

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı**
bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**MELATONİN İLE KOMBİNE D VİTAMİNİ'NİN
ZOLEDRONİK ASİT UYGULANMIŞ OSTEOLASTLAR
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK
İNCELENMESİ**

MELEK KOLTUK

**DANIŞMAN
BANU GÜRKAN KÖSEOĞLU**

**AĞIZ, DİŞ ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
AĞIZ DİŞ ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ
PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Annem; Birgül Esen Koltuk’a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Başta değerli referentim olan, bana hem cerrahiyi hem hekimliği öğreten, doktoramın her anında arkamda desteğini hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Banu Gürkan Köseoğlu'na teşekkür ederim.

Doktora hayatım boyunca desteğini, emeğini ve güler yüzünü unutamayacağım değerli hocam Prof. Dr. Burak Çankaya'ya teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü vaka yardım isteğimi geri çevirmeyen ve üzerimde emeği çok olan Doç. Dr. Cemil İşler'e ve Doç. Dr. Erol Cansız'a minnetlerimi sunarım.

Hep güler yüzü ile hatırlayacağım Prof. Dr. Buket Aybar'a teşekkür ederim.

Eğitim sürem boyunca yanımda hissettiğim, tezimi yazma sürecimde bana destek olan Dr. Dt. Cevat Tuğrul Turgut'a, Dt. Anıl Cesur'a ve Dr. Dt. Fatih Ayçiçek'e de ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deneyleri esnasında her türlü desteği sağlayan Prof. Dr. Hülya Koçak Berberoğlu ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Bölümü'ndeki başta Prof. Dr. Neslihan Abacı ve Doç. Dr. Sema Sırma Ekmekçi olmak üzere; Aris Çakiris ve Büşra Karacam'a teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne vermiş olduğu destekten dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29266

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	2
TEŞEKKÜR.....	3
İÇİNDEKİLER	4
TABLolar LİSTESİ.....	7
ŞEKİLLER LİSTESİ	8
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	11
ÖZET	13
ABSTRACT.....	15
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	16
2. GENEL BİLGİLER	17
2.1. BİSFOSFONATLAR.....	17
2.1.1. Bisfosfonatların Tarihi	17
2.1.2. Bisfosfonatların Yapısı	17
2.1.3. Bisfosfonatların Türleri.....	18
2.1.4. Bisfosfonatların Etki Mekanizması.....	19
2.1.5. Bisfosfonatların Endikasyonları ve Klinik Kullanım Alanları	21
2.2. ZOLEDRONİK ASİT (ZOLEDRONAT)	22
2.2.1. Zoledronik Asit ve Osteoblastlara Etkisi	22
2.3. İLAÇ KULLANIMINA BAĞLI GELİŞEN ÇENE OSTEONEKROZU (MEDICATION RELATED OSTEONECROSIS OF JAW) (MRONJ).....	22
2.3.1. MRONJ'un Tanımı ve Tarihi / BRONJ-MRONJ-ARONJ.....	22
2.3.2. MRONJ'un Sınıflandırılması.....	23
2.3.3. MRONJ'un Klinik Bulguları	24
2.3.4. MRONJ'un Radyolojik Bulguları	25
2.3.5. MRONJ Tedavi Yöntemleri.....	26
2.3.5.1. Konservatif Yöntemler.....	27
2.3.5.2. Agresif-Cerrahi Yöntemler	27
2.3.5.3. Destekleyici Tedaviler	27
2.4. D VİTAMİNİ.....	28
2.4.1. D Vitamininin Tanımı ve Metabolizması	28

2.4.2. D Vitamini Osteoblast ve Kemik İlişkisi	29
2.5. MELATONİN	31
2.5.1. Melatoninin Tanımı ve Metabolizması	31
2.5.2. Melatonin Osteoblast ve Kemik İlişkisi	32
2.6. DENEYDE UYGULANAN TESTLER	32
2.6.1. Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum (MTT) Test Yöntemi	32
2.6.2. ELISA Testleri: ALP, Caspase-3 ve IL-8	33
2.6.3. Tezde İncelenen Gen Expresyonları: BMP-2, RUNX-2, OSX	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. DENEY GRUPLARI	40
3.2. DENEY AŞAMALARI	42
3.2.1. Deney Medium'unun Hazırlanması	42
3.2.2. Hücre Ekimi ve Pasajlama	43
3.2.3. Deney Düzenegi	46
3.2.4. MTT Testi	50
3.2.5. ELISA Testleri	50
3.2.6. GEN Ekspresyonları-RT-PCR	51
3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	52
4. BULGULAR	53
4.1. MTT TEST SONUÇLARI	53
4.1.1. MTT Test Sonuçlarının Karşılaştırılması	54
4.1.2. MTT Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	59
4.2. BMP-2, OSX, RUNX-2 GEN SONUÇLARI	59
4.2.1. BMP-2 Sonuçları	59
4.2.2. BMP-2 Sonuçlarının Karşılaştırılması	60
4.2.3. BMP-2 Sonuçlarının Değerlendirilmesi	64
4.2.4. OSX Sonuçları	64
4.2.5. OSX Sonuçlarının Karşılaştırılması	65
4.2.6. OSX Sonuçlarının Değerlendirilmesi	68
4.2.7. RUNX-2 Sonuçları	68
4.2.8. RUNX-2 Sonuçlarının Karşılaştırılması	69
4.2.9. RUNX-2 Sonuçlarının Değerlendirilmesi	72
4.2.10. Gen Sonuçlarının Genel Değerlendirilmesi	72

4.3. ALP, Caspase-3,IL-8 ELISA SONUÇLARI	73
4.3.1. ALP Sonuçları.....	73
4.3.2. ALP Sonuçlarının Karşılaştırılması	74
4.3.3. ALP Sonuçlarını Değerlendirilmesi.....	77
4.3.4. IL-8 Sonuçları	77
4.3.5. IL-8 Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	78
4.3.6. IL-8 Sonuçlarının Değerlendirilmesi	82
4.3.7. Caspase-3 Sonuçları.....	82
4.3.8. Caspase-3 Sonuçlarının Karşılaştırılması	83
4.3.9. Caspase-3 Sonuçlarının Değerlendirilmesi	85
5. TARTIŞMA	86
KAYNAKLAR	94
HAM VERİLER	104
FORMLAR	105
ETİK KURUL KARARI	106
PATENT HAKKI İZNİ	107
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	108
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1:Bisfosfonatların sınıflandırılması	18
Tablo 2:Nitrojen içeren ve içermeyen bisfosfonatlar (Maruotti, Corrado, Neve, & Cantatore, 2012).....	19
Tablo 3:Bisfosfonat çeşitlerinin endikasyon ve alım yöntemlerine göre sınıflandırılması (Ruggiero et al., 2014)	21
Tablo 4:Amerikan Oral ve Maksillofasial Cerrahi Derneği'nin 2014 yılında yaptığı MRONJ sınıflaması	23
Tablo 5:Osteoradyonekroz, osteomyelit ve MRONJ'un benzer klinik ve radyolojik bulgularının karşılaştırılması (Fleisher, Kontio, & Otto, 2016)	24
Tablo 6:2014'te AAOMS'un yayınladığı evreye göre önerilen tedavi yöntemleri (Ruggiero et al., 2014)	26
Tablo 7:MTT için hazırlanan 96'lık plate ve deney gruplarının kuyucuklara dağıtılması	47
Tablo 8:PCR ve ELISA testleri için hazırlanan 6 well düzeneği ve ait olduğu deney gruplarının dağıtımı	49
Tablo 9:24 saatteki grupların MTT test sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.	53
Tablo 10:48 saatteki grupların MTT test sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi. ..	53
Tablo 11:BMP-2 Sonuçları	59
Tablo 12:OSX sonuçları	64
Tablo 13:RUNX-2 sonuçları.....	68
Tablo 14:ALP Sonuçları	73
Tablo 15:IL-8 Sonuçları.....	77
Tablo 16:Caspase-3 Sonuçları	82

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1:Soldaki pirofosfat ve sağdaki bisfosfonat molekülü (Khosla et al., 2012).....	18
Şekil 2:Bisfosfonatların etki mekanizmaları 1. yol	19
Şekil 3:Bisfosfonat etki mekanizması 2. yol (sadece 2. ve 3. kuşak bisfosfonatlar için)20	
Şekil 4:İkinci evre MRONJ klinik tablosu	24
Şekil 5:Mandibula sol taraf CBCT’de yaygın osteoskleroz ve osteolizis görülüyor (a).Mandibula 1. molar hizasındaki koronal kesit osteolitik değişim ve lateral ve medial korteksler arasında subperiostal kemik formasyonunu göstermektedir (ok) (Fleisher et al., 2016).	26
Şekil 6:Melatoninin üretimi	31
Şekil 7:1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 $\geq$ 99% (HPLC) Sigma-Aldrich	39
Şekil 8:Melatonin powder, $\geq$ 98% (TLC)Sigma-Aldrich	39
Şekil 9:Zoledronic acid monohydrate $\geq$ 98% (HPLC), $\geq$ 98% Sigma-Aldrich	40
Şekil 10:Hettich® ROTINA 38/38R santrifüj makinesi (Sigma- Aldrich)	43
Şekil 11:Mikroskop altında kuyucukların incelenmesi	44
Şekil 12:Vi-Cell XR™, Beckman Coulter, USA.....	45
Şekil 13:Santrifüj sonrası dibe çöken ve tabana yapışan osteoblastlar.....	46
Şekil 14:96’lık platelere yapılan hücre ekimleri.....	47
Şekil 15:6-well’lere yapılan hücre ekimleri.....	49
Şekil 16:6-well’lerden elde edilen osteoblast hücreleri ve gruplara göre RNA izolasyonu için hazırlanması.....	51
Şekil 17:LightCycler® 480	52
Şekil 18:Zoledronik asidin MTT testi üzerine etkisi	55
Şekil 19:D vitamini ve melatoninin osteoblastlar üzerine etkisi MTT 24.saat.....	55
Şekil 20:D vitamini ve melatoninin osteoblastlar üzerine etkisi MTT 48.saat.....	56
Şekil 21:50 μ M ZA içeren grupların 24 ve 48.saat karşılaştırması	56
Şekil 22:24. saatte melatoninin 10 μ M ZA, 10 μ M D vitamini grubu üzerine etkisinin karşılaştırılması.....	57
Şekil 23:24. saatte melatoninin 50 μ M ZA ve 10 μ M D vitamini içeren gruba etkisi ...	57
Şekil 24:48.saatte D vitamininin 10 μ M ZA grubu üzerine etkilerinin incelenmesi.....	58
Şekil 25:48. saatte ZA konsantrasyonu değişmesinin melatonin ve 10 μ M D vitamini içeren gruba etkisinin karşılaştırılması	59

Şekil 26:24 ve 48. saatte zoledronik asidin BMP-2'ye etkisinin kıyaslanması.....	61
Şekil 27:24. saatte melatonin ve D vitamininin BMP-2 üzerine etkisinin karşılaştırılması	61
Şekil 28:48. saatte melatonin ve D vitamininin BMP-2 üzerine etkisinin karşılaştırılması	62
Şekil 29:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki BMP-2 ekspresyonları üzerindeki etkileri-24.saat	63
Şekil 30:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki BMP-2 ekspresyonları üzerindeki etkileri-48.saat	63
Şekil 31:50 μ M'lık ZA içeren grupların OSX düzeylerinin aynı saatlerdeki kontrol grupları ile karşılaştırılması	65
Şekil 32:Melatonin ve D vitaminin OSX üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24.saat	66
Şekil 33:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki OSX ekspresyonları üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24.saat	67
Şekil 34:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki OSX ekspresyonları üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-48.saat	67
Şekil 35:Zoledronik asidin RUNX-2 düzeyindeki etkisini incelemek için 50 μ M'lık ZA içeren grupların aynı saatlerdeki kontrol grupları ile karşılaştırılması	69
Şekil 36:Melatonin ve D vitaminin RUNX-2 üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24.saat	70
Şekil 37:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki RUNX-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24.saat....	71
Şekil 38:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA gruplardaki RUNX-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-48.saat	72
Şekil 39:D vitamini ve melatoninin ALP üzerine etkisinin karşılaştırılması-24.saat.....	75
Şekil 40:D vitamini ve melatoninin ALP üzerine etkisinin karşılaştırılması-48.saat.....	76
Şekil 41:D vitamini ve melatoninin ZA üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24. saat	76
Şekil 42:D vitamini ve melatoninin IL-8 üzerine etkisinin karşılaştırılması 24.saat.....	79
Şekil 43:D vitamini ve melatoninin IL-8 üzerine etkisinin karşılaştırılması 48.saat.....	79
Şekil 44:Zoledronik asidin osteoblastların IL-8 değerleri üzerine etkilerinin karşılaştırılması-24.saat	80

Şekil 45:Melatonin ve D vitamininin 24. saatte 10 μ M ZA uygulanan osteoblastlar üzerine etkilerinin karşılaştırılması.....	81
Şekil 46:Melatonin ve D vitamininin 24. saatte 10 μ M ZA uygulanan osteoblastlar üzerine etkilerinin karşılaştırılması-48.saat	81
Şekil 47:D vitamini ve melatoninin Caspase-3 üzerine etkisinin karşılaştırılması-24.saat	84
Şekil 48:Melatonin ve D vitamininin 24. saatte 10 μ M ZA uygulanan osteoblastlar üzerine etkilerinin karşılaştırılması-24.saat	84
Şekil 49:Melatonin ve D vitamininin 24. saatte 10 μ M ZA uygulanan osteoblastlar üzerine etkilerinin karşılaştırılması-48.saat	85



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

7DHC: 7dehidrokolesterol

AAOMSs: Amerikan Oral ve Maksillofasial Cerrahi Derneği/American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

ALP: Alkalen Fosfataz

ATCC®: American Type Culture Collection

BF: Bisfosfonatlar

BMP-2: Bone morphogenic protein (Kemik Morfogenetik protein-2)

BRONJ: Bisfosfonata bağlı çene osteonekrozu

Ca: Kalsiyum

cm3: Santimetreküp

DBP: D vitamini bağlayan protein

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

HBO: Hiperbarik oksijen tedavisi

IL: İnterlökin

i.v.: İntravenöz

KMP: Kemik morfojenik protein

LLLT: Low level laser therapy (düşük doz lazer tedavisi)

Mg: Magnezyum

mg: Miligram

ml: Mililitre

mm: Milimetre

MTT: Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum

Na: Sodyum

ng: Nanogram

nm: Nanometre

OSX: Osterix

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR: Polymerase Chain Reaction

PRF: Platelet Rich Fibrin (plataletten zengin fibrin)

PTH: Paratiroid hormon

RANKL: RANK ligandı

RUNX-2: Runt-iliskili transkripsyon faktörü 2

RXR: Retinoik asit x reseptörü

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü-beta

VDR: D vitamini reseptörü

ZA: Zoledronik asit

μ l: Mikrolitre

μ M: Mikromolar

ÖZET

Koltuk,M . (2021). Melatonin ile Kombine D Vitamini'nin Zoledronik Asit Uygulanmış Osteoblastlar Üzerine Etkilerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler: D vitamini, MRONJ, Melatonin, Zoledronik asit, Hücre kültürü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29266

Bisfosfonat türevi ilaçlar günümüzde osteoporozis, Paget hastalığı, Osteogenezis İmperfekta ve malignitelerde metastazın önlenmesi amacıyla oldukça yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Bisfosfonatlar ve diğer antirezortif ajanların kullanımına bağlı olarak çene kemiği osteonekrozları günümüzde sık olarak klinisyenlerin karşısına çıkmaya başlamıştır. MRONJ (Medication Related Osteonecrosis of Jaw) (İlaç Kullanımına Bağlı Gelişen Çene Osteonekrozu) olarak isimlendirilen bu klinik duruma bisfosfonatlar dışında diğer antirezortif ilaçlar, denosumab ve antianjiyojenik ilaçlar da sebep olabilmektedir.

Zoledronik asit, osteoblastların aktivite ve vitalitesini düşürmekte proliferasyonunu engellemektedir. Buna karşın D vitamini ve güçlü bir antioksidan olan melatoninin osteoblastların diferansiyasyonu ve proliferasyonunu arttırıcı etkileri mevcuttur. Osteoblastlar üzerinde vitamin D reseptörlerinin olması, D vitamininin hücre üzerinde direkt olarak etki gösterebilmesini sağlar. Vitamin D insan ve rat osteoblastlarında diferansiyasyon ve mineralizasyonu stimüle eder. Sirkadiyen ritmi düzenleyen melatoninin, kemik kaybını azalttığı bildirilmiştir. Melatoninin kemik üzerindeki bu etkilerini otokoidler üzerinden ve kemik matriks proteinlerini arttırarak yaptığı düşünülmektedir.

MRONJ oluşumunun engellenmesi ve tedavisi için düşük seviyeli lazer tedavisi (LLLT, Low-Level Laser Therapy), sekestrektomi, PRF (Plasma Rich Fibrin), antibiyotik lavajı gibi çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Henüz kesin bir tedavi protokolü olmayan MRONJ'un tedavisi için birçok method denenmektedir ve bu çalışmalar literatürde önemli yer tutmaktadır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda farklı konsantrasyonlarda Zoledronik asit (ZA) ile inkübe edilen hazır olarak temin edilmiş insan osteoblast hücrelerinin 24 ve 48 saatlerdeki canlılık düzeyleri MTT (Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum) testi ile ölçülmüş, melatonin ve D vitamininin bu hücreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Farklı konstantrasyon, kombinasyon ve zaman dilimlerinde 36 alt grup oluşturulmuş ve bu gruplardaki osteoblastların gen ekspresyonları (RUNX-2 (Runt-ilişkili transkripsiyon

faktörü 2), BMP-2(Kemik morfogenetik protein-2) ve OSX(Osterix)) real-time PCR(Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Aynı şekilde bu gruplara ALP, caspase-3 ve IL-8 ELISA testleri uygulanmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır.



ABSTRACT

Koltuk,M . (2020). Evaluation the effects of melatonin combined vitamin d on zoledronic acid treated osteoblast in vitro. Istanbul University, Institute of Health Science, Oral and Maxillofacial Surgery. PhD Thesis. İstanbul.

Key Words: Vitamin D, MRONJ, Melatonin, Zoledronic acid, Cell culture

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.

Project No: 29266

Bisphosphonates are widely used in osteoporosis, Paget's disease, Osteogenesis imperfecta and malign tumor therapies. Clinicians often experience jaw osteonecrosis cases due to use of bisphosphonates and other antiresorptive agents. Except bisphosphonates, denosumab, antiangiogenics and other antiresorptive drugs can cause this clinic situation called Medication Related Osteonecrosis of Jaw.

Zoledronic acid inhibits osteoblast proliferation and activity, but in contrary melatonin and vitamin D enhance osteoblast's differentiation and proliferation. Additionally, melatonin is a powerful antioxidant. Vitamin D effects directly on bone tissue because of the vitamin D receptors on osteoblasts. Vitamin D also stimulates differentiation and mineralization in human and rat's osteoblasts. Melatonin which regulates circadian rhythm, is known for reducing bone loss. It is thought that melatonin makes these effects with upregulation of bone matrix proteins and otocoids.

Low level laser therapy, sequestrectomy, plasma rich fibrin and antibiotic drug lavage are some different therapy methods of MRONJ. There are lots of different options are trying to treat MRONJ, but there is no certain way yet and these researches take a wide place in the literature.

In our study, we survey vitality and effect of melatonin and vitamin D's effects on different concentrations of zoledronic acid treated human-osteoblasts by MTT (Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum) test method at 24 and 48th hour. We created 36 different group combination and compared gene expressions (RUNX-2, BMP-2 ve OSX(Osterix)) of the osteoblasts in these each groups with real time PCR (Polymerase Chain Reaction). And also ELISA tests (ALP, caspase-3 and IL-8) were done in these each group and the results compared.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oral ve maksillofasiyal cerrahide ilaç kullanımına bağlı çene osteonekrozlarına oldukça sık olarak rastlanmaya başlanmıştır. Hastalığın evresine göre çeşitli tedavi yöntemleri mevcuttur; ancak hastanın hangi amaçla bu ilacı kullandığı, hangi yol ve dozdan bu ilacı aldığı, tedavi sonucunu oldukça etkilemektedir. LLLT (Low-Level Laser Therapy-Düşük Seviyeli Lazer Terapisi), sekestrektomi, antibiyotik tedavisi, pentoksiflin tokoferol tedavisi (PENT-E), teriparatid enjeksiyonu gibi çeşitli tedavi yöntemleri denenmektedir; ancak henüz tam bir tedavi protokolü oluşturulamamıştır.

Antirezorptif ajanların kullanımı temel olarak üç grupta incelenebilir. Bunlardan ilki; malign durumlarda iskelet sistemine metastazın önlenmesi amacıyla kullanımıdır. Bu durumda hastalar kemoterapi ve radyoterapi tedavisi altında olabilirler. Bu hastalarda ortaya çıkan çene osteonekrozlarının tedavisi, diğer gruplara kıyasla daha zor olarak nitelendirilebilir. Bu zorluğun sebebi ise malignite tedavisi gören hastalarda daha efektif olması açısından intravenöz ve yüksek doz bisfosfonat kullanılmasıdır, bu durum da MRONJ'a daha kolay zemin hazırlayabilir. İkinci zorluk ise hastanın tedaviye verdiği yanıtta kemoterapi ve radyoterapi gibi tedaviler yüzünden baskılanma oluşabilmesidir. Dolayısıyla bu grup hastalarda tedaviye yanıt daha düşük olmaktadır.

İkinci grup olarak, osteoporoz hastalarının tedavisinde de antirezorptif ajanlar kullanılabilir. Bu hastalarda osteoporozun derecesine göre oral ve intravenöz kullanımlar mevcut olup eğer hastanın ek bir hastalığı yoksa tedavi sonucu ilk grupla karşılaştırıldığında daha tatmin edici olmaktadır.

Son olarak Paget veya Osteogenezis İmperfekta gibi metabolik kemik rahatsızlıkları olan hastalar da bisfosfonat veya diğer antirezorptif ajanlar kullanabilirler.

MRONJ'a sebep olan ilaçları temelde bisfosfonatlar, denosumab (insan monoklonal antikoru) ve diğer antirezorptif ajanlar olarak sınıflayabiliriz. Pirofosfat analogları olan bisfosfonatlar, antirezorptif tedavilerde en çok kullanılan ajanlardır. Nitrojen içeren ve içermeyen olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Zoledronik asit ise Nitrojen içeren grubun en güçlü ajanı olarak tanımlanabilir (Hu et al., 2016).

Çalışmamızda D vitamini ve melatoninin, zoledronik asit uygulanmış osteoblast hücre kültürü üzerindeki etkilerini vitalite, proliferasyon ve diferansiyasyon yönünden araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BİSFOSFONATLAR

2.1.1. Bisfosfonatların Tarihi

Bisfosfonatlar kemikte hidroksiapatite yüksek afinite gösteren pirofosfat analoglarıdır. Kemik üzerindeki farmakolojik etkilerine bağlı olarak iskeletsel hastalıklarda dengesiz kemik remodelasyonun oranını değiştirecek rol üstlenmektedirler (Drake, Clarke, & Lewiecki, 2015).

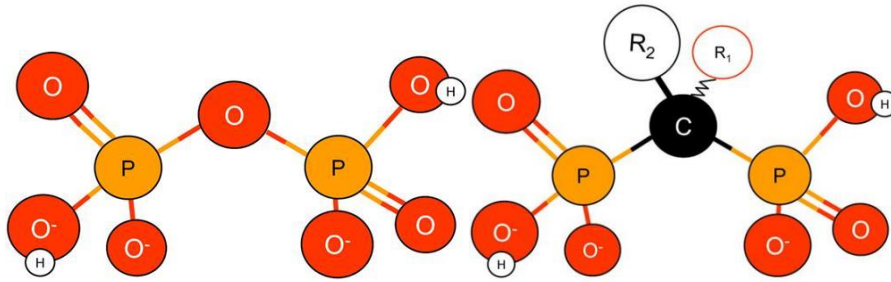
Rezorpsiyonu arttırarak kemik metabolizmasını etkileyen hastalıklarda -ki bu hastalıklar osteoporoz, Paget hastalığı, maligniteye bağlı hiperkalsemi, multipl myeloma, prostat, akciğer ve meme kanserlerinin kemik metastazları gibi hastalıklardır- etkili olan ilaçlardandır (Madrid & Sanz, 2009; Shabestari et al., 2010).

Bisfosfonatlar ilk olarak 19. yüzyılda endüstride kullanım amacıyla üretilmişlerdir. İlk sentez 1865'te Almanya'da gerçekleştirilmiştir. Sağlık alanında kullanımı 1960'ların sonunda kemik metabolizması hastalıklarının tedavisi amacıyla başlamıştır. Tedavide ilk kullanılan bisfosfonat etidronattır (Bassett et al., 1969). Bisfosfonatların biyolojik karakterleri ile ilgili bilgimiz ise 30 sene önceye dayanmaktadır, ilk rapor 1968'de yayınlanmıştır (Fleisch, Russell, Bisaz, Casey, & Mühlbauer, 1968).

2.1.2. Bisfosfonatların Yapısı

Bisfosfonatlar, pirofosfatların yapay analoglarıdır. Bisfosfonat molekülünde pirofosfattan farklı olarak oksijen molekülü bir karbon atomu ile yer değiştirmektedir (Khosla et al., 2012). Bisfosfonatların genel formülü şekil 1'de görülmektedir (Şekil 1). R2 pozisyonu değişik bisfosfonat moleküllerini oluşturan konumdur. R1 pozisyonu ise her zaman hidroksil grubudur.

Zincir uzunluğunun çözünürlüğü etkilediğini gözlenmiştir. Pamidronat gibi kısa zincirli bisfosfonatlar ($n=2$) suda serbestçe çözünürken daha uzun zincirli bileşikler suda ve en yaygın organik çözücülerde neredeyse çözünmemiştir.



Şekil 1: Soldaki pirofosfat ve sağdaki bisfosfonat molekülü (Khosla et al., 2012)

2.1.3. Bisfosfonatların Türleri

Bisfosfonatlar (BF) 1., 2. ve 3. jenerasyon olarak sınıflandırılabilirler. 1. jenerasyon bisfosfonatlar (Etidronat ve Tiludronat) alkali bisfosfonatlar olarak adlandırılırlar çünkü Nitrojen içermezler. Bunlar en az etkiye sahip olan ajanlardır ve günümüzde çok az kullanım alanları bulunmaktadır.

Nitrojen içermeyen BF'lar intrasellüler hidrolize olamayan ve salınabilir enerji içeriği bulunmayan ATP analoglarını bünyesine katarak kemik rezorpsiyonunu baskılar, bu da osteoklast ölümüne sebep olur (Frith, Mönkkönen, Auriola, Mönkkönen, & Rogers, 2001) (Tablo 1).

Tablo 1: Bisfosfonatların sınıflandırılması

Bisfosfonatların Sınıflandırılması		
Alkali BF'lar (Nitrojen İçermeyenler)	Amino BF'lar (Nitrojen İçerenler)	
<u>1.Jenerasyon</u> Etidronat Tiludronat	<u>2.Jenerasyon</u> Aledronate İbandronat Pamidronat	<u>3.Jenerasyon</u> Risedronat Zoledronat

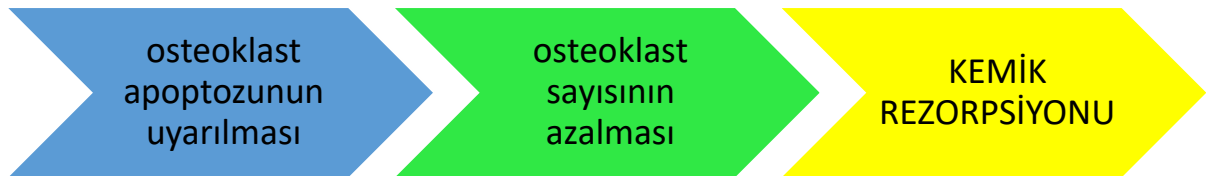
2. ve 3. jenerasyon bisfosfonatlar Nitrojen içeren dolayısı ile aminobisfosfonatlar olarak isimlendirilen ilaçlardır. Nitrojen içeren bisfosfonatlar farnesil disfosfat sentaz enziminin inhibisyonu ile kolesterol sentezindeki mevalonat yolağını engeller ve küçük GTP'azların fenilasyonunu bloklayarak osteoklast fonksiyonunda duraklamaya sebep olur (Reszka & Rodan, 2004). Ayrıca BF'lar kalsiyum iyonlarıyla şelat yapabilir ve kemik yüzeylerindeki hidroksiapatitlere bağlanabilirler (Rogers, 2003). 2. jenerasyon BF'lar 1. jenerasyona göre 10 ve 100 kat daha etkilidirler ve yan zincirlerinde Nitrojen içerirler (Aledronate, İbandronat, Pamidronat). 3. jenerasyonlar ise 10.000 kat etkilidir ve heterosiklik çemberlerinde Nitrojen içerirler (Risedronat, Zoledronat) (Tablo 2).

Tablo 2:Nitrojen içeren ve içermeyen bisfosfonatlar (Maruotti, Corrado, Neve, & Cantatore, 2012)

Nitrojen İçeren Bisfosfonatlar	Nitrojen İçermeyen Bisfosfonatlar
Aledronat	Etidronat
İbandronat	Klodronat
Risedronat	
Zoledronat	

2.1.4. Bisfosfonatların Etki Mekanizması

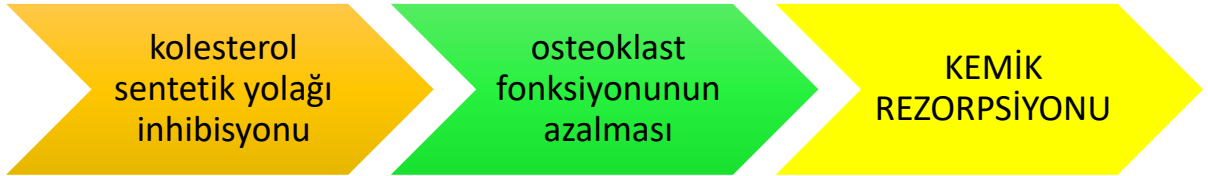
Bisfosfonatlar temel olarak kırık riskini azaltmak ve kemik yoğunluğunun azalmasını engellemek amacıyla kullanılırlar. Bu etkilerini iki yol üzerinden gösterirler. İlk yol osteoklast apoptozisini uyarak osteoklast sayısını azaltmak dolayısı ile kemik rezorpsiyonunu engellemektir (Şekil 2) .



Şekil 2:Bisfosfonatların etki mekanizmaları 1. yol

Diğer yol ise kolesterol sentetik yolağı inhibe ederken osteoklast fonksiyonunun azaltılması böylece de kemik rezorpsiyonun engellenmesidir. Ancak sadece 2. ve 3.

jenerasyon bisfosfonatlar (aledronat, ibandronat, pamidronat, risedronat, zoledronat) bu ikinci yolak üzerinden etki gösterirler (Şekil 3).



Şekil 3:Bisfosfonat etki mekanizması 2. yol (sadece 2. ve 3. kuşak bisfosfonatlar için)

Farmakinetiğine bakıldığında oral bisfosfonatlar gastrointestinal yoldan çok az emilim gösterirler. Biyoverimlilikleri %1 den küçüktür ve yemekle birlikte alındığında bu oran daha da azalır. Biyoverimliliği arttırmak amacıyla gece açlığından sonra kahvaltıdan 30 dakika önce, açken alınmalıdır. Oral bisfosfonatların majör yan etkileri özofajit ve özofagal irritasyondur. Gastrointestinal toksisiteyi azaltmak amacıyla mineralli olmayan bol su ile birlikte alınmalı ve kullanımdan en az 30 dakikaya kadar hastanın dik pozisyonunda kalması sağlanmalıdır (Duman AE, 2005).

Bisfosfonatlar'ın %50'sine yakını kemikte depolanır. Kalan yüzde elli değişmeden böbreklerden atılır. Bu nedenle böbrek komplikasyonu olan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır (Duman AE, 2005).

Yan etkileri incelendiğinde en önemli yan etkisi çene osteonekrozlarıdır (MRONJ). Bu komplikasyon uzun dönem yüksek doz kullanımla daha çok ilişkilendirilmiştir. Diş hekimleri ve oral cerrahları ilgilendiren ve hastanın yaşam kalitesini oldukça etkileyen MRONJ'un tedavisi zorlayıcıdır. Tedavisinden çok oluşumunun engellenmesi esastır, bu nedenle bisfosfonat kullanacak hastaların öncelikle ağız, diş, çene muayenelerinin yapılması önemli bir noktadır (Duman AE, 2005).

Gastrointestinal sistem yan etkileri; özofajit, özofagus irritasyonu, karın ağrısı, ishal olarak sınıflandırılabilir. Bunların dışında özellikle Pamidronat kullanımı sonrası kas ağrısı ve deri reaksiyonları gibi grip benzeri yan etkiler görülebilmektedir (Duman AE, 2005).

2.1.5. Bisfosfonatların Endikasyonları ve Klinik Kullanım Alanları

Bisfosfonatların kullanım endikasyonlarına bakıldığında temel olarak üç ana başlık bulunmaktadır. Bunlar özellikle meme, prostat ve akciğer kanseri hastalarında kemik metastazını engellemek, metabolik kemik hastalıklarında (Paget, ankilozan spondilit, fibröz displazi gibi) durumu yönetmek ve osteoporozda patolojik kırıkları engellemek şeklinde sıralanabilir (Hosking et al., 2007; C Walter et al., 2010). Bunlar dışında Osteogenezis İmperfekta'lı hastalarda kemik fraktürlerinin engellenmesinde, Multipl Myelom'da iskeletsel deformitelerin önlenmesinde ve malignitelere bağlı hiperkalseminin tedavisinde kullanımı mevcuttur (Hosking et al., 2007). Kullanım endikasyonuna ve içeriklerine göre bisfosfonatlar tabloda belirtilmektedir (Tablo 3).

Tablo 3: Bisfosfonat çeşitlerinin endikasyon ve alım yöntemlerine göre sınıflandırılması (Ruggiero et al., 2014)

	PRİMER ENDİKASYONU	NİTROJEN İÇERİĞİ	DOZU	ALIM ŞEKLİ
Alendronat (Fosamax®)	Osteoporoz	Evet	10 mg/gün 70 mg/hafta	ORAL
Risedronat (Actonel®)	Osteoporoz	Evet	5 mg/gün 35 mg/hafta	ORAL
Ibandronat (Boniva®)	Osteoporoz	Evet	2.5 mg/gün 150 mg/ay	ORAL
Pamidronat (Aredia®)	Kemik metastazı	Evet	3 mg her 3 ayda I.V. 90 mg/3 haftada	I.V.
Zolendronate (Zometa®) (Reclast®)	Kemik metastazı Osteoporoz	Evet	4 mg/3 haftada 5 mg/yılda	I.V. I.V.
Denosumab (Xgeva®) (Prolia®)	Kemik metastazı Osteoporoz	Hayır İnsan monoklonal antikoru	120 mg/4 haftada 60 mg/6 ayda	SUBKUTAN SUBKUTAN

2.2. ZOLEDRONİK ASİT (ZOLEDRONAT)

Zoledronik asit diğer adıyla zoledronat 3. jenerasyon Nitrojen içeren aminobisfosfonatlardandır. Osteoklast proliferasyonunu inhibe eder (Coxon et al., 2000) ve apoptotik hücre ölümünü indükler (Benford, McGowan, Helfrich, Nuttall, & Rogers, 2001). Özellikle kemik turnoverının fazla olduğu alanlarda mineralize kemik alanlara olan yüksek bağlanma kapasiteleri sayesinde potansiyel sonuçlarını gösterirler (Nancollas et al., 2006). Farnesil difosfat sentezini inhibe eder. Farnesil difosfat yokluğunda geranjil difosfat üretilemez, bu da osteoklastlardaki GTP bağımlı proteinlerin inhibisyonuna sebep olur. Düşük seviyeli GTP-bağımlı proteinler ise sonuç olarak osteoklast aktivitesini engeller ve apoptozunu uyarır (Benford et al., 2001).

Zoledronik asit insanlarda metabolize edilemez, CYP450 enzimlerini inhibe etmez ve idrarla değişmeden atılır. Bisfosfonatlar aminoglikozidlerle, loop diüretikleri ve nefrotoksisiteye yol açma potansiyeli bulunan diğer ilaçlarla birlikte kullanımı sırasında da dikkatli olunmalıdır.

2.2.1. Zoledronik Asit ve Osteoblastlara Etkisi

Zoledronik asidin osteoblast hücreleri üzerindeki etkilerine bakılacak olursa; Basso ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada zoledronik asidin doza bağımlı olarak osteoblastlar üzerinde sitotoksik etkisinin olduğunu belirtmişlerdir (Fernanda G Basso, Turrioni, Hebling, & de Souza Costa, 2013).

Benzer şekilde Huang ve ark. (2016) yüksek doz zoledronik asidin osteoblastlar üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu ve düşük konsantrasyonlarda ise BMP-2 seviyesini azaltarak osteoblast diferansiyasyonunu baskıladığını göstermişlerdir (Huang et al., 2016).

2.3. İLAÇ KULLANIMINA BAĞLI GELİŞEN ÇENE OSTEONEKROZU (MEDICATION RELATED OSTEONECROSIS OF JAW) (MRONJ)

2.3.1. MRONJ'un Tanımı ve Tarihi / BRONJ-MRONJ-ARONJ

2001 yılına kadar sadece izole BRONJ (Bisphosphonate Related Osteonecrosis of Jaw) (Bisfosfonat ile ilişkili Çenelerin Osteonekrozu) vakaları tanımlanmakla birlikte ilk kez 2003 Marx R.E. zoledronat ve pamidronata bağlı 36 çene osteonekrozu vakası bildirmiştir (Marx, 2003).

2007 yılında Amerikan Oral ve Maksillofasial Cerrahi Derneği (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons) (AAOMSs) bir lezyonun bisfosfonata bağlı çene osteonekrozu olarak sınıflandırılması için (BRONJ) ;

- devam eden veya daha önce bisfosfonat tedavisi geçirmiş olan,
- 8 haftadan daha uzun süre açığa çıkmış maksillofasiyal bölgedeki nekrotik kemik,
- daha önceden radyoterapi tedavisi görmemiş olmak,

olarak üç adet şart belirtmiştir. Vakalarda ağırlı cerrahi veya medikal tedaviye cevap vermeyen maksilla, mandibula veya her iki çenede bulunan kemik açıklıkları görüldüğünü belirtmişlerdir (Force, 2007).

Sonrasında 2014'te güncelleme yapılmış, BRONJ, ilaç kullanımına bağlı çene osteonekrozları (MRONJ) olarak değişmiş ve şartlar;

- devam eden antirezorptif veya antianjiyogenik tedavi,
- 8 haftadan daha uzun süre açığa çıkmış maksillofasiyal bölgedeki nekrotik kemik veya intra-ekstraoral fistülden hissedilen kemik varlığı,
- çene bölgesinden daha önce radyoterapi tedavisi görmemiş olmak ve herhangi bir metastaz bulunmaması olarak güncellenmiştir (Ruggiero et al., 2014).

2015 yılında ise çenelerin antirezorptif ilaca bağlı osteonekrozu (ARONJ) şeklinde uluslararası çalışma grubu tarafından tekrar güncellenmiştir (A. Khan, 2016).

2.3.2. MRONJ'un Sınıflandırılması

Amerikan Oral ve Maksillofasial Cerrahi Derneği'nin 2014 yılında yaptığı sınıflama aşağıdaki gibidir (Ruggiero et al., 2014) (Tablo 4).

Tablo 4: Amerikan Oral ve Maksillofasial Cerrahi Derneği'nin 2014 yılında yaptığı MRONJ sınıflaması

Riskli	Oral veya intravenöz BF kullanımı var. Açıkta görülebilecek nekrotik kemik yok.
0.Evre	Nekrotik kemik klinik bulgusu yok. Nonspesifik klinik bulgular ve semptomlar var.
1.Evre	Ekspoze olmuş nekrotik kemik veya kemiğe ulaşan fistül var. Hasta asemptomatik ve enfeksiyon belirtisi yok.

2.Evre	Ekspoze olmuş nekrotik kemik veya kemiğe ulaşan fistül var. Ekspoze kemik alanıyla ilişkili ağrı ve eritem gibi enfeksiyon bulguları var ancak pürülan drenaj yok.
3.Evre	2. evreye ek olarak aşağıdakilerden bir veya daha fazlasının varlığı: • Alveolar kemiğin ötesine uzanan nekroze kemik varlığı (mandibulanın inferior sınırı, maksiller sinus, zigoma gibi) • Patolojik fraktür, • Ekstraoral fistül, • Oroantral-oronazal ilişki, • Maksiller sinus tabanına uzanan osteolizis.

2.3.3. MRONJ'un Klinik Bulguları

MRONJ'un klinik semptomları arasında diş mobilitesi, kemik rezorpsiyonu, künt ağrı, odontojen sebebi bulunmayan diş ağrısı bulunabilir. Evre 1'e kadar ekspoze nekroz kemik görüntüsü olmadığı için MRONJ tanısı atlanabilir, bu dönemde hastanın anamnezinin alınması özellikle kullandığı ilaçların sorgulanması oldukça önemlidir. Evre 1'den sonra ekspoze nekroz kemik görüntüsü bulunduğu için tanı kolaylaşır; ancak bu durumda da osteomyelit, osteoradyonekroz gibi durumlarla ayırıcı tanının yapılmasının önemi artmaktadır (Şekil 4). Tablo 5'te bu hastalıkların klinik ve radyolojik bulgular açısından karşılaştırılması yapılmıştır (Tablo 5).



Şekil 4:İkinci evre MRONJ klinik tablosu

Tablo 5: Osteoradyonekroz, osteomyelit ve MRONJ'un benzer klinik ve radyolojik bulgularının karşılaştırılması (Fleisher, Kontio, & Otto, 2016)

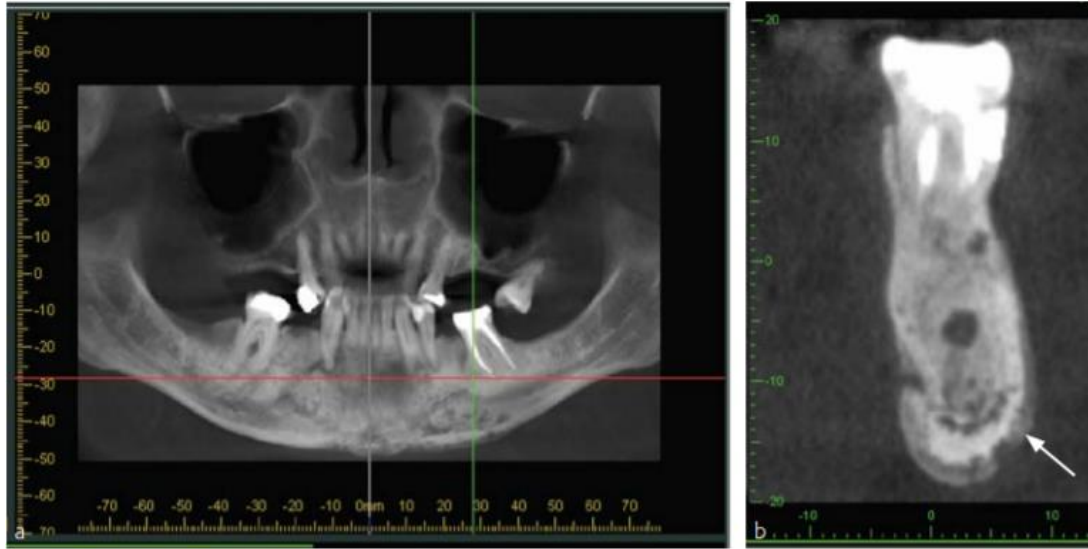
Osteoradyonekroz	Osteomyelit	MRONJ
	Lokal enfekte doku veya	
Hipovasküler, hiposellüler, hipoksik doku	kan dolaşımı sebebiyle kemik enfekte hale gelmiştir	Çene kemiklerinde tutulum yapan bisfosfonat
Kemik iliği fibrotik doku ile yer değiştirmiş	Artmış inflamatuvar hücre sayısı	Kemik ve yumuşak dokuda toksik etki
Limitli inflamatuvar hücre infiltrasyonu	Kemik iliği inflamasyonu ve tromboz	Lokal kemik kan desteğinin azalması
Periost izlenemez, reaktif kemik yapımı yok	Periosteal kemik yapımı görülebilir.	Periost izlenebilir, reaktif kemik yapımı görülebilir.
Neredeyse tüm olgularda mandibula tutulur.	Çoğunlukla mandibulada görülür.	2/3 oranda mandibula tutulumu görülür.

2.3.4. MRONJ'un Radyolojik Bulguları

MRONJ'un radyolojik değişiklikleri nonspesifik olmasına rağmen hastalığın seyri hakkında değerli bilgiler verebilir (Arce, Assael, Weissman, & Markiewicz, 2009). Oral ve maksillofasiyal cerrahi için panoramik görüntüleme standart olmasına karşın cone beam bilgisayarlı tomografilerle (CBCT) karşılaştırıldığında MRONJ lezyonlarının gerçek sınırlarını daha küçük gösterme eğiliminde olabilir (Bianchi, Scoletta, Cassione, Migliaretti, & Mozzati, 2007). Radyolojik bulgular ise:

- osteolizis
- osteosklerozis
- kemik sekestri
- kortikal kemikte bozulma
- periostal reaksiyon
- kalınlaşmış lamina dura
- patolojik kırık

•diş çekimleri alanında gecikmiş kemik remodelingi veya remodelingin olmaması, şeklinde sıralanabilir (Şekil 5).



Şekil 5:Mandibula sol taraf CBCT’de yaygın osteoskleroz ve osteolizis görülüyor (a).Mandibula 1. molar hizasındaki koronal kesit osteolitik değişim ve lateral ve medial korteksler arasında subperiosteal kemik formasyonunu göstermektedir (ok) (Fleisher et al., 2016).

2.3.5. MRONJ Tedavi Yöntemleri

MRONJ’un tedavisinde hastalığın evresi, hastanın genel durumu ve ek kronik rahatsızlıklarının değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Evreye göre önerilen tedavi yöntemleri tabloda belirtilmiştir (Tablo 6) (Ruggiero et al., 2014)

Tablo 6:2014’te AAOMS’un yayınladığı evreye göre önerilen tedavi yöntemleri (Ruggiero et al., 2014)

Evre	Tedavi
0	Antibiyotik ve ağrı kesici medikasyonu
1	- Antibakteriyel ağız gargarası, - Takip, - İlaç kullanımının devamının değerlendirilmesi amacıyla hastanın doktoru ile konsültasyon.
2	- Antibiyotik ve ağrı kesici medikasyonu, - Antibakteriyel ağız gargarası, - Takip, - Yüzeysel debridman (yumuşak doku tahrişini azaltmak amacıyla).
3	- Antibiyotik ve ağrı kesici medikasyonu, - Antibakteriyel ağız gargarası, - Cerrahi debridman veya rezeksiyon.

2.3.5.1. Konservatif Yöntemler

Tedavide başlangıç olarak konservatif tedaviler önerilmektedir. Bu “konservatif MRONJ tedavisi” tanımı; antimikrobiyal ağız gargaraları, etkili bir oral hijyen sağlanması ve eğer klinik olarak endikasyonu bulunuyorsa antibiyotik tedavisini içermektedir. Konservatif cerrahi girişimler ise yüzeysel kemik çıkıntılarının giderilmesi olarak sınıflandırılabilir.

MASCC/ISOO/ASCO’nun (Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology) 2019’da yayınladığı klinik rehberine göre tedaviler tip, kanıt değeri ve öneri derecesine göre sınıflandırılmıştır. Konservatif tedaviler içerisinde olan “yüzeysel kemik çıkıntılarının düzeltilmesi” işlemi tip olarak “resmi fikir birliği”, kanıt değeri olarak “yetersiz”, öneri değeri olarak da “orta derecede önerilir” olarak kategorilenmiştir (Ruggiero et al., 2014).

2.3.5.2. Agresif-Cerrahi Yöntemler

MRONJ başlangıç tedavisine cevap vermiyorsa ve semptomlar devam ediyorsa (inatçı-refraktör MRONJ) agresif cerrahi girişimler denenebilir. Bu girişimler mukoperiostal flap elevasyonu, nekrotik kemiğin blok rezeksiyonu ve yumuşak doku kapatılması olarak sınıflandırılabilir. Asemptomatik kemik ekspozesi olan hastalarda agresif cerrahi girişimler önerilmemektedir. Bu durumlarda mutlidisipliner ekip ile hastanın risk yarar tartışması yapılması önerilir (Yarom et al., 2019).

2.3.5.3. Destekleyici Tedaviler

Konservatif ve agresif cerrahi tedaviler gibi temel tedavi yaklaşımlarının dışında destekleyici tedavi amacıyla büyüme faktörleri ile kemiğin stimüle edilmesi (PRF-Trombositten zengin fibrin kullanımı), düşük doz lazer tedavisi (LLLT-Low level laser therapy) ve hiperbarik oksijen tedavisi (HBO) uygulanabilmektedir (Carey & Palomo, 2008). Konservatif tedaviye ek olarak ozon terapisi, LLLT ve HBO’nun başarı şansını arttırdığı belirtilmiştir (Vescovi et al., 2014).

Bu tedaviler dışında son yıllarda PENT-E (Pentoksifilin ve E vitamini (tokoferol) kombinasyonu) tedavisi özellikle vaka takdimlerinde oldukça tatmin edici sonuçlar ortaya koymuştur (Owosho, Estilo, Huryn, & Yom, 2016). Ayrıca teriparatid ile de tedavi edilen vakalar bildirilmiş ancak osteosarkom, hiperkalsemi, metastatik kemik rahatsızlığı

olan hastalarda kontrendike olması nedeniyle özellikle çok dar bir terapötik aralığı olduğu vurgulanmıştır (Jung et al., 2017).

Destekleyici tedaviler arasında hastalara besin veya vitamin takviyesi yapmak bugüne kadar çalışılan konular arasındadır. Özellikle osteoporoz ve kemik metabolizması üzerine etkilerinin detaylı olarak incelendiği D vitamini bu konuda oldukça popüler olmuştur. Lorenzo ve ark. (2018) yaptıkları çalışma sonucunda D vitamini takviyesinin her hastada ölçüm yapılması şartıyla MRONJ’u önleyebileceğini bildirmiştir (Lorenzo-Pouso, Pérez-Sayáns, García, & Carballo, 2018). Benzer şekilde de melatoninin etkilerini araştırmak amacıyla Camacho ve ark. (2017) in vitro bir çalışma yapmış ve melatoninin zoledronik aside karşı osteoblastlar üzerinde sitoprotektif etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir (Camacho-Alonso, Urrutia-Rodríguez, Onate-Cabrerizo, Oñate-Sánchez, & Rodríguez-Lozano, 2017). Araştırmamız bu bağlamda, D vitamini ve melatoninin, zoledronik asidin osteoblastlar üzerinde yarattığı toksik etkiye karşı koruyucu veya enfeksiyon önleyici olarak kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla yapılan ilk in vitro çalışmadır.

2.4. D VİTAMİNİ

2.4.1. D Vitamininin Tanımı ve Metabolizması

D vitamini insanda UVB ışınları sayesinde deride üretilebilen, kemik metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan en önemli hormonlardan biridir. Kalsiyum ve fosforun fizyolojik olarak düzenlenmesini sağlar. Besinsel kaynağı azdır, besinlerle birlikte dışarıdan alınması gerekir; ancak dokuda üretilip kan dolaşımına geçebilmesi ve diğer dokular üzerinde etki yapabilmesi sebebiyle vitamin değil daha çok steroid bir hormon olarak isimlendirilir (Erdem & Akbas).

Yapı olarak bakıldığında kolesterole yakındır. Dışarıdan alınan formu ergokalsirefol yani D2 formudur, deride sentezlenen formu ise kolekalsiferol yani D3 formudur. D2 formu, D3 formuna göre D vitamini bağlayıcı proteine (DVP) daha zayıf bağlanır, bu yüzden plazmadaki yarılanma süresi daha kısadır ve dolaşımdan daha çabuk elemine edilir.

İnsanda D vitamini sentezi 90-95% oranında UVB ışınları yardımıyla üretilmektedir ve bu üretim deride gerçekleşmektedir. Bu üretim sonunda oluşacak D3

miktarında gelen güneş ışınının zirve açısı önemli bir rol oynar. D vitamininin sentezi ve metabolizması incelendiğinde birçok aşamadan oluştuğu gözlenmektedir.

Kolesterol sentezi bittikten sonra elde edilen kolesterol molekülü 7dehidrokolesterole (7DHC) çevrilir ve bu işlem karaciğerde gerçekleşir. Elde edilen 7dehidrokolesterol dolaşıma geçerek derideki malphigi tabakasına gelir, güneş teması süresince (7DHC)'daki çift bağlarda Ultraviole (U.V.) ışınları emilir. Böylece inaktif provitamin D3, D vitaminine (previtamin kolekalsiferol) çevrilir (Erdem & Akbas).

Dönüştürülen previtamin kolekalsiferol karaciğerde, adele dokusunda ve yağ dokuda depolanır. Fazla üretilen D3, UVB ışınlarının da etkisiyle inaktif formlara yani D1 ve D5'e geri dönüştürülür böylece fazla D vitamini üretimi engellenir ve metabolizma D vitamini intoksikasyonuna karşı korunmuş olur.

Karaciğerde 25 hidroksilasyon işlemi sonucunda D vitamini 25hidroksiVitaminD'ye dönüştürülür, bu form kan dolaşımında D vitamininin en sık bulunan formudur. Bu formun hücre içine girmesini sağlayan D vitamini bağlayıcı proteinlerdir (DBP). Hücre içinde ise 1alfaHidroksilaz(1a(OH)az) enzimi sayesinde 25OHD 1,25dihidroksiVitaminD'ye dönüştürülür. Bu biyolojik olarak D vitaminin aktif formudur. Bu form hedef organlardaki etkilerini vitamin D reseptörüne bağlanarak gösterir (VDR). 1,25dihidroksiVitaminD ve VDR kompleksi hücre çekirdeğine bağlanır bu bağlanma retinoik asit X reseptörü (RXR) ile olur. Üçü birlikte, DNA üzerindeki VDRE'ye bağlanır. Bu işlemler sonucunda bağırsaklardan emilim sağlanmaktadır. Böbreklerde üretilen aktif D vitamini; Ca (Kalsiyum), P (Fosfor) ve PTH (Paratiroid hormon) seviyelerine göre 1a(OH)az enzimi ile düzenlenir. Dolaşımdaki vitaminin bir bölümü karaciğerde 25(OH)D₃ e veya 25(OH)D₂' ye dönüştürülür. Depolanmayan kısım 25(OH)D₃'e dönüştürülerek dolaşıma geçer. Az bir kısım da karaciğer hücrelerinde glukronize olur, safra ile bağırsağa taşınır, ileumdan tekrar emilir. Buna enterohepatik dolaşım denir. Kanda bulunan 25(OH)D₃ ve 25(OH)D₂ böbreğe gelir, burada proksimal tübüler hücrelerde 1,25(OH)₂D₃ veya 1,25(OH)₂D₂'ye dönüştürülür ve bu dönüşüm hidroksilaz enzimi sayesinde olur. Ve aktif D vitamini metaboliti oluşur (Erdem & Akbas).

2.4.2. D Vitamini Osteoblast ve Kemik İlişkisi

Osteoblastlar kemiğin temel hücreleridir; fibroblastlar, adipositler ve kondrositler gibi mezenkimal kök hücrelerden kaynak alırlar. 1,25(OH)₂D₃ insan osteoblast

diferansiyasyonunda, osteoblastların aktivite kontrolünde, kemik formasyonu ve kemik rezorpsiyonu üzerinde direkt olarak etki göstermektedir (Pols & van Leeuwen, 2004).

Osteoblastlar üzerinde vitamin D reseptörlerinin olması, 1a,25dihidroksivitamin D₃ (1a,25D₃)'ün hücre üzerinde direkt olarak etki gösterebilmesini sağlar. Fakat bu etkinin büyüklüğü diğer pek çok etkene bağlıdır. Vitamin D osteoblastların diferansiyasyonu ve mineralizasyonu kadar proliferasyonunu da etkiler. Bu etkileşim süre, dozaj ve osteoblastların orjinleri tarafından değişebilmektedir. Vitamin D insan ve rat osteoblastlarında diferansiyasyon ve mineralizasyonu stimule ederken murin osteoblastlarında inhibitör etki gösterir (Van Driel & Van Leeuwen, 2014).

Vitamin D reseptörleri osteoblastlardaki gen ekspresyonlarını düzenlerken, Tip 1 kollajen oluşumunu baskılar, kemik matriks proteinleri, osteokalsin ve osteopontin proteinlerinin oluşumunu artırır. D vitamini RANK ligandının (RANKL) sentezini artırır, RANKL paratiroid hormon ile birlikte çalışarak osteoklastların aktivitesini ve diferansiyasyonunu artırır bu sayede kemik rezorpsiyonunu düzenler (Fauci, 2008).

Vitamin D, Calbindin 9K'nın en önemli indükleyicisidir. Calbindin 9K ince bağırsakta bulunan Ca bağlayıcı bir proteindir ve kalsiyumun eritrositlerden aktif taşınmasında önemli bir rol üstlendiği düşünülür. TRPV5 ve TRPV6 (transient receptor potential vanilloid) da D vitaminine duyarlı olan kalsiyum taşıyıcılarıdır ve bağırsak epitelinde bulunurlar. D vitamininin aktif formu bu iki geni ve diğer genleri uyarak intestinal kalsiyum emilimini artırır. Tüm bunlar göz önüne alındığında vitamin D kalsiyum metabolizmasında oldukça önemli bir rol oynar (Fauci, 2008).

Vitamin D reseptörü paratiroid bez üzerinde de bulunmaktadır. Bu bezden salgılanan parathormon (PTH) kemikteki reseptörlerine bağlanarak kandaki kalsiyum konsantrasyonunu artırır. Yine benzer şekilde böbrekteki reseptörlerini de uyarak kalsiyumun bağırsaktan geri emilimini artırarak kandaki kalsiyum seviyesini yükseltir (Fauci, 2008).

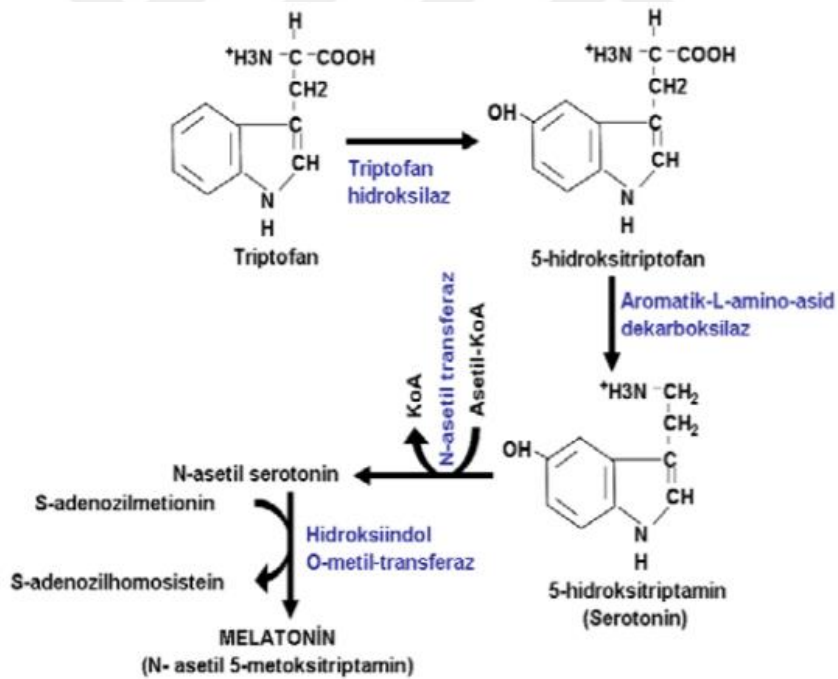
D vitamini düzeyi 150 ng/ml'nin üzerine çıktığında D vitamini intoksikasyonu oluşur. Hastalarda hiperfosfatemi, hipertansiyon, iştahsızlık, hiperkalsemi, damar kalsifikasyonu, hiperkalsiüri, nefrokalsinoz ve böbrek yetmezliği görülebilmektedir (Burtis, Ashwood, & Bruns, 2012).

2.5. MELATONİN

2.5.1. Melatoninin Tanımı ve Metabolizması

N- asetil 5-metoksi triptamin olarak bilinen melatonin hormonu pineal bezden gece saatlerinde salgılanır ve bioritminin (sirkadiyen ritim) düzenlenmesinde rol oynar (Claustrat, Brun, & Chazot, 2005). Melatonin, triptorandan sentezlenir ve salgılanması pinealositler tarafından gerçekleştirilir. Bu hücrelerin melatonin salgılaması ışık ile durur. Dolayısı ile melatonin hormonu gece 23:00–05:00 zamanlarında pik yapar ve kan konstantrasyon düzeyleri normalin 3-10 katına çıkar (Akın, 2003).

Dolaşımdaki triptofan epifiz bezine gelir ve burada triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenir. Oluşan 5-OH triptofandan L-aromatik dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubu ayrılır ve böylece serotonin meydana gelir. Pinealositler içerisinde serotonin N-asetil serotonine ve sonrasında da melatonine dönüştürülür (Özgüner Fehmi 1995) (Şekil 6).



Şekil 6: Melatoninin üretimi

Melatonin üretiminin %80'i pineal yani epifiz bezinde gerçekleştirilirken plateletler, retina, lakrimal bezler ve eritrositlerden de melatonin sentezi yapılabildiği bildirilmiştir (Cardinali DP, 1998).

Melatonin karaciğerde metabolize olur, 6-hidroksimel'e dönüştürülür ve bu şekilde idrarla atılır. İdrarda melatonin 6-hidroksimel tetkiki özellikle çocuklarda pineal bezin işlevinin değerlendirilmesi için kullanılır (S M Webb 1995).

Melatoninin MT1, MT2 ve MT3 olmak üzere üç adet reseptörü vardır. Bu çeşitlilik sayesinde farklı dokularda farklı etkiler gösterebilir. İşlevlerine baktığımızda sirkadiyen ritm dışında, homeostazisi sağlar, linoleik asitin hücre içerisine girmesini sağlayan reseptörleri azaltarak antikarsinojenik etki gösterir, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{H}_2\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{HOCl}$, $\cdot\text{NO}$, ONOO gibi radikalleri temizleyerek direkt antioksidan etki oluşturur (Salt, 2017). Bunun dışında daha fazla birçok etkisinin olduğu düşünülmekte ve hala bu etkinlikleri yoğun olarak araştırılmaktadır.

2.5.2. Melatonin Osteoblast ve Kemik İlişkisi

Melatoninin kemik dokusu üzerindeki etkileri direktir. Melatonin salgısının baskılanması serum kalsiyum seviyesini düşürür, melatonin uygulaması ise bu seviyeyi artırır. Ovariectomi yapılmış sıçanlarla yapılan bir hayvan deneyi sonuçlarına göre melatonin uygulaması bu sıçanlardaki kemik kaybını azaltmıştır. Melatoninin kemik üzerindeki bu etkilerini otokoidler üzerinden ve kemik matrix proteinlerini arttırarak yaptığı düşünülmektedir (Ostrowska et al., 2002).

Osteoblastik bir protein olan osteoprotegerin melatonin ile artmıştır. Günümüzde yaygın olarak postmenapozal dönemde osteoporozla karşı kullanılan bisfosfonatlara ilave olarak melatonin uygulamasının gerek direkt kemik üzerine olumlu etkileri ve gerekse bu ilaçlara bağlı yan etkileri azaltarak kemik koruyucu etkiyi güçlendirebileceği düşünülmektedir. Nitekim alendronatın neden olduğu gastrik hasara karşı melatoninin koruyucu etkisi gösterilmiştir (Sener et al., 2005).

2.6. DENEYDE UYGULANAN TESTLER

2.6.1. Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum (MTT) Test Yöntemi

MTT testi hücresel canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksissiteyi değerlendiren enzimatik bir test yöntemidir (Vellonen, Honkakoski, & Urtti, 2004). Mossman tarafından bulunup geliştirilmiştir (Kumar, Nagarajan, & Uchil, 2018). Testin mekanizması sarı renkli tetrazolium tuzlarının [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] hücreler tarafından hücre içerisine alınması ve "süksinat dehidrogenaz" isimli bir mitokondriyal enzim tarafından parçalanması esasına dayanır.

Ortaya çıkan tetrazolium formazan (1-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan) mor renkli ve suda çözünmeyen bir yapıdır (van de Loosdrecht, Nennie, Ossenkoppele, Beelen, & Langenhuijsen, 1991). Tetrazolium formazan DMSO gibi organik bir çözücüde çözüldüğünde grupların optik yoğunlukları bir spektrofotometre ile ölçülerek belirli değerler elde edilir (Holst-Hansen, 1998).

“Süksinat dehidrogenaz” mitokondriyal bir enzim olduğu için mitokondriyal aktivitesi fazla olan, aktif ve canlılığı yüksek olan hücreler tetrazolium formazan oluşumu ile doğru ilişkili şekilde ilişkilendirilir.

Bu testteki formazan kristallerinin yoğunluğu kültürün yapısında ve hücre serilerine göre değişiklik gösterebilir. Bu nedenle özellikle pH ve besiyerinin glikoz değerleri açısından titizlikle optimize edilmiş olması gerekmektedir.

MTT test sonuçlarının gruplararası karşılaştırılmasında değerin yüksek olduğu grupta hücre canlılığı ve proliferasyonun yüksek, sitotoksitenin düşük olduğu varsayılır. Çalışmamızda hücre canlılığı ve proliferasyonunu değerlendirmek amacıyla MTT test yöntemini kullandık.

2.6.2. ELISA Testleri: ALP, Caspase-3 ve IL-8

Kemik yapımı ve remodeling esnasında osteoblastlar arasında bulunan osteoid yapının üzerine Ca (Kalsiyum) tuzları çöker, bu sayede kemiğin organik matriksi mineralize olur ve direnci artar. Bu çökme işleminin öncesinde osteoblastlar sitoplazmalarında ALP (Alkalen Fosfataz) sentezler ve hücre dışına gönderir. Bu sebeptendir ki Alkalen fosfataz (ALP) kemik mineralizasyonunun ana belirteçlerinden biridir (Fedde, 1992). ALP sadece Ca tuzlarının çökmesi işleminde görev almaz aynı zamanda kolajen fibrillerin oluşmasında da yardımcı olur.

Kemik yapımının önemli bir markerı olan ALP aslında osteoblastın hücre membranındadır ve bu yapım esnasında kana salınır. Paget hastalığı, osteomalazi ve raşitizm gibi kemik metabolizması bozukluklarında tedaviye yanıtı belirler, travma durumlarında iyileşme takibinde izlenilir (Franz-Odenaal, Hall, & Witten, 2006). Osteoblastlar kemik matriksini depolama esnasında yüksek düzeyde ALP salgırlar (Delmas et al., 2000).

Ortamdaki ALP düzeyi ile aktif bir kemik yapımı ve minerilizasyon arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu düşünülür. Biz de çalışmamızda aktif kemik yapımını görüntülemek amacıyla ALP testi yapmayı planladık.

Caspase proteinleri (cysteine aspartate specific proteases) proteaz enzimlerdir. 14 tane izoformu bulunmuştur ve 3 ayrı grupta incelenirler. Bunlar; başlatıcı, etkileyici ve inflamatuvar caspaselardır. Bu ailedeki Caspase-3 programlı hücre ölümü yani “apoptoz” un göstergesidir. Dolayısı ile ortamdaki Caspase-3 düzeyi ile apoptozun doğru ilişkili olduğu düşünülür (Coşkun & Özgür, 2011).

Apoptoz mekanizmasına bakıldığında caspase proteinleri, bax ve p53’ün önemli rolü bulunmaktadır. Caspase proteinleri temel olarak başlatıcı ve efektör olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Hücrede sitozolde yer alan caspaselar sistein proteazlar olarak da isimlendirilirler. Asıl görevleri DNA polimeraz enziminin aktive olmasını engellemek böylece hücreyi apoptoza sürüklemektir. Bir patolojik durum oluştuğunda caspaselar aktive olur ve apoptoz aktive edici faktör 1 (apaf-1)’i tetikler, mitokondriden sitokrom c serbestlenir. Oluşan apaf-1 ile sitokrom c ve caspase-9 birleşir böylece apoptozomu oluşturur. Apoptozom ise caspase-3’ü aktifleyerek hücreyi apoptoza götürür (Abedin, Wang, McDonnell, Lehmann, & Kelekar, 2007).

Görüldüğü gibi caspase-3 proteini apoptozun son basamağı olup en etkili göstergelerinden biridir. Bu sebeple çalışmamızda osteoblastların apoptoz etkinliğini incelemek adına caspase-3 tayinini seçtik.

Pro inflamatuvar ve nötrofil kemoatraktanı olarak bilinen bir sitokin olan IL-8 in direkt olarak kemik yapıcı etkileri baskıladığını belirtilmiştir (Bendre et al., 2003), (Rothe et al., 1998). Dolayısı ile ortamdaki IL-8 konsantrasyonu ile kemik yapımının ters ilişkili olduğu düşünülmektedir.

2.6.3. Tezde İncelenen Gen Expresyonları: BMP-2, RUNX-2, OSX

Kemik morfogenetik proteinler “transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β)” ailesinin üyesidirler. Bu sınıfta 10 adet protein yer alır. Kemik Morfogenetik protein-2 (BMP-2) osteoblast diferansiyasyonunu stimüle ettiği için kemik yapımının güçlü indükleyicileri arasında yer alır (Reddi, 1998). BMP-2 nin hedef genleri iskelet gelişiminde önemli role sahip transkripsiyon faktörleri olan RUNX-2 ve Osterix’tir (Reddi, 1998).

BMP-2 sinyal yolağı Osterix ve RUNX-2 gibi temel kemik transkripsiyon genlerinin çalışmasını indükler. Çinko azlığı gibi BMP-2 sinyalini azaltıcı durumlarda kemiğe spesifik transkripsiyon faktörlerinin (RUNX-2, OSX) ekspresyonlarının da azaldığı görülmüştür (Cho & Kwun, 2018).

BMP proteinleri osteogeneziste temel rol oynayan biyolojik faktörlerden biridir. BMP proteinler transforme büyüme faktörleri (TGF- β) ailesinden olup kemik matriksinin sentezi, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunda görevlidir (Garrison et al., 2010; Kugimiya et al., 2005).

BMP proteinleri kemik dokusu formasyonunu mezenkimal kök hücreleri osteoblastik ve kondroblastik hücrelere farklılaştırarak gerçekleştirir (Yilgor, Tuzlakoglu, Reis, Hasirci, & Hasirci, 2009). Kemik dokunun morfogenezine en etkili proteinler BMP-2 ve BMP-7 'dir (Bessa, Casal, & Reis, 2008). Diğer BMP'ler gibi BMP-2'nin kıkırdak ve kemik doku gelişiminde özellikli bir rolü bulunmaktadır (Chen, Zhao, & Mundy, 2004). Ayrıca BMP-2'nin BMP'ler içerisinde osteoindüktif özelliği en fazla olan protein olduğu tespit edilmiştir (Groeneveld & Burger, 2000).

Suzuki ve ark. (1995) yaptığı çalışmada BMP-2'nin bulunduğu yerler olarak; çene kemikleri, düz ve çizgili kaslar, trakeal epitel, gelişmekteki diş germini belirtmiştir. Embriyojenik yapıda olan hücrelerin BMP'lere yanıt vererek kıkırdak ve kemik hücrelerine dönüşmesi BMP'leri iskelet sisteminin temel elemanlar arasına sokmaktadır (Mishina, Suzuki, Ueno, & Behringer, 1995).

Osterix kısaltmasıyla OSX, kemik formasyonu ve osteoblast diferensiyasyonu için esansiyel bir osteoblast-spesifik transkripsiyon faktörüdür. Osteoblast merkezli kemik formasyonunu ve osteoklast ilişkili kemik remodelingini kontrol eder. OSX mutant embriyolarında, bu genin ekspresyonu için gerekli olan belirli genler bozulduğunda, kemik oluşamadığı gözlenmiştir (Wang, Liao, & Cao, 2016).

OSX preosteoblastların osteoblast ve osteositlere dönüşme sürecinde görev alan, osteoblastlara özel bir transkripsiyon faktörüdür. OSX mutantı embriyolar kemik doku oluşturmamakta ve osteoblastlara özgü genleri eksprese edememektedirler. Doğum sonrası OSX inaktivasyonu gerçekleştirilen farelerde yeni kemik formasyonu, mineralize kıkırdak rezopsiyonu, osteosit fonksiyon ve maturasyonu gerçekleşmemektedir (Sinha & Zhou, 2013).

Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX-2) diğer adıyla “core-binding factor subunit alpha-1 (CBF-alpha-1)” insanlarda RUNX’ geni ile kodlanmış bir proteindir. RUNX-2 osteoblast diferansiyasyonu ile ilişkilendirilen ana faktördür (Komori, 2019).

RUNX-2 erken osteoblast soy hücrelerini ve osteoblastogenezisin birincil belirleyicisi olarak ifade edilen bir transkripsiyon faktörüdür. Kemik dokusunun gelişimi yetişkinlerde mineral dengesi ve kemik kütlesi ile birlikte osteoblast hattında düzenlenen bir süreçtir. Kemiği forme eden hücrelerin alt popülasyonunu ile karakterize olarak bu aşamaya özgü fenotipleri elde etmesiyle, oldukça düzenlenmiş bir farklılaşma programı yoluyla ilerler (Komori, 2011). Osteoblastların farklılaşması ve oluşumunun bir kısmı RUNX-2 geninin ekspresyonu ile gerçekleşmektedir (Lian et al., 2006; Long, 2012).

Farelerde bu genin ablasyonunun iskeletsel mineralizasyonunun gerçekleşmemesi ve diş gelişimin tomurcuk aşamasında kalması ile karakterize olduğu gösterilmekle beraber insandaki işlevinin bozulmuş olması kleidokranial displazi ile sonuçlanmaktadır (Hecht et al., 2007; Otto, Kanegane, & Mundlos, 2002).

RUNX-2 osteoblastogeneziste kompleks bir gen regülasyon ağını kontrol etmektedir (Vaes et al., 2006). OSX dahil olmak üzere çeşitli osteoblast soyuna özgü genler olan OSX (Osterix), Ocn (osteokalsin) ve Bsp (kemik sialoprotein)’i arttırırken non osteoblast genleri de ki bu genlerin bir kısmı olan PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) and MyoD (myogenic differentiation)’ı baskılamaktadır (Gersbach, Byers, Pavlath, & García, 2004; Jeon et al., 2003; Zhang et al., 2012). Çalışmalar RUNX-2’nin çoklu düzenleyici faktör sınıflarıyla etkileşerek gen ekspresyonunu kontrol ettiğini göstermiştir (Schroeder, Jensen, & Westendorf, 2005).

Bu zamana kadar ki çalışmalarla elde edilen veriler sonucunda meme ve prostat kanserleri gibi çeşitli solid tümörlerin RUNX-2 eksprese ettiğini ve RUNX-2 ekspresyonunun kemik metastazı gelişimi ve ardından osteoliz ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir (Akech et al., 2010; Khalid et al., 2008; Sase et al., 2012; Van der Deen et al., 2010).

Araştırmalar, RUNX-2 proteininin, kemik oluşturan hücrelerin (osteoblastlar) gelişiminde ve dişlerin gelişiminde rol oynayan bir dizi diğer geni düzenleyen bir "anahtar" görevi gördüğünü ortaya çıkaracak kanıtlar sunmaktadır. RUNX-2 geninin bir segmentinin fazladan bir kopyası (duplikasyonu), metafizeal displazi, maksiller hipoplazi ve brakidaktili adı verilen bir bozukluğa neden olur. Bu durum, uzun kemiklerin uçlarına

yakın anormallikler (metafizler), az gelişmiş üst çene kemiği (maksilla) ve kısa parmaklar (brakidaktili) ile karakterizedir. Bu bozuklukta başka iskelet anormallikleri de ortaya çıkabilir (Bruderer, Richards, Alini, & Stoddart, 2014).

Paratroid hormonu RUNX-2'nin ekspresyonunu arttırırken vitamin D de RUNX-2 hedef hücrelerini regüle etmektedir (Jensen, Gopalakrishnan, & Westendorf, 2010; Stein et al., 2004).

Bu bilgiler doğrultusunda ortamda BMP-2, RUNX-2 ve OSX ekspresyonlarının artması kemik yapımı, osteoblast proliferasyonu ve diferansiyasyonunda artma olarak ilişkilendirilebilir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı ile İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Bölümü'nün işbirliği ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, melatonin ve D vitamininin, zoledronik asit (ZA) uygulanmış osteoblastların canlılık, proliferasyon ve toksisite değerleri üzerindeki etkilerinin BMP-2, RUNX-2, OSX gen ekspresyonları, ALP, caspase-3 ve IL-8 ile araştırılması amaçlanmıştır.

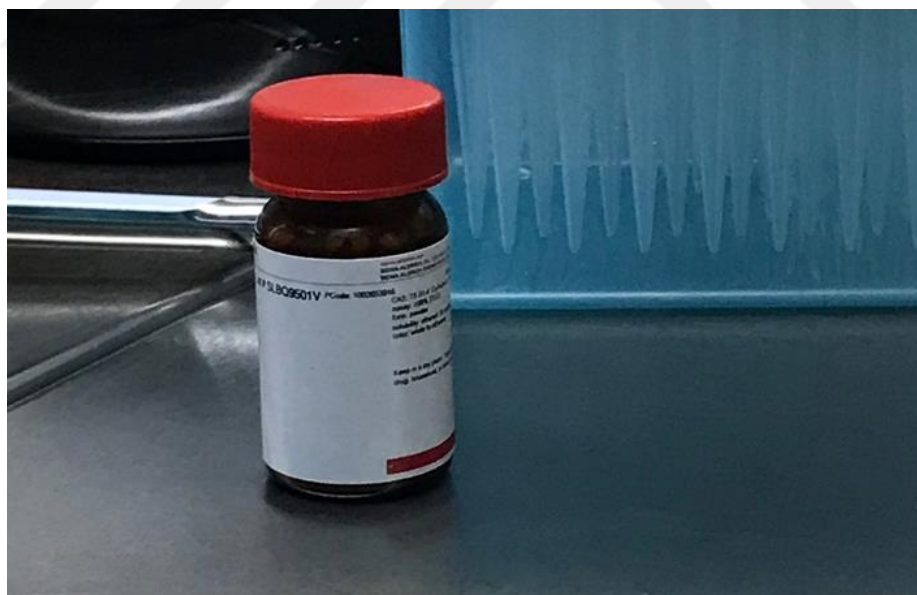
Deneyde kullanılan D vitamini, “1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 $\geq$ 99% (HPLC)” özelliğindedir ve “Sigma-Aldrich” tarafından temin edilmiştir (Şekil 7).

Deneyde kullanılan melatonin, “Melatonin powder, $\geq$ 98% (TLC)” özelliğindedir ve “Sigma-Aldrich” tarafından temin edilmiştir (Şekil 8).

Deneyde kullanılan zoledronik asit, “Zoledronic acid monohydrate $\geq$ 98% (HPLC), $\geq$ 98% (TLC)” özelliğindedir ve “Sigma-Aldrich” tarafından temin edilmiştir (Şekil 9).



Şekil 7: 1α,25-Dihydroxyvitamin D3 ≥99% (HPLC) Sigma-Aldrich



Şekil 8: Melatonin powder, ≥98% (TLC) Sigma-Aldrich



Şekil 9:Zoledronic acid monohydrate $\geq 98\%$ (HPLC), $\geq 98\%$ Sigma-Aldrich

Deneyde kullanılan osteoblast hücre kültürleri insan kaynaklı sürekli osteoblast hücre kültürleridir (hFOB 1.19) ve American Type Culture Collection (ATCC®), (Rockville, MD, USA) tarafından temin edilmiştir.

3.1. DENEY GRUPLARI

Deney, 8 ana grup ve bu grupların farklı konsantrasyonlarını içeren 18 alt gruptan oluşmaktadır. Her alt grup 24 ve 48.saatlerde in vitro olarak incelenmiştir. Böylece 36 grup elde edilmiştir. ZA konsantrasyonları 10 ve 50 μ M olacak şekilde iki grup olarak oluşturulmuştur. D vitamini de 10 ve 100 μ M olacak şekilde iki konsantrasyonda kullanılmıştır, melatonin ise 40 μ M konsantrasyonda tek grup olarak çalışılmıştır.

1. Grup (kontrol grubu)

Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne herhangi bir ek yapılmamıştır.

2. Grup (ZA 10-50 μ M)

a)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 10 μ M Zoledronik Asit eklemesi yapılmıştır.

b)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 50 μ M Zoledronik Asit eklemesi yapılmıştır.

3. Grup (ZA 10-50 μ M + M + D 10-100 μ M)

a)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 10 μ M Zoledronik Asit, 40 μ M melatonin ve 10 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

b)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 10 μ M Zoledronik Asit, 40 μ M melatonin ve 100 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

c)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 50 μ M Zoledronik Asit, 40 μ M melatonin ve 10 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

d)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 50 μ M Zoledronik Asit, 40 μ M melatonin ve 100 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

4. Grup (ZA 10-50 μ M + M)

a)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 10 μ M Zoledronik Asit, 40 μ M melatonin eklemesi yapılmıştır.

b)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 50 μ M Zoledronik Asit, 40 μ M melatonin eklemesi yapılmıştır.

5. Grup (ZA 10-50 μ M + D 10-100 μ M)

a)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 10 μ M Zoledronik Asit, 10 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

b)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 10 μ M Zoledronik Asit, 100 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

c)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 50 μ M Zoledronik Asit, 10 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

d)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 50 μ M Zoledronik Asit, 100 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

6. Grup (M)

a)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne yalnızca 40 μ M melatonin eklemesi yapılmıştır.

7. Grup (D10-100 μ M)

a)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne yalnızca 10 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

b)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne yalnızca 100 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

8. Grup (M+D10-100 μ M)

a)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 40 μ M melatonin ve 10 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

b)Bu grubu oluşturmak amacıyla ilgili kuyucuktaki osteoblast hücre kültürüne, 40 μ M melatonin ve 100 μ M D vitamini eklemesi yapılmıştır.

3.2. DENEY AŞAMALARI

3.2.1. Deney Medium'unun Hazırlanması

- 50 ml Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific), (Ebsdorfergrund, Germany)
- 500 ml F12 Medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Wisent Bioproducts), (Quebec, Canada)
- 1,5 ml G418 Geneticin (InvivoGen) (Toulouse, France),

içerikleri üretici firmanın (American Type Culture Collection (ATCC®), (Rockville, MD, USA) önerileri doğrultusunda karıştırılarak hücre besiyeri hazırlandı.

Elde edilen kültür vasatı, steril filtrasyon sistemi yardımıyla filtre edildi ve ana stok haline getirildi. Deney içerisinde kolay kullanım sağlamak amacıyla falconlara bölündü ve +4 °C’de soğutucu içerisinde bekletildi.

3.2.2. Hücre Ekimi ve Pasajlama

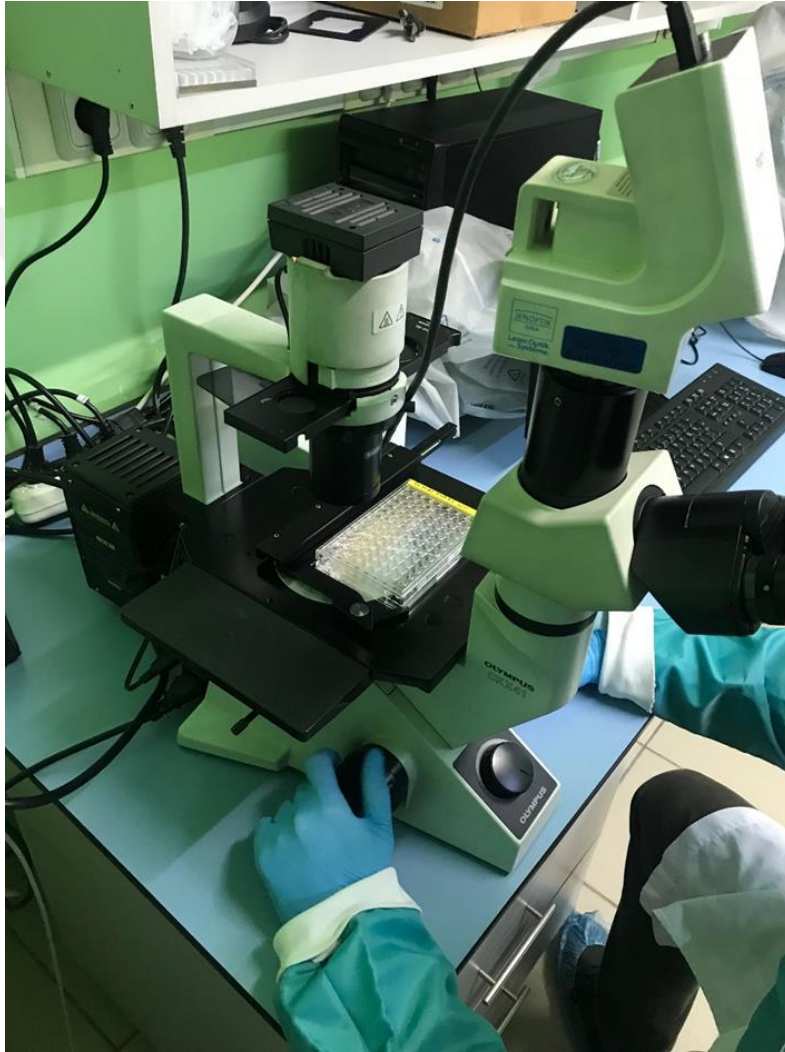
Sıvı azot tankından 2 ml’lik tüpler halinde çıkartılan insan osteoblast hücreleri, çözünebilmesi için +37°C sıvı banyosunda (Mettler GmbH + Co., Germany) 2 dakika süreyle çözdürüldü.

Hücreden 1 ml alınarak 9 ml medium üzerine eklendi. Oluşan karışım 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi (Şekil 10). Santrifüjden sonra süpernatant atılarak pellet medium içerisinde çözdürüldü. Medium içerisinde çözdürülen hücreler 75 cm³’lük hücre flusklarına ekildi. Hazırlanan 4 adet flusk % 5 CO₂ ve %95 atmosferik hava içeren, 37°C buhara doymuş CO₂ inkübatörüne (İnkübatör Thermo Form Direct Heat, USA) yerleştirildi.



Şekil 10:Hettich® ROTINA 38/38R santrifüj makinesi (Sigma- Aldrich)

Hücreler Pazartesi, Çarşamba ve Cuma günleri olmak üzere pasajlandı. Pasajlama sürecinde medium çekildikten sonra flusk PBS (phosphate buffered saline) ile yıkandı. Yapışan hücre tipinde olan hücelere Tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı. Daha sonra hücreler falkona alınarak medium ile tripsinin etkisi seyreltildi ve santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak pellet taze mediumda çözdürüldü ve yeni fluska alındı. Bu süreçte hücrelerin mikroskop altında yoğunlukları ve yüzey yapışkanlıkları değerlendirildi ayrıca mantar ve bakteri kontaminasyonuna karşı incelendi (Şekil 11).



Şekil 11: Mikroskop altında kuyucukların incelenmesi

Sonrasında 4 adet flusk içerisindeki medium pipetler ile çekilerek atıldı. Geride kalan mediumun uzaklaştırılması amacıyla flusklar 5 ml PBS (Wisent Bioproducts), (Quebec, Canada) ile yıkandı. Yıkama yapılan PBS tekrar pipetlerle çekilerek döküldü.

Flusk yüzeyine yapışan osteoblastların serbest-yüzer hale geçmesi için 25 cm³'lük 4 adet fluska her birine 3 ml olacak şekilde Trypsin-EDTA (%0,05 Trypsin, PBS ile çözülmüş EDTA, Biochrom KG, Seromed, Berlin, Trypsin-EDTA Solution) ve 7 ml medium eklendi ve inkübatörde 5 dakika bekletildi. Bekleme sonrası pipetaj yapılarak tüm hücrelerin homojen bir şekilde yüzmesi sağlandı.

4 adet 75'lik flusktaki 10'ar ml'lik karışım 40 ml olacak şekilde bir falconda birleştirildi. Bu karışımın içerisinde 1 ml örnek alındı ve hücre sayımı için ViCell™ (Vi-Cell XR, Beckman Coulter, USA) (Şekil 12) cihazına yerleştirildi. Yapılan ölçümler sonucunda hücre canlılığı %90,6 1 ml deki hücre sayısı da 730.000 olarak hesaplandı.



Şekil 12: Vi-Cell XR™, Beckman Coulter, USA

Örneğin alındığı toplama falconu sonrasında 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip hücrelerin tabana çökmesi sağlandı (Şekil 13). Üst tabakada kalan sıvı döküldü ve tabana yapışan osteoblastların serbest hale gelmesi için falcona vuruldu ve yeni medium 40 ml olarak eklendi. Böylece 40 ml’inde 29.2 milyon osteoblast olacak şekilde ana hücre stoğu hazırlanmış oldu.



Şekil 13:Santrifüj sonrası dibe çöken ve tabana yapışan osteoblastlar

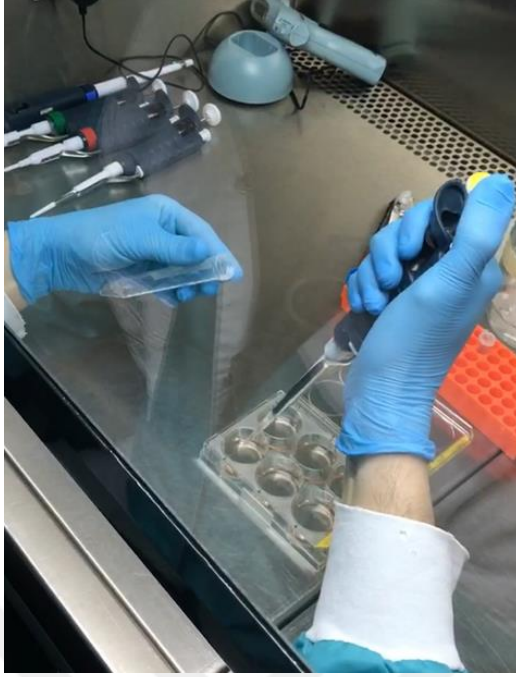
3.2.3. Deney Düzenegi

Deney düzenegi PCR ve ELISA incelemelerinin yapılacağı 6 well’ler ve MTT’nin yapılacağı 96’lık kuyucuklu deney olmak üzere ikiye ayrıldı.

96’lı iki adet plate’e her bir kuyuya 25.000 hücre gelecek şekilde 0.3 ml ana hücre stoğundan ekim yapıldı ve herbirinin üzerine 1,7 ml boş medium eklendi. Böylece her kuyucukta 2 ml’lik sıvı hacmi oluşturuldu. İki platein biri 24.saat biri 48.saat olmak üzere işaretleme yapıldı. 96’lık plateler bu şekilde 24 saat inkübatörde bekletildi (Şekil 14). 24 saat sonunda aşağıdaki deney düzenegi şeklinde gruplar oluşturuldu ve konsantrasyona

A1-A2: <u>1.Grup (kontrol grubu)</u>
A3-A4: <u>2.1. Grup (ZA 10μM)</u>
A5-A6: <u>2.2. Grup (ZA 50μM)</u>
A7-A8: <u>3.1. Grup (ZA 10μM + M + D 10μM)</u>
A9-A10: <u>3.2. Grup (ZA 10+ M + D 100 μM)</u>
A11-A12: <u>3.3. Grup (ZA 50μM + M + D 10μM)</u>
B1-B2: <u>3.4. Grup (ZA 50μM + M + D 100μM)</u>
B3-B4: <u>4.1. Grup (ZA 10 μM + M)</u>
B5-B6: <u>4.2. Grup (ZA 50μM + M)</u>
B7-B8: <u>5.1. Grup (ZA 10μM + D 10μM)</u>
B9-B10: <u>5.2. Grup (ZA 10μM + D 100μM)</u>
B11-B12: <u>5.3. Grup (ZA 50μM + D 10μM)</u>
C1-C2: <u>5.4. Grup (ZA 50μM + D 100μM)</u>
C3-C4: <u>6. Grup (M)</u>
C5-C6: <u>7.1. Grup (D10μM)</u>
C7-C8: <u>7.2. Grup (D100μM)</u>
C9-C10: <u>8.1. Grup (M+D10μM)</u>
C11-C12: <u>8.2. Grup (M+D100μM)</u>

PCR ve ELISA değerlendirmeleri iin 6 wellere her bir kuyucukta 350.000 hcre olacak ekilde ana stoktan 0,5 ml ekim yapıldı. zerlerine 1,5’ar ml bo mediumlar eklendi bylece her kuyuda 2 ml hacim sağlanmı oldu. 6 weller de her bir saat için 6 adet olacak şekilde 12 adet hazırlandı ve bu şekilde inkübatörde 37°C de 24 saat bekletildi (ekil 15). Sonrasında grup isimlerinin içerdiği içerikler eklendi ve bekleme süreleri başlatıldı (Tablo 8).



Tablo 8:PCR ve ELISA testleri için hazırlanan 6 well düzeneği ve ait olduğu deney gruplarının dağıtımı

Şekil 15:6-well'lere yapılan hücre ekimleri

1	1	2a
2a	2b	2b

3a	3a	3b
3b	3c	3c

3d	3d	4a
4a	4b	4b

5a	5a	5b
5b	5c	5c

5d	5d	6
6	7a	7a

7b	7b	8a
8a	8b	8b

3.2.4. MTT Testi

MTT testi olarak Boster firmasının MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit'i kullanılmıştır. "Assay Buffer" hazırlanması için 100 ml distile su içerisinde "Hücre Bazlı Assay Buffer Tablet" çözüldü. Hazırlanan çözeltiye toz haldeki "MTT Reagent" eklendi ve karıştırıldı. Oluşan sarı renkli çözelti deneyde kullanılmak üzere alikotlandı.

96 kuyucuklu kaplar 24. ve 48. saatte inkübatörden çıkartıldı. Her kuyucuktan 100 µl olacak şekilde sıvı çekildi ve yine her bir kuyucuğa hazırlanan MTT Reagent solüsyonundan 4 µM olacak şekilde eklendi ve pipetaj yapıldı. Daha sonra 96'lık weller yaklaşık 2,5 saat CO₂ inkübatöründe (İnkübatör Therma Form Direct Heat, USA) bırakıldı. Bu sırada 1 şişe "Crystal Dissolving SDS" ve 1 şişe "Crystal Dissolving (hidroklorid)" birbirlerine içinde çözülerek "Crystal Dissolving" solüsyonu hazırlandı. 24., 48. saatlerin her biri için ayrı "Crystal Dissolving" solüsyonları hazırlandı.

2,5 saatlik beklemeden sonra yine her bir kuyucuğa 30 µM olacak şekilde DMSO eklendi. DMSO eklenen 96'lık weller tekrar CO₂ inkübatörüne (İnkübatör Therma Form Direct Heat, USA) yerleştirildi ve 15 dakika karanlıkta bekletildi. Bu süre sonunda çıkartılan kaplar 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede ELISA (ELX800 Universal Microplate Reader, BIOTEK Instruments, USA) mikropate okuyucuda ölçüldü.

3.2.5. ELISA Testleri

PCR ve ELISA incelemeleri için 6 weller ile hazırlanan deney düzenekleri kullanıldı. 6 wellerde bulunan supernatant ve platein tabanına yapışmış osteoblastlar öncelikle ayrıldı.

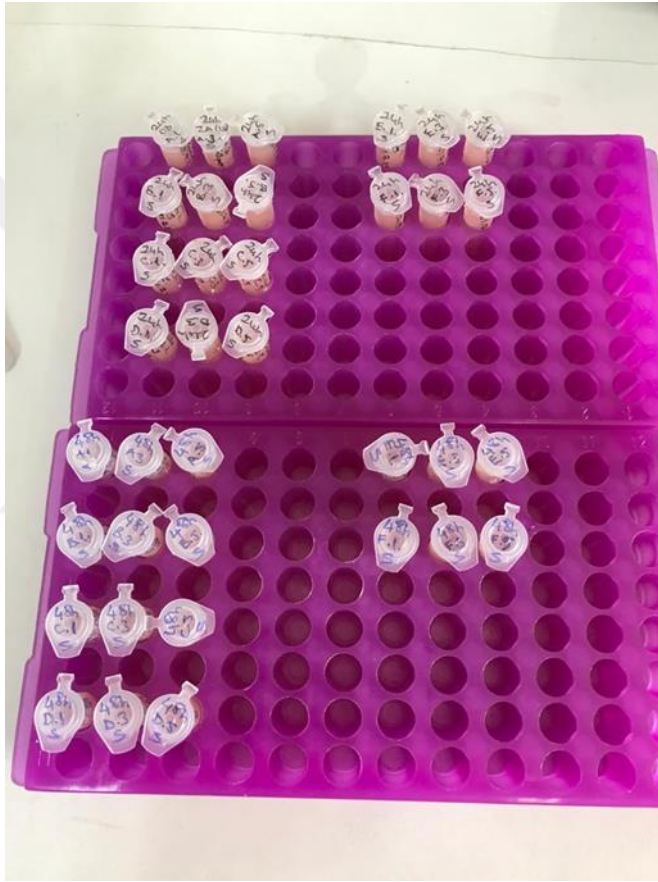
6 wellerden elde edilen süpernatantlar ELISA deneyleri için toplandı. Hücreler ise DNA izolasyonu ve PCR analizleri için kullanıldı.

Elde edilen supernatantlar ile ALP, IL-8 ve Caspase-3 testleri yapıldı. ELISA testlerinde caspase-3 için Boster firmasının PicoKine (Human Caspase-3 PicoKine™ ELISA Kit) kiti, ALP için Fine Test firmasının ALP (Human ALP (Alkaline Phosphatase) ELISA Kit) kiti ve IL-8 için ise Human IL-8 ELISA Kit PicoKine™ kiti uygulandı. Her kitin kendine ait protokolleri uygulanarak dilue edici ajanlar ile standartlar hazırlandı.

Yıkama ve ekleme protokollerinin sonunda 96'lık plateler her bir test için microplate okuyucuya (ELx800™ Universal Microplate Reader, BIOTEK Instruments, USA) yerleştirildi ve sonuçlar not edildi.

3.2.6. GEN Ekspresyonları-RT-PCR

RT-PCR testleri için 6 wellerden kazıyarak toplanan hücrelerden (Şekil 16) RNA izolasyon işlemi ZymoResearch firmasının Direct-zol™ RNA MiniPrep w/TRI-Reagent kiti kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 16:6-well'lerden elde edilen osteoblast hücreleri ve gruplara göre RNA izolasyonu için hazırlanması

Sonrasında elde edilen mRNA'lardan cDNA oluşturmak için Bioline firmasının "SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit" kiti kullanıldı. Elde edilen cDNA'lar ile RT-PCR deneyi yapıldı, OSX, RUNX-2 VE BMP-2 genlerine bakıldı.

Elde edilen c-DNA'lara PCR işleminin gerçekleştirilmesi için Bioline firmasının "SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit" kiti uygulandı ve hazırlanan plate Roche firmasının LightCycler® 480'ine yerleştirildi. (Şekil 17). Aynı makinenin yazılımında okuması

yapıldı ve sonuçlar not edildi. PCR incelemelerinde bu hücrelerdeki RUNX-2, OSX ve BMP-2 değerleri değerlendirildi.



Şekil 17:LightCycler® 480

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, New York, ABD) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Dunns's testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. MTT TEST SONUÇLARI

Tablo 9:24 saatteki grupların MTT test sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

	<i>MTT</i>
	Ort±SS (medyan)
G1:24h sadece osteoblast	0,281±0,01 (0,281)
G2:24h ZA 10	0,326±0,02 (0,326)
G3:24h ZA 50	0,307±0,04 (0,307)
G4:24h ZA10 + MLT + D10	0,238±0,04 (0,238)
G5:24h ZA10 + MLT + D100	0,403±0,16 (0,403)
G6:24h ZA50 + MLT + D10	0,357±0,07 (0,357)
G7:24h ZA50 + MLT + D100	0,259±0,06 (0,259)
G8:24h ZA10 + MLT	0,255±0,03 (0,255)
G9:24h ZA50 + MLT	0,216±0,02 (0,216)
G10:24h ZA10 + D10	0,167±0 (0,167)
G11:24h ZA10 + D100	0,237±0,06 (0,237)
G12:24h ZA50 + D10	0,189±0,06 (0,189)
G13:24h ZA50 + D100	0,247±0,09 (0,247)
G14:24h MLT	0,211±0,02 (0,211)
G15:24h D10	0,205±0,03 (0,205)
G16:24h D100	0,236±0,1 (0,236)
G17:24h MLT + D10	0,173±0 (0,173)
G18:24h MLT + D100	0,191±0,02 (0,191)

Tablo 10:48 saatteki grupların MTT test sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

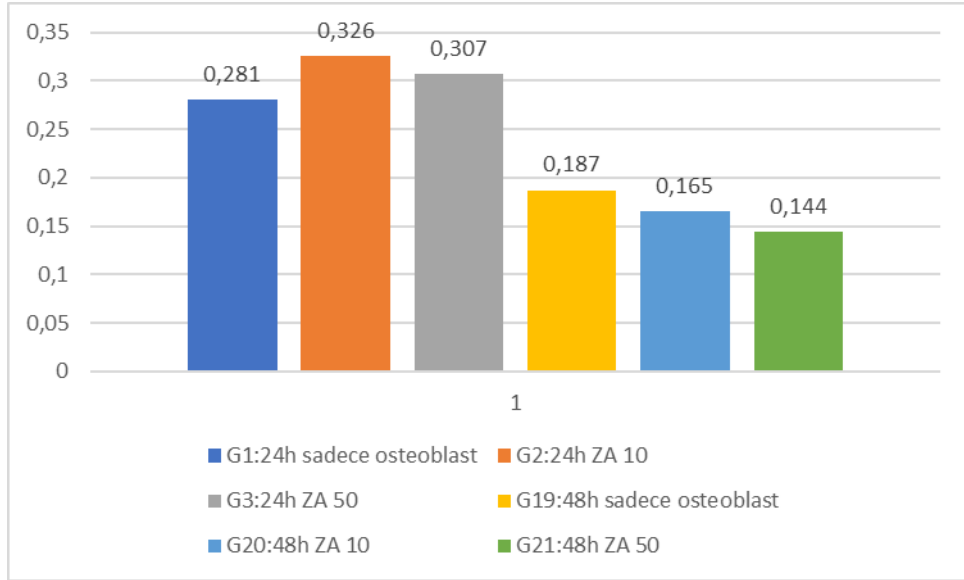
G19:48h sadece osteoblast	0,187±0,01 (0,187)
G20:48h ZA 10	0,165±0,01 (0,165)
G21:48h ZA 50	0,144±0,01 (0,144)
G22:48h ZA10 + MLT + D10	0,175±0,01 (0,175)
G23:48h ZA10 + MLT + D100	0,206±0,01 (0,206)
G24:48h ZA50 + MLT + D10	0,121±0 (0,121)
G25:48h ZA50 + MLT + D100	0,122±0 (0,122)

G26:48h ZA10 + MLT	0,175±0,01 (0,175)
G27:48h ZA50 + MLT	0,158±0,02 (0,158)
G28:48h ZA10 + D10	0,223±0 (0,223)
G29:48h ZA10 + D100	0,203±0,01 (0,203)
G30:48h ZA50 + D10	0,166±0,02 (0,166)
G31:48h ZA50 + D100	0,117±0,01 (0,117)
G32:48h MLT	0,162±0 (0,162)
G33:48h D10	0,175±0,01 (0,175)
G34:48h D100	0,182±0,01 (0,182)
G35:48h MLT + D10	0,157±0,01 (0,157)
G36:48h MLT + D100	0,14±0,03 (0,14)

4.1.1. MTT Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

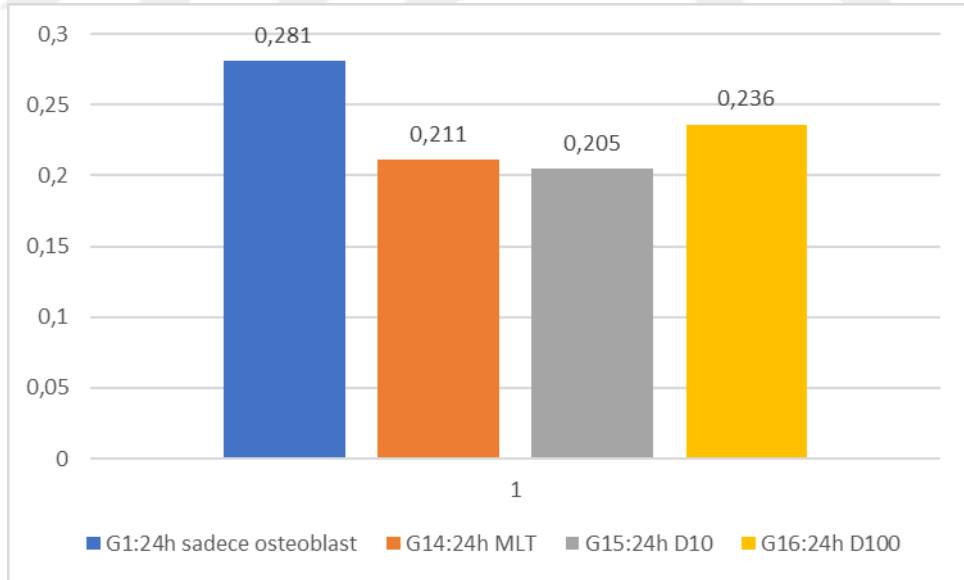
Gruplar arasında MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.005$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığının tespiti için Dunn's testi uygulanmıştır.

Zoledronik asit ve osteoblast üzerine etkilerini incelemek için kontrol grupları, 10 ve 50 μM ZA gruplarının 24. ve 48. saatleri karşılaştırıldığında 24 saat verilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değerlendirme bulunamamıştır. 48. saatteki değerler ise 24. saatteki tüm değerlerden istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu sonuç zoledronik asidin doz ve süre arttıkça (24.sa sonrasında) hücre canlılığı için olumsuz etkileri ortaya çıkarmaya başladığı şeklinde yorumlanabilir (Şekil 18).

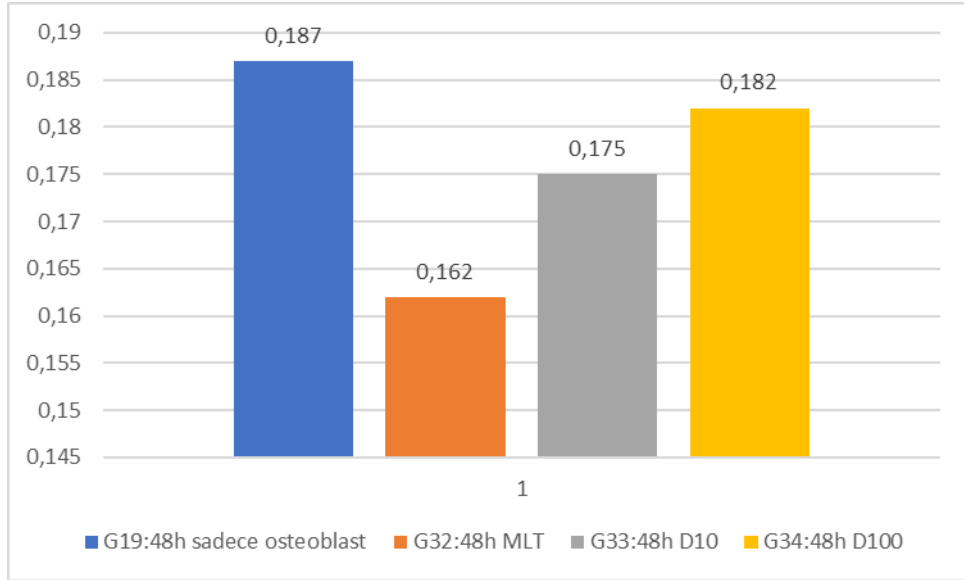


Şekil 18:Zoledronik asidin MTT testi üzerine etkisi

24 ve 48 saat MTT sonuçlarında D vitamini ve melatoninin hücre canlılığına pozitif etki etmediği hatta MTT değerlerini düşürdüğü gözlemlenmiştir ancak sonuçlar istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. (Şekil 19, Şekil 20).

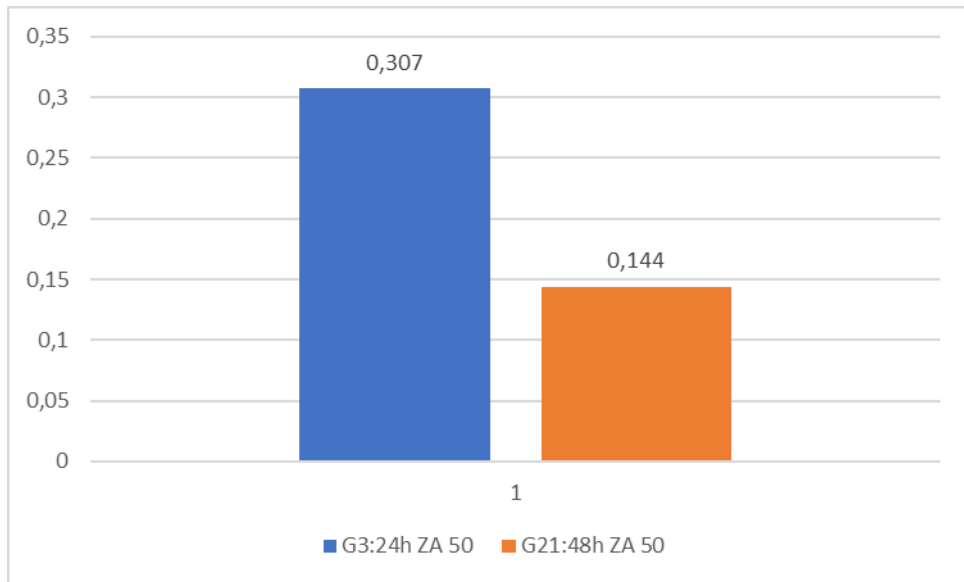


Şekil 19:D vitamini ve melatoninin osteoblastlar üzerine etkisi MTT 24.saat



Şekil 20:D vitamini ve melatoninin osteoblastlar üzerine etkisi MTT 48.saat

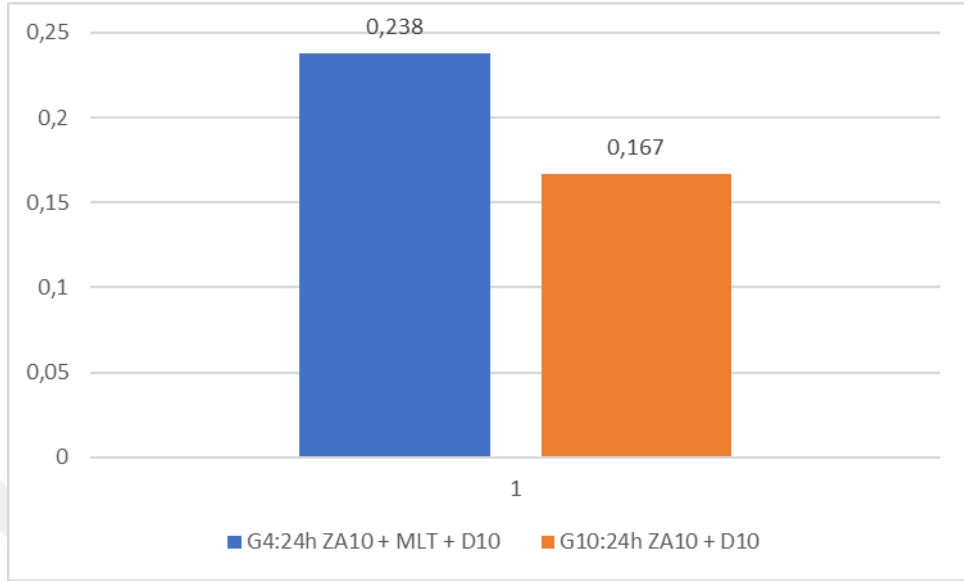
Gruplar karşılaştırıldığında 50 μ M ZA içeren grupta 48. saatteki MTT değeri aynı grubun 24. saatteki değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum zaman geçtikçe zoledronik asidin osteoblast üzerindeki sitotoksik etkisinin arttığını desteklemektedir (Şekil 21).



Şekil 21:50 μ M ZA içeren grupların 24 ve 48.saat karşılaştırması

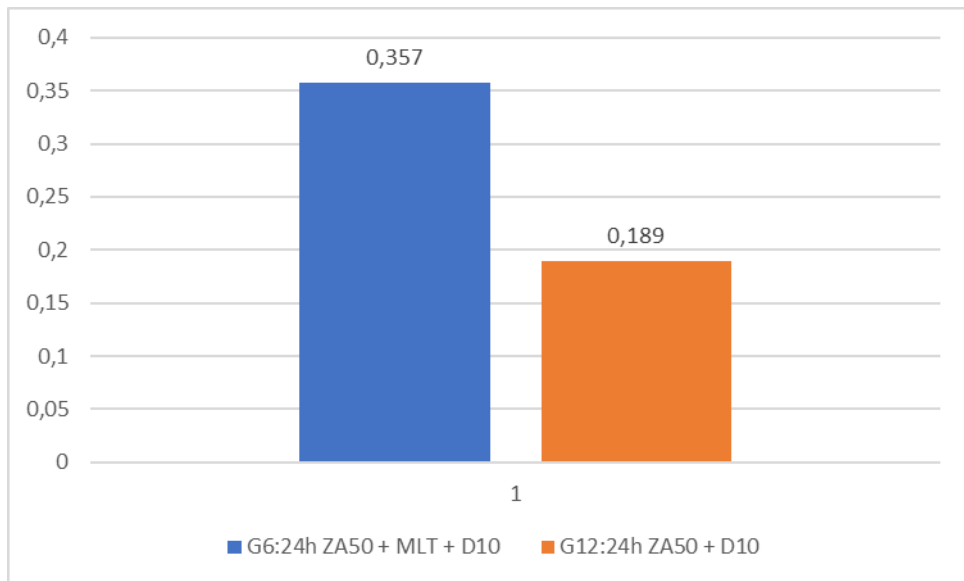
Aynı saat dilimine (24) bakıldığında 10 μ M ZA, 10 μ M D vitamini ve melatonin içeren grubun aynı grubun melatoninsiz olanına göre MTT değeri istatistiksel olarak

anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum melatoninin hücrelerin canlılığını korumada yardımcı etkisinin olacağını destekler yöndedir (Şekil 22).



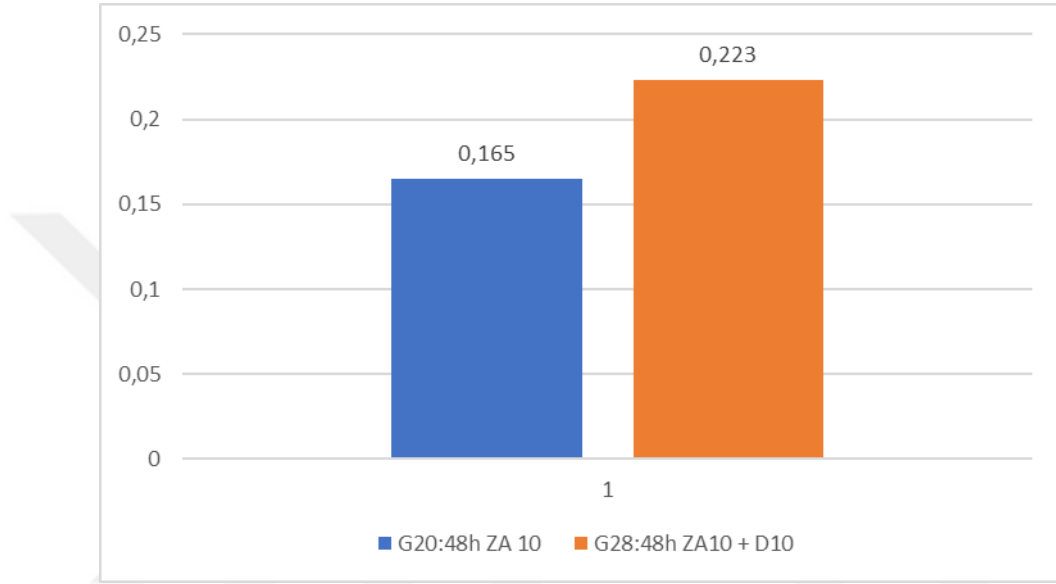
Şekil 22:24. saatte melatoninin 10 µM ZA, 10 µM D vitamini grubu üzerine etkisinin karşılaştırılması

Aynı saat dilimine bakıldığında 50 µM ZA, melatonin ve 10 µM D vitamini içeren grup ile aynı grubunun melatoninsiz olanının karşılaştırılması sonucunda ikinci grubun MTT değeri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum melatoninin hücrelerin canlılığını korumada yardımcı etkisinin olacağını destekler yöndedir (Şekil 23).



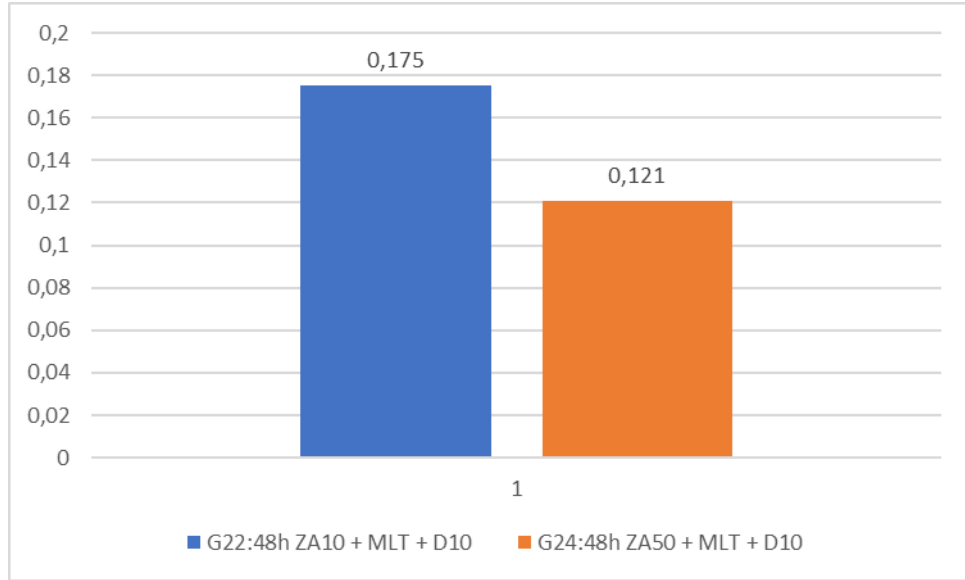
Şekil 23:24. saatte melatoninin 50 µM ZA ve 10 µM D vitamini içeren gruba etkisi

48 saat sonuçlarına bakıldığında 10 μ M ZA ve 10 μ M D vitamini içeren grubun MTT değerleri sadece 10 μ M ZA içeren grubunun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum D vitamininin, zoledronik asidin yarattığı sitotoksik etkiye karşı hücre canlılığını korumada yardımcı etkisinin olacağını destekler yöndedir (Şekil 24).



Şekil 24:48.saatte D vitamininin 10 μ M ZA grubu üzerine etkilerinin incelenmesi

48 saat sonuçlarına bakıldığında 10 μ M ZA, melatonin ve 10 μ M D vitamini içeren grubun MTT değerleri 50 μ M ZA, melatonin ve 10 μ M D vitamini içeren grubunkine kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum zoledronik asidin konsantrasyonu arttıkça sitotoksik etkisinin arttığını destekler yöndedir (Şekil 25).



Şekil 25:48. saatte ZA konsantrasyonu değişmesinin melatonin ve 10 µM D vitamini içeren gruba etkisinin karşılaştırılması

4.1.2. MTT Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

MTT sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde zoledronik asidin osteoblastların proliferasyon ve canlılığı üzerindeki olumsuz etkisinin 24.saatten sonra başladığı, melatonin ve D vitamininin zoledronik asidin yarattığı bu etki karşısında hücre canlılığını korumak için osteoblastlara yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

4.2. BMP-2, OSX, RUNX-2 GEN SONUÇLARI

4.2.1. BMP-2 Sonuçları

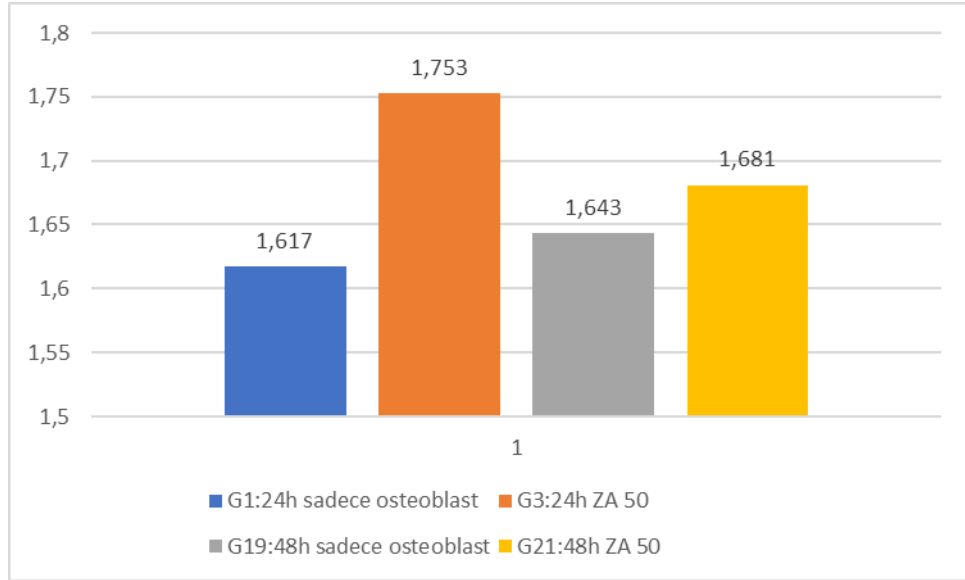
Tablo 11:BMP-2 Sonuçları

	BMP-2
G1:24h sadece osteoblast	1,617±0,02 (1,617)
G3:24h ZA 50	1,753±0,03 (1,753)
G4:24h ZA10 + MLT + D10	1,387±0,02 (1,387)
G6:24h ZA50 + MLT + D10	1,695±0 (1,695)
G7:24h ZA50 + MLT + D100	1,606±0,01 (1,606)
G8:24h ZA10 + MLT	1,482±0,07 (1,482)
G9:24h ZA50 + MLT	1,632±0,02 (1,632)
G10:24h ZA10 + D10	1,788±0 (1,788)
G11:24h ZA10 + D100	1,799±0 (1,799)
G12:24h ZA50 + D10	1,923±0,02 (1,923)
G13:24h ZA50 + D100	1,979±0,02 (1,979)
G14:24h MLT	1,839±0,11 (1,839)

G15:24h D10	1,726±0,01 (1,726)
G16:24h D100	1,71±0,01 (1,71)
G17:24h MLT + D10	1,771±0,01 (1,771)
G18:24h MLT + D100	1,607±0,03 (1,607)
G19:48h sadece osteoblast	1,643±0 (1,643)
G20:48h ZA 10	1,846±0,02 (1,846)
G21:48h ZA 50	1,681±0,01 (1,681)
G22:48h ZA10 + MLT + D10	1,859±0 (1,859)
G23:48h ZA10 + MLT + D100	1,938±0,01 (1,938)
G24:48h ZA50 + MLT + D10	1,886±0 (1,886)
G25:48h ZA50 + MLT + D100	2,091±0,01 (2,091)
G26:48h ZA10 + MLT	2,014±0 (2,014)
G27:48h ZA50 + MLT	1,953±0,01 (1,953)
G28:48h ZA10 + D10	1,918±0,03 (1,918)
G29:48h ZA10 + D100	1,857±0 (1,857)
G30:48h ZA50 + D10	1,992±0,01 (1,992)
G31:48h ZA50 + D100	2,013±0,05 (2,013)
G32:48h MLT	1,886±0 (1,886)
G33:48h D10	1,915±0,11 (1,915)
G34:48h D100	1,746±0,03 (1,746)
G35:48h MLT + D10	1,984±0,04 (1,984)
G36:48h MLT + D100	1,609±0,02 (1,609)

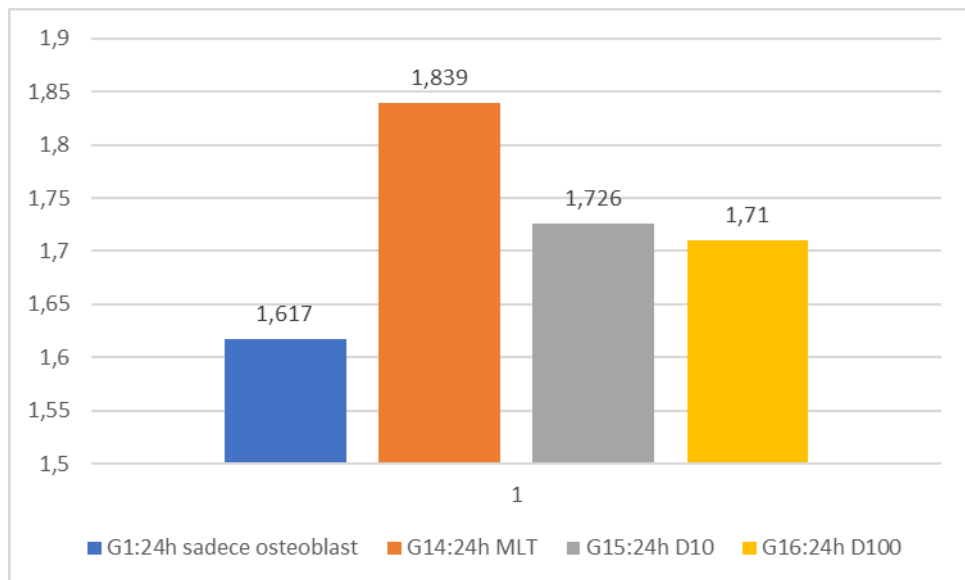
4.2.2. BMP-2 Sonuçlarının Karşılaştırılması

Zoledronik asidin BMP-2 düzeyindeki etkisini incelemek için; 50 µM'lık ZA içeren grupları aynı saatlerdeki kontrol grupları ile karşılaştırdık ve ZA içeren gruplarda BMP-2 ekspresyonları daha yüksek bulunmasına karşın sadece 24. saatteki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 26). ZA konsantrasyonu arttıkça ve zaman geçtikçe BMP-2 düzeyinde beklediğimizin aksine artış gerçekleşmiştir.



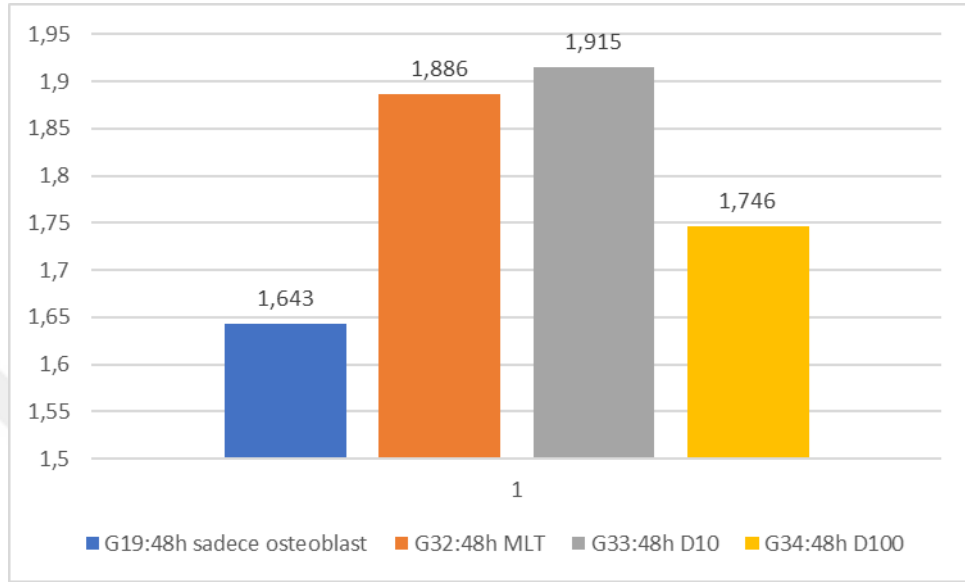
Şekil 26:24 ve 48. saatte zoledronik asidin BMP-2'ye etkisinin kıyaslanması

Melatonin ve D vitaminin BMP-2 üzerindeki etkilerine bakacak olursak 24 saatlik tüm gruplarda (melatonin, 10 ve 100 μ M D vitamini grupları) kontrol grubuna kıyasla BMP-2 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 27). Bu sonuç beklenen üzere melatonin ve D vitamininin BMP-2 ekspresyonunu desteklediği şeklinde yorumlanabilir.



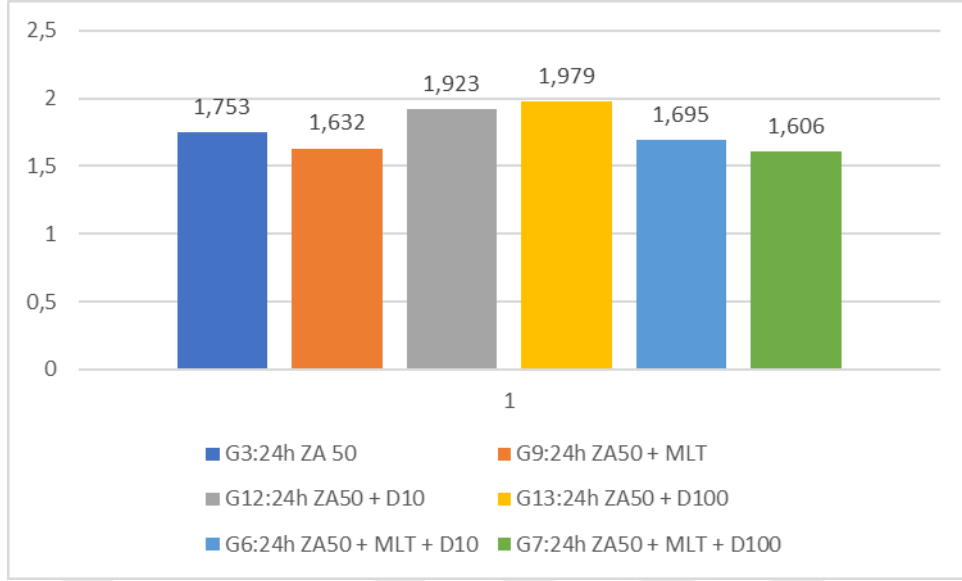
Şekil 27:24. saatte melatonin ve D vitamininin BMP-2 üzerine etkisinin karşılaştırılması

Aynı karşılaştırmayı 48. saat gruplarında yaptığımızda da paralel bir sonuç almış bulunmaktayız. 48. saatlik melatonin, 10 ve 100 μ M D vitamini gruplarında kontrol grubuna kıyasla BMP-2 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 28).



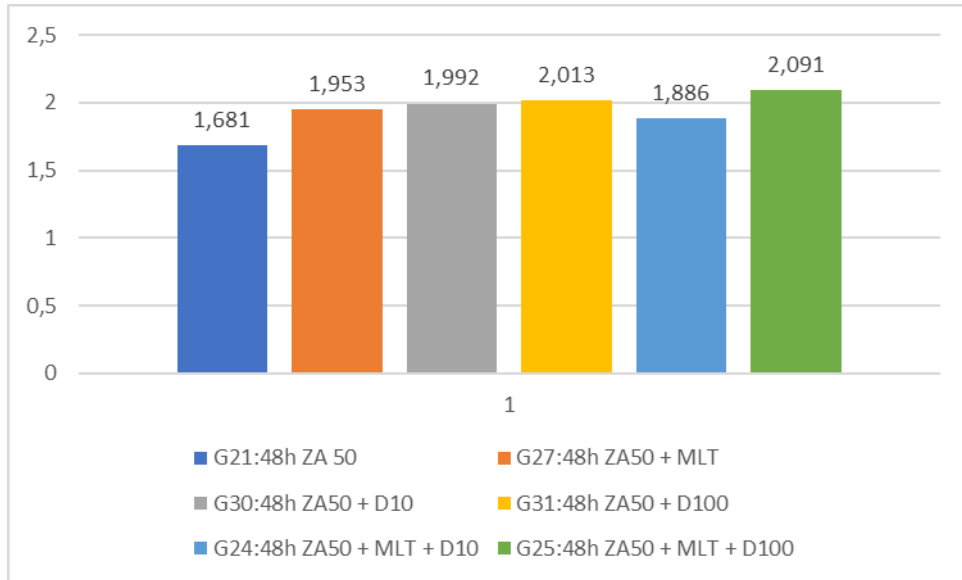
Şekil 28:48. saatte melatonin ve D vitamininin BMP-2 üzerine etkisinin karşılaştırılması

D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki BMP-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerine baktığımızda 24 saatlik gruplarda sadece D vitamini takviyesi yapılmasının ekspresyonu arttırdığı hatta melatonin veya D vitamini +melatonin kombinasyonlarının ekspresyonu düşürdüğü gözlemlenmiştir. 50 μ M ZA +10 ve 100 μ M D vitamini gruplarında BMP-2 ekspresyonu sadece 50 μ M ZA içeren gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu sonuç ilk 24 saat için zoledronik asidin etkilerinin giderilmesinde melatonin + D vitamini kombinasyonlarından çok sadece D vitaminin etkili olduğunu destekleyecek niteliktedir (Şekil 29).



Şekil 29:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki BMP-2 ekspresyonları üzerindeki etkileri-24.saat

Aynı kıyaslamayı 48 saat grubunda yaptığımızda sadece melatonin, sadece D vitamini ve tüm kombinasyonlarının 50 μ M ZA grubuna kıyasla BMP-2 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. En yüksek ekspresyon ise yüksek D vitamini (D100) ve melatonin kombinasyonunda elde edilmiştir (Şekil 30).



Şekil 30:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki BMP-2 ekspresyonları üzerindeki etkileri-48.saat

4.2.3. BMP-2 Sonuçlarının Değerlendirilmesi

BMP-2 sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde; melatonin ve D vitamini ayrı ayrı uygulandığında osteoblastların BMP-2 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. İlk 24 saat için ZA içeren gruplarda melatonin + D vitamini kombinasyonlarından çok sadece D vitamini takviyesi (özellikle D100) BMP-2 düzeyi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artışa sebep olmuştur. 24 saatten sonra ise melatonin + D vitamininin yüksek konsantrasyonunun (D100) kombinasyonu etkili olmuştur. Bu durum melatonin + D vitamini (D100) kombinasyonunun 24-48 saat aralığında BMP-2 düzeyini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.

4.2.4. OSX Sonuçları

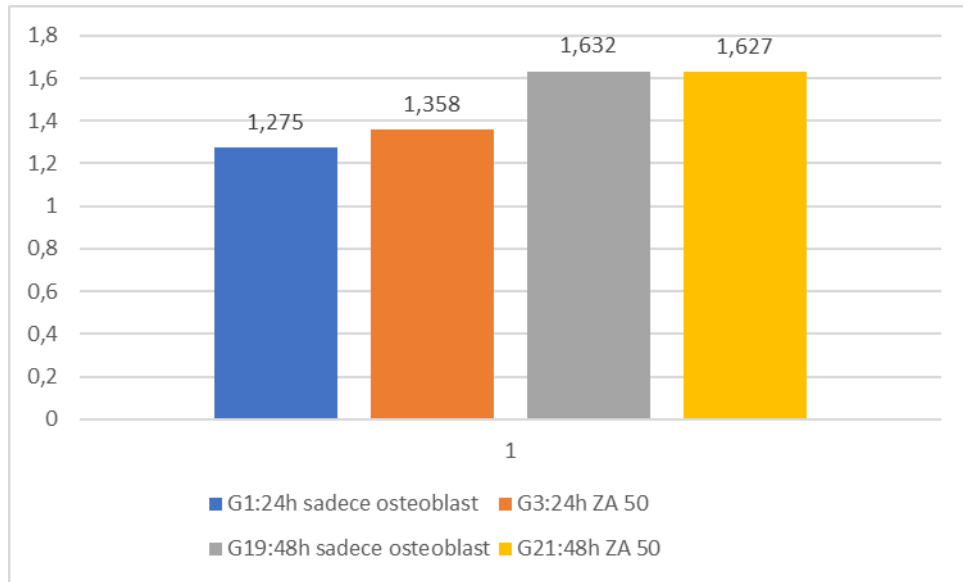
Tablo 12:OSX sonuçları

	OSX
G1:24h sadece osteoblast	1,275±0 (1,275)
G3:24h ZA 50	1,358±0 (1,358)
G4:24h ZA10 + MLT + D10	1,342±0,02 (1,342)
G6:24h ZA50 + MLT + D10	1,298±0 (1,298)
G7:24h ZA50 + MLT + D100	1,235±0 (1,235)
G8:24h ZA10 + MLT	1,264±0 (1,264)
G9:24h ZA50 + MLT	1,351±0,02 (1,351)
G10:24h ZA10 + D10	1,423±0 (1,423)
G11:24h ZA10 + D100	1,409±0,01 (1,409)
G12:24h ZA50 + D10	1,564±0,01 (1,564)
G13:24h ZA50 + D100	1,655±0 (1,655)
G14:24h MLT	1,563±0 (1,563)
G15:24h D10	1,302±0,02 (1,302)
G16:24h D100	1,554±0,01 (1,554)
G17:24h MLT + D10	1,641±0,01 (1,641)
G18:24h MLT + D100	1,589±0,01 (1,589)
G19:48h sadece osteoblast	1,632±0,01 (1,632)
G20:48h ZA 10	1,725±0,02 (1,725)
G21:48h ZA 50	1,627±0 (1,627)
G22:48h ZA10 + MLT + D10	1,725±0,01 (1,725)
G23:48h ZA10 + MLT + D100	1,702±0,01 (1,702)
G24:48h ZA50 + MLT + D10	1,696±0 (1,696)
G25:48h ZA50 + MLT + D100	1,883±0,01 (1,883)
G26:48h ZA10 + MLT	1,886±0,04 (1,886)

G27:48h ZA50 + MLT	1,724±0,01 (1,724)
G28:48h ZA10 + D10	1,694±0,02 (1,694)
G29:48h ZA10 + D100	1,644±0,01 (1,644)
G30:48h ZA50 + D10	1,758±0 (1,758)
G31:48h ZA50 + D100	1,798±0,02 (1,798)
G32:48h MLT	1,501±0,02 (1,501)
G33:48h D10	1,639±0,1 (1,639)
G34:48h D100	1,371±0 (1,371)
G35:48h MLT + D10	1,609±0,02 (1,609)
G36:48h MLT + D100	1,288±0,02 (1,288)

4.2.5. OSX Sonuçlarının Karşılaştırılması

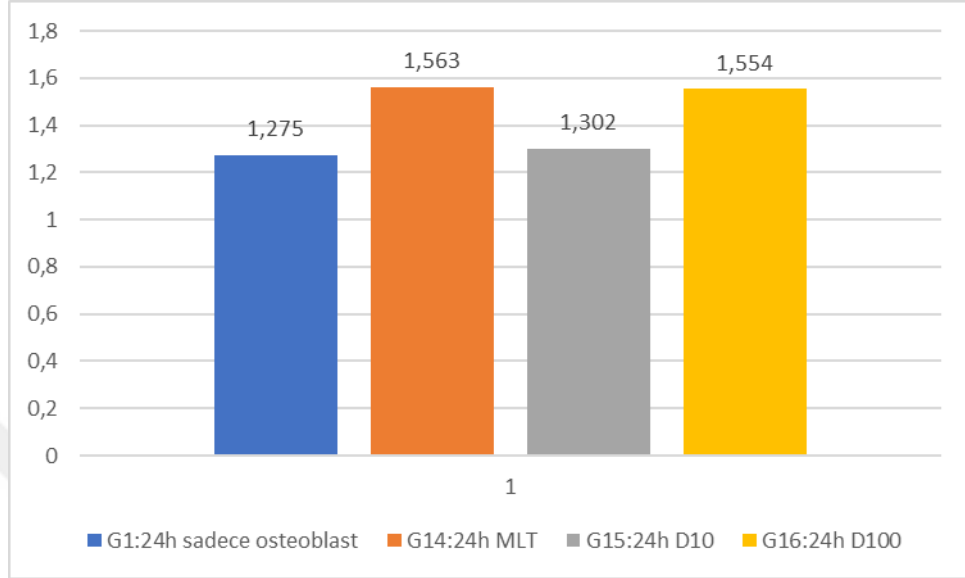
Zoledronik asidin OSX düzeyindeki etkisine baktığımızda 50 µM'lık ZA içeren gruplar aynı saatlerdeki kontrol grupları ile karşılaştırıldığında OSX ekspresyonları 24 saatte yükselirken 48 saatte düşüş göstermiştir. Sadece 24 saatteki OSX ekspresyonu yükselmesi istatistiksel olarak anlamlıdır. Aynı BMP-2 ekspresyonunda olduğu gibi beklediğimiz aksine ZA konsantrasyonu arttıkça ve zaman geçtikçe OSX düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 31).



Şekil 31:50 µM'lık ZA içeren grupların OSX düzeylerinin aynı saatlerdeki kontrol grupları ile karşılaştırılması

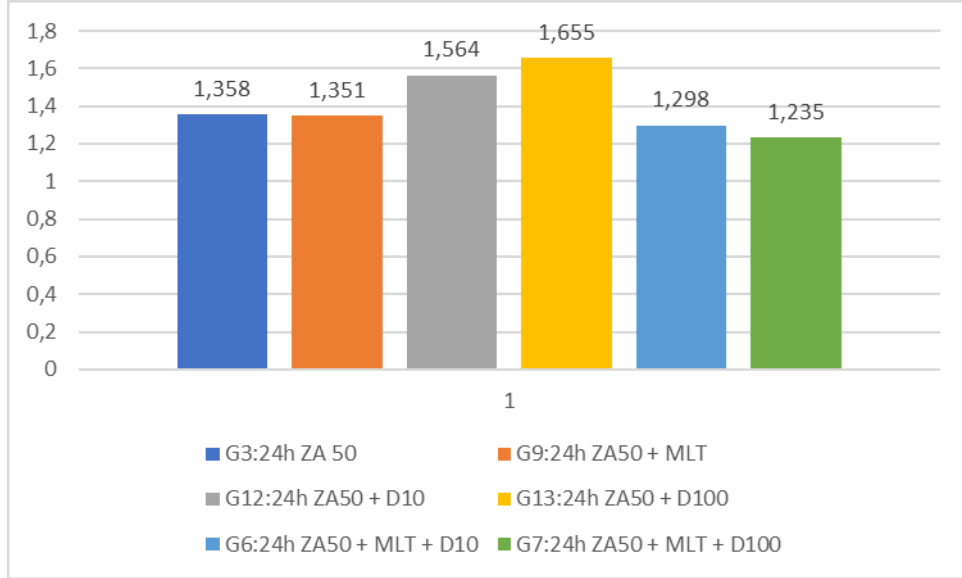
Melatonin ve D vitaminin OSX üzerindeki etkilerine bakacak olursak 24 saatlik tüm gruplarda (melatonin, 10 ve 100 µM D vitamini grupları) kontrol grubuna kıyasla

OSX ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuç beklenen üzere melatonin ve D vitamininin OSX ekspresyonunu desteklediği şeklinde yorumlanabilir (Şekil 32).



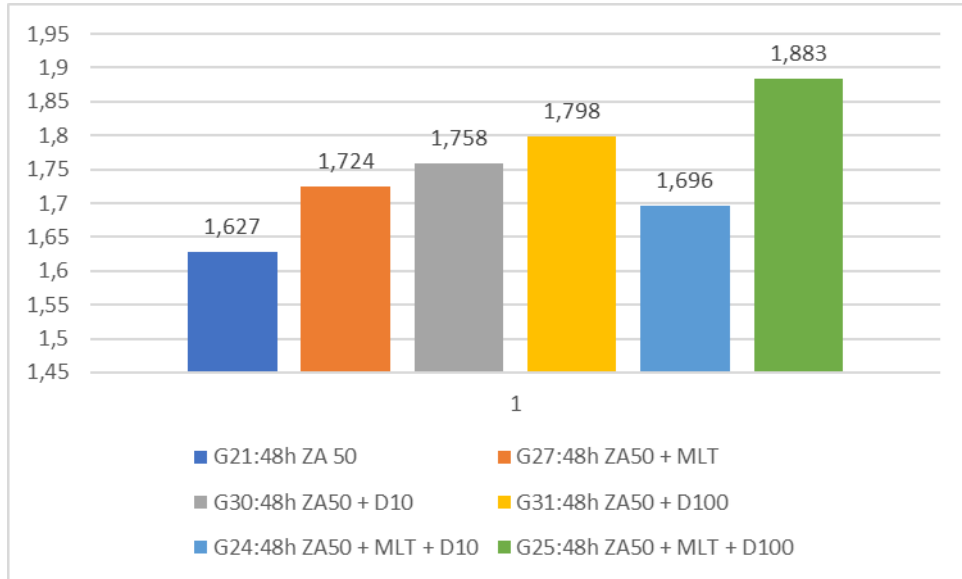
Şekil 32: Melatonin ve D vitamininin OSX üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24.saat

D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki OSX ekspresyonları üzerindeki etkilerine baktığımızda 24 saatlik gruplarda sadece D vitamini takviyesi yapılmasının ekspresyonu arttırdığı hatta melatonin veya D vit + melatonin kombinasyonlarının ekspresyonu düşürdüğü gözlemlenmiştir. BMP-2 ekspresyonlarında da benzer şekilde sonuçlar elde etmiştik. 50 μ M ZA +10 ve 100 μ M D vitamini gruplarında OSX ekspresyonu, sadece 50 μ M ZA içeren gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu sonuç ilk 24 saat için zoledronik asidin osteoblastların proliferasyonu üzerindeki olumsuz etkilerinin giderilmesinde melatonin + D vitamini kombinasyonlarından çok sadece D vitaminin etkili olduğunu destekleyecek niteliktedir (Şekil 33).



Şekil 33:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki OSX ekspresyonları üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24.saat

Aynı kıyaslamayı 48 saat grubunda yaptığımızda sadece melatonin, sadece D vitamini ve tüm kombinasyonlarının 50 μ M ZA grubuna kıyasla OSX ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. BMP-2 ekspresyonları için de aynı sonucu elde etmiştik. En yüksek ekspresyon ise melatonin ve en yüksek D vitamini (D100) kombinasyonunda elde edilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki OSX ekspresyonları üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-48.saat

4.2.6. OSX Sonuçlarının Değerlendirilmesi

BMP-2 sonuçlarında olduğu gibi OSX sonuçlarında da ayrı ayrı melatonin ve D vitamini uygulaması osteoblastların OSX ekspresyonunu arttırmaktadır. İlk 24 saat için ZA içeren gruplarda melatonin + D vitamini kombinasyonlarından çok sadece D vitamini takviyesi (özellikle D100) OSX düzeyi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı yükselmeye sebep olmuştur. 24 saatten sonra ise melatonin + D vitamini kombinasyonu (D100) en yüksek OSX ekspresyon seviyesini oluşturmuştur. Bu durum melatonin + D vitamini kombinasyonunun ilk 24 saatten sonra OSX düzeyini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.

4.2.7. RUNX-2 Sonuçları

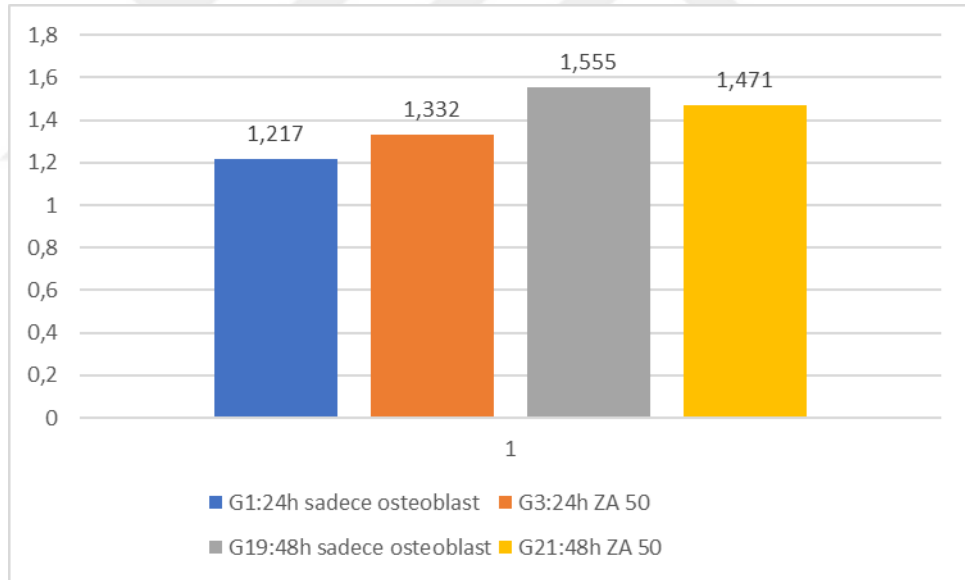
Tablo 13:RUNX-2 sonuçları

	RUNX-2
G1:24h sadece osteoblast	1,217±0 (1,217)
G3:24h ZA 50	1,332±0 (1,332)
G4:24h ZA10 + MLT + D10	1,297±0,05 (1,297)
G6:24h ZA50 + MLT + D10	1,359±0 (1,359)
G7:24h ZA50 + MLT + D100	1,24±0 (1,24)
G8:24h ZA10 + MLT	1,112±0,01 (1,112)
G9:24h ZA50 + MLT	1,273±0 (1,273)
G10:24h ZA10 + D10	1,361±0 (1,361)
G11:24h ZA10 + D100	1,383±0 (1,383)
G12:24h ZA50 + D10	1,436±0 (1,436)
G13:24h ZA50 + D100	1,449±0,01 (1,449)
G14:24h MLT	1,395±0 (1,395)
G15:24h D10	1,415±0 (1,415)
G16:24h D100	1,317±0,01 (1,317)
G17:24h MLT + D10	1,335±0 (1,335)
G18:24h MLT + D100	1,371±0,01 (1,371)
G19:48h sadece osteoblast	1,555±0 (1,555)
G20:48h ZA 10	1,415±0,01 (1,415)
G21:48h ZA 50	1,471±0,01 (1,471)
G22:48h ZA10 + MLT + D10	1,43±0,02 (1,43)
G23:48h ZA10 + MLT + D100	1,533±0 (1,533)
G24:48h ZA50 + MLT + D10	1,541±0 (1,541)
G25:48h ZA50 + MLT + D100	1,631±0,09 (1,631)
G26:48h ZA10 + MLT	1,722±0,03 (1,722)
G27:48h ZA50 + MLT	1,479±0,01 (1,479)

G28:48h ZA10 + D10	1,418±0 (1,418)
G29:48h ZA10 + D100	1,43±0,01 (1,43)
G30:48h ZA50 + D10	1,582±0,01 (1,582)
G31:48h ZA50 + D100	1,515±0,01 (1,515)
G32:48h MLT	1,478±0 (1,478)
G33:48h D10	1,659±0,11 (1,659)
G34:48h D100	1,386±0,02 (1,386)
G35:48h MLT + D10	1,57±0,05 (1,57)
G36:48h MLT + D100	1,312±0,01 (1,312)

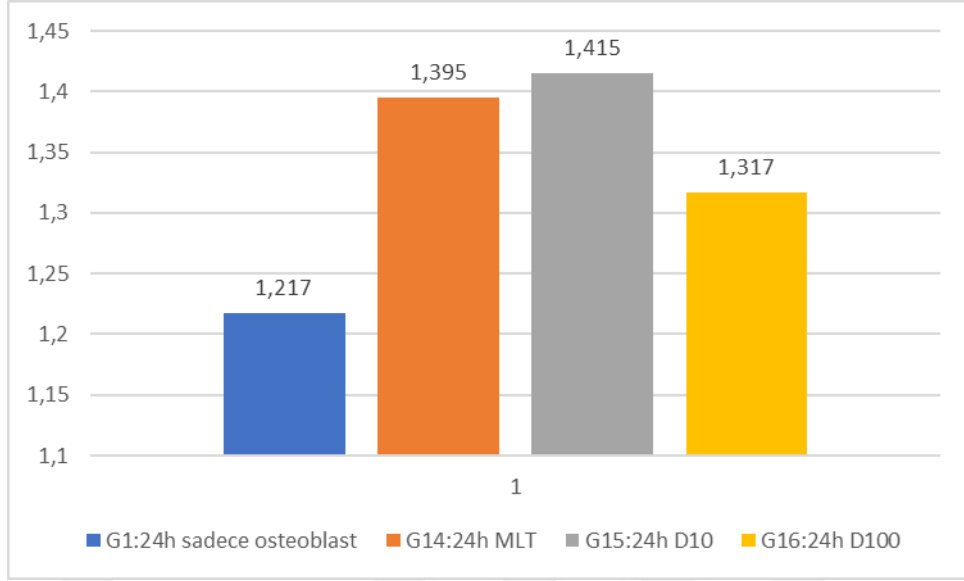
4.2.8. RUNX-2 Sonuçlarının Karşılaştırılması

Zoledronik asidin RUNX-2 düzeyindeki etkisini incelediğimizde 50 μ M'lık ZA içeren grupların aynı saatlerdeki kontrol grupları ile karşılaştırdık ve ilk 24 saatteki ekspresyonda artma 48. saatteki ekspresyonda ise azalma gözlemledik. Her iki değişim de istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 35).



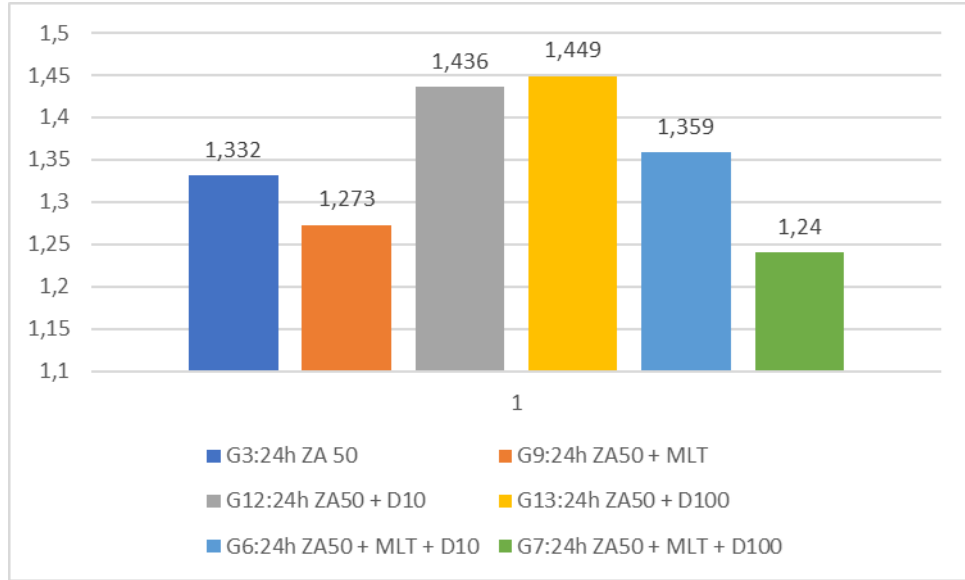
Şekil 35:Zoledronik asidin RUNX-2 düzeyindeki etkisini incelemek için 50 μ M'lık ZA içeren grupların aynı saatlerdeki kontrol grupları ile karşılaştırılması

Melatonin ve D vitaminin RUNX-2 üzerindeki etkilerine bakacak olursak 24 saatlik tüm gruplarda (melatonin, 10 ve 100 μ M D vitamini grupları) kontrol grubuna kıyasla RUNX-2 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuç beklenen üzere melatonin ve D vitamininin RUNX-2 ekspresyonunu desteklediği şeklinde yorumlanabilir (Şekil 36).



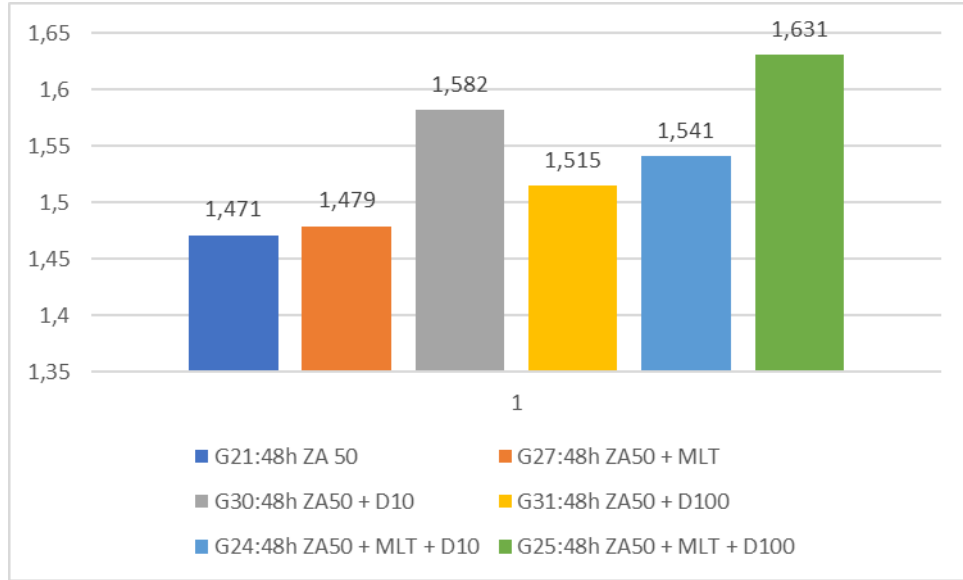
Şekil 36: Melatonin ve D vitaminin RUNX-2 üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24.saat

D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruptaki RUNX-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerine baktığımızda 24 saatlik grupta sadece D vitamini takviyesi yapılmasının ekspresyonu arttırdığı hatta melatonin veya D vitamini + melatonin kombinasyonlarının ekspresyonu düşürdüğü gözlemlenmiştir. Sadece 10 μ M'lik D vitamini + melatonin kombinasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bir yükselme gözlenmiştir. Bu yükselme göz ardı edildiğinde BMP-2 ve OSX ekspresyonlarında da tamamen paralel şekilde sonuçlar elde etmiştik. 50 μ M ZA +10 ve 100 μ M D vitamini gruplarında OSX ekspresyonu sadece 50 μ M ZA içeren gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu sonuç ilk 24 saat için zoledronik asidin osteoblastların proliferasyonları üzerindeki olumsuz etkilerinin giderilmesinde melatonin + D vitamini kombinasyonlarından çok sadece D vitaminin etkili olduğunu destekleyecek niteliktedir (Şekil 37).



Şekil 37:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruptaki RUNX-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24.saat

Aynı kıyaslamayı 48 saat grubunda yaptığımızda sadece melatonin, sadece D vitamini ve tüm kombinasyonlarının 50 μ M ZA grubuna kıyasla RUNX-2 ekspresyonları daha yüksek bulunmuştur. Sadece melatonin ve sadece 100 μ M'lik D vitamini eklenmesindeki yükselme istatistiksel olarak anlamlı değildir ancak diğer tüm ekspresyon artışları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. BMP-2 ve OSX ekspresyonları için de aynı sonucu elde etmiştik. En yüksek ekspresyon ise yine BMP-2 ve OSX ekspresyonlarında olduğu gibi melatonin ve en yüksek D vitamini (D100) kombinasyonunda elde edilmiştir (Şekil 38).



Şekil 38:D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA gruplardaki RUNX-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-48.saat

4.2.9. RUNX-2 Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Diğer iki gen sonuçlarında olduğu gibi RUNX-2 sonuçlarında da ayrı ayrı melatonin ve D vitamini uygulaması osteoblastların RUNX-2 ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı görülmektedir. İlk 24 saat için ZA içeren gruplarda melatonin + D vitamini kombinasyonlarından çok sadece D vitamini takviyesi (D100) RUNX-2 düzeyi üzerinde etkili olmuştur. 24 saatten sonra ise melatonin + en yüksek D vitamini (D100) kombinasyonu etkili olmuştur. Bu durum melatonin + D vitamini kombinasyonunun ilk 24 saatten sonra RUNX-2 düzeyini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.

4.2.10. Gen Sonuçlarının Genel Değerlendirilmesi

Gen ekspresyonları incelendiğinde 50 μ M ZA eklenmesinin 24 saatte her üç genin de (BMP-2, OSX, RUNX-2) ekspresyonunda artışa sebep olduğu ve bu artışın üçünde de istatistiksel olarak anlamlı olarak gerçekleştiği gözlemlenmiştir. 48 saat gruplarına bakıldığında ise 50 μ M ZA eklenmesi istatistiksel olarak anlamlı değişimler yaratmamış sadece RUNX-2 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe sebebiyet vermiştir.

Melatonin ve D vitaminin BMP-2, OSX, RUNX-2 üzerindeki etkilerine bakacak olursak 24 saatlik tüm gruplarda (melatonin, 10 ve 100 μ M D vitamini grupları) kontrol

grubuna kıyasla gen ekspresyonlarının hepsinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

D vitamini, melatonin ve ikisinin kombinasyonunun 50 μ M ZA içeren gruplardaki BMP-2, OSX, RUNX-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerine baktığımızda 24 saatlik gruplarda sadece D vitamini takviyesi yapılmasının (özellikle D100) ekspresyonu arttırdığı hatta melatonin veya D vit + melatonin kombinasyonlarının ekspresyonu düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu durum her üç gen için de aynıdır. Sadece 10 μ M'lik D vitamini + melatonin kombinasyonunda ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan yükselme gözlenmiştir.

Bu sonuç ilk 24 saat için zoledronik asidin BMP-2, OSX ve RUNX-2 genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkilerinin giderilmesinde melatonin + D vitamini kombinasyonlarından çok sadece D vitaminin (özellikle D100) etkili olduğunu destekleyecek niteliktedir.

Aynı kıyaslamayı 48 saat grubunda yaptığımızda sadece melatonin, sadece D vitamini ve tüm kombinasyonlarının gen ekspresyonları, 50 μ M ZA grubuna kıyasla her üç gende de istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. En yüksek ekspresyon ise melatonin ve en yüksek D vitamini (D100) kombinasyonunda elde edilmiştir. Bu sonuç her üç gen değerlendirilmesinde de aynı bulunmuştur.

4.3. ALP, Caspase-3,IL-8 ELISA SONUÇLARI

4.3.1. ALP Sonuçları

Tablo 14:ALP Sonuçları

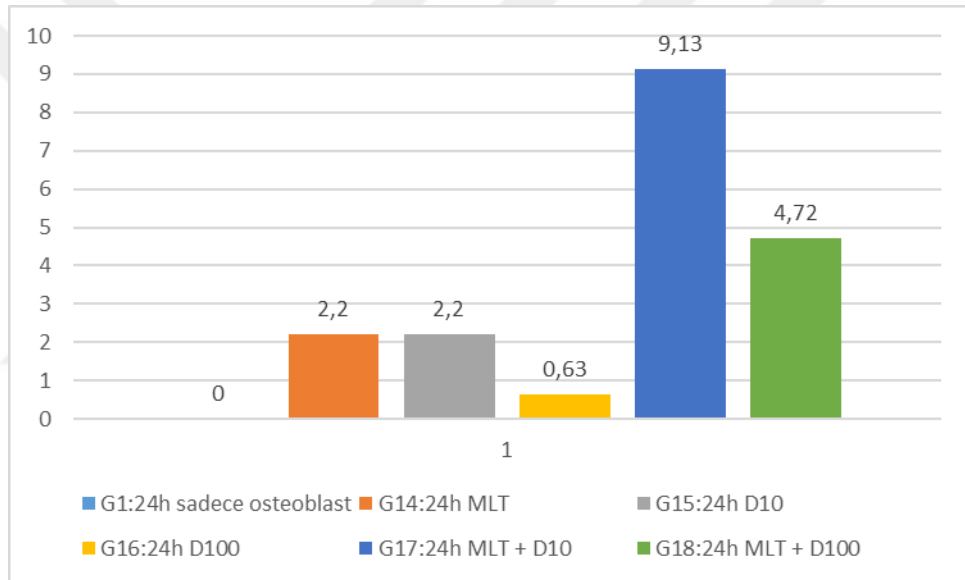
G1:24h sadece osteoblast	0 $\pm$ 0 (0)
G2:24h ZA 10	0 $\pm$ 0 (0)
G3:24h ZA 50	0,94 $\pm$ 0 (0,9)
G4:24h ZA10 + MLT + D10	1,57 $\pm$ 0 (1,6)
G5:24h ZA10 + MLT + D100	1,26 $\pm$ 0 (1,3)
G6:24h ZA50 + MLT + D10	2,52 $\pm$ 0 (2,5)
G7:24h ZA50 + MLT + D100	1,57 $\pm$ 0 (1,6)
G8:24h ZA10 + MLT	0 $\pm$ 0 (0)
G9:24h ZA50 + MLT	0 $\pm$ 0 (0)
G10:24h ZA10 + D10	1,57 $\pm$ 0 (1,6)

G11:24h ZA10 + D100	1,26±0 (1,3)
G12:24h ZA50 + D10	0,94±0 (0,9)
G13:24h ZA50 + D100	1,57±0 (1,6)
G14:24h MLT	2,2±0 (2,2)
G15:24h D10	2,2±0 (2,2)
G16:24h D100	0,63±0 (0,6)
G17:24h MLT + D10	9,13±0 (9,1)
G18:24h MLT + D100	4,72±0 (4,7)
G19:48h sadece osteoblast	1,89±0 (1,9)
G20:48h ZA 10	2,83±0 (2,8)
G21:48h ZA 50	2,83±0 (2,8)
G22:48h ZA10 + MLT + D10	18,25±0 (18,3)
G23:48h ZA10 + MLT + D100	1,26±0 (1,3)
G24:48h ZA50 + MLT + D10	5,03±0 (5)
G25:48h ZA50 + MLT + D100	1,57±0 (1,6)
G26:48h ZA10 + MLT	6,61±0 (6,6)
G27:48h ZA50 + MLT	1,57±0 (1,6)
G28:48h ZA10 + D10	0,94±0 (0,9)
G29:48h ZA10 + D100	0,31±0 (0,3)
G30:48h ZA50 + D10	0,63±0 (0,6)
G31:48h ZA50 + D100	12,59±0 (12,6)
G32:48h MLT	0,31±0 (0,3)
G33:48h D10	6,29±0 (6,3)
G34:48h D100	4,41±0 (4,4)
G35:48h MLT + D10	0,94±0 (0,9)
G36:48h MLT + D100	0,31±0 (0,3)

4.3.2. ALP Sonuçlarının Karşılaştırılması

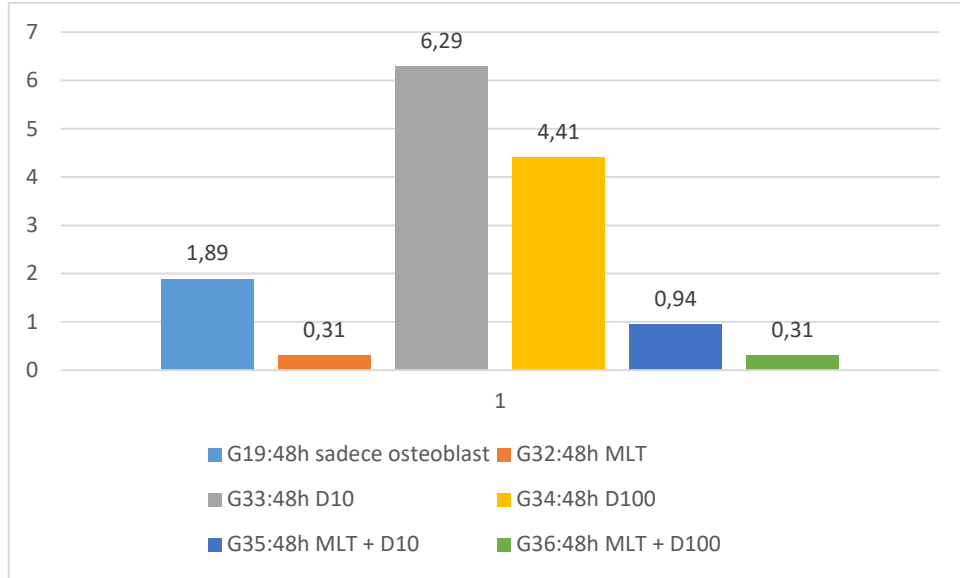
D vitamini ve melatoninin ALP üzerine etkisini görmek amacıyla 24 saat gruplarında; sadece osteoblast, sadece melatonin ve iki konsantrasyonda sadece D vitamini grupları (D10 ve D100) ve bunların kombinasyonlarının ALP düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya baktığımızda osteoblastlara melatonin veya D vitamini eklenmesi (her iki dozda da) onların ALP düzeyini yükseltmiştir. Melatonin ve

10 μ M'lık D vitamininin ALP yükselmesi yönündeki etkileri eşitken, D vitamininin konsantrasyonunun artması (D100) bu etkiyi yavaşlatmıştır. Bu bilgi 100 μ M'lık D vitamininin konsantrasyonunun osteoblastlar için çok yüksek geldiği, 10 μ M'ın daha ideal olduğu konusunda bir fikir verebilmektedir. Ek olarak melatonin ve her iki dozdaki D vitamini kombinasyonlarının ALP düzeyini tek başlarına olduklarından daha fazla yükselttiğini gözlemlemekteyiz. Bu noktada D vitamini ve melatoninin sinerjik etki ettiğini ancak yine 100 yerine 10 μ M'lık grupta daha fazla yükselme olduğunu ve bunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirlemiş bulunmaktayız ($p < 0.05$) (Şekil 39).



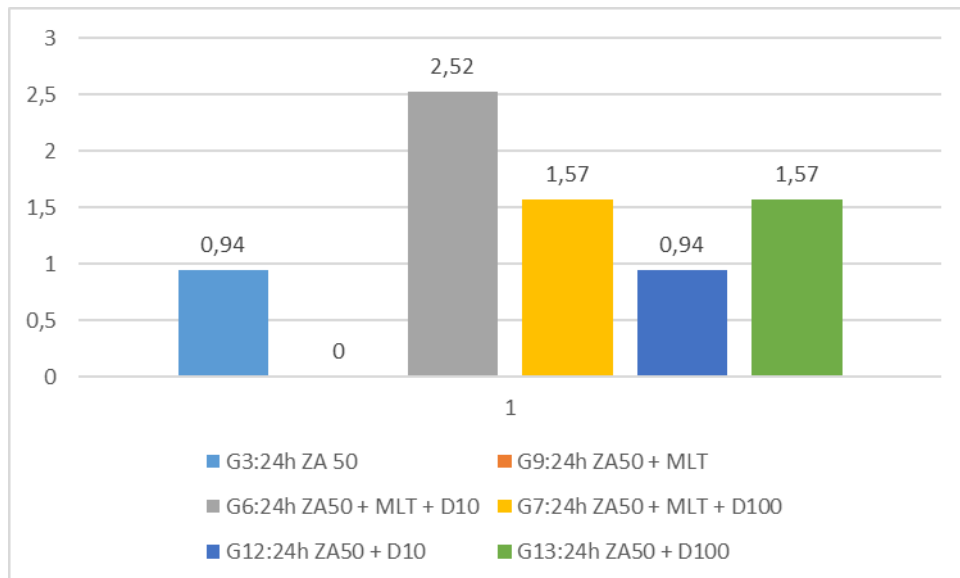
Şekil 39: D vitamini ve melatoninin ALP üzerine etkisinin karşılaştırılması-24.saat

Aynı karşılaştırmayı 48.saat için yaptığımızda en yüksek ALP seviyesini 10 μ M'lık D vitamini grubunda görmekteyiz. Bu gruplar arasında melatonin içeren tüm grupların ALP seviyesi kontrol grubundan (sadece osteoblast bulunan gruptan) daha düşük olarak tespit edilmiştir. ALP düzeylerindeki bu değişikliklerde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Bu durumu ilk 24 saatte melatoninin ALP düzeyinde yükselmeye yardımcı olduğu sonrasında ise düşüşe sebebiyet verdiği şeklinde yorumlayabiliriz (Şekil 40).



Şekil 40:D vitamini ve melatoninin ALP üzerine etkisinin karşılaştırılması-48.saat

D vitamini ve melatoninin ZA üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 50 μ M'lik ZA içeren 24.saat grupları değerlendirildi. En yüksek ALP düzeyi melatonin ve 10 μ M'lik D vitamini grubunda görülürken, sadece melatonin grubunda ise ALP'de azalma tespit edildi (Şekil 41). Ancak gruplar arasında ALP düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.



Şekil 41:D vitamini ve melatoninin ZA üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması-24.saat

4.3.3. ALP Sonuçlarını Değerlendirilmesi

ALP sonuçlarına baktığımızda ilk 24 saatte melatonin ve her iki dozdaki (D10 ve D100) D vitamini kombinasyonlarının osteoblastlardan salınan ALP düzeyini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığını, ancak D vitamini konsantrasyonu 100 μM 'a çıktığında bu artış hızını yavaşlattığını fark ettik ($p<0.05$). 48 saatlik sonuçlarda ise melatoninin, osteoblastların ALP düzeylerinde düşüşe sebebiyet verdiğini ve 50 μM 'lik ZA uygulanan gruplarda da diğer gruplarla benzer şekilde melatoninin ALP düzeyini düşürmeye yönelik etki ettiğini gözlemledik. Ayrıca 48.saat 50 μM 'lik ZA uygulanan gruplarda melatonin ve her iki dozdaki (D10 ve D100) D vitamini kombinasyonları osteoblastlardan salınan ALP düzeyini arttırmıştır. Ancak bu üç etki de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir.

4.3.4. IL-8 Sonuçları

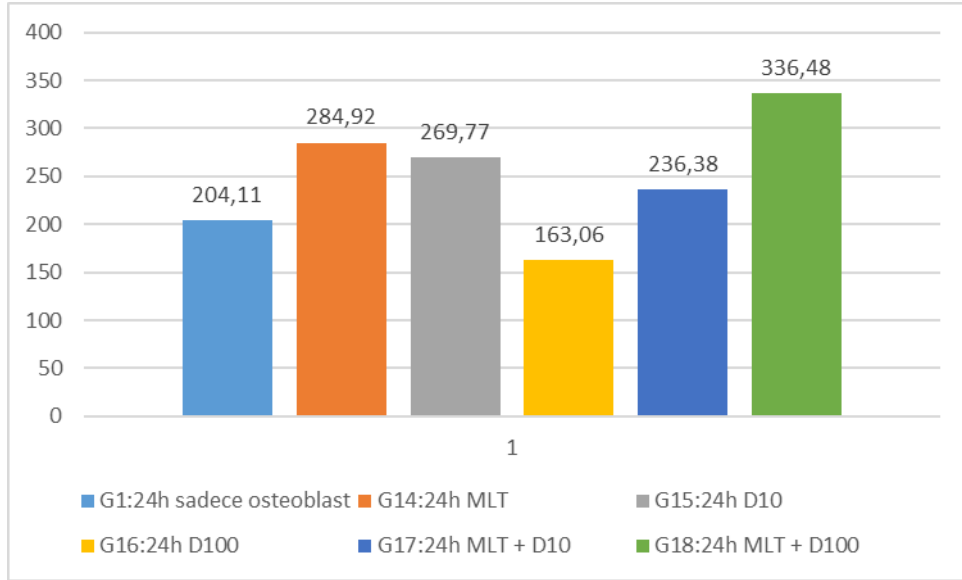
Tablo 15:IL-8 Sonuçları

G1:24h sadece osteoblast	204,11 $\pm$ 0 (204,1)
G2:24h ZA 10	135,48 $\pm$ 0 (135,5)
G3:24h ZA 50	372,1 $\pm$ 0 (372,1)
G4:24h ZA10 + MLT + D10	334,83 $\pm$ 0 (334,8)
G5:24h ZA10 + MLT + D100	401,55 $\pm$ 0 (401,6)
G6:24h ZA50 + MLT + D10	352,1 $\pm$ 0 (352,1)
G7:24h ZA50 + MLT + D100	332,08 $\pm$ 0 (332,1)
G8:24h ZA10 + MLT	239,2 $\pm$ 0 (239,2)
G9:24h ZA50 + MLT	225,23 $\pm$ 0 (225,2)
G10:24h ZA10 + D10	307,81 $\pm$ 0 (307,8)
G11:24h ZA10 + D100	264,81 $\pm$ 0 (264,8)
G12:24h ZA50 + D10	271,77 $\pm$ 0 (271,8)
G13:24h ZA50 + D100	448,34 $\pm$ 0 (448,3)
G14:24h MLT	284,92 $\pm$ 0 (284,9)
G15:24h D10	269,77 $\pm$ 0 (269,8)
G16:24h D100	163,06 $\pm$ 0 (163,1)
G17:24h MLT + D10	236,38 $\pm$ 0 (236,4)
G18:24h MLT + D100	336,48 $\pm$ 0 (336,5)
G19:48h sadece osteoblast	135,48 $\pm$ 0 (135,5)
G20:48h ZA 10	127,49 $\pm$ 0 (127,5)

G21:48h ZA 50	210,75±0 (210,7)
G22:48h ZA10 + MLT + D10	214,78±0 (214,8)
G23:48h ZA10 + MLT + D100	197,13±0 (197,1)
G24:48h ZA50 + MLT + D10	114,17±0 (114,2)
G25:48h ZA50 + MLT + D100	200,61±0 (200,6)
G26:48h ZA10 + MLT	220,66±0 (220,7)
G27:48h ZA50 + MLT	91,54±0 (91,5)
G28:48h ZA10 + D10	186,87±0 (186,9)
G29:48h ZA10 + D100	184,34±0 (184,3)
G30:48h ZA50 + D10	197,13±0 (197,1)
G31:48h ZA50 + D100	175,2±0 (175,2)
G32:48h MLT	60,67±0 (60,7)
G33:48h D10	34,99±0 (35)
G34:48h D100	51,52±0 (51,5)
G35:48h MLT + D10	60,67±0 (60,7)
G36:48h MLT + D100	84,13±0 (84,1)

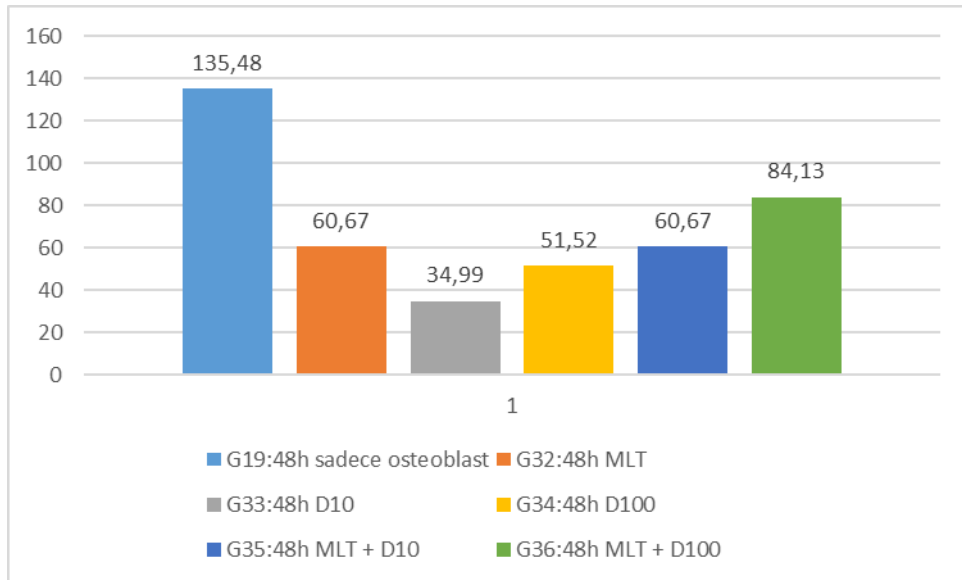
4.3.5. IL-8 Sonuçlarının Karşılaştırılması

D vitamini ve melatoninin IL-8 üzerine etkisini görmek amacıyla 24 saat gruplarında; sadece osteoblast, sadece melatonin ve iki konsantrasyonda sadece D vitamini grupları ve bunların kombinasyonlarının düzeyleri karşılaştırılmıştır. En yüksek IL-8 değeri melatonin ve 100 μ M'lık D vitaminin kombine olduğu grupta görülmüştür. Melatonin ve D vitamini takviyesi sadece 100 μ M D vitamini eklenen grup dışında tüm gruplarda IL-8 düzeyini arttırmıştır (Şekil 42). 24. saatteki bu gruplar arasındaki ALP seviye farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir.



Şekil 42:D vitamini ve melatoninin IL-8 üzerine etkisinin karşılaştırılması 24.saat

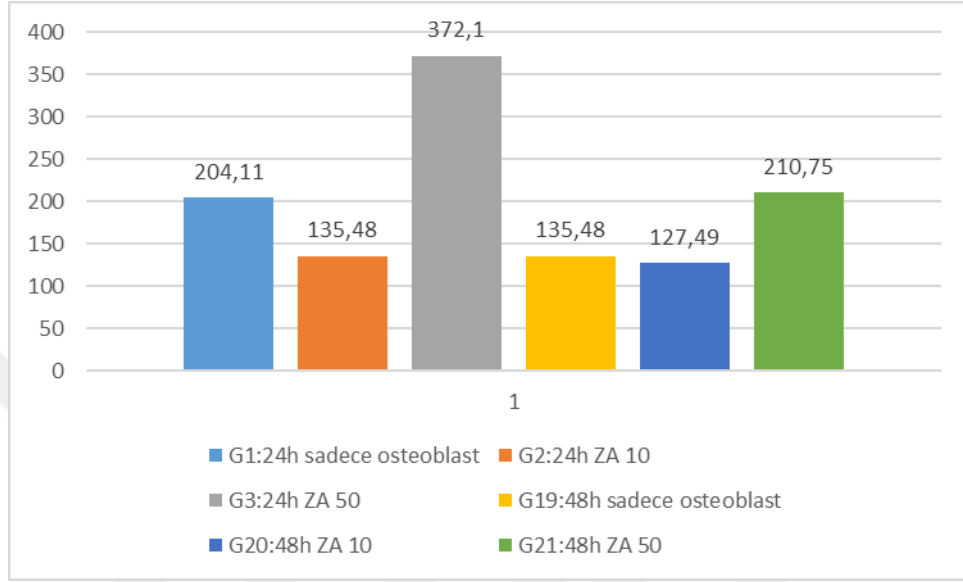
Aynı karşılaştırmayı 48. saat gruplarında yaptığımızda IL-8 değerlerinin oldukça düştüğünü gözlemlemekteyiz. 24. saatin tersine bu gruplarda eklenen tüm maddelerin IL-8 değerini kontrol grubuna göre düşürdüğünü gözlemledik. En fazla düşüş ise 10 μ M'lık D vitamini grubunda saptanmıştır (Şekil 43). Ancak ALP düzeyindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 43:D vitamini ve melatoninin IL-8 üzerine etkisinin karşılaştırılması 48.saat

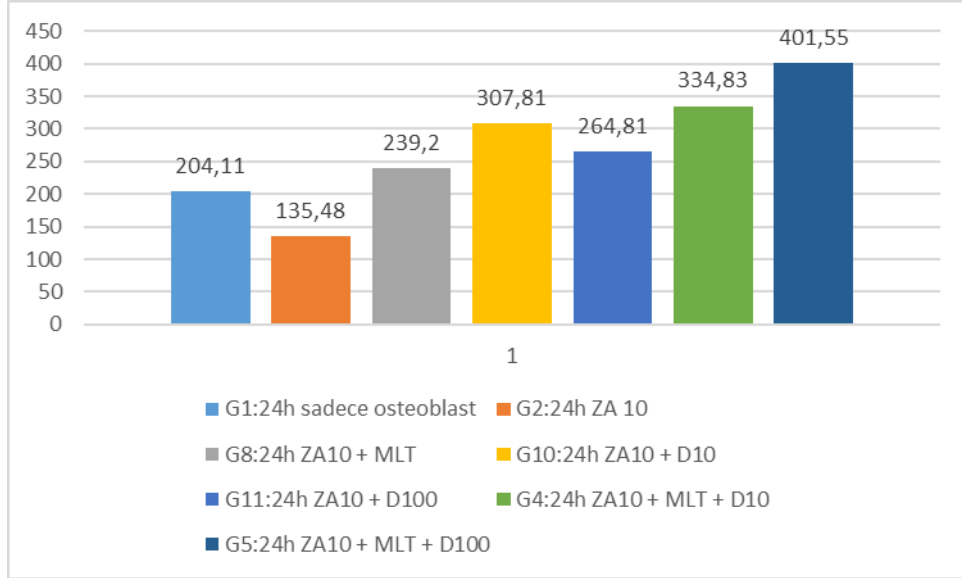
Zoledronik asidin osteoblastların IL-8 değerleri üzerine etkilerini anlamak amacıyla kontrol grupları ile 10 ve 50 μ M'lık ZA grupları karşılaştırılmıştır. Hem 24 hem

de 48 saat için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 μ M'lık grupta azalma 50 μ M'lık grupta ise artma görülmüştür. Tüm gruplarda 24 saatteki değeri ile karşılaştırıldığında ise azalma gözlenmiştir. Ancak bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 44).



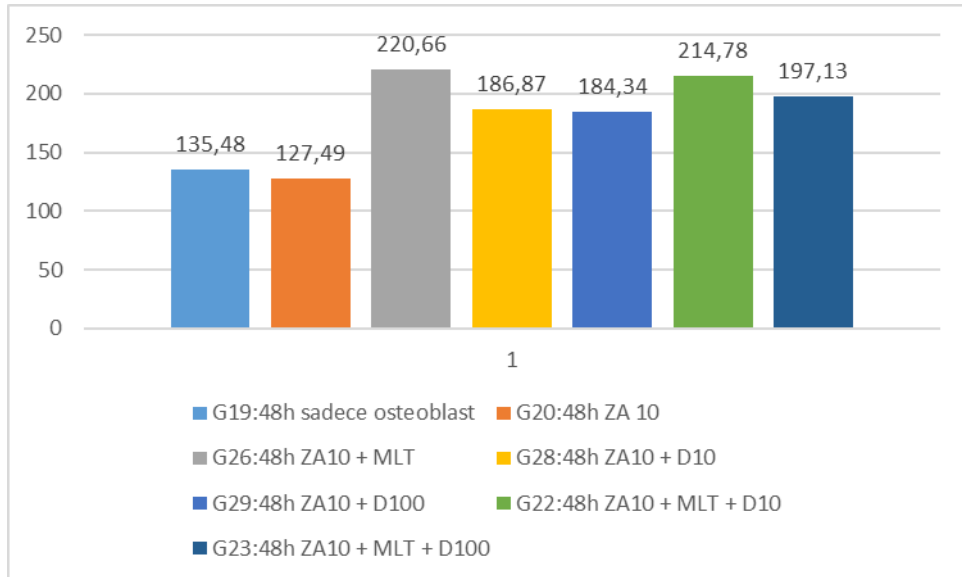
Şekil 44:Zoledronik asidin osteoblastların IL-8 değerleri üzerine etkilerinin karşılaştırılması-24.saat

Melatonin ve D vitamininin 24.saatte 10 μ M ZA uygulanan osteoblastlar üzerine etkilerine baktığımızda tüm takviyeler her kombinasyonda IL-8 seviyesini yükseltmiştir. 10 μ M lık ZA eklenmesi osteoblastların IL-8 seviyesinin 204,11'den 135,48'e düşmesine sebebiyet vermiştir. ZA eklendikten sonra yapılan takviyeler bu düşüşü kompanse etmiş hatta ilk hali olan 204,11 seviyesinin de üzerine çıkartmıştır. Melatonin ve D vitamini kombinasyonları ise tek tek uygulandıklarındaki etkilerinden daha yüksek IL-8 seviyelerine ulaşmaya yardımcı olmuştur. Melatonin ve iki konsantrasyondaki D vitaminin kombinasyonlarının yarattığı IL-8 yükselmesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$) (Şekil 45).



Şekil 45: Melatonin ve D vitamininin 24. saatte 10 μ M ZA uygulanan osteoblastlar üzerine etkilerinin karşılaştırılması

Aynı karşılaştırmayı 48. saat için yaptığımızda da 24. saatle aynı sonuçları elde etmiş bulunmaktayız. Aynı 24. saatteki gibi 10 μ M'lık ZA eklenmesi osteoblastların IL-8 seviyesinin 135,48'den 127,49'a düşmesine sebebiyet vermiştir. Yapılan melatonin ve D vitamini eklemeleri ise bu IL-8 seviyesindeki düşüşü kompanse etmiş ve ilk hali olan 135,48'in bile üzerine çıkartmıştır. Ancak bu yükselmeler istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 46).



Şekil 46: Melatonin ve D vitamininin 24. saatte 10 μ M ZA uygulanan osteoblastlar üzerine etkilerinin karşılaştırılması-48.saat

4.3.6. IL-8 Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İlk 24 saatte eklenen melatonin ve D vitamini (100 µM'lık D vitamini hariç) osteoblastlardan salgılanan IL-8 düzeyini arttırmıştır. 48 saate gelindiğinde ise melatonin ve D vitamini kombinasyonlarının tümünde IL-8 düzeyi düşük bulunmuştur ancak bu artış ve azalmalar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. Bu durum tarafımızdan içeriklerin 24 saat sonrasında etki göstermeye başladığını diğer bir deyişle melatonin ve D vitamininin IL-8 seviyesini düşürmesinin 24 satten fazla sürdüğü şeklinde yorumlanmıştır. 24 ve 48.saat 10 µM'lık ZA uygulanan gruplarda melatonin ve her iki dozdaki (D10 ve D100) D vitamini kombinasyonları osteoblastlardan salınan IL-8 düzeyini arttırmıştır. Ancak bu değerlerden 24.saatteki artış istatistiksel olarak anlamlı düzeydeyken ($p<0.05$) 48.saatteki artış anlamlı değildir.

4.3.7. Caspase-3 Sonuçları

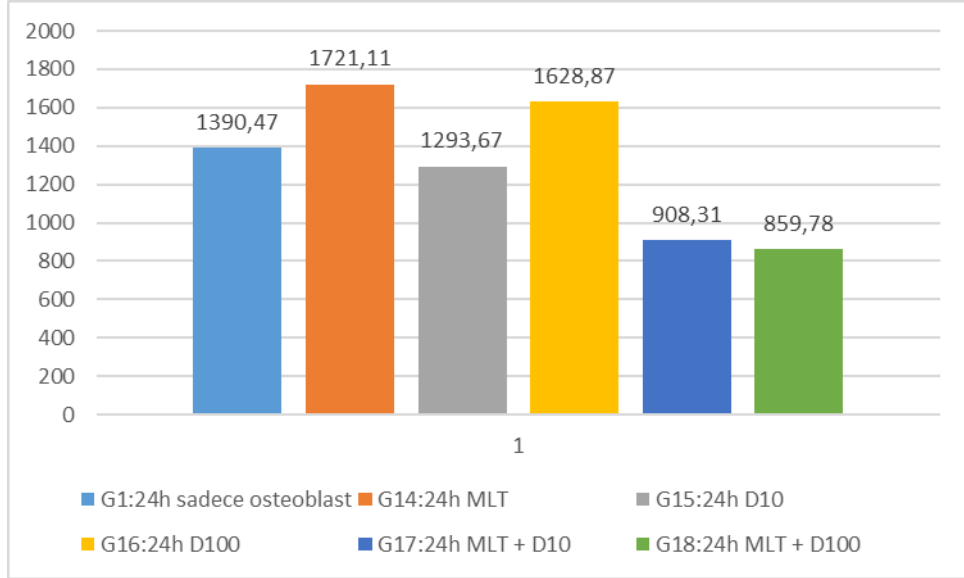
Tablo 16:Caspase-3 Sonuçları

G1:24h sadece osteoblast	1390,47±0 (1390,5)
G2:24h ZA 10	811,48±0 (811,5)
G3:24h ZA 50	1045,48±0 (1045,5)
G4:24h ZA10 + MLT + D10	1232,9±0 (1232,9)
G5:24h ZA10 + MLT + D100	583,37±0 (583,4)
G6:24h ZA50 + MLT + D10	937,83±0 (937,8)
G7:24h ZA50 + MLT + D100	1245,21±0 (1245,2)
G8:24h ZA10 + MLT	1310,5±0 (1310,5)
G9:24h ZA50 + MLT	995,82±0 (995,8)
G10:24h ZA10 + D10	1276,96±0 (1277)
G11:24h ZA10 + D100	830,41±0 (830,4)
G12:24h ZA50 + D10	1190,96±0 (1191)
G13:24h ZA50 + D100	1174,92±0 (1174,9)
G14:24h MLT	1721,11±0 (1721,1)
G15:24h D10	1293,67±0 (1293,7)
G16:24h D100	1628,87±0 (1628,9)
G17:24h MLT + D10	908,31±0 (908,3)
G18:24h MLT + D100	859,78±0 (859,8)
G19:48h sadece osteoblast	2358,02±0 (2358)
G20:48h ZA 10	2000,9±0 (2000,9)

G21:48h ZA 50	1787,85±0 (1787,9)
G22:48h ZA10 + MLT + D10	2119,07±0 (2119,1)
G23:48h ZA10 + MLT + D100	2090,54±0 (2090,5)
G24:48h ZA50 + MLT + D10	1690,62±0 (1690,6)
G25:48h ZA50 + MLT + D100	1669,91±0 (1669,9)
G26:48h ZA10 + MLT	1969,73±0 (1969,7)
G27:48h ZA50 + MLT	1911,52±0 (1911,5)
G28:48h ZA10 + D10	2018,32±0 (2018,3)
G29:48h ZA10 + D100	1769,82±0 (1769,8)
G30:48h ZA50 + D10	1971,46±0 (1971,5)
G31:48h ZA50 + D100	2578,07±0 (2578,1)
G32:48h MLT	2699,84±0 (2699,8)
G33:48h D10	1685,83±0 (1685,8)
G34:48h D100	2989,95±0 (2990)
G35:48h MLT + D10	2048,11±0 (2048,1)
G36:48h MLT + D100	2004,38±0 (2004,4)

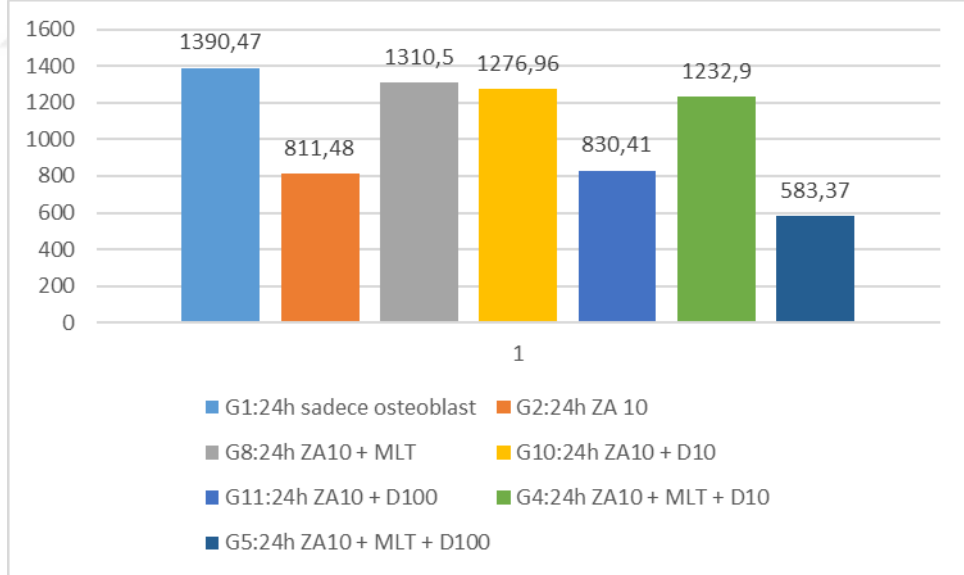
4.3.8. Caspase-3 Sonuçlarının Karşılaştırılması

D vitamini ve melatoninin caspase-3 üzerine etkisini görmek amacıyla 24 saat gruplarında; sadece osteoblast, sadece melatonin ve iki konsantrasyonda sadece D vitamini grupları ve bunların kombinasyonlarının düzeyleri karşılaştırılmıştır. Melatonin ve 100 µM'lık D vitamini grubunda kontrol grubuna kıyasla yükselme görülürken diğer gruplarda ise caspase-3 seviyesinde düşüş gözlenmiştir. Ancak bu düşüş ve yükselmeler istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 47).



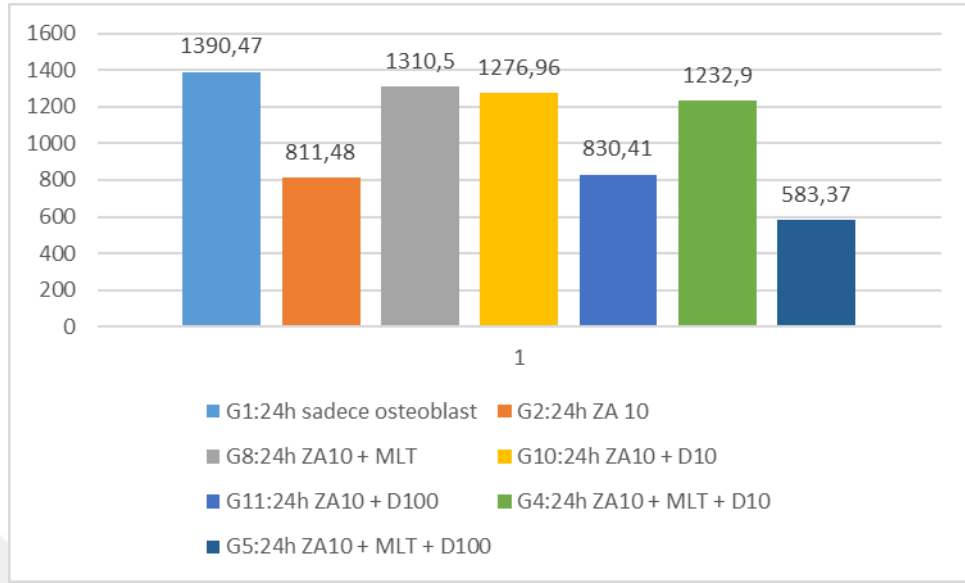
Şekil 47:D vitamini ve melatoninin Caspase-3 üzerine etkisinin karşılaştırılması-24.saat

Melatonin ve D vitamininin 24. saatte 10 μ M ZA uygulanan osteoblastlar üzerindeki etkilerine baktığımızda gruplarda karışık olarak yükselme ve azalma gözlenmişse de bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamışlardır (Şekil 48).



Şekil 48:Melatonin ve D vitamininin 24. saatte 10 μ M ZA uygulanan osteoblastlar üzerine etkilerinin karşılaştırılması-24.saat

Aynı karşılaştırmayı 48. saat 50 μ M ZA eklenen gruplarda yaptığımızda da yükselme ve azalma görmekteyiz. Yine bu değerlerdeki dalgalanmalar istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 49).



Şekil 49: Melatonin ve D vitamininin 24. saatte 10 µM ZA uygulanan osteoblastlar üzerine etkilerinin karşılaştırılması-48.saat

4.3.9. Caspase-3 Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Caspase-3 sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı fazla data olmasa da özellikle melatonin ve D vitamini kombinasyonlarındaki grupların caspase-3 seviyelerinin diğerlerine nazaran daha düşük olduğu yani gruplardaki apoptozun inhibe edildiği gözlenmektedir. Ancak bu sonuçlar değerlendirilirken apoptozu tetikleyen birden çok unsur olduğu göz önünde tutulmalıdır.

5. TARTIŞMA

MRONJ ve klinik bulgularının hastanın hayat kalitesi üzerindeki etkileri uzun süredir diş hekimliği cerrahisinin çalışma konusu haline gelmiştir. Kanser tedavisi, osteoporoz ya da diğer sebeplerle bisfosfonat kullanan hastaların MRONJ tablosu geliştikten sonra tedavisi oldukça güçtür ve bu durumu düzeltecek yöntemler aranmaktadır.

Çalışmamızda zoledronik asidin osteoblastların canlılık ve proliferasyonu üzerindeki olumsuz etkilerinin melatonin ve D vitamini takviyesi ile giderilebileceği fikri üzerinden yola çıktık ve bu amaçla hücre kültürü deneyimizde osteoblastların canlılık (MTT), gen ekspresyonu, bazı kemik yapımı markerlarını (ALP, IL-8) ve apoptoz belirteçlerini (caspase-3) inceledik. Önce osteoblastlara 10 ve 50 μ M zoledronik asit ekleyip markerlardaki değişimleri gözlemledik, sonrasında ise bu gruplara D vitamini (10 ve 100 μ M olmak üzere) ve melatonin takviyesi yaptık. Bu eklemelerin oluşturduğu değişimleri gözlemledik. Çalışmamızda 36 alt gruba ayrılan örneklerimizi değerlendirmek amacıyla osteoblast hücrelerine canlılık (MTT), ELISA testleri uyguladık ve gen ekspresyonlarını inceledik.

Huang ve ark. (2016) zoledronik asit dozlarının osteoblastlar üzerindeki etkilerini araştırdıkları in vitro çalışmalarında sayı ve canlılık değerlendirilmesi için CCK-8 Cell Counting Kit (Wuhan Boster Biological Tech) kullanmışlardır. 10 μ M ve üzerindeki ZA konsantrasyonlarında (1-3-5 ve 7.günde) osteoblastların sayı ve canlılığının kontrol grubuna göre düştüğünü raporlamışlardır.

Biz ise çalışmamızda osteoblastların canlılık değerlendirilmesi için Boster firmasının MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit'ini kullandık. Çalışmamızda yaptığımız MTT test sonuçlarında 24.saat 10 μ M ve 50 μ M'lik zoledronik asit içeren grup ile sadece osteoblast içeren kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak 48.saat verilerine baktığımızda Huang ve ark. (2016) sonuçlarına paralel olarak hem 10 μ M hem de 50 μ M lik ZA grubunda 24.saatteki değerlerine göre hücre canlılıkları istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Diğer çalışmada da aradaki fark 1. günden sonra açılmaya başlamıştır, dolayısı ile ZA'nın sitotoksik etkisinin 24.saatten sonra başladığını bu nedenle ilk 24 saatlik bölümde anlamlı bir sonuç alınamadığını düşünmekteyiz. Yine aynı çalışmada apoptozu değerlendirmek amacıyla aktif ve inaktif caspase-3 analizi yapılmıştır

(Western Blot). Biz ise çalışmamızda apoptozu değerlendirmek amacıyla yaptığımız caspase-3 analizi için Boster firmasının Human Caspase-3 PicoKine ELISA Kit'ini kullandık. Huang ve ark. (2016) gruplardaki zoledronik asit konsantrasyonu artmaya başladığında (10 μ M ve 100 μ M'lık gruplarda) inaktif caspase-3 seviyesinin düştüğünü ve aktif caspase-3 seviyesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Aynı caspase-3 değerlendirilmesinde olduğu gibi BMP-2, ALP ve RUNX-2 değerlendirmelerinde de ZA konsantrasyonlarının artmasıyla bu proteinlerinin ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düştüklerini belirtmişlerdir (Huang et al., 2016).

Benzer şekilde biz de çalışmamızda 48. saat 50 μ M'lık ZA grubunun RUNX-2 gen ekspresyon düzeyini yine aynı saat dilimindeki kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulduk. Paralel olarak 48. saatteki 50 μ M'lık ZA grubunun BMP-2 ekspresyon düzeyinin yine aynı saat dilimindeki 10 μ M'lık ZA grubununkine göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığını gözlemledik.

Thibaut ve ark. 2015'te zoledronik asidin osteoblastlar üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla 3 boyutlu hücre kültürü çalışması yapmışlardır. Hücre kültüründe bizim de çalışmamızda kullandığımız hücre serisini (hFOB 1.19 (hFOB)) kullanmışlardır. 0,1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarında ZA çözeltileri hazırlamış ve bu gruplardaki proliferasyon, morfoloji, asit fosfataz ve caspase-3 değerlerini incelemişlerdir. 10 μ M ZA grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede canlı hücre sayının düştüğünü gözlemlemişlerdir. Thibaut ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada 10 μ M ZA kullanmışlar ve osteoblastları 3.gün ve 10.gün olarak kontrol etmişlerdir (Thibaut et al., 2015).

Biz ise çalışmamızda osteoblastların canlılık ve gen ekspresyonlarını, erken dönem etkileri gözlemek amacıyla, 24 ve 48.saat zaman aralıklarında değerlendirmiş bulunmaktayız.

Basso ve ark. (2013) da benzer şekilde zoledronik asidin osteoblastlar üzerindeki etkisini incelemek amacıyla değişik konsantrasyonlarda ZA çözeltileri içerisinde osteoblast düzenekleri hazırlamışlar ve hücrelerin canlılık, total protein sentezi ve ALP ölçümlerini yapmışlardır. Hücrelerin canlılığının ölçülmesi için bizim de çalışmamızda uyguladığımız MTT test methodunu kullanmışlardır. MTT sonuçlarını değerlendirdiklerinde 1 μ M ZA konsantrasyonu olan düzenekte 7 ve 14.günlerde anlamlı bir fark göremezken, 5 μ M ZA konsantrasyonlu grupta 7,14 ve 21.gündeki canlılıkta

istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gözlemlenmiştir (Fernanda G Basso et al., 2013).

Biz de çalışmamızda bu veriye paralel olarak 48.saat grubunda hem 10 μ M hem de 50 μ M'lik ZA grubunda hücre canlılığını 24.saatteki değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulduk.

Chu ve ark. 2017'de yaptığı çalışmada melatoninin yaşlı sıçanlardaki osteoporoza etkisi incelenmiştir. Sıçanları 8 kontrol ve 8 deney grubu olarak ikiye ayırmışlar, 12 hafta boyunca kontrol grubuna intraperitoneal salin solüsyonu, deney grubuna ise günde kg başına 50 mg olacak şekilde melatonin enjekte etmişlerdir. Gruplar daha sonra micro CT, ELISA ve RT-PCR testleri ile değerlendirilmiştir. Çalışma grubu bizim de tezimizde incelediğimiz gibi osteoblast diferansiyasyon genlerinden RUNX-2'yi değerlendirmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre melatonin grubundaki RUNX-2 geni ekspresyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak melatoninin osteoblast diferansiyasyonunu destekleyici olduğunu belirtmişlerdir (Chu et al., 2017).

Bizim çalışmamızda RUNX-2 geni için yaptığımız RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde Chu ve ark. (2017) bulgularına paralel olarak ilk 24 saatte melatonin içeren grubun sadece osteoblast içeren kontrol grubuna göre RUNX-2 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda 48.saatteki kontrol grubunun (sadece osteoblast) RUNX-2 ekspresyon değeri 1,555 olarak bulunmuştur. 10 μ M'lik ZA grubunda ise bu değer zoledronik asidin osteoblastlar üzerindeki olumsuz etkileri sebebiyle 1,415'e, 50 μ M'lik ZA grubunda ise 1,471'e düşmüştür, bu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır. Çalışmamızda D vitamini ve melatoninin, zoledronik asidin yarattığı bu olumsuz etkiler üzerinde ne gibi değişiklikler yapabileceğini görmeyi amaçlamıştık. Bu nedenle oluşturduğumuz 10 μ M'lik ZA+ melatonin+100 μ M'lik D vitamini grubunda RUNX-2 gen ekspresyonu 1,533'e çıkmıştır. 50 μ M'lik ZA+ melatonin+100 μ M'lik D vitamini grubunda ise bu değer 1,631 olarak hesaplanmıştır. Her iki dozda D vitamini ve melatonin eklenen grupların RUNX-2 ekspresyon değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir.

2017'de Alonso ve ark. melatoninin ZA uygulanmış osteoblastlar üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada 1, 5, 10, 50, 100 and 300 μ M ZA ve 1, 10, 50, 100 and 200 μ M'lik konsantrasyonlarda melatonin içeren

gruplar oluşturmışlar ve bu grupların hücre canlılıklarını bizim de kullandığımız MTT testi ile 24, 48 ve 72.saat olacak şekilde incelemişlerdir. Sonuçlara göre en düşük canlılık oranını 24.saat 300 μM ZA grubunda görmüşler ancak bu değerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir (Camacho-Alonso et al., 2017).

Çalışmamızda ise osteoblastların en düşük canlılık oranı 48.saat 50 μM 'lık ZA ve 100 μM 'lık D vitamini grubunda gözlemlendi.

Yine aynı çalışmada 100 ve 200 μM 'lık melatoninin düşük konsantrasyonlu (1 ve 5 μM) ZA gruplarında koruyucu etkili olduğunu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulamadıklarını belirtmişlerdir (Camacho-Alonso et al., 2017).

2011'de Walter ve ark. bisfosfonatların osteoblast, fibroblast ve insan umbilikord endotelial hücreleri üzerindeki etkilerini incelemek üzere bir çalışma yapmışlardır. Bisfosfonat olarak nitrojen içermeyen klodronat ve nitrojen içeren pamidronat, ibandronat ve bizim de çalışmamızda kullandığımız zoledronat yani zoledronik asit kullanmışlardır. Kullandıkları ZA konsantrasyonları 0, 5, 50, 100, 200, 500 μM 'dür ve inkübasyon süreleri ise 72 saattir. Gruplardaki hücre canlılığını ölçmek amacıyla Calcein canlılık testi ve apoptozu ölçmek amacıyla Tunnel testini uygulamışlardır. Calcein testinin sonuçlarına göre düşük konsantrasyonlarda (5–50 μM) zoledronatın osteoblastlar üzerindeki etkisinin diğer bisfosfonatlara göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca diğer çalışmalar ve bizim çalışmamıza benzer şekilde ZA konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının da azaldığını gözlemlemişlerdir. Apoptoz sonuçlarına bakıldığında ise bisfosfonatlar arasında en yüksek etkiyi zoledronat ve pamidronatın yarattığını belirtmişlerdir (Christian Walter, Pabst, Ziebart, Klein, & Al-Nawas, 2011).

2015'te Lozano ve ark. yaptıkları çalışmada melatoninin ZA uygulanmış mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisini hücre kültürü yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmada 10 yetişkinin 20 yaş dışı çekimi esnasında elde edilen periodontal ligament hücrelerini ve iliak kretten perkutan olarak elde ettikleri kemik iliği hücrelerini kullanmışlardır (Rodríguez-Lozano et al., 2015).

Biz ise çalışmamızda hazır insan kaynaklı sürekli osteoblast hücre kültürleri (hFOB 1.19) American Type Culture Collection (ATCC®), (Rockville, MD, USA) hücrelerini kullandık.

Lozano ve ark. (2015) yaptıkları deneyde ZA olarak ilaç formu olan Zometa (Teva Pharmaceutical Industries) ve melatonin (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Biz de deneyimizde aynı marka melatonin kullanmış olup ZA olarak monohidratı ve aktif formu olan “Zoledronic acid monohydrate $\geq 98\%$ (HPLC), $\geq 98\%$ (TLC)” (Sigma Aldrich)’ı kullandık. Çalışmamızda hücreleri değerlendirirken MTT testi olarak Boster firmasının MTT cell proliferation and cytotoxicity assay kit’ini kullandık, Lozano ve ark. (2015) ise Chemicon firmasının MTT cell growth kit’ini kullanmışlardır. ZA olarak 1,3,5,10,20 ve 30 μM ’lık, melatonin olarak da 300 ve 500 μM ’lık konsantrasyonları incelemişlerdir (Rodríguez-Lozano et al., 2015).

Biz ise deneyimizde 10 ve 50 μM ’lık ZA konsantrasyonları kullandık. Melatonini ise tek (40 μM) konsantrasyonda çalıştık.

Elde ettikleri MTT sonuçları değerlendirildiğinde Lozano ve ark. (2015) kemik iliği hücrelerinin zoledronik aside karşı periodontal ligament hücrelerinden daha dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise 3 ve 5 μM ’lık ZA gruplarında periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulmuşlardır ($p < 0.01$). Kemik hücreleri ise bu düşüşü 10 μM ’lık ZA grubunda göstermişlerdir ($p < 0.001$). Daha yüksek ZA konsantrasyonlarında (30 μM) hücrelerin proliferasyon yüzdelerinde periodontal ligament hücrelerinde 72.8% kemik iliği hücrelerinde ise 44.8%’lik bir düşüş gözlemişlerdir. Bu gruplara melatonin eklendiğinde ise değişik hücre yanıtları meydana gelmiştir. Periodontal ligament hücrelerinde 100 μM gibi düşük konsantrasyonlarda melatonin eklenmesi ZA’nın 1 μM ‘lık düşük dozu kullanılsa bile sitotoksik etkilerini engelleyememiştir. 5 μM ’a kadar ZA uygulanan gruplarda ancak 300 μM ’lık melatonin eklenmesi, periodontal ligament hücrelerindeki proliferasyonu arttırabilmiştir. Kemik iliği hücreleri ise zoledronik aside karşı daha dirençli oldukları için 100 μM ’lık melatonin bile ZA’in etkilerini engellemek açısından yeterli olduğunu belirtmişlerdir (Rodríguez-Lozano et al., 2015).

Bizim çalışmamızda ise 24.saatte 10 ve 50 μM ’lık ZA uygulamalarında osteoblast canlılığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükselme gözlemlenmiş, 48.saatte ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüş gözlemlenmiştir. Lozano ve ark. (2015) yaptıkları çalışma ile araştırmamızın bulguları arasındaki farka; kullanılan zaman aralıkları, ZA konsantrasyonları ve hücre tipi farklılıklarının neden olduğunu düşünmekteyiz.

Basso ve ark. 2013'te zoledronik asidin osteoblastlar üzerindeki inhibisyonunu incelemek amacıyla hücre kültürü çalışması yapmışlardır (Fernanda Gonçalves Basso, Turrioni, Hebling, & Costa, 2013). Hücre olarak insan osteoblastları kullanmışlar ve kullandıkları seri ise SaOs-2 ATCC HTB-85'tir. 48 saatlik inkübasyon sonunda örneklerle 5 μ M'lık ZA eklemesi yapmışlar ve hücreleri 7-14 ve 21.gün olarak değerlendirmişlerdir. Değerlendirmeyi ALP düzeyi ve Alizarin Red testleri şeklinde gerçekleştirmişlerdir. ALP enzim aktivitesini belirlemek amacıyla 590 nm'lik solüsyonu absorbe edişi okuyan spektrofotometre kullanmışlardır. Alirazin Red boyama için Sigma Aldrich firmasının kitini kullanmışlardır. 7 günlük grupta ALP aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla 64% oranında azaldığını gözlemlemişlerdir ($p=0.001$). 14 ve 21.günlerde ise bu değer 82%'lere çıkmıştır. Alirazin Red ile mineralize nodül formasyonuna baktıklarında ise ZA uygulanan grupta mineralize nodül oluşumunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Mineralizasyonda 7.günde 85%, 14. günde 83% ve 21.günde ise 63% azalma tespit ettiklerini belirtmişlerdir (Fernanda Gonçalves Basso et al., 2013).

Biz ise deneyimizde ALP seviyelerini incelediğimizde 24 ve 48.saat değerlerinde 10 ve 50 μ M'lık ZA gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükselme gözlemledik. Biz çalışmamızda 24 ve 48. saat zaman aralığı sonuçlarını incelerken Basso ve ark. (2013) 7,14 ve 21 gün gibi bize göre daha uzun dönem sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Deneyimiz ile Basso ve ark. 2013'te yaptıkları çalışma sonuçları arasındaki farka deneyde kullanılan hücre serilerinin ve inkübasyon sürelerinin farklı olmasının neden olacağını düşünmekteyiz. ALP'nin 48.saat sonrasında 7. güne kadar önemli bir düşüş gösterebileceğini bu bağlamda bizim deneyimizin erken sonuçlar içerdiğini gözlemlemekteyiz.

2020'de Yadegari ve ark. yaptıkları hayvan deneyi çalışmasında melatoninin MRONJ'a karşı koruyuculuğunu incelemişlerdir (Yadegari, Aminzadeh, Seyyedkhamesi, & Aminian, 2020). Deneyde 30 erkek Wistar albino sıçanı kullanılmıştır. Bu 30 sıçan biri kontrol olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna 0.1 mg/kg dozunda haftada 3 olmak üzere 4 hafta boyunca intraperitoneal salin enjeksiyonu yapılmıştır. İkinci gruba birinci gruba aynı doz ve ritimde intraperitoneal ZA (Zolena; Ronak Pharmaceutical, Saveh, Iran) enjeksiyonu yapılmıştır. Son gruba ise ikinci gruba aynı doz ve ritimde ZA enjeksiyonuna ek olarak 5 mg/kg/gün olacak şekilde melatonin (Melatonin, Nature Made, CA, USA) 3 hafta boyunca akşam saat 4 ve 5 arasında oral olarak uygulanmıştır. 4 hafta

bekleme periyodunun sonunda her sıçanın sağ 1. maxiller molar dişi çekilmiş, iyileşme için 4 hafta beklendikten sonra sakrifikasyon işlemi gerçekleşmiş ve histopatolojik inceleme yapılmıştır. İncelemeyi vaskülarizasyon ve inflamasyon dereceleri, fibroblast sayısı, osteoklast sayısı ve osteonekroz alanları şeklinde gerçekleştirmişlerdir. Yadegari ve ark. (2020) elde ettiği sonuçlara göre osteonekroz alanlarında 2.grupta kontrol grubuna göre artma gözlenmiş gruba melatonin eklenmesi ise bu alanları kontrol grubundaki değere kadar düşüremese bile osteonekroz alanlarında azalma sağlamıştır. Osteoklast sayılarında ise sıralama; en yüksek birinci kontrol grubu, sonrasında melatonin eklenen grup ve sonuncu olarak da sadece ZA içeren grup olarak belirtilmiştir. Sonuç olarak melatoninin, zoledronik asidin sebep olduğu osteonekroz alanlarındaki artma ve osteoklast sayısındaki azalma gibi durumları engelleyebileceğini ancak antifibrotik etkisinin yetersiz olduğunu belirtmişlerdir (Yadegari et al., 2020).

Deneyimizde Yadegari ve ark. (2020) farklı olarak in vitro bir çalışma yapmamıza ve osteoklast değil osteoblastları kullanmamıza rağmen melatoninin koruyuculuğu konusunda biz de bazı paralel sonuçlar elde ettik. 50 μ M ZA, melatonin ve 10 μ M D vitamini içeren grup ile 50 μ M ZA ve 10 μ M D vitamini içeren grubun karşılaştırılması sonucunda ikinci grubun MTT değeri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum melatoninin hücrelerin canlılığını korumada yardımcı etkisinin olacağını fikrini desteklemektedir.

Farshdousti Hagh ve ark. 2012’de yayınladığı bir çalışmada insan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler 5 μ M’lık ZA etkisine maruz bırakıldıktan sonra osteojenik diferansiyasyon için 3 hafta boyunca inkübe edilmişlerdir (FARSHDOUSTI et al., 2012). 0,7,14 ve 21. günlerde DNA ve RNA örnekleri alınmış, cDNA elde edilmiş ve RT-PCR tekniği ile OSX gen ekspresyonu araştırılmıştır. Osteoblasta farklılaşan hücrelerde zoledronik asidin etkisiyle özellikle 14 ve 21. günlerde OSX’in mRNA ekspresyonunda artış gözlenmiştir ($p<0.05$), ancak farklılaşmayan mezenkimal hücrelerde OSX’te değişiklik olmamıştır. Farshdousti Hagh ve ark. (2012) sonuç olarak OSX in başlatıcı bölgesinin osteoblastik farklılaşma sırasında zoledronik asitten bağımsız olarak hipometilize olduğunu belirtmişlerdir (FARSHDOUSTI et al., 2012).

Çalışmamızdaki OSX gen ekspresyon sonuçlarına bakacak olursak 24.saat 50 μ M ZA grubunda kontrol grubu ile kıyaslanıldığında artış gözlenirken 48.saat grubunda azalma olduğunu, ancak sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptadık. Bu

açından baktığımızda kullanılan hücre farklılığı, inkübasyon süresi ve konsantrasyon farklılıkları sebebiyle Farshdousti Hagh ve ark. (2012) yaptığı çalışma ile paralel olmayan sonuçlar elde ettiğimizi düşünmekteyiz.

Tüm bulgular değerlendirildiğinde ZA uygulaması sonrası MRONJ tablosunun gelişmesini engellemek amacıyla D vitamini ve melatonin verilmesi düşüncesi çalışmamızdaki bulgular ile uyum göstermektedir. Çalışmamızı, osteoblast hücrelerinin canlılığının yanı sıra kemik yapımını etkileyen gen ve markerları da değerlendirecek şekilde planladık. Sonuçları incelediğimizde melatonin ve D vitamini takviyesinin hücre canlılığı, gen ekspresyonları ve markerlar açısından farklı sonuçlara yol açtığını görmekteyiz. MTT verileri değerlendirildiğinde, D vitamini ve melatonin uygulamaları osteoblast hücrelerinin vitalite ve proliferasyonları açısından olumlu sonuçlara yol açmaktadırlar. Özellikle gen ekspresyon sonuçlarını incelediğimizde ise D vitamini +melatonin kombinasyonundansa sadece D vitamini uygulamasının (özellikle D100) gen ekspresyonlarını daha fazla arttırdığını gözlemlemekteyiz. ALP, caspase-3 ve IL-8 sonuçlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Çalışmamızda kullanılan D vitamini ve melatonin dışında hücre canlılığını ve kemik yapım genlerini uyaran birden fazla etmen olduğu ve inkübasyon süresinin de bu değerleri oldukça etkilediği unutulmamalıdır. D vitamini ve melatoninin ZA uygulanan osteoblastlar üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla, farklı konsantrasyon değerlerindeki ZA, melatonin ve D vitamininin uygulandığı, uzun dönem takibi olan çalışmalar yapılmasının bu konudaki bilgileri daha da arttıracığına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

A. Khan, A. M., A. Cheung, W. Hashem & J. Compston (2016). Osteonecrosis of the jaw (ONJ): diagnosis and management in 2015. *Osteoporosis International*, 27, 853–859.

Abedin, M., Wang, D., McDonnell, M., Lehmann, U., & Kelekar, A. (2007). Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death & Differentiation*, 14(3), 500-510.

Akech, J., Wixted, J. J., Bedard, K., Van der Deen, M., Hussain, S., Guise, T. A., . . . Altieri, D. C. (2010). Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene*, 29(6), 811-821.

Akın, Ç. A. M., and Murat Faik ERDOĞAN. (2003). Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 56(2).

Arce, K., Assael, L. A., Weissman, J. L., & Markiewicz, M. R. (2009). Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 67(5), 75-84.

Bassett, C., Donath, A., Macagno, F., Preisig, R., Fleisch, H., & Francis, M. (1969). Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. *The Lancet*, 294(7625), 845.

Basso, F. G., Turrioni, A. P. S., Hebling, J., & Costa, C. A. d. S. (2013). Inhibition of osteoblast activity by zoledronic acid. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 49(5), 368-371.

Basso, F. G., Turrioni, A. P. S., Hebling, J., & de Souza Costa, C. A. (2013). Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology*, 59(6), 534-541.

Bendre, M. S., Montague, D. C., Peery, T., Akel, N. S., Gaddy, D., & Suva, L. J. (2003). Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone*, 33(1), 28-37.

Benford, H., McGowan, N., Helfrich, M. H., Nuttall, M., & Rogers, M. J. (2001). Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone*, 28(5), 465-473.

Bessa, P. C., Casal, M., & Reis, R. (2008). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(2-3), 81-96.

Bianchi, S. D., Scoletta, M., Cassione, F. B., Migliaretti, G., & Mozzati, M. (2007). Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 104(2), 249-258.

Bruderer, M., Richards, R., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2014). Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*, 28(28), 269-286.

Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2012). *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book*: Elsevier Health Sciences.

Camacho-Alonso, F., Urrutia-Rodríguez, I., Onate-Cabrerizo, D., Oñate-Sánchez, R., & Rodríguez-Lozano, F. (2017). Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human osteoblasts. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 45(8), 1251-1257.

Cardinali DP, P. P. (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 175–190.

Carey, J. J., & Palomo, L. (2008). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: Innocent association or significant risk? *Cleveland Clinic journal of medicine*, 75(12), 871-879.

Chen, D., Zhao, M., & Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth factors*, 22(4), 233-241.

Cho, Y.-E., & Kwun, I.-S. (2018). Zinc upregulates bone-specific transcription factor Runx2 expression via BMP-2 signaling and Smad-1 phosphorylation in osteoblasts. *Journal of Nutrition and Health*, 51(1), 23-30.

Chu, Z., Li, H., Sun, S., Jiang, Y., Wang, B., & Dong, Y. (2017). Melatonin promotes osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in aged rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*, 21, 4446-4456.

Claustrat, B., Brun, J., & Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews*, 9(1), 11-24.

Coşkun, G., & Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.

Coxon, F. P., Helfrich, M. H., Van't Hof, R., Sebt, S., Ralston, S. H., Hamilton, A., & Rogers, M. J. (2000). Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(8), 1467-1476.

Delmas, P., Eastell, R., Garnero, P., Seibel, M., Stepan, J., & Foundation, C. o. S. A. o. t. I. O. (2000). The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporosis International*, 11(6), S2.

Drake, M. T., Clarke, B. L., & Lewiecki, E. M. (2015). The pathophysiology and treatment of osteoporosis. *Clinical therapeutics*, 37(8), 1837-1850.

Duman AE, G. G., Gürlek A. . (2005). Erkek osteoporozu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 36, 175-183.

Erdem, B. K., & Akbas, H. Metabolomics Approach in Vitamin D.

FARSHDOUSTI, H. M., NORUZINIA, M., MORTAZAVI, Y., SOLEIMANI, M., KAVIANI, S., & MAHMODINIA, M. M. (2012). Zoledronic acid induces Steoblastic differentiation of mesenchymal stem cells without change in Hypomethylation status of OSTERIX promoter.

Fauci, A. S. (2008). *Harrison's principles of internal medicine (Vol. 2)*: McGraw-Hill, Medical Publishing Division New York.

Fedde, K. N. (1992). Human osteosarcoma cells spontaneously release matrix-vesicle-like structures with the capacity to mineralize. *Bone and mineral*, 17(2), 145-151.

Fleisch, H., Russell, R., Bisaz, S., Casey, P., & Mühlbauer, R. (1968). The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution. *Calcified tissue research*, Suppl: 10.

Fleisher, K. E., Kontio, R., & Otto, S. (2016). Antiresorptive drug-related osteonecrosis of the jaw (ARONJ)-a guide to research: Thieme.

Force, A. T. (2007). *Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws*, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons:

American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*, 65, 369-376.

Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K., & Witten, P. E. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(1), 176-190.

Frith, J. C., Mönkkönen, J., Auriola, S., Mönkkönen, H., & Rogers, M. J. (2001). The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 44(9), 2201-2210.

Garrison, K. R., Shemilt, I., Donell, S., Ryder, J. J., Mugford, M., Harvey, I., . . . Alt, V. (2010). Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(6).

Gersbach, C. A., Byers, B. A., Pavlath, G. K., & García, A. J. (2004). Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype. *Experimental cell research*, 300(2), 406-417.

Groeneveld, E., & Burger, E. (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European journal of endocrinology*, 142(1), 9-21.

Hecht, J., Seitz, V., Urban, M., Wagner, F., Robinson, P., Stiege, A., . . . Brieske, N. (2007). Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2^{-/-} mouse model. *Gene Expression Patterns*, 7(1-2), 102-112.

Holst-Hansen, C. (1998). MTT-cell proliferation assay. *Cell Biology-A Laboratory Handbook*, 1, 16-18.

Hosking, D., Lyles, K., Brown, J. P., Fraser, W. D., Miller, P., Curiel, M. D., . . . Zelenak, K. (2007). Long-term control of bone turnover in Paget's disease with zoledronic acid and risedronate. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(1), 142-148.

Hu, L., Han, J., Yang, X., Wang, Y., Pan, H., & Xu, L. (2016). Apoptosis repressor with caspase recruitment domain enhances survival and promotes osteogenic differentiation of human osteoblast cells under Zoledronate treatment. *Molecular medicine reports*, 14(4), 3535-3542.

Huang, X., Huang, S., Guo, F., Xu, F., Cheng, P., Ye, Y., . . . Chen, A. (2016). Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Molecular medicine reports*, 13(1), 613-622.

Jensen, E. D., Gopalakrishnan, R., & Westendorf, J. J. (2010). Regulation of gene expression in osteoblasts. *Biofactors*, 36(1), 25-32.

Jeon, M. J., Kim, J. A., Kwon, S. H., Kim, S. W., Park, K. S., Park, S.-W., . . . Shin, C. S. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23270-23277.

Jung, J., Yoo, H. Y., Kim, G. T., Lee, J. W., Lee, Y. A., Kim, D. Y., & Kwon, Y. D. (2017). Short-term teriparatide and recombinant human bone morphogenetic protein-2 for regenerative approach to medication-related osteonecrosis of the jaw: a preliminary study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 32(12), 2445-2452.

Khalid, O., Baniwal, S. K., Purcell, D. J., Leclerc, N., Gabet, Y., Stallcup, M. R., . . . Frenkel, B. (2008). Modulation of Runx2 activity by estrogen receptor- α : implications for osteoporosis and breast cancer. *Endocrinology*, 149(12), 5984-5995.

Khosla, S., Bilezikian, J. P., Dempster, D. W., Lewiecki, E. M., Miller, P. D., Neer, R. M., . . . Potts, J. T. (2012). Benefits and risks of bisphosphonate therapy for osteoporosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(7), 2272-2282.

Komori, T. (2011). Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *Journal of cellular biochemistry*, 112(3), 750-755.

Komori, T. (2019). Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1694.

Kugimiya, F., Kawaguchi, H., Kamekura, S., Chikuda, H., Ohba, S., Yano, F., . . . Azuma, Y. (2005). Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35704-35712.

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb. prot095505.

Lian, J. B., Stein, G. S., Javed, A., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., . . . Young, D. W. (2006). Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 7(1-2), 1-16.

Long, F. (2012). Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(1), 27-38.

Lorenzo-Pouso, A. I., Pérez-Sayáns, M., García, A., & Carballo, J. (2018). Vitamin D supplementation: Hypothetical effect on medication-related osteonecrosis of the jaw. *Medical hypotheses*, 116, 79-83.

Madrid, C., & Sanz, M. (2009). What impact do systemically administrated bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. *Clinical oral implants research*, 20, 87-95.

Maruotti, N., Corrado, A., Neve, A., & Cantatore, F. P. (2012). Bisphosphonates: effects on osteoblast. *European journal of clinical pharmacology*, 68(7), 1013-1018.

Marx, R. E. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 61(9), 1115-1117.

Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N., & Behringer, R. R. (1995). Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes & development*, 9(24), 3027-3037.

Nancollas, G., Tang, R., Phipps, R., Henneman, Z., Gulde, S., Wu, W., . . . Ebetino, F. (2006). Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*, 38(5), 617-627.

Ostrowska, Z., Kos-Kudla, B., Marek, B., Kajdaniuk, D., Staszewicz, P., Szapska, B., & Strzelczyk, J. (2002). The influence of pinealectomy and melatonin administration on the dynamic pattern of biochemical markers of bone metabolism in experimental osteoporosis in the rat. *Neuroendocrinology Letters*, 23, 104-109.

Otto, F., Kanegane, H., & Mundlos, S. (2002). Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Human mutation*, 19(3), 209-216.

Owosho, A. A., Estilo, C. L., Huryn, J. M., & Yom, S. K. (2016). Pentoxifylline and tocopherol in the management of cancer patients with medication-related

osteonecrosis of the jaw: an observational retrospective study of initial case series. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 122(4), 455-459.

Özgüner Fehmi , R. Ö., Namık Delibaş , Ahmet Koyu , Sadettin Çalışkan. (1995). Melatonin ve klinik önemi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2(4), 1-6.

Pols, H., & van Leeuwen, J. (2004). Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites. *Current pharmaceutical design*, 10(21), 2535-2555.

Reddi, A. H. (1998). Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature biotechnology*, 16(3), 247-252.

Reszka, A. A., & Rodan, G. A. (2004). Nitrogen-containing bisphosphonate mechanism of action. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 4(7), 711-719.

Rodríguez-Lozano, F. J., García-Bernal, D., de los Ángeles Ros-Roca, M., del Carmen Algüero, M., Onate-Sánchez, R. E., Camacho-Alonso, F., & Moraleda, J. M. (2015). Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 43(6), 855-862.

Rogers, M. J. (2003). New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Current pharmaceutical design*, 9(32), 2643-2658.

Rothe, L., Collin-Osdoby, P., Chen, Y., Sunyer, T., Chaudhary, L., Tsay, A., . . . Osdoby, P. (1998). Human osteoclasts and osteoclast-like cells synthesize and release high basal and inflammatory stimulated levels of the potent chemokine interleukin-8. *Endocrinology*, 139(10), 4353-4363.

Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B., & O'Ryan, F. (2014). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 72(10), 1938-1956.

S M Webb , M. P.-D. (1995). Role of melatonin in health and disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 42, 221-234.

Salt, A., Çenesiz, M , Çenesiz, S . (2017). Melatonin, Etkileri ve Kullanım Alanları *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 28, 7-12.

Sase, T., Suzuki, T., Miura, K., Shiiba, K., Sato, I., Nakamura, Y., . . . Watanabe, M. (2012). Runt-related transcription factor 2 in human colon carcinoma: A potent prognostic factor associated with estrogen receptor. *International journal of cancer*, 131(10), 2284-2293.

Schroeder, T. M., Jensen, E. D., & Westendorf, J. J. (2005). Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 75(3), 213-225.

Sener, G., Goren, F. O., Ulusoy, N. B., Ersoy, Y., Arbak, S., & Dölger, G. A. (2005). Protective effect of melatonin and omeprazole against alendronat-induced gastric damage. *Digestive diseases and sciences*, 50(8), 1506-1512.

Shabestari, G. O., Shayesteh, Y. S., Khojasteh, A., Alikhasi, M., Moslemi, N., Aminian, A., . . . Treister, N. S. (2010). Implant placement in patients with oral bisphosphonate therapy: a case series. *Clinical implant dentistry and related research*, 12(3), 175-180.

Sinha, K. M., & Zhou, X. (2013). Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of cellular biochemistry*, 114(5), 975-984.

Stein, G. S., Lian, J. B., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Javed, A., . . . Pockwinse, S. M. (2004). Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*, 23(24), 4315-4329.

Thibaut, F., Watrin, T., Meary, F., Tricot, S., Legros, V., Pellen-Mussi, P., & Chauvel-Lebret, D. (2015). Effects of zoledronic acid on osteoblasts in three-dimensional culture. *Journal of Dental Sciences*, 10(1), 8-15.

Vaes, B. L., Ducy, P., Sijbers, A. M., Hendriks, J. M., van Someren, E. P., de Jong, N. G., . . . Dechering, K. J. (2006). Microarray analysis on Runx2-deficient mouse embryos reveals novel Runx2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone*, 39(4), 724-738.

van de Loosdrecht, A. A., Nennie, E., Ossenkoppele, G. J., Beelen, R. H., & Langenhuijsen, M. M. (1991). Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay: a methodological study. *Journal of immunological methods*, 141(1), 15-22.

Van der Deen, M., Akech, J., Wang, T., FitzGerald, T. J., Altieri, D. C., Languino, L. R., . . . Stein, G. S. (2010). The cancer-related Runx2 protein enhances cell growth and responses to androgen and TGF β in prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 109(4), 828-837.

Van Driel, M., & Van Leeuwen, J. P. (2014). Vitamin D endocrine system and osteoblasts. *BoneKEy Reports*, 3.

Vellonen, K.-S., Honkakoski, P., & Urtti, A. (2004). Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *European journal of pharmaceutical sciences*, 23(2), 181-188.

Vescovi, P., Merigo, E., Meleti, M., Manfredi, M., Fornaini, C., Nammour, S., . . . Bagan, J. V. (2014). Conservative surgical management of stage I bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *International journal of dentistry*, 2014.

Walter, C., Klein, M., Pabst, A., Al-Nawas, B., Duschner, H., & Ziebart, T. (2010). Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clinical oral investigations*, 14(1), 35-41.

Walter, C., Pabst, A., Ziebart, T., Klein, M. O., & Al-Nawas, B. (2011). Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral diseases*, 17(2), 194-199.

Wang, C., Liao, H., & Cao, Z. (2016). Role of osterix and microRNAs in bone formation and tooth development. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 22, 2934.

Yadegari, A., Aminzadeh, A., Seyyedkhamesi, S., & Aminian, M. (2020). The effect of melatonin on prevention of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an animal study in rats. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 46(4), 266-274.

Yarom, N., Shapiro, C. L., Peterson, D. E., Van Poznak, C. H., Bohlke, K., Ruggiero, S. L., . . . Anderson, H. (2019). Medication-related osteonecrosis of the jaw: MASCC/ISOO/ASCO Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 37(25), 2270-2290.

Yilgor, P., Tuzlakoglu, K., Reis, R. L., Hasirci, N., & Hasirci, V. (2009). Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 30(21), 3551-3559.

Zhang, Y.-y., Li, X., Qian, S.-w., Guo, L., Huang, H.-y., He, Q., . . . Tang, Q.-Q. (2012). Down-regulation of type I Runx2 mediated by dexamethasone is required for 3T3-L1 adipogenesis. *Molecular endocrinology*, 26(5), 798-808.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MELATONİN İLE KOMBİNE D VİTAMİNİ'NİN ZOLEDRONİK ASİT UYGULANMIŞ OSTEOLASTLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	marmarapharmaceuticaljournal.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	dspace.baskent.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1

