ve her bir denek için uygun ilaç dozu hesaplandı. Grup 3 teki tüm farelere 8. haftadaki dış çekimini takiben Sildenafil citrate (GP3242-1G ChemPUR) 4 hafta boyunca verildi. Her ilaç uygulaması öncesinde hayvanların ağırlıkları yeniden ölçülerek uygulanacak dozlarda standardizasyon sağlandı.

. Grup 3' teki farelerin ağırlıkları göz önünde bulundurularak uygun konsantrasyonda günlük olarak hazırlanan bu çözeltiler bir enjektör yardımıyla günlük 1' er cc olacak şekilde oral gavaj yoluyla farelere verilmiştir. Bu protokol 4 hafta boyunca, hafta da 5 kez, 12mg/kg sildenafil sitrat salinde çözündürülerek uygulandı.

3.5. Rolipram Uygulama Protokolü

İlaç uygulaması öncesi farelerin ağırlıkları tartılarak kayıt altına alındı ve her bir denek için uygun ilaç dozu hesaplandı. Grup 2 teki tüm farelere 8. haftadaki dış çekimini takiben Rolipram (M02441-250MG ChemPUR) 4 hafta boyunca verildi. Her ilaç uygulaması öncesinde hayvanların ağırlıkları yeniden ölçülerek uygulanacak dozlarda standardizasyon sağlandı.

Grup 2' teki farelerin ağırlıkları göz önünde bulundurularak 4 hafta boyunca haftada beş kez günde 20 mg/kg rolipram DMSO da çözündürülerek intraperitonel uygulandı.

3.6. Sakrifikasyon Protokolü

Tüm fareler 12 haftalık araştırma protokolünün sonunda yüksek doz sodyum pentobarbiton verilerek sakrifiye edildi. Farelerin kafaları mandibuladan ayrıldıktan sonra her bir fareye ait örnek içinde % 10'luk formal solüsyonu kaplara ayrı ayrı konuldu. Tüm örnekler gerçek zamanlı *PCR* ve Western Blot analizleri için Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na gönderildi. Histolojik analizler için ise %10'luk formalin solüsyonu içerisinde saklanmıştır.

3.7. Farelerle İlgili Yapılan Gözlemsel Değerlendirmeler

Tüm denek hayvanları iki güne bir yapılan ağız içi muayenelerle dil ve dudakta irritasyon olup olmadığı değerlendirilmiştir. Ayrıca günlük gıda tüketiminde bir azalma olup olmadığı haftalık yapılan kilo ölçümleri ile yakından takip edilmiştir.

3.8. Histopatolojik İnceleme

Farelerden alınan maksilla dokuları %10 nötral formalin içerisinde fikse edildi. Ardından dekalsifikasyon işlemi uygulandı ve bir gece akar su altında yıkandı. Rutin histolojik takibe alınan dokular parafin içerisine transvers düzlemde parafin içerisine gömüldü. Parafin bloklardan histokimyasal boyama için klasik, immunohistokimyasal boyama için pozitif şarjlı lamlara 5µ'luk kesitler alındı. Deparafinize edilen kesitler genel histolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin ile, immunohistokimyasal olarak da VEGF primer antikoruyla boyanarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

Hematoksilen Eozin boyaması

Kesitler parafinin giderilmesi için 1 gece etüvde ardından 1 saat ksilende bekletildi. İnen etil alkol serilerinden (%100- %70) geçirilip, distile suya alındı. Hematoksilende 3 dk. bekletildi. Çeşme suyunda 10dk. Yıkandı Eozinde 1 dk boyandı. Distile suya alındı. Yükselen alkol serilerinden (%70-%100) geçirildi. Ksilenden geçirilerek entellan ile kapatıldı ve daimi preparat hazırlandı. Işık mikroskobu (Eclipse E-600 Nikon, Japonya) altında değerlendirme yapıldı. Histopatolojik değerlendirme için iyileşme ve osteonekroz parametreleri kullanıldı. Değerlendirmede kan pıhtısı, inflamatuvar infiltrat, kan damaları, osteositler ve boş

laküna parametreleri kullanıldı. Gruplarda kan pıhtısı ve inflamatuvar infiltrata rastlanmadığı için değerlendirme yapılamadı. 20x objektif altında alveolar socketin rastgele seçilen 3 farklı alanında kan damarları, osteositler ve boş lakünalar sayıldı. Ardından istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.9. İmmunohistokimyasal Yöntem Ve Değerlendirme

İmmunohistokimyasal boyamalar için ksilenden geçirilerek suyu giderilen kesitler Sitrat Tampon solüsyonuyla antijen açığa çıkarma işlemine tabi tutuldu. Ardından soğumaya bırakılan kesitler PBSle yıkandıktan sonra %3'lük H₂O₂ ile muamele edilerek endojen peroksidaz maskelenmesi sağlandı. Tekrar PBSle yıkanan kesitler Blocking Solüsyonuyla muamele edildi. Ardından VEGF (Anti-VEGF, sc7269, Santa Cruz Biotechnology, 1/100 dilüsyon), primer antikoru damlatılarak +4 °C'de buzdolabında 1 gece beklemeye bırakıldı. . Ertesi gün PBS ile iyice yıkandıktan sonra sekonder antikor olarak HRP kit (Large Volume Anti-polyvalent HRP, Thermo Scientific) uygulandı. Bu amaçla kit içinde yer alan Biotin ile işaretli sekonder antikor (Biyotinylated Goat Anti-Polivalent) ile 10 dk muamele edildi. PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra ve 10 dakika Streptavidin-Peroksidazda bekletildi. PBS'te 4 kez yıkandı ve renklendirme basamağına geçildi. Kesitlere AEC (3, aminoetil 9, karbozol) kromojeni damlatılarak reaksiyon gözlemlendi. Kesitlere Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama uygulanarak aköz kapama solüsyonuyla kapatıldı. Ardından araştırma mikroskobu altında immunreaktivite değerlendirmesi yapıldı.

İmmunohistokimyasal boyanmanın değerlendirmesi yapılırken x400 büyütme altında rastgele seçilen alanlarda en az 100 hücre işaretlendi. Her kesitte, boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin kriter olarak alındığı semikantitatif bir yöntemle, immünohistokimyasal boyama skorlaması yapıldı. Değerlendirmeler, 0 (boyanma yok), +1 (zayıf boyanma), +2 (belirgin), +3 (yoğun) olarak belirtilen dört yoğunluk kategorisinin her birinde tüm tiplerdeki pozitif boyanan hücrelerin yüzdeleri olarak kaydedildi. H-skoru adı verilen bir puanlama formülü kullanıldıktan sonra istatistiksel olarak analizi yapıldı.

$$HSCORE = S (I+1) \times (PC)$$

(S:toplam, I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi)

3.10. Biyokimyasal Değerlendirme

Örnek Alımı

Farelerden kan örnekleri 2 ml'lik EDTA içeren BD Vacutainer marka tüplere (Becton Dickinson, Canada) alındı. Kan alımını takiben 2000 g'de +4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan plazma örnekleri eppendorf tüplerine ayrılarak testler çalışılncaya kadar Nuaire marka ultra soğutucuda -85 °C'de saklandı (Nuaire Incorporated, USA) . Çalışılmadan önce plazma örnekleri oda ısısına getirildi.

3.11. Gen İfadesi Değerlendirmesi

TaqMan Gen Ekspresyonu Tahlilleri *PCR* yoluyla hedef genlerin varlığını değerlendirmek için *RT-PCR* prob sistemi kullanıldı. *PCR* amplifikasyonu bir termaldöngüleyici (QuantStudio™ 5 Digital ThermoFisher Scientific CA, ABD) içinde gerçekleştirildi.

3.12. Rna Ekstraksiyonu Ve Saflaştırılması

Toplam RNA, üreticinin talimatlarına göre PureLink®RNA Mini Kit Invitrogen kiti (Carlsbad, Ca. 92008. ABD) ile ekstre edildi. Muameleden sonra kültür ortamı toplandı ve hücreler ile birlikte kitosan ve ksantan membran, bir kez Fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBS) ile yıkandı. PBS çıkarıldı ve 300 uL lizis tamponu artı %1 p-merkaptoetanol doğrudan plakaya ilave edildi. Hücreler pipetle homojenleştirildi ve 1.5 mL'lik bir konik tüpe aktarıldı, burada %70 etanol (h/h) içinde seyreltildi ve guanidin izotiyosiyanat (toplam RNA'yı tutan) ile bir silika mikro kolona uygulandı ve 12.000 devirde, oda sıcaklığında, 15 saniye süreyle ile santrifüjlendi ve elüsyon atıldı. Daha sonra mikro sütun 700 uL yıkama tamponu I (Yıkama Tamponu I) ile yıkandı ve iki kez 500 uL yıkama tamponu II (Yıkama Tamponu II) ile yıkandı. Her yıkama adımını, 12.000 g'de 2 dakikalık santrifüjlemeden sonra 10.000 g'de 15 saniyelik bir santrifüjleme izledi, mikro sütuna

yapıştırılan saflaştırılmış RNA, RNA'lar ve DNA'lar içermeyen ultra saf su ile 20 μ L'de ayrıştırıldı. RNA örnekleri; DNase I, Amplifikasyon Derecesi (Invitrogen) kullanılarak kalan genomik DNA'dan arındırıldı. Bunu yapmak için 16 μ L numune, 2 μ L DNase I Tampon ve 2 μ L DNase I, Amplifikasyon Derecesi (1 birim/ μ L) ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Toplam RNA, tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için RNA'nın konsantrasyonunu ve saflık derecesini NanoDrop spektrofotometresi (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak ölçüldü.

3.13. Tamamlayıcı Dna (cDNA) Sentezi

cDNA, SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, ABD) ile sentezlendi.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

- RT-PCR reaksiyonunun endojen kontrolü olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (*Gapdh*) kullanıldı.
- RT-PCR reaksiyonu, TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- TaqMan™ Gen Ekspresyon Testlerinin (Applied Biosystems™) etkinliğini değerlendirmek için, her TaqMan için aynı konsantrasyonda (1 μ L) farklı cDNA konsantrasyonları (25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng, 3.12 ng ve 1.56 ng) kullanıldı.
- Cts ve başlangıç cDNA konsantrasyonları, daha yüksek konsantrasyonların orantılı olarak daha düşük Ct değerleri üretmesi gereken bir verimlilik eğrisi geliştirmek için kullanıldı. Verim eğrileri elde edildikten sonra optimum konsantrasyon olarak 6.25 ng belirlendi.
- Her reaksiyon için 6.25 ng cDNA, 5 μ L TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™), 1 μ L TaqMan ve RNase içermeyen su, 10 μ L'lik son hacme ilave edildi. Tüm reaksiyonlar üç kopya halinde gerçekleştirildi.
- Reaksiyon hazırlandıktan sonra QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems™) kullanıldı. Amplifikasyon döngüsü, 10 dakika boyunca 95°C, ardından 15 saniye boyunca 95°C, 1 dakika için 60°C ve 30 saniye için 72°C'lik 40 döngüden oluşuyordu. Ayrışma eğrisi 1 döngü 95°C 1 dakika,

60°C 30 saniye ve 95°C 30 saniye ile yapılmıştır. Tüm örneklerin karşılaştırılabileceği Ct eşiğini geçen döngü sayısı, oluşturulan amplifikasyon eğrilerinden belirlendi. Söz konusu genlerin analizinden elde edilen sonuçların referans gen - *Gapdh* ile karşılaştırıldığı bu değerlerle bağlı niceleme yöntemi kullanıldı. Bu şekilde, mRNA'nın keyfi seviyeleri, gösterge (kontrol grubu) ile ilgili olarak "n" kerelik bir fark olarak ifade edildi. Göreceli gen ekspresyonu, 2- $\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılarak hesaplandı.

- Burada: Ct: söz konusu amplifiye gen miktarının sabit bir eşiğe ulaştığı döngü sayısını gösterir; Ct'nin sayısal değeri ne kadar düşükse, hedeflenen kopyaların sayısı o kadar hızlı olur.
- Farelerin maksillasından alınan ve biyokimyasal incelemeler için ayrılan doku örnekleri Eppendorf tüplere konuldu ve hızlı bir şekilde -20°C' lik ortama taşındı.
- Örnekler; doku homojenizasyonu yapıldı kadar -80°C' de muhafaza edildi.
- Doku analizleri için -80°C'den çıkarılacak örneklerin çözülmesi beklendi.
- Daha sonra serum fizyolojik içinde (%20 w/v) homojenize edildi.
- Elde edilen doku homojenatları 5000 devir/dakika'da, 30 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant kısımları biyokimyasal analizler için kullanıldı.

Çalışmada analizi yapılan parametrelerden CTX (C-terminal Telopektid) ve BALP (Kemiğe spesifik alkalen fosfat) seviyelerine bakılacaktır. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time-PCR) yöntemi ile Gen İfadelerinin IL-6, IL1B (interlökin 1 beta), TGF α (Transforme Edici Büyüme Faktör Alfa), RANK, Ctsk (Katepsin K), RANKL, Opn (Osteopontin), Bmp (kemik morfogenetik protein), Nfatc1 (Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü 1), TGF- β , VEGF A, TRAP (Tartarata dirençli asit fosfat), Osteokalsin, OPG (Tablo 3.2) belirlenirken şu aşamalar takip edildi:

Tablo 3.2. qRT-PCR yöntemiyle mRNA ekspresyonu belirlemesi için kullanılan primer dizileri

Gen	İleri Primer Dizi (5' → 3')	Ters Primer Dizi (3' → 5')	
IL-6	GTCCTTCCTACCCCAATTCC	TGCCGAGTAGATCTCAAAGTG	
IL-1B	GCCACCTTTTGACAGTGATG	CACGGGAAAGACACAGGTAG	
TGFα	TAGGTTGAGACAAGTCCGGT	TCAACTGTACTGCCCTCTGA	
RANK	CATCCCTTGCAGCTCAACAA	GAGCAGAACGATGAGACTGG	
Ctsk	GGATGAAATCTCTCGGCGTT	GTCCCGTCATCTTCTGAACC	
Opn	TGACGATGATGATGACGATGG	TGGCTATAGGATCTGGGTGC	
Nfatc1	AGTGAGCTGAGAGGAGGTTT	AGATATACACCCCAGACCG	
TGB	GATGTTCTCTCGTTCTGTCTCA	TCACTGCACTGAAGAGGCTG	
VEGFA	CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG	GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC	
TRAP	ACCAGCAAGGATTGCGAGGCAT	GGATGACAGACGGTATCAGTGG	
Osteocalcin	GCAATAAGGTAGTGAACAGACTCC	CCATAGATGCGTTTGTAGGCGG	
OPG	CAATGGCTGGCTTGGTTTCATAG	CTGAACCAGACATGACAGCTGGA	
GAPDH	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT	

3.14. Western Blot Teknik Uygulama Protokolü

Bu teknikte sırasıyla aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir:

3.14.1. Örnek Hazırlamak

Numuneler 20-50 μ l 1X numune tamponu içinde yeniden süspanse edildi. Elde edilen karışımlar, peptitler arasındaki etkileşimleri parçalamak için 90°C'de beş dakika veya 50°C'de 15 dakika inkübe edildi.

3.14.2. Protein Konsantrasyon Tayini

Bradford test yöntemi (Bio-Rad Protein Testi), her numunedeki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanıldı. Elde edilen okuma, protein konsantrasyonunun nispi bir ölçümüne izin veren standart bir eğri (bu eğri; değişen konsantrasyonlarda sığır serum albümini (BSA) kullanılarak üretilir) ile karşılaştırıldı.

3.14.3. SDS-PAGE

SDS-PAGE (proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kullanılan elektroforez yöntemi) , Mini-PROTEAN III elektroforez sistemi (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirildi.

- Numuneler, bir protein merdiveni ile birlikte %8, 10 veya %12 poliakrilamid jellere yüklendi ve parçalara ayrıldı.
- Jeller, bromofenol mavi boyası jelin dibine ulaşana kadar çalışan tamponda (%3 Tris-HCl, %14.4 glisin, %1 SDS) 100 ila 150 V arasında elektroforezlendi
- Jeller PVDF (polyvinylidene difluoride) membranlarına elektrotransfer edildi.

3.14.4. Western Blot Analizi

- Western blot deneyleri için Mini Trans-Blot Elektroforetik Transfer Hücre sistemi (Bio-Rad) kullanıldı.
- SDS-PAGE tarafından parçalanmış proteinler, poliviniliden diflorür (PVDF) membranlarına elektrotransfer edildi. Transfer, transfer tamponu (192 mM glisin, %20 v/v metanol, 25 mM Tris-HCl, pH 8.3) içinde gerçekleştirildi. Protein transferi, tampon devirdaimi ile 4°C'de 1 saat boyunca 100 V'de gerçekleştirildi. Kalan adımların tümü oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
- Transferden sonra, membranlar bir BSA bloke edici solüsyon (%5 BSA, 150 mM NaCl, %0.05 Tween 20, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) ile bloke edildi.
- Membranlar, TBST (150 mM NaCl, %0.05 Tween 20, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) içinde uygun birincil antikor seyreltiklerinde oda sıcaklığında 1 saat

dikkatlice çalkalanarak inkübe edildi. Primer antikor, üreticinin tavsiyesi izlenerek kullanıldı.

- Membranlar, 3 kez TBST ile 10 dakika yıkandı ve serbest primer antikor uzaklaştırıldı.
- Kolorimetrik saptama için ikincil antikor alkalın, fosfataz konjüge edilmiş alfa-tavşan IgG, oda sıcaklığında 1 saat boyunca TBST içinde uygun seyreltmede membran ile inkübe edildi
- Membran, herhangi bir serbest ikincil antikoru uzaklaştırmak için daha önce olduğu gibi TBST ile yıkandı.
- TBS ile 30 saniyelik ek bir yıkama gerçekleştirildi.
- Antikorlar; alkalın fosfataz tamponu (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris- HCl, pH 9.5) içinde renk geliştirme substratları, nitro mavi tetrazolyum (NBT) ve 5-bromo-4-kloro-3-indolilfosfat (BCIP) eklenerek görselleştirildi. Reaksiyonlar, membranların suda yıkanmasıyla sonlandırıldı.

3.14.5. Kemilüminesans Algılama

- Kemilüminesans saptaması için ikincil antikor, yaban turpu peroksidazla konjüge alfa-fare-IgG, TBST içinde 1:10.000 seyreltmede zar ile 1 saat süreyle inkübe edildi.
- Membran, herhangi bir serbest ikincil antikoru çıkarmak için daha önce olduğu gibi TBST ile yıkandı
- TBS ile 30 saniyelik ek bir yıkama gerçekleştirildi.
- Antikorlar, kemilüminesans geliştirme substratları, Peroxide Buffer ve Luminol/Enhancer solüsyonu (Pierce) 1:1 oranında karıştırıldı. Daha sonra bu karışım membran üzerinde 5 dakika inkübe edilerek görselleştirildi.
- Membran, üreticinin talimatlarına göre bir görüntüleyici kullanılarak hemen tarandı.

3.15. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. Real Time-PCR sonuçları kontrol grubuna göre % değişim olarak verildi. Verilerin analizi için Prism 5.02 GraphPad programı kullanılmıştır. Bütün deneylerde istatistik analiz, One-way ANOVA (nonparametrik) ile eş olmayan gruplar arasındaki farkın

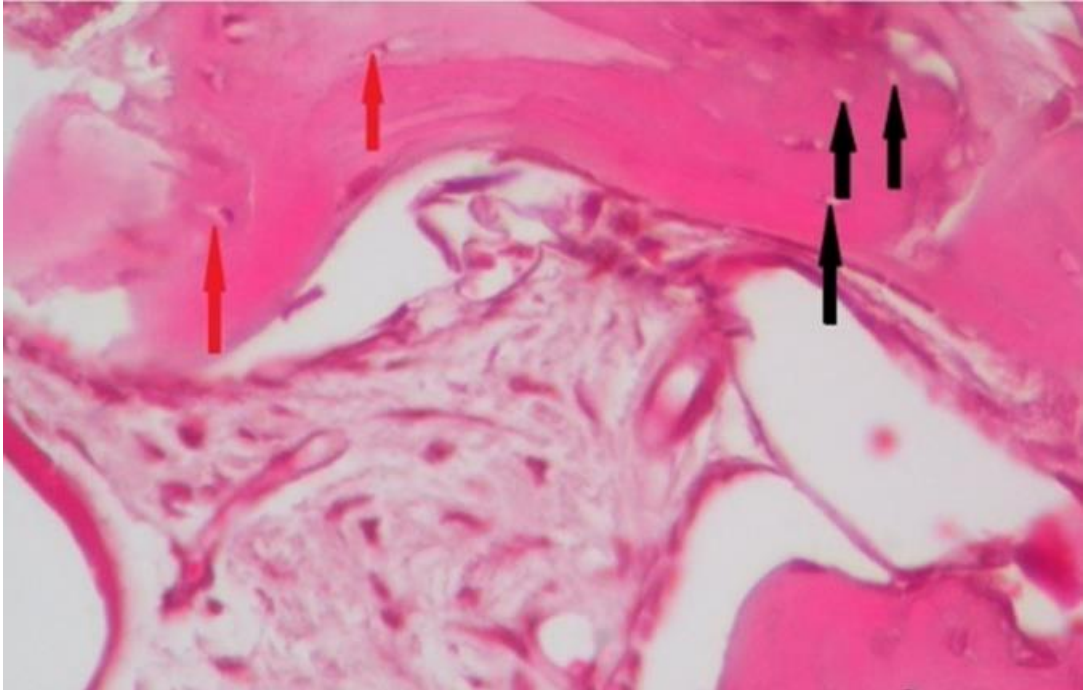
anlamlılığı, *Tukey* testi kullanılarak ölçölmüştür. P değeri 0.05'den küçük ise, bulgu anlamlı olarak değeriendirilmiştir.



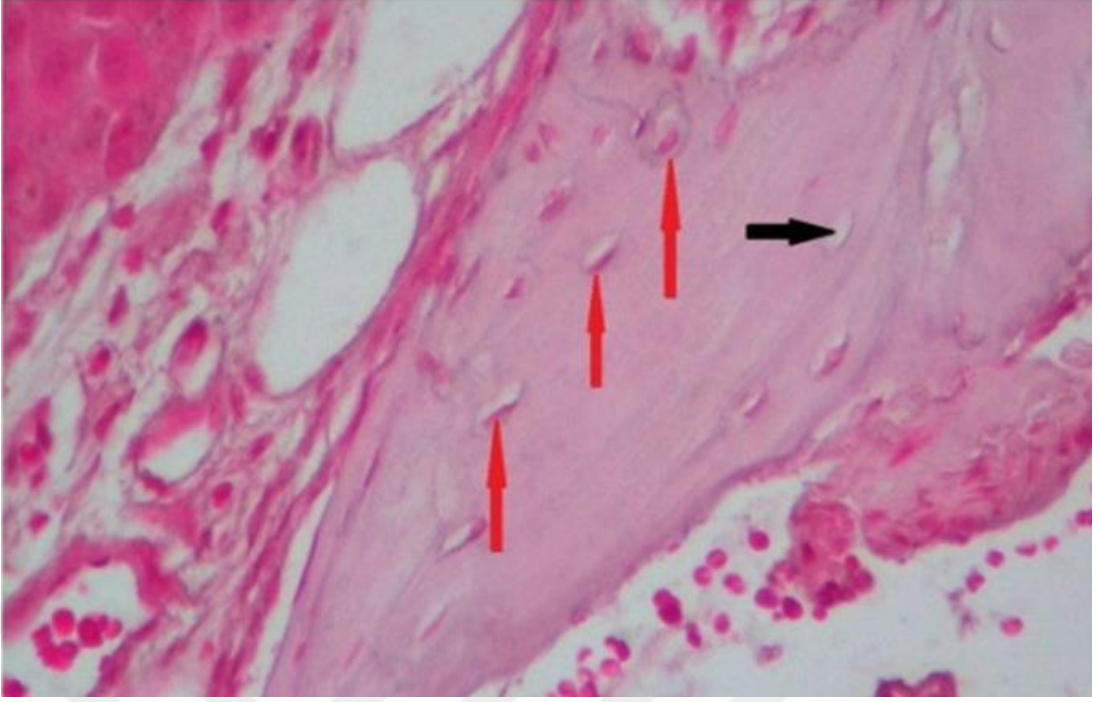
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

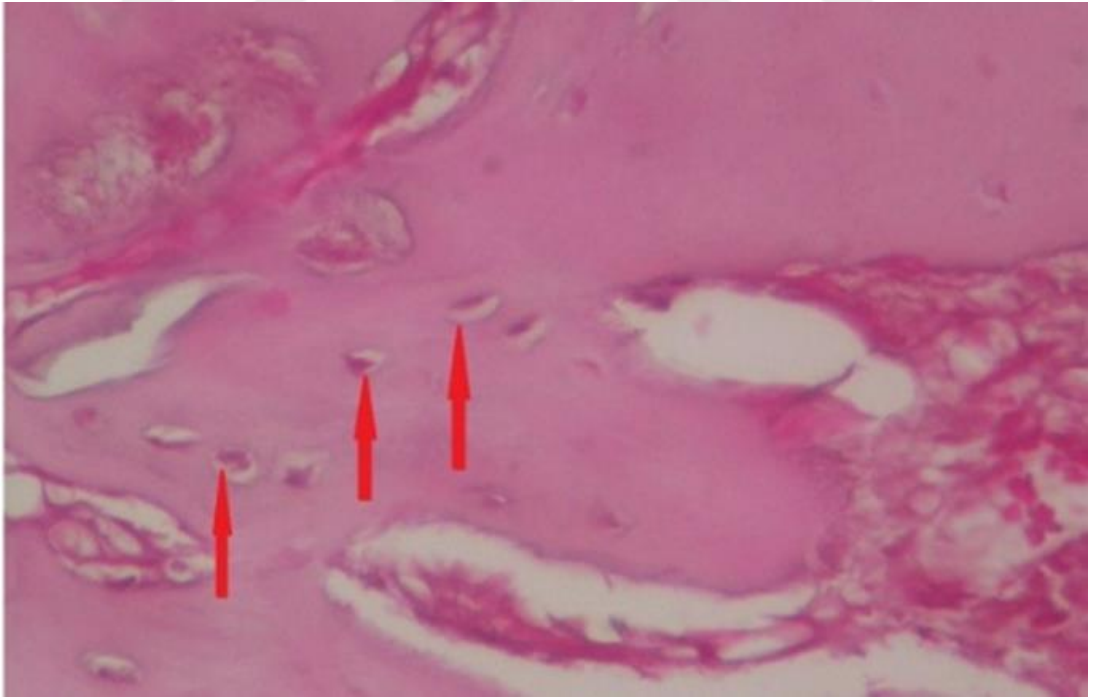
H-E ile boyanmış kesitlerde kontrol grubunda hücre şeklinin bozulduğu ve özellikle de sitoplazmik büzülme dikkat çekicidir. Bununla beraber zoledronik asit + rolipram ve zoledronik asit + sildenafil gruplarında genel olarak iyi organize olmuş bir medulla içinde olgun kemik trabekülleri gözlemlendi. Kontrol grubunda iyileşme sürecinde gecikme olduğu gözlemlendi. Fakat ilginç olarak lökosit infiltrasyonu gözlemlenmedi. Ayrıca, canlı olmayan kemik alanları boş laküna varlığıyla tespit edildi. Kan damarları, osteositler ve boş lakünalar 20x objektif altında rastgele seçilen 3 farklı alanda sayıldı. Gruplardan alınan maksilla dokularının alveolar soket bölgesini içeren Hematoksilen –Eozin boyamaları (x400, scale bar 50 µm) yapılmıştır. Siyah oklar boş lakünaları, kırmızı oklar ise osteositleri göstermektedir. Kontrol grubunda çok sayıda boş laküna olduğu gözlemlenmekle beraber hücre şekil bozuklukları özellikle sitoplazmik büzülme dikkat çekmektedir. (Resim 4.1, 4.2, 4.3)



Resim 4.1. Kontrol grubuna ait histopatolojik görüntüler.



Resim 4.2. Sildenafil grubuna ait histopatolojik görüntüler



Resim 4.3. Rolipram grubuna ait histopatolojik görüntüler

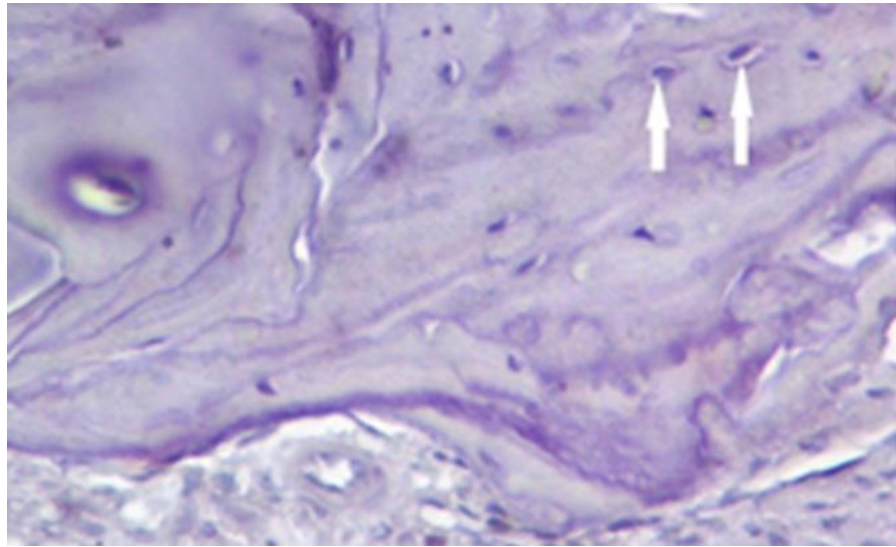
Tablo 4.1. Histolojik incelemeler sonucu çıkan değerler

<i>Gruplar</i>	Kan Damarı Sayısı	Osteosit Sayısı	Boş Laküna Sayısı
<i>Kontrol</i>	7±0.4	54±4.5	23.8±1.2
<i>Rol</i>	12.2±1.1 *	73.2±2 *	19.5±2.5
<i>SDF</i>	17.5±1.8 #	101±7.1 #	11.2±1.9 #

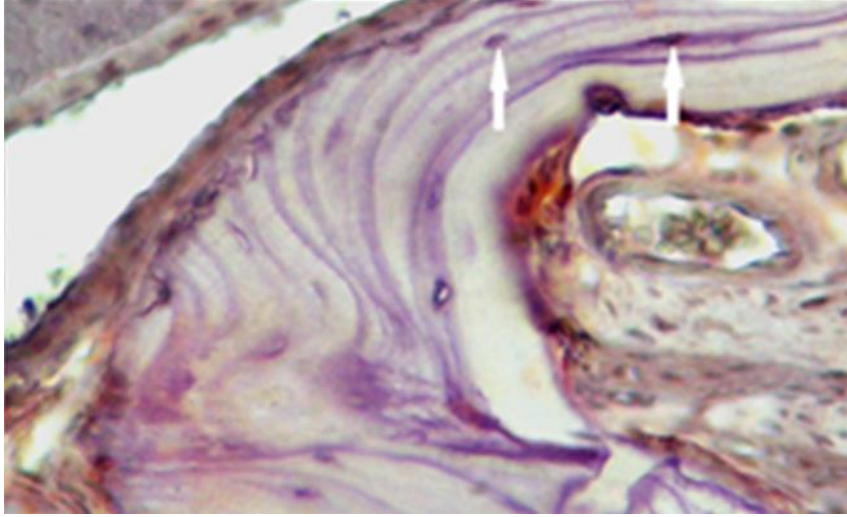
Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=10. * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # $p<0.05$ Rolipram grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

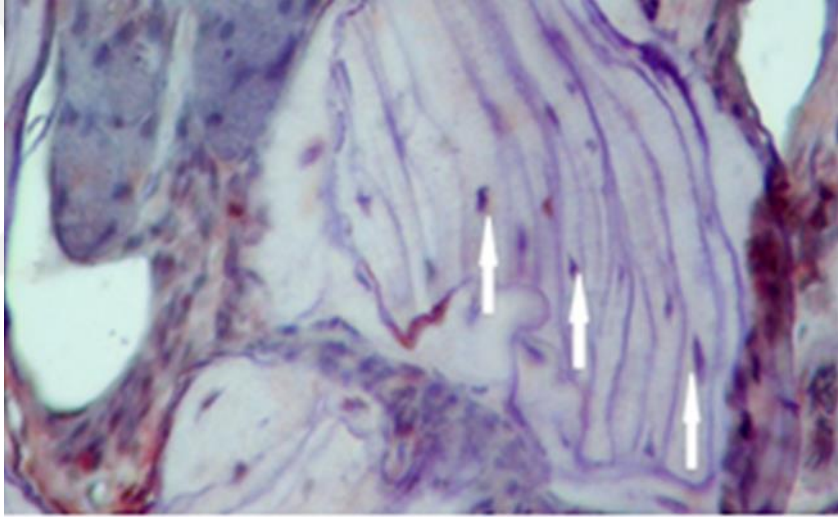
Kan damarlarının oluşumunu uyarıcı bir faktör olan VEGF ekspresyonu immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Gruplardan alınan maksilla dokularının alveolar soket bölgesini içeren kesitlerde VEGF ekspresyonu (x400, scale bar 50 µm) incelenmiştir. Beyaz oklar immunohistokimyasal VEGF boyanmalarını göstermektedir. Kontrol grubunda hem boyanan hücre sayısının hem de boyanma şiddetinin azlığı dikkat çekmektedir. zoledronik asit + rolipram ve zoledronik asit + sildenafil gruplarında ise sayıca ve şiddet olarak değişen derecelerde immunoekspresyon gözlenmektedir (Resim 4.4,4.5,4.6).



Resim 4.4. Kontrol grubuna ait immünohistokimyasal görüntüler.

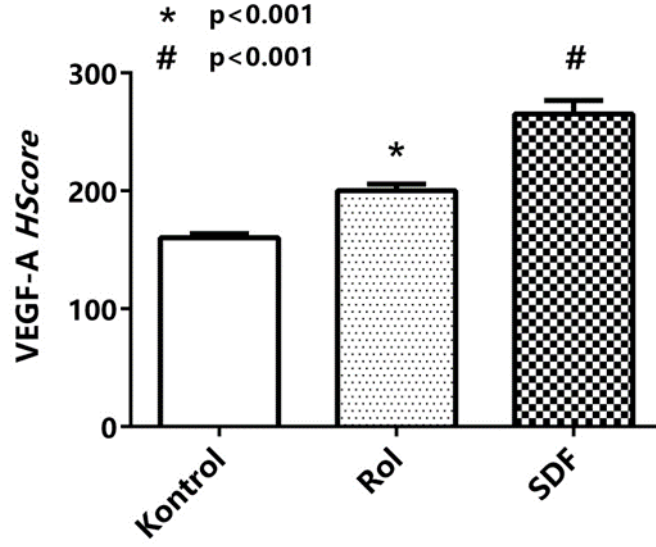


Resim 4.5. Sildenafil grubuna ait immünohistokimyasal görüntüler.



Resim 4.6. Rolipram grubuna ait immünohistokimyasal görüntüler

Maksiller kemikten alınan örneklerde VEGF Hscore değeri rolipram verilen farelerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Sildenafil verilen farelerde bu artış rolipram grubuna göre VEGF Hscore değerinin daha fazla arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1)



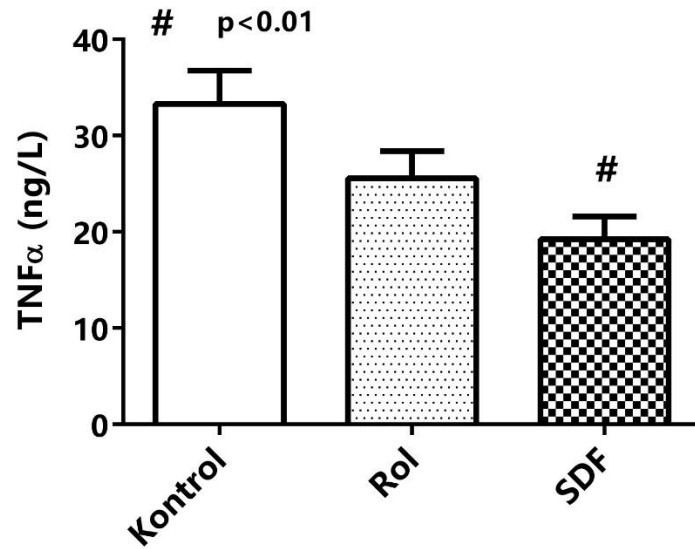
Şekil 4.1. Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında maksiller anterior bölgesi VEGF HScore değerleri.

Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=20. * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # $p<0.05$ Rolipram grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.3. Serumda Biyokimyasal Bulgular

Plazmada TNF α , IL-1, IL17 ve IL-23 ölçümleri BT-LAB marka fare TNF- α , IL-1, IL17 ve IL-23 Elisa kitleri ile yapıldı (BT Lab Bioassay Technology Laboratory, Zhejiang, China). Absorbans okuması ChemWell 2910 marka elisa okuyucu cihazında yapıldı. (Awareness Technology, Inc. Martin Hwy. Palm City, USA). Sonuçlar ng/L olarak verildi.

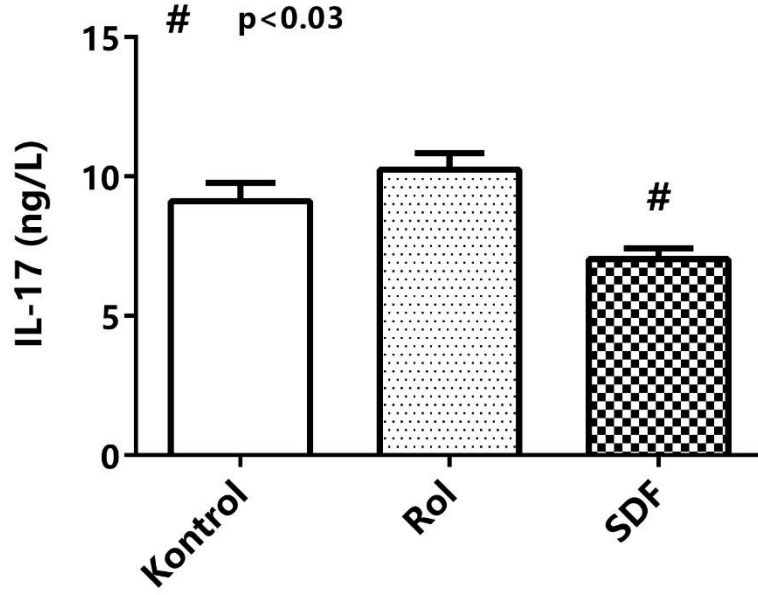
Plazmadan elde edilen örneklerde kontrol grubunda artan TNF α değerinin sildenafil verildikten sonra anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında TNF α değerinin düzeylerinin karşılaştırılması.

Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=10. # $p<0.05$ Kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

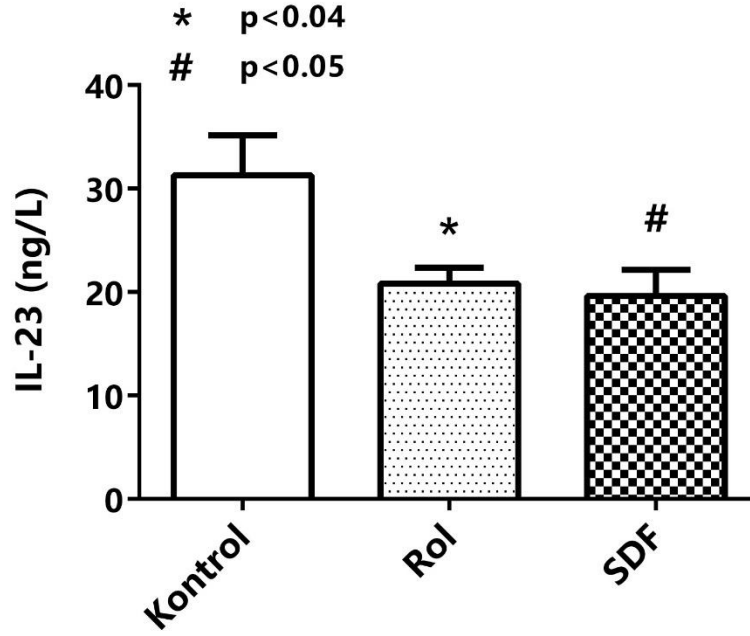
Plazmadan elde edilen örneklerde kontrol grubunda artan IL-17 değerinin Sildenafil verildikten sonra anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.3.de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında IL-17 değerinin düzeylerinin karşılaştırılması.

Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=10. # $p<0.05$ Kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

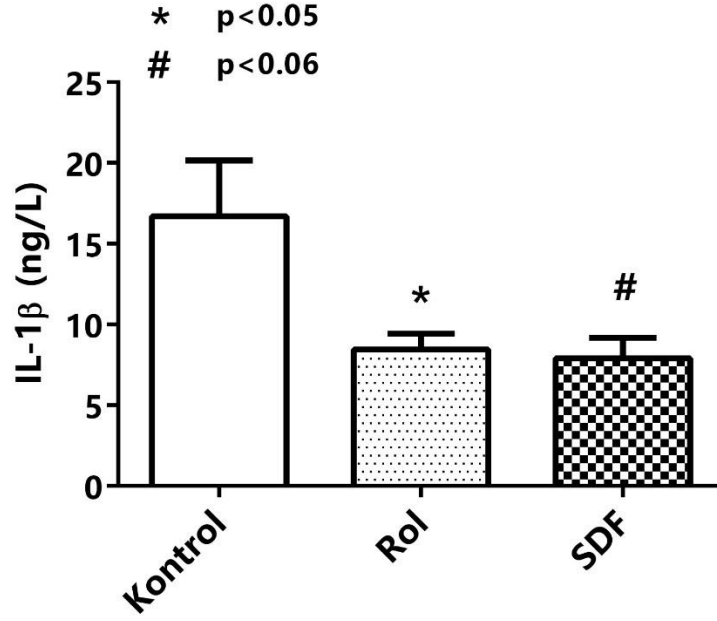
Plazmadan elde edilen örneklerde kontrol grubunda artan IL-23 değerinin Sildenafil ve Rolipram verildikten sonra anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.4. 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında IL-23 değerinin düzeylerinin karşılaştırılması.

Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. $n=10$, * $p < 0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # $p < 0.05$ Rolipram grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Plazmadan elde edilen örneklerde kontrol grubunda artan IL-1 β değerinin Sildenafil ve Rolipram verildikten sonra anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



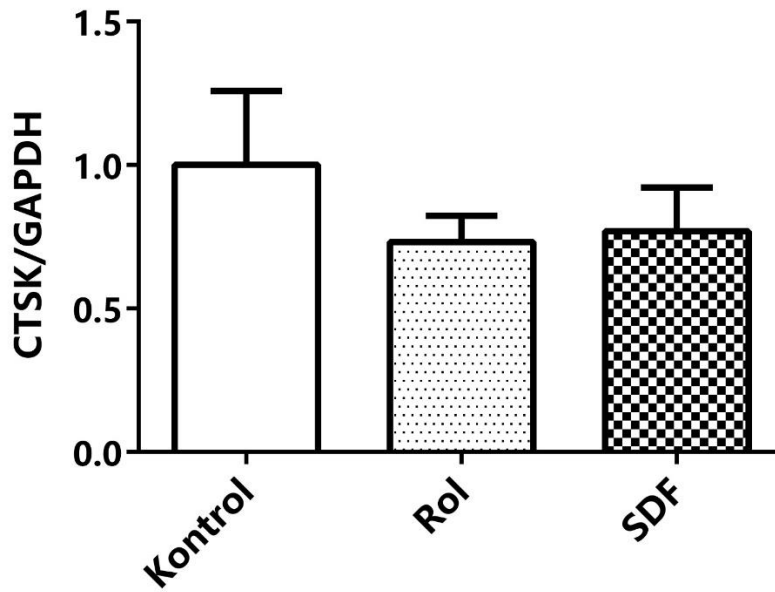
Şekil 4.5. Kontrol, rolipram ve sildenafil gruplarında IL-1 β değerinin düzeylerinin karşılaştırılması.

Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=10, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # $p<0.05$ Rolipram grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.4. Kemik Dokuda mRNA Düzeyleri

Diş çekiminin yapıldığı maksilla anterior bölge örnekleri izole edilerek, Real Time-PCR yöntemiyle CTSK (Şekil 4.6), VEGF (Şekil 4.7), TRAP (Şekil 4.8), TGF α (Şekil 4.9), RANK (Şekil 4.10), OPN (Şekil 4.11), OPG (Şekil 4.12), OCN (Şekil 4.13), NFatc1(Şekil 4.14) IL-6 (Şekil 4.15) ve IL1- β (Şekil 4.16) TGF β (Şekil 4.17) mRNA ekspresyonları ölçülmüştür.

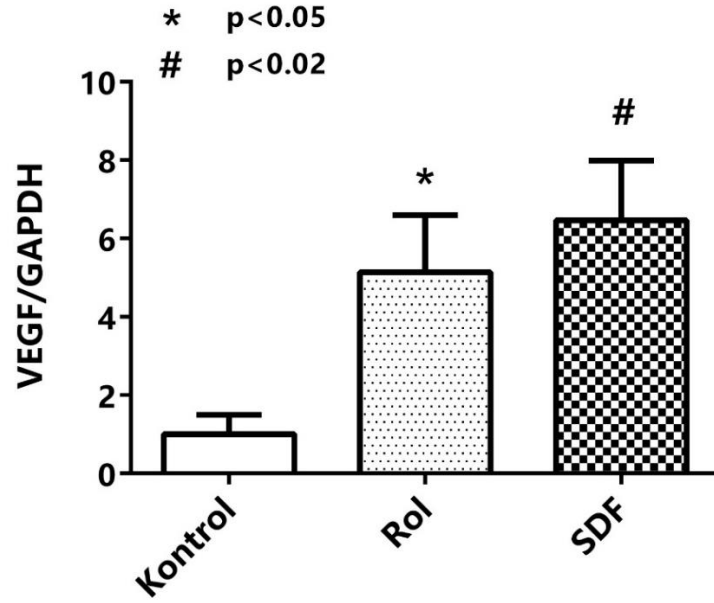
Rolipram grubunda CTSK mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna ve sildenafil grubuna göre azaldığı saptanmıştır. Ancak gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Fosfodiesteraz inhibitörleri verilen gruplar CTSK seviyesi kontrol grubundan daha düşüktür fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.6. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde CTSK mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH'e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=10, * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # p<0.05 kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

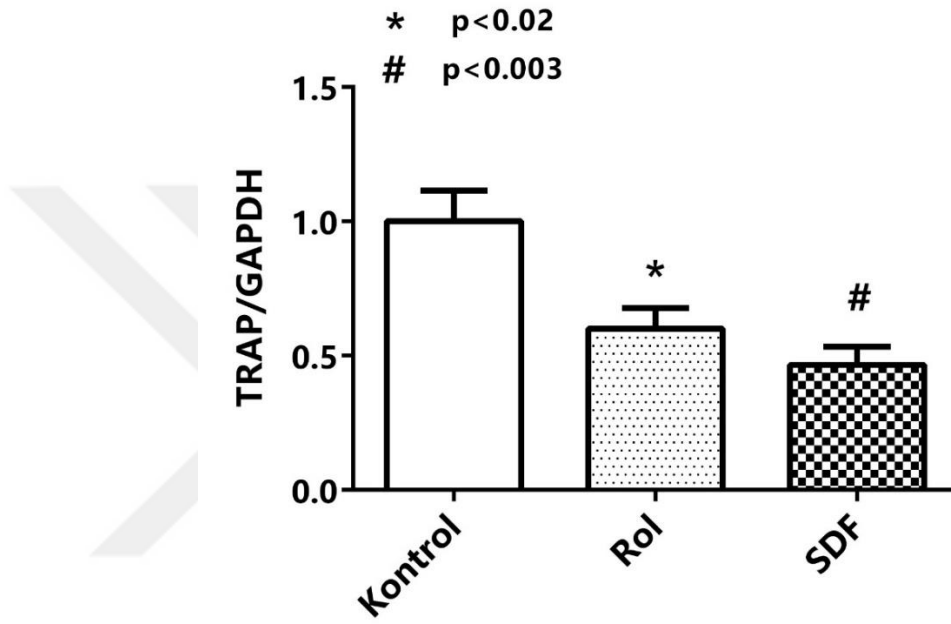
Rolipram grubunda ve sildenafil grubunda VEGF mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Sildenafil grubundaki artış rolipram grubuna göre daha fazladır. Osteonekroz yapılan farelerde fosfodiesteraz inhibitörleri verilmesi VEGF seviyesini anlamlı şekilde artırmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde VEGF mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=8 * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # p<0.05 kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

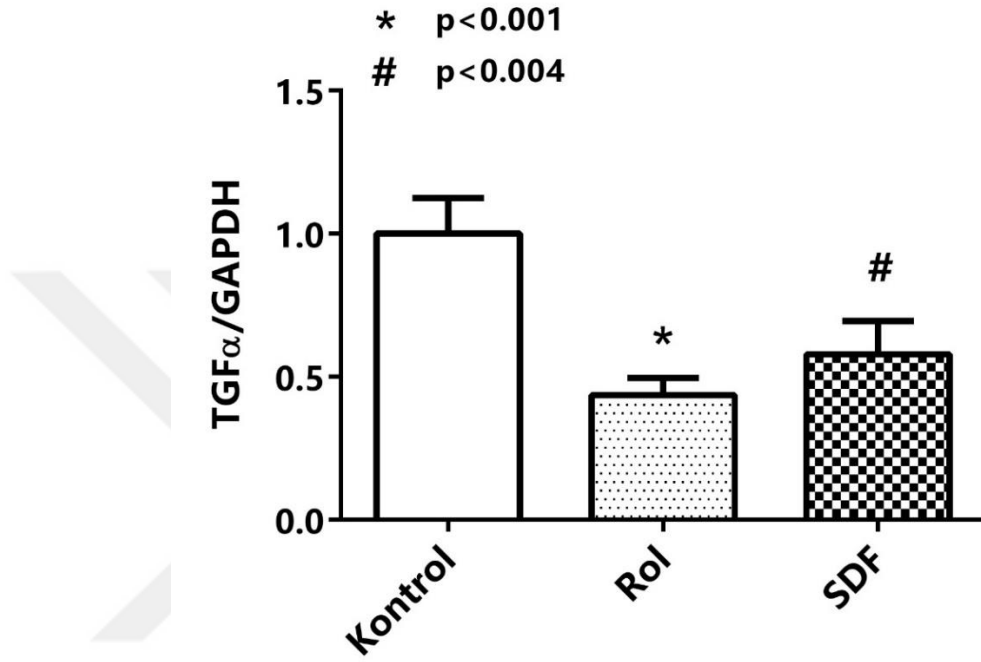
Rolipram grubunda ve sildenafil grubunda TRAP mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Sildenafil grubundaki azalış daha fazladır. Osteonekroz yapılan farelerde fosfodiesteraz inhibitörleri verilmesi TRAP seviyesini anlamlı şekilde azaltmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde TRAP mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=8 * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # p<0.05 kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

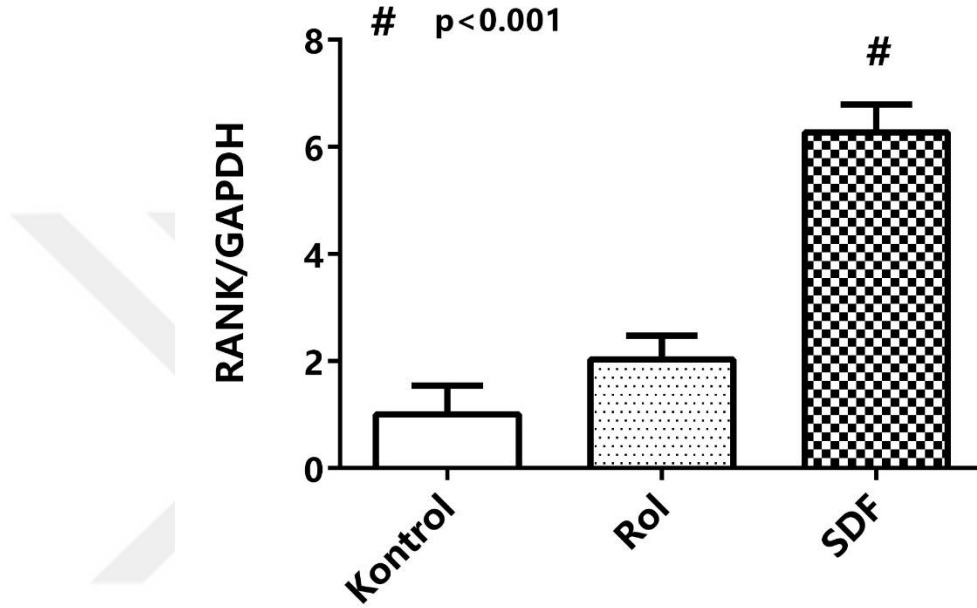
Rolipram grubunda ve sildenafil grubunda TGF α mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Rolipram grubundaki azalış daha fazladır. Osteonekroz yapılan farelerde fosfodiesteraz inhibitörleri verilmesi TGF α seviyesini anlamlı şekilde azaltmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde TGF α mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=8 * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # p<0.05 kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

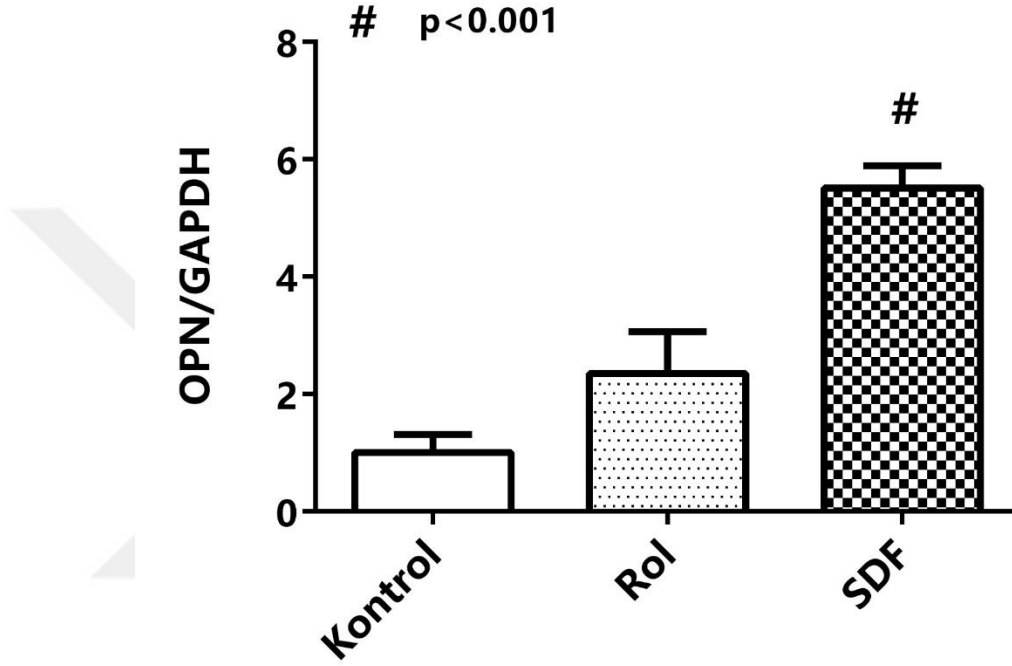
Sildenafil grubunda RANK mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Rolipram grubundada RANK mRNA ekspresyonlarının artış gözlenmede sildenafil grubu kadar belirgin bir artış yoktur. Osteonekroz yapılan farelerde sildenafil verilmesi RANK seviyesini anlamlı şekilde artırmıştır. Fakat rolipram verilen farelerde RANK artışı anlamlı değildir. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.10’da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde RANK mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=8 * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # p<0.05 kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

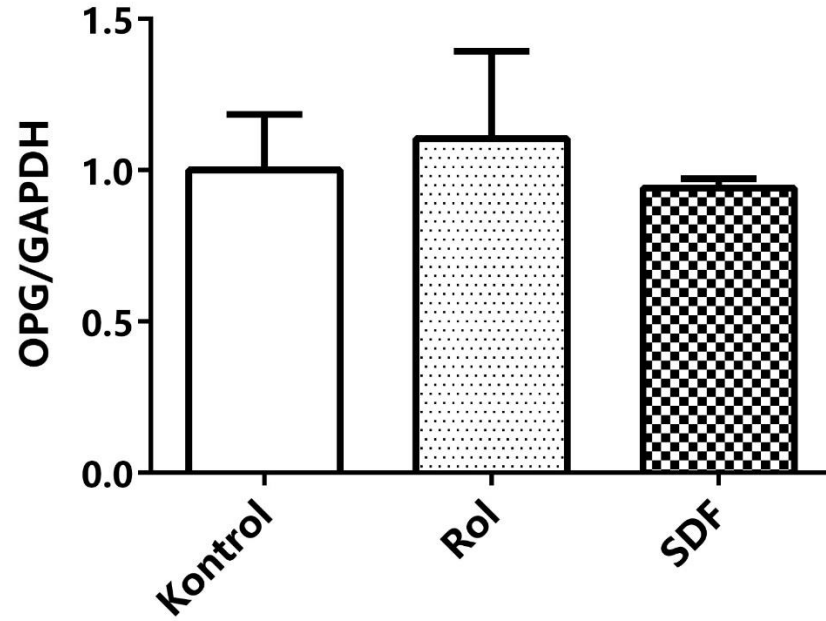
Sildenafil grubunda OPN mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Rolipram grubundada OPN mRNA ekspresyonlarının artış gözlenmede sildenafil grubu kadar belirgin bir artış yoktur. Osteonekroz yapılan farelerde sildenafil verilmesi OPN seviyesini anlamlı şekilde artırmıştır. Fakat rolipram verilen farelerde RANK artışı anlamlı değildir. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde OPN mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=8 * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # p<0.05 kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

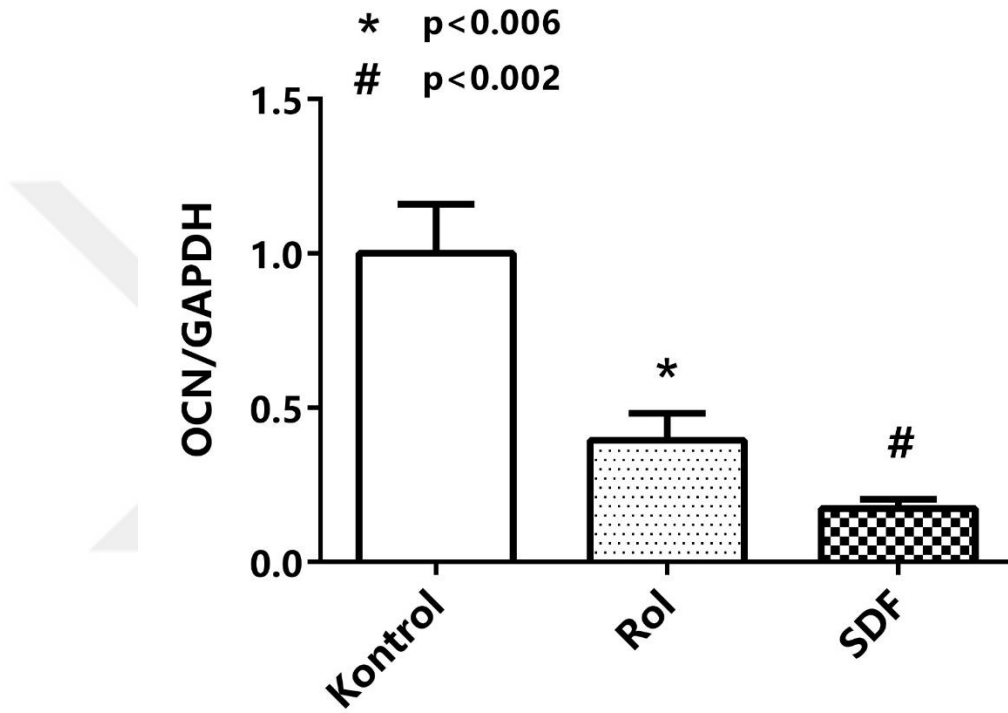
Rolipram grubunda OPG mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna ve sildenafil grubuna göre hafif arttığı saptanmıştır. Sildenafil grubunda OPG mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre hafif azaldığı saptanmıştır. Osteonekroz yapılan farelere fosfodiesteraz inhibitörleri verilmesi OPG seviyesindeki değişikliğinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde OPG mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. $n=8$ * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # $p<0.05$ kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

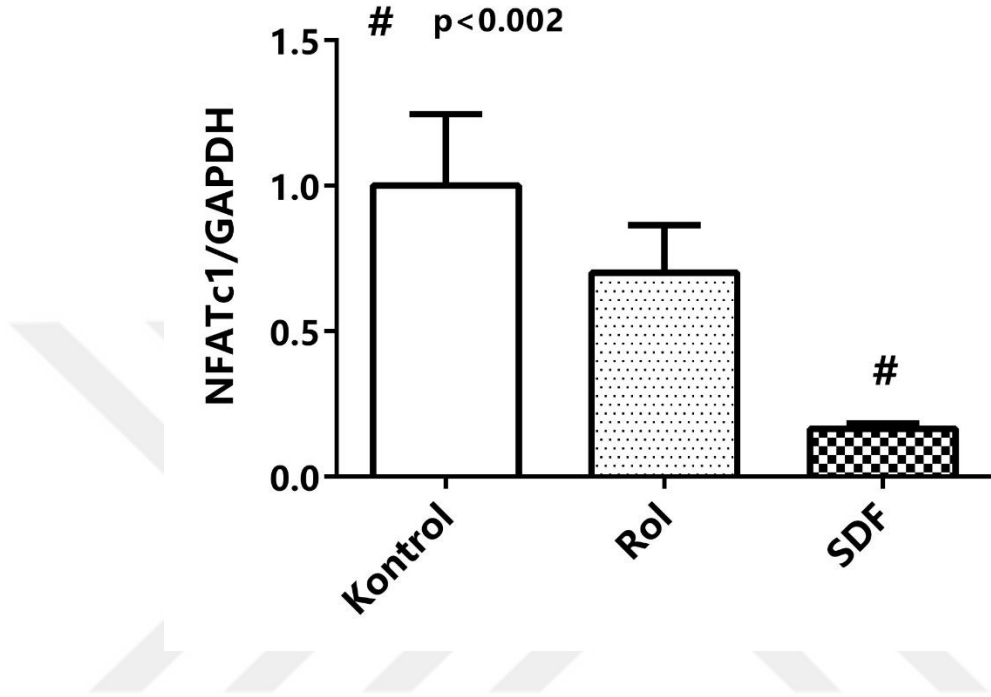
Rolipram grubunda ve sildenafil grubunda OCN mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Sildenafil grubundaki azalış daha fazladır. Osteonekroz yapılan farelerde fosfodiesteraz inhibitörleri verilmesi OCN seviyesini anlamlı şekilde azaltmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde OCN mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=8 * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # p<0.05 kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

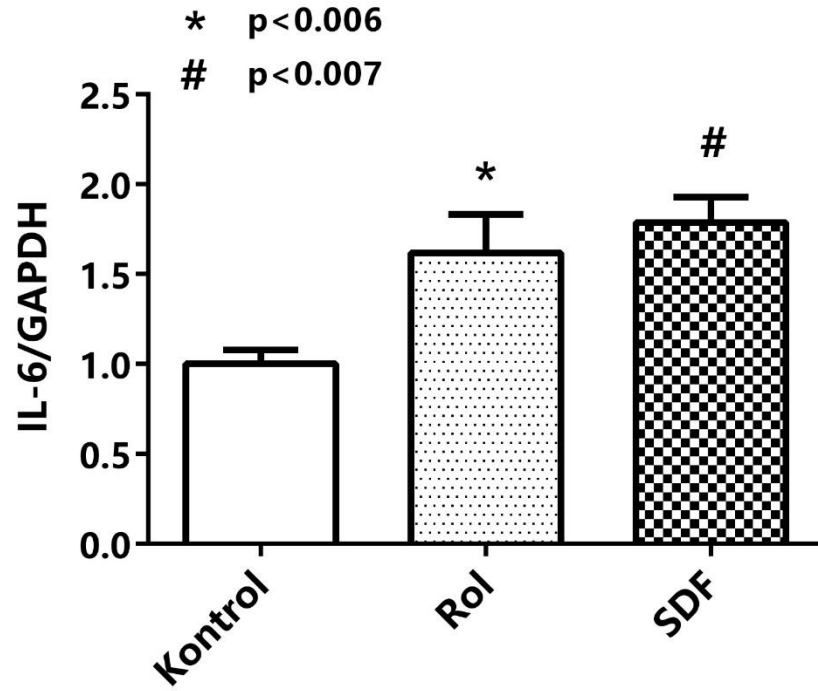
Rolipram grubunda ve sildenafil grubunda NFATc1 mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre azaldığı saptanmıştır. Sildenafil grubundaki azalış daha fazla ve anlamlıdır. Rolipram grubunda azalış olsada anlamlı bi fark saptanmamıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.14’de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde NFATc1 mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH'e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. $n=8$ * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # $p<0.05$ kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

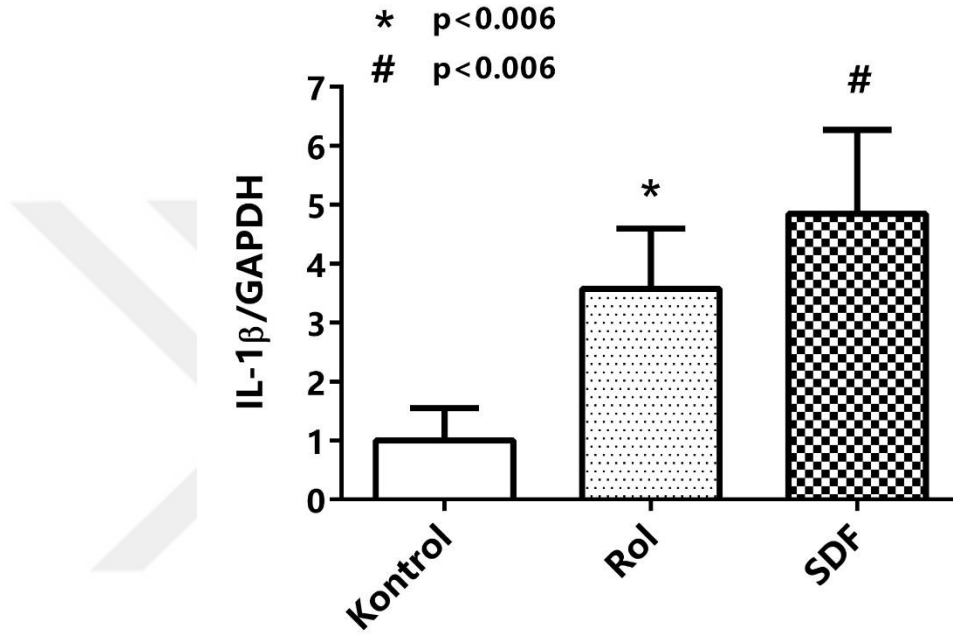
Rolipram grubunda ve sildenafil grubunda IL-6 mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Sildenafil grubunda artış daha fazladır. Osteonekroz yapılan farelerde fosfodiesteraz inhibitörleri verilmesi IL-6 seviyesini anlamlı şekilde artırmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde IL-6 mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=8 * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # p<0.05 kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

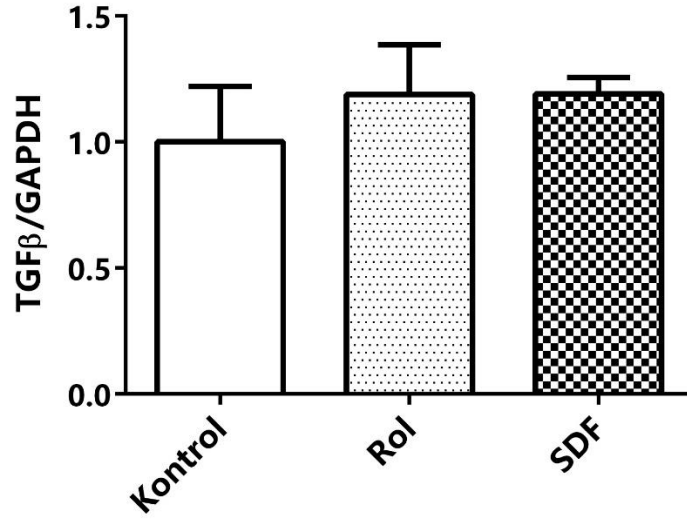
Rolipram grubunda ve sildenafil grubunda IL-6 mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Sildenafil grubunda artış daha fazladır. Osteonekroz yapılan farelerde sildenafil ve rolipram verilmesi IL1 seviyesini anlamlı şekilde artırmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.16’da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde IL-1 β mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=8 * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir. # p<0.05 kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Rolipram grubunda ve sildenafil grubunda TGF β mRNA ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Sildenafil grubunda artış daha fazladır. Osteonekroz yapılan farelerde fosfodiesteraz inhibitörleri verilmesi TGF β seviyesini anlamlı şekilde artırmıştır. Grupların toplu karşılaştırması Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Real Time-PCR yöntemi ile farelerin maksilla örneklerinde TGF β mRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

Sonuçlar GAPDH’e oranlanarak yüzde (%) halinde sunulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=10

5. TARTIŞMA

Osteoporoz, kemik metastazları ve Paget hastalığı gibi hiperkalsemi ile senkronize birçok hastalığın tedavisinde bifosfonatlar adı verilen ve osteoklastik aktiviteyi baskılayan ilaçlar kullanılmaktadır (52). Bifosfonatlar kemik rezorpsiyonundan sorumlu oldukları bilinen osteoklastlara bağlanarak, bilinen özelliklerinin dışında antianjiyogenik etki de gösterirler (88). Bu etkileri renal yetmezlik gibi doku veya organ hasarı ile birlikte nekrotik sonuçlara da neden olabilir (165). Yakında dönemde yapılan çalışmalar mandibular ya da maksiler kemikte ortaya çıkan osteonekrozun bifosfonat kullanımına bağlı gelişebileceğine işaret etmektedir (103). MRONJ olarak bilinen bu patolojinin tedavisinde konservatif ve/veya cerrahi yöntemler öne çıkmaktadır (132). Fakat oral hijyenin sağlanması, antibiyotik ve analjezik uygulamaları gibi konservatif uygulamaların MRONJ tedavisinde ideal bir tedaviyi sağlayamadığı ve hatta nekrotik süreci daha da şiddetlendirdiği bildirilmiştir (83). Bu nedenle tedavi için paratiroid bezinden izole edilen teriparatid (67), hiperbarik oksijen (129), ozon (166) ve trombosit zengin plazma (167) uygulamaları gibi birçok farklı yöntem halen denenmektedir. Bazı çalışmalarda ise lazer cerrahisinin konvansiyonel cerrahiye göre daha başarılı olduğu ifade edilmektedir (87). Gerekli literatür taraması yapıldığında mevcut süreçte MRONJ tedavisi için açık ve net bir uygulamanın varlığından söz edilemez. Bununla birlikte bifosfonat uygulamaları öncesi hastaların dental muayeneye alınması ve oral hijyene dikkat edilmesi tavsiye edilmektedir. MRONJ patogenezinde en önemli faktör anjiyogenezin azalması ya da tamamen inhibe olmasıdır (8). Bu açıdan osteonekrozu kemiği besleyen damarların hasar görmesi sonucu kemik dokusu ve kemik iliği iskemisi gerçekleştiği söylenebilir. Bu nekrotik süreçte kemik matriksinin etkilenmediği bilinmektedir. Buna karşın iskemik nekroz kemikte epifizler, metafizler ve diyafizler bölgeleri etkileyebilir (88). Bifosfonatlar osteoklastlardaki mevalonik asit-sterol yolağını bozarak osteoklastik kemik rezorpsiyonunu inhibe ederken, anjiyogenezi de inhibe ederek osteonekroza giden süreci başlatırlar. Özellikle uzun süreli nitrojen içeren bifosfonatların uygulandığı hastalarda cerrahi işlemler sonrası kemik iyileşme sürecinin kusurlu olması birçok çalışmada gösterilmiştir (52). Hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi için klinik araştırma uygulamaları zorluk teşkil etmektedir. Bu amaçla yapılan birçok çalışma deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmiştir. MRONJ patogenezi veya tedavi alternatiflerinin

etkilerini araştırmak için yapılan hayvan modellerinde amaç, bifosfonat uygulamasıyla taklitsel nekroz oluşturmaktır. Bu kapsamda, araştırmalarda MRONJ modeli oluşturmak için fare (168) ve sıçan (150) gibi kemirgenlerle, köpek (107) ve minipig (169) gibi daha büyük hayvanlar kullanılmıştır. Çalışma metodunda diş çekimi uygulaması yer almaktadır. Kolay uygulama yapılabilmesi nedeniyle fare ve sıçan gibi kemirgenler mevcut modelleme için daha çok tercih edilmektedir. Model oluşturmak için kullanılan bifosfonatlar ise intravenöz, intraperitoneal ya da oral yolla uygulanmıştır (66). Uygulama yolunu belirleyen temel faktör deney süresidir. Bifosfonatların veriliş yolunun da MRONJ oluşma riskinde etkili olduğu ifade edilmektedir. Literatürde bütün bifosfonatlarda oral absorpsiyon açlık koşulları altında sınırlıdır ve gıda mevcudiyetinde ihmal edilebilir düzeydedir. (9). Bu farklılık tedavi intervali ile ilişkilendirilmektedir. Benzer bir çalışmada ise intravenöz uygulamanın oral yolla uygulamaya göre yüksek biyoyararlanım nedeniyle MRONJ oluşturma riskinin daha fazla olduğu ifade edilmiştir (170). Uygulamada ise bifosfonat çeşitleri arasında yüksek potense sahip olması nedeniyle zoledronik asit öne çıkmaktadır. Bu nedenle, deneysel osteonekroz oluşturmak için zoledronik asit uygulamasının, MRONJ patofizyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve alternatif tedavi yöntemleri uygulamalarında daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi açısından daha avantajlı olduğu ifade edilmektedir (145).

Bifosfonatlarla tedavi edilen 55 yaşın üzerinde menopozdaki kadın hastalar, genç kadın hastalara kıyasla MRONJ geliştirme riski 10 kat daha fazladır (89). Laboratuvar farelerinin ve insanların yaşlarını eşleştirerek, bu çalışmada kullanılan fareler için ilişkili yaş (64-68 hafta), insanlarda yaklaşık 50-52'dir. Farelerde yaşlanma değişiklikleri orta yaşta, yaklaşık 40-60. haftalar arasında başlar (171). Kadınlarda ortalama menopoz yaşı yaklaşık 51'dir (172) ve bu menopoz sonrası dönemde 64-68 haftalık olan farelerin yaşına denk gelmektedir. MRONJ modeli oluşturulan hayvan çalışmalarının çoğunluğunda mronj için risk faktörü olan yaş ve menopoz sonrası durumla ilgili faktörlerin dikkate alınmadığı göze çarpmaktadır .Ulaşılabilir kaynaklarda birkaç çalışmada bu faktörlerin dikkate alınarak MRONJ hayvan modeli oluşturulduğu görölmüştür (173,174). Bunlardan yola çıkarak çalışmamızda 64 haftalık diş fareler tercih edilmiştir.

Çenelerde osteonekroz modeli oluşturmak için çeşitli bifosfonat türevleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda diğer bifosfanatlara göre osteonekroz oluşturma potansiyeli yüksek olan zoledronik asit kullanılmıştır. Literatürde zoledronik asitin uygulama dozu, yolu ve intervali ile ilgili birçok farklı hayvan çalışması yer almaktadır. Bu noktada temel amacın tartışılması söz konusu olmayacak bir osteonekroz oluşturmak olması unutulmamalıdır. Bu kapsamda literatür taraması yapıldığında, Sprague-Dawley dişi sıçanlara haftada üç kez ve altı hafta boyunca 0.1 mg/kg intraperitoneal zoledronik asit uygulaması ile MRONJ oluştuğu saptanmıştır (152). Diğer bir çalışmada, Wistar sıçanlara haftada bir kez intravenöz zoledronik asit (0.04 mg/kg) uygulaması ile benzer sonuç elde edildiği gösterilmiştir (153). Benzer bir şekilde haftada 3 kez intraperitoneal zoledronik asit (0.1 mg/kg) uygulaması ile osteonekroz oluştuğu saptanmıştır (175). Ayrıca zoledronik asitin etkisinin potansiyelize edilmesi amacıyla deksametazonla kombine uygulanmıştır. (176) Çalışmamızda uygulama dozu olarak literatürle uyumlu olacak şekilde 0.2 mg/kg zoledronik asit ve 10 mg/kg deksametazon belirlenmiştir.

Deney hayvanlarında MRONJ oluşturulması ve tedavisi ile ilgili çalışmalar tarandığında çalışma süresi olarak farklılıklar bulunmaktadır (149,151). Çalışmamızda ise farelerimizin yaşı olması hayvan kayıplarımızı arttıracığından çalışma süremizi kısa tutmaya çalıştık. Farelerde zoledronik asit 8 hafta süre ile haftada iki kez zoledronik asit ve deksametazon uygulamasındaki farklılık, intervali azaltıp bifosfonatın etkisini potansiyelize ederek farelerin daha az ajite olması sağlamaktan kaynaklanmaktadır.

MRONJ gelişme insidansı mandibulada maksilladan daha fazladır.(8) Fakat farelerde mandibula da cerrahi olarak diş çekimi hayvan ölümlerini arttırdığı kalan kök oranı artıp çalışma dışı kalan hayvan sayısında artma olduğu için özellikle fare çalışmalarında maksilla santral diş çekimi olan çalışmalarda mevcuttur (173). Çalışmamızda sol üst santral diş çekimi yapılmıştır.

Ulaşılabilir literatür tarandığında MRONJ tedavisi için fosfodiesteraz inhibitörlerinin anjiyogenezis, vazodilatasyon gibi etkilerinden dolayı son yıllarda hayvan çalışmalarında kullanıldığı bilinmektedir (177,178). Sildenafil dozajını ayarlarken Pal ve ark. 2020 yılında yaptıkları çalışmada farelerin femurlarındaki osteotomi modelinde yeni kemik oluşumunu değerlendirirken 6mg/kg ve 12 mg/kg

sildenafil uygulanmış ve 12 mg/kg daha etkili olduğu görülmüştür. Bizde çalışmamızda haftada 5 gün 12mg/kg 4 hafta boyunca oral gavaj yöntemi ile uyguladık (179).

Rolipramı verirken fosfodiesteraz inhibitörlerinin anjiyogenezis, vazodilatasyonun yanı sıra farelerde trabeküler kemik hacminin azalması ve trabeküler mimarinin bozulmasını önemli ölçüde önlemesi etkili olmuştur (180). Rolipram DMSO da çözülüp intraperitoneal uygulanmıştır (181). Rolipram dozajı belirlenirken dozaj 20 mg /kg a çıkarılınca TNF α değerindeki değişim ve moleküler düzeyde etkinliğinin artması etkili olmuştur(182).

Bifosfonatlarla MRONJ modelinin kanıtlanabilirliğinin klinik ve histolojik olarak iki ölçütü vardır. Çalışma metodolojisinde klinik çıktılarına ilişkin sınırlı veri bulunduğundan belirleyici faktörün histolojik çıktılar olduğu söylenebilir. Histolojik bulgularımız zoledronik asit ve deksametazon uygulaması ile maksiller kemikte örnek alınan bölgede hücre şeklinin bozulduğu, sitoplazmik büzüşmenin olduğu, trabeküller ve ciddi oranda boş laküna varlığına işaret etmektedir (183). Ayrıca iyileşme sürecindeki gecikmenin de bu kapsamda ciddi bir bulgu olduğu söylenebilir. Bu kapsamda histolojik görüntüler ve bulgularla deneysel MRONJ modelinin oluştuğu görülmektedir.

Kemik gelişimi için hem kemik dokusunun hem de kemik iliğinin yeterli vasküler beslenmeye ihtiyacı vardır. Anjiyogenez adı verilen bu fizyolojik sürecin regülasyonunda VEGF'in önemli rolü bulunmaktadır (19). VEGF'in baskılanması kemik dokuda vaskülarizasyonun önüne geçerek osteositleri etkiler ve kemik dokuda boşluklar oluşmasına ve nekroza neden olabileceği bildirilmiştir (38). Sıçanlarda zoledronik asit uygulamasının VEGF düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (119). Yakın dönemde kullanıma sunulan azot bağlı bifosfonatlardan minodronat uygulamasının da farelerde VEGF inhibisyonuna neden olarak maling melanomun önüne geçtiği bildirilmiştir (115). Gerek rolipramın, gerekse sildenafilin anjiyogenezi indükleyerek VEGF düzeylerini artırabileceği çeşitli çalışmalarda ispatlanmıştır (183,184). İmmünohistokimyasal bulgularımız, zoledronik asit ile maksiller osteonekroz oluşturulan farelere selektif fosfodiesteraz 4 inhibitörü olan rolipram ile fosfodiesteraz 5 inhibitörü sildenafil uygulamaları ile VEGF skorlarının arttığına işaret etmektedir (183). Sonuçları destekleyecek nitelikte histolojik bulgulardan

rolipram ve sildenafil uygulamaları ile kan damarı ve osteosit sayısının arttığı, boş laküna sayısının ise azaldığı anlaşılmaktadır. Çalışmamızda MRONJ u iyileşmesi ve/veya azaltılması için kullandığımız ilaçlar, etki perspektifiyle değerlendirildiğinde fosfodiesteraz 5 inhibisyonunun yani sildenafil uygulamasının daha potent olduğu söylenebilir. Moleküler düzeydeki bu etkilerin damarlanmayı artırarak osteosit ve boş laküna sayısını etkilemesi muhtemeldir (38). Öte yandan sildenafilin rolipram karşısındaki potansiyel farklılığı, fosfodiesteraz 5 inhibisyonunun, kemik rejenerasyonunu osteonekrozun erken evrelerinde iyileştirmesi ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz (185). Özellikle sildenafil uygulanan farelerin maksiller kemik dokularına ilişkin histolojik bulgulara çok düşük düzeydeki boş laküna sayısı, remodellingin daha hızlı gerçekleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte kontrol grubunda lökosit infiltrasyonun gözlenmemesi, kemik rejenerasyonu açısından deney süresinin yeterli olmadığı kanısına varmamıza sebep olmuştur. Bu durum, zoledronik asit dozuna bağlı olarak daha şiddetli osteonekroz oluşması ile ilişkili olabilir.

Kemik homeostazının ya da kemiğin yeniden şekillenmesi olarak tanımlanan “remodelling”, T hücresi gibi immünolojik ve osteogenetik faktörlerin yanı sıra bu faktörlerin regülasyonunda rolü bulunan sitokinlerle de ilişkilidir (186). İmmün sistemde yer alan bu sitokinlerden özellikle IL-1, IL-6 ve TNF α gibi inflamatuvar yapıların RANKL ekspresyonunu artırarak kemik yıkımını hızlandırdığı gösterilmiştir (187). İn vivo ve in vitro ortamlarda zoledronik asit gibi özellikle azot bağlı bifosfonatların T hücresi indüksiyonu ile proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır (188). IL-17 proinflamatuvar sistin düğümü sitokinlerinin bir ailesidir. IL-23 ile uyarılmalarına yanıt olarak T yardımcı 17 hücresi (Th17) olarak bilinen bir grup T yardımcı hücre tarafından üretilirler (189). Yakın tarihli bir çalışmada Th17 hücreleri üzerinden üretilen ve RANKL ekspresyonu ile karakterize IL-17 ve IL-23 sitokinleri osteoklastik aktivitelerinin daha belirgin olduğu gösterilmiştir (190). Bu kapsamda, çalışmamızda farelerden izole edilen plazma örneklerinde fare spesifik-ELISA kitleri kullanılarak sırasıyla TNF α , IL-1 β , IL-17 ve IL-23 sitokin düzeyleri ölçülmüştür. Biyokimyasal bulgularımız zoledronik asit ile maksiller osteonekroz oluşturulan kontrol grubuna göre; sildenafil uygulamasının tüm sitokin düzeylerini, rolipramın ise sadece IL-1 β ve IL-23 düzeylerini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. Fosfodiesteraz 4 ve 5

inhibisyonunun cAMP'nin 5'-AMP'ye dönüşümünü engelleyerek makrofaj ve nötrofil downregülasyonuna ve sonuçta inflamasyonun baskılanmasına neden olduğu bilinmektedir (191,192). Bu açıdan değerlendirdiğimizde, sildenafil ve rolipram uygulamalarıyla kemik dokunun yeniden şekillenmesi için bir engel teşkil eden inflamatuvar baskının önüne geçildiği ve sonuçların literatürle büyük oranda uyumlu olduğu söylenebilir. Ayrıca histolojik ve immünohistokimyasal bulgularımızda olduğu gibi sildenafilin roliprama göre tedaviye yönelik etkilerindeki potansiyelinin biyokimyasal bulgularda da daha belirgin olması sonuçlarımızı desteklemektedir.

Kemik dokusunda yer alan T lenfositleri, B lenfositleri ve dentritik hücreler gibi yapılar inflamasyon sürecinde olduğu gibi kemik onarımında da rol alır. Osteonekrotik süreçte bu hücrelerin uyarımı genellikle hasarlı bölgede trombositler tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokinler aracılığı ile gerçekleşir. Akut inflamasyonun erken evrelerinde aktif halde bulunan makrofajlar süpürücü etkinlik gösterirken oksidatif metabolitlerin yanı sıra yine TNF α , IL1 β ve IL-6 sitokinlerin salınımını indükler (193). İnflamatuvar sürecin ardından başarılı kemik onarımı ve yeniden şekillenmesi için mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik soya farklılaşması gerekir. Bu hücrelerin osteoblastik kökene uyarılması ise kemik morfogenetik proteinler, insülin büyüme faktörü ve dönüşen büyüme faktörleri (α ve β) aracılığı ile gerçekleşir (38). Osteoblast farklılaşması için ortak mekanizma Wnt-katenin ve Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü-2 (RUNX-2) aracılığı ile otokrin yollardır (32). Bağlı pre-osteoblastlar arttıkça kollajen proteinleri ve TGF- β ekspresyonunun artması beklenir. Bu aşamada katepsin K (CTSK) endo ve kollajenolitik aktivitelere sahip bir sistein proteaz olarak pre-osteoblastların olgunlaşmamış osteoblastlara dönüşümünü regüle eder (194). Son olarak, olgun osteoblastlar, kalsiyum birikimini ve mineralizasyonunu düzenleyen kalsiyum birikintilerinin oluşumuna izin veren osteokalsin (OCN) ve osteopontin (OPN) proteinlerini serbest bırakır (38). Literatür insan osteoblastik hücrelerinde bifosfonatların osteoprotegerin (OPG) indüksiyonu ile RANKL ekspresyonunu inhibe ederek tip I kollajeni parçalayan ana lizozomal proteaz olan CTSK ekspresyonunu baskıladığına işaret etmektedir (194). RANK/RANKL/OPG yolağı, osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonu ve kemik oluşumu arasındaki simbiyozun sürdürülmesinde kritik bir süreçtir. RANKL'ın RANK reseptörleri ile kenetlenmesi nükleer faktör kappa B (NF- κ B) indüksiyonu ile aktive T-hücreleri sitoplazmik 1 faktörü (NFATc1) upregülasyonuna neden olur.

NFATc1, osteoklast öncü hücrelerinin osteoklastogenez olarak bilinen olgun osteoklastlara farklılaşması sırasında temel sitokinlerin ekspresyonu için bir ana düzenleyicidir (195). Olgun osteoklastlar daha sonra sıkı bağlantılar yoluyla kemiğe bağlanır ve eski kemikte yeniden rezorpsiyon oluşturmak için sindirim enzimlerini serbest bırakır. Kemik matriksi fosfoproteinleri olan OPN ve kemik sialoproteininin (Ibsp), fosforillendiğinde osteoklastlara bağlanan yüksek verimli tartarata dirençli asit fosfataz (TRAP) substratları olduğu gösterilmiştir (196). Kısmi defosforilasyon üzerine, hem OPN hem de kemik Ibsp'i osteoklastlara bağlanamaz. Bu etkiden yola çıkarak, TRAP'ın OPN'i defosforile ettiği ve osteoklast göçüne ve daha fazla rezorpsiyonun meydana gelmesine izin verdiği varsayılmıştır (197).

Çalışma sonuçlarımız, bifosfonat ile oluşturulan osteonekroz üzerinde sildenafil uygulaması ile VEGF, RANK, IL-1 β , IL-6 ve OPN mRNA ekspresyonlarının anlamlı olarak artmıştır ayrıca TRAP, α , OCN ve NFATc1 düzeylerinin ise anlamlı olarak azalmıştır. Ayrıca CTSK, OPG ve TGF β mRNA ekspresyonlarında değişiklik oluşmadığı saptanmıştır. Güçlü bir fosfodiesteraz 5 inhibitörü olarak sildenafilin VEGF indüksiyonu ile anjiyogenetik ve antienflamatuvar etkileri bilinmektedir (183). Sildenafilin anjiyogenetik faktör olan VEGF ekspresyonunu artırması bu kapsamda hem literatürle, hem de immünohistokimyasal sonuçlarımızla uyumlu görünmektedir. Fakat sildenafilin plazma proinflamatuvar sitokinlerini (TNF α , IL-1 β , IL-17 ve IL-23) azaltırken kemik dokuda IL-1 β ve IL-6 mRNA ekspresyonlarını artırması önemli bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum, düşük düzeydeki sitokin düzeylerine karşı kompensasyon ile kemik dokuda yeni sitokinlerin üretiminin teşviki için gerçekleşen bir fizyolojik yanıt olarak değerlendirilebilir. Öte yandan kemik rezorpsiyonunu artıran TRAP, TGF α ve NFATc1 mRNA düzeylerinin sildenafil uygulaması ile anlamlı olarak azalması, sildenafilin osteblastik aktiviteyi artırarak kemik yeniden şekillenme sürecine katkı sağladığına işaret etmektedir. Dikkat çeken diğer bir bulgu ise sildenafilin bu olumlu etkisinin bilinenin aksine TGF β yerine TGF α üzerinden gerçekleşmesidir. Ayrıca RANK ekspresyonunun beklentinin aksine sildenafil ile artması, sildenafilin RANKL düzeylerini baskılaması ile ilişkili olabilir. Baskılanmış RANKL nedeniyle RANK ekspresyonunun artması fizyolojik bir kompensasyon şeklinde değerlendirilebilir. Ayrıca sildenafilin kemik remodeling sürecinde CTSK ve OPG üzerinde bir değişikliğe neden olmadan etki göstermesi selektivitesi açısından önemli bulgular

olarak kabul edilmelidir. Tabi ki söz konusu bulguların kanıtlanması açısından daha detaylı moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Öte yandan tedaviye yönelik olarak uygulanan fosfodiesteraz 4 inhibitörü rolipramın etkilerinin sildenafille büyük oranda paralellik gösterdiği söylenebilir. Rolipramın da her ne kadar osteonekroza karşı olumlu etkileri saptansa da RANK, NFATc1 ve OPN gibi yapılar üzerindeki etkilerinin anlamlı olarak değerlendirilememesi, histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal sonuçlarımızda olduğu gibi sildenafilin etkilerinin daha belirgin olduğuna işaret etmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız rolipram ve sildenafil uygulamasının maksiler kemikte azot bağlı bifosfonatlardan zoledronik asit ile oluşturulan osteonekroz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bulgularımız çalışma sınırları içerisinde aşağıdaki sonuçlara işaret etmektedir:

- Zoledronik asitin osteoklastik süreci inhibisyonu ile apoptozise neden olarak kemik rezorpsiyonunu engellediği; osteonekroza neden olduğu,
- Rolipram ve sildenafilin bifosfonat uygulamasına bağlı ve diş çekimi sonrası muhtemel osteonekroz gelişme riskini önlemede etkin rol aldığı; bu etkilerinin muhtemelen inflamatuvar belirteçlerin regülasyonu, anjiyogenez ve *Wnt* yolağı ile ilişkili olduğu,
- Osteonekrozun tedavisinde fosfodiesteraz 5 inhibisyonunun 4'e göre daha etkin sonuçlar sağlayacağı; sildenafilin roliprama göre daha belirgin etkilere sahip olduğu saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre rolipram ve sildenafilin bifosfonatlara bağlı osteonekroz gelişme riskini VEGF-A indüksiyonu ile anjiyogenezi artırarak; makrofajlar ve lökositler üzerinden TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17 ve IL-23 regülasyonunu sağlayarak; *Wnt* yolağını modüle ederek ve büyüme faktörlerini baskılayarak engellediği görülmektedir. Çalışmamızda rolipram ve sildenafilin bifosfonatların neden olduğu osteonekroza karşı olumlu etkileri görülse de, gerek moleküler mekanizmalarının aydınlatılması gerekse tedavi temellerinin belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda değerlendirilmesi durumunda, sildenafil uygulamasının etki potansiyeli açısından öne çıktığı söylenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Vepsäläinen J. Bisphosphonate prodrugs. *Curr Med Chem* 2002;9(12):1201–8.
2. Miller PD, Watts NB. Bisphosphonate. *Osteoporos Diagnosis Manag* 2022;10:123–43.
3. Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 2004;4::3–13.
4. Reszka AA, Rodan GA. Nitrogen-containing bisphosphonate mechanism of action. *Mini Rev Med Chem* 2004;4(7):711–9.
5. Lewiecki EM. Osteoporosis: Clinical Evaluation. *Endotext* 2000;14:112–115
6. Saia G, Blandamura S, Bettini G, Tronchet A, Totola A, Bedogni G, et al. Occurrence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw after surgical tooth extraction. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68(4):797–804.
7. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the Jaws Associated with the Use of Bisphosphonates: A Review of 63 Cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(5):527–34.
8. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022;80(5):920–43.
9. Porras AG, Holland SD, Gertz BJ. Pharmacokinetics of alendronate. *Clin Pharmacokinet*. 1999;36(5):315–28.
10. Walter C, Grötz KA, Kunkel M, Al-Nawas B. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. *Support Care Cancer* 2007;15(2):197–202.
11. Vasikaran SD. Bisphosphonates: an overview with special reference to alendronate. *Ann Clin Biochem* 2001;6:608–23.
12. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 2002;62(22):6538–44.
13. Goffinet M, Thoulouzan M, Pradines A, Lajoie-Mazenc I, Weinbaum C, Faye JC, et al. Zoledronic acid treatment impairs protein geranyl-geranylation for biological effects in prostatic cells. *BMC Cancer* 2006;6:221–229.
14. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411(2–3):334–50.
15. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, et al. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 2011;29(6):867–73.
16. Vidavalur R, Penumathsa SV, Zhan L, Thirunavukkarasu M, Maulik N. Sildenafil induces angiogenic response in human coronary arteriolar endothelial cells through the expression of thioredoxin, hemeoxygenase and vascular endothelial growth factor. *Vascul Pharmacol* 2006;45(2):91–5.
17. Colnot C, Lu C, Hu D, Helms JA. Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development.

Dev Biol 2004;269(1):55–69.

18. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schütze N, Jakob F, Duda GN, et al. CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 2006;24(2):254–62.
19. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis P V. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury* 2008;39:341-9.
20. Diwan AD, Wang MX, Jang D, Zhu W, Murrell GAC. Nitric oxide modulates fracture healing. *J Bone Miner Res* 2000;15(2):342–51.
21. Yang JX, Hsiung TC, Weng FC, Ding SL, Wu CP, Conti M, et al. Synergistic effect of phosphodiesterase 4 inhibitor and serum on migration of endotoxin-stimulated macrophages. *Innate Immun* 2018;24(8):501–12.
22. Schaal SM, Garg M Sen, Ghosh M, Lovera L, Lopez M, Patel M, et al. The Therapeutic Profile of Rolipram, PDE Target and Mechanism of Action as a Neuroprotectant following Spinal Cord Injury. *PLoS One* 2012;7(9):43-9.
23. Chong B, Hegde M, Fawknier M, Simonet S, Cassinelli H, Coker M, et al. Idiopathic hyperphosphatasia and TNFRSF11B mutations: relationships between phenotype and genotype. *J Bone Miner Res* 2003;18(12):2095–104.
24. Peng WX, Ye C, Dong WT, Yang LL, Wang CQ, Wei ZA, et al. MicroRNA-34a alleviates steroid-induced avascular necrosis of femoral head by targeting Tgif2 through OPG/RANK/RANKL signaling pathway. *Exp Biol Med* (Maywood) 2017;242(12):1234–43.
25. Song HM, Wei YC, Li N, Wu B, Xie N, Zhang KM, et al. Effects of Wenyangbushen formula on the expression of VEGF, OPG, RANK and RANKL in rabbits with steroid-induced femoral head avascular necrosis. *Mol Med Rep.* 2015 Dec 1;12(6):8155–61.
26. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005;34(3):597–601.
27. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010;285(33):25103–8.
28. Robinson RA. Bone tissue: composition and function. *Johns Hopkins Med J* 1979;145(1):10–24.
29. D'Amour P. Acute and chronic regulation of circulating PTH: significance in health and in disease. *Clin Biochem* 2012;45(12):964–9.
30. Mori G, D'Amelio P, Faccio R, Brunetti G. The Interplay between the bone and the immune system. *Clin Dev Immunol* 2013;28:112-9.
31. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 2006;24:33–63.
32. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;13(1):27–38.
33. Palumbo C. A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in

the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res* 1986;246(1):125–31.

34. Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* 2001;28(2):145–9.
35. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:281–90.
36. Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech* 1994;27(3):339–60.
37. Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Magenheimer BS, Guo D, et al. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem* 2006;281(41):30884–95.
38. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 2010;11(4):219–27.
39. Lee S-K, Lorenzo J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(4):411–8.
40. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289(5484):1504–8.
41. Vaananen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 1995;8:2729–32.
42. Li YP, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat Genet* 1999;23(4):447–51.
43. Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavarua M, et al. Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res* 1999;14(10):1654–63.
44. Nesbitt SA, Horton MA. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 1997;276(5310):266–9.
45. Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy: expert panel recommendations. *J Am Dent Assoc* 2006;137(8):1144–50.
46. Silverman SL, Watts NB, Delmas PD, Lange JL, Lindsay R. Effectiveness of bisphosphonates on nonvertebral and hip fractures in the first year of therapy: the risedronate and alendronate (REAL) cohort study. *Osteoporos Int* 2007;18(1):25–34.
47. Reid IR, Cornish J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol* 2011;8(2):90–6.
48. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(1):133–8.

49. Russell RGG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi A, Hulley PA, et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1117:209–57.
50. Russell RGG. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics* 2007;119:225-9.
51. Ezra A, Golomb G. Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;42(3):175–95.
52. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991;88(6):2095–105.
53. Azuma Y, Sato H, Oue Y, Okabe K, Ohta T, Tsuchimoto M, et al. Alendronate distributed on bone surfaces inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and in experimental hypercalcemia models. *Bone* 1995;16(2):235–45.
54. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989;245(4920):855–7.
55. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19(1):80–100.
56. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* 2011;49(1):50–5.
57. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 2006;39(3):443–52.
58. Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res* 2009;15(18):5829–39.
59. Barbosa JS, Almeida Paz FA, Braga SS. Bisphosphonates, Old Friends of Bones and New Trends in Clinics. *J Med Chem*. 2021;64(3):1260–82.
60. Delmas PD. The use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17(4):462–6.
61. Hortobagyi GN, Theriault RL, Porter L, Blayney D, Lipton A, Sinoff C, et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. *N Engl J Med* 1996;335(24):1785–92.
62. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004;350(16):1655–64.
63. Yin JJ, Pollock CB, Kelly K. Mechanisms of cancer metastasis to the bone. *Cell Res* 2005;15(1):57–62.
64. Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000;82(8):1459–68.
65. Sun M, Iqbal J, Singh S, Sun L, Zaidi M. The crossover of bisphosphonates to

- cancer therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1211:107–12.
66. Pietschmann P, Rauner M, Sipos W, Kersch-Schindl K. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease--a mini-review. *Gerontology* 2009;55(1):3–12.
 67. Mosekilde L, Vestergaard P, Rejnmark L. The pathogenesis, treatment and prevention of osteoporosis in men. *Drugs* 2013;73(1):15–29.
 68. Ebeling PR. Clinical practice. Osteoporosis in men. *N Engl J Med* 2008;358(14):1474–82.
 69. Van Staa TP, Dennison EM, Leufkens HGM, Cooper C. Epidemiology of fractures in England and Wales. *Bone* 2001;29(6):517–22.
 70. Iwata K, Li J, Follet H, Phipps RJ, Burr DB. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. *Bone* 2006;39(5):1053–8.
 71. Resnick D. Paget disease of bone: current status and a look back to 1943 and earlier. *AJR Am J Roentgenol* 1988;150(2):249–56.
 72. Meunier PJ, Coindre JM, Edouard CM, Arlot ME. Bone histomorphometry in Paget's disease. Quantitative and dynamic analysis of pagetic and nonpagetic bone tissue. *Arthritis Rheum* 1980;23(10):1095–103.
 73. Britton C, Walsh J. Paget disease of bone - an update. *Aust Fam Physician* 2012;41(3):100–3.
 74. Theodorou DJ, Theodorou SJ, Kakitsubata Y. Imaging of Paget disease of bone and its musculoskeletal complications: review. *AJR Am J Roentgenol* 2011;196:113–8.
 75. Cundy T, Bolland M. Paget disease of bone. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19(7):246–53.
 76. Reid IR, Miller P, Lyles K, Fraser W, Brown JP, Saïdi Y, et al. Comparison of a single infusion of zoledronic acid with risedronate for Paget's disease. *N Engl J Med* 2005;353(9):898–908.
 77. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Lancet* 2004;363(9418):1377–85.
 78. Basel D, Steiner RD. Osteogenesis imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genet Med* 2009;11(6):375–85.
 79. Phillipi CA, Remington T, Steiner RD. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane database Syst Rev* 2008;4:74–9.
 80. Letocha AD, Cintas HL, Troendle JF, Reynolds JC, Cann CE, Chernoff EJ, et al. Controlled trial of pamidronate in children with types III and IV osteogenesis imperfecta confirms vertebral gains but not short-term functional improvement. *J Bone Miner Res* 2005;20(6):977–86.
 81. Pyram R, Mahajan G, Gliwa A. Primary hyperparathyroidism: Skeletal and non-skeletal effects, diagnosis and management. *Maturitas* 2011;70(3):246–55.
 82. Conte P, Guarneri V. Safety of intravenous and oral bisphosphonates and compliance with dosing regimens. *Oncologist* 2004;9:28–37.

83. Strampel W, Emkey R, Civitelli R. Safety considerations with bisphosphonates for the treatment of osteoporosis. *Drug Saf* 2007;30(9):755–63.
84. Markowitz GS, Fine PL, Stack JJ, Kunis CL, Radhakrishnan J, Palecki W, et al. Toxic acute tubular necrosis following treatment with zoledronate (Zometa). *Kidney* 2003;64(1):281–9.
85. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007;356(18):1809–22.
86. Cummings SR, Schwartz A V., Black DM. Alendronate and atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2007;356(18):1895–6.
87. Manfredi M, Merigo E, Guidotti R, Meleti M, Vescovi P. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case series of 25 patients affected by osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;40(3):277–84.
88. Khan AA, Sándor GKB, Dore E, Morrison AD, Alsahli M, Amin F, et al. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *J Rheumatol* 2009;36(3):478–90.
89. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72(10):1938–56.
90. Zervas K, Verrou E, Teleioudis Z, Vahtsevanos K, Banti A, Mihou D, et al. Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *Br J Haematol* 2006;134(6):620–3.
91. Wessel JH, Dodson TB, Zavras AI. Zoledronate, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: a case-control study. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(4):625–31.
92. Khamaisi M, Regev E, Yarom N, Avni B, Leitersdorf E, Raz I, et al. Possible association between diabetes and bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(3):1172–5.
93. Lo JC, O’Ryan FS, Gordon NP, Yang J, Hui RL, Martin D, et al. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68(2):243–53.
94. Hansen PJ, Knitschke M, Draenert FG, Irle S, Neff A. Incidence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) in patients taking bisphosphonates for osteoporosis treatment - a grossly underestimated risk? *Clin Oral Investig* 2013;17(8):1829–37.
95. Langston AL, Campbell MK, Fraser WD, MacLennan GS, Selby PL, Ralston SH. Randomized trial of intensive bisphosphonate treatment versus symptomatic management in Paget’s disease of bone. *J Bone Miner Res* 2010;25(1):20–31.
96. Malmgren B, Åström E, Söderhäll S. No osteonecrosis in jaws of young patients with osteogenesis imperfecta treated with bisphosphonates. *J Oral Pathol Med* 2008;37(4):196–200.

97. Woo S Bin, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 2006;144(10):753–61.
98. Migliorati CA, Woo S Bin, Hewson I, Barasch A, Elting LS, Spijkervet FKL, et al. A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis (BON) in cancer. *Support Care Cancer* 2010;18(8):1099–106.
99. ABU-ID MH, WARNKE PH, GOTTSCHALK J, SPRINGER I, WILTFANG J, ACIL Y, et al. “Bis-phossy jaws” - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg* 2008;36(2):95–103.
100. Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2008;23(6):826–36.
101. Walter C, Al-Nawas B, Frickhofen N, Gamm H, Beck J, Reinsch L, et al. Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Head Face Med* 2010;6(1):232-9.
102. Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, Katodritou E, Triaridis S, Andreadis CG, et al. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol* 2009;27(32):5356–62.
103. Allen MR, Burr DB. Bisphosphonate effects on bone turnover, microdamage, and mechanical properties: what we think we know and what we know that we don't know. *Bone* 2011;49(1):56–65.
104. Fleisch HA. Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. *Ann Med* 1997;29(1):55–62.
105. Mavropoulos A, Rizzoli R, Ammann P. Different responsiveness of alveolar and tibial bone to bone loss stimuli. *J Bone Miner Res* 2007;22(3):403–10.
106. Meta IF, Fernandez SA, Gulati P, Huja SS. Adaptations in the mandible and appendicular skeleton of high and low bone density inbred mice. *Calcif Tissue* 2007;81(2):107–13.
107. Mashiba T, Mori S, Komatsubara S, Cao Y, Manabe T, Norimatsu H, et al. The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. *J Bone Miner Metab* 2005;23:36–42.
108. Van Den Wyngaert T, Huizing MT, Vermorken JB. Osteonecrosis of the jaw related to the use of bisphosphonates. *Curr Opin Oncol* 2007;19(4):315–22.
109. Bauss F, Pfister T, Papapoulos S. Ibandronate uptake in the jaw is similar to long bones and vertebrae in the rat. *J Bone Miner Metab* 2008;26(4):406–8.
110. Moreira MS, Katayama E, Bombana AC, Marques MM. Cytotoxicity analysis of alendronate on cultured endothelial cells and subcutaneous tissue. a pilot study. *Dent Traumatol* 2005;21(6):329–35.
111. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral*

Maxillofac Surg 2008;66(5):839–47.

112. Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab* 2009;27(6):663–72.
113. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone* 2007;41(3):318–20.
114. Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis C, Boukovinas I, Teleioudis Z, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case-control study of risk factors in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2008;26(28):4634–8.
115. Yamagishi SI, Abe R, Inagaki Y, Nakamura K, Sugawara H, Inokuma D, et al. Minodronate, a newly developed nitrogen-containing bisphosphonate, suppresses melanoma growth and improves survival in nude mice by blocking vascular endothelial growth factor signaling. *Am J Pathol* 2004;165(6):1865–74.
116. Aguirre JI, Altman MK, Vanegas SM, Franz SE, Bassit ACF, Wronski TJ. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Dis* 2010;16(7):674–85.
117. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol* 2009;45(2):164–72.
118. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Miñano F, Gomez-Garcia F. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. Knowledge and attitudes of dentists and dental students: a preliminary study. *J Eval Clin Pract* 2010;16(5):878–82.
119. Yamashita J, Koi K, Yang DY, McCauley LK. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res* 2011;17(6):1405–14.
120. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43(11):5721–32.
121. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab* 2010;28(2):165–75.
122. Hansen T, Kunkel M, Kirkpatrick CJ, Weber A. Actinomyces in infected osteoradionecrosis--underestimated? *Hum Pathol* 2006;37(1):61–7.
123. Sedghizadeh PP, Kumar SKS, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(4):767–75.
124. Wei X, Pushalkar S, Estilo C, Wong C, Farooki A, Fornier M, et al. Molecular profiling of oral microbiota in jawbone samples of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Dis* 2012;18(6):602–12.
125. Lodi G, Sardella A, Salis A, Demarosi F, Tarozzi M, Carrassi A. Tooth

- extraction in patients taking intravenous bisphosphonates: a preventive protocol and case series. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68(1):107–10.
126. Ferlito S, Puzzo S, Liardo C. Preventive protocol for tooth extractions in patients treated with zoledronate: a case series. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69:61-8.
 127. Otto S, Schreyer C, Hafner S, Mast G, Ehrenfeld M, Stürzenbaum S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40(4):303–9.
 128. Otto S, Hafner S, Mast G, Tischer T, Volkmer E, Schieker M, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: is pH the missing part in the pathogenesis puzzle? *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68(5):1158–61
 129. Van den Wyngaert T, Claeys T, Huizing MT, Vermorken JB, Fossion E. Initial experience with conservative treatment in cancer patients with osteonecrosis of the jaw (ONJ) and predictors of outcome. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2009;20(2):331–6.
 130. Ferlito S, Puzzo S, Palermo F, Verzi P. Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: presentation of a protocol and an observational longitudinal study of an Italian series of cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2012;50(5):425–9.
 131. Wilde F, Heufelder M, Winter K, Hendricks J, Frerich B, Schramm A, et al. The role of surgical therapy in the management of intravenous bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111(2):153–63.
 132. Rupel K, Ottaviani G, Gobbo M, Contardo L, Tirelli G, Vescovi P, et al. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Oncol* 2014;50(11):1049–57.
 133. Seth R, Futran ND, Alam DS, Knott PD. Outcomes of vascularized bone graft reconstruction of the mandible in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Laryngoscope* 2010;120(11):2165–71.
 134. Lemound J, Eckardt A, Kokemüller H, von See C, Voss PJ, Tavassol F, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the mandible: reliable soft tissue reconstruction using a local myofascial flap. *Clin Oral Investig* 2012;16(4):1143–52.
 135. Corso A, Varettoni M, Zappasodi P, Klersy C, Mangiacavalli S, Pica G, et al. A different schedule of zoledronic acid can reduce the risk of the osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2007;21(7):1545–8.
 136. Stanton DC, Balasanian E. Outcome of surgical management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: review of 33 surgical cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(5):943–50.
 137. Junquera L, Gallego L, Pelaz A, Olay S. Oral bisphosphonates-associated osteonecrosis in rheumatoid arthritis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14:126-32.
 138. Del Conte A, Bernardeschi P, La Ferla F, Turrisi G, D'Alessandro M,

- Montagnani F, et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw 32 months after interruption of zoledronate in a patient with multiple myeloma. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68(5):1179–82.
139. Campisi G, Fedele S, Colella G, Lo Casto A, Fusco V. Canadian consensus practice guidelines for bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *J Rheumatol* 2009;36(2):451–2.
 140. Edwards BJ, Gounder M, McKoy JM, Boyd I, Farrugia M, Migliorati C, et al. Pharmacovigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *Lancet Oncol* 2008;9(12):1166–72.
 141. Marx RE. Reconstruction of defects caused by bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:107–19.
 142. Engroff SL, Kim DD. Treating bisphosphonate osteonecrosis of the jaws: is there a role for resection and vascularized reconstruction? *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(11):2374–85.
 143. Ryan P, Saleh I, Stassen LFA. Osteonecrosis of the jaw: a rare and devastating side effect of bisphosphonates. *Postgrad Med J* 2009;85(1010):674–7.
 144. Orozco C, Maalouf NM. Safety of bisphosphonates. *Rheum Dis Clin North Am* 2012;38(4):681–705.
 145. Dhillon S. Zoledronic Acid (Reclast®, Aclasta®): A Review in Osteoporosis. *Drugs* 2016;76(17):1683–97.
 146. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2006;38(5):617–27.
 147. Russell RGG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068(1):367–401.
 148. Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sebt S, Ralston SH, Hamilton A, et al. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res* 2000;15(8):1467–76.
 149. Bi Y, Gao Y, Ehrichtiou D, Cao C, Kikuri T, Le A, et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol* 2010;177(1):280–90.
 150. Hokuo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, et al. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res* 2010;25(6):1337–49.
 151. Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:71–8.
 152. Senel FC, Duman MK, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109(3):385–91.

153. Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med* 2010;39(5):390–6.
154. TUĞRAK M, KÜÇÜKOĞLU K. Fosfodiesteraz Enzimleri ve İnhibitörleri. *J Lit Pharm Sci* 2016;5(1):17–35.
155. Rombaut B, Kessels S, Schepers M, Tiane A, Paes D, Solomina Y, et al. PDE inhibition in distinct cell types to reclaim the balance of synaptic plasticity. *Theranostics* 2021;11(5):2080–8.
156. Miller MS. Phosphodiesterase inhibition in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases: current status and potential. *undefined* 2014;8:19–30.
157. Das A, Xi L, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. *J Biol Chem* 2005;280(13):12944–55.
158. Koneru S, Varma Penumathsa S, Thirunavukkarasu M, Vidavalur R, Zhan L, Singal PK, et al. Sildenafil-mediated neovascularization and protection against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats: role of VEGF/angiopoietin-1. *J Cell Mol Med* 2008;12:2651–64.
159. Moreira SG, Brannigan RE, Spitz A, Orejuela FJ, Lipshultz LI, Kim ED. Side-effect profile of sildenafil citrate (Viagra) in clinical practice. *Urology*. 2000;56(3):474–6.
160. Zhu J, Mix E, Winblad B. The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS Drug Rev* 2001;7(4):387–98.
161. Paintlia AS, Paintlia MK, Singh I, Skoff RB, Singh AK. Combination therapy of lovastatin and rolipram provides neuroprotection and promotes neurorepair in inflammatory demyelination model of multiple sclerosis. *Glia* 2009;57(2):182–93.
162. Atkins CM, Oliva AA, Alonso OF, Pearse DD, Bramlett HM, Dietrich WD. Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2007;208(1):145–58.
163. Li LX, Cheng YF, Lin HB, Wang C, Xu JP, Zhang HT. Prevention of cerebral ischemia-induced memory deficits by inhibition of phosphodiesterase-4 in rats. *Metab Brain Dis* 2011;26(1):37–47.
164. Sasaki T, Kitagawa K, Omura-Matsuoka E, Todo K, Terasaki Y, Sugiura S, et al. The phosphodiesterase inhibitor rolipram promotes survival of newborn hippocampal neurons after ischemia. *Stroke* 2007;38(5):1597–605.
165. Adami S, Zamberlan N. Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review. *Drug Saf* 1996;14(3):158–70.
166. Alkan O, Oktay Coven B, Ozcopur B, Kazanci F, Kaya Y, Aydogan C, et al. Effects of Ozone and Prophylactic Antimicrobial Applications on Shear Bond Strength of Orthodontic Brackets. *Turkish J Orthod* 2017;30(4):101–5.
167. Moraes-da-Silva A de F, Maluf G, Rubira-Bullen IRF, Santos PS da S. Bone Morphogenetic Protein 2 Plus Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin for the Treatment of MRONJ. *J Craniofac Surg* 2023;34(4):338–41.
168. Gkouveris I, Hadaya D, Elzakra N, Soundia A, Bezouglaia O, Dry SM, et al.

Inhibition of HMGB1/RAGE Signaling Reduces the Incidence of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) in Mice. *J Bone Miner Res* 2022;37(9):1775–86.

169. Troeltzsch M, Zeiter S, Arens D, Nehrbass D, Probst FA, Liokatis P, et al. Chronic Periodontal Infection and Not Iatrogenic Interference Is the Trigger of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: Insights from a Large Animal Study (PerioBRONJ Pig Model). *Medicina (B Aires)* 2023;59(5):1000-11.
170. Marx RE. Uncovering the Cause of “Phossy Jaw” Circa 1858 to 1906: Oral and Maxillofacial Surgery Closed Case Files—Case Closed. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(11):2356–63.
171. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* 2016;152:244–8.
172. The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2017;24(7):728–53.
173. Bigueti CC, De Oliva AH, Healy K, Mahmoud RH, Custódio IDC, Constantino DH, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. *PLoS One* 2019;14(6):1–22.
174. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg* 2007;65(3):369–76.
175. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid – Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 2014;42(6):744–50.
176. Doppelt O, Cohen G, Tamari T, Elimelech R, Sabbah N, Zigdon-Giladi H. Endothelial progenitors increase vascularization and improve fibroblasts function that prevent medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Dis* 2020;26(7):1523–31.
177. Delfrate G, Mroczek T, Mecca LEA, Andreis JD, Fernandes D, Lipinski LC, et al. Effect of pentoxifylline and α -tocopherol on medication-related osteonecrosis of the jaw in rats: Before and after dental extraction. *Arch Oral Biol* 2022;137:23-39
178. Yalcin-Ulker GM, Cumbul A, Duygu-Capar G, Uslu Ü, Sencift K. Preventive Effect of Phosphodiesterase Inhibitor Pentoxifylline Against Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: An Animal Study. *J Oral Maxillofac Surg* 2017;75(11):2354–68.
179. Pal S, Rashid M, Singh SK, Porwal K, Singh P, Mohamed R, et al. Skeletal restoration by phosphodiesterase 5 inhibitors in osteopenic mice: Evidence of osteoanabolic and osteoangiogenic effects of the drugs. *Bone* 2020;135:115-305.
180. Tokuhara Y, Wakitani S, Imai Y, Nomura C, Hoshino M, Yano K, et al. Local delivery of rolipram, a phosphodiesterase-4-specific inhibitor, augments bone morphogenetic protein-induced bone formation. *J Bone Miner Metab*

2010;28(1):17–24.

181. Number P, Information P, Specification T, Information S, Information T. Product Information Product Information. Opadry 1920;(14998):1919–20.
182. De Moraes VLG, Singer M, Vargaftig BB, Chignard M. Effects of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. *Br J Pharmacol* 1998;123(4):631–6.
183. Mroczek T, Delfrate G, Mecca LEA, Andreis JD, Lipinski LC, Fernandes D, et al. Sildenafil reduces bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis in rats. *Clin Oral Investig* 2023;27(5):2437–48.
184. HU S, CAO Q, XU P, JI W, WANG G, ZHANG Y. Rolipram stimulates angiogenesis and attenuates neuronal apoptosis through the cAMP/cAMP-responsive element binding protein pathway following ischemic stroke in rats. *Exp Ther Med* 2016;11(3):1005–10.
185. Campos Pessoa AL, Oliveira Araújo VH V., Rosa Nascimento AL, Elias N, Carvalho JJ. Phosphodiesterase- 5 inhibition improves bone regeneration at the early stages of ischemic osteonecrosis of the femoral head in rats. *J Orthop Res* 2021;39(10):2077–82.
186. Lombard T, Neirinckx V, Rogister B, Gilon Y, Wislet S. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. *Stem Cells* 2016;206:1–16.
187. Nakashima T, Takayanagi H. Osteoimmunology: Crosstalk Between the Immune and Bone Systems. *J Clin Immunol* 2009;29(5):555–67.
188. Thompson K, Roelofs AJ, Jauhainen M, Mönkkönen H, Mönkkönen J, Rogers MJ. Activation of $\gamma\delta$ T Cells by Bisphosphonates 2009;4:11–20.
189. Ibba L, Gargiulo L, Alfano A, Cascio Ingurgio R, Narcisi A, Costanzo A, et al. Anti-IL-23 and anti-IL-17 drugs for the treatment of non-pustular palmoplantar psoriasis: a real-life retrospective study. *J Dermatolog Treat* 2023;34(1):35–42.
190. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014;20(1):62–8.
191. Ölmestig JNE, Marlet IR, Hainsworth AH, Kruuse C. Phosphodiesterase 5 inhibition as a therapeutic target for ischemic stroke: A systematic review of preclinical studies. *Cell Signal* 2017;38:39–48.
192. Schick MA, Schlegel N. Clinical Implication of Phosphodiesterase-4-Inhibition. *Int J Mol Sci* 2022;23(3):1209–25.
193. Timlin M, Toomey D, Condrón C, Power C, Street J, Murray P, et al. Fracture Hematoma Is a Potent Proinflammatory Mediator of Neutrophil Function. *J Trauma Inj Infect Crit Care* 2005;58(6):1223–9.
194. Mijanović O, Jakovleva A, Branković A, Zdravkova K, Pualic M, Belozerskaya TA, et al. Cathepsin K in Pathological Conditions and New Therapeutic and Diagnostic Perspectives. *Int J Mol Sci* 2022;23(22):137–62.
195. Gu W, Wang Z, Sun Z, Bao Z, Zhang L, Geng Y, et al. Role of NFATc1 in the bone-vascular axis calcification paradox. *J Cardiovasc Pharmacol*

2019;75(3):200–7.

196. Zhang W, Guo J, Gao L, Ren W, Li S, Zheng J, et al. Upregulation of mmu_circ_0001066 attenuates the inhibitory effect of bisphosphonates on osteoclastogenesis. *Oral Dis* 2022;28(6):1591–602.
197. Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegård D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem* 1994;269(21):14853–6.



EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(AKUHADYЕК)

Sayı: 49533702/102

Tarih : 24/08/2021

Konu: AKUHADYЕК-81-21-Referans nolu araştırma

Dr. Öğr. Üyesi Olgun TOPAL

AFSÜ. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Cerrahisi AD.

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunmuş olduğunuz "*Bifosfonat İle Deneysel Osteonekroz Oluşturulan Farelerde Fosfodiesteraz İnhibitörlerinin Kullanımının Etkisinin Değerlendirilmesi*" isimli araştırma projesi AKUHADYЕК yönetmeliğine ve evrensel etik ilkelere uyumlu olduğuna karar verilmiş ve **onaylanmıştır**.

Görevi	Adı	İmza	Görevi	Adı	İmza
--------	-----	------	--------	-----	------

Ek 2:

BİFOSFONAT İLE DENEYSEL OSTEONEKROZ OLUŞTURULAN FARELERDE FOSFODİESTERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN KULLANIMININ ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIGINALITY REPORT

12%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet	757 words — 5%
2	docplayer.biz.tr Internet	505 words — 3%
3	acbid.org Internet	65 words — < 1%
4	www.creativebiomart.net Internet	57 words — < 1%
5	9lib.net Internet	40 words — < 1%
6	756d243f-9742-4892-987f-8834db07019e.filesusr.com Internet	39 words — < 1%
7	ppg.cirtranslacional.sites.unifesp.br Internet	38 words — < 1%
8	Usuk, Sinem. "Sicanlarda Yaniga bagli Uzak Organ Hasarinda Gilaburu'nun (Viburnum opulus L.) Olasi Tedavi Edici ve Koruyucu Etkilerinin Arastirilmesi", Marmara Universitesi (Turkey), 2020	37 words — < 1%