

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ, DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



NİTROJEN İÇEREN BİFOSFONATLARIN ORAL MUKOZA HÜCRE
KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE DOZA BAĞLI ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ
Dt. Sıdka Sinem SOYDAN

ANKARA/2011

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ, DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



NİTROJEN İÇEREN BİFOSFONATLARIN ORAL MUKOZA HÜCRE
KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE DOZA BAĞLI ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ
Dt. Sıdıka Sinem SOYDAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Kenan ARAZ

ANKARA/2011

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Dalında Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/06/2011

“Nitrojen İçeren Bifosfonatların Oral Mukoza Hücre Kültürleri Üzerine Doza Bağlı Etkilerinin İncelenmesi”

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. KENAN ARAZ

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof.Dr. Kenan ARAZ

Prof.Dr. Reha KİŞNİŞÇİ

Prof.Dr. Sina UÇKAN

Prof. Dr. Feride ŞAHİN

Doç.Dr. Firdevs VEZİROĞLU

ONAY:Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun 30/06/2011 tarih ve 094 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Rengin Erdal
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli ilgisi ve bilgisiyle hep yanımda olup, yolumu her zaman aydınlatan sevgili tez danışmanım Başkent Üniversitesi Rektörü Sayın **Prof. Dr. Kenan ARAZ**'a,

Büyük bir özveri, sabır ve sevgiyle bilgi ve tecrübesini bana aktaran değerli hocam, Başkent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı ve Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Sina UÇKAN**'a,

Dört yıl boyunca bana tüm kalbiyle hem eğitmen, hem dost, hem yol gösterici olan, birlikte gülüp birlikte ağladığım, çok sevdiğim ve manevi ablam saydığım Sayın **Doç. Dr. Firdevs Vezioğlu ŞENEL**'e, her zaman ve her konuda desteğini hissettiğim, birlikte çalışmaktan zevk aldığım sevgili ağabeyim Sayın **Dr. Dt. Burak BAYRAM**'a, tüm bilgisini benimle paylaşarak eğitimime çok katkıda bulunan sevgili ağabeyim Sayın **Dr. Dt. Ufuk ATEŞ**'e,

Doktora eğitimime aynı gün başlayıp aynı gün bitirdiğim, bu süreç boyunca her şeyi beraber tecrübe ettiğim eş-kıdemlim, her zaman yanında olacağım sevgili dostum **Dr. Dt. Kağan DENİZ**'e,

Onlarla birlikte çalışmaktan ötürü şanslı olduğumu hissettiğim Başkent Üniversitesi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalının sevgili asistanları ve yardımcılarına,

Tez çalışmam süresince hiç bir bilgi ve desteğini benden esirgemeyen sevgili hocalarım Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Attila DAĞDEVİREN** ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Feride ŞAHİN**'e, laboratuvar aşamasında en az benim kadar emek gösteren Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Doç Dr. Erkan YURTÇU**, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Uzm. Dr. Fatma HELVACIOĞLU**'na, istatistiksel analizlerin yapılmasında ve yorumlanmasında bana yardımcı olan Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Uzm. Dr. Mustafa Agah TEKİNDAL**'a,

Bu süreçte hiçbir karşılık beklemeden hep yanımda olan ve hayatı benim için kolaylaştıran sevgili **Berat Serdar AKDENİZ**'e,

Beni ben yapan, benim için her şeyi yapmaya her daim hazır olan, sevgisiyle bana güç veren, onlarla gurur duyduğum, her zaman örnek aldığım ve her şeyden çok sevdiğim annem **Ayşe SOYDAN**, babam **Mustafa SOYDAN**, ağabeylerim **Cem SOYDAN** ve **Cenk SOYDAN**'a, **Sonsuz şükranlarımı sunuyorum.**

ÖZET

Nitrojen İçeren Bifosfonatların Oral Mukoza Hücre Kültürleri Üzerine Doza Bağlı Etkilerinin İncelenmesi

Bifosfonat kullanımı ile ilişkili olarak çene kemiklerinde görülen osteonekroz (BRONJ), oral ve maksillofasiyal cerrahide tedavisi oldukça zor ve karmaşık patolojilerden biridir. Hasarlı veya gecikmiş yumuşak doku epitelizeasyonu hemen her BRONJ vakasında görülmektedir. BRONJ'un yumuşak veya sert dokunun hangisinden köken alarak başladığı hala belirsizdir. Kurulan hipotezlerde oral mukozanın BRONJ'un gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülmüştür. Bu hipotezi desteklemek veya reddetmek amacıyla, bu çalışma insan dişeti fibroblastları üzerinde alendronat ve pamidronatın *in vitro* etkilerini araştırmak ve karşılaştırmak için planlanmıştır. Primer fibroblast kültürleri, altı sağlıklı gönüllüden alınan dişeti biyopsileri kullanılarak standart hücre kültürü şartlarında üretilmiştir. MTT kiti kullanılarak alendronat ve pamidronatın sitotoksik konsantrasyonları belirlenmiştir. Alendronat ve pamidronat 10^{-4} - 10^{-7} M arası konsantrasyonda; 6, 12, 24, 48 ve 72 saat süreyle kültür medyumuna uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu ve apoptoz indüksiyonu immunohistokimyasal olarak Ki-67 ve kaspaz 3 tutulumu ile değerlendirilmiş ve iki ilaç için karşılaştırılmıştır. Pamidronat ve alendronatın her ikisinin de, ilaç uygulanmayan kontrol kültürleri ile karşılaştırıldığında doz ve zamana bağlı olarak apoptozu indüklediği ve proliferasyonu baskıladığı görülmüştür. Hücre proliferasyonundaki değişiklikler her iki ilaç grubu için benzer olsa da, kaspaz 3 aktivasyonunun her doz ve uygulama zamanı için pamidronat grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazla olduğu bulunmuştur (p:0.046). Bifosfonatların, doza ve zamana bağlı olarak insan dişeti fibroblastları üzerinde indükledikleri kaspaz 3 yolağı ile belirlenmiş apoptozis, BRONJ'un patogenezinde yumuşak dokunun önemini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: BRONJ, osteonekroz, oral fibroblast, primer kültür, nitrojen içeren bifosfonat, apoptozis, hücre proliferasyonu, sitotoksikite

ABSTRACT

The Evaluation of Nitrogen Containing Bisphosphonate's Effect on Oral Mucosa Cell Culture

Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) has become one of the most obstinate and complicated pathology in oral and maxillofacial surgery. Defective or delayed epithelialization of soft tissue has been observed in almost every BRONJ case. Whether BRONJ starts from bone or soft tissue is still controversial. It has been hypothesized that the soft tissue of the oral mucosa could play a significant role in BRONJ. In order to support or reject this hypothesis, our study was planned to investigate and compare the *in vitro* effects of alendronate and pamidronate on human gingival fibroblasts. Primary fibroblast cultures were set up from 6 healthy volunteers' oral mucosa biopsy under standard cell culture conditions. The cytotoxic concentrations of alendronate and pamidronate were determined by MTT assay. Alendronate and pamidronate were added to culture medium at concentrations of 10^{-4} to 10^{-7} M for at 6, 12, 24, 48 and 72 hours. Cell proliferation and induction of apoptosis were evaluated and compared with immunohistochemically by Ki-67 and caspase-3 staining, respectively. Both pamidronate and alendronate induced apoptosis and inhibited cell proliferation in a dose and time dependent manner compared to untreated control cells. Although cell proliferation ratios were similar for both drugs, caspase activation in every application time and dose was significantly higher in pamidronate than alendronate (p:0.046). Bisphosphonates induce apoptosis via caspase-3 pathway on human gingival fibroblasts in a dose and time dependent manner emphasizing the importance of soft tissue in BRONJ.

Key words: BRONJ, osteochemonecrosis, oral fibroblasts, primary cultures, nitrogen containing bisphosphonate, apoptosis, cell proliferation, cytotoxicity

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET(ABSTRACT).....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER	xii
ŞEKİLLER	xv
RESİMLER	xvii
TABLolar	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Bifosfonatların Tarihçesi	4
2.2 Bifosfonatların Kimyasal Yapısı	4
2.3 Bifosfonat Türleri	6
2.3.1Nitrojen İçermeyenler.....	6
2.3.2Nitrojen İçerenler: (Aminobifosfonatlar)	6
2.4 Bifosfonatların Etki Mekanizması	7
2.5 Bifosfonatların Farmakokinetik Özellikleri	10
2.6 Bifosfonatların Osteoklastlar Dışında Etkilediği Diğer Hücreler	10
2.6. 1 Osteoblast.....	10
2.6.2 Endotel	12
2.6.3 Tümör Hücreleri	12
2.6. 4 Oral Epitel Hücreleri; Keratinosit ve Fibroblast	12
2.7 Bifosfonatların Endikasyonları	14
2.8 Bifosfonatların Kontrendikasyonları	15

2.9 Bifosfonatların Klinik Kullanımları	16
2.10 Bifosfonatlarla İlgili Dişhekimliğinde Yapılmış Uygulamalar	18
2.11 Bifosfonat Kullanımının Sistemik Yan Etkileri	19
2.12 Bifosfonat Kullanımının Oral Kavitedeki Yan etkileri	19
2.12.1 Osteokemonekroz	19
2.12.2 Diş sürme gecikmesi	22
2.12.3 Oral Mukoza İrritasyonu	23
2.13 Osteokemonekrozda Klinik Bulgular	23
2.14 Osteokemonekrozun Radyografik Bulguları	26
2.15 Osteokemonekrozun Histolojik Bulguları	27
2.16 Osteokemonekrozun Predispozan Risk Faktörleri	28
2.17 Osteokemonekrozun Tedavisi	30
2.18 Osteokemonekrozun Ayırıcı Tanıları	33
2.18.1 Phossy Jaw	33
2.18.2 Osteoradyonekroz	33
2.18.3 Osteomyelit	33
2.18.4 Multiple Myeloma	34
2.18.5 Çene Kemigine Metastaz	34
2.19 Bifosfonatlara Alternatif Olabilecek İlaçlar	34
2.19.1 NE 107790 BP	34
2.19.2 Doxorubicin	35
2.19.3 Pegylated Liposomal Doxorubicin.....	35
2.19.4 Denosumab	35
2.19.5 Protelous	35
2.20 Hücre Kültürlerine Uygulanacak İlaç Konsantrasyonunun Ayarlanması 36	
2.20.1MTT[3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H razoliumbromide] Metodu	36
2.21 İmmunohistokimyasal Boyama	37

2.22 Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü)	37
2.23 Proliferasyon (Hücre çoğalması)	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1 Kullanılan Cihazlar	42
3.2 Kullanılan Kitler ve Kimyasallar	42
3.3 Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	43
3.3.1 Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) Hazırlanması	43
3.3.2 Fosfat Tampon Solüsyonu-Sığır Serum Albumini Hazırlanması	44
3.3.3 İlaçların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	44
3.4 Hastalar	45
3.5 Primer Fibroblast Kültürü	45
3.5.1 Primer Fibroblast Eldesi	45
3.5.2 Primer Fibroblastların Pasajı	46
3.6 Hücre Sayısının ve Canlılığının Belirlenmesi	46
3.7 MTT Yöntemi ile Hücre Kültürlerinde Uygulanacak İlaç Konsantrasyonunun Belirlenmesi	46
3.7.1 MTT Yönteminin Uygulanışı	47
3.8 İlaçların Uygulanması	50
3.9 İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi	52
3.9.1 Örneklerin Hazırlanması	52
3.9.2 İndirekt İmmüno Floresan Boyama Yöntemi	53
3.9.3 İmmüno Floresan Boyamasını Değerlendirme	54
3.9.4 İmmunohistokimyasal Mikroskopta Hücre Sayım Yöntemi	54
3.10 İstatistiksel Yöntem	55

4. BULGULAR	56
4.1 MTT Yöntemi ile IC ₅₀ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	56
4.2 Uygulanan Konsantrasyon ve Süreye Göre Elde Edilen Sonuçlar	57
4.3 Çalışmada İncelenen Tüm Değişkenler Arasındaki Tekrarlanan Ölçümlü (<i>Greenhouse Geisser Düzeltmeli</i>) Varyans Analizi Sonuçları	61
4.3.1 Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulumu İlişkisi	61
4.3.2 Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulumu ile İlaç Konsantrasyonu İlişkisi	61
4.3.3 Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulumu ile İlaç Muamele Süresi İlişkisi	62
4.3.4 Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulumunun İlaç Konsantrasyonu ve İlaç Muamele Süresine Göre Değişim	62
4.4 Tahmini Marjinal Ortalama İstatistik Verileri	63
4.4.1 Pamidronat ve Alendronat Grubu İçin Tahmini Marjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulum Veriler	63
4.4.2 Çalışma Geneline Değişen İlaç Konsantrasyonuna Bağlı Tahmini Marjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulum Verileri	64
4.4.3 Pamidronat ve Alendronat Grupları İçin İlaç Konsantrasyonlarına Göre Tahmini Orjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulum Verileri	65
4.4.4 Çalışma Geneline İlaç Konsantrasyonu ve İlaç Muamele Süresine Göre Değişen Tahmini Marjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulum Verileri	66
4.4.5 Pamidronat ve Alendronat Grupları İçin İlaç Konsantrasyonu ve Muamele Süresine Göre Değişen Tahmini Marjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki- 67 Tutulum Verileri	69
4.5 Vimentin, Ki-67 ve Kaspaz 3 Antikoru ile İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları	78
4.5.1 Vimentin	78
4.5.2 Ki-67	80
4.5.3 Kaspaz 3	83

4.5.4 Negatif Kontrol	85
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	98
7. KAYNAKLAR	101

KISALTMALAR ve SİMGELER

AAOMS: American Association of Oral and Maxillofacial Surgery

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

APAF-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

Ark.: Arkadaşları

ATP: Adenozin trifosfat

Bcl: B-hücreli lenfoma

BRONJ: Bifosfonat kullanımı nedeniyle çene kemiklerinde oluşan osteokemonekroz

BSA: Sığır serum albumini

Ca⁺⁺: Kalsiyum iyonu

CARD: Kaspaz iyileştirme bölgesi

CRP: C- reaktif protein

DD: Ölüm bölgesi

DED: Bir çift ölüm tetikleyici bölge

DISC: Ölümü tetikleyen sinyal bileşeni

Dk: Dakika

DMEM: Dulbecco'nun modifiye eagle medyumu

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetikasit

ELİSA: Enzim ilintili immün test

FBS: Fetal sığır serumu

FDA: Food and Drug Administration

GTPaz: Guanozintrifosfat bağlayan enzim

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HCl: Hidroklorik asit

HO: Heterotropik osifikasyon

IL-6: İnter lökin 6

µl: mikrolitre

ml: mililitre

MMP2: Matriks metalloproteinaz-2

MRI: Manyetik rezonans görüntüleme

MTT : [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide]

NaCl: Sodyum klorid

NHS: Normal insan serumu

nm: Nanometre

PBS: Fosfat tampon solüsyonu

PDL: Periodontal ligament

PTH: Paratiroid hormon

RANK: Reseptör aktivator nükleer faktör kB

RANKL: Reseptör aktivator nükleer faktör kB ligand

RPM: Dakikada devir sayısı

TGF β-1: Transform edici büyüme faktörü β-1

TNF-α: Tümör nekroz faktör α

TSH: Tiroid stimüle edici hormon

TUNEL: Terminal Uridine Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling

ŞEKİLLER

Şekil 2.1: Pirofosfonatın kimyasal yapısı	5
Şekil 2.2: Bifosfonatların kimyasal yapısı	5
Şekil 2.3: Günümüzde kullanımı en çok tercih edilen nitrojen içeren ve içermeyen bifosfonatların kimyasal yapıları	7
Şekil 2.4: Nitrojen içeren bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi mevalonat yolu üzerinden inhibe etme mekanizması	9
Şekil 2.5: Osteoblastların salgıladığı ajanların rezorpsiyona olan etkisi	11
Şekil 4.1: 48 ve 72 saat uygulama sonrası pamidronat ve alendronat için belirlenen doz bağımlı hücre canlılığı grafiği	56
Şekil 4.2: Pamidronat ve alendronatın zamana bağımlı IC ₅₀ değerleri	57
Şekil 4.3: Pamidronat grubunda ilaç konsantrasyonu ve uygulama süresine göre değişen kaspaz 3 tutulum eğrisi	70
Şekil 4.4: Pamidronat grubunda ilaç konsantrasyonu ve uygulama süresine göre değişen Ki-67 tutulum eğrisi	70
Şekil 4.5: Alendronat grubunda ilaç konsantrasyonu ve uygulama süresine göre değişen kaspaz 3 tutulum eğrisi	71
Şekil 4.6: Alendronat grubunda ilaç konsantrasyonu ve uygulama süresine göre değişen Ki-67 tutulum eğrisi	72
Şekil 4.7: Cinsiyete göre kaspaz 3 ve Ki-67 değerlerinin ortalama oranlarına bakıldığında, kadınlarda erkeklere göre her iki antikor tutulum oranının daha yüksek olduğu görülmektedir	74
Şekil 4.8: Mavi sütunlarla pamidronat, kırmızı sütunlarla alendronat bulguları belirtilmiştir. Ki-67 tutulum oranları pamidronat ve alendronat için benzerken, kaspaz 3 tutulumu pamidronat grubunda belirgin ölçüde daha yüksektir	75
Şekil 4.9: Kaspaz 3 tutulumu ve Ki-67 tutulumu değerlerinin zamana göre değişimi her iki ilaç için birlikte gösterilmiştir. Mavi sütunlarla gösterilen kaspaz 3 değişimidir, kırmızı sütunlarla gösterilen Ki-67 değişimidir	76

Şekil 4.10: Her iki ilaç grubu için kaspaz 3 ve Ki-67 tutulumunun, uygulanan ilaç dozlarına göre değişimi incelendiğinde kaspaz 3 tutulumunun konsantrasyon düştükçe azaldığı ve Ki-67 tutulumunun konsantrasyon düştükçe arttığı görülmektedir 77

Şekil 5.1: Lokal travmanın kronik olarak uzun süredir bifosfonat kullanan bir bireyde çene kemiği ve komşu yumuşak dokuda osteokemonekroz öncesi oluşturduğu değişiklikler şematik olarak gösterilmiştir 89

RESİMLER

Resim 2.1: Sağ üst çene premolar diş çekimini takiben oluşan BRONJ.....	25
Resim 2.2: Sağ alt çenede protez irritasyonu nedeniyle oluşan BRONJ.....	25
Resim 2.3: Osteokemonekroz nedeniyle trabekülasyonu bozulmuş alveolar kemiğin radyografik görüntüsü	26
Resim 2.4: Osteokemonekroz nedeniyle erozyona uğramış mandibuler kortikal kemiğin radyografik görüntüsü	27
Resim 3.1: Alendronat grubu, 48. saat MTT sonuçları	48
Resim 3.2: Pamidronat grubu, 48. saat MTT sonuçları	49
Resim 3.3: Alendronat grubu 72. saat MTT sonuçları	49
Resim 3.4: Pamidronat grubu 72. Saat MTT sonuçları	50
Resim 3.5: Lamel ve medyum yerleştirilmiş altılı flask örneği	51
Resim 4.1: Çalışmada yetmiş iki saat süreyle 10^{-6} M pamidronatla muamele edilmiş kültüre ait lamelden elde edilen görüntüde 5 tane vimentin ile sitoplazmaları yeşil çekirdekleri turuncu boyanmış fibroblast hücresi görülmektedir (Orijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli)	78
Resim 4.2: Hiçbir ilaçla muamele edilmemiş yirmi dördüncü saat kontrol grubuna ait bir lamelde vimentin ile boyanmış fibroblast hücreleri görülmektedir (Orijinal büyütme X20; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli)	79
Resim 4.3: Altı saat 10^{-4} M pamidronatla muamele edilmiş lamelden elde edilen görüntüde yıldız ve iğsi şekilli karakteristik fibroblast hücre sitoplazma yapısı vimentin boyaması ile gösterilmiştir (Orijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli)	79

- Resim 4.4:** Kırk sekiz saat 10^{-6} M alendronata maruz kalmış lamelden alınmış görüntüde, toplam yedi fibroblast hücrelerinden işaretlenen iki tanesinde Ki-67 tutulumu pozitifdir (Orijinal büyütme X100; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli) 80
- Resim 4.5:** Altı saat 10^{-4} M pamidronatla muamele edilmiş lamelden elde edilen görüntüde, beyaz işaretle gösterilen hücrede Ki-67 tutulumu daha az, mavi ile işaretlenen hücrelerde Ki-67 tutulumu daha yoğun olarak görülmektedir (Orijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli) 81
- Resim 4.6:** Altı saat 10^{-4} M alendronatla muamele edilmiş lamelden elde edilen görüntüde iki hücrenin çekirdeğinde belirgin Ki-67 reaktivitesi izlenmektedir. (Orijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli) 82
- Resim 4.7:** On iki saat 10^{-7} M alendronatla muamele edilmiş lamelde kaspaz 3 tutulumu pozitif fibroblast hücresi işaretlenerek gösterilmiştir (Orijinal büyütme X100; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli) 83
- Resim 4.8:** On iki saat 10^{-4} M pamidronatla muamele edilmiş lamelden elde edilen görüntüde 10 hücre arasında kaspaz 3 tutulumu pozitif olan üç fibroblast hücresi işaretlenerek gösterilmiştir (Orijinal büyütme X40; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli) 84
- Resim 4.9:** On iki saat alendronat 10^{-6} M ile muamele edilmiş lamelde negatif kontrol için primer antikör basamağı atlanarak gerçekleştirilen boyamada herhangi bir spesifik reaktiviteye rastlanmamıştır. (Orijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli) 85

TABLÖLAR

Tablo 2.1: Bifosfonat türlerinin rölatif etkinlik dereceleri.....	8
Tablo 2.2: Bifosfonatların mevcut olan dozları, uygulama şekli, uygulama periyodları ve FDA onay tarihleri gösterilmiştir.....	17
Tablo 2.3: BRONJ'un klinik evrelerine göre önerilen tedavi seçenekleri	31
Tablo 3.1: Alendronat ve pamidronat için hazırlanan stok solüsyon konsantrasyonları, uygulanmak istenen son konsantrasyonlar, kültüre eklenen solüsyon hacmi ve kültürdeki toplam sıvı miktarının hacmi gösterilmektedir	52
Tablo 4.1: Pamidronat uygulaması sonrası hücrelerin kaspaz 3 skorları ve tanıtıcı istatistikler	58
Tablo 4.2: Pamidronat uygulaması sonrası hücrelerin Ki-67 skorları ve tanıtıcı istatistikler	58
Tablo 4.3: Alendronat uygulaması sonrası hücrelerin kaspaz 3 skorları ve tanıtıcı istatistikler	59
Tablo 4.4: Alendronat uygulaması sonrası hücrelerin Ki-67 skorları ve tanıtıcı istatistikler	59
Tablo 4.5: Kontrol grubu hücrelerin kaspaz 3 ve Ki-67 skorları ve tanıtıcı istatistikler	60
Tablo 4.6: Çalışmada incelenen tüm değişkenler arasındaki tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tablosu (<i>Greenhouse Geisser Düzeltmeli</i>)	63
Tablo 4.7: Farklı iki bifosfonat türüne göre, kaspaz 3 ve Ki-67 antikorunun tutulumuna ait tanıtıcı istatistikler	64
Tablo 4.8: Pamidronat ve alendronat verilerini birbirinden ayırmadan, çalışmada uygulanan beş farklı ilaç konsantrasyonundaki genel Kaspaz 3 ve Ki-67 antikor tutulumuna ait tanıtıcı istatistikler	65

Tablo 4.9 Pamidronat ve alendronatın uygulandıkları doza göre oluşan antikor tutulumuna ait tanıtıcı istatistikler	66
Tablo 4.10 Alendronat, pamidronat ve kontrol grubu verilerinin birbirinden ayırmadan çalışmadaki tüm örneklerin kaspaz 3 ve Ki-67 antikor tutulumunun, doz ve zaman değişkenlerine göre tanıtıcı istatistikleri	68
Tablo 4.11 Alendronat ve pamidronat ilaç gruplarında, kaspaz 3 ve Ki-67antikor tutulumuna ait tanıtıcı istatistikler	73

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bifosfonatlar kalsiyum kristallerine olan afiniteleri sayesinde, sistemik olarak kullanıldıklarında kemiğin yapısına geçerek hidroksiapatite tutunurlar ve bir dizi mekanizma ile osteoklastların yaptığı rezorpsiyonu durdururlar. Bu etkileri sayesinde kemikte yıkıma neden olan her türlü osteopenik hastalık ve kemik kanserinin tedavisinde çığır açan bu ilaç, tüm dünyada giderek artan bir oranla kullanılmaktadır.

Üretildiği ilk yıldan beri jenerasyonları değişerek gelişen bifosfonatlar, günümüzde nitrojen içeren ve içermeyen olmak üzere iki temel gruba ayrılırlar ve yaygın olarak nitrojen içeren bifosfonat grubundan olan zolendronat, pamidronat ve alendronat kullanılmaktadır.

Başlangıçta ilacın kullanımına bağlı oluşan yan etkiler akut faz reaksiyonları, gastrointestinal ve renal yan etkiler olarak bilinirken, ilk kez 2003 yılında bu ilacın kullanımının bir komplikasyonu olarak çene kemiklerinde osteokemonekroz olduğu bir diş hekimi olan Marx ve ark. tarafından rapor edilmiştir ve o yıldan beri literatürde yayınlanan vaka sayısı 2000'e ulaşmıştır.

Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi Derneği (AAOMS: *American Association of Oral and Maxillofacial Surgery*)'nin 2007 yılında yayınladığı bildirgeye göre bifosfonatlarla ilişkili olarak çene kemiklerinde oluşan osteokemonekroz (BRONJ: *Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw*); baş boyun bölgesinden herhangi bir radyoterapi almamış olup bifosfonat tedavisi gören hastalarda, sekiz haftadan uzun süredir mevcut olan ve iyileşmeyen ekspoze kemik nekrozu olarak tanımlanmaktadır.

İlacın üç yıl kullanımından itibaren osteokemonekroz görülme riski %1,3 ile %12 arasındadır. Bu osteokemonekrozların tedavisi klinik olarak oldukça zordur ve hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir.

İlacın neden olduğu osteokemonekroz sadece kemik dokuda değil yumuşak dokuda da hasarlara neden olmakta ve yara iyileşmesini geciktirmektedir. Bu osteokemonekrozun önlenmesi veya tedavi edilebilmesi için oral kavitedeki kemik

ve yumuşak dokuya yönelik araştırmalar yapılmaktadır. Henüz olayın patogenezi tam açıklanamamıştır ve ideal bir tedavi protokolü oluşturulamamıştır.

Çene kemiği ile ilgili çok sayıda çalışma yapılarak bifosfonat türlerinin kemik dokudaki etkileri anlaşılmış olmasına karşın bifosfonat kullanımını takiben neden sadece çene kemiklerinde osteokemonekroz oluştuğu hala açıklanamamıştır.

Bifosfonatların oral yumuşak dokudaki etkilerine yönelik bilimsel araştırmalar sınırlıdır. Osteokemonekrozların önlenebilmesi ve bifosfonatların patogenezinin açıklanabilmesi için ilacın oral yumuşak dokudaki etkilerinin de tam olarak anlaşılmasına ihtiyaç vardır.

Oral yumuşak dokuya yönelik çalışmalar daha önce hayvan dokusu ve hazır hücre kültür preparatların üzerinde immunohistokimyasal işaretleyici tutulumunu veya hücresel düzeydeki değişimleri gözlemleyerek yapılmıştır. Bifosfonatlarla ilişkili olarak çene kemiklerinde oluşan osteokemonekrozun patogenezinde oral yumuşak dokunun rolünün yorumlanabilmesi için doğal insan dokusu üzerinde yapılacak *in vitro* alışmalara ihtiyaç vardır.

Bifosfonatların yumuşak doku üzerindeki etkileri değerlendirilirken sıklıkla intravenöz kullanılan zolendronat ve pamidronatın etkileri incelenmiştir. Tüm dünyada en sık kullanılan bifosfonatlardan biri olan alendronatla ilgili çalışmalar yetersizdir.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında;

- Pamidronat ve alendronatın oral mukozanın temel hücresi olan fibroblastlar üzerindeki apoptotik etkisini kaspaz 3 ve proliferatif etkisini Ki-67 ile immunohistokimyasal olarak incelemek ve karşılaştırmak,
- Bifosfonat türleri arasında osteokemonekroz oluşturma riski yüksek olan pamidronat ve alendronatın, primer insan oral mukoza fibroblast kültür hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini yorumlamak,
- Osteokemonekrozun patogenezinde, oral yumuşak dokunun primer olarak rol alıp almadığının değerlendirilmesi,
- Bifosfonatlara bağlı çene kemiklerinde oluşan ve tedavisi oldukça zor olan osteokemonekrozun önlenmesine ve tedavisine ışık tutmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Bifosfonatların Tarihçesi

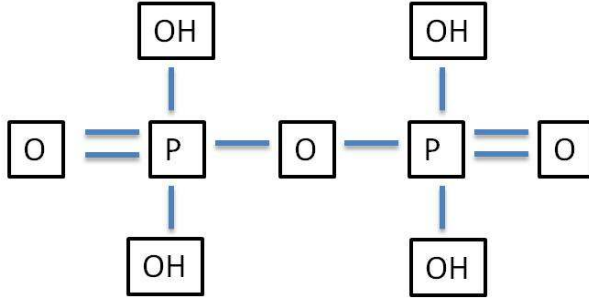
Bifosfonatlar 19. yy ortalarında Almanya’da kimyagerler tarafından üretilmişlerdir. İlk olarak endüstride kalsiyum karbonat depolanmasını önleme özellikleri sayesinde petrol borularını kalsiyum tuzlarının kaplamasını engellemek için kullanılmışlardır (1). Ayrıca lehimleme esnasında kalsiyum karbonat azalmasını önleyebilen güçlü bir şelasyon ajanı olarak da kullanılmaktadırlar.

Bifosfonatların biyolojik özelliklerinin 1968’de rapor edilmesiyle birlikte klinik kullanımları gündeme gelmiştir. İlk olarak böbrek taşı oluşmasını önlemek amacıyla kullanılmışlardır (2). Kalsiyum fosfata yüksek afiniteleri olmasından dolayı 1970’lerin sonlarında klinikte kemiksel gama grafileri elde edilmesinde kullanılmışlardır. Daha sonra üreticiler diş macunlarına bifosfonat katarak anti-tartar, anti-plak etkilerinden yararlanmışlardır. Osteoklastik aktiviteyi inhibe ederek sağladıkları antiresorptif mekanizma sayesinde 1987 yılından beri pek çok osteopatinin tedavisinde kullanılmaktadırlar (1).

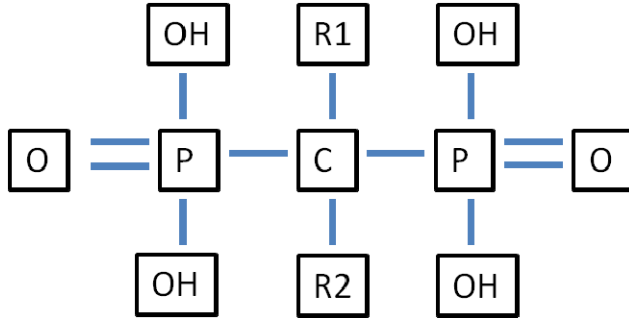
2.2 Bifosfonatların Kimyasal Yapısı

Bifosfonatlar stabil inorganik pirofosfonat analoglarıdır ve kimyasal yapıları pirofosfonatlara benzerdir. Pirofosfonatlar endojen kemik mineralizasyonunu düzenlerler. Pirofosfonatta 2 fosfatı bağlayan ajan oksijen iken (Şekil 2.1), bifosfonatta iki fosfatı bağlayan merkezi eleman karbondur (Şekil 2.2).

Bifosfonatlardaki merkezi karbon molekülünün varlığı, iki tane yan zincirin bağlanmasına olanak sağlar ve bu kimyasal farklılık sayesinde bifosfonatlar daha direçli bir yapıya sahiptir, pirofosfonatlar gibi asidik ortamda hidrolize olmazlar. Bifosfonatlar merkezi elemanları ile kemikteki hidroksiapatite bağlanırlar, periferel zincirleri ise değişkendir (3).



Şekil 2.1: Pirofosfonatın kimyasal yapısı.



Şekil 2.2: Bifosfonatların kimyasal yapısı.

P-C-P bağının merkezindeki karbon atomuna R1 ve R2 olarak adlandırılan iki yan zincir bağlanır. R1 zinciri genellikle hidroksil grubudur ve kemiğe olan afiniteden sorumludur. R1 zincirinin antirezorptif mekanizmada etkinliği çok azdır. Antirezorptif mekanizmadan sorumlu majör zincir azot grubu olan R2 zinciridir (4). Antirezorptif etki ile yeni osteositlerin demineralizasyonu arasındaki terapötik indeks oranının artışından R2 zinciri sorumludur (5).

2.3 Bifosfonat Türleri

İki farklı bifosfonat grubu bulunmaktadır;

2.3.1 Nitrojen İçermeyenler

- Etidronat
- Tiludronat
- Klodronat
- Medronat

Nitrojen içermeyen bifosfonatlar aynı zamanda *1. Jenerasyon* bifosfonatlar olarak da bilinirler. 30 yılı aşkın süredir klinik kullanımları mevcuttur. Kimyasal yapılarında merkezi karbon atomuna bağlanan basit zincirlerden (medronat, klodronat, etidronat) veya klorofenil grubu içeren zincirlerden (tiludronat) oluşurlar ve en düşük etkinliğe sahip olan bifosfonatlardır (6).

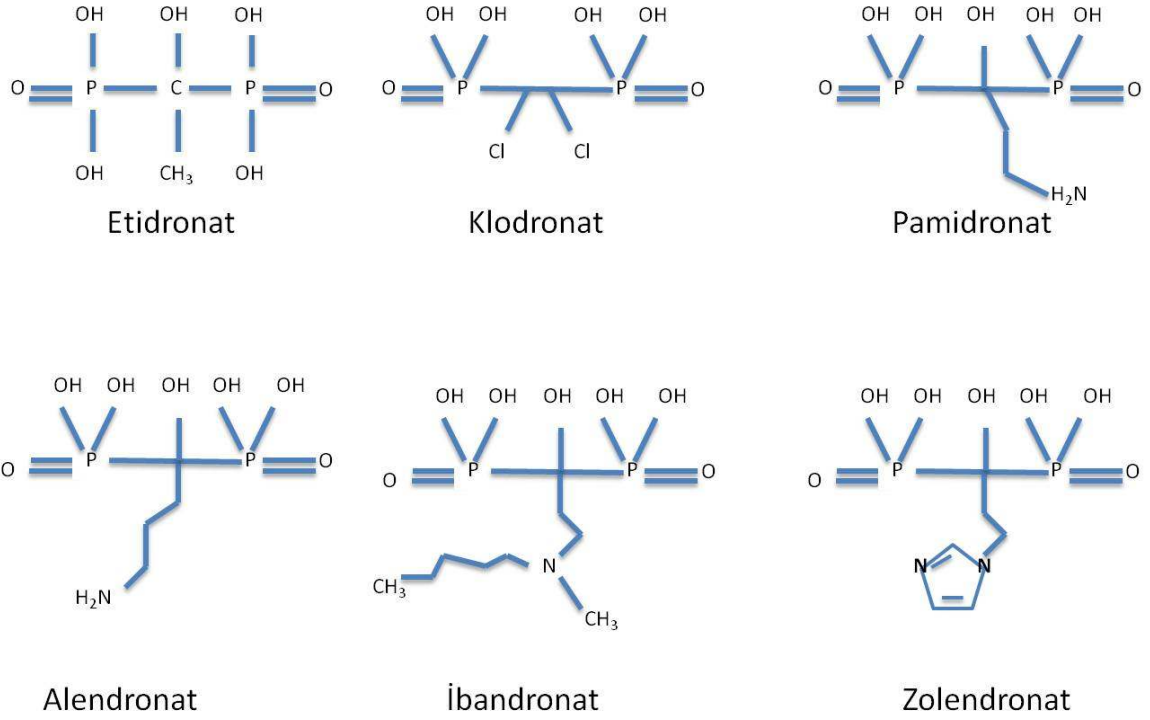
2.3.2 Nitrojen İçerenler (Aminobifosfonatlar)

- Alendronat
- Risedronat
- Pamidronate
- Zolendronat
- Ibandronate

Nitrojen içeren bifosfonatlardan alendronat ve pamidronat *2. Jenerasyon* bifosfonatlar olarak kabul edilirler. Kimyasal yapılarında tek bir nitrojen atomu içeren basit alifatik zincirlere sahiptirler (7).

Risedronat, ibandronat ve zolendronat ise daha potent *3. Jenerasyon* bifosfonatlar olarak tanımlanırlar. Risedronat heterosilik halka yapısına ve zolendronat ise iki nitrojen atomu içeren beş üyeli imidazol halka yapısına sahiptirler (8).

Yaygın olarak kullanılan bifosfonatların kimyasal yapıları (Şekil 2.3.):



Şekil 2.3: Günümüzde kullanımı en çok tercih edilen nitrojen içeren ve içermeyen bifosfonatların kimyasal yapıları.

2.4 Bifosfonatların Etki Mekanizması

Bifosfonatların etki mekanizmaları tam olarak açıklanmamış olmasına karşın hidroksiapatit çözünmesini engelledikleri, kemik iliği öncül hücrelerinin osteoklastlara farklılaşmasını inhibe ettikleri, osteoklast inhibitör faktörü uyardıkları, osteoklast apoptozisini ve anti-anjiojenik etki sağladıkları kesin olarak kanıtlanmıştır (5, 9, 10).

En eski ve en az güçlü bifosfonatlar olan 1. Jenerasyon bifosfonatlar kemik dokuya ulaştıkları zaman osteoklastlar tarafından yakalanarak hücre içinde ATP toksik analoglarına dönüştürülürler ve etkilerini bu yolla gösterirler. 1. Jenerasyon bifosfonatlar vücutta çok hızlı metabolize edilirler (5).

Nitrojen içeren bifosfonatlar (2. ve 3. jenerasyon bifosfonatlar), nitrojen içermeyen bifosfonatlardan ortalama olarak 100-2000 kat daha güçlüdürler (Tablo 2.1.) (11).

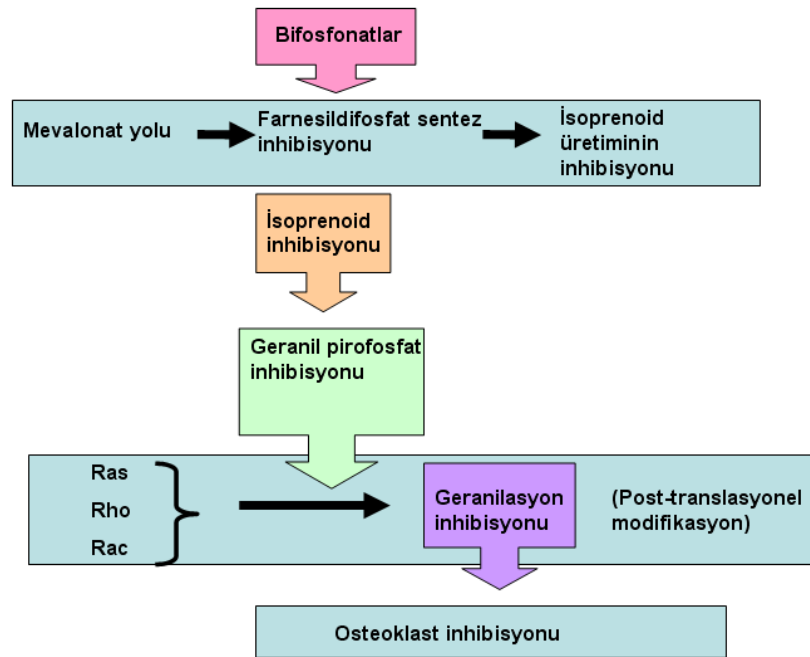
Tablo 2.1: Bifosfonat türlerinin rölatif etkinlik dereceleri.

Bifosfonat Türü	Etkinlik Derecesi
Etidronat	1
Tiludronat	50
Alendronat	1000
Residronat	1000
Ibandronat	1000
Pamidronat	5000
Zolendronat	10000

Aminobifosfonatlar mevalonat yolu üzerinden antirezorptif etkilerini gösterirler (12). Kolesterol üreten mevalonat yolunun anahtar enzimlerinden biri olan farnesildifosfat sentez enzimini inhibe ederler. Farnesildifosfatın inhibisyonu sonucu Guanozintrifosfat bağlayan (GTPaz) Ras, Rho ve Rac proteinlerinin post-translasyonel modifikasyon(prenilasyonu) için gereken isoprenoid yağları üretilemez. Bunun sonucu olarak da Ras, Rho ve Rac proteinlerinin aktivasyonu gerçekleştirilemez. İsooprenoid yağlarının eksikliği geranil pirofosfat enziminin inhibisyonuna neden olur ve Ras, Rho ve Rac enzimlerinin geranilasyonu da inhibe edilmiş olur (1, 5, 9). Ras, Rho ve Rac hücre proliferasyonunu, hücre sağ kalımını ve hücresel iskelet organizasyonunu düzenlerler. Protein prenilasyonunun inhibe olması ve Ras sinyal iletiminin buna bağlı

olarak kesilmesi osteoklastlarda hücre içinde veziküler transportun bozulmasına yol açar (13). Bunun sonucunda da osteoklastın kemik rezorpsiyonunu oluşturabilmesi için gereken yüzey özellikleri oluşamaz ve rezorpsiyon baskılanmış olur (Şekil 2.4).

Klodronat gibi nitrojen içermeyen bifosfonatlar mevalonat yoluna etki edemezler (5). Eski ve yeni tüm bifosfonatların yüksek dozları osteoklast apoptozisine neden olurlar (2). Aminobifosfonatlar, 1. jenerasyon bifosfonatlardan farklı olarak rezorptif aktiviteyi inhibe edebilmek için osteoklast apoptozisine ihtiyaç duymazlar.



Şekil 2.4: Nitrojen içeren bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi mevalonat yolu üzerinden inhibe etme mekanizması.

Bifosfonatlar özellikle aktif yenilenme olan alanlarda kemik yüzeyinde yerleşmiş hidroksiapatit kristallerine çok kolay bir şekilde bağlanırlar ve uzunca bir süre de bağlı kalırlar çünkü osseoz pirofosfatazlar tarafından enzimatik bozunmaya uğratılamazlar. Kemik yüzeyinde bağlı oldukları alanlardan salınırlar ve osteoklastlar tarafından özümseirler. Olgun osteoklastlara olduğu gibi öncül osteoklast hücrelerine de etki gösterebilirler (14). Bu sayede kemikte rezorptif aktivite miktarında ve buna bağlı olarak turn-over oranında azalmaya neden olurlar.

Bifosfonatların uzun süre kullanımı kemikteki yenilenme metabolizmasını bozar ve ‘donmuş kemik’ olarak adlandırılan kemik yapının oluşmasına neden olurlar. Donmuş kemik yapısında kemiğin tamir mekanizması bozulur ve iskelette önce mikrolezyonlar oluşur, zaman içerisinde osteokemonekrozlar görülmeye başlar (7).

2.5 Bifosfonatların Farmakokinetik Özellikleri

Bifosfonatlar oral biyoyararlanımı çok düşük olan ilaçlardır. Sistemik biyoyararlanımları %1-10 arasındadır ve biyoyararlanım bireysel farklılıklar gösterebilir (15). Besinle birlikte alınma, özellikle kalsiyum ve demir içeren besinlerle kompleks oluşturma potansiyelleri nedeniyle biyoyararlanımı oldukça düşürür. Günlük bifosfonat kullanım rejiminde doz sabah aç karnına günde bir kez olacak şekilde verilir. Yaklaşık %30-65 oranında plazma proteinlerine bağlanırlar veya plazmada çok ufak kümeler halinde bulunurlar. Kalan kısımları ise serbest dolaşır (16). Absorbe edilen ilacın bir kısmı kemiğe tutunur, tutunma oranı ilacın etkinlik derecesi ile ilişkilidir.

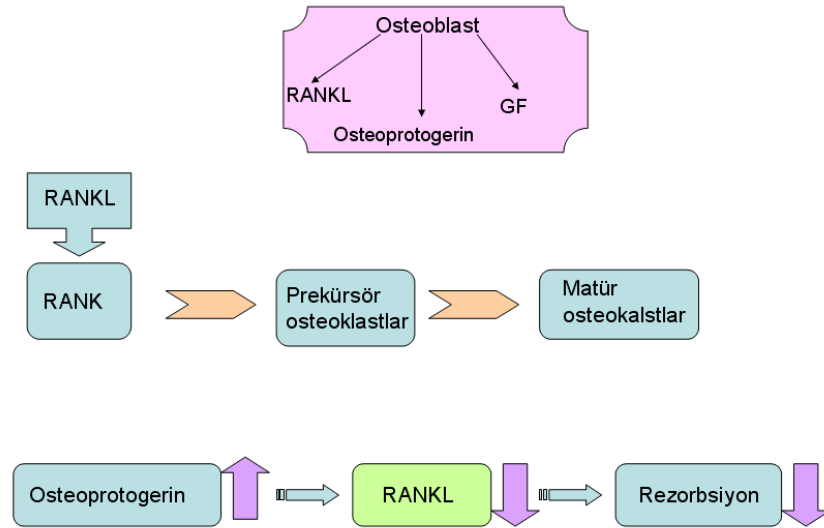
Kandaki ortalama ömürleri kısa olmasına rağmen (30dakika – 2saat) kemikle bir kez birleştikleri takdirde ortalama 10 yıl bozulmadan kalabilirler. Kan yoluyla kemikten ilk geçişlerinde kandaki miktarının neredeyse tümü kemikte tutunur. Bu sayede kemiğe geçiş mekanizmaları çok hızlıdır (17). Oral kullanımda gastrointestinal alandan ilacın % 1’i, intravenöz kullanımda yaklaşık %50’si kemiğe ulaşabilmektedir (18). Vücuttan atılımları renal yolla gerçekleşir (19, 20).

2. 6 Bifosfonatların Osteoklastlar Dışında Etkilediği Diğer Hücreler

2.6. 1 Osteoblast

Kemik hücresinin öncülü olan olgunlaşmamış hücre çeşididir. Çoğalarak, olgunlaşmamış kemik hücresine dönüşür. Böylece kemiklerin oluşumunda ve yenilenmesinde rol oynayan poligonal hücrelerdir. Kemik yüzeyinde yan yana dizili bu hücrelerin, kemik içine doğru uzanan çıkıntıları vardır. Osteoblastların kemik yapımı, kişiden kişiye değişiklik gösterir.

Bifosfonatların osteoblastlara olan etkisi osteoklastlara olan etkisi kadar iyi açıklanamamıştır. Aminobifosfonatlar tedavi edici dozlarda osteoblast farklılaşmasını ve kemik apozisyonunu uyarırlar ederler. Osteoblastlar reseptör aktivatör nükleer faktör Kb ligand (RANKL), Transforming Growth Factor β -1(TGF β -1) ve Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) ailesinden osteoprotogerin salgılayarak kemikteki turn-overi düzenlerler. Osteoblastların salgıladığı RANKL, osteoklastların öncül hücrelerden olgun hücrelere farklılanmsı için gereken uyarıyı sağlarlar (21). RANKL öncül osteoklastlar üzerindeki RANK reseptörlerine RANK'ın bağlanmasını sağlar ve farklılaşma gerçekleşir. Bu sayede kemikte rezorptif aktivite başlar. Osteoprotogerin ise RANKL antagonistidir ve rezorpsiyonu durdurmak için yine osteoblastlar tarafından salgılanır (Şekil 2.5). Kemikte rezorpsiyon olması osteoblastlardan büyüme faktörü salınımını uyarır. Fakat bu konuyla ilgili yeterli çalışma yoktur (14). Yüksek dozlarda ise bifosfonatlar osteoblastlara sitotoksik etki göstererek apoptozislerine neden olurlar.



Şekil 2.5: Osteoblastların salgıladığı ajanların rezorpsiyona olan etkisi.

2.6. 2 Endotel

Dolaşım sistemindeki tüm yapıların, kalp boşlukları, atardamarlar, kılcal ve toplardamarlar, lenf damarları, iç yüzünü örten çok ince, kaldırım taşı gibi dizilmiş hücre dizisidir.

Bifosfonatların endotelyal hücre proliferasyonu, adezyonu ve migrasyonunu bozduğu in vitro olarak gösterilmiştir (14). Mevalonat yolundaki farnesil difosfat sentetaz enzim inhibisyonu sonucu gerekli protein prenilasyonu gerçekleşmediği zaman endotel yapılanması bozulur ve anti- anjiyogenik etki ortaya çıkar (22).

2.6. 3 Tümör Hücreleri

Bifosfonatlar tümör hücrelerinde apoptozise neden olurlar ve tümör invazyonunu engellerler (23, 24). Hastaların sağ kalım oranlarını artırırılar. Anti-anjiogenik mekanizmaları rejenerasyonu öneleyerek anti-tümoral etkilerine katkı sağlamaktadır (1). Bifosfonatların anti-tümoral etkileri anti-resorptif etkileri gibi farnesil difosfat sentetaz enzim inhibisyonu yolu ile oluşmaktadır (25).

2.6. 4 Oral Epitel Hücreleri; Keratinosit ve Fibroblast

Epitel terimi Yunanca epi (stte, üzerinde) ve theleos (örtü) sözcüklerinden oluşmuştur. Epitel hücreleri, gelişmekte olan embriyonun  germinatif tabakası olan ektoderm, endoderm ve mezodermden köken alır (26). Epitel doku, organizmada yaygın bir dağılım gösterir.

Oral mukozanın epiteli keratinizedir ve basal membran aracılığı ile altındaki bağ dokusuna bağlıdır. Ağız boşluğu tamamıyla mukoza ile kaplı olup epitelin kaynağı, dilde endoderm, dudak, yanak, gingiva, vestibulum oris, damak, ağız tabanında ise ektodermdir. Oral mukoza genelde çok katlı yassı epitel ve bağ dokusundan oluşan lamina propria olarak iki tabakadan oluşur. Lamina proprianın altında damarlar, yağ dokusu, tükrük bezleri bulunur ve submukoza olarak isimlendirilir (27).

Oral mukoza salgı yapan bezleri içeren çok katlı yassı epitelden oluşan bir yarı mukoza görünümündedir. Oral mukoza çiğneme fonksiyonu ve mekanik olarak etkilenmesine uyumlu olarak hem epitel, hemde bağ dokusunda çeşitli bölgelerde değişiklik gösterir.

Keratinosit; oral epitelde fiziksel, mikrobiyal ve kimyasal uyarılara karşı koruma görevi sağlayan hücrelerdir. Travmaya daha çok maruz kalan sert damak ve gingivada oral epitelde keratinosit yoğunluğunun daha fazla olması nedeniyle sert, stratum papillaris oldukça yoğun, periosta doğrudan yapışmış ve hareketlilik göstermeyen lamina propriası 4 katlı orto ve parakeratinize epitel ile kaplıdır. Ayrıca sitokin uyarıları sayesinde proinflamatuar yanıtta direkt olarak görev alırlar (28). Hücre kültüründe sitokeratin boyamayla işaretlenirler fakat kültür ortamında üretilmeleri oldukça zordur.

Aminobifosfonatların, mürin oral keratinositlerin apoptozisine neden olmadan hücresel proliferasyonlarını inhibe ettiği bilimsel olarak gösterilmiştir. Aminobifosfonatlar insan oral mukozasının keratinositlerinde de proliferasyonu baskırlar fakat apoptotik etkileri belirsizdir (29). Keratinosit proliferasyonu olmadan oral mukozada yara iyileşmesi bozulur.

Fibroblast; ekstrasellüler matriks ve kollajen üreten, doku stromasını sağlayan, yara iyileşmesinde önemli rol oynayan ve bağdokuda en çok bulunan hücredir. Oral mukoza bağ dokusunda yaygın olarak bulunurlar ve turn-overları çok yüksektir. Hücre kültüründe kollojenaz boyama ile işaretlenirler ve kültürde çoğalma kapasiteleri çok yüksektir (27).

Aminobifosfonatların oral mukoza fibroblast hücrelerinde proliferasyon baskılanmasına neden olduğu *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (30), apoptotik etkileri ile ilgili kesin veri yoktur.

Bifosfonatlar kemikte yeterli konsantrasyona ulaştıkları zaman kemiğe komşu, kemik yüzeyini örten yumuşak dokuda toksik etki oluşturlar (31). Bifosfonatların mevalonat yolundaki farnesil difosfat sentetaz enzimini inhibe etmeleri nedeniyle epitelde hücre proliferasyonu da inhibe edilmiş olur. Buna bağlı olarak oral kavitede

mukoza bütünlüğünün bozulmasına neden olan cerrahi girişim ya da dental travma sonrasında yara iyileşmesi gecikir. Oral bifosfonat kullanımına bağlı gastroözefageal epitelde irritasyon ve ülserasyon benzeri epitelyal bozulmalar görülür (32).

2.7 Bifosfonatların Endikasyonları

Bifosfonatlar postmenapozal dönemde kadınlarda profilaktik veya terapötik amaçlı olarak kemik mineral densitesini artırdığı ve osteoporoza bağlı oluşan kemik kırıklarını azalttığı için yaygın olarak kullanılmaktadır (33).

Bu ajanlar ayrıca yaşlanmaya, glukokortikoid kullanımına ve östrojendeki azalmaya bağlı olarak kemikte oluşan kitlesel azalmayı engellemektedir (34).

Paget's hastalığı (35), fibröz displazi (36), heteretropik ossifikasyonlar (37), ankilozan spondilit (20) gibi kemikle ilişkili hastalıkların tedavisinde tercih edilmektedir.

Kemiğe metastaz özelliği olan göğüs, prostat ve akciğer kanserlerinin tedavisinde anti-tümöral etkileri nedeniyle kullanılmaktadır (199). Kemikte kontrolsüzce yıkıma neden olan tümör hücrelerini inhibe eder. Bifosfonatlar son yıllarda kemik metastazlarının tedavisinde standart haline gelmiştir. Bifosfonatlar kemikte yerleşmiş tümörün veya metastazın yaptığı lokal kemik yıkımı, ağrı ve hiperkalsemiyi etkin şekilde azaltabilir (38).

Osteogenesis imperfekta çocuklarda kemik fragilitesi artmakta ve bunun şiddetine bağlı olarak pediatrik dozlarda aminobifosfonatlar kullanılmaktadır (37).

Multiple myeloma'da osteoklastik aktivitenin stimule olması sonucu oluşan iskelet komplikasyonlarını önlemeye yönelik kullanılmaktadır (25).

Glukoserebrolipidaz enzim bozukluğuna bağlı oluşan otozomal geçişli lizozomal depo hastalığı olan Gaucher Sendromunun tedavisinde de bifosfonatlar kullanılmaktadır (39). Retikuloendotelyal sistemde lipid birikimi meydana gelmektedir ve hastalığın

klirik bulgularından biri osteoporotik kemik lezyonlarıdır. Gaucher hastalarında kemik lezyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır.

2.8 Bifosfonatların Kontrendikasyonları

Adölesanlarda önemli beyin yaralanmalarından sonra heterotropik ossifikasyon(HO) oluşmasını önlemek amacıyla bifosfonat kullanımına bağı Raşitik Sendrom oluştuğı rapor edilmiştir. Bu yaş grubunda kullanımı önlenmelidir (40). Orta ve ileri derecede yanık hastalarında patolojik heterotropik ossifikasyonlar %25-50 oranında oluşmaktadır. Kalsifikasyonu önlediğı bilinen bifosfonatlar, yanık hastalarında HO oluşmasını önlemek amacıyla salisilatlar ve warfarinle birlikte uygulanmıştır. Fakat Shafer ve ark.'nın yapmış olduğı çalışmanın sonuçlarına göre etidronat-disodyumun HO oluşmasını önlemediğı ayrıca insidansını artırdığı belirlenmiştir (41). Yanık hastalarında bifosfonatlar önerilmemektedir.

FDA (*Food and Drug Administration*) tarafından henüz tanımlanmamış olmasına karşın özellikle kadınlarda %1-3 atrial fibrilasyon riski oluşturdukları düşünülmektedir. Kardiyolojik problemi olan hastalarda dikkat edilmelidir (42).

Özefagus darlığı ve akalazy gibi özefajiyal boşalmayı geciktiren özefagus anormalliklerinde uygulanmamalıdır. En az 30 dakika dik oturamayan ya da ayakta duramayan hastalarda kontrendikedir. Hipokalsemide kontrendikedir. Ciddi böbrek yetmezliği olan hastalarda kreatinin klerensi nedeniyle kullanılmamalıdır (41).

Gebe kadınlar üzerinde yapılmış yeterli çalışma yoktur. Bu nedenle ancak potansiyel yararları beklenen potansiyel zararlarından üstün olduğunda gebe kadınlarda kullanılmalıdır (Gebelik kategorisi C). Ürünün bileşimindeki herhangi bir maddeye karşı aşırı duyarlılık söz konusuysa kullanımı kısıtlanmalıdır. Birçok ilaç insan sütüne geçtiğinden ve bifosfonatların yeni doğanlarda olası yan etkileri nedeniyle, annenin ilacı kullanmasının önem derecesi göz önüne alınarak, ilacın kullanımına ara verilmesi ya da bebeğin anne sütüyle beslenmesine son verilmesi düşünülmelidir (43).

2.9 Bifosfonatların Klinik Kullanımları

Multiple Myeloma, metastatik tümörler, osteogenezis imperfekta, hiperkalsemi yaratan maligniteler intravenöz tedavi gerektirirken, genellikle osteoporoz ve Paget's hastalığında oral uygulama yeterli olmaktadır (9).

Bifosfonatların çok çeşitli uygulama profilleri vardır (Tablo 2.2). Oral bifosfonat rejimi genellikle haftada bir tek doz şeklinde uygulanmaktadır. Günlük düzenli kullanımı sonucu gastrointestinal sistemin üst bölgelerinde mukoza irritasyonu yapması nedeniyle haftalık uygulama daha yaygın olarak kullanılmaktadır (44). Oral kullanılan bifosfonatın etkinliğini artırabilmek için ilacın yemekten 30 dakika önce sadece su ile birlikte alınması gerekmektedir (2).

İntravenöz uygulama için injeksiyonluk bifosfonat solüsyonları 250-500ml salin içinde seyreltilerek yavaş infüzyonla (en az 2 saat) hastaya verilir. Acil bir durum olmadığı sürece kronik intravenöz bifosfonat uygulaması aylık periyodlarla uygulanır (45).

Tablo 2.2: Bifosfonatların mevcut olan dozları, uygulama şekli, uygulama periyodları ve FDA onay tarihleri gösterilmiştir.

Bifosfonat Türü	Dozu	Veriliş yolu	Uygulama Periyodu	Food & Drug Administraton onay tarihi
Etidronat	400mg	Oral	Aralıklı	1977
Klodronat	300mg 800mg	IV Oral	Aralıklı Günlük	ABD’de onayı yok BK’da onayı var
Tiludronat	200mg	Oral	Aralıklı	1997
Pamidronat	30mg 90mg	IV IV	Aralıklı Aralıklı	1991
Alendronat	10mg 70mg	Oral Oral	Günlük Haftalık	1995
Risedronat	5mg 35mg	Oral Oral	Günlük Haftalık	1998
Zoledronat	4-5mg	IV	Aralıklı	2001
Ibandronat	2,5mg 150mg 3mg	Oral Oral IV	Günlük Aylık Aralıklı	2003-2005- 2006

2.10 Bifosfonatlarla İlgili Dişhekimliğinde Yapılmış Uygulamalar

Detartraj ajanlarının yapısında anti tartar etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Periodontolojide mukoperiosteal flap cerrahisini takiben ya da periodontitise bağlı olarak kemik döngüsü hızlanmakta ve alveol kemikte rezorbiyon görülmektedir. Bu rezorpsiyonun önlenmesi için bifosfonatların sistemik ya da lokal uygulaması hayvan modellerinde denenmiş ve hiçbir sistemik yan etki oluşmadan başarılı sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Kemiğe lokal uygulandığı takdirde %20-30 abzorbe edildiği ve bunun rezorpsiyonu durdurmada etkili olduğu belirlenmiştir (46).

Hidroksiapatit kaplı implantlar ve titanyum implantların alveole yerleştirilmeden önce bir hafta boyunca 37C⁰'ta 0.1mmol nötroal alendronat-sodyum solüsyonunda bekletilmesi sonucu cerrahi sonrası implant çevresi periferik kemik miktarında belirgin artış olduğu görülmüştür (47).

Avülsiyona uğramış, ağız dışında uzun süre kalmış, özellikle de bu süre boyunca uygun ortamda saklanamayan dişlerde periodontal ligament hücreleri canlılığını kaybeder. Kök yüzeyinde PDL hücrelerinden yoksun bölgelere osteoklastların tutunması daha kolay olduğundan rezorpsiyon başlar. Bu durumu yavaşlatabilmek için diş sokete yerleştirilmeden önce Hank'ın dengelenmiş tuz solüsyonu (HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*) ve alendronat-sodyumdan oluşan solüsyonda bekleterek sokete yerleştirme denenmiştir. Sonuç olarak inflamatuvar rezorpsiyon oranında azalma belirlenmiştir. Osteoklastla ilişkili eksternal kök rezorpsiyonunu engellediği ve apeksogenezis üzerinde olumlu etkileri olabileceği düşünülmektedir (48).

Distraksiyon osteogenezisle birlikte anabolik mekanizmayı artırması amacıyla bifosfonatlar kullanılmıştır. Tavşanlar üzerinde yapılan çalışmada distraksiyon fazının ilk 3 gününde alendronat enjeksiyonu yapılarak post operatif dönemde distraksiyon bölgesinin histolojik, radyografik özellikleri değerlendirilmiştir. Alendronatın distraksiyon aralığında yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı belirlenmiştir (49).

2.11 Bifosfonat Kullanımının Sistemik Yan Etkileri

Oral bifosfonatların absorpsiyonlarının çok sınırlı olması ve dispepsi, bulantı, kusma, mide ağrısı ve diyare gibi gastrointestinal yan etkilerinin olması birçok hasta grubu tarafından tolerasyonlarını sınırlamaktadır.

Günlük oral kullanımdan sonra üst gastrointestinal sistemde özefajitis, özefageal ülserasyon benzeri lezyonlar oluşması nedeniyle artık günümüzde alendronat ve risedronatın haftalık kullanılması tercih edilmektedir (2). Oral bifosfonat kullanamayan hastalarda intravenöz uygulama tercih edilmektedir.

Intravenöz bifosfonatlar iyi tolere edilmelerine karşın %20 hastada grip benzeri halsizlik (2), akut ateş, kemik ağrısı, renal toksisite veya akut böbrek yetmezliği, geçici hipokalsemiye ve IL-6, TNF- α , CRP ve elastaz salınımına neden olmaktadır (20). İntravenöz bifosfonatların uygulanmasını takiben plazma kreatinini takip etmek gerekmektedir.

Bifosfonat kullanımına bağlı olarak sklerit, iridosiklit, orbital miyozit ve uveit gibi oftalmolojik yan etkiler de bildirilmiştir (50). Bu komplikasyonların doza bağımlı olduğu böbrek fonksiyonlarının bozulmasının bir sonucu olarak ortaya çıktığı belirlenmiştir (51).

Düzenli bifosfonat kullanımının özellikle hipertansif, diyabetik, kalp anomalisi veya kalp yetmezliği bulunan kadın hastalarda atriye fibrilasyon riskini artırdığı düşünülmektedir (52). Bu hasta grubunda oluşabilecek yan etkiler hayati önem taşıdığından dikkat edilmelidir.

2.12 Bifosfonat Kullanımının Oral Kavitedeki Yan etkileri

2.12.1 Osteokemonekroz

Bifosfonat kullanımını takiben turn-overın azalmasına bağlı çene kemiklerinde osteokemonekrozlar oluşmaktadır (36). Bu osteokemonekrozların genellikle ilacın 2 yıl

süreyle kullanımından sonra ve %1-12'lik bir oranla görüldüğü bilinmektedir. Literatürde rapor edilen bifosfonat kullanımına bağlı oluşan çene kemiği nekrozlarının çok büyük bir kısmı intravenöz kullanımdan sonra oluşmuştur (1). Dünya genelinde 2,5 milyon kişi intravenöz bifosfonat tedavisi görmektedir ve bu konuyla ilgili çalışma ve raporlar giderek artmaktadır.

Osteokemonekrozun Patogenezinin Yönelik Teorileri:

I. Kemik doku: Çene kemiklerindeki osteokemonekroz patogenezi tam olarak çözülememiş olmasına rağmen dişli hastalarda periodontal aralık yoluyla cep sıvısı elemanlarının sürekli ekspoz olmasının osteokemonekroz riskini artırdığı düşünülmektedir. Bu ekspoz inflamasyona neden olur ve cevap olarak osseöz turn-overda artış beklenir. Bifosfonatlar teropatik dozlarda kullanıldığı zaman mevalonat yolu üzerinden osteoklastların rezorptif aktivitesini inhibe ederler fakat osteoblastları stimüle ederler ve osteoblastların RANKL üreterek uyardığı rezorpsiyonu engellemezler. Bu sayede kemik metabolizmasına daha az sitotoksik etki oluştururlar. Bifosfonatların yüksek dozda kullanılması hem osteoblastlar hem de osteoklastlarda hücre içi Ca^{++} birikmesine neden olarak sitotoksik etki oluşturur. Buna bağlı olarak kemik turn-overı bozulur ve gereken remodelasyon gerçekleşemez (144). Kemikte turn-overın azalması avasküler nekroz riskini artırır.

Total ya da parsiyel dişsizlikte hastaların kullandığı hareketli protezin uyumsuzluğu alveolar krette irritasyon yaratarak inflamasyona neden olur, bu durumda turn-over da artış olması gerekirken yüksek doz bifosfonatın neden olduğu sitotoksik etkiye bağlı olarak rezorpsiyonla birlikte apozisyonda da azalma olur ve sonuçta ilerleyen dönemde osteokemonekroz oluşur. En çok etkilenen bölgeler mukozanın çok ince olduğu milohiyoid çıkıntının üzeri, mandibuler alveol kemiğin lingual yüzeyi, torus ve ekzositoz olan bölgelerdir (43).

Kemik apozisyonu ve rezorpsiyonu normal kemik homeostazisinin sağlanabilmesinde önemli rol almaktadır. Osteoklastik aktivite başladığı zaman, oluşan yeni kemik matriksinin matürasyonu için sitokinler ve büyüme faktörleri salgılanır. Kemikte resorbsiyonun azalmasıyla birlikte apozisyon da azalmaya başlar, kemik onarım metabolizması, kemik büyüme-gelişme kapasitesi ve kemik kalitesi bozulur.

Travma, periodontal hastalık, periradiküler lezyon ya da dental işleme bağlı olarak nekroz olduğu durumda osteoklastlar nekrotik kemiği ortadan kaldırmak için gerekli aktivasyonu gösteremezler. Nekrotik doku hacmi yeterli seviyeye ulaştığı zaman lokal değişiklikler başlar (53).

Oral kavitenin geniş bir mikrofloraya sahip olması, oral kavitede asla aseptik bir ortam oluşturulamaması, alveolar kemiğin turn-over oranının çok yüksek olması ve travmaya yatkın olması çene kemiklerinde osteokemonekroz oluşması riskini artırır. Tüm iskelet sisteminden farklı olarak çene kemikleri dişler aracılığı ile sürekli dış çevreyle ilişkidir. Vaskülarizasyon özellikleri nedeniyle %60 mandibula, %30 maksillada osteokemonekroz görülürken, %10 her iki kemikte birlikte görülmektedir (399).

AAOMS tarafından belirlenen kemik turn-overi ile ilişkili serum işaretleyiciler kalsitonin, tiroid stimüle edici hormon (TSH), T4, T3, N-Telopeptit, C-Telopeptit, 25-hidroksi vitamin D, kemiğe özgü alkalen fosfoataz, osteokalsin ve paratiroid hormon (PTH)'dur (54). Bu işaretleyiciler kemikteki osteopeniyi değerlendirmek için kullanılırlar. Bifosfonat kullanan hastalarda kemikte remodelasyon ve rezorptif aktiviteyle ilgili değerler önemli ölçüde düşmektedir.

II. Yumuşak doku: Adölesanlarda veya erişkinlerde steroid kullanımına bağlı kemiklerde osteokemonekroz rapor edilmiştir (55). Fakat bu nekrozlar bifosfonata bağlı oluşan nekrozlardan farklı olarak genellikle ekstremitelerde büyük eklemlerde oluşmaktadır. Bifosfonatların neden özellikle çene kemiklerinde osteokemonekroz oluşturduğu tam olarak açıklanamamıştır. Bifosfonatlar turn-overin yüksek olduğu alanlarda birikirler.

Alveol kemiği vücutta en yüksek turn-over oranına sahip olan kemiklerdendir. Kemikteki bifosfonat yeterli konsantrasyona ulaştığı zaman kemiği örten yumuşak dokuda sitotoiksik etki oluşturur. Oral mukoza hücrelerinin apoptozisine neden olmadan hücre proliferasyonunu, hücreler arası bağlantıyı bozar ve hücrel nekroza neden olabilir. Alveol kemikte biriken bifosfonatın oral mukozada sitotoksik etki oluşturmasına bağlı olarak mukoza bütünlüğünün bozulması halinde yara iyileşmesinin gerçekleşmediği ve buna bağlı olarak açıkta kalan çene kemiklerinde ikincil

enfeksiyonların geliştiği ilerleyen dönemde de ekspoze osteokemonekroza dönüştüğü düşünölmektedir (29, 32).

III. Anti-anjiogenezis: Bifosfonatlar kanser hastalarında anti-anjiogenetik özellikleri sayesinde tümör hücresinin proliferasyonunu baskılayarak tümöral hücrelerin yayılmasını önlemede kullanılırlar (56). Bifosfonatların obliterasyona neden olduğu düşünölmektedir. Ayrıca bifosfonatların kemikte yenilenmeyi baskılaması kemiğin yapısında neovaskülarizasyonunda bozulmasına neden olmaktadır. Bozulan vaskülarizasyon en ufak travmayı takiben sekonder olarak yara iyileşmesinde yetersizliklere neden olmaktadır (57).

IV. İnfeksiyon Teorisi: Normal ağız mikroflorasının en baskın mikroorganizması olan *Aktinomiçes İsraili*, BRONJ vakalarında yapılan histopatolojik incelemelerde çok yüksek oranda izole edilmektedir (58, 59). Mukozanın bütönlüğünün bozulduğu durumlarda aktinomiçeslerin kemiğe invaze olarak heterojenik bir floraya neden olduğu ve kemikte osteomiyelit benzeri klinik bir tabloyla enfeksiyona bağlı nekroz oluşturduğu düşünölmektedir (60). İnfeksiyonun BRONJ’da primer ya da sekonder rolünün ayrımı tam olarak yapılamamıştır.

V. Genetik Teori: Lehrer ve ark. bifosfonatlarla ilişkili çene kemiklerinde oluşan osteokemonekrozun genetik mutasyona bağlı olarak hassas bireylerde olduğu hipotezini savunmuşlardır (39). Matriks metalloproteinaz ailesinden MMP2 genindeki mutasyonun bifosfonatın yarattığı osteokemonekrozla ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir. MMP2 genindeki mutasyonlar daha önce kemik matriksindeki bozukluklarla birlikte görölen Winchester sendromu gibi sendromlarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca zolendronat ve alendronatın neden olduğu atrial fibrilasyonla vücutta ilişkili tek genin MMP2 olduğu belirlenmiştir (399). MMP2 geninin bifosfonatlar gibi hem kardiyovasküler sistem hem de kemik dokuda etkileri vardır fakat bu konuyla ilgili kesin sonuçlara ulaşabilmek için daha çok araştırma yapılması gerekmektedir.

2.12. 2 Diş sürme gecikmesi:

Pediyatrik dönemde uygulandığı takdirde diş sürme fizyolojisi için gerekli olan osteoklastik aktiviteyi baskıladığı için diş sürme yolunda direnç oluşmasına ve buna

bağlı olarak erüpsiyonda gecikmeye neden olmaktadır. Pediatrik hasta grubunda etik açıdan bu konuda klinik çalışma yapılması sınırlıdır. Goldrat ve ark. tarafından osteogenezis imperfekta tanısı konmuş bifosfonat tedavisi gören ve görmeyen aynı yaş grubu çocuklar üzerinde yapılan bir değerlendirmede bifosfonat tedavisinin ortalama 19,5 ay diş sürme gecikmesine neden olduğu saptanmıştır (37).

Osteopetrotik farelerde yapılan çalışmalarda osteoklastik rezorptif aktivitenin yokluğu nedeniyle dişlerin süremediği ve sağlıklı farelerden alınan dalak hücrelerinin injeksiyonu sonrasında osteoklastik farklılaşma ve diş erüpsiyonunun görüldüğü rapor edilmiştir (37).

2.12.3 Oral Mukoza İrritasyonu

Keratositlerin hücresel döngüsünün bifosfonatlar tarafından bozulması müköz membran yenilenmesini ve yara iyileşmesini olumsuz etkiler. Bu konudaki hipotezler: 1. Bifosfonatların yumuşak dokuda yüksek konsantrasyona ulaştığı zaman farnesil difosfat sentetazı engelleyerek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve turn-overı baskıladığı 2. Özellikle aminobifosfonatların (nitrojen zinciri içeren bifosfonatlar) yapısında hücre proliferasyonunu engelleyerek yara iyileşmesini bozduğu şeklindedir (29). Ayrıca anti-anjiyogenik etkisi nedeniyle iskemiye neden olur.

2.13 Osteokemonekrozda Klinik Bulgular

AAOMS bifosfonat kullanımına bağlı çene kemiklerinde oluşan osteokemonekrozun kesin tanısı için 3 karakteristik özellik belirlemiştir (61, 62);

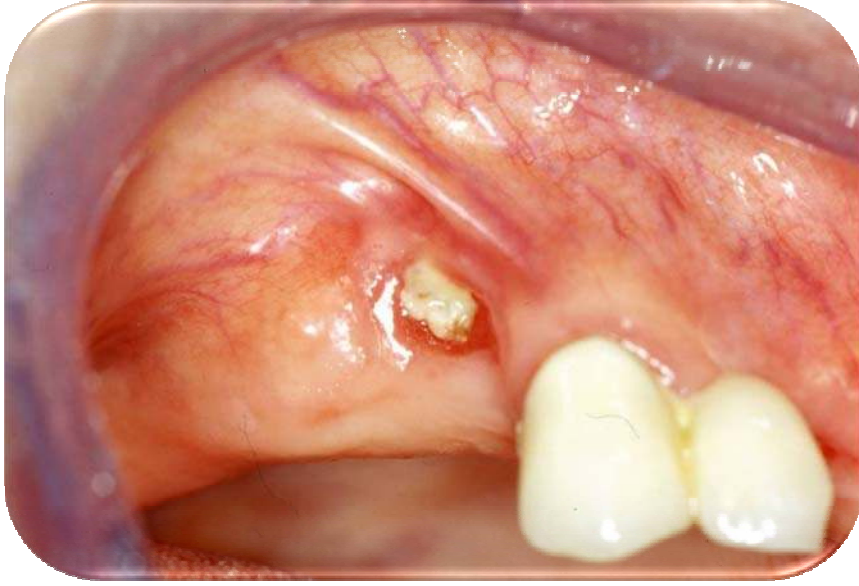
- Devam eden ya da geçmişte uygulanmış bifosfonat terapisi
- Baş-boyun bölgesinde daha önceden radyoterapi uygulanmamış olması
- Ekspoze nekrotik kemiğin maksillada olması ve/veya en az 8 haftadır var olması

Bifosfonata bağlı oluşan osteokemonekrozun tipik klinik görüntüsünde inflame olmuş dişeti veya ağız mukozası ile çevrili, devital, ekspoze kemik yüzeyi vardır (53). Vakaların %82'sinde çene kemiğinde spontan ağrı ilk bulgudur (63).

Bifosfonata bağlı oluşan osteokemonekrozun ağızda birçok patoloji ile karışabilen spesifik olmayan bulguları vardır (4, 10). Bunlar;

- Dişlerde hassasiyet
- Mukozada lserasyon
- Yumuşak dokuda şişlik
- Spontan olabileceği gibi özellikle çiğnerken veya diş fırçalarken grlen şiddetli ağrı
- Maksiller sinüs bölgesi tutulumunda sinüzit, oroantral fistül, mukoperiosteal genişleme, Schneider müköz mebranında yeni kemik oluşumu görülebilir
- İnflamasyonun tüm bulguları
- İltihabik drenaj
- Akut abse
- Alveol kemikte ekspoz (Resim 2.1, 2.2)
- Osteomiyelit
- Osseöz sekestre oluşumu
- Trismus
- Halitozis
- Deride fistülizasyon
- Parestezi/Anestezi
- Aktinomiçes infeksiyonu olabilmektedir.

Bifosfonata bağlı oluşan ostekemonekroz semptomatik olabileceği gibi aylarca kemikte hiçbir ekspoz oluşturmadan asemptomatik olarak da devam edebilir. Osteokemonekroz dental ya da periodontal bir rahatsızlığın bulgularıyla kendini belli edebilir. Bu nedenle bifosfonat kullandığı bilinen hastada rutin dental tedavi yapıldığı durumda semptomlarda düzelme olmuyorsa osteokemonekrozdan şüphe edilmelidir (18).



Resim 2.1: Sağ üst çene premolar diş çekimini takiben oluşan BRONJ.

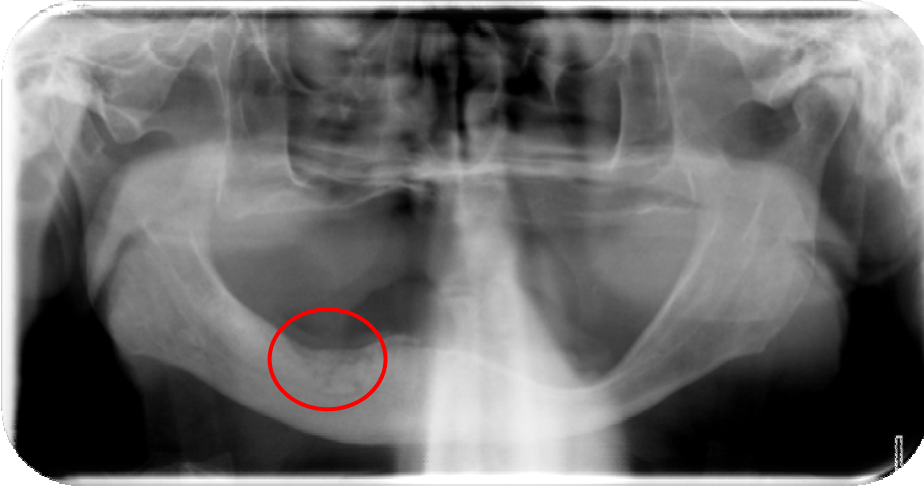


Resim 2.2: Sağ alt çenede protez irritasyonu nedeniyle oluşan BRONJ.

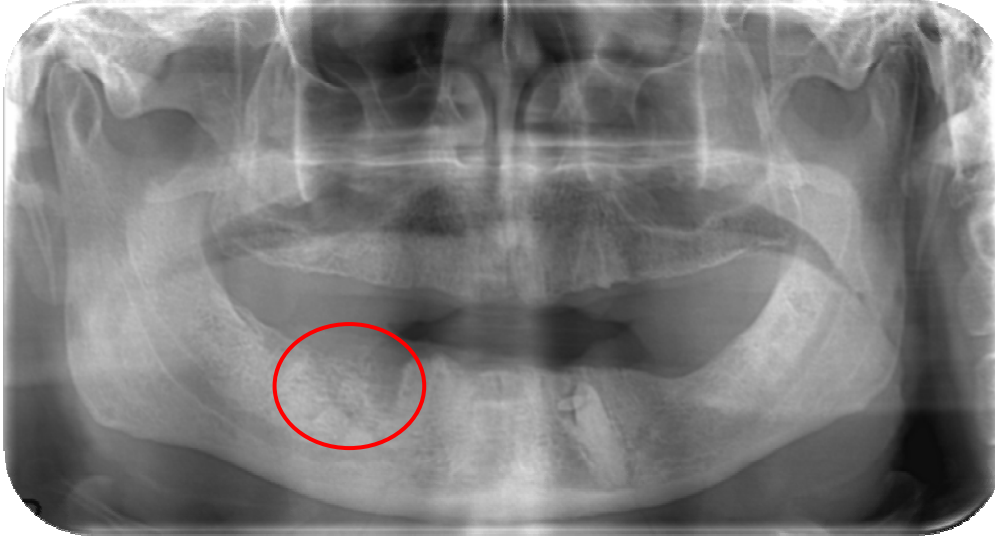
2. 14 Osteokemonekrozun Radyografik Bulguları

Osteokemonekrozun başlangıç fazlarında özgün olmayan radyolojik bulgular vardır. Periodontal infeksiyonlarda olduğu gibi periodontal aralıkta genişleme görülür. Lezyon ilerledikçe geniş radyolusent alanlar görülür ve bazen klinik çene kemiği fraktürleri ile sonuçlanabilir. Olası bulgular;

- Trabeküler yapının genişlik, mineral densitesi, lakünleri, trabekül formasyonunda değişiklikler (Resim 2.3)
- Kortikal kemikte erozyon (Resim 2.4)
- Osteosklerozlar
- Periosteal yeni kemik oluşumu
- Küçük (15mm'den küçük) veya büyük (15mm'den büyük) sekestrelerdir (64).



Resim 2.3: Osteokemonekroz nedeniyle trabekülasyonu bozulmuş alveolar kemiğin radyografik görüntüsü.



Resim 2.4: Osteokemonekroz nedeniyle erozyona uğramış mandibuler kortikal kemiğin radyografik görüntüsü.

Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kemik iliğindeki ödem gözlemlenebilmektedir. Kemik iliğinde ödem kemikteki iskemi ve nekrozun erken bulgusudur (65). Radyonükleotid kemik taramaları kemikteki vaskülarizasyon değişikliklerini en iyi görüntüleyen tekniklerdir. Bu taramalar osteokemonekrozun erken tanısında yardımcı olabilir (65).

Sintigrafi kemik yoğunluğundaki değişiklikleri göstererek nekroz başlangıcı, nekroza yatkın kemik metabolizmasında bozulmaların olduğu bölgeleri veya nekrozun subklinik evrelerini göstererek bifosfonatı düzenli kullanan hastalarda osteokemonekrozlar oluşmadan önce %66 gibi bir oranla erken tanıya yardımcı olabilmektedir (66).

2.15 Osteokemonekrozun Histolojik Bulguları

Bifosfonata bağlı oluşan osteokemonekrozun histolojik yapısı incelendiğinde kemik iliğinde fibrozisle birlikte akut-kronik inflamatuvar hücreler, plazma hücreleri ve çeşitli fungal-bakteriyel mikroorganizma kolonizasyonları görülmektedir.

Mikrobiyolojik incelemede primer olarak aktinomiçesler olmak üzere, enterokoklar, kandida albicans, hemofilus influenza, alfa hemolitik streptokoklar, laktobasiller, enterobakterler ve klebsiella pnömonia türleri izole edilmiştir (111).

Bifosfonata bağlı osteokemonekrozlarda, olayın infeksiyon kısmında baskın olarak rol aldığı bilinen Aktinomiçesler, flamentöz, Gr(+) ve anaerobik mikroorganizmalardır (60). Oral mukoza bütünlüğünün bozulmadığı durumlarda normal ağız florasının elemanı olarak oral mukoza yüzeyinde yer alırlar fakat mukoza bütünlüğünün bozulduğu durumlarda kemiğe invaze olarak patojen hale gelirler. Uzun süren kronik inflamatuvar bir etkiyle kemikte yıkıma ve osteolizise neden olurlar (60).

2.16 Osteokemonekrozun Predispozan Risk Faktörleri

Osteokemonekrozlar genellikle yüksek doz kullanan hastalarda görülür. Osteokemonekrozların özellikle intravenöz kullanılan zolendronat ve pamidronatla ilişkili olduğu yapılan vaka raporlarında gösterilmiştir. Buna rağmen literatürde nitrojen içermeyen disodyum klodronatin oral kullanımından sonra rapor edilmiş ağırlı, ekspoz ve pürülan akıntı ile birlikte görülen osteokemonekroz vakası bulunmaktadır (67).

Kanser tedavisi gören hastalarda kullanılan bifosfonat oranı osteoporoz tedavisinde kullanılan bifosfonatın 12 katı kadardır ve osteoporoz tedavisinde oral alınırken, tümör tedavisinde intravenöz uygulanmaktadır. Bu nedenle çene kemiğinde osteokemonekroz genellikle kanser hastalarında görülmektedir. Oral bifosfonat kullanımından sonra görülen osteokemonekrozlar tüm osteokemonekrozların %5'ini oluşturmaktadır (68).

Yapılan değerlendirmelere göre bifosfonat terapisi sonucu oluşan osteokemonekrozların %46,5'i multiple myeloma, %38,8'i metastatik göğüs kanseri, %6,2'si prostat kanseri, %4,1'i osteoporoz, %3,5'i diğer metastatik kanserler, %0,8'i Paget's hastalığında görülmektedir (35).

Bifosfonat türlerinin çoktan aza doğru osteokemonekroz oluşturma riskleri: zolendronat, pamidronat, alendronat, risedronat, ibandronat şeklindedir (10). İntravenöz

uygulama ajanları olan zolendronat ve pamidronat karşılaştırıldığı zaman zolendronat kullanan hastalarda çene kemiğinde rapor edilen osteokemonekroz vakası sayısının 2 katı olduğu belirlenmiştir (20).

Bifosfonat terapisinin 3 yıldan uzun olması osteokemonekroz gelişme riskini artırmaktadır. IV kullanımı takiben 6 ay içerisinde ve parenteral kullanımı takiben 23 ay sonra olduğu rapor edilen osteokemonekroz vakaları vardır (68).

Osteogenezis imperfektanın tedavisinde çocuklarda bifosfonatlar kullanılmaktadır. Fakat çocuklarda rapor edilmiş hiçbir osteokemonekroz vakası yoktur. Bu da osteokemonekrozda yaşın rol oynadığının bir göstergesidir.

Çene kemiklerinde ağırlı, ekspozite osteokemonekrozlar spontan olarak oluşabileceği gibi iatrojenik travma, uyumsuz protez irritasyonu, dental yaralanmadan sonra gelişebilir. Bifosfonata bağlı çene kemiklerinde osteokemonekroz oluşumu ile birlikte osteomiyelit görülmesi genellikle travmaya sekonder oluşmaktadır (69).

Periodontal tedavi, diş çekimi gibi invaziv minör cerrahi işlemlerden sonra gelişebilir. Osteokemonekrozun major etkeni diş çekimi olarak kabul edilmektedir. Diş enfeksiyonu, çürük tedavisi, dental restorasyon ve endodontik tedavi sonrasında gelişen vakalar da rapor edilmiştir (53). Oral kavitede klinik ve radyografik olarak bulguları olan periodontitisin varlığı riski artırmaktadır. Torus ve ekzositozların varlığı riski artırmaktadır (188).

Hastanın 65 yaş üzeri olması, alkol veya tütün kullanım alışkanlığı diabetes mellitus, böbrek yetmezliği, anemi gibi sistemik hastalıklar osteokemonekroz riskini artıran önemli predispozan etkenlerdir (13, 20).

Kanser tedavisi gören hastalarda periferik vasküler hastalıklar, hiperviskozite sendromları, çene kemiğinin özellikle orofaringeal kanser nedeniyle radyasyona maruz kalması, kemoterapötik ajanlar ve antianjiyogenik ajanların (glukokortikoid, thalidomit, bortezomit) ek olarak kullanılması osteokemonekroz riskini artırır (70). Osteokemonekrozların %61'inde önceden glukokortikoid kullanıldığı belirlenmiştir (10). Osteokemonekroz riski kanser popülasyonunda 4 kat daha fazladır (11).

Obesite önemli bir risk faktörüdür. Özellikle kanser hastaları üzerinde yapılan değerlendirmede obez bireylerde osteokemonekroz riskinin yüksek olduğu belirlenmiş (71).

2.17 Osteokemonekrozun Tedavisi

İlk kez 2003 yılında Marx ve ark. rapor ettiği ilk bifosfonata bağlı osteokemonekroz vakasıyla, klinikte tedaviye yanıt vermeyen, osteomyelit benzeri bulguları olan, nekrotik patolojinin etiyolojisi açıklanmış oldu (72). Önceleri invaziv cerrahi yöntemlerle tedavi edilmeye çalışılsa da tedaviyi takiben nekrozun klinik seyrinin kötüleştiği görüldü. Klinik deneyimlerin artmasıyla birlikte BRONJ'un tedavisinde konservatif yöntemler tercih edilmeye başlanmıştır.

AAOMS tarafından 2007 yılında BRONJ'un klinik seyri evre I, II ve III olmak üzere üç ana gruba ayrılmıştır (73). Bu üç evre birbirinden tam keskin sınırlarla ayrılmasa da klinik duruma bağlı olarak hepsinin birbirinden farklı tedavi gereksinimleri vardır (Tablo 2. 3).

Tablo 2. 3: BRONJ'un klinik evrelerine göre önerilen tedavi seçenekleri.

Evre	Klinik Özellikleri	Tedavisi
Evre I	Aseptomatik kemik ekspozu Komşu yumuşak dokuda herhangi bir inflamasyon, ödem veya infeksiyon bulgusu yok	Antibakteriyel ağız gargarası Klinik takip Hasta bilgilendirilmesi Semptomatik tedavi
Evre II	Ağrılı ekspoz kemik Komşu yumuşak dokuda şişlik/sekonder infeksiyon	Antibakteriyel ağız gargarası Semptomatik tedavi Ağrı kontrolü Superfasiyal debridman Antibiyograma uyumlu antibiyotik terapisi
Evre III	Ağrılı ekspoz kemik Komşu yumuşak dokuda şişlik/ sekonder infeksiyon Ekstraoral kutanöz fistül/ patolojik fraktür	Antibakteriyel ağız gargarası Semptomatik tedavi Ağrı kontrolü Superfasiyal debridman Antibiyograma uyumlu antibiyotik terapisi Hiperbarik oksijen Cerrahi kemik greftleri Kemik Stimulatorleri, Büyüme Faktörleri Paratroid Hormon vb. ajanlar

Hastada bifosfonat tedavisine karar verildiyse özellikle invaziv işlemler başta olmak üzere tüm dental tedaviler bitirildikten sonra ilaç tedavisine başlanmalıdır. Daha sonradan risk oluşturabilecek durumlar söz konusuysa radikal tedaviler düşünülmelidir. Hasta osteokemonekroz riski konusunda bilgilendirilerek ağız hijyeninin önemi vurgulanmalıdır.

Bifosfonat terapisine başlandıktan sonra düzenli dental takip yapılmalıdır. İnvaziv dental işlemler özellikle yüksek doz veya intravenöz bifosfonat kullanan hastalarda olabildiğince önlenmelidir. Bu hastaların protez uyumu maksimum olmalıdır (9).

Oral bifosfonat kullanan hastalarda dentoalveolar cerrahi kontrendike değildir. Cerrahi işlem gerektiği takdirde bifosfonat tedavisine sıklıkla 1 ay ara verilmesi önerilmektedir (65). Marx ve ark. bifosfonat kullanan hastarda invaziv dental işlem endikasyonu konulduysa kemiğin normale dönüp nekroz riskinin ortadan tamamen kalkabilmesi için en az 6-9 ay terapiye ara verilmesini önermiştir (36). Bifosfonat kemikte çok uzun yıllar devamlılık gösterebilen bir ilaç olmasına karşın ilaca ara verilmesi antianjojenik etkinin ortadan kalkmasına neden olmaktadır. Uluslar arası Myeloma Kuruluşu (*International Myeloma Foundation*) bifosfonat terapisi gören hastalarda oral cerrahi işlem gerekmesi durumunda da 2-4 ay ilacın kesilmesinin osteokemonekroz riskini belirgin ölçüde azalttığını savunmaktadır (13).

Bifosfonat kullanan hastalarda kemikte ağırlı, ekspoze, osteokemonekroz oluşması durumunda ağrıyı kontrol etmek ve mukozanın bütünlüğünü sağlamak çok zordur. Bu osteokemonekrozlar süperinfeksiyonlardır ve hekim ilk seçenek olarak cerrahi tedavi uygulamaktan kaçınmalıdır. Konservatif tedavi ve takip önerilmektedir. Antimikrobiyal tedavi osteokemonekroz tedavisinin en önemli kısmını oluşturmaktadır (11).

Konservatif tedavi olarak;

- %0,2'lik kloroheksidinli ağız gargarası (2 ay süreyle)
- Hiberbarik oksijen terapisi
- Antibiyograma uygun antibiyotik tedavisi (penisilin-klavulonik asit, metranidazol, doksisisiklin, hastanın penisiline allerjisi varsa klindamisin)
- Sekestreleri uzaklaştırmak için agresif olmayan yüzeysel küretaj uygulanabilir (64).

2.18 Osteokemonekrozun Ayırıcı Tanıları

2.18.1 Phossy Jaw

20. yüzyılda füze-mermi ve saat gibi endüstri sektörleri çalışanlarında beyaz fosforla temasa bağlı olarak ‘phossy jaw’ diye adlandırılan çene kemiği nekrozları görülmüştür. Çalışanlar ciddi oral ülserler, şiddetli ağrı, kötü koku ile birlikte görülen sekestrelerle karakterize nekrozlardan yakınmışlardır. Diş çekimi sonrası çok kötü bir tablo oluşmaktadır ve enfeksiyona bağlı mortalite oranı çok yüksektir. Osteoradyonekroz ve osteokemonekroz tabloları ile benzer histolojik özellikler belirlenmiştir. Osteoradyonekrozdan farklı olarak phossy jaw tablosunda hastalığın temelini bakteriyel bileşenler oluşturmaktadır (70, 74, 75).

2.18.2 Osteoradyonekroz

Klinik semptom ve bulguları osteokemonekrozla benzerdir. Histolojik olarak her iki patolojideki nekroz yapısı benzemesine karşın osteoradyonekrozda farklı olarak ölü kemik alanları arasında canlı kemik alanları da izlenir. Her ikisinde de medular boşluklarda inflamasyon ve fibrozis oluşur. Kan damarı obliterasyonu osteoradyonekrozda daha fazladır (1). Avasküler nekroz paternleri farklıdır. Osteoradyonekroz sıklıkla mandibulada izlenirken osteokemonekroz hem maksilla hem mandibulada görülebilir. Osteokemonekrozda çene kemiğinde etkilenmiş nekrotik dokunun sınırları genellikle belirgin değildir ve osteoradyonekrozdan farklı olarak radikal cerrahi tedavi tercih edilmez (53).

2.18.3 Osteomiyelit

Osteomiyelit genellikle odontojenik kaynaklı ya da travmaya bağlı olarak gelişen kemik iliği inflamasyonu ile başlayan bir enfeksiyondur. Radyografik olarak sınırları belirgin olmayan radyolusent bölgeler ve radyopak sekestreler izlenir. Osteokemonekrozda olduğu gibi şişlik, ağrı, fistül oluşumu, pürulan akıntı görülebilir fakat genellikle klinik tablosunda ekspoze nekrotik kemik yoktur (76).

2.18.4 Multiple Myeloma

İmmatur plazma hücrelerinin kemik iliğinde proliferasyonu ile karakterize malign bir neoplazidir. Tüm iskelet sistemini etkileyebilir. Çene kemiklerinde maksilla veya mandibulayı tutan litik lezyonlar yapabilir. Klinik olarak lezyonlar şişlik, ağrı, hiperemiye neden olabilir. Radyografik olarak sınırları belirgin olmayan osteolitik alanlar görülür (77).

2.18.5 Çene Kemiğine Metastaz

Oral malign tümörlerin %1'i metastatik kemik hastalıklarıdır. Genellikle posterior mandibulada lokalize olurlar ve ağrı, parestezi ya da anestezi, diş kayıpları ve kemik yıkımı ile birlikte görülürler. Klinik görüntüleri bifosfonata bağlı oluşan osteokemonekrozla karıştırılabilir. Kemikteki metastas osteokemonekroza göre çok daha agresif bir tedavi gerektirir ve iki lezyonu ayrımı bu açıdan çok önemlidir. Bifosfonata bağlı osteokemonekroz olduğu düşünülen klinik tablo kemikteki metastazı gizleyebilir ya da hem osteokemonekroz hem metastaz görülebilir (78). Bu nedenle kemiğe metastaz riski olan, kanser tedavisi gören hastalarda çene kemiklerinde osteokemonekroz oluşması halinde biyopsi alınarak incelenmelidir.

2.19 Bifosfonatlara Alternatif Olabilecek İlaçlar

Osteoklastları direkt olarak inhibe etmeden ve osteoklast apoptozisine neden olmadan kemik rezorpsiyonunu önleyen ilaçlar üretilmektedir (13). Bu sayede kemikte turn-overın bozulmadığı düşünülmektedir. Bu ilaçlar;

2.19.1 NE 107790 BP

Risedronatın fosfonokarboksilat analogudur. Mevalonat yolunda özgün Rab protein prenilasyonunu bozarak etkilerini gösterirler. Risedronattan farklı olarak osteoklast sayısını azaltmadan osteoklastların morfolojisini değiştirerek rezorpsiyonu baskılar. Antirezorptif etkileri zayıftır (79). Klinik kullanımı yaygın değildir.

2.19.2 Doxorubicin

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapotik bir ajandır. Bir artrasilin antibiyotiğidir. Etki mekanizması tam olarak açıklanamamış olmasına karşın makromoleküler DNA biyosentezini inhibe ederek etkilerini gösterdikleri düşünülmektedir (80).

2.19.3 Pegylated Liposomal Doxorubicin

Anti-kanser ilaçtır. Lipozom içeren doksorubisinlerin polietilen glikol ile kaplı olması fagositoza karşı dirençli olmalarını ve daha stabil kalmalarını sağlar. Yarı ömürleri normal doksirubisine göre daha uzundur (81).

2.19.4 Denosumab

Kemik metastazı, multiple myeloma ve osteoporozda etkili şekilde kullanılmaktadır. Özgün RANKL antikorudurlar. Osteobalstlar tarafından üretilen RANKL, preosteoklastlara RANK bağlanmasını sağlar ve osteoklast üretilmesinde rol alır. RANKL baskılandığı zaman preosteoklastlar osteoklastlara dönüştürülemez. Osteoporoz tedavisinde bifosfonatlara göre çok daha etkilidirler. Bifosfonatlar kemikte turn-overın fazla olduğu alanlarda birikirler fakat denosumab kemikte uniform bir etkiye sahiptir (2).

Alendronat ve denosumab karşılaştırıldığı zaman, kemiğin yenilenmesini baskılama özelliği denosumab kullanan bireylerde daha baskındır. Günümüzde denosumab kullanan hastalarda rapor edilmiş osteokemonekroz vakası bulunmamaktadır. Denosumab çok yeni bir ilaçtır ve kemikte yenilenmeyi baskılaması nedeniyle oluşabilecek komplikasyonları yorumlamak için daha uzun yıllara ihtiyaç vardır.

2.19.5.1 Protelous

Stronsiyum renalat şelasyonu olan bu tablet osteoporoz tedavisinde bifosfonatlara alternatiftir. 1980’li yıllarda piyasaya giren ilacın günümüze kadar kullanımına bağlı gelişmiş bir osteokemonekroz komplikasyonu rapor edilmemiştir.

Osteoporozla bağlı kırık oluşmasını önlemede alendronattan daha etkin olduğunu savunan çalışmalar vardır (82).

2.20 Hücre Kültürlerine Uygulanacak İlaç Konsantrasyonunun Ayarlanması

2.20.1 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide]

Metodu

MTT, bir ilacın veya ajanın hücre üzerindeki sitotoksik etkisini renk değişikliğine bağlı yorumlamaya yarayan bir yöntemdir. Hücre canlılığı ve proliferasyon miktarı ve ilacın IC₅₀(%50 İnhibitor Konsantrasyon) değerini sayısal verilerle ifade etmeye yardımcı olur. MTT uygulandığı ortamdaki canlı hücrelerin mitokondrisindeki enzimlerin yapısına bağlanır. Enkübasyon döneminin ardından kültürlere dodeksil sülfat+etanol+hidroklorik asit kombinasyonundan oluşan zelti katılarak canlı hücrelere bağlanmış MTT'ler tuz haline getirilir. Oluşan tuz hücrenin canlılığı ile doğru orantılı olarak ilk uygulandığı anda oluşan sarı renkten giderek mor rengin tonlarına dönüşür. Canlılığın ve proliferasyonun çok olduğu hücre koyu mor boyanırken, sitotoksik etki oluşmuş canlılığını azalmış veya kaybolmuş hücreler açık mor veya pembe renkte boyanır (83). Bu renk değişimi sayesinde ELİSA yoğunlukler sayesinde doza bağımlı sitotoksik etki oluşumu doz eğrisi ile ifade edilir.

2.21 İmmunohistokimyasal Boyama

İmmunohistokimya istenilen proteinin antijen- antikor ilişkisine dayanarak gösterilmesi temeline dayanır (84). İstenilen protein hücre zarı, sitoplazması (kaspaz 3) ya da çekirdeğinde (Ki-67) yerleşim gösteriyor olabilir. Hücrede gösterilmek istenen proteinler antijen kabul edilir. Bu proteine karşı başka bir canlı immünize edilerek antikor üretilir. Örneğin; insana ait bir hücredeki protein için fare, tavşan, keçi gibi hayvanlara bu protein antijen olarak verilir ve buna karşı antikor oluşturması sağlanır. Elde edilen bu antikor immünohistokimyasal yöntemlerde primer antikor olarak adlandırılır. Primer antikor geliştirildiği kendine özgü antijene bağlanır. Böylece antijen antikor kompleksi oluşur. Ancak bu kompleksin görünür hale gelmesi için floresan işaretli ikinci bir antikor kullanılır. Bu ikinci antikor sekonder antikor olup primer antikora karşı spesifik olarak üretilmiş işaretli bir immunoglobülinidir (Örneğin; primer antikor fareden elde edilmişse sekonder antikor anti- fare, tavşandan üretilmişse anti-tavşan olmalıdır). Floresan işaretli sekonder antikor primer antikora kovalent olarak bağlanır. Bu aşamadan sonra floresan mikroskopta istenilen proteinler görünür hale gelmiştir. Floresan mikroskopta ışık kaynağından gelen ışık absorblanır ve farklı bir renkte (yeşil, kırmızı, turuncu, sarı) yansır ve fotoğraflanır.

2.22 Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü)

Apoptoz; gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve işlev kaybına uğrayan hücrelerin, diğer hücelere zarar vermeden genetik bir program eşliğinde ölümüdür. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam süresince apoptoz düzeneği ve programlı hücre ölümü vardır (85, 86).

Apoptotik hücre ölüm programında üç ana protein ailesi iş görür (87, 88). Bunlar:

- 1) B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi proteinleri
- 2) Kaspazlar (cysteine aspartate proteinases-Caspases)
- 3) Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1)

Bu anahtar bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen yapısal değişikliklerden, mitokondriyon hasarından, DNA parçalanmasından, kromatin

yoğunlaşmasından, hücre zarının apoptozise özgü tomurcuklanmasından ve sonuçta apoptotik cisimciklerin şekillenmesinden sorumludur (86).

Apoptoz; CD95 ölüm reseptörü üzerinden olan dış (ekstresek) ve mitokondriyon üzerinden olan iç (intrensek) yollar ile gerçekleşir. Dış yolda kaspazlar, belli ölüm substratlarını yıkarak apoptozun gerçekleşmesini sağlarlar. İç yola ise pro- ve anti-apoptotik proteinler tarafından düzenlenir. Apoptozda hücrede görülen yapısal ve biyokimyasal değişimlerin hiçbirisi 'olmazsa olmaz' nitelikte değildir, çünkü apoptoz birbirinden farklı yollar üzerinden yürür. Apoptoz birkaç saat ile birkaç gün arasında sürebilir (89).

DNA parçalanması, karyoreksis (çekirdeğin küçük parçalara ayrılması), sitoplazmanın daha yoğun, organellerin daha sıkı paketlenmiş hale gelmesi, hücre zarında balonlaşmalar (apoptotik cisimler) oluşması apoptozun ana yapısal özellikleridir (90).

Apoptozu tespit etmekte kullanılan yöntemler; hücre yapısındaki değişimlerin gözlenmesi, DNA kırıkları, kaspazlar, parçalanmış substratlar, düzenleyici ya da baskılayıcıların saptanması olarak özetlenebilir. Düşük molekül ağırlıklı DNA parçaları agaroz-jel elektroforezi ile rahatlıkla tespit edilir. Endonükleazlar, nükleozomlar arasındaki bağlayıcı DNA'yı hedef alırlar ve bu noktalardan parçalanan DNA merdiven görüntüsü verir. Kırık noktaları sıklıkla 3'-OH ucu içerdiğinden, DNA kırıkları TUNEL (*Terminal Deoxyuridine Triphosphate Nick-End Labeling*) yöntemiyle işaretlenir. TUNEL yöntemi nekrozdaki ya da DNA onarımı içindeki hücreleri de işaretleyebildiğinden güvenilirliği fazla değildir. DNA agaroz jel elektroforezi ile desteklenmelidir (91).

Apoptozisin erken evrelerinde bir protein ailesi olarak bilinen kaspazlar aktive olurlar. Bu proteinler normal hücresel fonksiyonlar için gerekli olan, özellikle hücre iskeleti yapısal proteinleri ve DNA onarımında rol alan çekirdek proteinlerin parçalanmasından sorumludurlar. Aynı zamanda kaspazlar DNazlar gibi çekirdekte DNA'yı ve ayrıca diğer hücresel bileşenleri parçalayan enzimleri aktive ederler (92).

Çoğu sağlıklı hücre birçok kaspazı inaktif öncüller (zimojen) olarak içerir. Kaspaz zimojenleri az miktarda katalitik aktiviteye sahip olmasına karşın çeşitli düzenleyici moleküller ile kontrol altında tutulmaktadır. Apoptotik sinyal aldığı anda, kaspaz zimojenleri proteolitik parçalanmaya uğrayarak kalırlar aktif enzimleri oluştururlar (92).

Kaspazlar uzun öncül bölgesi kaspazlar (kaspaz 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13) ve kısa öncül bölgesi kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7, 14) olarak iki alt gruba ayrılırlar. Uzun öncül bölgesi kaspazlar, özel protein-protein etkileşim bölgeleri içerir ve kaspaz aktivasyonunda çok önemli role sahiptirler. Bu bölgeler; prokaspaz moleküllerinin, özel ölüm sinyali komplekslerine dönüşümüne aracılık ederek otokatalitik aktivasyonlarına yol açar. Sinyaller aracılığı ile aktive olan kaspazlar öncü kaspazlar olarak bilinir ve hücre sinyali ve apoptotik ölüm arasında bir bağ oluşturur. Ana öncü kaspazlar 2, 8, 9 ve 10'dur. Bu kaspazlar ya kaspaz iyileştirme bölgesi (CARD) (kaspaz 2, 9) ya da bir çift ölüm tetikleyici bölge (DED) içerir (kaspaz 8, 10). Başlatıcı kaspazların öncül-bölgelerinin birbirleriyle yapışması kaspaz aktivasyonu için esas etkiyi oluşturur. Herhangi bir ligandın ölüm reseptörüne bağlanması ölüm bölgesini (DD) içeren moleküllerin, DED ve CARD bölgelerini içeren uzun öncül-bölgelerin yapışmasına etki eder. Bu yapışma Ölümü Tetikleyen Sinyal Bileşeni'nin (DISC) oluşmasına neden olur. DISC ise kaspaz 3'ü aktive eder. Kaspaz 9 ise APAF-1 ve sitokrom c ile apoptozom bileşenini oluşturarak aktive olur ve prokaspaz 3'ü aktive eder (93). Kaspaz 3 antijeni immunohistokimya sitoplazmik olarak boyanmaktadır.

2.23 Proliferasyon (Hücre çoğalması)

Proliferasyon; kontrollü veya kontrolsüz şekilde hücre bölünmesine bağlı hücre miktarındaki nüfus artışıdır. Hücre çoğalmasını incelemek için en sık kullanılan antijenlerden biri hücre döngüsünde proliferatif evredeki hücrelerde nükleer antijeni ifade eden monoklonal bir antikör olan Ki-67'dir. Ki-67 antijeni pozitif yüklü, alkalın non-histon bir proteindir (94).

Ki-67 antijeni hücre döngüsünün dinlenme evresi (G_0) dışında her evrede (G_1 , S, G_2 , M) ifade edilir. İfadelenmesi G_1 evresinin başında belirgindir ve geç G_1 evresi

süresince çekirdekte birikir. Antijenin ifadenmesi hücre döngüsü ilerledikçe artar, en yüksek yoğunluğuna mitozda ulaşır ve sonra belirgin şekilde azalır. Mitozdan hemen sonra miktarı en düşük düzeyde gözlenmektedir (95). Bu protein, tüm proliferatif hücrelerde (normal hücre ya da tümör hücresi) immünohistokimyasal olarak çekirdekte boyanma özelliği göstermektedir (96).

Yapılan literatür incelemesinde sınırlı sayıda çalışmada bifosfonatların oral mukozadaki farklı hücre grupları üzerinde oluşturduğu etkilerin incelendiği görülmüştür. Bu çalışmaların tümü doğal fare oral mukozası ya da önceden üretilmiş sentetik oral mukoza hücre kültür preparatları üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmalarda pamidronat ve zoledronatın, oral fibroblastlar veya keratinositler üzerindeki etkilerine bakılmıştır ve çalışmaların sonuçlarında farklılıklar mevcuttur. Zoledronatla yapılan çalışmalarda apoptozisle birlikte hücre proliferasyonunun baskılandığı görülürken, pamidronatın apoptozise neden olmadan hücre proliferasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir. Ayrıca en yaygın kullanılan bifosfonat türü olan aledronatla ilgili ise hiçbir yumuşak doku çalışması bulunmamaktadır.

Bifosfonat kullanan hastalarda %12'ye varan bir oranda çene kemiklerinde görülen nekrozlarda hemen hepsinde oral mukoza irritasyonu da birlikte görülmektedir. Birçok araştırmacı 2007 yılından beri kurdukları hipotezlerde nekrozun tedavi edilebilmesi için yumuşak dokudaki patofizyolojinin de bilinmesi gerektiğini ve kemikte oluşan nekrotik olaylarla yumuşak doku kaybının ilişkili olduğunu savunmaktadır. Ancak bu konuda yapılan deneysel çalışmalar patogenezi yorumlamak konusunda yetersizdir.

Bifosfonatların epitel hücresi üzerinde olan etkisi osteoklastlara olan etkisi kadar iyi açıklanamamıştır. Doğal insan oral epitel hücreleriyle ilgili kesin bir veri bulunmamaktadır. Doğal insan mukozası üzerinde yapılmış incelemelere yönelik veriler gastrointestinal sistemle sınırlıdır.

Planlanan çalışma insan oral mukozasından elde edilen primer fibroblast hücre kültürleri üzerinde, farklı endikasyonlar için kullanılan iki farklı bifosfonat türü olan alendronat ve pamidronatın apoptoz ve proliferasyon üzerine olan etkilerini, immunohistokimyasal boyama tekniğiyle incelemek ve karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı, Arçelik, Türkiye
- CO₂ inkübatör Heraeus, Heracell, Almanya
- ELİSA okuyucu, Biotek Instrument ELx800, ABD
- Flouresans ataşmanlı mikroskop, Nikon Eclips E600, Japonya
- Hava akım kabini, Cytobaby CB1204, Danimarka
- Işık mikroskobu, Leica DM500, Almanya
- İnvert mikroskop, Olympos CK40, Japonya
- Normal human serum (NHS)
- Otomatik mikropipet (10, 100, 1000 µl skalasında), Costar, İtalya
- Otomatik mikropipet (10,100 ve 1000 µl skalasında), Eppendorf, ABD
- Santrifüj, Harrier 15/80, İngiltere
- pH metre, Orion 420A, ABD
- Vorteks, Dragon Laboratory, Çin

3.2 Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

- Alendronat Sodyum Trihidrat, A4978, Sigma-Aldrich, ABD
- Aseton, 5704, Merck, Almanya
- Besiyeri, DMEM-F12, F0455, Biochrom, Almanya
- BSA Sığır serum albumini, A3174, Sigma-Aldrich, İsviçre
- Etidyum Bromür, 160539, Sigma-Aldrich, ABD
- Fetal Bovin serum, S0215, Biochrom, Almanya
- HCl, H1758, Sigma-Aldrich, ABD
- İyodin, Batticon Antiseptik Solüsyon, Türkiye
- Kloroheksidin diglukonat, Listerine Advanced Antiseptic Mouthwash, ABD
- L-Glutamin, K0282, Biochrom, Almanya
- MTT 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide; M5655, Sigma-Aldrich, ABD
- Pamidronat disodyum Trihidrat, P2371, Sigma-Aldrich, ABD
- PAP pen, 71310, Zymed Laboratories, ABD
- Penisilin-streptomisin-neomisin karışımı, A2212, Biochrom, Almanya

• Primer Antikor

- Anti- vimentin, clone vim3B4 Monoclonal Mouse, M7020, Dako, Danimarka
- Anti- caspase 3, Ab-3 (3CSP03) Monoclonal Mouse, 1123R908A, Thermo Scientific, ABD
- Anti- Ki-67, RM-9106-R7,9106R1003A, Thermo Scientific, ABD

• Sekonder Antikor

- Polyclonal Rabbit Anti- Mouse Immunoglobins FITC, F0313, Dako, Danimarka
- Polyclonal Mouse Anti- Rabbit Immunoglobins FITC, F0232, Dako, Danimarka
- Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 106346, Merck, Almanya
- Disodium hydrogen phosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 106342, Merck, Almanya
- Sodium chloride (NaCl), 109889, Merck, Almanya
- Sodium dodesil sülfat (SDS), 239313, Sigma-Aldrich, ABD
- Stok PBS (Fosfat tampon stok solüsyonu)
- PBS (Fosfat tampon solüsyonu)
- PBS-BSA (Fosfat tampon solüsyonu- %2,5 sığır serum albumini (PBS-BSA) karışımı)
- Tip I Kolejenaz, C1-28, Biochrome, Almanya
- Tripsin-EDTA çözeltisi % 0,05, L2143, Biochrom, Almanya
- Tripan mavisi, T8154, Sigma-Aldrich, ABD

3.3 Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması:

3.3.1 Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) Hazırlanması

Solüsyon I :

Sodium dihydrogen phosphate monohydrat	13.7 gr
NaCl	87.66 gr
Distile su	1000 ml

Solüsyon II :

Disodyum hidrojen phosphate dihydrate	71.2 gr
NaCl	350.64 gr
Distile su	4000 ml

Stok solüsyonu:

Hazırlanan solüsyon I ve solüsyon II ayrı ayrı süzildükten sonra 4000 ml. solüsyon II + 500 ml. solüsyon I karıştırıldı. Bir pH metre yardımı ile gerekirse solüsyon I eklenerek stok solüsyonun pH'sı 6,9'a ayarlandı.

Kullanma solüsyonu:

Stok solüsyonu 1/10 oranında distile su ile sulandırıldı. Yine aynı şekilde gerekirse solüsyon I eklenerek kullanma solüsyonun pH'sı 7,4 olarak ayarlandı.

3.3.2 Fosfat Tampon Solüsyonu-Sığır Serum Albumini (PBS-BSA)**Hazırlanması:**

Hazırlanan fosfat tampon solüsyonu (PBS) içine 1/40 oranında %30'luk BSA steril bir enjektörle eklenerek hazırlandı.

3.3.3 İlaçların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Alendronat Sodyum Trihidrat: $C_4H_{12}NaNO_7P_2 \cdot 3 H_2O$

Alendronat Sodyum Trihidrat'ın molekül ağırlığı: 325,02 g

Suda çözünürlüğü: 10 mg/ml

3,25 gram Alendronat Sodyum hassas terazide tartılarak 1 ml distile suda çözüldü. Bu yolla 10^{-2} M stok çözelti elde edildi. Stok solüsyon steril distile su ile seyreltilerek 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} M'lık çözeltiler elde edildi.

Pamidronat disodyum tuz hidrat: $C_3H_9NO_7P_2Na_2 \cdot xH_2O$

Pamidronat disodyum tuz hidrat'ın molekül ağırlığı: 279,03g

Suda çözünürlüğü: 28 mg/ml

2,8 mg apmidronat disodyum tuz hidrat hassas terazide tartılarak 1 ml suda çözülerek 10^{-1} M stok çözelti elde edildi. Stok solüsyon steril distile su ile seyreltilerek 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} M'lık çözeltiler elde edildi.

3.4 Hastalar

Çalışma kapsamına 20-30 yaş arası, sigara, alkol ve herhangi bir ilaç kullanmayan, sağlıklı, 3 erkek, 3 kadın, toplam 6 hasta dahil edildi. Hastaların tümü çalışma konusunda bilgilendirildi ve aydınlatılmış onam formunu okuyarak imzaladı.

3.5 Primer Fibroblast Kültürü

3.5.1 Primer Fibroblast Eldesi

Ortodontik tedavi amaçlı gömülü dişlerin yüzeyine braket yapıştırılması gereken durumlarda, gömülü dişin üzerindeki dişeti kesilerek çıkarılmaktadır ve bu işlem kapişon izolesi olarak adlandırılmaktadır. Uygulama yapılacak olan primer fibroblastlar kapişon izolesi uygulanan hastalardan elde edildi. Hastalara kloroheksidin diglukonat ve iyodin ile ağız gargarası yaptırıldı. Sterilizasyon ve aseptiye özen gösterilerek rutin kapişon izolesi uygulaması yapıldı. Elde edilen tam kalınlıktaki dişeti örnekleri kod numarası verilerek anonimize edildi. Dişeti örnekleri transport medyum (3 ml DMEM-F12 içerisine 1 damla penisilin-streptomisin-neomisin karışımı) içerisine alınarak laboratuvara ulaştırıldı.

Laboratuvara ulaştırılan örnekler, hava akım kabininde, 3 cm çapında steril petri kutuları içerisinde bistüri ile mekanik olarak parçalandı. Bu parçalar daha sonra enzimatik parçalama için Tip I kollajenaz (5 mg/10 ml DMEM-F12) içerisinde 37°C 'lık inkübatörde 60 dk bekletildi. Süre sonunda doku ve kollajenaz karışımı steril bir tüpe alınarak 500 g'de, 9 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Elde edilen çökeltiye, 3 ml hücre kültürü besiyeri (%10 FBS, %2 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin karışımı içerecek şekilde hazırlanmış $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen DMEM-F12) eklenerek 25 cm^2 'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Kültür kapları %5 CO_2 ve %95 nem içeren 37°C 'lık inkübatöre kaldırıldı. Hücre gelişimi invert mikroskop ile takip edilerek 2-3 günde bir besiyeri değiştirildi. Ekim sonrası 7 ile 10 gün arasında hücrelerin kültür kaplarına yapışmaya başladığı gözlemlendi (97).

3.5.2 Primer Fibroblastların Pasajı

Hücrelerin kültür kabının %80'ini kapladığı invert mikroskop ile belirlendikten sonra, kültür kaplarındaki besi yerleri hava akım kabini içerisinde steril pipet aracılığıyla alındı ve kaplara 2 ml %0,05'lik Tripsin-EDTA karışımı eklendi. Kültür kapları 37⁰C'lık inkübatörde 8-10 dk bekletilerek yapışmış hücrelerin ayrılması sağlandı. Steril tüplere alınan tripsin-EDTA, hücre karışımı üzerine toplam hacim kadar DMEM-F12 besi yeri eklendi. Tüp içeriğinin iyice karışması sağlandı ve 500 g'de, 9 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Elde edilen çökeltiliye, 3 ml hücre kültürü besi yeri eklenerek tekrar 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Bu, hücrelerin 1. pasajı olarak etiketlendi. Tüm örneklerden 4 kez pasaj yapılarak, yaklaşık 15 günlük süre sonucunda deneyler için yeterli hücre sayısına ulaşıldı. Tüm hastalarda 4. pasaj sonunda elde edilen hücreler deneysel çalışmalarda kullanıldı.

3.6 Hücre Sayısının ve Canlılığının Belirlenmesi

Hücre sayıları Thoma lamı ile sayılarak belirlendi. Thoma lamının lameli kapatıldıktan sonra sayımı yapılacak sıvı bir pipet aracılığıyla lama damlatıldı. Işık mikroskopunda 10X büyütme ile alan sayıldı. Bu alandan elde edilen hücre sayısı 1 cm³'e normalize edilerek çözeltilideki toplam hücre sayısına ulaşıldı.

Hücre canlılığı hücrelerin tripan mavisini alma testi ile belirlendi. Hücre süspansiyonu 9/1 oranında tripan mavisi boyası ile karıştırılarak Thoma lamına bir pipet aracılığıyla damlatıldı. Koyu mavi boyanan hücreler, zar geçirgenliğinin bozulması sebebiyle boyayı içerisine alan ölü hücreler olarak değerlendirildi. Hücre canlılığı %98'in üzerinde olan kültürler çalışma kapsamına dahil edildi.

3.7 MTT Yöntemi ile Hücre Kültürlerinde Uygulanacak İlaç Konsantrasyonunun Belirlenmesi

MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide] testi kimyasalların hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Temel olarak bu yöntem ile hücre canlılığının ve proliferasyonunun uygulanan kimyasal ajan konsantrasyonuna bağlı

değişimi değerlendirilir. Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT, yaşayan hücrelerin mitokondriyon enzimleri ile indirgenmekte ve reaksiyon sonucunda suda çözünmeyen mor renkli kristaller oluşmaktadır. Bu kristallerin organik çözücüler (SDS, DMSO, izopropanol gibi) eklenerek çözünmesiyle oluşan renk 540 nm dalga boyunda optikal yoğunluğun ölçülmesiyle kantite edilir. MTT testinde sitotoksosite arttıkça formazan oluşumu azalmakta, renk açılmakta yani ölçülen optik yoğunluk da azalmaktadır. Hücre proliferasyonunun konsantrasyona bağlı eğrisinden hücrelerin %50'sinin canlı olduğu konsantrasyon (IC_{50}) hesaplanır.

3.7.1 MTT Yönteminin Uygulanışı

Kültürlere uygulanacak ilaç konsantrasyonu bu çalışmaya özgü olarak 48 ve 72 saat için ayrı ayrı belirlendi. Bunun için; 96 kuyucuklu ELISA plağının ilk sütununu oluşturan kuyucuklara 150'şer μ l hücre kültürü besi yeri eklendi. Bu sütun, besi yeri kontrolü olarak kullanıldı. İkinci sütuna 100 μ l hücre kültürü besi yeri içinde hücre süspansiyonu eklendi. Bu kolon, hücre kültürü kontrolü olarak kullanıldı. Üçüncü sütuna, içerisinde test edilecek ilaç konsantrasyonunun 1.5 katı olacak şekilde (her iki ilaç içinde 1.5×10^{-4} M) ilaç içeren 200 μ l hücre kültürü besi yeri eklendi. Kalan 4 ile 12. sütunlar arasına ise sadece 100 μ l hücre kültürü besi yeri eklendi. Üçüncü kolona eklenen ilaçlar 100 μ l olacak şekilde yatay düzlemde seri dilüsyona tabi tutuldu. Daha sonra besi yeri kontrolü hariç tüm kuyucuklara, kuyucuk başına en az 10 000 hücre içerecek şekilde 50 μ l hücre kültürü besi yeri eklendi. Süre bağımlı toksik ilaç konsantrasyonunu belirlemek üzere 48 ve 72 saatlik uygulama grupları oluşturuldu (Resim 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4). İzleyen 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonunda her kuyucuğa 20 μ l MTT (5 mg/1 ml distile su) eklendi. MTT ile 4 saatlik inkübasyon sonrasında tüm kuyucuklara 100 μ l %10'luk SDS (50 g SDS + 5 ml 1 N HCl + 500 ml distile su) eklendi. Bir gece inkübasyonun ardından plaklar ELISA okuyucuda 540 nm dalga boyunda okundu. Hücre çoğalmasını %50 oranında engelleyen inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) doz bağımlı çoğalma grafiğinin logaritmik eğim çizgi denklemi aracılığıyla hesaplandı. Hesaplama sonrasında her iki ilaç için de sitotoksik etkinin 10^{-4} M ile 10^{-7} M arasında olduğu belirlendi. İlaç etkilerini değerlendirmek için kültürlere bu konsantrasyon aralığında ilaç uygulanması karar verildi.

IC₅₀ değerine bağlı olarak çalışmada uygulanacak ilaç konsantrasyonları:

Alendronat için: 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ ve 10⁻⁷ M

Pamidronat için: 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ ve 10⁻⁷ M olarak belirlendi.



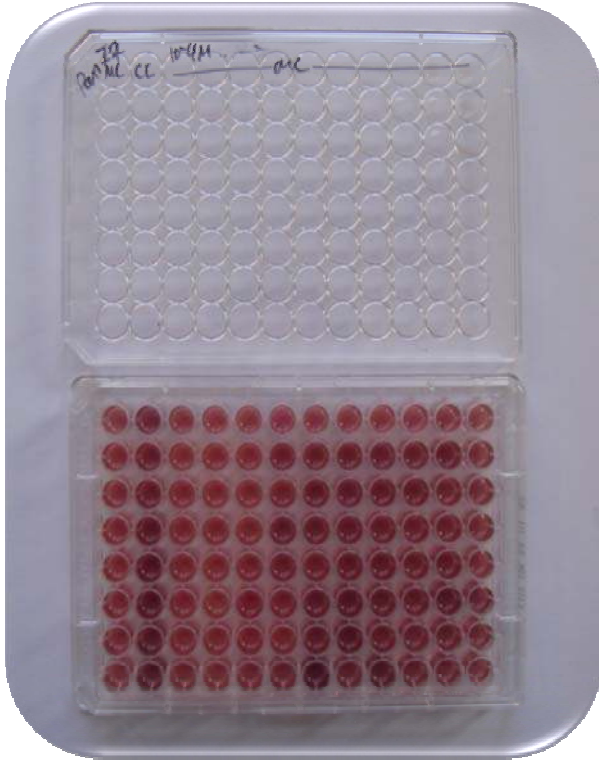
Resim 3.1: Alendronat grubu, 48. saat MTT sonuçları.



Resim 3.2: Pamidronat grubu, 48. saat MTT sonuçları.



Resim 3.3: Alendronat grubu 72. saat MTT sonuçları.



Resim 3.4: Pamidronat grubu 72. Saat MTT sonuçları.

3.8 İlaçların Uygulanması

Dördüncü pasaj sonrası elde edilen hücreler etilen oksit ile steril edilmiş lamelli altı kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Her bir kuyucukta yaklaşık 500 000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Kuyucukların her birinde 2 ml hücre kültürü besi yeri eklendi. Hücrelerin lamellere yapışabilmesi ve bölünme fazına geçebilmesi için kültür kapları 48 saat, 37⁰ C’de hücre kültürü koşullarında inkübe edildi (Resim 3.5).



Resim 3.5: Lamel ve medyum yerleştirilmiş altılı flask örneği.

Kültür kapları 48 saat sonunda invert mikroskop ile incelenerek hücrelerin lamellere yapışma ve yüzeyi kaplama özellikleri kontrol edildi. Çalışma kapsamına alınan kültür kaplarının hiç birisinde 48 saat sonunda çalışmayı başlatmayı engelleyecek bir olumsuzluk görülmedi.

Daha önce yapılan çalışmalarda bisfosfonatların sitotoksik etkilerini değerlendirmek üzere 6, 12, 24 saatlik uygulamalar yapıldığı literatür bilgisinde mevcuttu. Çalışmamızda bu uygulama sürelerine ek olarak 48 ve 72 saat sonrası etkileri gözlemlendi.

Her bir hastadan elde edilen ve yeteri sayıda 6'lı kültür kabına bölünen fibroblastlara son konsantrasyonları $10^{-4}M$, $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ ve $10^{-7}M$ olacak şekilde pamidronat ve alendronat uygulandı. Bunun için 6'lı kültür kabındaki hücre kültür besiyerleri alınarak yeniden taze 2 ml besiyeri eklendi. Bu kuyucuklarda istenen son ilaç konsantrasyonlarına ulaşmak için tablo 3.1'de belirtilen şekilde ilaçlar eklendi. Aynı zamanda her bir hastanın ilaç uygulanmamış fibroblastları, belirtilen sürelerde kültüre edilerek kontrol grubu oluşturuldu.

Tablo 3.1: Alendronat ve pamidronat için hazırlanan stok solüsyon konsantrasyonları, uygulanmak istenen son konsantrasyonlar, kültüre eklenen solüsyon hacmi ve kültürdeki toplam sıvı miktarının hacmi gösterilmektedir.

Ulaşılmak istenen son konsantrasyon	Stok solüsyonunun konsantrasyonu	Eklenen hacim	Kültür kabının son hacmi
10^{-4} M	10^{-2} M	2 μ l	2 ml
10^{-5} M	10^{-3} M	2 μ l	2 ml
10^{-6} M	10^{-4} M	2 μ l	2 ml
10^{-7} M	10^{-5} M	2 μ l	2 ml

Her bir konsantrasyon için 6, 12, 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübasyon gerçekleştirildi. Belirtilen süre sonunda fibroblastların yapışmış olduğu lameller alınarak kuruması için bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Bu lameller daha sonra immunohistokimyasal boyamalarda kullanıldı.

3.9 İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

3.9.1 Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada her bir konsantrasyon için 6, 12, 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübasyonu yapılan fibroblast hücre kültüründe belirtilen süre sonunda hücrelerin yapışmış olduğu lameller alınarak bir gece $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi.

3.9.2 İndirekt İmmüno Floresan Boyama Yöntemi

Hazırlanan lameller Kaymaz ve ark. tarafından kullanılan indirekt immüno floresan boyama tekniğine uygun olarak aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanarak gerçekleştirildi (98).

- Lameller, moleküler sieve eklenerek suyu alınmış saf asetonda, oda ısısında 10 dakika tespit edildi.
- Fikse edilmiş lameller 30 dakika kurutulduktan sonra lamellerin üzerinde PAP pen ile sınırlandırılan 4 ayrı alan oluşturuldu. 1. Alan: anti- vimentin, 2. Alan: anti- kaspaz 3, 3. Alan: anti Ki-67, 4. Alan: negatif kontrol alanı olarak belirlendi.
- Çalışmada anti-vimentin, anti-kaspaz 3, anti- Ki-67 pimer antikorları kullanıldı. Bu antikorlar önerilen oranlarda (ör.1/100) PBS-BSA karışımı ile sulandırılarak lameller üzerinde PAP pen’le çevrelenen belirlenmiş alanlara damlatıldı ve nem odasında (üzeri kapakla kapatılmış, ıslatılmış gazlı bez içeren nemli küvet) 1 saat süreyle oda ısısında inkübe edildi. Negatif kontrol boyaması için kullanılan 4. alan için primer antikor basamağı atlandı (antikor içermeyen PBS/BSA solüsyonu damlatıldı) ve bunu izleyen basamaklar aynen uygulandı.
- Lameller PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı.
- 1. alan (anti-vimentin) ve 2. alana (anti-kaspaz 3) 1/50 oranında “Polyclonal Rabbit Anti- Mouse Immunoglobulin”i ve 1/100 oranında normal insan serumu eklenmiş PBS- BSA solüsyonu; 3. ve 4. alana (anti-Ki-67) 1/40 oranında “Polyclonal Mouse Anti- Rabbit Immunoglobulin”i ve 1/100 oranında normal insan serumu eklenmiş PBS- BSA solüsyonu damlatıldı ve 30 dakika süreyle ışıktan korunarak nem odasında bekletildi.
- Lameller PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı, ışıktan korunarak yıkandı.

- Çekirdek (zemin) boyanması için tüm alanlara birer damla distile su içinde hazırlanmış 2 µg/ml etidyum bromür solüsyonu damlatıldı.
- Lameller, lam üzerine yerleştirildi, üzerlerine 1 damla sulu kapama maddesi (*aqueous mounting medium*) eklenerek diğer bir lamelle kapatıldı ve ışıktan korunarak saklandı.

3.9.3 İmmüno Floresan Boyamasını Değerlendirme

Vimentin Tutulumu: Sitoplazmada yaygın olarak anti-vimentin reaktivitesi (FITC-ile sarı-yeşil renkte işaretlenmiş) bulunan, çekirdekleri etidyum bromidle turuncu olarak boyanmış hücreler vimentin tutulumu olan hücreler olarak kabul edildiler.

Ki-67 Tutulumu: Çekirdekte yaygın olarak anti-Ki-67 reaktivitesi (FITC-ile sarı-yeşil renkte işaretlenmiş) bulunan, çekirdek zemini etidyum bromidle turuncu olarak boyanmış hücreler Ki-67 tutulumu olan hücreler olarak kabul edildiler. Çalışmada sayım yapılırken hücrelerin Ki-67 tutulum yoğunlukları göz ardı edildi.

Kaspaz 3 Tutulumu: Sitoplazmada yaygın ya da bölgesel olarak anti-kaspaz 3 reaktivitesi (FITC-ile sarı-yeşil renkte işaretlenmiş) bulunan, çekirdek zemini etidyum bromidle turuncu olarak boyanmış hücreler kaspaz 3 tutulumu olan hücreler olarak kabul edildiler. Apoptozun varlığı ilerleyen aşamalarda çekirdekte görülen yapısal değişikliklerle (sınırlarda düzensizleşme, çekirdekte küçülme-karyoreksis ve parçalanma) desteklendi.

3.9.4 İmmunohistokimyasal Mikroskopta Hücre Sayım Yöntemi

İmmüno Floresan yöntemi kullanılarak immün boyama uygulanmış lameller floresan ataşmanlı mikroskop (Nicon Eclips E600, Japonya) ile değerlendirildi. Lamellerdeki kaspaz 3 ve Ki-67 ile işaretlenmiş alanlar X100 büyütmede iki araştırmacı tarafından kör olarak (gruplar bildirilmeden) incelendi ve her alanda yüz hücre sayılarak reaktif olan hücre sayıları belirlendi. Görüntüler Leica DMR Research Microscope-Germany mikroskobuna bağlı Leica DC 500 kamera ile alındı.

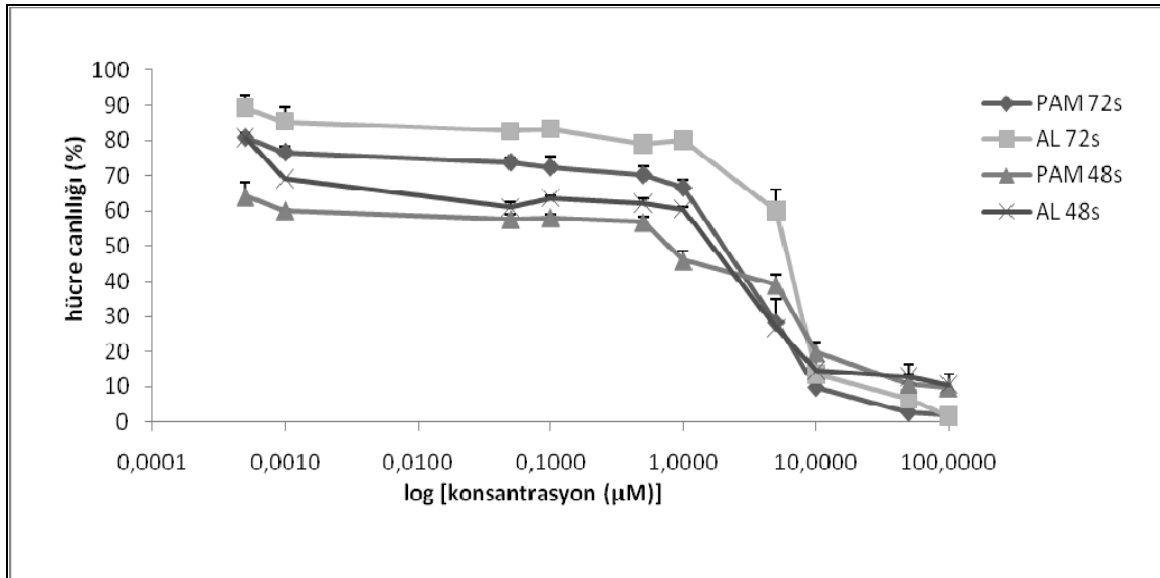
3.10 İstatistiksel Yöntem

Hiçbir kimyasal ajana maruz kalmamış kontrol grubu ile pamidronat veya alendronat uygulanmış çalışma grupları kültürlerindeki hücresel değişiklikler karşılaştırmalı olarak incelendi. Çalışmada veriler farklı sonuç grubundan birinde yer almakta olup tekrarlanan ölçümleri bulunmaktadır ve bu ölçümler birbirleri ile bağımlıdır. Bu nedenle tekrarlanan varyans analizi (*repeated measure*) uygulandı. Verilerin kaydedilmesi ve istatistiksel analizler SPSS 17 paket programı ile gerçekleştirildi. Fakat çoklu karşılaştırmaları yapılırken 1. tip hatanın 0,05 olasılığında sabit tutulması için programın menüleri yeterli olmadığı için “*syntax*” fonksiyonu kullanıldı. Küresellik varsayımı sağlanmadığı durumlarda “*Greenhouse Geisser*” serbestlik derecesi düzeltmeli istatistik yöntemi kullanılarak değerlendirme yapıldı.

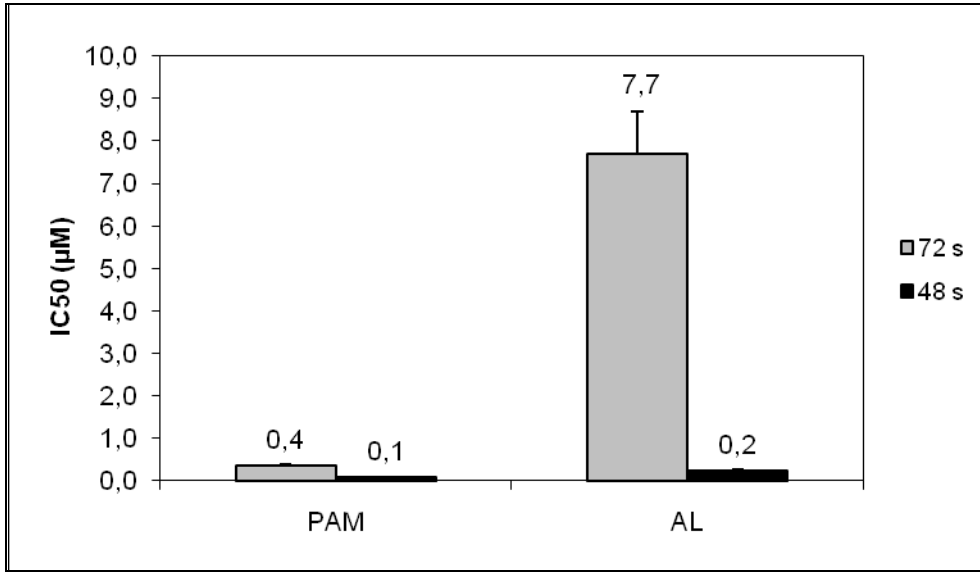
4. BULGULAR

4.1 MTT Yöntemi ile IC₅₀ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Her iki bifosfonat da uygulama konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığını 48 saat içerisinde daha fazla azalttı ancak hücre canlılıkları 72 saatlik zaman periyodunda 48 saat uygulamaya göre daha yüksekti (Şekil 4.1). Eğrilerden hesaplanan IC₅₀ değerleri de (Şekil 4.2) ilaçların ilk 48 saat içerisindeki etkinliğinin daha yüksek olduğunu göstermekteydi. Özellikle alendronatın etkinliği 72 saatlik inkübasyonda ciddi şekilde azaldı. Pamidronat alendronata göre daha yüksek sitotoksik etki gösterdi. Tüm uygulamalarda sitotoksosite 1 µM'dan yüksek konsantrasyonlarda daha dik artış gösterdi ve 10 µM'dan yüksek konsantrasyonlarda ise hücre canlılığı %20'nin altına düştü. Tüm veriler incelendiğinde her iki ilacın da sitotoksik konsantrasyonlarının 0.1-100 µM arasında olduğu belirlendi ve hücrelere buna göre uygulandı.



Şekil 4.1: 48 ve 72 saat uygulama sonrası pamidronat ve alendronat için belirlenen doz bağımlı hücre canlılığı grafiği.



Şekil 4.2: Pamidronat ve alendronatın zamana bağımlı IC₅₀ değerleri.

4.2 Uygulanan Konsantrasyon ve Süreye Göre Elde Edilen Sonuçlar

Altı farklı bireyden elde edilen fibroblast örneklerinin her birine iki farklı ilaç için 4 farklı doz ve 5 farklı zaman süresince uygulama yapıldı. Aynı zamanda her bireyden uygulama yapılmayan kontrol grubu hazırlandı ve uygulama yapılan hücrelerde olduğu gibi histokimyasal olarak değerlendirildi. Vimentin pozitif boyanma lamel üzerindeki hücrelerin fibroblast olduğunu kontrol etmek için kullanıldı. Her bir lamelde kaspaz 3 ve Ki-67 tutulumu gösteren ve göstermeyen hücreler sayılarak skorlama yapıldı. Bu yolla immünreaktivite sayısal veri olarak değerlendirildi.

Pamidronat uygulanmış hücrelerde kaspaz 3 tutulum yüzdelerini gösteren tanıtıcı veriler Tablo 4.1'te, Ki-67 tutulum yüzdelerini gösteren tanıtıcı veriler Tablo 4.2'de, alendronat uygulanmış hücrelerde kaspaz 3 tutulum yüzdelerini gösteren tanıtıcı veriler Tablo 4.3'te, Ki-67 tutulum yüzdelerini gösteren tanıtıcı veriler Tablo 4.4'de, kontrol grubunu oluşturan hücrelerde kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum yüzdelerini gösteren tanıtıcı veriler ortalama değerleri ve standart sapmaları ile birlikte Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Pamidronat uygulaması sonrası hücrelerin kaspaz 3 skorları ve tanıtıcı istatistikler.

Süre (saat)	6				12				24				48				72			
Konsantrasyon (M)	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Örnek 1	32	18	8	0	14	12	6	6	62	60	18	8	67	20	25	9	83	79	60	27
Örnek 2	18	7	4	2	21	8	2	1	46	20	14	10	51	23	19	11	60	55	29	18
Örnek 3	21	17	13	7	19	13	10	7	38	25	14	8	49	35	21	15	55	40	32	18
Örnek 4	62	27	11	0	15	10	10	10	64	60	68	30	51	16	11	7	57	25	18	7
Örnek 5	23	21	11	9	26	31	26	24	85	80	34	16	52	45	26	7	51	42	31	20
Örnek 6	18	9	8	4	20	16	12	8	34	25	14	7	48	30	19	12	60	49	21	18
Ortalama	29.00	16.50	9.16	3.66	19.16	15.00	11.00	9.33	54.83	45.00	27.00	13.16	53	28.16	20.16	10.16	61.00	48.33	31.83	18.0
Std. Sapma	16.97	7.47	3.18	3.72	4.3	8.29	8.17	7.78	19.18	24.89	21.53	8.86	7.01	10.72	5.38	3.12	11.29	18.10	14.90	6.41

Tablo 4.2: Pamidronat uygulaması sonrası hücrelerin Ki-67 skorları ve tanıtıcı istatistikler.

Süre (saat)	6				12				24				48				72			
Konsantrasyon (M)	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Örnek 1	32	18	61	68	48	50	52	71	37	41	60	76	21	38	60	85	8	10	11	29
Örnek 2	26	23	43	62	33	37	46	51	18	23	38	60	16	28	32	48	11	15	43	48
Örnek 3	25	35	58	67	23	29	37	43	20	24	36	40	18	27	38	41	15	22	30	34
Örnek 4	85	60	64	77	39	42	50	62	30	44	51	85	20	45	52	70	30	37	45	47
Örnek 5	28	39	64	62	30	52	70	66	33	48	40	49	45	47	76	78	10	29	32	40
Örnek 6	24	27	30	51	29	39	59	62	26	29	46	58	20	19	24	31	11	19	24	30
Ortalama	36.6	33.66	53.33	64.50	33.66	41.50	52.33	63.33	27.33	34.83	45.16	61.33	23.33	34.00	47.00	58.83	14.16	22.00	30.83	38.00
Std. Sapma	23.84	15.01	13.85	8.59	8.75	8.54	11.29	2.30	7.42	10.83	9.13	16.70	10.76	11.09	19.33	21.84	8.08	9.75	12.57	8.31

Tablo 4.3: Alendronat uygulaması sonrası hücrelerin kaspaz 3 skorları ve tanıtıcı istatistikler.

Süre (saat)	6				12				24				48				72			
Konsantrasyon (M)	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Örnek 1	30	26	15	2	5	6	4	1	26	13	2	1	18	15	6	1	52	27	1	1
Örnek 2	17	10	5	3	20	18	10	2	24	15	11	8	20	19	11	9	42	29	16	10
Örnek 3	12	9	6	6	16	10	8	5	25	14	11	7	29	17	13	10	35	28	21	12
Örnek 4	16	14	6	5	19	11	5	3	16	12	5	2	60	49	15	3	57	47	5	1
Örnek 5	14	12	8	0	12	8	6	2	18	13	7	8	60	35	10	5	77	35	12	10
Örnek 6	16	11	6	3	21	15	7	4	28	23	12	6	32	30	11	7	38	28	17	10
Ortalama	17.50	13.66	7.66	3.16	15.50	11.33	6.66	2.83	22.83	15.00	8.00	5.33	36.50	27.50	11.00	5.83	50.16	32.33	12.00	7.33
Std. Sapma	6.37	6.28	3.72	2.13	6.09	4.45	2.16	1.47	4.75	4.04	4.00	3.07	18.94	13.14	3.03	3.48	15.58	7.73	7.64	4.96

Tablo 4.4: Alendronat uygulaması sonrası hücrelerin Ki-67 skorları ve tanıtıcı istatistikler.

Süre (saat)	6				12				24				48				72			
Konsantrasyon (M)	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Örnek 1	17	27	38	60	50	64	66	70	28	34	60	69	8	42	49	65	18	30	42	60
Örnek 2	23	21	40	53	24	28	32	49	17	25	28	43	20	23	28	40	16	20	30	34
Örnek 3	43	49	56	70	47	60	61	74	38	42	55	66	29	37	35	49	24	30	32	50
Örnek 4	49	48	59	68	40	53	61	64	42	48	65	65	29	47	67	56	35	54	64	65
Örnek 5	42	24	25	47	26	37	43	53	29	43	56	80	20	30	45	58	20	35	25	52
Örnek 6	28	36	47	59	30	35	46	57	26	30	50	58	20	27	37	42	16	20	34	41
Ortalama	33.66	34.16	44.16	59.50	36.16	46.16	51.50	61.16	30.00	37.00	52.33	63.50	21.00	34.33	43.50	51.66	21.50	31.50	37.83	50.33
Std. Sapma	12.76	12.18	12.57	8.73	11.07	14.79	13.21	9.82	8.92	8.76	12.94	12.34	7.74	9.24	13.70	9.72	7.25	12.54	13.97	11.53

Tablo 4.5: Kontrol grubu hücrelerin kaspaz 3 ve Ki-67 skorları ve tanıtıcı istatistikler.

	KASPAZ 3					Ki-67				
Süre (saat)	6	12	24	48	72	6	12	24	48	72
Örnek 1	0	1	0	4	1	89	70	70	95	71
Örnek 2	2	1	1	3	4	72	62	77	50	51
Örnek 3	3	4	7	6	8	76	60	51	47	48
Örnek 4	0	3	1	6	1	76	90	90	70	69
Örnek 5	3	5	0	2	6	75	83	55	87	60
Örnek 6	2	2	3	2	5	56	68	66	47	45
Ortalama	1.66	2.66	2.00	3.83	4.1	74	72.16	68.16	66	57.33
Std. Sapma	1.36	1.63	2.68	1.83	2.78	10.6	11.90	14.35	21.33	11.03

4.3 Çalışmada İncelenen Tüm Değişkenler Arasındaki Tekrarlanan Ölçümlü (*Greenhouse Geisser* Düzeltmeli) Varyans Analizi Sonuçları

Bu çalışmada etkileşim etkisi anlamlı çıkan değişkenlerin tek değişkenli olarak anlamlılığı olsa da değerlendirmeye alınmamış etkileşim etkisi ile etki gösterdiği değişkenler istatistiksel analize dahil edildi.

4.3.1 Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulumu İlişkisi

Kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum oranları arasındaki ilişki çalışmaya dahil edilen tüm örneklerde istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, iki farklı antikorun tutulum oranları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı (p: 0.000) bulundu (Tablo 4.6).

Apoptoz indeksi (kaspaz 3 tutulumu) yüksek olan aynı gruplara ait örneklerde proliferasyon oranı (Ki-67 tutulumu) daima düşmüş olarak bulunmuştur.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre iki farklı bifosfonat türü olan alendronat ve pamidronatın, oluşturdukları kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık (p: 0.025) vardı (Tablo 4.6). Apoptoz indeksi (kaspaz 3 tutulumu) pamidronat grubunda belirgin ölçüde daha yüksekken, proliferatif indeks (Ki-67 tutulumu) alendronat grubunda daha yüksek bulundu.

4.3.2 Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulumu ile İlaç Konsantrasyonu İlişkisi

Alendronat ve pamidronat uygulanan grupların tüm konsantrasyonlara ait örneklerinde kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark (p: 0.000) bulunduğu belirlendi (Tablo 4.6). Genel olarak konsantrasyon arttıkça apoptoz miktarında artış ve proliferasyon miktarında düşüş gözlemlendi.

Alendronat ve pamidronatın, ilaç konsantrasyon değişimine bağlı oluşturdukları kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum oranları uygulanan beş farklı konsantrasyon için istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; aynı konsantrasyonda alendronat ve pamidronat uygulanmış örneklerin kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum oranları arasındaki farklılıklar (p: 0.046) istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4.6). Aynı konsantrasyonda alendronat

uygulanmış lamellerin Ki-67 tutulumu, pamidronat uygulanmış lamellerin ise kaspaz 3 tutulumu yüksektir.

4.3.3 Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulumu ile İlaç Muamele Süresi İlişkisi

Her iki ilaç grubu birlikte değerlendirildiğinde, kırk sekiz saat ilaç muamelesinden sonra apoptotik indekste belirgin bir artış ve yirmi dört saat ilaç muamelesinden sonra proliferasyonda düşüş gözlenirse de kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum yüzdelерinin ilaç uygulama süresine bağlı değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 4.6).

Alendronat ve pamidronat grubunda, beş farklı ilaç muamele süresinde oluşan kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum oranları değerlendirildiğinde, ilaç muamele süresinin iki grup arasında apoptotik ve proliferatif indeks açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı belirlendi (Tablo 4.6). İlaç muamele süresi değiştikçe her iki ilaç grubu için benzer apoptotik ve proliferatif indeks değişim oranları ölçüldü.

4.3.4 Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulumunun İlaç Konsantrasyonu ve İlaç Muamele Süresine Göre Değişimi

Alendronat ve pamidronat uygulanmış tüm örneklerde, ilaç uygulama süresi ve ilaç konsantrasyonu değiştikçe oluşan kaspaz 3 ve Ki-67 tutulumu değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark ($p:0.000$) bulundu (Tablo 4.6). Artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte ilacın muamele süresi uzadıkça kaspaz 3 tutulumunda önemli artış olduğu belirlendi. İlaç konsantrasyonu ve ilaç muamele süresi azaldıkça Ki-67 tutulum oranı artışıyla birlikte proliferatif indekste önemli artış bulundu.

Alendronat ve pamidronat gruplarının verileri birbirine paraleldir. Fakat iki ilacın verileri birbirinden ayrılmadan tüm veriler genel olarak değerlendirildiğinde bifosfonatların ilaç muamele süresi uzadıkça ve konsantrasyon arttıkça istatistiksel olarak anlamlı ($p:0.000$) şekilde toksik etkiler oluşturduğu belirlendi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Çalışmada incelenen tüm değişkenler arasındaki tekrarlanan ölçümlü varyans analizi tablosu (*Greenhouse Geisser* Düzeltmeli).

Değişkenler	F	Sig. (p)
Antikor tutulum değerleri (kaspaz 3/Ki-67)	110.099	0.000*
Bifosfonat ve antikor tutulumu etkileşimi	12.134	0.025*
Antikor tutulumu ve doz etkileşimi	129.733	0.000*
Bifosfonat ve doz etkileşimi	8.134	0.046*
Antikor tutulumu ve zaman etkileşimi	35.265	0.126
Bifosfonat ve zaman etkileşimi	.653	0.716
Zaman ve doz etkileşimi	3.798	0.000*
Antikor tutulumu-zaman ve doz etkileşimi	4.576	0.000*

*p<0.05

4.4 Tahmini Marjinal Ortalama İstatistik Verileri

4.4.1 Pamidronat ve Alendronat Grubu İçin Tahmini Marjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulum Veriler

Pamidronat grubunda kaspaz 3 antikoru tutulum yüzdesi genel ortalaması $21.513 \pm 1,74$, Ki-67 antikoru tutulum yüzdesi genel ortalaması $45.973 \pm 3,540$ olarak; Alendronat grubunda kaspaz 3 tutulum yüzdesi genel ortalaması $13,060 \pm 0,431$, Ki-67 tutulum yüzdesi genel ortalaması ise $47,147 \pm 3,603$ olarak bulundu (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Farklı iki bifosfonat türüne göre, kaspaz 3 ve Ki-67 antikorunun tutulumuna ait tanıtıcı istatistikler.

Bifosfonat	Antikor	Ortalama	Std. Hata	Güven Aralığı (% 95)	
				Alt sınır	Üst Sınır
Pamidronat	Kaspaz 3	21.513	1.744	16.671	26.355
	Ki-67	45.973	3.540	36.145	55.802
Alendronat	Kaspaz 3	13.060	.431	11.864	14.256
	Ki-67	47.147	3.603	37.144	57.150

4.4.2 Çalışma Genelinde Değişen İlaç Konsantrasyonuna Bağlı Tahmini Marjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulum Verileri

Pamidronat, alendronat ve kontrol gruplarını birbirinden ayırmaksızın, çalışmada değerlendirilen tüm örneklerin doza bağlı değişen kaspaz 3 ve Ki-67 antikor tutulum oranlarına bakıldığında, kaspaz 3 tutulum oranının çalışma genelinde en yüksek görüldüğü oran 10^{-4} M konsantrasyonda 35.950 ± 2.186 iken Ki-67 tutulum oranı ise en yüksek olarak hiç ilaç uygulanmadığında 67.533 ± 4.751 olarak hesaplandı. En düşük kaspaz 3 tutulum yüzdesi hiç ilaç uygulanmadığında 2.867 ± 0.682 olarak ve en düşük Ki-67 tutulum oranı ise 10^{-4} M konsantrasyonda 27.750 ± 2.766 olarak hesaplandı (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Pamidronat ve alendronat verilerini birbirinden ayırmadan, çalışmada uygulanan beş farklı ilaç konsantrasyonundaki genel Kaspaz 3 ve Ki-67 antikor tutulumuna ait tanıtıcı istatistikler.

Antikor	Konsantrasyon (M)	Ortalama	Std. Hata	Güven Aralığı (% 95)	
				Alt Sınır	Üst Sınır
Kaspaz 3	10^{-4}	35.950	2.186	29.880	42.020
	10^{-5}	25.283	1.710	20.536	30.030
	10^{-6}	14.450	.775	12.297	16.603
	10^{-7}	7.883	.743	5.819	9.948
	Kontrol	2.867	.682	.975	4.759
Ki-67	10^{-4}	27.750	2.766	20.069	35.431
	10^{-5}	34.917	3.398	25.483	44.350
	10^{-6}	45.800	3.303	36.630	54.970
	10^{-7}	56.800	3.478	47.144	66.456
	Kontrol	67.533	4.751	54.341	80.725

4.4.3 Pamidronat ve Alendronat Grupları İçin İlaç Konsantrasyonlarına Göre Tahmini Marjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulum Verileri

Pamidronat ve alendronat grubunda doza bağımlı kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum oranları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, pamidronat grubunda en yüksek kaspaz 3 tutulumu oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 43.400 ± 3.160 olarak; en yüksek Ki-67 tutulum oranı ise 10^{-7} M konsantrasyonda 56.367 ± 4.336 olarak belirlendi. Alendronat grubunda ise en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı pamidronat bulgularına paralel şekilde 10^{-4} M konsantrasyonda 28.500 ± 1.428 ve en yüksek Ki-67 tutulumu ise 10^{-7} M konsantrasyonda 57.233 ± 3.723 olarak belirlendi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9 Pamidronat ve alendronatın uygulandıkları doza göre oluşan antikör tutulumuna ait tanıtıcı istatistikler.

Bifosfonat	Antikör	Konsantrasyon (M)	Ortalama	Std. Hata	Güven Aralığı (% 95)	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Pamidronat	Kaspaz 3	10^{-4}	43.400	3.160	34.627	52.173
		10^{-5}	30.600	3.673	20.401	40.799
		10^{-6}	19.833	2.181	13.777	25.890
		10^{-7}	10.867	.912	8.336	13.398
		Kontrol	2.867	.682	.975	4.759
	Ki-67	10^{-4}	27.033	3.100	18.427	35.639
		10^{-5}	33.200	3.109	24.568	41.832
		10^{-6}	45.733	3.353	36.423	55.044
		10^{-7}	56.367	4.366	44.244	68.490
		Kontrol	67.533	4.751	54.341	80.725
Alendronat	Kaspaz 3	10^{-4}	28.500	1.428	24.536	32.464
		10^{-5}	19.967	1.016	17.146	22.787
		10^{-6}	9.067	1.070	6.096	12.037
		10^{-7}	4.900	1.130	1.763	8.037
		Kontrol	2.867	.682	.975	4.759
	Ki-67	10^{-4}	28.467	3.323	19.240	37.694
		10^{-5}	36.633	4.375	24.487	48.779
		10^{-6}	45.867	4.826	32.469	59.264
		10^{-7}	57.233	3.723	46.898	67.569
		Kontrol	67.533	4.751	54.341	80.725

4.4.4 Çalışma Genelinde İlaç Konsantrasyonu ve İlaç Muamele Süresine Göre Değişen Tahmini Marjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulum Verileri

Çalışma genelinde pamidronat, alendronat ve kontrol gruplarını birbirinden ayırmadan yapılan değerlendirmede kaspaz 3 ve Ki-67 antikör tutulum oranlarının, ilaç konsantrasyonu ve aynı zamanda ilaç muamele süresine göre olan değişimleri değerlendirildi. Kaspaz 3 tutulum oranı her ilaç muamele süresi için en yüksek konsantrasyon olan 10^{-4} M’da belirlenirken, Ki-67 tutulum oranı ise her ilaç muamele süresi için hiç ilaç uygulanmamış kontrol grubunda en yüksek olarak ölçüldü (Tablo 4.10).

Altı saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı çalışma genelinde ortalama olarak 23.250 ± 4.249 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 74.00 ± 4.143 olarak hesaplandı. Oniki saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı çalışma genelinde ortalama olarak 17.333 ± 1.718 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 72.167 ± 3.586 olarak hesaplandı. Yirmi dört saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı çalışma genelinde ortalama olarak 38.833 ± 3.502 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 68.167 ± 6.464 olarak hesaplandı. Kırk sekiz saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı çalışma genelinde ortalama olarak 44.750 ± 2.814 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 66.000 ± 9.687 olarak hesaplandı. Yetmiş iki saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı çalışma genelinde ortalama olarak 55.583 ± 4.001 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 57.333 ± 5.028 olarak hesaplandı (Tablo4.10).

Tablo 4.10 Alendronat, pamidronat ve kontrol grubu verilerinin birbirinden ayırmadan çalışmadaki tüm örneklerin kaspaz 3 ve Ki-67 antikor tutulumunun, doz ve zaman değişkenlerine göre tanıtıcı istatistikleri.

Süre (Saat)	Konsantrasyon (M)	Kaspaz 3				Ki-67			
		Ortalama	Std. Hata	Güven Aralığı (% 95)		Ortalama	Std. Hata	Güven Aralığı (% 95)	
				Alt Sınır	Üst Sınır			Alt Sınır	Üst Sınır
6	10^{-4}	23.250	4.249	11.452	35.048	35.167	6.419	17.345	52.988
	10^{-5}	15.083	2.506	8.127	22.040	33.917	4.990	20.061	47.772
	10^{-6}	8.417	1.102	5.356	11.477	48.750	4.107	37.347	60.153
	10^{-7}	3.417	.870	1.001	5.832	62.000	3.362	52.665	71.335
	Kontrol	1.667	.624	-.065	3.398	74.000	4.143	62.496	85.504
12	10^{-4}	17.333	1.718	12.564	22.103	34.917	3.522	25.139	44.695
	10^{-5}	13.167	1.426	9.206	17.127	43.833	3.866	33.100	54.567
	10^{-6}	8.833	1.417	4.900	12.767	51.917	2.949	43.730	60.103
	10^{-7}	6.083	1.302	2.469	9.697	60.167	3.030	51.754	68.579
	Kontrol	2.667	.667	.816	4.518	72.167	3.586	62.210	82.124
24	10^{-4}	38.833	3.502	29.110	48.556	28.667	2.686	21.209	36.125
	10^{-5}	30.000	4.432	17.694	42.306	35.917	3.358	26.593	45.241
	10^{-6}	17.500	3.490	7.810	27.190	48.750	4.242	36.973	60.527
	10^{-7}	9.250	1.528	5.009	13.491	62.417	4.192	50.779	74.054
	Kontrol	2.000	1.179	-1.272	5.272	68.167	6.464	50.221	86.112
48	10^{-4}	44.750	2.814	36.938	52.562	22.167	2.248	15.924	28.409
	10^{-5}	27.833	1.944	22.437	33.230	34.167	3.983	23.109	45.224
	10^{-6}	15.583	.786	13.401	17.766	45.250	6.133	28.221	62.279
	10^{-7}	8.000	1.296	4.401	11.599	55.250	7.053	35.668	74.832
	Kontrol	3.833	.799	1.614	6.053	66.000	9.687	39.105	92.895
72	10^{-4}	55.583	4.001	44.475	66.692	17.833	3.223	8.884	26.782
	10^{-5}	40.333	2.785	32.601	48.066	26.750	3.960	15.756	37.744
	10^{-6}	21.917	1.895	16.656	27.177	34.333	4.529	21.758	46.908
	10^{-7}	12.667	1.764	7.769	17.564	44.167	3.005	35.824	52.509
	Kontrol	4.167	1.269	.643	7.691	57.333	5.028	43.374	71.292

4.4.5 Pamidronat ve Alendronat Grupları İçin İlaç Konsantrasyonu ve Muamele Süresine Göre Değişen Tahmini Marjinal Ortalama Kaspaz 3 ve Ki-67 Tutulum Verileri

Pamidronat ve alendronat ilaç grupları için ayrı ayrı, ilaç dozu ve muamele süresine göre değişen kaspaz 3 ve Ki-67 antikör tutulum oranlarına bakıldığında, her iki ilaç grubunda da en yüksek kaspaz 3 tutulum oranlarının 10^{-4} M ilaç konsantrasyonunda olduğu; en yüksek Ki-67 tutulum oranlarının 10^{-7} M ilaç konsantrasyonunda olduğu görüldü (Tablo 4.11).

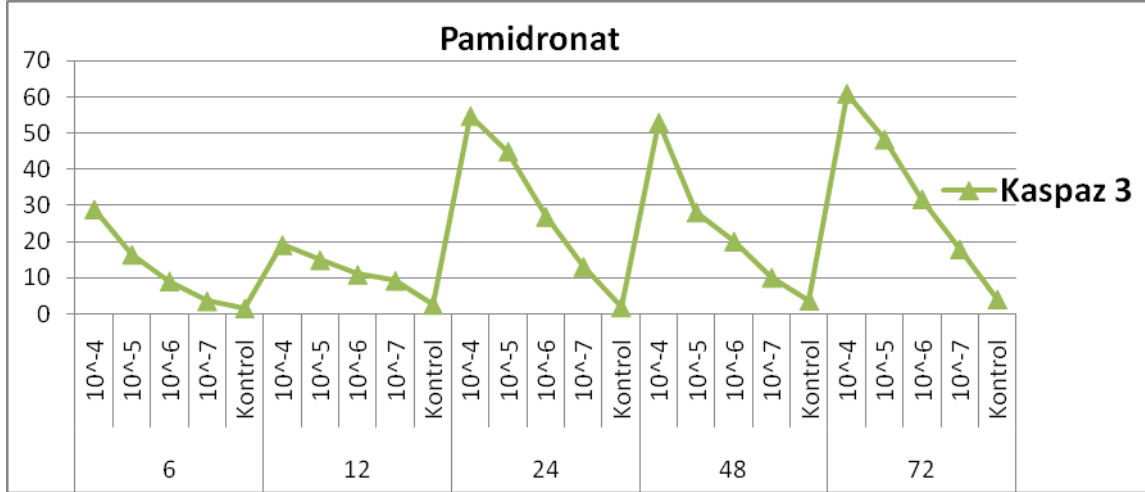
Pamidronat ve alendronat grubunda her ikisinde de altı saatlik ilaç muamele süresinde oluşan kaspaz 3 tutulumunun, on iki saatlik ilaç muamelesi sonucu oluşan kaspaz 3 tutulumundan daha yüksek olduğu görüldü. Pamidronat grubunda yirmi dört saat ilaç muamele süresinde kaspaz 3 tutulumu belirgin ölçüde artmakta, kırk sekiz saatte yirmi dört saatle aynı kalmakta ve daha sonra artmaya devam edip yetmiş iki saatte pik yapmaktadır. Alendronat grubunda ise kaspaz 3 tutulum oranı yirmi dört saatlik ilaç muamelesi ve üzeri sürelerde orantılı olarak artmaktadır (Tablo 4.11).

Pamidronat grubunda Ki-67 tutulum oranının ilaç muamele süresine bağlı değişimi değerlendirildiğinde, altı saatlik ilaç muamelesindeki oranın on iki saatten yüksek olduğu, yirmi dört saatteki Ki-67 tutulum oranının on iki saatten yüksek fakat altı saattekinden düşük olduğu belirlendi. Kırk sekiz saatte tutulum yüzdesi düşmekte ve yetmiş iki saatte bu düşüş devam etmektedir (Tablo 4.11).

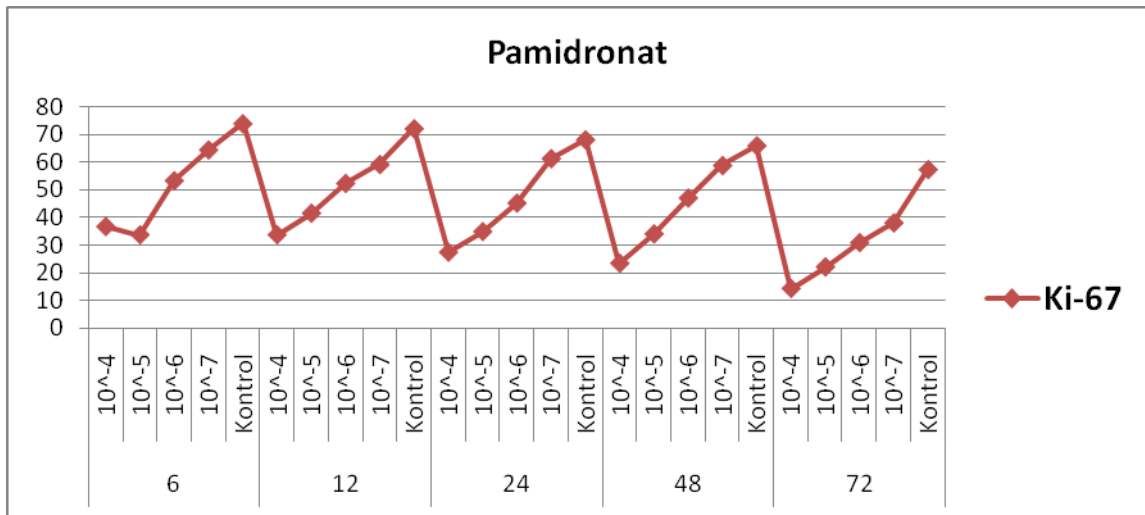
Alendronat grubunda Ki-67 tutulum oranının ilaç muamele süresine bağlı değişimi değerlendirildiğinde, yirmi dört saatteki tutulum oranı on iki saattekinden; on iki saatteki tutulum oranı da altı saattekinden daha yüksek olarak bulundu. Kırk sekiz ve yetmiş iki saatteki Ki-67 tutulum yüzdeleri ani bir düşüş göstermektedir (Tablo 4.11).

Pamidronat grubunda kaspaz 3 ve Ki-67 tutulumunun her zaman dilimi için konsantrasyona göre karşılaştırmalı incelemesinde: Altı saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 29.000 ± 2.272 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda 64.500 ± 3.880 olarak hesaplandı. On iki saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 19.167 ± 1.900 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda 59.167 ± 4.216 olarak hesaplandı. Yirmi dört saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum

oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 54.833 ± 8.197 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda 61.333 ± 7.507 olarak hesaplanmıştır. Kırk sekiz saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 53.000 ± 2.911 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda $58,833 \pm 9.954$ olarak hesaplandı. Yetmiş iki saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 61.000 ± 4.509 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda 38.000 ± 3.764 olarak hesaplandı (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4; Tablo 4.11).

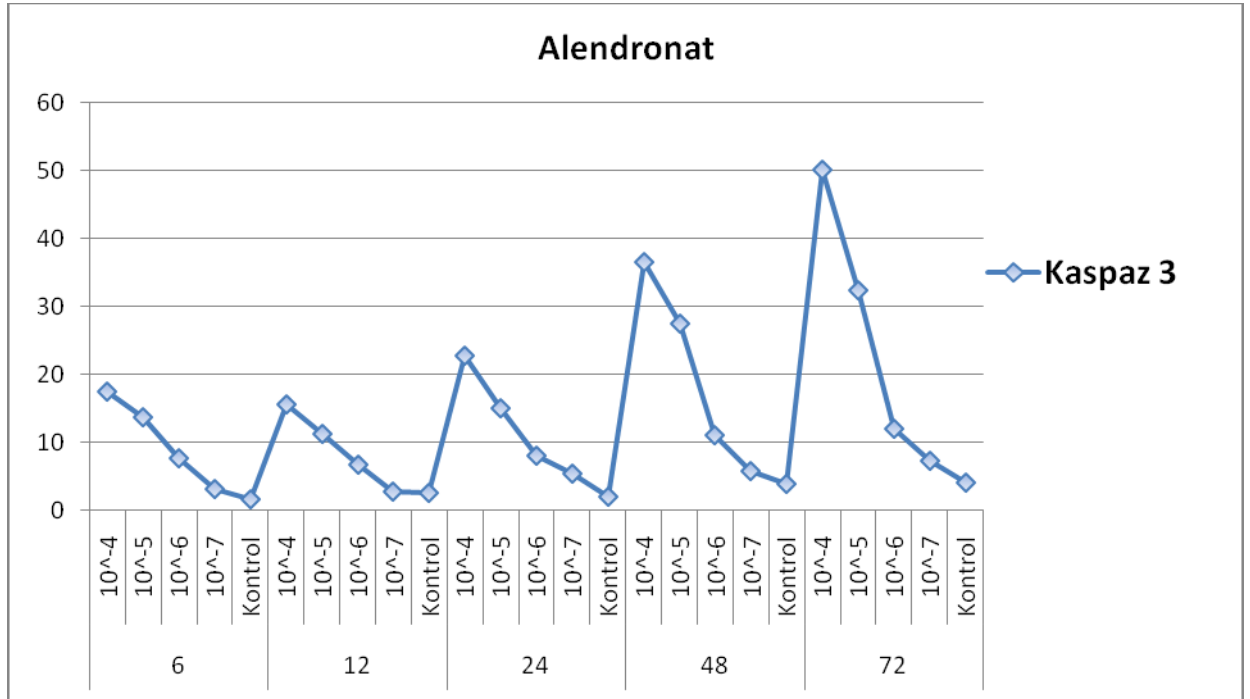


Şekil 4.3: Pamidronat grubunda ilaç konsantrasyonu ve uygulama süresine göre değişen kaspaz 3 tutulum eğrisi.

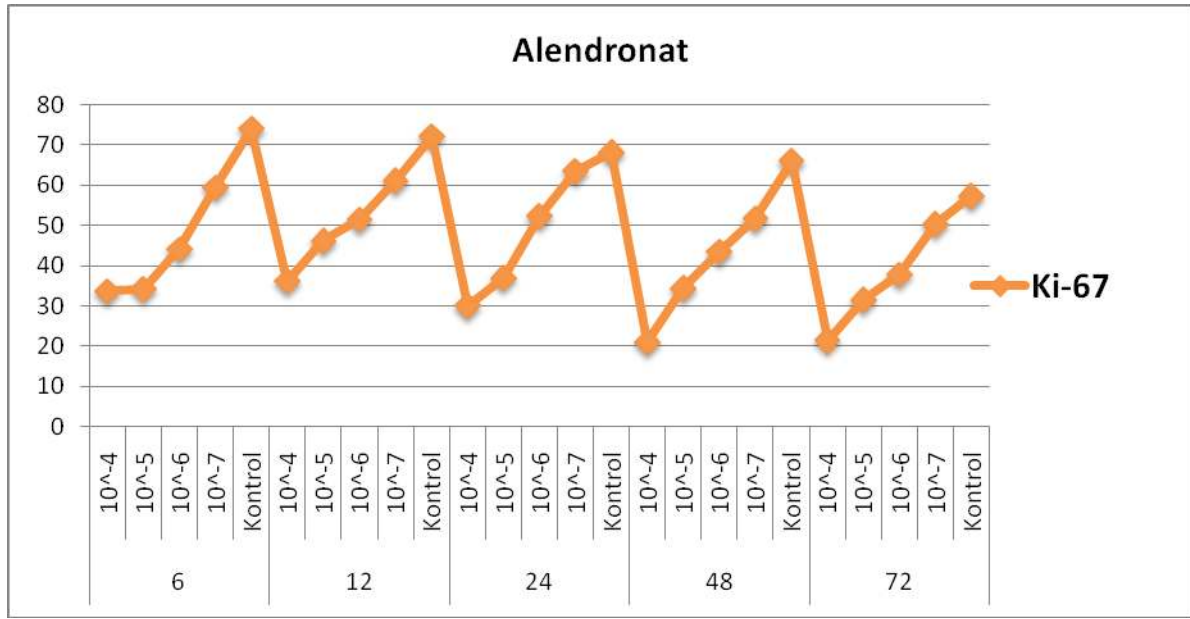


Şekil 4.4: Pamidronat grubunda ilaç konsantrasyonu ve uygulama süresine göre değişen Ki-67 tutulum eğrisi.

Alendronat grubunda kaspaz 3 ve Ki-67 tutulumunun her zaman dilimi için konsantrasyona göre karşılaştırmalı incelemesinde: Altı saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 17.500 ± 2.703 , en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda 59.500 ± 3.916 olarak hesaplandı. On iki saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 15.500 ± 2.625 olarak, en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda 61.167 ± 4.197 olarak hesaplandı. Yirmi dört saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 22.833 ± 1.878 olarak, en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda 63.500 ± 5.233 olarak hesaplandı. Kırk sekiz saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 36.500 ± 4.954 olarak, en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda 51.667 ± 4.438 olarak hesaplandı. Yetmiş iki saatlik ilaç muamelesi için en yüksek kaspaz 3 tutulum oranı 10^{-4} M konsantrasyonda 50.167 ± 6.146 olarak, en yüksek Ki-67 tutulum oranı 10^{-7} M konsantrasyonda 50.333 ± 5.134 olarak hesaplandı (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6; Tablo 4.11).



Şekil 4.5: Alendronat grubunda ilaç konsantrasyonu ve uygulama süresine göre değişen kaspaz 3 tutulum eğrisi.

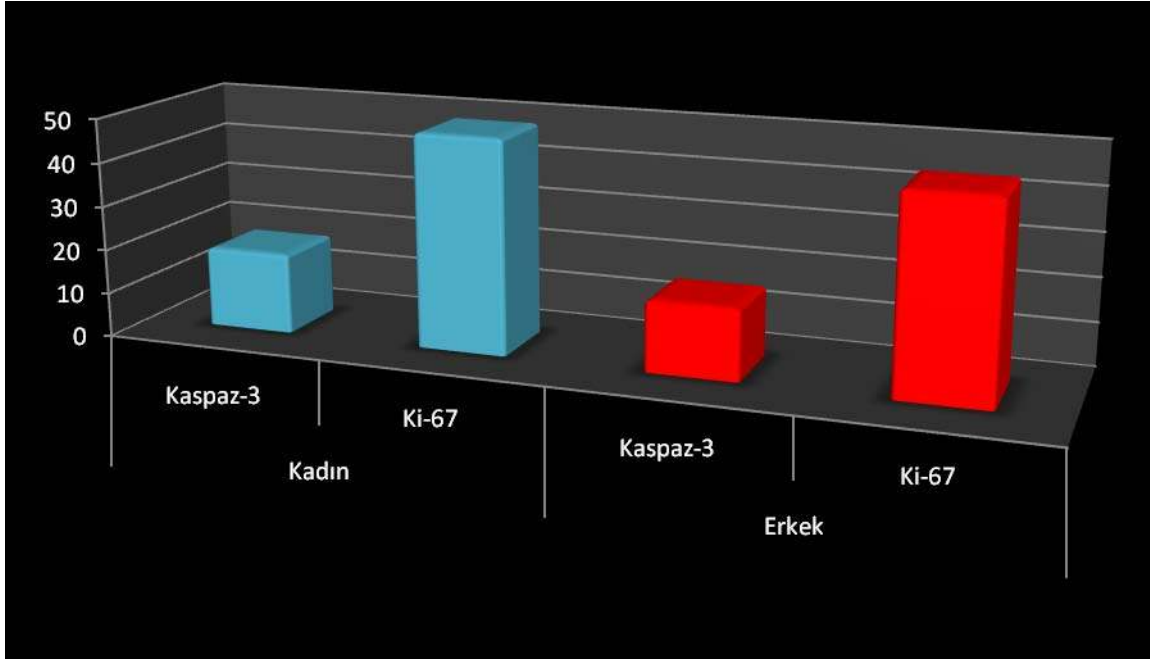


Şekil 4.6: Alendronat grubunda ilaç konsantrasyonu ve uygulama süresine göre değişen Ki-67 tutulum eğrisi.

Tablo 4.11 Alendronat ve pamidronat ilaç gruplarında, kaspaz 3 ve Ki-67antikor tutulumuna ait tanıtıcı istatistikler.

	Süre (saat)	Konsant rasyon (M)	Ortalama	Std. Hata	Güven Aralığı (% 95)		Ortalama	Std. Hata	Güven Aralığı (0% 95)	
					Alt Sınır	Üst Sınır			Alt Sınır	Üst Sınır
					Pamidronat				Alnedronat	
Kaspaz 3	6	10 ⁻⁴	29.000	7.272	8.808	49.192	17.500	2.703	9.996	25.004
		10 ⁻⁵	16.500	3.175	7.684	25.316	13.667	2.789	5.924	21.410
		10 ⁻⁶	9.167	1.394	5.295	13.038	7.667	1.624	3.156	12.177
		10 ⁻⁷	3.667	1.667	-.961	8.294	3.167	.943	.549	5.784
		Kontrol	1.667	.624	-.065	3.398	1.667	.624	-.065	3.398
	12	10 ⁻⁴	19.167	1.900	13.891	24.443	15.500	2.625	8.213	22.787
		10 ⁻⁵	15.000	3.215	6.075	23.925	11.333	2.034	5.685	16.982
		10 ⁻⁶	11.000	2.769	3.312	18.688	6.667	.928	4.090	9.243
		10 ⁻⁷	9.333	2.682	1.886	16.780	2.833	.667	.982	4.684
		Kontrol	2.667	.667	.816	4.518	2.667	.667	.816	4.518
	24	10 ⁻⁴	54.833	8.197	32.074	77.592	22.833	1.878	17.619	28.048
		10 ⁻⁵	45.000	10.206	16.663	73.337	15.000	1.780	10.059	19.941
		10 ⁻⁶	27.000	7.909	5.041	48.959	8.000	1.826	2.931	13.069
		10 ⁻⁷	13.167	3.362	3.831	22.502	5.333	1.404	1.434	9.232
		Kontrol	2.000	1.179	-1.272	5.272	2.000	1.179	-1.272	5.272
	48	10 ⁻⁴	53.000	2.911	44.919	61.081	36.500	4.964	22.718	50.282
		10 ⁻⁵	28.167	4.773	14.916	41.418	27.500	2.901	19.445	35.555
		10 ⁻⁶	20.167	2.339	13.672	26.662	11.000	1.291	7.416	14.584
		10 ⁻⁷	10.167	1.213	6.798	13.535	5.833	1.537	1.567	10.100
		Kontrol	3.833	.799	1.614	6.053	3.833	.799	1.614	6.053
	72	10 ⁻⁴	61.000	4.509	48.480	73.520	50.167	6.146	33.102	67.232
		10 ⁻⁵	48.333	6.704	29.720	66.947	32.333	2.789	24.590	40.076
		10 ⁻⁶	31.833	5.312	17.084	46.583	12.000	3.472	2.360	21.640
		10 ⁻⁷	18.000	2.517	11.013	24.987	7.333	2.261	1.056	13.610
		Kontrol	4.167	1.269	.643	7.691	4.167	1.269	.643	7.691
	Ki-67	6	10 ⁻⁴	36.667	9.911	9.150	64.183	33.667	4.997	19.792
10 ⁻⁵			33.667	5.442	18.558	48.775	34.167	5.487	18.931	49.402
10 ⁻⁶			53.333	6.314	35.804	70.863	44.167	5.735	28.244	60.089
10 ⁻⁷			64.500	3.880	53.727	75.273	59.500	3.916	48.628	70.372
Kontrol			74.000	4.143	62.496	85.504	74.000	4.143	62.496	85.504
12		10 ⁻⁴	33.667	3.965	22.658	44.676	36.167	4.604	23.385	48.949
		10 ⁻⁵	41.500	3.636	31.404	51.596	46.167	6.368	28.485	63.848
		10 ⁻⁶	52.333	3.621	42.280	62.387	51.500	5.986	34.880	68.120
		10 ⁻⁷	59.167	4.216	47.460	70.873	61.167	4.197	49.515	72.818
		Kontrol	72.167	3.586	62.210	82.124	72.167	3.586	62.210	82.124
24		10 ⁻⁴	27.333	3.180	18.505	36.162	30.000	3.902	19.168	40.832
		10 ⁻⁵	34.833	4.110	23.423	46.243	37.000	3.636	26.904	47.096
		10 ⁻⁶	45.167	4.160	33.617	56.717	52.333	5.426	37.268	67.399
		10 ⁻⁷	61.333	7.507	40.489	82.177	63.500	5.233	48.970	78.030
		Kontrol	68.167	6.464	50.221	86.112	68.167	6.464	50.221	86.112
48		10 ⁻⁴	23.333	4.230	11.590	35.076	21.000	3.391	11.585	30.415
		10 ⁻⁵	34.000	4.839	20.565	47.435	34.333	4.216	22.627	46.040
		10 ⁻⁶	47.000	8.635	23.027	70.973	43.500	5.444	28.385	58.615
		10 ⁻⁷	58.833	9.964	31.169	86.497	51.667	4.438	39.345	63.988
		Kontrol	66.000	9.687	39.105	92.895	66.000	9.687	39.105	92.895
72		10 ⁻⁴	14.167	3.408	4.706	23.627	21.500	3.131	12.806	30.194
		10 ⁻⁵	22.000	3.131	13.306	30.694	31.500	5.193	17.081	45.919
		10 ⁻⁶	30.833	5.563	15.389	46.278	37.833	6.180	20.674	54.992
		10 ⁻⁷	38.000	3.764	27.550	48.450	50.333	5.134	36.078	64.588
		Kontrol	57.333	5.028	43.374	71.292	57.333	5.028	43.374	71.292

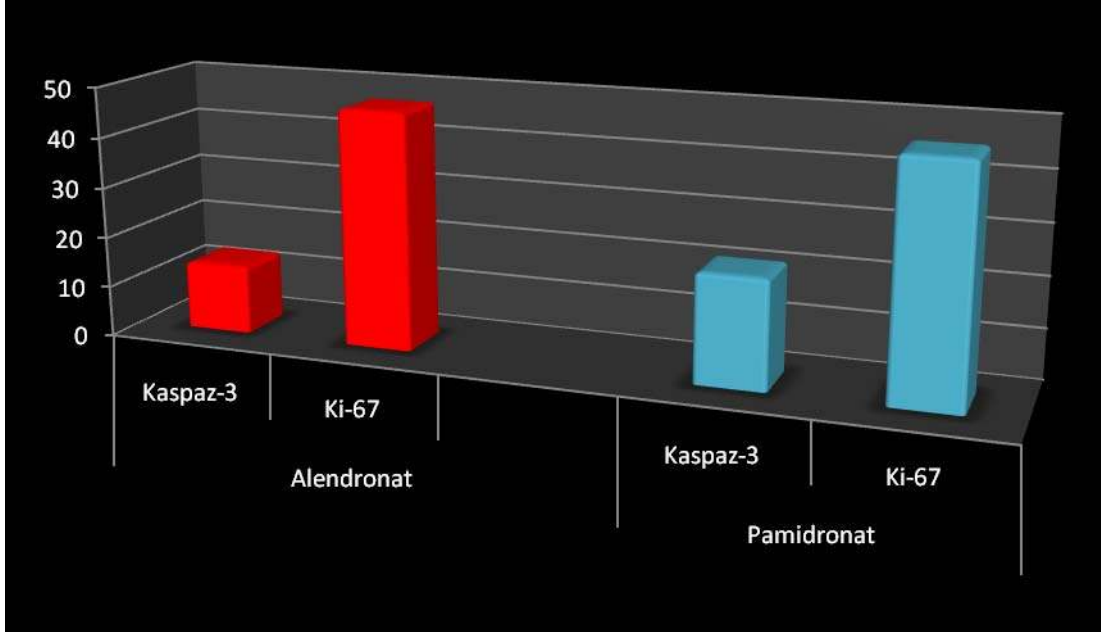
Kaspaz 3 tutulum değeri ortalamaları (apopitoz indeksi) ve Ki-67 tutulum değeri ortalamalarının (proliferatif indeks) her ikisi de kadınlarda daha yüksek olarak ölçüldü (Şekil 4.7). Çalışmaya dahil edilen üçü erkek üçü kadın bireyden oluşturulan örneklerin kaspaz 3 ve Ki-67 antikoru tutulum değerleri arasındaki farklılık cinsiyete göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde hiçbir anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4.7: Cinsiyete göre kaspaz 3 ve Ki-67 değerlerinin ortalama oranlarına bakıldığında, kadınlarda erkeklere göre her iki antikor tutulum oranının daha yüksek olduğu görülmektedir.

Ki-67 tutulumunun her iki ilaç grubunda da genel olarak birbirine benzer oranlarda olduğu görülmekle birlikte, alendronat grubunda proliferasyonun ortalama %5 oranında daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 4.8).

Kaspaz 3 tutulumu pamidronat grubunda ortalama olarak %20'nin üzerindeyken alendronat grubunda bu oran %10'a yakındı (Şekil 4.8).



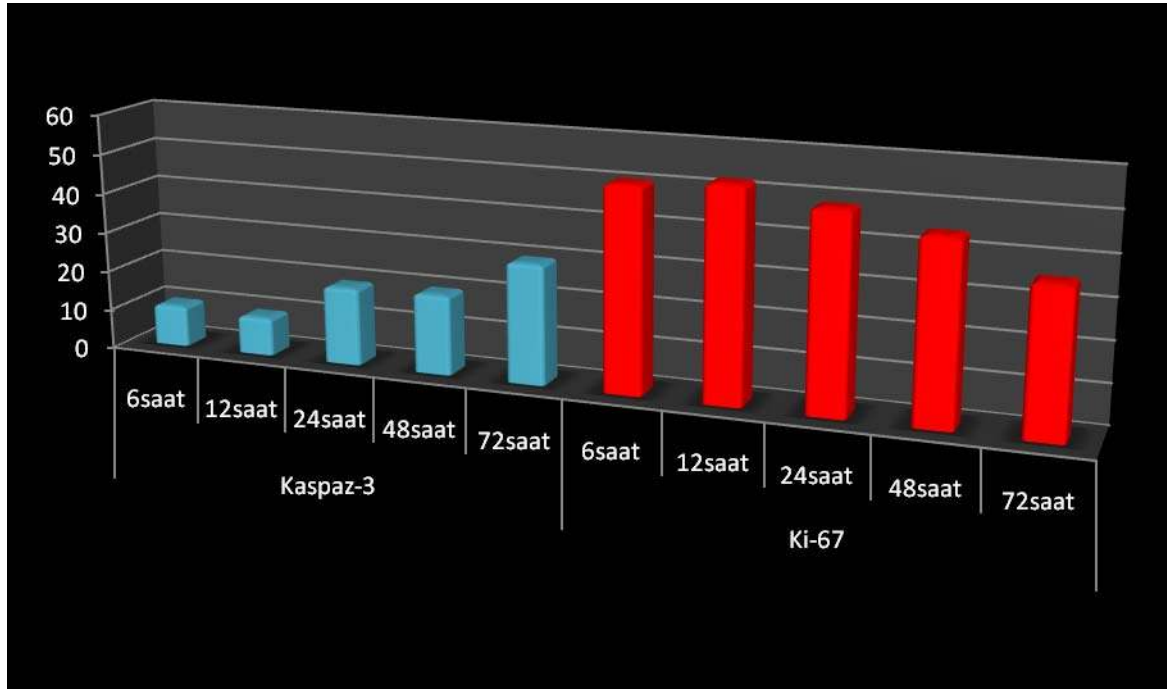
Şekil 4.8: Mavi sütunlarla pamidronat, kırmızı sütunlarla alendronat bulguları belirtilmiştir. Ki-67 tutulum oranları pamidronat ve alendronat için benzerken, kaspaz 3 tutulumu pamidronat grubunda belirgin ölçüde daha yüksektir.

Her iki ilaç uygulaması birlikte değerlendirildiğinde kaspaz 3 tutulum oranları ortalama olarak %30'un altında iken Ki-67 tutulum ortalamaları %45'in üzerindeydi. Bu oranlar ilaç muamele sürelerine bağlı olarak değişiklik göstermekteydi (Şekil 4.9). Yine iki ilaç birlikte zamana göre değerlendirildiğinde altı saatlik ilaç uygulamasında kaspaz 3 tutulum değeri en düşük iken, Ki-67 tutulum değeri çok yüksekti; bunun tam aksine yetmiş iki saatte en yüksek kaspaz 3 tutulum oranları görülürken, en düşük Ki-67 tutulumu gözlemlendi.

Hem alendronat hem pamidronat grubunda, ilacın muamele süresi uzadıkça apoptoz indeksinin arttığı ve ilacın uygulandığı kültürde hücre proliferasyon kapasitesinin giderek azaldığı görüldü. Apoptozun yirmi dördüncü saatte belirgin olarak artmaya başladığı; yirmi dört ve kırk sekizinci saatteki apoptoz değerlerinin birbirine çok yakın olduğu ve yetmiş ikinci saatte pik yaptığı belirlendi (Şekil 4.9).

Her iki ilaç grubu bulguları bir arada değerlendirildiğinde maruz kalma süresi uzadıkça proliferasyon oranının anlamlı bir şekilde giderek azaldığı saptandı. On ikinci

saatteki ortalama proliferasyon oranı, altıncı saatteki proliferasyon oranından %2 gibi bir oranla daha yüksekti. En yüksek Ki-67 tutulumu değeri %50'nin üzerindeyken, en düşük Ki-67 tutulumu %30 civarındaydı. Altı ve on ikinci saat proliferasyon oranları birbirine yakinken, yirmi dördüncü saatte proliferasyon oranlarında ani bir düşüş görüldü ve beklenen şekilde en düşük proliferasyon indeksi en uzun süre olan yetmiş ikinci saatte ölçüldü.

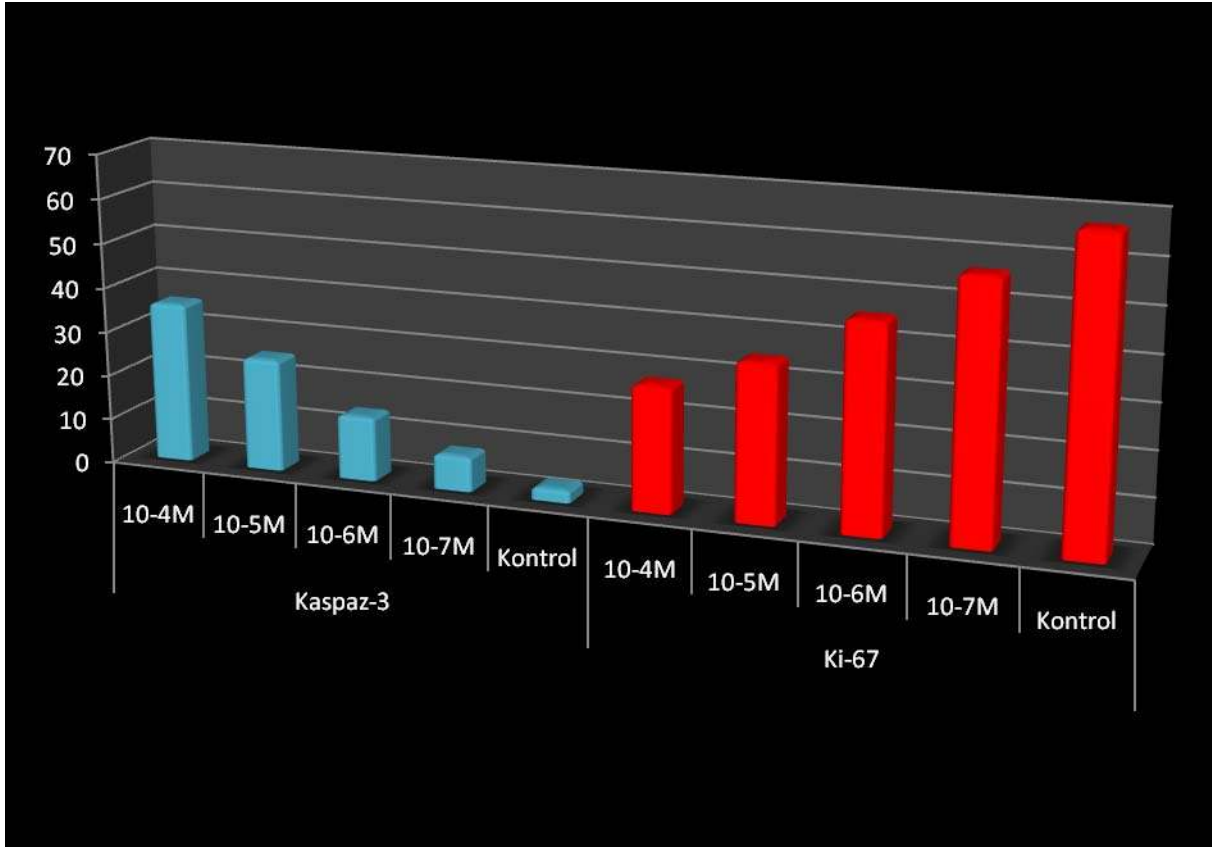


Şekil 4.9: Kaspaz 3 tutulumu ve Ki-67 tutulumu değerlerinin zamana göre değişimi her iki ilaç için birlikte gösterilmiştir. Mavi sütunlarla gösterilen kaspaz 3 değişimidir, kırmızı sütunlarla gösterilen Ki-67 değişimidir. İlaç muamele süresi arttıkça kaspaz 3 tutulum oranı artarken; Ki-67 tutulum oranı azalmaktadır.

Her iki ilaç uygulaması birlikte değerlendirildiğinde kaspaz 3 ve Ki-67 tutulum oranlarının uygulanan ilaç dozlarına göre değişiminde anlamlı bir fark görüldü. İlaç konsantrasyonu arttıkça kaspaz 3 tutulum oranı artmakta ve Ki-67 tutulum oranı azalmaktaydı. Çalışma genelinde, kaspaz 3 tutulumu en yüksek olarak yaklaşık %40'lık bir oranla $10^{-4}M$ 'da ölçüldü; en düşük olarak %2'lik bir oranla hiç ilaç uygulanmamış

kontrol grubunda ölçüldü (Şekil 4.10). Ki-67 tutulumu için aynı değerlendirme yapıldığında, en yüksek oranın %70 olarak hiç ilaç uygulanmamış kontrol grubunda; en düşük oranın %25 olarak $10^{-4}M$ 'da görüldüğü belirlendi (Şekil 4.10).

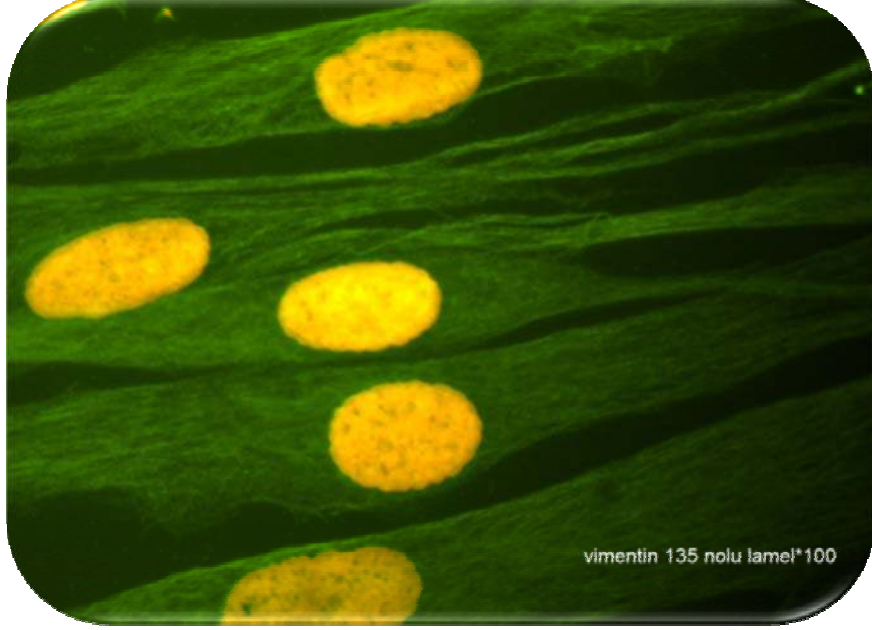
Apoptoz ve proliferasyon indekslerindeki değişimler $10^{-4}M$ ve $10^{-5}M$ 'da birbirine yakın ve paralel oranlarda iken, $10^{-6}M$ - $10^{-7}M$ ve hiç ilaç uygulanmamış kontrol grubundaki değişimler daha belirgindi. Elde edilen oranlara bakıldığında çalışmada $10^{-4}M$ ve $10^{-5}M$ dozlarının belirgin toksisite gösterdikleri görüldü (Şekil 4.10).



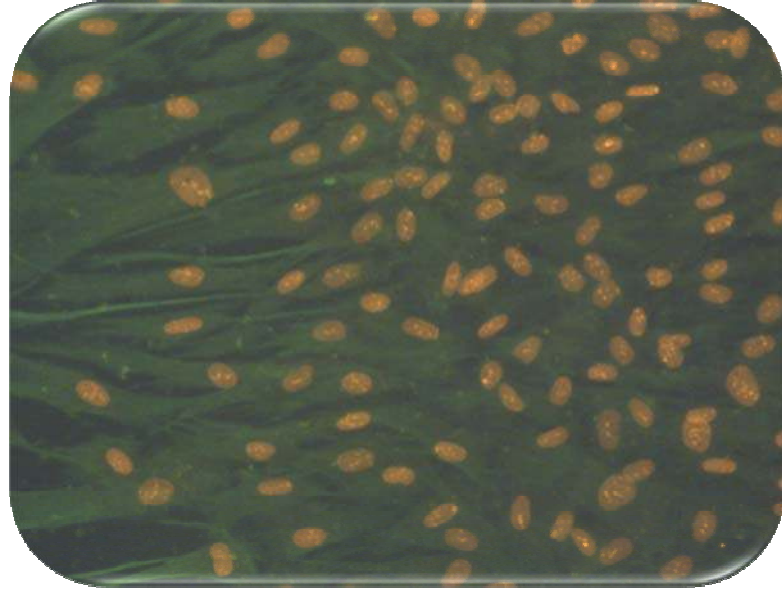
Şekil 4.10: Her iki ilaç grubu için kaspaz 3 ve Ki-67 tutulumunun, uygulanan ilaç dozlarına göre değişimi incelendiğinde kaspaz 3 tutulumunun konsantrasyon düştükçe azaldığı ve Ki-67 tutulumunun konsantrasyon düştükçe arttığı görülmektedir.

4.5 Vimentin, Ki-67 ve Kaspaz 3 Antikoru ile İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

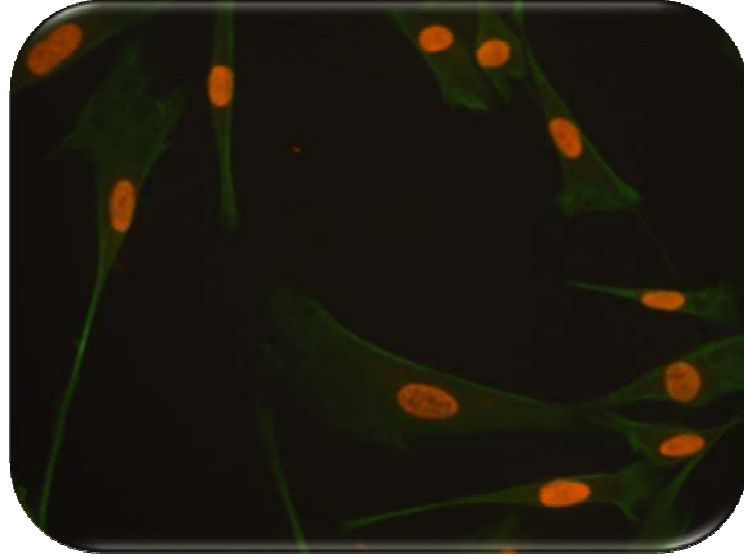
4.5.1 Vimentin



Resim 4.1: Çalışmada yetmiş iki saat süreyle 10^{-6} M pamidronatla muamele edilmiş kültüre ait lamelden elde edilen görüntüde 5 tane vimentin ile sitoplazmaları yeşil çekirdekleri turuncu boyanmış fibroblast hücresi görülmektedir (Orijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli).



Resim 4.2: Hiçbir ilaçla muamele edilmemiş yirmi dördüncü saat kontrol grubuna ait bir lamelde vimentin ile boyanmış fibroblast hücreleri görülmektedir (Oriijinal büyütme X20; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli).

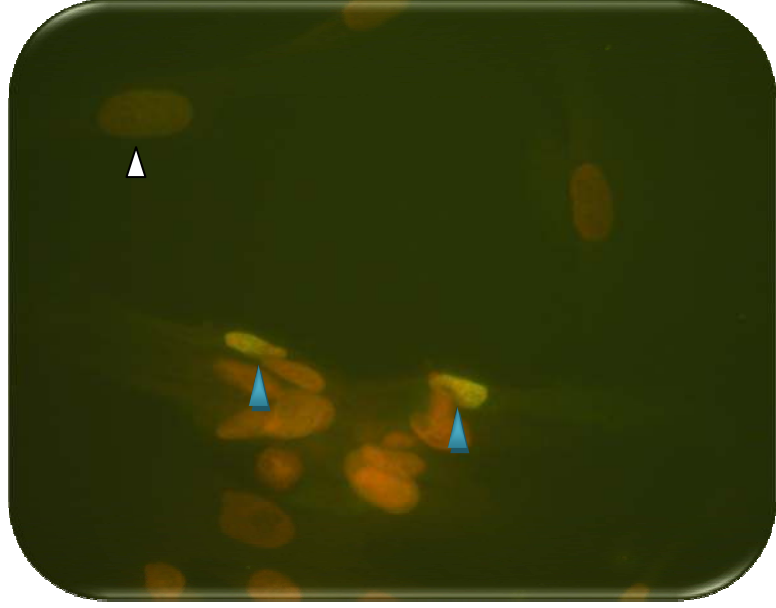


Resim 4.3: Altı saat 10^{-4} M pamidronatla muamele edilmiş lamelden elde edilen görüntüde yıldız ve iğsi şekilli karakteristik fibroblast hücre sitoplazma yapısı vimentin boyaması ile gösterilmiştir (Oriijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli).

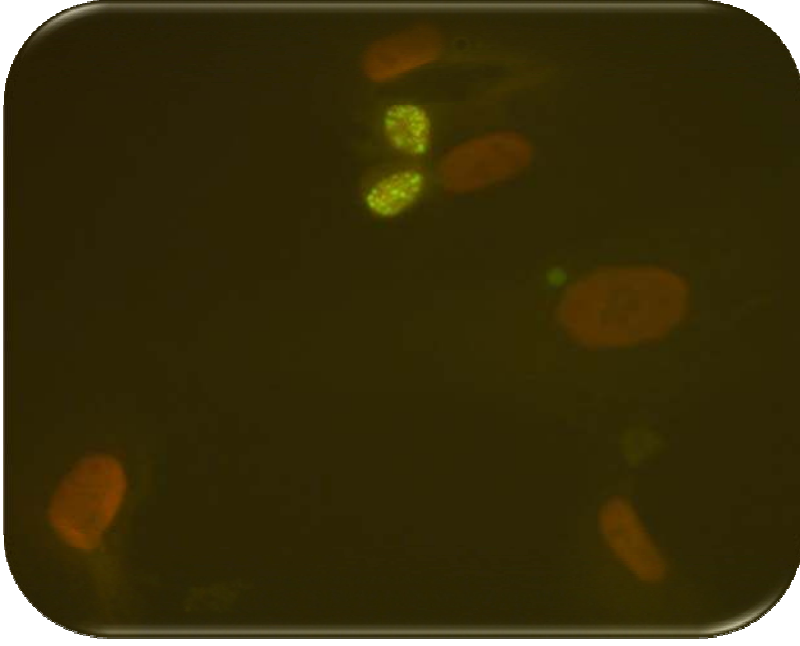
4.5.2 Ki-67



Resim 4.4: Kırk sekiz saat 10^{-6} M alendronata maruz kalmış lamelden alınmış görüntüde, toplam yedi fibroblast hücrelerinden işaretlenen iki tanesinde Ki-67 tutulumu pozitifdir (Orijinal büyütme X100; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli).

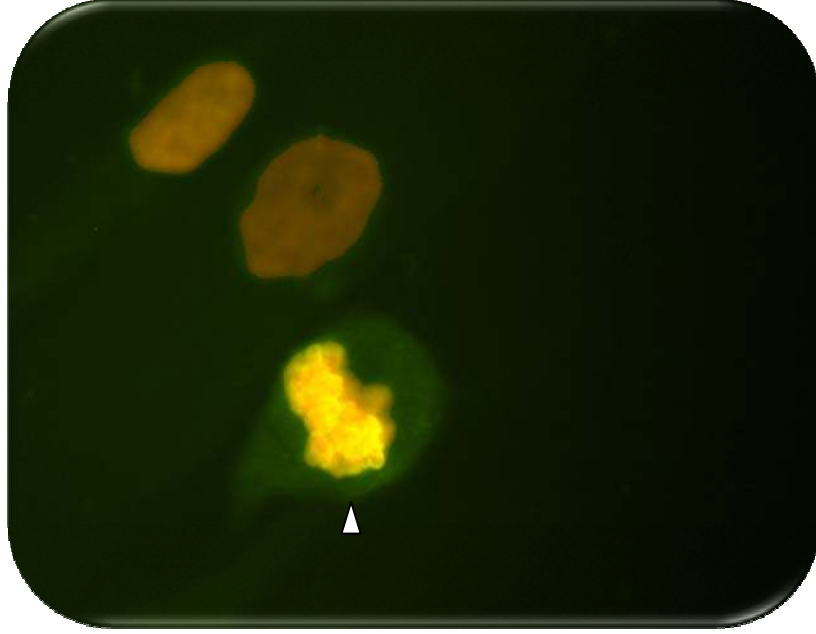


Resim 4.5: Altı saat 10^{-4} M pamidronatla muamele edilmiş lamelden elde edilen görüntüde, beyaz işaretle gösterilen hücrede Ki-67 tutulumu daha az, mavi ile işaretlenen hücrelerde Ki-67 tutulumu daha yoğun olarak görülmektedir (Orijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli).

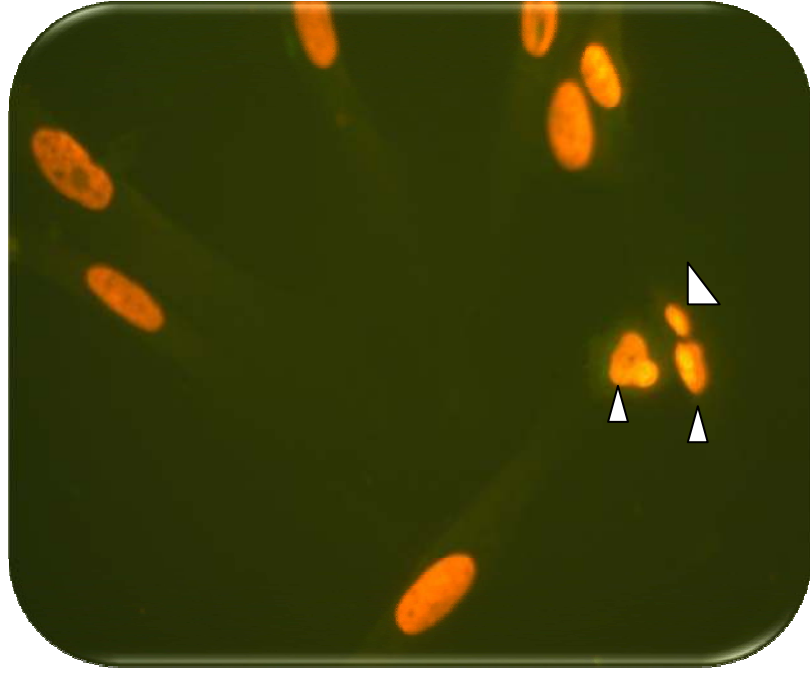


Resim 4.6: Altı saat 10^{-4} M alendronatla muamele edilmiş lamelden elde edilen görüntüde iki hücrenin çekirdeğinde belirgin Ki-67 reaktivitesi izlenmektedir. (Orijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli).

4.5.3 Kaspaz 3

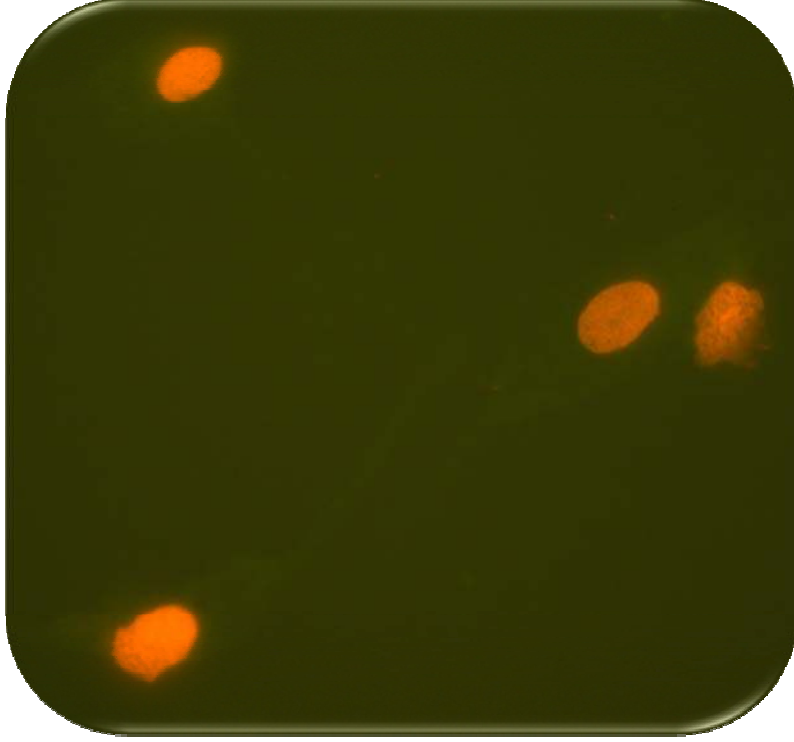


Resim 4.7: On iki saat 10^{-7} M alendronatla muamele edilmiş lamelde kaspaz 3 tutulumu pozitif fibroblast hücresi işaretlenerek gösterilmiştir (Orijinal büyütme X100; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli).



Resim 4.8: On iki saat 10^{-4} M pamidronatla muamele edilmiş lamelden elde edilen görüntüde 10 hücre arasında kaspaz 3 tutulumu pozitif olan üç fibroblast hücresi işaretlenerek gösterilmiştir (Orijinal büyütme X40; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli).

4.5.4 Negatif Kontrol



Resim 4.9: On iki saat alendronat 10^{-6} M ile muamele edilmiş lamelde negatif kontrol için primer antikor basamağı atlanarak gerçekleştirilen boyamada herhangi bir spesifik reaktiviteye rastlanmamıştır. (Orijinal büyütme X63; etidyum bromid çekirdek boyalı; FITC işaretli).

5. TARTIŞMA

Bifosfonatlar mevalonat yolu üzerinden osteoklastların apoptotik ölümüne neden olarak kemikte rezorptif aktiviteyi durdururlar (99). Bu sayede başta hormonal bozukluklara bağlı oluşan osteoporoz olmak üzere tüm patolojik kemik rezorpsiyonlarını tedavi ederler. Malign kemik rahatsızlıklarında bifosfonatlar hiperkalsemiyi, patolojik kemik kırıklarını, metastası ve kemik ağrısını önleyerek, hastaların yaşam kalitesini artırır ve ömrünü uzatırlar (100).

Alendronat ve pamidronat bifosfonatlar arasında en sık kullanılan ilaçlardır (1, 9, 35). Popülasyonda görülen BRONJ'ların %27'si pamidronat, %4'ü alendronat kullanımı ile ilişkilidir (101). Pamidronat ve alendronat karşılaştırıldığında, alendronatın antiresorptif etkinliği pamidronata göre 10 kat daha fazladır (100). Pamidronat aylık 90 mg/kg'lık dozda kanser hastalarında kullanılırken, alendronat haftalık 70 mg/kg dozda osteoporoz tedavisinde kullanılmaktadır. Aylık intravenöz bifosfonat tedavisi gören kanser hastalarında osteokemonekroz oluşma riski %2-13 arasındayken, haftalık oral tablet formunu kullanan hastalarda bu oran 100,000-200,000'de 1 gibi çok düşük bir oran olarak belirlenmiştir (102). Bazı çalışmalarda ise oral bifosfonat kullanımını takiben BRONJ gelişme riski daha yüksek olarak rapor edilmiştir (103, 104).

Önceleri BRONJ'un patogenezi yorumlayabilmek için kemik doku çalışmaları yapılırken günümüzde yumuşak doku çalışmaları daha fazla önem kazanmıştır (14, 105, 106). Kemik dokuda bifosfonatların osteoblast (107), osteoklast (108) ve tümör hücrelerinde (109) değişken faktörlere bağlı olarak neden oldukları etkiler çok sayıda çalışmada değerlendirilmiştir. Yumuşak dokuya yönelik olarak deneysel çalışmalarda mikromolar konsantrasyondaki bifosfonatların monosit, makrofaj, (110), endotel (111), oral epitel hücreleri (30) ve periodontal ligamentlerdeki fibroblastlar (112, 113) üzerinde oluşturduğu sitotoksik etki incelenmiştir.

Oral yumuşak doku üzerinde bifosfonatların sitotoksik etkilerini değerlendiren çalışmalarda, alendronat kullanımını takiben BRONJ oluşma riskinin çok düşük olduğu bildirildiği için zolendronat ve pamidronat gibi intravenöz kullanılan, etkinliği yüksek

ilaçlar tercih edilmiştir. Haftalık alendronat kullanımına rağmen gastrik mukozada ülserasyon (114), özefajitis (115) ve disfaji (116) rapor edilmiştir. Wallace ve ark.'nın yapmış oldukları bir çalışmada, alendronat ve pamidronatın *in vitro* olarak sıçan gastrik mukoza dokusu üzerinde topikal uygulanmalarını takiben oluşturdukları etkiler incelenmiştir ve irritasyona neden oldukları görülmüştür (117). Bu irritasyonu gastrik mukoza yüzeyinde yer alan mukusun yapısındaki yüzey aktif fosfolipidlerin yapısını bozarak oluşturduklarını düşünülmüştür (117).

Yüksek mukoza irritasyon potansiyeli nedeniyle özefagus anomalisi olan bireylerde alendronatın oral tablet formunun kullanılması kontrendikedir. Bu olumsuz etkileri bilinmesine rağmen alendronatın oral mukoza hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı etkilerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamız oral insan mukozasında alendronatın etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır.

Daha önce hiçbir çalışmada bifosfonatların etkileri primer oral fibroblast hücre kültürü üzerinde değerlendirilmemiştir. Az sayıda diğer çalışmada mürin oral fibroblast hücre kültürü (29) ya da hazır tam kalınlık 3 boyutlu oral mukoza bantları kullanılmıştır (105).

Fibroblastlar genel olarak proliferasyon kapasitesi yüksek olan hücrelerdir ve bu nedenle üretilmeleri oldukça kolaydır. Keratinositler izole edilmesi, yaşatması ve üretmesi oldukça zor olan hücrelerdir. Bu nedenle birçok araştırmacı keratinositi değerlendirmek için hazır hücre kültürü bantlarını kullanmayı tercih etmiştir ya da hücreleri yaşatmak için standart kültür medyumundan farklı medyumlar kullanmıştır. Çalışmamızda oral mukozadan alınan örneklerden keratinositler de izole edilmiş ancak sitotoksik çalışma ve değerlendirme yapılabilecek miktarda keratinosit üretilmesinde karşılaşılan güçlük nedeniyle çalışmada değerlendirilmemiştir.

Bifosfonatların neden olduğu BRONJ'un patogenezi doğru şekilde yorumlayabilmek için, hücre kültür çalışmalarında ilacın saf formunun kullanılması gerekmektedir. Bu çalışmada alendronat sodyum trihidrat ve pamidronat disodyum tuz hidratın saf tuz formları çözelti haline getirilerek hücre kültürlerine belirlenen konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

Daha önce oral yumuşak doku üzerinde bifosfonatların etkilerine yönelik yapılan çalışmalarda farklı bifosfonat türleri farklı doz aralıklarında uygulanmışlardır. Zolendronat 10^{-8} - 10^{-6} ve pamidronat 10^{-4} - 10^{-5} doz aralığında uygulanmıştır (29, 30). İnsan kaynaklı primer hücre kültürüne uygulanmış bifosfonat konsantrasyonu ile ilgili yeterli veri bulunamadığı için bizim çalışmamızda MTT testi yapılarak, ELİSA yoğunlukölçer yardımı ile pamidronat ve alendronatın fibroblastlar üzerinde toksik etki oluşturduğu konsantrasyonlar belirlenip, IC_{50} değeri hesaplanmış ve doz ayarlaması özgün olarak yapılmıştır.

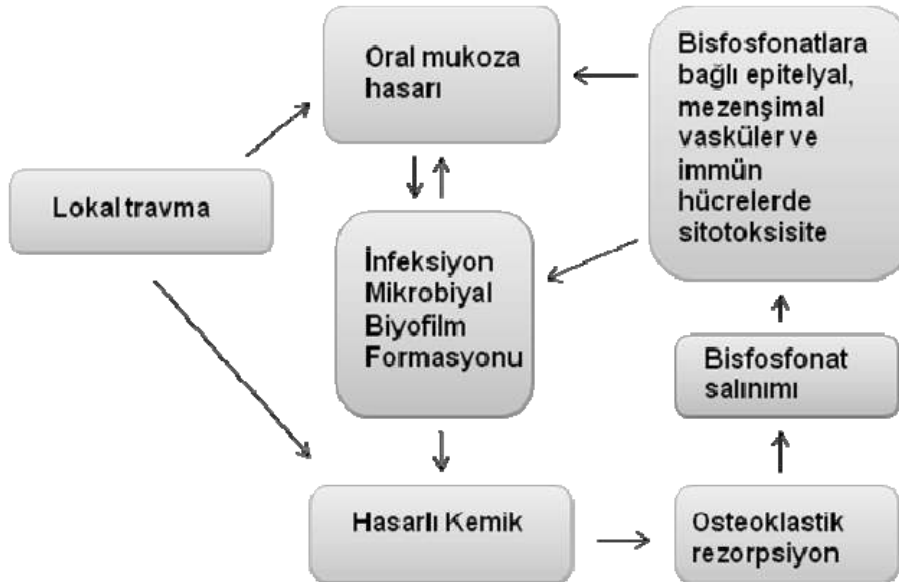
Hücre kültür çalışmalarında apoptozu değerlendirebilmek için genellikle ışık mikroskopunda (May Grunwalde Giemsa and tripan mavisi tutulumu), floresan mikroskopta (akridin oranj/etidyum bromid veya anneksin V/propidyum iyodin tutulumu), TUNEL kiti veya agaröz jelde genomik DNA fragmanlarının elektroforezi yoluyla sayısal ölçümü yapılır (118). Apoptoz için araştırmalarda kullanılan hiçbir yöntem apoptozu özgü değildir ve %100 güvenilirlikleri yoktur. Laboratuvarda apoptozun tespit edilmesinde; kaspazların yalnızca geçici olarak ortamda bulundukları, kültürdeki hücrelerin eninde sonunda nekroza gittikleri, apoptozun 2-3 saat kadar kısa bir zamanda sonuçlandığı unutulmamalıdır. Apoptozun dış veya iç yoldan uyarılması farketmeksizin, kaspaz 3 aktivasyonu apoptoz varlığını kesin olarak göstermektedir. Bu nedenle bizim çalışmamızda apoptoz oranının güvenilir olarak değerlendirilmesi için kaspaz 3 işaretlemesiyle immünfloresan inceleme yöntemi tercih edilmiştir.

Hücre kültüründe proliferasyonu değerlendirmek için MTT, MTS/PMS reaktif kiti, Calcein Viability kiti ve benzeri kitler sıklıkla kullanılmaktadır (105). Ki-67 monoklonal antikoru ile proliferasyon değerlendirmesi literatürde kabul görmüş ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bizim çalışmamızda Ki-67 tutulumunun kantitatif olarak değerlendirilmesi yapılarak proliferasyona yönelik kolay ve güvenilir yorum yapılmıştır.

Kobayashi ve ark. sıçanlarda diş çekimini takiben diş çekim soketine lokal olarak zoledronat uygulanmışlar ve yara iyileşmesinde oluşan farklılıkları incelemişlerdir (31). Zolendronatın yeni kemik oluşumunu inhibe ettiğini, vaskülarizasyonu bozduğunu, oral mukoza epitel hücrelerinin göçünü önlediğini ve bunun da soketin bakteri kontaminasyonuna yol açtığını bulmuşlardır. BRONJ'un klinik

tablosuna bakıldığında karakteristik olarak epitelizasyonu bozulmuş diş eti ile birlikte nekrotik kemik görülmektedir. Kemikteki nekroz bifosfonatların osteoklastik aktivite inhibisyonuna sekonder olarak turn-overın aşırı baskılanmasının bir sonucu olarak oluşmaktadır. Fakat yumuşak dokudaki iyileşme gecikmesi BRONJ'un sadece kemik doku kaynaklı değil, yumuşak dokuda da eş zamanlı bir patolojiye neden olarak oluştuğunu düşündürmelidir. Aslında bu durum ilacın yumuşak dokuda oluşturduğu toksisitenin bir kanıtıdır (119).

Düzenli bifosfonat kullanımı kemikte osteoklastik rezorpsiyonu baskılasa da kemiğe diş çekimi gibi eksternal bir travma gelmesi durumunda reaksiyonlar olarak ilgili bölgede rezorpsiyon meydana gelmektedir. Reid ve ark. bu rezorpsiyon bölgesinde önceden birikmiş olan bifosfonatların serbestleşerek çevre yumuşak dokuda sitotoksik etki oluşturduğunu ve uzun süredir bifosfonat kullanan bireylerde yara iyileşmesinin bu nedenle geciktiğini savunmaktadır (Şekil 5.1.) (2). Bunun aksine Hasmim ve ark. zoledronik asitin insan umbilikal ven endotel hücresi üzerinde oluşturduğu adezyon, migrasyon ve canlılık değişimini prenilasyona bağımlı sinyal iletim yolağına yönelik olarak inceledikleri çalışmada, bifosfonatların yumuşak dokuda toksisite oluşturabilmek için komşu kemik dokuya ihtiyaç duymadığı sonucunu vurgulamışlardır (120).



Şekil 5.1: Lokal travmanın kronik olarak uzun süredir bifosfonat kullanan bir bireyde çene kemiği ve komşu yumuşak dokuda osteokemonekroz öncesi oluşturduğu değişiklikler şematik olarak gösterilmiştir.

Oral mukozadaki yara iyileşmesi dokunun temel hücreleri olan keratinosit ve fibroblastın birbirini stimule etmesi ile meydana gelir (121). Önce keratinositler fibroblastları büyüme faktörü üretmesi için uyarır. Daha sonra fibroblastların ürettiği büyüme faktörleri parakrin etkileşimi sayesinde keratinositleri uyarır. Keratinositler, fibroblastlar ve kemik iliği hücreleri bir arada çalışarak yara iyileşmesini gerçekleştirir. Bu süreçte koordinasyonu sağlayacak olan RANK mediyatörleri, büyüme faktörleri, kemik morfojenik proteinleri ve immun sistem elemanları bifosfonatın hücre içine invazyonu sonucu olması gerektiği gibi çalışamaz ve bifosfonatın etkilediği yumuşak dokuda yara iyileşmesi bozulur (50).

Neden bifosfonat kullanımının bir komplikasyonu olarak sadece çene kemiklerinde osteokemonekroz olduğu konusunda çok sayıda hipotez kurulmuştur. Bu hipotezlerden en yaygın kabul göreni vücuttaki en yüksek remodelasyon oranına sahip kemiğin çene kemikleri olmasıdır. Alveolar kortikal kemiğin remodelasyon oranı iliyak kortikal kemiğin remodelasyonundan 10-20 kat daha fazladır (122). Yüksek remodelasyon oranı nedeniyle alveolar kemikte vücuttaki diğer kemiklere oranla 100 kat daha fazla bifosfonat birikmektedir (2). Bifosfonatların uzun süre kullanımıyla çene kemiklerinde remodelasyon dramatik boyutlarda inhibe olmaktadır ve bu inhibisyon osteokemonekrozun kemikteki patogenezinde rol oynamaktadır.

Diş çekiminin yapıldığı alveol bölgesinde turn-over miktarı mandibuler kanal bölgesine göre 2 kat daha fazla, basal kemiğe göre ise 3-5 kat daha fazladır (123). Bu nedenle BRONJ'lar hep turn-overın daha yüksek olduğu alveol bölgesinde görülmektedir. AAOMS'nin ve birçok araştırmacının da kabul ettiği gibi özellikle düzenli olarak intravenöz bifosfonat kullanan hastalarda invaziv dental cerrahi işlemlerden olabildiğince kaçınılması gerektiği ve konservatif tedavilerin tercih edilmesi gerektiği savunulmaktadır. Evrensel olarak kabul görmüş konservatif tedavinin tam aksine Ferlito ve ark. düzenli zoledronat kullanan 43 hastada 102 diş çekimini takiben BRONJ oluşmasını önlemek için dişin çekildiği bölgede alveoloktomi yapmışlardır ve postoperatif dönemde hiçbir nekroz vakası oluşmadığını rapor etmişlerdir (124).

Bifosfonatlardan başka hormonlar, kalsitonin, östrojen reseptör modölatörleri veya glukokortikoidler de kemikte remodelasyonu baskılayan ilaçlardır. Bu ilaçların kemik remodelasyonunu baskılama oranları %50'nin altındadır ve bu ilaçların kullanımına bağlı kemikte osteokemonekroz oluşumu bifosfonatlara göre çok daha düşük bir oranda rapor edilmiştir (122).

Oral kavite çok geniş bir mikrofloraya sahip olduğundan, oral mukoza yüzeyinde aseptik koşulları elde etmek çok zordur. BRONJ'un patogeneğinde mikrobiyal paterninde rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle insan oral mukozasından alınan örneklerden elde edilen hücre kültürünün enfekte olma ihtimali çok yüksektir. Yapılan çalışmada oral mukoza örneği alınacak hastalara preoperatif olarak kloroheksidin diglukonat ile ağız gargarası yaptırılıp, örneğin alınacağı yüzey iyodin ile silinmiştir. Bizim çalışmamızda örneklerin laboratuvara taşınmasında kullanılan transport medyuma streptomisin-neomisin ve penisilin kombinasyonu katılmıştır. Ayrıca aynı antibiyotik karışımı pasajlama yapılırken kullanılan medyuma da katılmıştır. Buna rağmen laboratuvara götürülen örneklerden birinde, 1. haftada enfeksiyon tesbit edilerek örnek çalışma dışı bırakılarak yeni örnek oluşturulmuştur.

Bu tez çalışmasına dahil edilen erkek ve kadın örneklerin sonuçları kendi arasında karşılaştırıldığında hem apoptoz hem proliferasyon değerlerinin kadınlarda daha yüksek olduğu görüldü fakat anlamlı bir ilişki kurulamadı. Örnek sayısı az olduğu için cinsiyete yönelik bir yorumlama yapılmadı. Literatür bilgisi değerlendirildiğinde de bifosfonatların yumuşak veya kemik doku üzerindeki etkisinde cinsiyetin rolüne dair bir bilgi bulunamadı.

Yapılan çalışmada alendronat ve pamidronatın her ikisinin de hücresel proliferasyonu baskıladığı ve apoptozu indüklediği belirlendi. Proliferasyondaki azalma direkt olarak apoptoz indüklenmesi ile ilişkilendirildi. Pamidronat grubunda beklenen şekilde kaspaz 3 tutulumu alendronat grubuna göre daha yüksek oranda gözlemlendi. Bunun nedeninin pamidronatın kimyasal etkinlik derecesinin alendronattan beş kat fazla olması olabileceği düşünüldü.

Pamidronat grubunda gözlenen yüksek apoptoz oranı literatürle uyumlu bulunmuştur. Nitrojen içeren bifosfonatların farklı dokular üzerindeki etkilerini

inceleyen bir çalışmada, pamidronatın fibroblast hücre kültüründe %61 oranında apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (105). Literatürde alendronatın oral yumuşak dokuda oluşturduğu etkiyi açıklayan bir çalışma bulunmamıştır. Alendronatın, BRONJ oluşturma riski çok düşük olmasına ve klinik kullanımda intravenöz kullanılan bifosfonat türlerine göre BRONJ açısından daha güvenilir kabul edilmesine karşın, bizim çalışmamızda alendronatın da fibroblast hücresinde %28,5'a varan bir oranda apoptozu indüklediği belirlendi.

MTT testi sonuçlarına göre hem pamidronat hem alendronat için aynı konsantrasyon aralığının (10^{-4} - 10^{-7} M) çalışılması gerektiği belirlendi. MTT sonuçları ile uyumlu olarak her iki ilaç grubunda da apoptozun en yüksek olduğu toksik doz 10^{-4} M olarak ölçüldü. Daha önce yapılan oral mukoza çalışmalarında pamidronat için toksik dozlar bizim çalışmamızla benzer şekilde 10^{-4} , 10^{-5} ve 5×10^{-5} M olarak belirlenmiştir (29, 105, 125).

İlaç uygulamasından sonra erken dönem apoptoz ve proliferasyon indekslerindeki değişiklikleri yorumlayabilmek için bizim çalışmamızda önceki çalışmalardan farklı olarak altı ve on ikinci saat değerlendirmeleri yapıldı. İlaç muamele süresi uzadıkça kaspas 3 tutulumu ve dolayısı ile apoptoz oranının artması beklenirken pamidronat ve alendronat grubuplarının her ikisinde de altı saatlik ilaç uygulama süresinde oluşan kaspas 3 tutulumunun, on iki saatte olandan daha yüksek olduğu görülmüştür. On ikinci saatte apoptoz oranındaki düşüşün, hücrelerin canlılığını korumak için ortaya koydukları bir savunma mekanizması ile dirençlerini artırıyor olmalarından kaynaklanabileceği düşünüldü. Yirmi dördüncü saatte apoptozun tekrar artmaya başladığı ve her iki ilaç grubunda da kaspas 3 tutulum oranının yetmiş iki saatte pik yaptığı saptandı.

İlaç uygulama süresi uzadıkça Ki-67 tutulum oranı yani proliferasyon miktarının düşmesi beklenir. Bizim çalışmamızda pamidronat grubunda beklenen şekilde altı saatlik ilaç uygulamasında Ki-67 tutulum oranı en yüksek olarak ölçüldü ve on ikinci saatte proliferasyonda bir düşüş gözlemlendi. Beklenenin aksine yirmi dördüncü saatte tekrar proliferasyonda artış gözlemlendi ve altıncı saatteki kadar olmasa da on ikinci saatten daha yüksek bir proliferasyon miktarı belirlendi. Alendronat grubunda ise

proliferasyonun altı saatlik ilaç muamelesinden yirmi dördüncü saate kadar düzenli bir şekilde arttığı ve en yüksek Ki-67 tutulumunun yirmi dördüncü saatte olduğu belirlendi. Bu beklenmeyen proliferasyon miktarı değişimlerinden ilk yirmi dört saatte proliferasyon indeksinin ilaç uygulamasından etkilenmediği, her iki ilaç uygulamasına bağlı proliferasyondaki azalmanın kırk sekiz saatten sonra başladığı yorumu yapılabilir. Her iki ilaç grubunda da kırk sekizinci saatte proliferasyonda dramatik boyutlarda düşmekte ve Ki-67 tutulum oranı beklenen şekilde yetmiş ikinci saatte oldukça azalmaktadır.

Çalışmamızda doz değişimi apoptozu ve proliferasyonu etkileyen en önemli değişken olarak belirlendi. İlaç uygulama süresi anlamlı bir farklılık oluşturmasa da literatürde daha önce bu konuyla ilgili yapılan çalışmalarla uyumlu şekilde hücre kültüründe toksik etkilerin yirmi dört saat ve daha uzun süren bifosfonat uygulamasını takiben olduğu belirlendi (29, 30).

Bifosfonatların oral yumuşak doku üzerindeki etkileri ilk kez 2009 yılında Landesberg ve ark. tarafından pamidronatla yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (29). Bu çalışmada pamidronatın mürin oral keratinositlerinde hücre proliferasyonunu baskılayarak yara iyileşmesini geciktirdiği fakat apoptozu neden olmadığı belirtilmiştir. Değerlendirmeler 3×10^{-5} , 10^{-4} ve 3×10^{-4} M konsantrasyonda yapılmıştır (29). Proliferasyonun 10^{-4} M konsantrasyonda baskılanmaya başladığını fakat çalışılan dozlarda apoptoz oluşmadığını belirtmişlerdir. Kim ve ark. 2011 yılında üç boyutlu sentetik insan oral mukoza hücre kültür bantları üzerinde yaptıkları çalışmada pamidronatın fibroblast ve keratinosit hücre kültürleri üzerinde sitotoksik, hücre yaşlanması, apoptoz ve proliferasyon açısından oluşturduğu etkileri değerlendirilmiştir (125). Uyguladıkları 10^{-6} M ve 5×10^{-5} M'lık pamidronat konsantrasyonlarına bağlı olarak, keratinositler üzerinde apoptotik etki oluşmazken fibroblastlarda apoptoz meydana geldiğini görmüşlerdir ve her iki hücrede de proliferasyonun baskılandığını görmüşlerdir (125). Walter ve ark. 2011 yılında yayınlamış oldukları çalışmada pamidronatın 5×10^{-5} M konsantrasyonda fibroblastlarda hem apoptoz hem de hücre canlılığında azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır (105). Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızla uyumludur. Bizim çalışmamızda fibroblastlarda özellikle 10^{-4} ve 10^{-5} M konsantrasyonlarda hem pamidronat hem de alendronatla muamele edildiğinde önemli ölçüde apoptoz meydana geldiği görüldü. BRONJ'un klinik tablosunda

meydana gelen kemik ekspozu, alveol kemiğini örten oral yumuşak dokunun temel iki hücresi olan keratinositlerin ve fibroblastların proliferasyonunu engellemesi ve fibroblastların ek olarak apoptoza uğramaları ile açıklanabilir.

Bifosfonatların patogeneze yönelik kurulan çok sayıda teori arasında kemik ve yumuşak doku yapılan çalışmalarla en çok desteklenen ve kabul görendir (122). Bizim tez çalışmasında elde edilen verilere göre, BRONJ'un patogenezinde yumuşak dokunun önemli rolü olduğu belirlenmiştir. Bifosfonatlar hem çene kemiğinin remodelasyonunu bozarak hem de yumuşak dokunun kemiği örtme mekanizmasını inhibe ederek BRONJ'u oluştururlar.

BRONJ vakalarının %5-15'lik kısmı hiçbir travma veya invaziv cerrahi girişim hikayesi olmaksızın spontan olarak oluşmaktadır (106). Bifosfonatların oral yumuşak dokuda indüklediği apoptoz ve baskıladığı proliferasyon sonucu spontan kemik ekspozları oluşabilir. Bu ekspozlar turn-over'ı ve angiogenezi bozulmuş kemikte bakteriyel invazyona ortam hazırlayarak takip eden süreçte osteomyelit ve BRONJ gelişmesi ile sonuçlanabilir (60, 126). BRONJ'un patogenezindeki infeksiyon paterni, yumuşak doku bütünlüğünün bozulmasına sekonder olarak gelişir.

Genel prensibe göre BRONJ vakalarında kemik üzerindeki asemptomatik, sınırlı açıklıklarda konservatif tedavi uygulanmalıdır ve cerrahi tedavi sadece semptomatik hastalarda denenmelidir. Birçok vakada osteokemonekrozun cerrahi tedavisinden sonra defektin ilk haline göre büyüdüğü bilinmektedir. Katz ve ark. 2005 yılında yayınladığı 3 vaka raporunda dişle ilişkili semptomatik osteokemonekrozun, diş çekimi ya da endodontik-cerrahi tedavi yerine konvansiyonel endodontik tedavi ile başarılı şekilde giderildiğini belirtmiştir (20).

Prospektif olarak yapılan bir çalışmada, bifosfonata bağlı çene kemiklerinde ekspoz osteokemonekroz teşhis edilen 16 hasta değerlendirilmiştir (53). Bu hastalarda 7'sine cerrahi tedavi (sekestretomi ya da süperfisiyal küretaj) uygulanırken, 9'una sadece antimikrobiyal (günlük 2gr amoksisilin/klavulanat-potasyum + 1,5gr metranidazol) konservatif tedavi uygulanmıştır. 5-24 aylık kontroller sonunda iki gruptaki iyileşme arasında hiçbir farklılık belirlenmemiştir (53).

Oral kavitede aynı anda birden fazla kadranda osteokemonekroz teşhis edildiği takdirde dental açıdan mümkünse önce sadece bir bölgenin tedavisi yapılarak 2 ay süreyle antimikrobiyal önlemler altında tedavi edilen bölgenin tamamen iyileşmesi için beklendikten sonra sırayla diğer bölgeler tedavi edilmelidir (188, 127).

Periapikal patoloji, aktif abse, sinüs perforasyonu, ciddi periodontitis ya da pürülan cep akıntısı kendi başlarına osteokemonekroz riski taşıyan patolojilerdir. Bu durumlarda kemik iliği etkilenmiştir ve bifosfonat kullanan hastalarda acil tedavi edilmeleri gerekmektedir. Birden fazla kadranda etkilenmiş olsa bile en kısa sürede tümünü tedavi etmek gerekmektedir (101).

Diş hekimleri bifosfonat kullanan hastalarının tedavisi ve takibi için düzenli olarak yenilenen <http://www.ada.org/2995.aspx> sitesinden faydalanabilirler (18).

Hekimler bifosfonata bağlı çene kemiklerinde teşhis ettikleri osteokemonekroz vakalarını www.fda.gov/MedWatch/report.htm internet adresi ile FDA' in oluşturduğu FDA Med Watch programına bildirmelidirler (127).

BRONJ'un patogenezi anlaşıldıkça tedavisine yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Ziebart ve ark. bozulan kemik remodelasyonu ve yumuşak doku migrasyonunu tedavi etmek için BRONJ bölgesine topikal olarak geranil-geraniol uygulanmasının etkili olduğunu savunmaktadırlar (128). Bifosfonatların mevalonat yolağı üzerinde baskıladıkları geranilasyonu tekrar stimule etmek için ekternal olarak geranil-geraniol uygulanmasının BRONJ'da tedavi edici rolü olabileceğini düşünmüşlerdir. Scheper ve ark. bifosfonat kullanımına bağlı oral mukozadaki fibroblast ve kerkinositlerde meydana gelen apoptozun, siRNA ile tedavi edilebileceğini savunmaktadır zira siRNA, kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonunu durdurarak apoptozu inhibe etmektedir. TUNEL and Annexin-V flow sitometre kitlerini kullanarak zolendronatın epitel hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin incelendiği bu çalışmada, kaspaz 3 ve kaspaz 9 yolağı ile apoptozun meydana geldiğini gösterilmiştir (30). Bifosfonatların oral epitelde yarattığı apoptotik indüklenmenin önlenmesi için, bifosfonata bağlı oluşan apoptozun intrinsek ya da ekstrinsek hangi yolla meydana geldiğini araştıran ileri çalışmalar gerekmektedir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarının desteklediği gibi bifosfonatların oral yumuşak dokuda oluşturdıkları apoptozun geri çevrilmesine yönelik alınacak önlemler proliferasyonu indükleyecek, yara iyileşmesini hızlandıracak ve bu yolla kemikteki ekspozu ortadan kaldıracaktır. Kemik ekspozunun giderilmesi BRONJ'un tedavisindeki en önemli basamaktır. Bifosfonat kullanımına bağlı oral yumuşak dokuda meydana gelen yıkımları gidermeye yönelik daha ileri bilimsel araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Bifosfonatların uzun süre kullanımını takiben BRONJ gelişmesi bifosfonatlara alternatif olabilecek ilaçları gündeme getirmiştir. Özellikle kanser tedavisinde doxorubicin (80), metastası önlemede denosumab (129) ve osteoporoz tedavisinde de protelous (130) denenmiştir. Etki mekanizmaları bifosfonatlardan farklı olan bu ilaçların, klinik başarılarını prospektif veya restrospektif olarak bifosfonatlarla karşılaştıran çalışmalar yapılmıştır (131, 132). Genel olarak bu ilaçların kanser tedavisinde bifosfonatlar kadar etkili olmadığı düşünülürken, osteoporoz tedavisinde etkili bir alternatif olabilecekleri savunulmaktadır. Ancak 2011 yılında denosumab kullanımını izleyerek çene kemiğinde BRONJ'a benzer osteokemonekroz geliştiği de rapor edilmiştir (133). Kemiğin doğal metabolizmasını etkileyen her türlü ilacın uzun dönem kullanımından sonra kemikteki apozisyon ve rezorpsiyon dengesini bozacağı ve osteokemonekroz açısından risk oluşturacağı unutulmamalıdır.

Osteokemonekrozun tedavisinde, kemikteki turn-overi artıracak PTH kullanılması tavsiye edilmektedir. Bifosfonat terapisine ara vererek 6 ay boyunca PTH kullanılmasının kemikteki turn-over oranını gösteren osteokalsin değerinin %74 artmasını sağladığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada PTH'nın osteoklastik aktivitede önemli bir değişiklik yaratmasa da osteokemonekrozun iyileşmesine katkı sağladığı savunulmuştur (134).

Marx ve ark. serumda ölçülen TLX telopeptit değerinin osteokemonekroz riskini belirleyen bir değer olduğunu göstermiştir. Bu değer 100 pg/ml den az ise osteokemonekroz riski yüksek, 100-150 pg/ml arasında ise orta derecede risk, 150 pg/ml 'den fazla ise risk düşük olarak kabul edilmektedir. TLX değeri kemikte turn-over arttığı zaman yükselmektedir. Bifosfonat terapisi gören hastalarda terapiye 1 ay ara

verilmesi sonucu kemikte remodelasyon metabolizmasının iyileştiği ve turn-overın arttığı TLX değerin 25,9'dan 26,4'e yükseldiği belirlenmiştir (36).

Düzenli bifosfonat kullanan bir hastada BRONJ gelişmesini önlemeye yönelik profilaktik amaçlı veya BRONJ gelişmiş bir hastada yara iyileşmesini hızlandırabilmek için hastanın medikal durumu uygunsa 3 ay ya da daha uzun süre ile bifosfonat terapisine ara verilmesi tavsiye edilse de klinik uygulama da bifosfonat terapisine ara verilmesinin BRONJ'un tedavisinde çok etkili olmadığı görülmüştür (114, 135). Bifosfonatlar kemikteki remodelasyon alanına bir kez tutundumu on yıl hiç bozulmadan kalabilirler. Bu nedenle kısa dönem ilacı kullanmamak bifosfonatın kemikte oluşturduğu değişiklikleri ortadan kaldırmaz. Önemli olan BRONJ gelişmeden önce gerekli önlemlerin alınmasıdır.

Uzun süren bifosfonat terapisi, özellikle lokal travma ve dental prosedürleri takiben çene kemiklerinde BRONJ oluşturabilir (53). 2004 yılında toplam 214 bifosfonata bağlı osteokemonekroz vakası rapor edilirken, bir yıl sonra 2005'de bu sayı 561'e yükselmiştir (10). Toplumda osteoporoz probleminin görülmesi kaçınılmazdır. Buna bağlı olarak alendronatın 19. yüzyılda en çok reçete edilen ilaç olduğu belirlenmiştir (12). Ciddi kemik rahatsızlığı olan bir hastada önlem alınmadığı takdirde kalça ya da vertebra kırığına bağlı ölüm riski bifosfonat kullanımına bağlı çene kemiklerinde BRONJ oluşma riskinden çok daha yüksektir (70). Oral bifosfonat kullanımı osteoporozu olan hastalarda vertebra kırıklarını %50, göğüs ve ekstremitelerdeki kırıklarını %35-50 önlemektedir. Bu veriler bifosfonat kullanımının kaçınılmaz olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Dişeti bağ dokusunda en yoğun olarak bulunan fibroblastlar üzerinde, nitrojen içeren bifosfonatlardan alendronat ve pamidronatın oluşturduğu apoptotik etkiyi kaspaz 3 ve proliferatif etkiyi Ki-67 antikoru tutulum oranı ile incelediğimiz bu sitotoksikite çalışmada;

- İnsan dişeti dokusundan elde edilen primer fibroblast kültüründe hem alendronat hem de pamidronat için MTT kiti kullanılarak toksik konsantrasyon aralığı 0.1-100 μ M olarak özgün şekilde belirlendi.
- En yüksek doz olan 10^{-4} M'da ve en uzun ilaç muamelesi süresi olan yetmiş iki saatin sonunda alendronatın %50,167; pamidronatın %61,00 oranında apoptoz oluşturduğu ve iki ilaç grubu arasındaki apoptoz indeksi farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p: 0.046).
- Pamidronat grubunda 10^{-4} M'da yetmiş ikinci saatte proliferasyon miktarı %14,167 iken alendronat grubunda bu oran %21,58 olarak belirlendi ve iki ilaç grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p: 0.046).
- Hiçbir ilaç muamelesi yapılmamış kontrol grubunda altıncı saatte apoptoz oranı %1,667 ve yetmiş ikinci saatte %4,167 olarak belirlendi. Kontrol grubu ve çalışma grupları arasındaki apoptoz indeksi farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0.000).
- Kontrol grubunda altıncı saatte %74 olarak belirlenen proliferasyon indeksi yetmiş ikinci saatte %57,3'e düştü. Kontrol grubu ve çalışma grupları arasındaki proliferatif indeks farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p:0.000).
- Çalışma genelinde ilaç uygulama süresi arttıkça kaspaz 3 tutulum oranı artarken, Ki-67 tutulum oranının her dozda ve sürede azaldığı görüldü. İlaç uygulama süresi ile apoptoz-proliferasyon indeksi değişimi arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, hem kontrol grubu ile çalışma grupları arasında (p:0.126); hem de alendronat ve pamidronat gruplarının kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı belirlendi (p:0.716).

- BRONJ oluřturma riski çok dūřuk olduęu bilinen alendronatın da oral yumuřak dokuda intravenöz uygulanan bifosfonat tūrleri gibi sitotoksik olduęu gōsterildi.
- Osteokemonekroz multifaktōriyel bir olaydır ve tūm oral kaviteyi etkileyen bir patolojidir. Kemik doku kadar yumuřak doku da osteokemonekrozun patogenezinde önemli yer tutmaktadır. Çalıřmamızın verileri ıřıęında, bifosfonat kullanımına baęlı çene kemiklerinde oluřan nekrozlarda yumuřak dokuda oluřan hasarın tūm çabalara raęmen tedavi edilememesinin nedeninin bifosfonatların yumuřak dokuda oluřturduęu apoptoz ve proliferasyonun baskılanması olduęu dūřunūldū.

BRONJ'un tedavisinde geliřmeler saęlayabilmek için hem oral yumuřak doku hem sert dokuya yōnelik daha çok klinik ve laoratuvar çalıřmasına ihtiyaç vardır. BRONJ'un patogenezinde yumuřak ve sert dokunun rolū dūřunūlerek, bu patolojinin oluřmasını önlemek veya oluřtuęu zaman geri çevirebilmek için neler yapılabilceęi konusunda ileri *in vitro* alıřmalar planlanmalıdır. Özellikle yaygın kullanımı kaçınılmaz olan ajanların yerel dokudaki keratinosit ve fibroblastlar bařta olmak ūzere hūcreleri hangi mekanizmalar ūzerinden olumsuz olarak etkilediklerine yōnelik arařtırmalar, yardımcı tedavi yōntemlerinin geliřtirilmesine ve uygulanmasına önemli katkı saęlayacaktır.

Bifosfonatların farklı tūrlerinin veya bifosfonatlara alternatif olduęu dūřunūlen ilaçların oral yumuřak doku ūzerindeki etkilerini arařtıran karřılařtırmalı çalıřmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalıřmamız da dahil olmak ūzere bundan önce yapılmıř tūm bifosfonat-oral yumuřak doku iliřkisini inceleyen çalıřmalar saęlıklı hūcreler ūzerinde yapılmıřtır. Klinikte BRONJ'un uzun sūre bifosfonat terapisi gōrmūř bireylerde oluřtuęu gōz nūnde bulundurularak, bifosfonata belli sūre maruz kalmıř diřeti dokusunda bifosfonatların etkisi çalıřılmalıdır.

Bifosfonat kullanımına bağlı çene kemiklerinde osteokemonekroz oluşmasını önleyebilmek için, bifosfonat terapisine başlamadan önce hastalar mutlaka dişhekimine

konsülte edilmeli, dental kontroller yapılmalı, gerekli önlemler alınmalıdır. Düzenli dental kontroller tüm terapi boyunca devam etmelidir. Hastalar ağız hijyenine dikkat etmeli ve olası travmadan dental dokuları korumalıdır. BRONJ'un ciddiyeti, tedavisinin zorluğu ve hayatı ne kadar olumsuz etkileyebileceği hastaya vurgulanmalıdır. Gerekli tüm önlemler BRONJ oluşmadan önce alınmalıdır.

7. KAYNAKLAR

-
1. FONT R. F., GARCIA M. L., MARTINEZ J. M. (2008). Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments: Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. **13**:318-324.
 2. REID I. R. (2008). Anti-resorptive therapies for osteoporosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **19**:473-478.
 3. CZURYSZKIEWICZ T., AREVA S., HONKANEN M., LINDEN M. (2005). Synthesis of sol-gel silica materials providing a slow release of bisphosphonate. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng Aspects*. **254**:69-74.
 4. 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. **104**:249-258.
 5. ŞENEL F. C., SARAÇOĞLU T. U., DURMUŞ A., BAĞIŞ B. (2007). Severe osteomyelitis of the mandible associated with the use of non-nitrogen containing bisphosphonate (disodium clodronate): report of a case. *J Oral Maxillofac Surg*. **65**:562-565.
 6. BRUNTON L. L., LAZO J. S., PARKER K. L. (2006). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. New York: McGrawHill. p.:1-41.
 7. RUSSELL R. G., WATTS N. B., EBETINO F. H., ROGERS M. J. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*. **19**:733-759.

-
8. ASHCROFT A. J., DAVIS F. E., MORGAQN G. J. (2003). Aetiology of bone disease and role of bisphosphonates in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* **4**:284-292.
 9. LEITE A. F., FIGUEIREDO P. T., MELO N. S., ACEVEDO A. C., CAVALCANTI M. G., PAULA L. M., PAULA A. P., GUERRA E. N. (2006). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. Report of a case and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **102**:14-21.
 10. NAVEAU A., NAVEAU B. (2006). Osteonecrosis of the jaw in patients taking bisphosphonates. *Joint Bone Spine.* **73**:7-9.
 11. DANNEMANN C., ZWAHLEN R., GRATZ K. W. (2006). Clinical experiences with bisphosphonate induced osteochemonecrosis of the jaws. *Swiss Med Wkly.* **136**:504-9.
 12. DUNFORD J. E., THOMPSON K., COXON F. P., LUCKMAN S. P., HAHN F. M., POULTER C. D., EBETINO F. H., ROGERS M. J. (2001). Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther.* **296**:235-242.
 13. GUTTA R., LOUIS P. J. (2007). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: Science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **104**: 186-193.
 14. NAIDU A., DECHOW P. C., SPEARS R., WRIGHT J. M., KESSLER H. P., OPPERMAN L. A. (2008). The effects od bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **106**:5-13.
 15. MARTIN T. J., GRIN V. (2000). Bisphosphonates- mechanism of action. *Australian Prescriber.* **23**:130-132.

-
16. ROGERS M. J., GORDON S., BENFORD H. L., COXON F. P., LUCKMAN S. P., MONKKONEN J., FRITH J. C.(2000). Cellular and molecular mechanism of action of bisphosphonates. *Cancer*. **88**:2961-2978.
17. KIMMEL D. B. (2007). Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res*. **86**; 1022-1033.
18. Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy. 2008 Expert panel recommendations of American Dental Association Council on Scientific Affairs.
19. FRANCHIMONT N., CANALIS E. (2003). Management of glucocorticoid induced osteoporosis in premenopausal women with autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. **2**: 224-228.
20. KATZ H. (2005). Endodontic implications of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: A report of three cases. *J Endod*. **31**:831-34.
21. GARCIA-MORENO C., SERRANO S., NACHER M., FARRE M., DIEZ A., MARINOSO M. L., CARBONELL J., MELLIBOSKY L., NOGUES X., BALLESTER J., AUBIA J. (1998). Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone*. **22**:233-239.
22. BOISSIER S., MAGNETTO S., FRAPART L., CUZIN B., EBETINO F. H., DELMAS P. D., CLEZARDIN P. (1997). Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Res*. **57**:3890-3894.
23. SMITH M. R. (2003). Antitumor activity of bisphosphonates. *Clin Cancer Research*. **9**:5433-5434.
24. COXON J. P., OADES G. M., KIRBY R. S., COLSTON K. W. (2004). Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU Int*. **94**:164-170.

-
25. SHIPMAN C. M., CROUCHER P. I., RUSSELL R. G., HELFRICH M. H., ROGERS M. J. (1998). The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res.* **58**:5294-5297.
26. GÜNHAN O., YILDIZ E., KARSLIOĞLU Y., AYDINTUĞ Y., DOĞAN N., CELASUN B. (2003). Nuclear morphometric features of epithelial cells lining keratocytes. *Anal Quant Cytol Histol.* **25**:85-89.
27. ODELL E. W. M. P. (1998). Biopsy pathologies of the oral tissues. 1st ed. London: Chapman&Hall. Chapter 1.
28. RUCH J. V. (1990). Patterned distribution of differentiating dental cells: facts and hypotheses. *J Biol Buccale.* **18**:91-98.
29. LANDESBURG R., COZIN M., CREMERS S., WOO V., KOUSTENI S., SINHA S., GARRETT L., RAGHAVAN S. (2008) Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* **66**:839-847.
30. SHEPER M. A., BADROS A., CHAISUPARAT R., CULLEN K. J., MEILLER T. F. (2009) Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol.* **144**:667-676.
31. KOBAYASHI Y., HIRAGA T., UEDA A., WANG L., MATSUMOTO-NAKANO M., HATA K., YATANI H., YONEDA T. (2010). Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab.* **28**:165-175.
32. REID I. R., BOLLAND M. J., GREY A. B. (2007). Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone.* **41**:318-320.
33. LIBERMANN U. A., WEISS S. R., BROLL J., MINNE H. W., QUAN H., BELL H. N., RODRIGUEZ-PORTALES J., DOWNS R. W., FAVUS M. (1994). Effect of oral alendronate on bone mineral density and incidence of fractures in postmenopausal

osteoporosis. The Alendronat Pahse III Osteoporosis Study Group. *N Engl J Med.* **333**:1437-1443.

34. KAYALP O. (2009). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 12. Baskı, Pelikan Yayıncılık, İSTANBUL. p.: 1139-1141.

35. WOO S. B., HELLSTEIN J. W., KALMAR J. R. (2006). Narrative (corrected) review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med.* **16**:753-761.

36. MARX R. E., CILLO J. E., ULLOA J. J. (2007). Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* **65**: 2397-2410.

37. KAMOUN-GOLDRAT A., GINISTY D., LE MERRER M. (2008). Effect of bisphosphonates on tooth eruption in children with osteogenesis imperfecta. *Eur J Oral Sci.* **116**: 195-198.

38. LIPTON A., THERIAULT R. H., HORTOBAGYI G. N. (2000). Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases: long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer.* **88**:1082-1090.

39. LEHRER S., MONTAZEM A., RAMANATHAN L., PESSIN-MINSLEY M., PFALL J., STOCK R. G., KOGAN R. (2009). Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws, Bone markers, and a Hypothesized Candidate Gene. *J Oral Maxillofac Surg.* **67**:159-161.

40. SILVERMAN S. L., HURVITZ E. S., NELSON V. S., CHIODO A. (1994). Rachitic Syndrome after disodium etidronate therapy in adolescent. *Arch Pyys Med Rehabil.* **75**:118-120.

-
41. SHAFER D. M., BAY C., CARUSO D. M., FOSTER K. N. (2008). The use of eidronate disodium in the prevention of heteretropic ossification in burn patients. *Burns*. **34**:355-360.
42. PAZIANAS M., COOPER C., WANG Y., LANGE J. L., RUSSELL R. G. (2011). Atrial fibrillation and the use of oral bisphosphonates. *Ther Clin Risk Manag*. **7**:131-144.
43. SOYDAN S. S., ŞENEL F. V., ARAZ K. (2009) Bifosfonata Bağlı Çene Kemiklerinde Gelişen Osteonekrozun Patogenezi ve Tedavisi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. **33**:61-68.
44. DANSEREAU R. J., CRAIL D. J., PERKINS A. C. (2008). In vitro disintegration and dissolution studies of once-weekly copies of alendronate sodium tablets (70 mg) and in vivo implications. *Curr Med Res Opin*. **24**:1137-1145.
45. SKERJANEC A., BERENSON J., HSU C., MAJOR P., MILLER W. H., RAVERA C., SCHRAN H., SEAMAN J., WALDMEIER F. (2003). The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with varying degrees of renal function. *J Clin Pharmacol*. **43**:154-162.
46. BINDERMAN I., ADUT M., YAFFE A. (2000). Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodontol*. **71**:1236-1240.
47. MERW S. J., REEVE C. M. (1999). Qualitative analysis of peripheral peri-implant bone and influence of alendronate sodium on early bone regeneration. *J Periodontol*. **70**:1228-1233.
48. LEVIN L., BRYSON E. C., CAPLAN D., TROPE M. (2001). Effect of alendronate on root resorption of dried replanted dog teeth. *Endod Dent Traum*. **17**:120-126.
49. TEKIN U., TÜZ H. H., ÖNDER E., ÖZKAYNAK O., KORKUSUZ P. (2008). Effects of alendronate on rate of distraction in rabbit mandibles. *J Oral Maxillofac Surg*. **66**:2042-2049.

-
50. MOORTHY R. S., VALLURI S., JAMPOL L. M. (1998). Drug-induced uveitis. *Surv Ophthalmol.* **42**:557-570.
51. MALIK A. R., CAMPBELL S. H., TOMA N. M. (2002). Bilateral acute anterior uveitis after alendronate. *Br J Ophthalmol.* **86**:1443.
52. KELEŞ T, AVŞAR A. F. (2009). Bifosfonatlar ve atriyal fibrilasyon riski. *Türkiye Klin J Cardiovasc Sci.* 21:275-278.
53. MONTEBUGNOLO L., FELICETTI L., GISSI D. B., PIZZIGALLO A., PELLICIONI G. A., MARCHETTI C. (2007). Biphosphonate-associated osteonecrosis can be controlled by nonsurgical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **104**: 473-477.
54. LEHRER S., MONTAZEM A., RAMANATHAN L., PESSIN-MINSLEY M., PFAIL J., STOCK R. G., KOGAN R. (2008). Normal serum bone markers in Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **106**:389-391.
55. MALMGREN B., ASTRÖM E., SÖDERHALL S. (2008). No osteonecrosis in jaws of young patients with osteogenesis imperfecta treated with bisphosphonates. *J Oal Pathol Med.* **37**:196-200.
56. SANTINI D., VINCENZI B., DICUONZO G., AVVISATI G., MASSACESI C., BATTISTONI F., GAVASCI M., ROCCI L., TIRINDELLI M. C., ALTOMARE V., TOCCHINI M., BONSIGNORI M., TONINI G. (2003). Zolendronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.* **9**:2893-2891.
57. SANTINI D., VINCEZI B., HANNON R. A., BROWN J. E., DICUONZO G., ANGLETTI S., La CESA A., COLEMAN R., TONINI G., BUDILLON A., CARAGLIA M., HOLEN I. (2006). Changes in bone resorption and vascular

endothelial growth factor after a single zoledronic acid infusion in cancer patients with bone metastases from solid tumours. *Oncol Rep.* **15**:1351-1357.

58. HELLSTEIN J. W., MAREK C. L. (2005). Bisphosphonate osteochemonecrosis(bis-phossy jaw): is this phossy jaw of the 21st century? *J Oral Maxillofac Surg.* **63**:682–689.

59. SEDGHIZADEH P. P., KUMAR S. K., GORUR A., SCHAUDINN C., SHULER C. F., COSTERTON J. W. (2008). Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* **66**:767–775.

60. KAPLAN I., ANAVI K., ANAVI Y., CALDERON S., SCHWARTZ-ARAD D., TEICHER S., HRSHBERG A.,TIQVA P., HASHARON R., HASHOMER T. (2009). The clinical spectrum of Actinomyces-associated lesions of the oral mucosa and jawbones: correlations with histomorphometric analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **108**:738-746.

61. MAWARDI H., TREISTER N., RICHARDSON P., ANDERSON K., MUNSHI N., FAIELLA R. A., WOO S. B. (2009). Sinus tracts-an early sign of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws? *J Oral Maxillofac Surg.* **67**:593-601.

62. RUGGIERO S. L., DODSON D. B., ASSAEL L. .A., LANDESBURG R., MARX R. E., MEHROTRA B. (2009). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update. *J Oral Maxillofac Surg.* **67**:2-12.

63. LIMONTA C., VAIA S., BIGGIOGGEORA M., BIANCHIA M. L. (2007). Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate in children and adolescents. *Bone.* **40**:61.

64. BEDOGNI A., BLANDAMURA S., LOKMIC Z., PALUMBO C., RAGAZZO M., FERRARI F., TREGNAGHI A., PIETROGRANDE F., PROCOPIO O., SAIA G., FERRETT M., BEDOGNI G., CHIARINI L., FERRONATO G., NINFO V., LO RUSSO L., LO MUZIO L., NOCINI P. F. (2008). Bisphosphonate-associated jawbone

osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **105**:358-364.

65. RUGGIEO S. L., DREW S. J. (2007). Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonate therapy. *J Dent Res.* **86**:1013-1021.

66. O'RYAN F. S., KHOURY S., LIAO W., HAN M. M., HUI R. L., BAER D., MARTIN D., LIBERTY D., LO J. C. (2009). Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: bone scintigraphy as an early indicator. *J Oral Maxillofac Surg.* **67**:1363-1372.

67. DIEI I. J., FOGELMAN I., AL-NAWAS B., HOFFMEISTER B., MIGLIORATI C., GLIGOROV J., VÄÄNÄNEN K., PYLKKÄNEN L., PECHERSTORFER M., AAPRO M. S. (2007). Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Is there a diverse relationship of amino- and non-aminobisphosphonates? *Crit Rev Oncol Hematol.* **64**:198-207.

68. ROELOFS A. J., THOMPSON K., GORDON S., ROGERS M. J. (2006). Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res.* **12**:6222-6230.

69. LEITE A. F., FIGUEIREDO P. T., MELO N. S., ACEVEDO A. C., CAVALCANTI M. G., PAULA L. M., PAULA A. P., GUERRA E. N. (2006) Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. Report of a case and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **102**:14-21.

70. CAREY J. J., PALOMO L. (2008). Bisphosphonate and osteonecrosis of the jaw: Innocent association of significant risk? *Cleveland Clinic Journal of Medicine.* **75**:871-879.

71. WESSEL J. H., DODSON T. B., ZAVRAS A. I. (2008). Zolendronate, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: A case-control study. *J Oral Maxillofac Surg.* **66**:625-631.

-
72. MARX R. E. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* **61**:1115-1117.
73. Adapted from advisory task force on bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. (2007). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* **65**:369-376.
74. RUGGIERO S. L., FANTASIA J., CARLSON E. (2006). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **102**:433-441.
75. HELLSTEIN J. W., MAREK C. L. (2005). Bisphosphonate osteochemonecrosis(bis-phossy jaw): is this phossy jaw of the 21 st century? (Review). *J Oral Maxillofac Surg.* **63**: 682-689.
76. WIPFF J., ADAMSBAUM C., KAHAN A., JOB-DESLANDRE C. (2011). Chronic recurrent multifocal osteomyelitis. *Joint Bone Spine.* (Article in press)
77. POZZI S., RAJE N. (2011). The role of bisphosphonates in multiple myeloma: mechanisms, side effects, and the future. *Oncologist.* **16**:651-662.
78. BEDOGNI A., SAIA G., RAGAZZO M., BETTINI G., CAPELLI P., D'ALESSANDRO E., NOCINI P. F., LO RUSSO L., LO MUZIO L., BLANDAMURA S. (2007). Bisphosphonate-associated osteonecrosis can hide jaw metastases. *Bone.* **41**:942-945.
79. COXON F. P., HELFRICH M. H., LARIJANI B., MUZYLAK M., DUNFORD J. E., MARSHALL D., MCKINNON A. D., NESBITT S. A., HORTON M. A., SEABRA M. C., EBETINO F. H., ROGERS M. J. (2001). Identification of a novel phosphonocarboxylat inhibitor of Rab Geranylgeranyl Transferase that specifically reverts Rab prenylation in osteoclasts macrophages. *J Biol Chem.* **276**: 48213-48222.

-
80. LAGINHA K. M., VERWOERT S., CHARROIS G., ALLENT. M. (2005). Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clinical Cancer Research*. **11**: 6944-6949.
81. DANDO T. M., KEATING G. M. (2005). Liposomal doxorubicin: A review of its use in metastatic breast cancer and potential in non-hodgkin lymphoma. *American Journal of Cancer*. **4** :193-206.
82. SUN P., CAI D. H., LI Q. N., CHEN H., DENG W. M., HE L., YANG L. (2010). Effects of alendronate and strontium ranelate on cancellous and cortical bone mass in glucocorticoid-treated adult rats. *Calcif Tissue Int*. **86**:495–501.
83. KASUGAI S., HASEGAWA N., OGURA H. (1990). A simple in vito cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A). *Jpn J Pharmacol*. **52**:95-100.
84. MAO S. Y., LORETTE C., JAVOIS L. C., KENT U. M. (2010) Methods in Molecular Biology. Vol. 115. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Chapter: Overview of antibody use in immunocytochemistry.
85. KERR J. F., WYLLIE A. H., CURRIE A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. **26**:239-257.
86. WYLLIE AH, KERR J. F., CURRIE A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. **68**:251-306.
87. DANNO K., HORIO T. (1982). Sulphydryl crosslinking in cutaneous apoptosis: a review. *J Cutan Pathol*. **9**:123-132.
88. WYLLIE A. H. (1987). Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol*. **153**:313-316.

-
89. FAWTHROP D. J., BOOBIS A. R., Davies DS. (1991). Mechanisms of cell death. *Arch Toxicol.* **65**:437-444.
90. SINKOVICS J. G. (1991). Programmed cell death (apoptosis): its virological and immunological connections (a review). *Acta Microbiol Hung.* **38**:321-334.
91. COSTA P. M., MIGUEL C., CAEIRO S., LOBO J., MARTINS M., FERREIRA A. M., CAETANO M., VALE C., DELVALLS T. A., COSTA M. H. (2011). Transcriptomic analyses in a benthic fish exposed to contaminated estuarine sediments through laboratory and in situ bioassays. *Ecotoxicology*. (Article in Press)
92. ARENDS M. J, WYLLIE A. H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* **32**:223-254.
93. KANNO T., NISHIZAKI T. (2011). Sphingosine induces apoptosis in hippocampal neurons and astrocytes by activating caspase-3/-9 via a mitochondrial pathway linked to SDK/14-3-3 protein/Bax/cytochrome c. *J Cell Physiol.* **6**:2329-2337.
94. HABBERSTAD A. H., GULATI S., TORP S. H. (2011). Evaluation of the proliferation markers Ki-67/MIB-1, mitotin, survivin, pHH3, and DNA topoisomerase II α in human anaplastic astrocytomas – an immunohistochemical study. *Diagn Pathol.* **6**:43.
95. VOLLMER E., ROESSNER A., GERDES J., MELLIN W., STEIN H., CHONG-SCHACHEL S., GRUNDMANN E. (1986). Improved grading of bone tumors with the monoclonal antibody Ki-67. *J Cancer Res Clin Oncol.* **112**:281-282.
96. GERDES J. (1985). An immunohistological method for estimating cell growth fractions in rapid histopathological diagnosis during surgery. *Int J Cancer.* **35**:169-171.
97. MUSSIG E., STEINBERG T., KOHL A., CHAMULITRAT W., KOMPOSCH G., TOMAKIDI P. (2008). Discrimination of epithelium-like and fibroblast-like phenotypes derived from ethanol-treated immortalised human gingival keratinocytes in epithelial equivalents. *Cell Tissue Res.* **332**:57–71.

-
98. KAYMAZ F. F., DAĞDEVİREN A., ASAN E. (2003). Antigenic profile of human thymus in concurrence with "Clusters of Thymic Epithelial Staining" classification. *Annals Of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. **185**: 163-171.
99. BENFORD H. L., MCGOVAN N. W. A., HELFRICH M. H., NUTTAL M. E., ROGERS M. J. (2001). Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 Activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone*. **28**:465–473.
100. FAN T. M. (2009). Intravenous aminobisphosphonates for managing complications of malignant osteolysis in companion animals. *Top Companion Anim Med*. **24**:151-156.
101. REID I. R. (2009). Osteonecrosis of the jaw — Who gets it, and why? *Bone*. **44**:4–10.
102. MANFREDI M., MERIGO E., GUIDOTTI R., MELETI M., VESCOVI P. (2011). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case series of 25 patients affected by osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. **40**:277-284.
103. LO J. C., O'RYAN F. S., GORDON N. P., YANG J., HUI R. L., MARTIN D., HUTCHINSON M., LATHON P. V., SANCHEZ G., SILVER P., CHANDRA M., MCCLOSKEY C. A., STAFFA J. A., WILLY M., SELBY J. V., GO A. S. (2010). Predicting risk of osteonecrosis of the jaw with oral bisphosphonate exposure (PROBE) investigators. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. *J Oral Maxillofac Surg*. **68**: 243–253.
104. SEDGHIZADEH P. P., STANLEY K., CALIGIURI M., HOFKES S., LOWRY B., SHULER C. F. (2009). Oral bisphosphonate use and the prevalence of osteonecrosis of the jaw: an institutional inquiry. *J Am Dent Assoc*. **140**: 61–66.
105. WALTER C., PABST A., ZIEBART T., KLEIN MO., AL-NAWAS B. (2011). Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblast and osteoblast in vitro. *Oral Disease*. **17**:194-199.

-
106. BADROS A., WEIKEL, D., SALAMA A., GOLOUBEVA O., SCHNEIDER A., RAPOPORT A., FENTON R., GAHRES N., SAUSVILLE E., ORD R., MEILLER T. (2006). Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *Journal of Clinical Oncology*. **24**:945–952.
107. GUN-IL I. M., QURESHI S. A., KENNEY J., RUBASH H. E., SHANBHAG A. S. (2004). Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*. **25**:4105–4115.
108. KHOSLA S. (Chair), BURR D., CAULEY J., DEMPSTER D. W., EBELING P. R., FELSENBURG D., GAGEL R. F., GILSANZ V., GUISE T., KOKA S., McCAULEY L. K., McGOWAN J., McKEE M. D., MOHLA S., PENDRYS D. G., RAISZ L. G., RUGGIERO S. L., SHAFER D. M., SHUM I., SILVERMAN S. L., POZNAK C. H., WATTS N., WOO S. B., SHANE E. (2007). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*. **22**:1479–1491.
109. MACKIE P. S., FISHER J. L., ZHOU H., CHOONG P. F. (2001). Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *British Journal of Cancer*. **84**:951–958.
110. HEWITT R. E., LISSINA A., GREEN A. E., SLAY E. S., PRICE D. A., SEWELL A. K. (2005). The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gamma delta T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins. *Clin Exp Immunol*. **139**:101–111.
111. MOREAU M. F., GUILLET C., MASSIN P., CHEVALIER S., GASCAN H., BASLÉ M. F., CHAPPARD D. (2007). Comparative effects of five bisphosphonates on apoptosis of macrophage cells in vitro. *Biochem Pharmacol*. **73**:718-723.

-
112. CORREIA V. D. , CALDEIRA C. L., MARQUES M. M. (2006). Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dental Traumatol.* **22**:312–317.
113. AGIS H., BLEI J., WATZEK G., GRUBER R. (2010). Is zoledronate toxic to human preiodontal fibroblasts? *J Dent Res.* **89**:40-45.
114. WEITZMAN R., SAUTER N., ERIKSEN E.F., TARASSOFF P.G., LACERNA L.V., DIAS R., ALTMAYER A., CSERMAK-RENNER K., MCGRATH L., LANTWICKI L., HOHNEKER J.A. (2007). Critical review: updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients – May 2006. *Critical Reviews in Oncology Hematology.* **62**:148–152.
115. SURİ S., MÖNKKÖNEN J., TASKİNEN M., PESONEN J., BLANK M. A., PHIPPS R. J., ROGERS M.J.(2001). Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of Caco-2 cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway: a model of bisphosphonate-induced gastrointestinal toxicity. *Bone.* **29**:336-343.
116. DE GROEN P. C., LUBBE D. F., HIRSCH L. J., DAIFOTIS A., STEPHENSON W., FREEDHOLM D., PRYOR-TILLOTSON S., SELEZNICK M. J., PINKAS H., WANG K. K. (1996) Esophagitis associated with the use of alendronate. *N Engl J Med.* **335**:1016-1021.
117. WALLACE J. L., DICAY M., MCKNIGHT W., BASTAKI S., BLANK M. A. (1999). N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. *Aliment Pharmacol Ther.* **13**:1675-1682.
118. BASKIC D., POPOVIC S., RISTIC P., ARSENIJEVIC N. N.. (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International.* **30**:924-932.
119. KYRGIDIS A., TRIARIDIS S., ANTONIADES K. (2009). Effects of bisphosphonates on keratinocytes and fibroblast having a role in the development of osteonecrosis of the jaw. *Bioscience Hypotheses.* **2**:153-159.

-
120. HASMIM M., BIELER G., RUEGG C. (2007). Zoledronate inhibits endothelial cell adhesion, migration and survival through the suppression of multiple, prenylation-dependent signaling pathways. *J Thromb Haemost.* **5**:166-173.
121. WERNER S., KRIEG T., SMOLA H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* **127**:998-1008.
122. ALLEN M. R., BURR D. B. (2009). The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg.* **67**:61-70.
123. MARX R. E. (2009). Reconstruction of defects caused by bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* **67**:107-119.
124. FERLITO S., PUZZO S., LIARDO C. (2011). Preventive protocol for tooth extractions in patients treated with zoledronate: a case series. *J Oral Maxillofac Surg.* (Article in Press)
125. KIM R. H., LEE R.S., WILLIAMS D., BAE S., WOO J., LIEBERMAN M., OH J. E., DONG Q., SHIN K. H., KANG M. K., PARK N. H. (2011) Bisphosphonates induce senescence in normal human oral keratinocytes. *J Dent Res.* (Article in Press)
126. HOEFERT S., EUFINGE H. (2011). Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg.* **69**:362-380.
127. Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy. 2008 Expert panel recommendations of American Dental Association Council on Scientific Affairs.
128. ZIEBART T., KOCH F., KLEIN M.O., GUTH J., ADLER J., PABST A., AL-NAWAS B., WALTER C.. (2011). Geranylgeraniol – A new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *Oral Oncology.* **47**:195–201.

-
129. FIZAZI K., CARDUCCI M., SMITH M., DAMIÃO R., BROWN J., KARSH L., MILECKI P., SHORE N., RADER M., WANG H., JIANG Q., TADROS S., DANSEY R., GOESSL C. (2011). Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet*. **377**:813-822.
130. RIZZOLI R., LAROCHE M., KRIEG M. A., FRIELING I., THOMAS T., DELMAS P., FELSENBERG D. (2010). Strontium ranelate and alendronate have differing effects on distal tibia bone microstructure in women with osteoporosis. *Rheumatol Int*. **30**:1341-1348.
131. RIZZOLI R., REGINSTER J. Y., BOONEN S., BRÉART G., DIEZ-PEREZ A., FELSENBERG D., KAUFMAN J. M., KANIS J. A., COOPER C. (2011). Adverse reactions and drug-drug interactions in the management of women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. (Article in pres)
132. BRANDI M. L. (2010). Sustained vertebral antifracture efficacy of oral anti-osteoporotic therapies in postmenopausal osteoporosis. *Curr Med Res Opin*. **26**:2553-2563.
133. DROZDZOWSKA B. (2011). Osteonecrosis of the jaw. *Endokrynol Pol*. **62**:88-92.
134. SONG K., MIN Y., LEE J., LEE K., JOO H., KWACK K., CHUNG Y. (2008). A probable case of oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw and recovery with parathyroid hormone treatment. *Current Therapeutic Research*. **69**:356-562.

-
135. JEFFCOAT M., WATTS N.B. (2008). Osteonecrosis of the jaw: balancing the benefits and risks of oral bisphosphonate treatment for osteoporosis. *General Dentistry*. **56**:96–102.