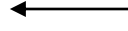
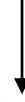


Adınızı soyadınızı giriniz

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



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



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**ZOLEDRONİK ASİT VERİLEN SIÇANLARDA DİŞ
ÇEKİMİ SONRASI ANJİYOGENEZ TETİKLEYİCİ
PARTİKÜL İÇEREN HİDROJELİN KEMİK
İYİLEŞMESİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

OSMAN NİHAT ÖZER

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. MUSTAFA RAMAZANOĞLU**

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

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN



İTHAF

Her zaman yanımda olan aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimde mesleki bilgi ve becerilerimi geliştirmemde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışma sürecimde değerli fikirlerinden yararlandığım, öğrencisi olmaktan ve birlikte çalışmaktan her zaman onur duyduğum danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa RAMAZANOĞLU'na,

Desteklerinden dolayı kendilerine bir ömür minnettar kalacağım hocam Sayın Prof. Dr. Osman GÜMRÜ'ye ve Sayın Prof. Dr. Buket AYBAR'a,

Tez çalışmamın fikir temelini geliştiren ve katkılarını, desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Gamze Torun KÖSE'ye,

Yoğun çalışma temposuna rağmen doktora tezimin histopatolojik bulgularının değerlendirilmesindeki ve yorumlanmasındaki emeklerinden dolayı Sayın Doç. Dr. Vakur OLGAÇ'a,

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan Sayın Dr. Görke GÜREL'e,

Çalışmamın radyolojik bulgularının elde edilmesinde emeği olan Biyomühendis Göker KÜLÜŞLÜ'ye

Doktora eğitimim boyunca desteklerini her zaman gördüğüm Dr. Kadir Akın KAYGUN, Dr. Mustafa Erdem YAZICI, Dt. Hüsna AKTÜRK ve isimlerini yazamadığım diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Bugüne gelmemde büyük pay sahibi olan, sevgilerini bana her zaman gösteren, emekleri ve fedakarlıkları için canım annem Aysel ÖZER ve canım babam Ali İrfan ÖZER'e ve biricik kardeşim Dr. Mustafa Orhan ÖZER'e,

Hayatıma girdiği günden beri beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, en karanlık anlarda varlığıyla yolumu aydınlatan ve bana umut veren kıymetli eşim Seda Nur ÖZER'e

Tez çalışmamın başında aramıza katılan, hayatıma anlam katan ve canımdan çok sevdiğim biricik kızım Miray Berra ÖZER'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. BİFOSFONATLAR.....	4
2.1.1. Bifosfonatların Tarihçesi.....	4
2.1.2. Bifosfonatların Kimyasal Yapısı.....	4
2.1.3. Bifosfonatların Sınıflandırılması.....	5
2.1.3.1. Kimyasal Yapılarına Göre Bifosfonatların Sınıflandırılması.....	5
2.1.3.2. Jenerasyonlarına Göre Bifosfonatların Sınıflandırılması.....	5
2.1.3.3. Etkinlik Derecelerine Göre Bifosfonatların Sınıflandırılması	6
2.1.3.4. Veriliş Yollarına Göre Bifosfonatların Sınıflandırılması.....	6
2.1.3.5. Moleküler Düzeydeki Etkisine Göre Bifosfonatların Sınıflandırılması.....	6
2.1.4. Bifosfonatların Farmakokinetiği	6
2.1.5. Bifosfonatların Farmakodinamiği	7
2.1.5.1. Bifosfonatların Antianjiyogenik Etkileri.....	10
2.1.6. Bifosfonatların Endikasyonları	13
2.1.7. Bifosfonatların Yan Etkileri.....	14
2.2. Bifosfonatların Kullanımına Bağlı Çene Osteonekrozu	15
2.2.1. BRONJ Patofizyolojisi.....	16
2.2.2. BRONJ Risk Faktörleri	18
2.2.3. BRONJ Teşhisinde Bulgular.....	19

2.2.3.1. Klinik Bulgular.....	19
2.2.3.2. Radyolojik Bulgular	20
2.2.3.3. Histolojik Bulgular.....	20
2.2.3.4. Mikrobiyolojik Bulgular	20
2.2.4. BRONJ Evre ve Tedavi Yaklaşımları.....	21
2.3. Dış Çekim Yarasının İyileşmesi	22
2.4. PLGA-PEG-PLGA ve GS4012.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Deney Hayvanları	27
3.2. Çalışma Grupları.....	27
3.3. İlaçların Hazırlanması ve Uygulanması.....	28
3.4. Cerrahi Girişim	30
3.5. Işık Mikroskobu Takibi ve Değerlendirme Kriterleri.....	31
3.6. Radyolojik Değerlendirme.....	33
3.7. İstatiksel Değerlendirme	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. İstatiksel Bulgular	39
4.1.1. Deney Hayvanlarının Ağırlık Bulguları.....	39
4.1.2. Histopatolojik Bulgular.....	40
4.1.2.1. İltihap	40
4.1.2.2. Fibrozis.....	42
4.1.2.3. Epitel Proliferasyonunun Defekti Kapatma düzeyi.....	44
4.1.2.4. Nekroz	47
4.1.2.5. Yeni Kemik Yapımı	49
4.1.3. Radyolojik Bulgular.....	51
4.1.3.1. Kemik Mineral yoğunluğu (BMD)	51
4.1.3.2. SMI.....	53
4.1.3.3. Hacim	54
4.1.3.4. Kökler arası doku kalınlığı.....	56
4.1.3.5. Kortikal kemik kalınlığı	57
4.2. Işık Mikroskobu Değerlendirmeleri.....	59
5. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	77

ETİK KURUL KARARI	98
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	99
ÖZGEÇMİŞ	100



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Günümüzde en çok kullanılan bifosfonatlar	14
Tablo 2-2: MRONJ ile ilişkili ilaçların listesi	16
Tablo 2-3: MRONJ evrelendirme ve tedavi yaklaşımı	21
Tablo 3-1: Deney hayvanlarının gruplandırılması	27
Tablo 4-1: 4. haftada sakrifiye edilen grupların ağırlık açısından karşılaştırılması	39
Tablo 4-2: 6. haftada sakrifiye edilen grupların ağırlık açısından karşılaştırılması	40
Tablo 4-3: İltihap düzeylerinin değerlendirilmesi	40
Tablo 4-4: İltihap düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi	41
Tablo 4-5: Fibrozis düzeylerinin değerlendirilmesi	42
Tablo 4-6: Fibrozis düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi	43
Tablo 4-7: Epitel proliferasyonunun defekti kapatma oranı düzeylerinin değerlendirilmesi	44
Tablo 4-8: Epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi	45
Tablo 4-9: Nekroz düzeylerinin değerlendirilmesi	47
Tablo 4-10: Nekroz düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi	47
Tablo 4-11: Yeni kemik yapımı düzeylerinin değerlendirilmesi	49
Tablo 4-12: Yeni kemik yapımı düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi	49
Tablo 4-13: BMD düzeylerinin değerlendirilmesi	51
Tablo 4-14: SMI düzeylerinin değerlendirilmesi	53
Tablo 4-15: Hacim düzeylerinin değerlendirilmesi	54
Tablo 4-16: Kökler arası doku kalınlığı düzeylerinin değerlendirilmesi	56
Tablo 4-17: Kortikal kemik kalınlığı düzeylerinin değerlendirilmesi	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Pirofosfatların kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2-2: Bifosfonatların kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2-3: Bifosfonatların mevalonat yolunu inhibe etmeleri.....	9
Şekil 2-4: Anjiyogenez sürecindeki basamaklar.....	10
Şekil 2-5: PLGA-PEG-PLGA kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2-6: Gözenekli ağ yapısını gösteren PLGA–PEG–PLGA hidrojelinin temsili kriyo-SEM görüntüsü	24
Şekil 2-7: GS4012 kimyasal yapısı.....	25
Şekil 3-1: Deney planı	28
Şekil 3-2: ZOL intraperitoneal enjeksiyonu	28
Şekil 3-3: GS4012 (Merck K GaA, Darmstadt, Almanya).....	29
Şekil 3-4: PLGA-PEG-PLGA Hidrojel (Sigma-Aldrich, Almanya)	29
Şekil 3-5: Mandibuler sol 1. ve 2. azı dişlerin çekim soketleri	30
Şekil 3-6: PLGA-PEG-PLGA ve GS4012'nin sertleştikten sonraki görünümü.....	31
Şekil 3-7: SkyScan 1174v2 (Kontich- Belgium) bilgisayarlı tomografi cihazı.....	33
Şekil 3-8: NRecon'da görüntünün analize hazırlanması - rekonstrüksiyon işlemi	35
Şekil 3-9: CTAn programı ile analizi yapılacak alanın belirlenmesi (ROI seçimi).....	35
Şekil 3-10: CTAn programı	36
Şekil 3-11: CTAn rogramı ile analiz yapılan bölgede siyah-beyaz alan içerisinde thresholdin belirlenmesi.....	36
Şekil 3-12: CTAn programı analizi ile elde edilen sonuçlar	37
Şekil 3-13: İyileşmenin olmadığı (a), kısmen görüldüğü (b) ve tamamlandığı (c) radyolojik görüntüler	37
Şekil 4-1: Gruplar arasında iltihap bulgularının karşılaştırılması.....	42
Şekil 4-2: Gruplar arasında fibrozis bulgularının karşılaştırılması.....	44
Şekil 4-3: Gruplar arasında epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeylerinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 4-4: Gruplar arasında nekroz bulgularının karşılaştırılması	48
Şekil 4-5: Gruplar arasında yeni kemik yapım bulgularının karşılaştırılması	51
Şekil 4-6: Gruplar arasında BMD bulgularının karşılaştırılması.....	52

Şekil 4-7: Gruplar arasında SMI bulgularının karşılaştırılması.....	54
Şekil 4-8: Gruplar arasında hacim bulgularının karşılaştırılması	55
Şekil 4-9: Gruplar arasında kökler arası doku kalınlığı bulgularının karşılaştırılması....	57
Şekil 4-10: Gruplar arasında kortikal kemik kalınlığı bulgularının karşılaştırılması	58
Şekil 4-11: Diş çekim boşluğu büyük oranda fibröz bağ dokusu ve içinde yeni kemik trabekülleri ile doludur. Yüzey epiteli ise soketi yaklaşık yarı yarıya örtmüş durumdadır. Soket içinde nekrotik doku ve besin artıkları vardır (Kontrol grubu 4. hafta, H&E X40)	59
Şekil 4-12: Çekim socketinin büyük oranda yeni kemik yapımı ve fibröz bağ dokusu ile dolduğu, yüzey epitelinin rejenere olarak çekim socketini örttüğü izlenmektedir (Kontrol grubu 6. hafta, H&E X40)	60
Şekil 4-13: Çekim socketinde iltihap hücresi infiltrasyonu içeren bağ dokusu içinde bir bölümü nekrotik kemik trabekülleri, çevrede kanama alanları ve fibrin demetleri izlenmektedir (ZOL grubu 4. hafta, H&E x40)	61
Şekil 4-14: Çekim socketinde nekrotik doku artıkları, büyük bölümü nekrotik kemik trabekülleri izlenmektedir. Bunların çevresinde yoğun iltihap hücresi proliferasyonu içeren bağ dokusu saptanmaktadır. Yüzey epitelinin bağ dokusu içine doğru proliferasyonu dikkati çekmektedir (ZOL grubu 6. hafta, H&E X40)	62
Şekil 4-15: Çekim socketinin büyük oranda yenik kemik ve fibröz doku ile dolmuş durumda olduğu ve yüzey epitelinin çekim boşluğunu yarı yarıya örttüğü gözlenmektedir. Aradaki fibröz dokuda ise iltihap hücresi infiltrasyonu vardır (GS4012 grubu 4. hafta, H&E X40)	63
Şekil 4-16: Çekim socketinin tamamıyla fibröz bağ dokusu ile dolduğu, bu doku içinde yeni kemik trabeküllerinin bulunduğu görülmektedir. Yüzey epiteli diş çekim boşluğunu tamamıyla örtmüş durumdadır (GS4012 grubu 6. hafta, H&E X40).....	64
Şekil 4-17: Çekim boşluğunda fibröz bağ dokusu içinde nekrotik kemik trabekülleri izlenmektedir. Yüzey epiteli çekim boşluğu kenarlarından derine doğru proliferasyon olmaktadır (ZOL+GS4012 grubu 4. hafta, H&E X40).....	65
Şekil 4-18: Çekim socketinde yoğun iltihapsal hücre infiltrasyonu içeren bağ dokusu içinde nekrotik kemik trabekülleri yanı sıra çekim boşluğunun kenarlarında canlı yeni kemik dokusu izlenmektedir. Yüzey epiteli çekim boşluğunu yaklaşık 2/3 oranında kapatmıştır (ZOL+GS4012 grubu 6. hafta, H&E X40)	66

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BP: Bifosfonat

FDA: Food and Drug Administration

ZOL: Zoledronik asit

AAOMS: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

BRONJ: Bifosfonat kullanımına bağlı gelişen çene osteonekrozu

MRONJ: İlaça bağlı gelişen çene osteonekrozu

GS4012: Vasküler endotelyal büyüme faktörü indükleyicisi

PLGA-PEG-PLGA: Poli (laktik-ko-glikolik asit) -poli (etilen glikol) -poli (laktik-ko-glikolik asit)

ATP: Adenozin trifosfat

FPP: Farnesil pirofosfat

FPPS: Farnesil pirofosfat sentaz

GGPP: Geranilgeranil pirofosfat

GTPaz: Glutamiltranspeptidaz

IPP: İzopentil pirofosfat

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

bFGF: Temel fibroplastik büyüme faktörü

TGF-beta: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

ECM: Ekstraselüler matriks

HUVEC: İnsan umbilikal damar endotelyal hücreleri

MMP: Matriks metalloproteinaz

EPC: Endotelyal progenitör hücre

LA: Laktik asit

GA: Glikolik asit

µg: Mikrogram

kg: Kilogram

i.p.: İntraperitoneal

µl: Mikrolitre

i.m.: İntramüsküler

mg: Miligram

ml: Mililitre

µm: Mikrometre

H.E.: Hemotoksilen eozin

kVp: Kilovolt peak

µA: Mikroamper

W: Watt

mm: Milimetre

ms: Milisaniye

BMD: Kemik mineral yoğunluğu

g: Gram

mm³: Milimetreküp

ROI: Region of interest

SMI: Structure Model Index

PBS: Phosphate buffer saline

s.c.: Subkutan

i.v.: İntravenöz

°C: Santigrat

ÖZET

Özer, O.N. (2021). Zoledronik asit verilen sıçanlarda diş çekimi sonrası anjiyogenez tetikleyici partikül içeren hidrojinin kemik iyileşmesine olan etkisinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Zoledronik asit yumuşak ve sert dokudaki yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle çene osteonekrozu gelişimine neden olan ilaçların başında gelmektedir. Bu durumun etyolojisi, risk unsurları, klinik seyri ve etkin tedavi yöntemleri günümüzde halen tartışılmaktadır. Bu tez çalışmasında, zoledronik asit verilen sıçanlarda VEGF indükleyicisi olan GS4012 biyomateryalini içeren PLGA-PEG-PLGA hidrojinin kemik iyileşmesine olan etkisini anlamak amaçlanmıştır. Çalışmamızda 48 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları her grupta 12 sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba dağıtılarak çalışma grupları ve kontrol grubu oluşturuldu. Her grup sakrifikasyon zamanına göre iki alt gruba ayrıldı. 1. grupta sadece diş çekimleri takiben kemik defektleri oluşturuldu. 2. grupta ise sıçanlara zoledronik asit enjeksiyonu sonrasında diş çekimleri ile birlikte kemik defektleri oluşturuldu. 3. grupta ise sıçanlara diş çekimleri ile birlikte oluşturulan kemik defektlerine PLGA-PEG-PLGA hidrojel içinde GS4012 bileşiği 10 µg/kg dozunda lokal olarak uygulandı. 4. grupta sıçanlara zoledronik asit enjeksiyonu sonrasında diş çekimlerinden sonra yine aynı doz PLGA-PEG-PLGA hidrojel içinde GS4012 bileşiği lokal olarak uygulandı. Zoledronik asit, uygulandığı gruplarda her bir hayvana 7.5 µg/kg doz ve haftada bir olmak üzere toplamda 4 kez intraperitoneal olarak verildi. Kemik iyileşmesini histopatolojik ve radyolojik olarak değerlendirebilmek amacıyla diş çekimlerini takiben 4. ve 6. haftada sakrifikasyonlar gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Sonuç olarak; GS4012'nin PLGA-PEG-PLGA hidrojelinde lokal olarak sürekli salımıyla zoledronik asidin yumuşak doku üzerindeki olumsuz etkilerini ortadan kaldıracak bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: zoledronik asit, sıçan, osteonekroz, ilaç taşıyıcı sistemler, vasküler endotelial büyüme faktörü indükleyicisi

ABSTRACT

Ozer, O.N. (2021). Investigation of the effect of hydrogel containing angiogenesis triggering particle on bone healing after tooth extraction in zoledronic acid treated rats. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Oral Surgery, PhD thesis, İstanbul.

Zoledronic acid is one of the drugs that cause the development of osteonecrosis of the jaw due to its negative effects on wound healing in soft and hard tissues. The etiology, risk factors, clinical course and effective treatment methods of this condition are still discussed today. The purpose of this study was to understand the effect of PLGA-PEG-PLGA hydrogel containing GS4012 biomaterial, which is a VEGF inducer, on bone healing in rats given zoledronic acid. In our study forty eight adult male Sprague-Dawley rats were used. Study groups and control groups were formed by randomly distributing the experimental animals into 4 groups, with 12 rats in each group. Each group was divided into two subgroups according to the time of sacrifice. In the first group, bone defects were created only after tooth extraction. In the second group, bone defects were created together with tooth extraction after zoledronic acid injection in rats. In the third group, GS4012 compound in PLGA-PEG-PLGA hydrogel at a dose of 10 µg/kg was applied locally to the bone defects formed with tooth extraction in rats. In the fourth group, after zoledronic acid injection, GS4012 compound in the same dose of PLGA-PEG-PLGA hydrogel was applied locally after tooth extraction. Zoledronic acid was given intraperitoneally to each animal at a dose of 7.5 µg / kg and once a week for a total of 4 times in the groups. In order to evaluate bone healing histopathologically and radiologically, sacrifices were performed at the 4th and 6th weeks after tooth extraction. IBM SPSS Statistics 22 (SPSS IBM, Turkey) programs were used for statistical analysis. As a result, it has shown that GS4012 has the potential to eliminate the negative effects of zoledronic acid on soft tissue by locally sustained release in the PLGA-PEG-PLGA hydrogel.

Key Words: zoledronic acid, rat, osteonecrosis, drug delivery systems, vascular endothelial growth factor inducer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlk olarak 1865 yılında Alman kimyagerler tarafından sentezlenen bifosfonatlar (BP), kalsiyum iyonlarının şelasyonunu kolaylaştıran pirofosfatların sentetik analoglarıdır (Rogers ve ark. 2000; Cremers ve ark. 2005). Bifosfonat türevi ilaçların arasında en güçlü etkiye sahip olan zoledronik asit, 2001 yılında Food and Drug Administration (FDA) tarafından onay alındıktan sonra ilk kez maligniteye bağlı hiperkalseminin tedavisinde kullanılmıştır. Zoledronik asit, daha sonraki yıllarda ise antineoplastik ajan olarak multiple myelom ve kemik metastazı olan tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biri haline gelmiştir (Russell 2011).

Bifosfonatlar, osteoklastların hücrel fonksiyonlarının inhibisyonuna veya osteoklast apoptozuna neden olarak kemik rezorpsiyonunun azalmasına dolayısıyla da kemik döngüsünü inhibe etmesiyle sonuçlanan bir biyolojik etkiye sahiptir (McLeod ve ark. 2012). Ayrıca bifosfonatlar, vasküler obliterasyona neden olarak anjiyogenezi engelleyecek aktiviteye de sahiptir (Maurer ve ark. 2011).

Terapötik etkilerinden dolayı sık uygulanan bifosfonatların kullanımına bağlı olarak erken dönemde akut faz reaksiyonları, gastrointestinal ve renal yan etkilere neden olduğu bilinirken (Shannon ve ark. 2011), ilk kez Marx ve Stern (2002) tarafından çene kemiklerinde osteonekroz vakaları bildirilmiştir. İlk olarak kanser hastalarında karşılaşılan bu klinik tablonun kullanılan kematerapötik ilaçlar ve steroidler nedeniyle meydana geldiği düşünülmüştür (Hellstein ve Marek 2005). Fakat zamanla herhangi bir etyolojik neden olmadığı halde sadece bifosfonat grubu ilaç alan hastalarda da bu klinik tablonun görülmesi, bifosfonat kullanımı ile ilişkilendirilmesine neden olmuş ve literatürde olgu raporlarının sayısı ise artmaya başlamıştır.

İlacın bu yan etkisi öğrenildikten sonra tedavisinde standardizasyon sağlanması ve vakaların sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) tarafından 2009 yılında bir bildiri yayınlanmıştır. Bu bildiriye göre, 'Bifosfonat kullanımına bağlı gelişen çene osteonekrozu' (BRONJ); çenelerine radyoterapi almamış olan bifosfonat kullanmış veya kullanmakta olan hastalarda mandibula veya maksillada 8 haftadan daha fazla süren kemik ekspozu ile karakterize bir klinik durum olarak tanımlanmıştır (Ruggiero ve ark. 2009). 2014 yılında ise AAOMS yayınladığı bildiride bu terimi 'İlaca bağlı

gelişen çene osteonekrozu' (MRONJ) olarak tanımlamıştır (Ruggiero ve ark. 2014). Bu tanım değişikliği, antirezorptif ajanlar (Denosumab) ve antianjiyogenik ajanların (Bevasizumab, Sunitinib) kullanımından sonra literatürdeki olgu sayıları hızla artan çene kemiklerinde osteonekroz yayınlarından kaynaklanmıştır.

MRONJ gelişiminde oral cerrahi işlemler, protez kullanımına bağlı iritasyonlar ve periodontal hastalık varlığı gibi lokal faktörlerin yanı sıra; eşlik eden malignansilerin, diyabet gibi sistemik hastalıkların varlığı, kullanılan BP grubu ilacın türü, dozu, veriliş yolu, süresi ve kortikosteroid türevleri gibi sistemik faktörler de rol oynamaktadır (Brozoski ve ark. 2012).

MRONJ, hastaların yaşam kalitesini azaltan bir klinik tablo olmakla birlikte diş hekimlerini de tedavi edilmesi oldukça zor bir durumla karşı karşıya bırakmaktadır. MRONJ'un AAOMS tarafından bildirilen güncel tedavi yaklaşımındaki esas amacı; hastada var olan ağrı, ödem ve hassasiyet gibi şikayetlerini azaltmaya dayanmaktadır. Tedavi yöntemleri, hastanın mevcut durumuna göre medikal ve/veya cerrahi içeriklidir. Medikal tedavide oral antiseptik gargaralar ile ağız içi hijyenin sağlanması, uzun süreli antibiyotik ve analjezik kullanımı; cerrahi tedavide ise küretaj, sekestrotomi, geniş çene kemiği rezeksiyonları ve serbest flep operasyonları yer almaktadır (McLeod ve ark 2012). Ancak AAOMS tarafından önerilen bu tedavi protokolü her zaman başarılı sonuç vermemektedir. Bu sebeple MRONJ gelişmeden ya da oluşuktan sonra tedavisi için kemik ve yumuşak dokuda iyileşmeyi olumlu yönde etkileyebileceği düşünülen yeni yöntem ya da biyomateryaller araştırılmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız; çene osteonekrozunun oluşumuna engel olabilmek için bifosfonat ilacı verilmiş sıçanlarda diş çekimi sonrası yara bölgesine anjiyogenezi tetikleyici küçük partikül içeren hidrojel uygulamasının potansiyelini araştırmaktır. GS4012 (Merck K GaA, Darmstadt, Almanya) bir vasküler endotelyal büyüme faktörü indükleyicisidir. Yapılan araştırmalar sonucunda GS4012'nin endotelyal hücre tübülü oluşumunu başlatarak anjiyogenezi desteklediği bildirilmiştir (Peterson ve ark. 2004; Wu ve ark. 2015). GS4012'nin diş çekim soketinde kalabilmesi ve sürekli salımı için bir taşıyıcıya ihtiyaç bulunmaktadır. Mikropartikül ilaç taşıma sistemleri; tıbbi uygulamaların çoğunluğunda kullanılabilmesi, enjekte edilebilir ve hedeflenen dokuya kontrollü ilaç salımı gibi avantajları olması sebebiyle literatürde çok sık karşılaşılan konuların başında yer almaktadır (Lee ve ark. 2016).

Biz de GS4012 bileşiğinin, salımını yapabilecek ve yara bölgesinde dağılmasını önlemek amacıyla ısıya duyarlı bir PLGA-PEG-PLGA (Poly (lactic-co-glycolic acid)-poly (ethylene glycol)-poly (lactic-co-glycolic acid) (Sigma-Aldrich, Almanya) kopolimer hidrojel içinde kullanmayı amaçladık. Bifosfonatların vasküler obliterasyon ile anjiyogenezisi inhibe ederek osteonekroz oluşumundaki rolünü etkileyebilecek bu biyomateryalin lokal olarak diş çekim bölgesine uygulanmasıyla çene osteonekrozunun oluşumuna engel olacağını düşünmekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. BİFOSFONATLAR

2.1.1. Bifosfonatların Tarihçesi

1865 yılında ilk kez Almanya’da sentezlenen bifosfonatlar, antikoroziv ajan olarak petrol boru hatlarında kalsiyum tuzlarının çökmesini engellemek amacıyla kullanılmış daha sonra da tekstil, gübre ve yağ endüstrilerinde de kullanımı devam etmiştir (Fleisch 1998; Russell ve Rogers, 1999; Russell 2011).

İnsanda tedavi amaçlı ilk kez uygulanan BP olan etidronat 1897 yılında sentezlenmiş ve 1969 yılında progresif ossifikans fibrodisplazi hastalığına sahip çocukların tedavisinde kullanılmıştır (Russell 2011). BP’nin antitartar ve antiplak etkilerinden dolayı diş macunlarında da kullanımı olmuştur (Font ve ark. 2008). Tanı amaçlı ise sintigrafik tetkiklerde radyoaktif madde olan teknesyum 99m metilen difosfatın (Tc99m MDP) kemiğe taşınmasında bifosfonatların kalsiyum fosfonatlara olan yüksek afinitesinden dolayı kullanılmıştır (Tofe ve Francis 1974).

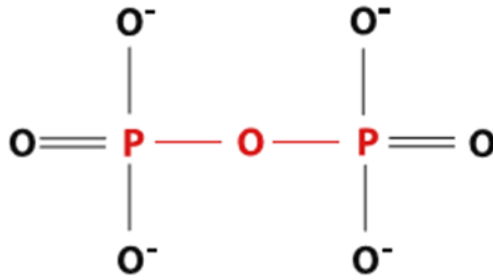
BP türevi ilaçların antianjiyogenik özellikleri ve osteoklastik aktivite üzerindeki inhibitör etkileri nedeniyle, maligniteye bağlı hiperkalseminin, solid tümörlerin kemik metastazlarında ve multiple myeloma gibi kanser ilişkili hastalıklarda; ayrıca osteoporoz, osteopeni, Paget hastalığı, osteogenezis imperfecta gibi sistemik rahatsızlıkların tedavilerinde kullanılmaktadır (Shannon ve ark. 2011)

2.1.2. Bifosfonatların Kimyasal Yapısı

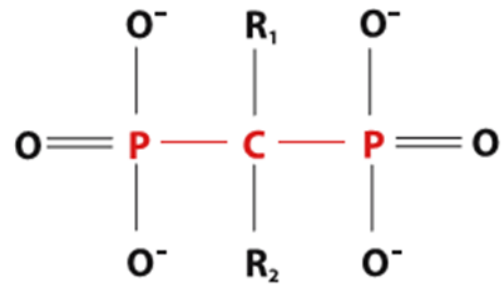
Bifosfonatlar, insan metabolizmasında fizyolojik olarak birçok sentetik reaksiyonda yan ürün olarak salınan ve kemik mineralizasyonunun endojen düzenleyicileri olan inorganik pirofosfata benzer kimyasal yapıda olan bileşiklerdir. Pirofosfatlar (P-O-P) fosfoanhidrit bağları ile bağlı iki fosfat grubundan oluşurken (Şekil 2-1), BP’ler (P-C-P) fosfoeter bağları ile bağlı iki fosfat grubunun birleşmesinden oluşur (Şekil 2-2) (Cheng ve ark. 2005; Russell ve ark. 2008).

Pirofosfatın iki fosfat molekülünü birbirine bağlayan oksijen atomu bifosfonatlarda yerini karbon atomuna bırakmıştır. Bu yer değiştirme BP’yi kimyasal açıdan stabil ve hidrolitik enzimlere karşı daha dirençli hale getirir. Böylece BP’ler vücutta metabolitlere dönüştürülemez ve değiştirilmeden atılırlar (Russell ve ark. 2008).

BP'lerin kimyasal yapısı, daha kolay modifiye olmalarına imkan tanır ve bu nedenle BP'lerin farklı jenerasyonları biyolojik, terapötik ve toksikolojik özellikleri açısından birbirinden ciddi anlamda farklılık göstermektedir (Cheng ve ark. 2005).



Şekil 2-1: Pirofosfatların kimyasal yapısı



Şekil 2-2: Bifosfonatların kimyasal yapısı

Bifosfonatlar pirofosfatlardan farklı R1 ve R2 adı verilen iki yan zincire sahiptir. Molekülün merkezindeki karbon atomuna bağlanan bu iki grubun değiştirilmesi ile farklı kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik karakterleri olan bifosfonatlar oluşturulabilmektedir (Bartl ve ark. 2007; Marx 2011). R1 yapısı genellikle hidroksil grubu içerir ve BP'ye kalsiyum ve kemik mineraline yüksek afinite kazandırarak bileşiğin kemik matriksine tutunmasını sağlarken, R2 yapısı ise BP'nin antirezorptif özelliğini belirler (Ashcroft ve ark. 2003; Papapoulos 2006).

2.1.3. Bifosfonatların Sınıflandırılması

2.1.3.1. Kimyasal Yapılarına Göre Bifosfonatların Sınıflandırması

Nitrojen içeren ve nitrojen içermeyen bifosfonatlar olmak üzere iki alt gruba ayrılır (Brunton ve ark. 2006).

Nitrojen içermeyen bifosfonatlar (Alkil bifosfonatlar): Etidronat, Klodronat, Medronat ve Tiludronat' tır.

Nitrojen içeren bifosfonatlar (Aminobifosfonatlar): Alendronat, Pamidronat, İbandronat, Risedronat ve Zoledronat'tır.

2.1.3.2. Jenerasyonlarına Göre Bifosfonatların Sınıflandırılması

Bifosfonatlar jenerasyonlarına göre başlıca 3 gruba ayrılmaktadır (Brunton ve ark. 2006):

1. jenerasyon: R2 yan zincirinde alkil türevi bulunan etidronatın, klor türevi bulunan klodronatın ve klorofenil grubu bulunan tiludronatın temsil ettiği gruptur. Bu bifosfonatların etkinliği daha az ve antirezorptif aktivitesi daha zayıftır.

2. jenerasyon: Nitrojen içeren aminobifosfonatlardan alendronat ve pamidronatın temsil ettiği gruptur.

3. jenerasyon: Nitrojen içeren aminobifosfonatlardan olan ibandronatın, zoledronatın ve risedronatın temsil ettiği gruptur.

2.1.3.3. Etkinlik Derecelerine Göre Bifosfonatların Sınıflandırılması

BP'ler, aktivitelerine göre değerlendirilirken nitrojen içermeyen bir BP olan etidronata göre potens sıralaması yapılmaktadır (Fleisch 1998; Papapoulos 2006). Etidronatın sıçanlarda kemik rezorpsiyonunu inhibe etme gücü yani potensi 1 birim olarak kabul edildiğinde, bu etki klodronatta 10, tiludronatta 50, alendronat, risedronat ve ibandronatta 1000, pamidronatta 1000-5000 ve zoledronatta ise 10.000+ birim olarak kabul edilmektedir (Marx 2011).

2.1.3.4. Veriliş Yollarına Göre Bifosfonatların Sınıflandırılması

BP'ler veriliş yoluna göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Oral yoldan verilen BP'ler; risedronat, alendronat, tiludronat ve etidronat iken, ibandronat ve klodronat ise hem oral hem de intravenöz yoldan verilebilmektedir. İntravenöz verilen BP'ler ise pamidronat ve zoledronik asittir (McLeod ve ark. 2007).

2.1.3.5. Moleküler Düzeydeki Etkisine Göre Bifosfonatların Sınıflandırılması

Nitrojen içermeyen BP'ler (etidronat, klodronat, tiludronat) intraselüler olarak metabolize edilerek adenozin trifosfatın sitotoksik, hidrolize edilemeyen analoglarına dönüşürler. Nitrojen içeren BP'ler (alendronat, risedronat, pamidronat, ibandronat ve zoledronik asit) ise guanazin trifosfat bağlayıcı proteinlerin fonksiyonlarını inhibe ederler. Nitrojen içeren BP'lerin antirezorptif etkileri çok daha güçlüdür (Russell 2011).

2.1.4. Bifosfonatların Farmakokinetiği

Bifosfonatlar oral yoldan alındığında, emilimleri parasellüler geçiş ile düşük oranlarda bağırsaklardan gerçekleşir. Bifosfonatlar arasında absorpsiyon açısından çok önemli farklar bulunmamaktadır (Lin 1996; Fleisch 1998; 2000; Russell ve Rogers 1999; Cremers ve Papapoulos 2011). Oral biyoyararlanımı çok düşük olan

bifosfonatların sistemik biyoyararlanımı ise %1'in altındaki değerler ile %10 arasında değişiklik göstermektedir (Lacy ve ark. 2003) .

Oral biyoyararlanımı arttırmak amacıyla yapılan birçok çalışma başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Gertz ve ark. 1995). Bifosfonatların emilimi yiyeceklerle alındığında, özellikle kalsiyum ve demir varlığında önemli ölçüde azalır (Lacy ve ark. 2003; Chapurlat ve Delmas 2006). Bifosfonatlar oral olarak uzun süreli açlıktan sonra alınmalı ve sonrasında 30–60 dakika herhangi bir şey yenilip içilmemelidir (Watts ve Diab 2010).

Radyoaktif işaretleme metoduyla yapılan çalışmalarda bifosfonatların böbreklerden hemen atılmadığını, öncesinde kemikte ve az miktarda dalak, böbrek ve karaciğerde dağılımının olduğu gösterilmiştir (Cremers ve Papapoulos 2011).

Nitrojen içeren veya içermeyen bifosfonatların metabolizasyon ve atılım yolları farklılık göstermektedir. Nitrojen içermeyen bifosfonatlar hidrolize edilemeyen, sitotoksik adenosin trifosfatın (ATP) analoglarına metabolize olurlar. Bu toksik yan ürünlerin osteoklast içerisinde birikmeleri sonucunda mitokondriyal fonksiyon azalır ve osteoklast apoptozu meydana gelir. Nitrojen içeren ve etkinliği daha yüksek olan bifosfonatlar ise metabolize edilmeden kemiğe bağlanarak dolaşıma yavaşça salınırlar (Cremers ve Papapoulos 2011; Russell 2011).

İlacın büyük kısmı (%80) hızla böbreklerden ve çok küçük kısmı safra yolu ile atılırken bir kısmı da (%20) iskeletsel yapıya geçerek dolaşımdan uzaklaşır (Cremers ve Papapoulos 2011).

İskelet sistemine ulaşan bifosfonatlar, osteoklastik rezorpsiyon sonucu hidroksiapatitten ayrılır. Fakat açığa çıkan bu bifosfonatlar kemik tarafından tekrar alınabilir veya devam eden kemik oluşumu sırasında kan dolaşım yoluyla tekrar kemiğe ulaşabilirler. Bu nedenle bifosfonatların iskeletsel düzeydeki yarı ömürleri çok fazla olmaktadır (Frith ve ark. 1997; Drake ve Cremers 2010; Cremers ve Papapoulos 2011).

2.1.5. Bifosfonatların Farmakodinamiği

Bifosfonatların temel biyolojik etkisi kemik rezorpsiyonunu inhibe etmektir. Böylece kemik döngüsünü ve yenilenmesini azaltarak antirezorptif etki meydana gelir (Marx ve ark. 2005). Bu etki mekanizması günümüzde tam olarak bilinmemesine rağmen, yapılan çalışmalarda bifosfonatların osteoklast inhibisyonuna ve/veya

dönüşümsüz hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Bifosfonatların farmakodinamiğini doku, hücre ve moleküler düzeyde ele almak gerekmektedir (Hughes ve ark. 1989; Watts 2001).

Bifosfonatların doku düzeyindeki temel etkisi, kemik döngüsünü azaltarak kemiğin yıkımının engellenmesi sonucunda kemik yapımı ile yıkımı arasındaki dengenin bozulmasına yöneliktir (Hughes ve ark. 1989 ; Stresing ve ark. 2011).

Hücresel düzeyde bifosfonatların osteoklastları aşağıdaki yollar ile etkilediği düşünülmektedir (Fleisch 2000; Watts 2001):

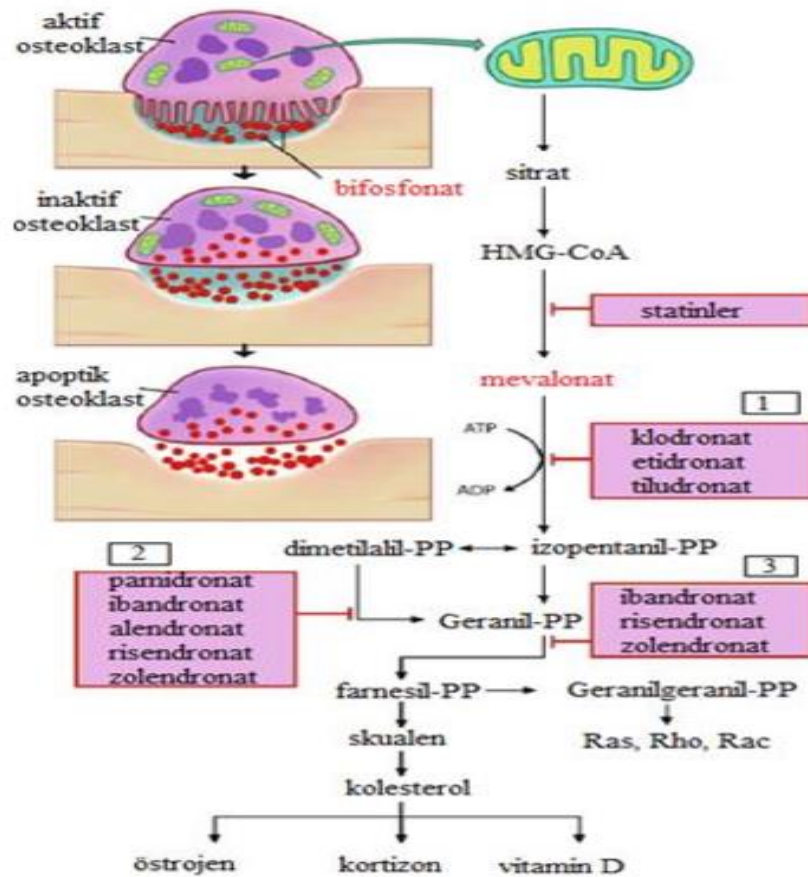
- 1- Osteoklast öncül hücrelerinin aktivasyonunun inhibe edilmesiyle öncül hücrelerin olgun osteoklastlara dönüşümünün engellenmesi,
- 2- Osteoklastın kemiğe kemotaksisinin ve tutunmasının engellenmesi,
- 3- Osteoklast aktivitesinin inhibe edilmesi,
- 4- Osteoklastın erken apoptoz nedeniyle yaşam süresinin kısalması.

Moleküler düzeyde ise bifosfonatlar yapısında nitrojen grubu varlığına göre osteoklastları iki farklı mekanizma ile etkilediği ileri sürülmüştür (Sato ve ark. 1991; Russell ve Rogers 1999; Altundal ve Güvener 2004).

Nitrojen içermeyen bifosfonatlar, osteoklastlar tarafından metabolize edilerek hidrolize edilemeyen adenosin trifosfat (ATP) analoglarına dönüşür. Sitotoksik olan bu metabolitlerin hücre içinde birikimi sonucunda osteoklast fonksiyonu inhibe edilir ve osteoklast apoptozu gerçekleşir (Van Beek ve ark. 1999).

Nitrojen içeren bifosfonatlar ise farklı bir mekanizma üzerinden osteoklastların aktivitesini ve canlılığını etkiler. Bifosfonatlar hücre içine alındıktan sonra, osteoklastların fonksiyonu için gerekli olan kolesterolün biyosentezindeki mevalonat yolunun önemli bir enzimi olan farnesil difosfat sentazı inhibe ederek etki gösterirler (Şekil 2-3) (Frith ve ark. 1997). Osteoklastlar, mevalonat yolu sırasında farnesil pirofosfat ve farnesil pirofosfattan (FPP) oluşan geranilgeranil pirofosfat (GGPP) gibi izopren ara bileşiklerini ana hücre içi proteinlerden bir sinyal proteini olan glutamiltranspeptidazları (GTPaz) modifiye ve aktive etmek için kullanırlar. Bu 15C zincirine sahip FPP ve 20C zincirine sahip GGPP' nin spesifik sinyal proteinlerine (Ras, Rho, Rac) transfer olmasına prenilasyon prosesi denilmektedir (Luckman ve ark. 1998;

Russell ve Rogers 1999; Altundal ve Güvener 2004; Rogers ve ark. 2011). Sonuç olarak; nitrojen içeren bifosfonatların mevalonat yolundaki majör enzimlerden olan farnesil pirofosfat sentazı (FPPS) inhibe etmesiyle FPP oluşumuna engel olmakta dolayısıyla da GGPP inhibisyonuna neden olduğundan hücre proliferasyonu, canlılık süresi ve iskeletsel organizasyondan sorumlu sinyal proteinlerinin prenilasyonu gerçekleşemediği için osteoklast fonksiyonu engellenmekte ve osteoklastların apoptozu meydana gelmektedir (Fisher ve ark. 1999; Green 2004). Ayrıca FPPS inhibisyonu sonucu izopentil pirofosfatların (IPP) birikimine neden olarak osteoklastların apoptozunu indükleyen App1 (ATP analogu) oluşumuna neden olur. Aynı zamanda biriken IPP'ler intravenöz olarak verilen bifosfonatların geliştirdiği akut faz reaksiyonlarından da sorumludur (Russell ve ark. 2008).

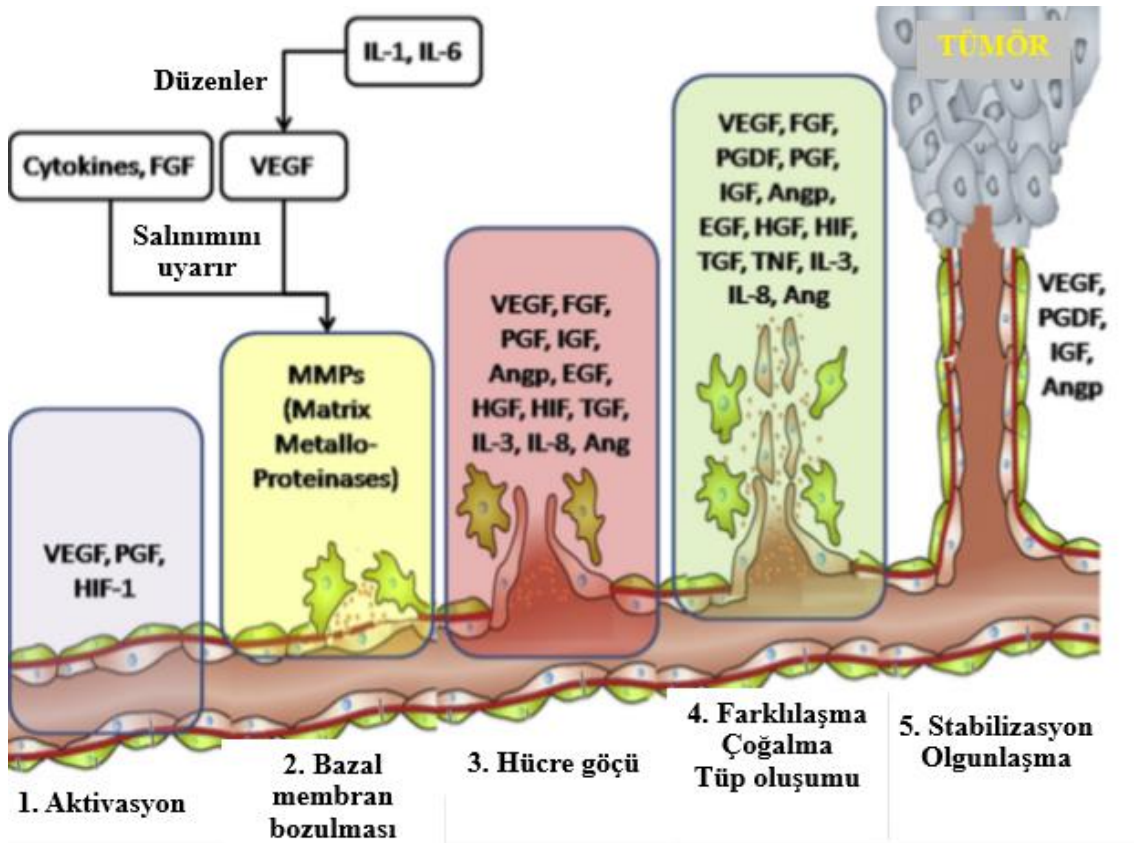


Şekil 2-3: Bifosfonatların mevalonat yolunu inhibe etmeleri - Bartl ve ark. (2007)'dan

Bifosfonatların antirezorptif etkisinin yanı sıra tümorosidal ve antianjiyogenik etkilerinin de olması nedeniyle klinik açıdan geniş bir endikasyonunun olduğunu ifade etmek gerekmektedir.

2.1.5.1. Bifosfonatların Antianjiyogenik Etkileri

Anjiyogenez, yeni kan damarları oluşturmak için endotel hücrelerinin büyümesini, göçünü ve farklılaşmasını içeren bir süreçtir (Ruggiero ve ark. 2014). Anjiyogenez sürecinde birçok olay basamaklar şeklinde birbirini izler (Şekil 2-4) (Gacche ve Meshram 2013).



Şekil 2-4: Anjiyogenez sürecindeki basamaklar – Gacche ve Meshram (2013)' dan

Anjiyogeneze neden olan bir uyarın (hipoksi veya iskemi); VEGF, bFGF, TGF-beta, PDGF gibi anjiyogenik faktörlerinin salınmasına neden olur. Ekstraselüler matriks (ECM) ve matriksi çevreleyen hücrelerden, endotel hücrelerinden, tümör hücrelerinden salınan bu büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörlerinin endotel hücrelerini

uyarmaları sonucunda anjiyogeneze neden olan metabolik süreç başlar (Adair ve Montani 2010).

Mevcut damarların indüklenmeleri için ekstraselüler matriksin ve bazal membranın parçalanması gerekir. Bu nedenle endotel, inflamatuvar ya da tümör hücrelerinden serin proteaz ve metalloproteinaz gibi proteolitik enzimler salgılanır (Bloemendal ve ark. 1999). Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen bu proteolitik enzimler, bazal membranın ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin yıkımına neden olurlar (Bloemendal ve ark. 1999; Konukoğlu ve Turhan 2005). ECM'deki proteolitik yıkımdan hemen sonra endotel hücreleri, parçalanmış matriks içine göç etmeye başlar (Konukoğlu ve Turhan 2005). Normalde endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka halinde görülürken, anjiyogenez sırasında çoğalıp yayılma gösterirler. Anjiyogenez sürecinde vasküler hücrelerin yüzeyinde bulunan, hücre-ECM ve hücre-hücre arasındaki etkileşimde önemli rol oynayan avbeta3 ve avbeta5 gibi adezyon molekülleri, uyarılmış endotel hücreleri tarafından indüklenir. Çoğalan endotel hücreleri, integrinler aracılığıyla diğer endotel hücreler ile sıkı bağlantı kurarlar ve böylece tüp oluşumunu gerçekleştirirler (Pepper 1997; Bloemendal ve ark. 1999). Daha sonra çoğalma durur, hücreler morfolojilerini değiştirerek bir lümen oluşturacak şekilde birbirlerine sıkıca tutunur. Çoğunlukla perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin endotele katılması ve yeni bazal membranın sentezlenmesi ile anjiyogenez süreci tamamlanır (Kılıç ve ark. 2005). Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve dolayısıyla daha ileri yayılım mümkün olur. Damar olgunlaştıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış görülür. Böylece endotel hücreleri geri plana geçerken, damarlardan kan akımı başlayabilir (Konukoğlu ve Turhan 2005).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ailesi ve reseptörleri, anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve vasküler geçirgenliğin temel düzenleyicileridir (Bisacchi ve ark. 2003). Bu protein ailesi; endotelyal hücre çoğalması, ECM bozulması, endotelyal hücre göçü, çoğalması ve tüp oluşumu dahil olmak üzere anjiyogenezde çeşitli yönlerde yeri doldurulamaz bir rol oynamaktadır (Gacche ve Meshram 2013).

VEGF, osteogenez ve anjiyogenezin birleştirilmesi için de gereklidir. VEGF; endotel hücrelerini kemik dokusuna doğru çeken, osteoblast ve osteoklastların

farklılaşmasını ve fonksiyonlarını doğrudan kontrol eden kemotaktik bir molekül olarak işlev görür (Gao ve ark. 2019).

Bifosfonatların antirezorptif etkilerinin yanı sıra antianjiyogenik etkilerinin de olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Özellikle nitrojen içeren bifosfonatların direkt olarak endotelial hücrelere etki etmesiyle hücre göçünü, proliferasyonu ve tüp oluşumu gibi anjiyogenezin temel aşamalarına engel olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Stressing ve ark. 2011). Wood ve ark. (2002) tarafından insan umbilikal damar endotelial hücreleri (HUVEC) ile yapılan bir in vitro çalışmada zoledronik asidin dozuna bağlı olarak temel fibroblastik büyüme faktörü (bFGF) ile indüklenen HUVEC'lerin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir.

Pamidronat ve zoledronik asit verilen kemik metastazı olan kanser hastalarında VEGF seviyelerinde ciddi azalmaların olduğu gösterilmiştir (Santini ve ark. 2006). VEGF'in, bifosfonatların intravenöz olarak verilmesinden sonra 7. ve 21. günlerde osteonekroz gelişen hastaların serumlarındaki düşüş nedeniyle bir prognostik faktör olabileceği düşünülmüştür (Vincenzi ve ark. 2012).

Serviks kanserinin transgenik bir fare modelinde zoledronik asit, tümör stromasında MMP-9 ekspresyonunu aktivitesini inhibe ederek VEGF'in anjiyogenik endotelial hücreler üzerindeki reseptörü ile ilişkisini azalttığı bildirilmiştir. Böylece ZOL, VEGF biyoyararlanımının azalmasına neden olarak tümör anjiyogenezi ve tümör ilerlemesini baskıladığı sonucuna varılmıştır (Giraud ve ark. 2004).

Prenilasyona bağlı sinyal yollarını baskılayarak anjiyogenezi etkileyen zoledronik asidin düşük konsantrasyonlarda endotelial progenitör hücre (EPC) farklılaşmasını inhibe ederken; yüksek konsantrasyonlarda ise EPC apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (Yamada ve ark. 2009).

Zoledronik asit, normal kemik gelişimi sırasında anjiyogenez ve kırık sırasında kemik onarımı ile ilişkili olan osteopontini hem maksillada hem de mandibulada inhibe ederek anjiyogenezi etkileyebilir. Bifosfonat tedavisi alan ve osteonekroz ile ilişkili hastaların alveolar kemik örneklerinde osteopontin düzeyinin, sağlıklı alveolar kemiğe göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Wehrhan ve ark. 2015).

BRONJ literatüründe çok sık karşılaşılmayan bir diğer antianjiyogenik yaklaşım ise bisfosfonatların kan akışına olan etkisidir. Bifosfonatlar kemiğin yeniden şekillenmesini baskıladığı için metabolik talebin azalmasına ve bunun sonucunda da dolaylı olarak kan akışının azalmasına neden olacaktır. Dokuların canlılığı için gerekli olan kan sirkülasyonunun bozulması BRONJ'un antianjiyogenik mekanizmalarından biri olacağı düşünülmüştür (Allen ve Burr 2009).

Bu çalışmalar bifosfonatların potansiyel antianjiyogenik mekanizmalarının çeşitli olduğunu göstermektedir.

2.1.6. Bifosfonatların Endikasyonları

Bifosfonatların endikasyonlarını şöyle sıralayabiliriz:

- Kemik metastazlı kanserler ve hiperkalsemi (Brenson ve Lipton 1999)
- Multiple myelom (Aparicio ve ark. 1998)
- Paget hastalığı (Russell ve ark. 1974; Mee 1999; Daroszewska ve Ralston 2005)
- Fibröz displazi (Mansoori ve ark. 2010)
- Osteogenezis imperfekta (Dwan ve ark. 2014)
- Ankilozan spondilit (Viapiana ve ark. 2014)
- Gaucher hastalığı (Lebel ve ark. 1999)
- Osteoporoz (Tella ve Gallagher 2014)

Günümüzde en çok kullanılan bifosfonatların ticari isimleri, endikasyonları ve tedavi dozları aşağıda gösterilmiştir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Günümüzde en çok kullanılan bifosfonatlar

Bifosfonat Türü	Jenerik İsmi	Onaylanmış Endikasyonu	Önerilen Dozu/Veriliş Yolu	Nitrojen İçeriği	(Etidronat'a Göre) Rölatif Gücü
Etidronat	Didronat	Paget Hastalığı, Heterotopik Ossifikasyon	Oral Günlük 350-750 mg 6 Ay	YOK	1
Tiludronat	Skelid	Paget Hastalığı	Oral Günlük 400 mg 3 Ay	YOK	50
Alendronat	Fosomax Bonemax Andante	Osteoporoz/ Paget Hastalığı	Oral Günlük 10-Haftalık 70 mg	VAR	1000
Risedronat	Actonel	Osteoporoz/ Paget Hastalığı	Oral Günlük 5 mg-Haftalık 35 mg	VAR	1000
İbandronat	Bondronat Bonviva	Postmenopozal osteoporoz	Oral Günlük 2,5 mg-Aylık 150 mg	VAR	1000
Pamidronat	Aredia Pamidem	Malignansi hiperkalsemisi Multiple Myeloma Kemik metastazı Paget Hastalığı	Parenteral 90mg/3 Hafta	VAR	1000-5000
Zoledronat	Zometa Reclasta Ostezolen	Malignansi hiperkalsemisi, Multiple Myeloma Kemik metastazı Paget Hastalığı	Parenteral 4 mg/3 Hafta	VAR	+10000

2.1.7. Bifosfonatların Yan Etkileri

Bifosfonatların kullanımına bağlı olarak görülebilecek yan etkiler aşağıdaki gibidir:

- Hipokalsemi (Kreutle ve ark. 2014)
- Gastrointestinal yan etkiler (Pazianas ve ark. 2010)
- Akut faz reaksiyonları (Papapetrou 2009)
- Renal yan etkiler (Chang ve ark. 2003; Munier ve ark. 2005; Hirschberg 2012)
- Santral sinir sistemi yan etkileri (Bartl ve Frisch 2002)
- Okuler yan etkiler (Bock ve Felsenberg 2008)
- Atriyal fibrilasyon (Saridoğan ve Gün 2010)

- Femur başı atravmatik avasküler nekroz (Bartl ve Frisch 2002)
- Çene kemiklerinde osteonekroz (Ruggiero ve ark. 2004; Tanvetyanon ve Stiff 2006; Marx ve ark. 2007; Migliorati ve ark. 2010)

2.2. Bifosfonatların Kullanımına Bağlı Çene Osteonekrozu

Çenelerde bifosfonata bağlı gelişen osteonekrozdan ilk kez 2002’de Marx ve Stern, iyileşme göstermeyen kemik dokusuna debridman yapıldığında daha da kötüye giden ve miktarında artış görülen ekspoze kemik olarak bahsetmiştir. Daha sonra Marx (2003) ile Migliorati (2003) çenelerde bifonata bağlı çene osteonekroz olgularını bildirmişlerdir. 2004 yılında ise Ruggiero ve ark. tarafından 63 olgu içeren daha büyük bir vaka serisi yayınlanmıştır. Khosla ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada diş çekiminden sonra ekspoze kemiğin oluşması için 8 haftalık sürenin yeterli olabileceğini ifade etmişlerdir.

Bifosfanata bağlı çene osteonekrozunun ilk kez literatürde görülmesinden itibaren birçok olgu bildirimini rapor edilmiş ve tedaviye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Görülme sıklığı artan bu ciddi yan etkinin tanımını yapmak ve standart tedaviyi belirlemek amacıyla AAOMS, 2009 yılında bir konsensus yayınlamıştır. Bu konsensusta; bifosfonata bağlı çene osteonekrozunu “Baş-boyun bölgesine radyoterapi uygulanmamış, bifosfonat kullanmış veya kullanmakta olan hastaların çenelerinde 8 haftadan daha fazla süren ekspoze kemik ile karakterize olan klinik bir durum” olarak tanımlamışlardır (Ruggiero ve ark. 2009).

Bifosfonatın oluşturduğu çene osteonekrozlarına benzer şekilde denosumab gibi antirezorptif (Aghaloo ve ark. 2010; Niibe ve ark. 2015; O’Halloran ve ark. 2014; Vyas ve ark. 2014) ve bevacizumab (Serra ve ark. 2009; Van Poznak 2010) veya sunitinib (Koch ve ark. 2011) gibi antianjiyogenik ilaçların da sebep olduğu bildirildikten sonra, 2014 yılında AAOMS, BRONJ tanımını güncelleyerek MRONJ (İlaçlara bağlı gelişen çene osteonekrozu) olarak literatüre geçirmiştir. Bu bildiriye göre MRONJ ‘Çenelerinde radyoterapi uygulanmamış veya belirgin metastazik hastalığı olmayan, antirezorptif veya antianjiyogenik ilaçlar ile tedavi edilmiş ya da edilmekte olan hastalarda maksilofasiyal bölgede 8 haftadan daha fazla süren ekspoze kemik ya da intraoral/ekstraoral fistülü bulunan bir klinik durum’ olarak tanımlamışlardır (Ruggiero ve ark. 2014). MRONJ’a sebep olan ilaçların güncel listesi aşağıda tabloda gösterilmiştir (Tablo 2-2) (Singar ve ark. 2020).

Tablo 2-2: MRONJ ile ilişkili ilaçların listesi

MRONJ ile ilişkili İlaçlar	Kategori (Sınıf)	Farmakolojik etki
Zoledronat	Bifosfonat	Antirezorptif
Pamidronat	Bifosfonat	Antirezorptif
Ibandronat	Bifosfonat	Antirezorptif
Alendronat	Bifosfonat	Antirezorptif
Risedronat	Bifosfonat	Antirezorptif
Neridronat	Bifosfonat	Antirezorptif
Tiludronat	Bifosfonat	Antirezorptif
Denosumab	RANKL inhibitör	Antirezorptif
Bevacizumab	VEGF inhibitör	Antianjiyogenik
Aflibercept	VEGF inhibitör	Antianjiyogenik
Temsirolimus	mTOR yolağı (Mammalian target of rapamycin pathway)	Antianjiyogenik
Everolimus	mTOR yolağı	Antianjiyogenik
Sirolimus	mTOR yolağı	Antianjiyogenik
Sunitinib	Tirozin kinaz inhibitörü	Antianjiyogenik
Sorafenib	Tirozin kinaz inhibitörü	Antianjiyogenik
Imatinib	Tirozin kinaz inhibitörü	Antianjiyogenik
Ipilimumab	Monoklonal antikör	Sitotoksik
Infliximab	Monoklonal antikör	Sitotoksik

2.2.1. BRONJ Patofizyolojisi

Bifosfonatlara bağlı çene osteonekrozunun etyolojisi ile ilgili birçok deneysel ve klinik çalışmalar yapılmasına rağmen patofizyolojisi ile ilgili olarak henüz ortak bir fikirde buluşulamamıştır. (Reid 2009; Maahs ve ark. 2011; Singar ve ark. 2020).

BRONJ ile ilgili yaygın olarak kabul edilen iki hipotezden biri kemik remodelasyonunun azalması, diğeri ise anjiyogenezin inhibisyonudur (Zafar ve ark. 2020).

Bifosfonatlar osteoklast diferansiyasyonunu ve fonksiyonunu inhibe eder, apoptozu artırır. Böylece kemiğin rezorpsiyonunun ve remodelasyonunun azalmasına neden olur (Ruggerio ve ark 2014). Kemik remodelasyonu inhibisyonunun mekanik

olarak direncin azaldığı sonrasında da kemik nekrozunun oluşacağı bölgelerde mikro hasar alanlarının toplanmasına neden olduğu düşünülmektedir (Zafar ve ark. 2020).

Alveolar kemikte remodelasyon uzun kemiklere göre daha fazla gerçekleştiğinden (Cheng ve ark. 2009) dolayı bifosfonatların çene kemiklerindeki tutulumu daha fazla olur ve dolayısıyla BP'ler alveolar kemikte daha yüksek konsantrasyonlarda birikirler (Marx 2011). Diş çekimi gibi invaziv işlemlerin yapılması sonucunda alveolar kemikte osteoklastik kemik rezorpsiyonuna remodeling ile yeteri kadar cevap verilemez. Yani yüksek remodeling ihtiyacına düşük kemik turnover ile yanıt verilmiş olduğundan yüzeyi örten mukozaya altındaki kemikten gelen kan akımı zamanla azalır. Bunun sonucunda ise mukozanın doku bütünlüğü bozularak ekspoze bir kemiğin ortaya çıkmasına neden olur (Marx ve ark. 2005.)

BRONJ patogenezinde bifosfonatların anjiyogenez inhibisyonu ile önemli bir rolünün olduğu düşünülmektedir. İn vitro çalışmalarda zoledronik asidin anjiyogenezi azalttığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir (Wood ve ark. 2002; Hansen ve ark. 2006). Ayrıca Santini ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada zoledronik asidin kullanıldığı hastalarda VEGF seviyelerinde azalma olduğu bildirilmiştir.

BRONJ patogenezindeki teorilerden birisi de Tsurushima ve ark. tarafından (2013) ortaya atılmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen bu teoriye göre, mikrobiyolojik kontaminasyon sonucunda ortam pH'sının düşmesi ile daha fazla bifosfonat salınarak kemik nekrozunda artışın görülmesidir. Otto ve ark. (2010), bifosfonata bağlı çene osteonekrozunun gelişmesinde ortam pH'sının önemli olduğunu belirtmiş ve zoledronik asit ile düşük pH'ta mezenkimal kök hücre ölümünün en yüksek seviyede olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca Sedghizadeh ve ark. (2008) mikroorganizmaların bifosfonat birikimi olan kemiklerde mikrobiyal biyofilm oluşumunu kolaylaştırdığını ve kronik enfeksiyonlara zemin hazırladığını bildirmişlerdir.

BRONJ oluşumundaki patojenik mekanizmalardan bir diğerinin de bifosfonatların oral mukoza üzerindeki toksik etkileri ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Landesberg ve ark. (2008) bifosfonat kullanılmasıyla keratinositlerin migrasyonunun bozulduğunu, bunun sonucunda da oral mukoza hücrelerinde yara iyileşmesini geciktirdiğini ve mukozal yaralanmaların kolaylaştığını; Reid (2009) ise potens değeri en yüksek olan zoledronik asidin, epitel hücrelerinin kemik yüzeylere olan adhezyonunu

inhibe ederek toksik etkilere neden olduğunu göstermişlerdir. Bifosfonatların hidroksiapatite olan afinitesinden dolayı kemik dışındaki diğer dokularda minimal kalarak özellikle çenelerdeki yüksek konsantrasyonu nedeniyle yumuşak dokuda toksik etkiye sebep olduğu ifade edilmiştir (Reid ve Cornish 2012).

2.2.2. BRONJ Risk Faktörleri

BRONJ klinikte uygulanan bir işleme bağlı olarak ya da patolojik nedenlerden dolayı gelişebilirken bazen kendiliğinden de meydana gelebilir. BRONJ oluşumunda rol oynayan risk faktörleri 4 grup altında toplanabilir (Reid 2009; Ruggerio ve ark. 2009):

- İlaça bağlı risk faktörleri
- Lokal risk faktörleri
- Demografik ve sistemik risk faktörleri
- Genetik faktörler

İlaça bağlı risk faktörleri:

BRONJ gelişim riski; kullanılan bifosfonatın türü, veriliş yolu ve tedavi süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ruggerio ve ark. 2009). BRONJ riski en yüksek bifosfonat türü, zoledronik asit olurken; onu sırasıyla pamidronat, alendronat, risedronat ve ibandronat takip eder (Naveau ve Naveau 2006). Zervas ve ark. (2006) zoledronik asit kullanan hastalarda BRONJ riskinin, pamidronat kullanan hastalara oranla 9.5 kat daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Bifosfonat grubu ilaçların intravenöz yol ile kullanımının oral yola göre BRONJ riskinin çok daha yüksek bir düzeyde olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bildirilmiştir (Wang ve ark. 2007; Stumpe ve ark. 2009; Reid ve Cornish 2012; Otto ve ark. 2012). Zoledronik asidin yarılanma ömrünün uzun olmasından dolayı bu ilaç ile tedavi gören hastalarda BRONJ görülme riski, diğer bifosfonat türleri ile tedavi görenlere göre daha fazladır. Zoledronik asit, önerilen aylık 4mg'lık dozlarda 3-12 ay içerisinde oral lezyonlar gelişebilirken; pamidronat preparatlarının önerilen aylık 90 mg'lık dozlarında 10-16 ay içinde ekspoz kemik oluşumuna neden olabilir. Alendronatın yarılanma ömrünün zoledronik asit ve pamidronata göre daha kısa olması ve oral yol ile alınımı nedeniyle daha yavaş emilimi gerçekleştiğinden önerilen günlük 10 mg'lık ya da

haftalık 70 mg'lık kullanılan dozu ile ekspozite kemiğin oluşması için 2 yıl veya daha fazla süre kullanılması gereklidir (Marx ve ark. 2005).

Lokal risk faktörleri:

Dento-alveolar işlemler (diş çekimi, dental implant operasyonu, periapikal cerrahi, kemik yapısını içeren periodontal cerrahi), çene kemiklerinde travma, kötü ağız hijyeni, periodontal hastalıklar, anatomik oluşumlar (kemik ekzostozları, toruslar, mylohyoid kenar), ağız içindeki protezlerin uyumsuzluğu, alkol ve tütün kullanımı BRONJ için lokal risk faktörlerini oluşturmaktadır (Ruggerio ve ark. 2009).

Demografik ve sistemik risk faktörleri:

İrk (Badros ve ark 2006), cinsiyet, yaş, kanserle birlikte görülen osteoporoz (Ruggerio ve ark. 2009), dializ, diyabet, obezite ve düşük hemoglobin değeri olan hastalar (Jadu ve ark. 2007), kortikosteroid kullanımı (Marx ve ark. 2005), tanısı konulan kanserin tipi (Hoff ve ark. 2008; Wang ve ark. 2007) gibi etkenler BRONJ için demografik ve sistemik risk faktörlerini oluşturmaktadır.

Genetik faktörler:

Sarasquete ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada sitokrom P450-2C (CYP2C8) genindeki tek nükleotit polimorfizmden dolayı multiple myelomlu hastalar parenteral yoldan bifosfonat ile tedavi edildiğinde BRONJ görülme riskinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

2.2.3. BRONJ Teşhisinde Bulgular

2.2.3.1. Klinik Bulgular

Bifosfonatların kullanımına bağlı çene osteonekrozunun en tipik klinik bulgusu olan nekroze alveol kemiği, osteoradyonekroz ve osteomyelit vakalarında da karşılaşılabileceğinden ayırıcı tanısında hastanın medikal ve dental anamnezi büyük önem taşımaktadır. Ağız boşluğu içerisinde farklı büyüklükte ve yerleşimde yer alan, klinik olarak çoğu kez asemptomatik olan nekroze alveol kemiği enfekte olduğu zaman semptomatik hale gelir ve ilk olarak şiddetli bir lokalize ağrı ile belirti vermektedir. Bu klinik tabloya zamanla mukozal şişlikler, eritem, ödem, ülserasyon, fistül oluşumu, pü drenajı gibi bulgular eklenmektedir (Marx ve ark. 2007; Otto ve ark. 2012). İleri evrelerde başvuran ya da kontrol altına alınamayan hastalarda inferior alveolar kanalın

tutulumu ile parestezi, maksiller sinüs tutulumu ile oroantral fistüller ve patolojik fraktürler meydana gelebilir (Ruggiero ve Mehrotra 2009; Vescovi ve ark. 2012 Beninati ve ark. 2013).

2.2.3.2. Radyolojik Bulgular

BRONJ lezyonlarının radyografik açıdan değerlendirilmesinde panoramik grafiler osteosklerotik, osteolitik lezyonların ve patolojik fraktürlerin teşhisinde yeterli olurken; manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi ve kemik sintigrafisi ise erken tanı için ya da nekrotik alanın sınırlarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Adjemian ve ark. 2009; Stockman ve ark. 2010; Rocha ve ark. 2012).

Radyografik bulgulardaki değişikliklerin sınırlı olduğu BRONJ erken dönemde; iyileşmenin geciktiği diş çekim soketleri, etkilenen bölgede periapikal ve/veya alveol kretinde radyolusent alanlar, peridontal ligament aralıklarında daralma ve lamina durada kalınlaşma görülebilir. İlerleyen dönemlerde ise geniş osteoliz alanları, sekestr formasyonu ve patolojik fraktürler gözlenebilir (Migliorati ve ark. 2006; Khosla ve ark. 2007; Treister ve ark. 2009; Rocha ve ark. 2012). Trabeküler kemikte genişlik, mineral dansitesi, lakünleri ve trabekül oluşumunda değişiklikler meydana gelirken; kortikal kemikte bozulma ve periostal kemik yapımında ise artış gözlenir (Bianchi ve ark. 2007; Elad ve ark.2010).

2.2.3.3. Histolojik Bulgular

BRONJ histolojisinde, ayırıcı tanısı yapılması gereken süpüratif osteomyelit ve osteoradyonekroz bulgularına benzer biçimde bazı bakteriyel kolonizasyonlar içeren non-spesifik nekrotik kemik görünümü olmasına rağmen, santral kemik biyopsileri incelendiğinde her bir klinik tablonun kendine özgü mekanizmalarının olduğu görülmektedir. Süpüratif osteomyelitte kemik iliği inflamasyonu görülürken, BRONJ ve osteoradyonekrozda kemik iliğinde inflamatuvar hücre görülmemektedir. Osteoradyonekrozda kemik iliğinde kollajen içerikli ilik fibrozis dokusu görülürken, BRONJ'da kemik iliği inflamasyonu ve fibrozis oluşmaz, bu ilik dokusunun yerine boş asellüler alanlar izlenmektedir (Hansen ve ark. 2006).

2.2.3.4. Mikrobiyolojik Bulgular

Mikrobiyolojik incelemede en sık görülen bakteri *Actinomyces* olmak üzere, *Enterococcus*, *Candida albicans*, *Haemophilus influenzae*, *Alpha-hemolytic*

streptococcus, Lactobacillus, Enterobacter ve Klebsiella pnömonia türlerinin izole edildiği rapor edilmiştir (Chiandussi ve ark. 2006).

2.2.4. BRONJ Evre ve Tedavi Yaklaşımları

Günümüzde en çok kullanılan BRONJ klinik evre ve tedavisine yönelik Ruggiero ve ark. 2009 yılında AAOMS bildirgesinde oluşturmuş oldukları protokolünü 2014 yılında antianjiyogenik ilaçların da çene osteonekrozuna neden olmasından dolayı güncellemişlerdir (Tablo 2-3) (Ruggiero ve ark. 2014).

Tablo 2-3: MRONJ evrelendirme ve tedavi yaklaşımı

	MRONJ evresi	Tedavi yaklaşımı
Risk kategorisinde	Oral veya intravenöz olarak bifosfonat ilaçlar ile tedavi edilen nekrotik kemiğin olmadığı hastalar	- Herhangi bir tedavi gerekli değildir. - Hasta bilgilendirilmelidir.
Evre 0	Klinik olarak nekrotik kemik gözlenmemektedir. Fakat spesifik olmayan klinik bulgular, radyolojik değişiklikler ve semptomlar mevcuttur.	- Semptomatik tedavi ve diğer lokal etyolojik nedenlerin konservatif tedavisi - Analjezik ve antibiyotik kullanımını da içeren sistemik tedavi.
Evre 1	Aseptomatik veya enfeksiyon kanıtı olmayan hastalarda açığa çıkmış ve nekrotik kemik veya kemiğe doğru sonda ile fistül varlığı görülür.	- Oral antibakteriyel ağız gargarası - Hastanın 3 aylık aralarla klinik takibi - Hasta eğitimi ve bifosfonat tedavi endikasyonlarının hekimi tarafından tekrar değerlendirilmesi
Evre 2	Açığa çıkmış ve nekrotik kemik veya kemiğe doğru sonda ile fistül varlığı görülür. Pürülan drenajlı ya da drenajsız açığa çıkan kemik bölgesinde ağrı ve eritem ile enfeksiyon kanıtı mevcuttur.	- Oral antibiyotiklerle semptomatik tedavi - Antibakteriyel ağız gargarası - Ağrı kontrolü - Yumuşak doku iritasyonunu uzaklaştırmak için debridman ve enfeksiyon kontrolü
Evre 3	Açığa çıkmış ve nekrotik kemik veya kemiğe doğru sonda ile bir fistül varlığı görülür. Ağrı ve enfeksiyonla birlikte açığa çıkmış nekrotik kemiğe aşağıdaki bulgulardan bir veya birkaçının eşlik etmesi: Açığa çıkmış ve nekrotik kemiğin alveolar kemik sınırlarını aşması sonucunda (örn: mandibula alt kenarı, ramus mandibula, maksiller sinüs, zigoma) patolojik fraktür, ekstraoral fistül, oral antral veya oral-nasal birleşme ya da mandibula alt kenarına, sinüs tabanına doğru uzayan osteolizis varlığı görülebilir.	- Antibakteriyel ağız gargarası - Antibiyotik tedavisi ve ağrı kontrolü - Uzun dönem ağrı ve enfeksiyonu hafifletmek için cerrahi debridman veya rezeksiyon

2.3. Diş Çekim Yarasının İyileşmesi

Diş çekim yara iyileşmesi, özelleşmiş sekonder yara iyileşmesine bir örnek olarak gösterilmektedir (Huebsch ve Hansen 1969). Bir dişin çekimi, prototipik olarak cilt ve mukoza yaralanmalarında da görülen inflamasyon, epitelizasyon, fibroplazi ve remodelasyon sıralamasını aynen başlatır (Hupp ve ark. 2018).

Diş çekiminden hemen sonra soket kan ile dolmaktadır. Hem intrinsik hem de ekstrinsik yollar ile pıhtı oluşumu aktif edilir. Oluşan fibrindeki kırmızı kan hücreleri yırtılmış kan damarlarını kapatır ve çekim soketinin büyüklüğünü azaltır. Pıhtının organizasyonu ik 24-48 saat içinde başlamaktadır. Periodontal ligament içindeki kan damarlarının genişlemesi ve bunu takiben lökositik göç ve bir fibrin tabakasının formasyonu ile pıhtı meydana gelmektedir (Shetty ve Bertolami 2004).

Birinci haftada fibrin pıhtısı, üzerinde inflamatuvar hücrelerin göç edebilmesi ve anjiyogenez için geçici bir iskele şeklinde organize olur. Yara çevresindeki epitel organize olan pıhtının yüzeyine doğru büyür. Osteoklastlar, kret rezorpsiyonunu aktif etmek için alveoler kemik kreti boyunca birikirler (Shetty ve Bertolami 2004; Le ve Shetty 2010). Anjiyogenez ise periodontal ligament kalıntıları içinde devam eder (Shetty ve Bertolami 2004).

İkinci haftada pıhtı fibroplazi ve neoanjiyogenez ile organize olmaya devam eder. Osteoid trabekülü alveolden pıhtı içine doğru yavaş bir şekilde uzamaya başlar. Alveoler soketin kortikal kenarında osteoklastik rezorpsiyonu belirgin bir hale gelir (Shetty ve Bertolami 2004; Le ve Shetty 2010).

Üçüncü haftada çekim soketi tamamen granülasyon dokusu ve yara çevresinde zayıf kalsifiye kemik adacıkları ile dolar. Yara yüzeyi skar gelişmeden veya minimal skar ile tamamen epitelize hale gelir (Shetty ve Bertolami 2004; Le ve Shetty 2010).

Aktif olarak kemik remodelasyonu birkaç hafta boyunca devam eder. Kemik oluşumu diş çekiminden 6-8 hafta sonrasına kadar radyografik olarak belirgin olmazken; 6-8 aydan sonra ise çekim bölgesi ayırt edilemez (Le ve Shetty 2010).

2.4. PLGA-PEG-PLGA ve GS4012

Farmasötik bilimler; mikropartikül, nanopartikül ve hidrojel formunda yeni ilaç gönderme sistemlerinin geliştirilmesinde kayda değer ilerlemeler göstermiştir. Bu yeni ilaç taşıyıcıların çoğu polimerlerden ve özellikle biyoçözünür diblok ve triblok şeklinde

poli kaprolakton, poli laktik, poli propilen oksit ve poli laktik-ko-glikolik gibi hidrofobik ve poli etilen glikol ve poli etilen oksit gibi hidrofilik bloklardan oluşan kopolimerlerden yapılmaktadır (Khodaverdi ve ark. 2013).

Hidrojeller, kimyasal veya fiziksel nedenlerle oluşan üç boyutlu çapraz bağlı polimer ağlardır ve önemli miktarda suyu (% 70'den fazla su) emebilirler. Bu polimer hidrojeller, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir özelliklerinden dolayı kontrollü ilaç salımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Cigognini ve ark. 2014; Contri ve ark. 2014). Isıya duyarlı hidrojeller; bozulan dokunun boşluğunu doldurabilmesi, basit enjeksiyon ile doğrudan hedeflenen bölgeye verilerek cerrahi komplikasyonları azaltabilmesi (Lai ve ark. 2012) ve ilaçları kontrollü bir şekilde verme yeteneği ile enjekte edilebilir ilaç verme sistemlerinde en çok ilgilenilen taşıyıcılar haline gelmiştir (Fang ve ark. 2009; Gong ve ark. 2012; Wang ve ark. 2013).

Poli (laktik-ko-glikolik asit) -poli (etilen glikol) -poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA-PEG-PLGA) (Şekil 2-5) kontrollü ilaç salınımı taşıyıcısı olarak en yaygın kullanılan polimerlerden biridir. PLGA ve PEG bloklarından oluşan bu hidrojel, ilk kez Zentner ve ark. (2001) tarafından sentezlenmiştir. Hidrofilik PEG, blok kopolimerlerine biyouyumluluk kazandırırken; laktik asit (LA) ve glikolik asitten (GA) oluşan hidrofobik PLGA bloğu, ester bağları nedeniyle blok kopolimerlerine biyolojik olarak bozunabilirlik kazandırır (Zentner ve ark. 2001).

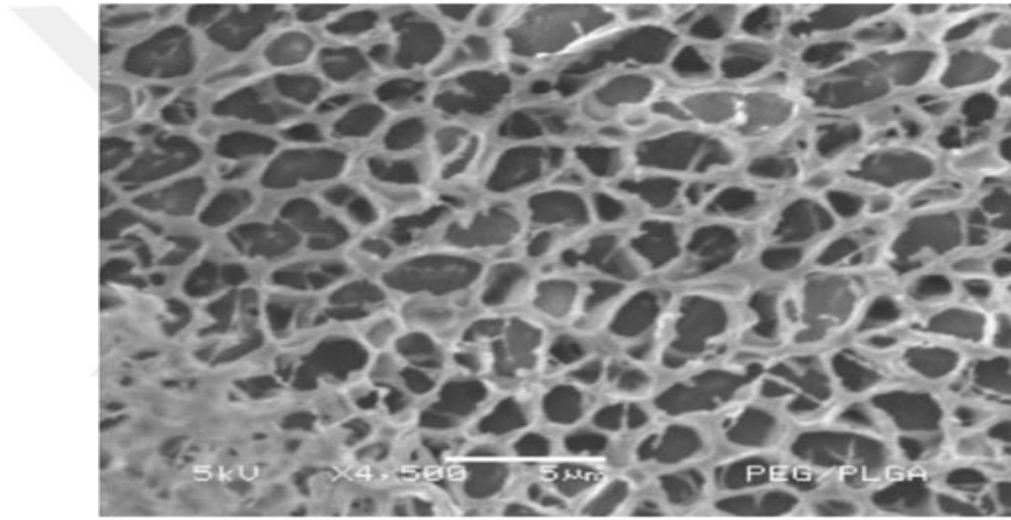


Şekil 2-5: PLGA-PEG-PLGA kimyasal yapısı – Yang ve ark. (2018)’ dan

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), hem dikişler hem de çeşitli ilaç verme uygulamaları gibi mekanik uygulamalarda onlarca yıldır kullanılan hidrofobik, biyolojik olarak bozunabilir bir polyesterdir. PLGA doğal olarak toksik olmayan bileşenlere, laktik asit ve glikolik aside hidrolize olur. Poli (etilen glikol) (PEG), az bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkardığı için iyi biyouyumluluğa sahip, parçalanamayan, hidrofilik bir polieterdir (Garner ve ark. 2017).

Bu kopolimerin (PLGA-PEG-PLGA) sentezi ve saflaştırılması için herhangi bir organik çözücü gerektirmemesi, sistemik toksisitesinin olmaması, hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçların uygulanabilir olması, biyolojik olarak bozulabilir ve biyolojik olarak uyumlu olması gibi avantajları vardır. (Khodaverdi ve ark. 2012)

PLGA-PEG-PLGA hidrojel matrisi, oda sıcaklığında veya altında bir çözeltidir ve vücut sıcaklığında ise bir jel haline gelir. Böylece uygulama yerinde bir ilaç deposu olarak işlev yapabilir (Qiao ve ark. 2005). Hidrojelin gözenekli ağ yapısını ifade edebilmek için bir kriyo-SEM görüntüsü Pratoomsoot ve ark. (2008) tarafından yayınlanan bir çalışmadan alınmıştır (Şekil 2-6).



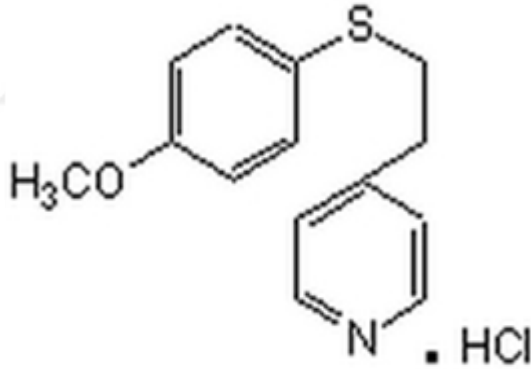
Şekil 2-6: Gözenekli ağ yapısını gösteren PLGA-PEG-PLGA hidrojelinin temsili kriyo-SEM görüntüsü - Pratoomsoot ve ark. (2008)' dan

Laktik, PLGA üretmek için kullanılan hidrofobik bir monomerdur. İceberg teorisine göre, hidrofobik moleküller su molekülleri ile çevrildiğinde, sistemin entropisi azalır. Bu nedenle, hidrofobik moleküller sulu bir ortamda maruz kalan yüzey alanlarını azaltmak için toplanır. Bu sistemde triblok kopolimerleri, hidrofobik PLGA segmentlerinin suya maruz kalan yüzey alanını düşürmek için miseller oluşturur. Sıcaklığı arttırmadan önce, hidrofilik PEG segmentleri ve su molekülleri arasındaki hidrojen bağı nedeniyle biyomateryal sıvı formdadır. Bu durumda sulu ortamda monomerler, ayrı ayrı miseller ve gruplanmış miseller halinde bulunur. Sıcaklık arttıkça hidrojen bağları zayıflar ve PLGA segmentleri arasındaki hidrofobik bağlar, miseller

arasında köprüler oluşturarak bir hidrojel ağı oluşturmaya başlar. Kimyasal yapıya, moleküler ağırlığa ve triblok kopolimer konsantrasyonlarına bağlı olarak her sistem için farklı olabilen belirli bir sıcaklıktan sonra faz ayrımı meydana gelir ve kopolimerler aşamalı olarak uzaklaştırılır (Khodaverdi ve ark. 2012).

İlacın böyle bir termojel matrinden salım davranışı esas olarak ilacın difüzyonuna, taşıyıcı polimer bozulmasına veya bu ikisinin kombinasyonuna bağlıdır (Shang ve ark. 2017). Hidrojelin faz geçiş sıcaklığı ve ilaç salım hızı, triblok kopolimerin moleküler ağırlığı, PEG içeriği, LA/GA oranı ve formülasyonda kullanılan diğer maddelere göre değişebilir (Chen ve Singh 2008).

GS4012 (4-(2-(4-Methoxyphenyl)sulfanyl) ethyl) pyridine, HCl), VEGF ve VEGF aracılı damar oluşumunun güçlü bir indükleyicisi olarak işlev gören hücre geçirgen bir piridinil-tiyoeter bileşiğidir. Kimyasal formülü $C_{14}H_{15}NOS \cdot HCl$ olan bu bileşiğin moleküler ağırlığı da 281.8 g/mol' dır (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: GS4012 kimyasal yapısı

(https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/VEGF-Inducer-GS4012-CAS-328073-92-3-Calbiochem,EMD_BIO-676491)

VEGF'in damarsal geçirgenlik faktörü olarak anjiyogenezi desteklemek için mikrovaskülarizasyona etki ettiği bilinmektedir (Dvorak ve ark. 1995). VEGF, endotelial hücre göçünü ve proliferasyonunu uyararak anjiyogenin ana düzenleyicisi olarak görev yapmasının yanı sıra osteojenik faktörlerin düzenlenmesiyle de osteogenezi uyarır (Grosso ve ark. 2017). GS4012'nin anjiyogenik fonksiyonları

VEGF'den daha fazla olmasına rağmen bu küçük molekül temelde bir VEGF indükleyicisi olarak işlev görmektedir (Hong ve ark. 2008; Best ve ark. 2018).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın 01.02.2018 tarih 44488 sayılı izni alınarak başlanmıştır. Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden alınan 200 ± 50 gr ağırlığında ve 10-12 haftalık 48 adet Sprague-Dawley türü erkek sıçan kullanıldı. Çalışma kullanılan deney hayvanları; İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Deney Hayvanları Biyolojisi Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda 22 ± 1 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamı sağlayacak şekilde otomatize edilmiş odada ve deney süreci boyunca her metal kafes içerisinde 4 sıçan olacak şekilde yerleştirildi. Araştırma süresince deney hayvanlarının standart sıçan yemi ve musluk suyuna ad libitum olarak ulaşmasına izin verildi. Her gün yemleri kontrol edildi ve her hafta olmak kaydıyla deney süreci boyunca ağırlıkları kaydedildi.

3.2. Çalışma Grupları

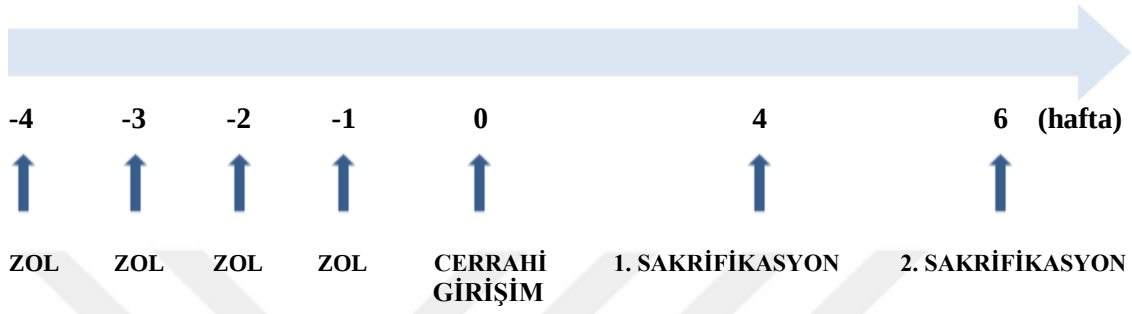
Deney hayvanları her grupta 12 sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba dağıtılarak çalışma grupları ve kontrol grubu oluşturuldu (Tablo 3-1). Çalışmamızda kullanılan GS4012 biyomateryalinin aktif kalma süresi ve yara iyileşmesi dikkate alınarak 2 ayrı dönemde sakrifikasyon olacak şekilde her grup kendi içinde iki alt gruba ayrıldı. Gruplar arası ortalama ağırlığının birbirine yakın değerlerde olmasına özen gösterildi.

Tablo 3-1: Deney hayvanlarının gruplandırılması

	4. hafta sakrifikasyon	6. hafta sakrifikasyon
1. grup (KONTROL)	6	6
2. grup (ZOL)	6	6
3. grup (GS4012)	6	6
4. grup (ZOL + GS4012)	6	6

3.3. İlaçların Hazırlanması ve Uygulanması

Deney öncesi sıçanlar tartılarak ağırlıkları kaydedildi ve uygulanacak bütün ilaçların miktarları hesaplandı. Zoledronik asit (Ostezolen®, Recordati, Türkiye) serum fizyolojik içerisinde seyreltilerek ve her bir hayvana 7.5 µg/kg doz olacak şekilde haftada bir olmak üzere toplamda 4 kez intraperitoneal (i.p.) olarak verildi (Şekil 3-1).



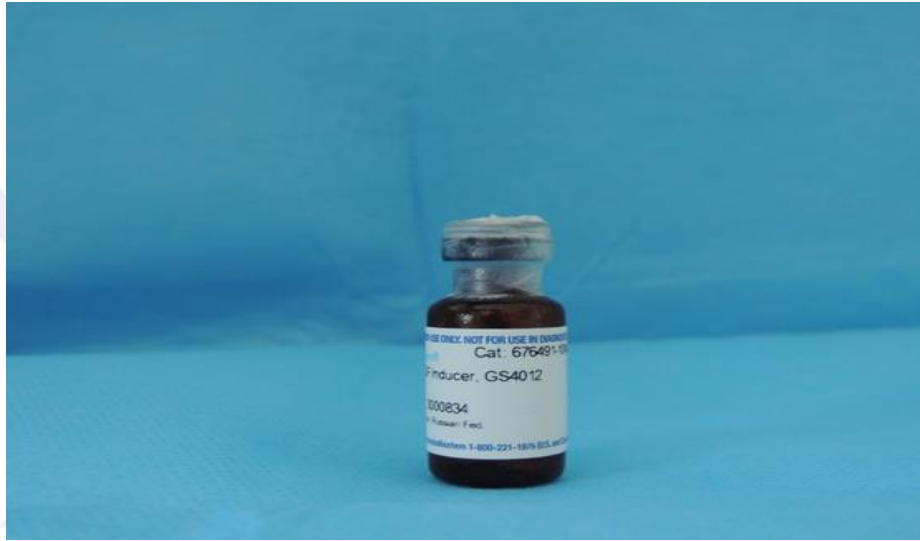
Şekil 3-1: Deney planı

2. ve 4. gruplara ilk 4 hafta boyunca haftada 1 kez zoledronik asit 7.5 µg/kg i.p. olarak verildi (Şekil 3-2), 4. haftanın sonunda diş çekimlerini takiben kemik defektleri oluşturuldu.

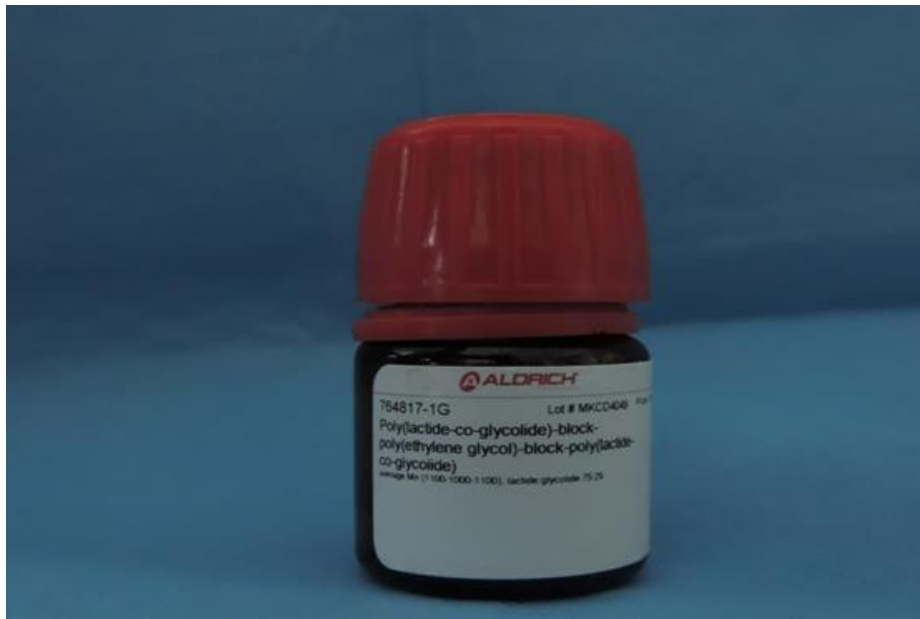


Şekil 3-2: ZOL intraperitoneal enjeksiyonu

GS4012 (Merck K GaA, Darmstadt, Almanya) (Şekil 3-3) dozu ise 10 µg/kg olacak şekilde 10 µl suda çözüldükten sonra %20 (w/v)'lik 200 µl PLGA-PEG-PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid) (Sigma-Aldrich, Almanya) (Şekil 3-4) kopolimer hidrojel solüsyonu bir buz üzerinde karıştırılarak pipet yardımıyla deney hayvanlarının dış çekim soketlerine aktarıldı ve birkaç saniye içinde sertleşmesi sağlandı.



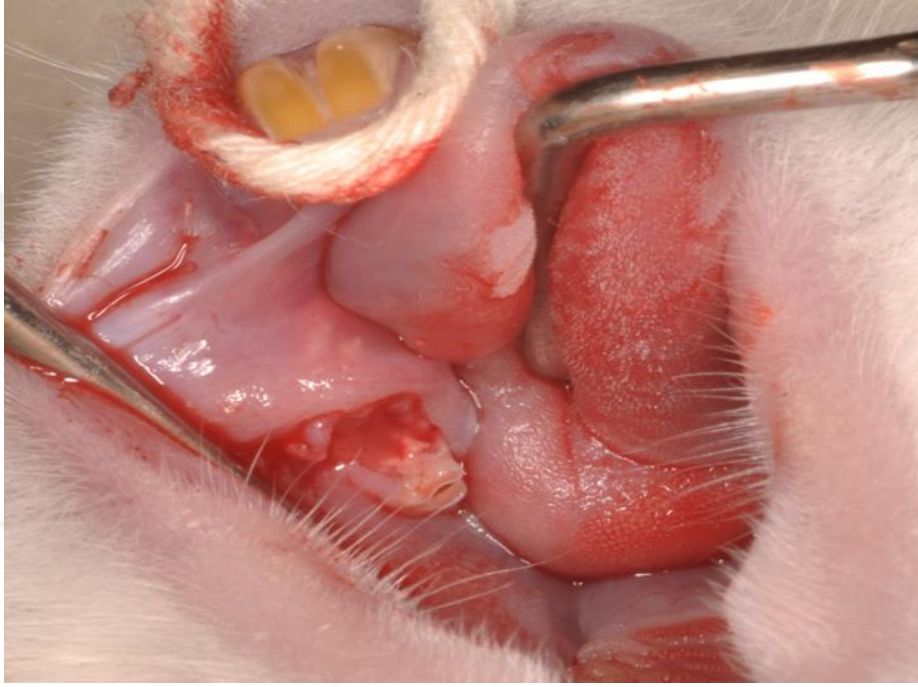
Şekil 3-3: GS4012 (Merck K GaA, Darmstadt, Almanya)



Şekil 3-4: PLGA-PEG-PLGA hidrojel (Sigma-Aldrich, Almanya)

3.4. Cerrahi Girişim

Çalışmamızda 48 adet Sprague Dawley soyu, 250 ± 20 gr ağırlığında ve 10-12 haftalık erkek sıçanlara intramüsküler (i.m.) yoldan ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) uygulanarak genel anestezi oluşturuldu. Lokal infiltratif olarak, lidokain (2mg/kg) uygulanmasının ardından mandibuler sol 1.ve 2. molar dişlerinin çekimi yapıldı (Şekil 3-5).



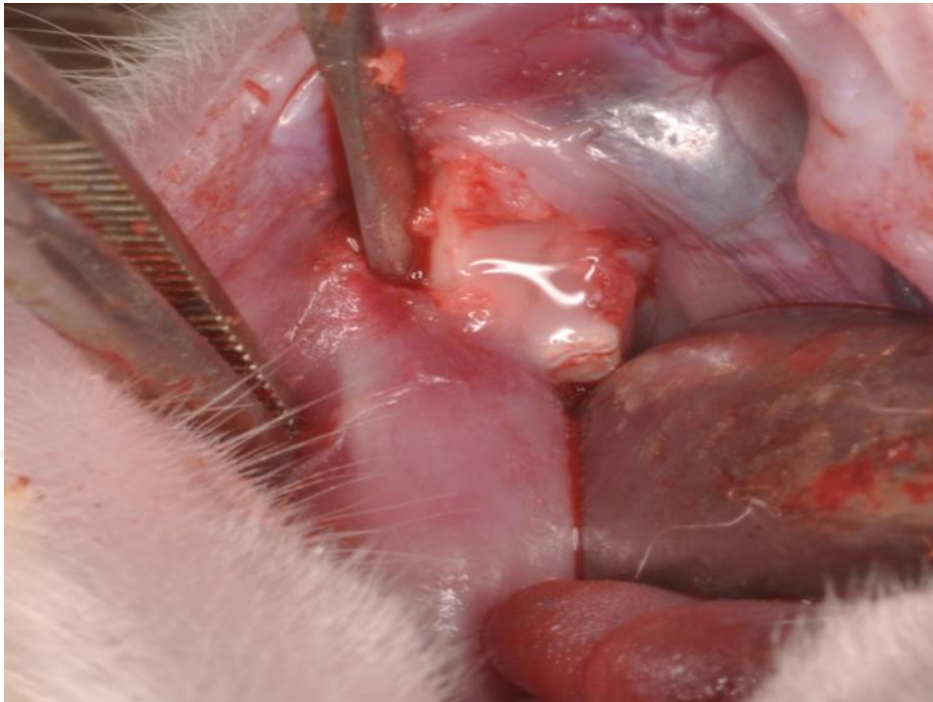
Şekil 3-5: Mandibuler sol 1. ve 2. azı dişlerin çekim soketleri

Çekim soketlerine bifosfonata bağlı kemik nekrozu oluşturabilmek için uygun ebattaki frezler ile çevre dokulara zarar vermeyecek şekilde ve devamlı serum fizyolojik (izotonik NaCl) irrigasyonu altında dairesel kemik defektleri oluşturuldu. Hemostaz steril tamponla sağlandı. Bütün çekimler aynı cerrah tarafından aynı teknik ile gerçekleştirildi.

1. grupta sadece diş çekimleri takiben kemik defektleri oluşturuldu.
2. grupta ise sıçanlara 4 hafta boyunca haftada bir zoledronik asit enjeksiyonu sonrasında diş çekimleri ile birlikte kemik defektleri oluşturuldu.

3. grupta ise sıçanlara diş çekimleri ile birlikte oluşturulan kemik defektlerine PLGA-PEG-PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid) hidrojel iskele içinde GS4012 bileşiği 10 µg/kg dozunda lokal olarak uygulandı (Şekil 3-6).

4. grupta sıçanlara 4 hafta boyunca haftada bir zoledronik asit enjeksiyonu sonrasında diş çekimleri ile birlikte oluşturulan kemik defektlerine PLGA-PEG-PLGA hidrojel iskele içinde GS4012 bileşiği 10 µg/kg dozunda lokal olarak uygulandı.



Şekil 3-6: PLGA-PEG-PLGA ve GS4012'nin sertleştikten sonraki görünümü

Cerrahi girişim sonrası haftada bir kez olmak üzere sakrifiye edilene kadar ağırlıkları kaydedildi. Çalışma süreci sonunda tüm deney ve kontrol gruplarına ait sıçanlar sakrifiye edildi.

3.5. Işık Mikroskobu Takibi ve Değerlendirme Kriterleri

Yüksek doz anestezi madde enjeksiyonu ile sakrifiye edilen deney hayvanlarının kafatası çıkartılıp yumuşak dokulardan ve deriden temizlenerek %10'luk tamponlanmış formaldehite alındı. Mandibuler sol 1. ve 2. azı dişlerin çekim bölgesini içeren kemik dokusu, formolde tespit olduktan sonra dekalsifikasyon işlemi için

sodyum sitrat (%20) ve formik asit (%50) içeren solüsyona alındı. Dekalsifikasyon işlemi biten kafatasları rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan hazırlanan 4 µm incelikteki kesitler alındı ve kesitler lam üzerine yerleştirildikten sonra deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işlemlerine tabi tutuldu. Daha sonrasında da Hematoksilen Eozin (H.E.) boyası ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Bütün gruplardan 4. ve 6. haftanın sonunda elde edilen kesitler aşağıdaki değerlendirme ölçütlerine göre sınıflandırıldı:

- İltihap
- Fibrozis
- Nekroz
- Yeni kemik yapımı
- Epitel proliferasyonunun defekti kapatma oranı

İltihap ve fibrozis, bir büyütme alanında kapladıkları bölgenin yüzdesine göre aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir:

İltihap;

- %0 ise (0)
- %5- %30 arasını kaplıyorsa (1)
- %30-60 arasını kaplıyorsa (2)
- %60'dan fazlasını kaplıyorsa (3)

Fibrozis;

- %0 ise (0)
- %5- %30 arasını kaplıyorsa (1)
- %30-60 arasını kaplıyorsa (2)
- %60'dan fazlasını kaplıyorsa (3)

Nekroz ve yeni kemik yapımı histomorfometrik değerlendirme ile incelenmiştir. Bu amaçla AnalySIS Five (Olympus Soft Imaging System, Münster, Germany) isimli görüntü analiz sistemi kullanıldı. Nekroz ve yeni kemik yapımı kapladıkları alana göre milimetre cinsinden hesaplandı.

Epitel proliferasyonunun defekti kapatma oranı için;

- Epitel proliferasyonu defekti $1/3$ ' inden az kapatıyorsa (1)
- Epitel proliferasyonu defekti $1/3$ ile $2/3$ arasında kapatıyorsa (2)
- Epitel proliferasyonu defekti $2/3$ ' sinden fazla kapatıyorsa (3) olarak değerlendirilmiştir.

3.6. Radyolojik Değerlendirme

Falcon tüp içerisine sabitlenen numuneler SkyScan 1174v2 (Kontich- Belgium) bilgisayarlı tomografi cihazında taramak üzere hazırlandı (Şekil 3-7).



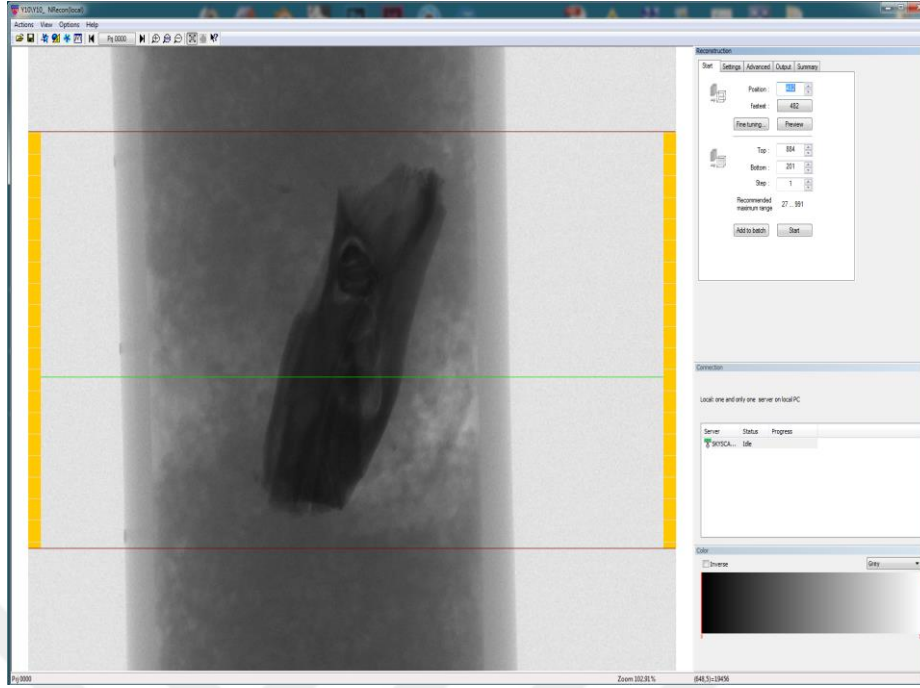
Şekil 3-7: SkyScan 1174v2 (Kontich- Belgium) bilgisayarlı tomografi cihazı

Tarama haznesi içine sabitlenen her bir örneğin tarama işlemi 50 kVp voltaj, 800 μ A akım ve 40 W güç değerlerinde 0.25 mm'lik Al filtre kullanılarak gerçekleştirildi. Tarama değerleri optimize edilerek 3500 ms pozlama süresi (exposure time),

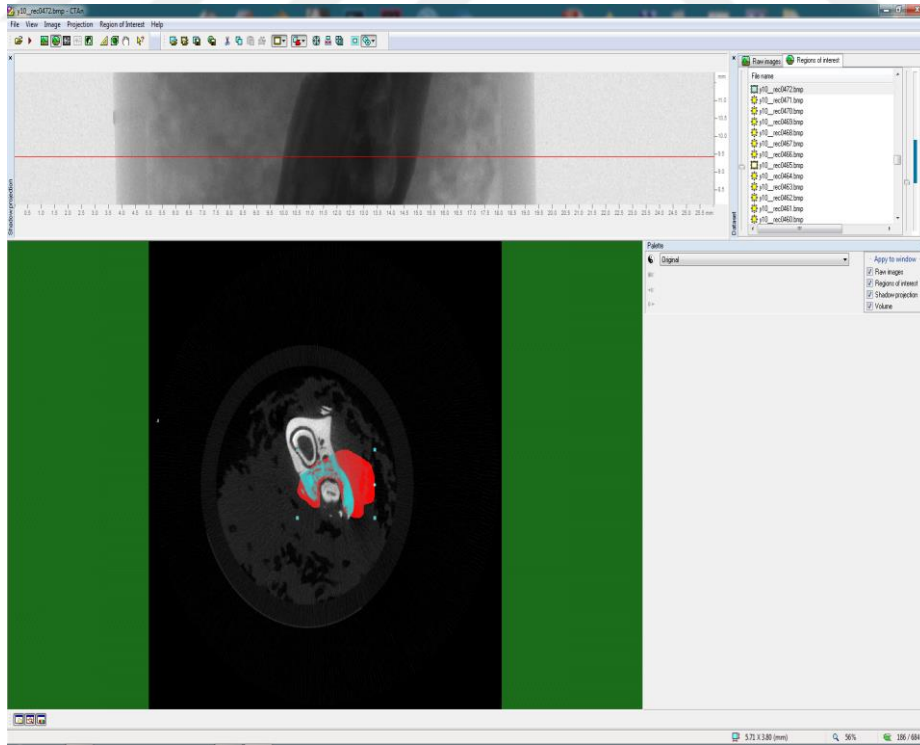
1024x1304 çözünürlük ve 19.98 μm yakınlaştırma faktörü kullanılmıştır. Her bir örnek yaklaşık 57 dakikada 1.00 derecelik rotasyon ile 360 derece taranmıştır. Tarama sonrası elde edilen TIFF formatındaki 360 ham görüntü NRecon (Ver. 1.6.10.2) programı ile yeniden yapılandırılarak BMP formatında yaklaşık 633 adet yatay kesit elde edildi (Şekil 3-8). Kemik mineral yoğunluğu (KMD) kalibrasyonları ilk olarak veri kümesine uygulandı. KMD analizleri kalsiyum yoğunlukları 0,25 g/mm^3 ve 0,75 g/mm^3 CaHA kalibrasyon çubuğu (fantom) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Rekonstrüksiyon sonucu elde edilen görüntüler BMP formatında kaydedilmiştir. Bu kesitler; kantitatif parametreler ve görsel modeller oluşturmak amacıyla kullanılan, densitometrik ve morfometrik ölçümlere olanak sağlayan CTAn (Ver. 1.16.4.1+) programına aktarıldı (Şekil 3-10). Ölçüm yapılacak alanın sınırlarını belirlemek amacıyla; kesitler üzerinde yatay düzlemde yarı-otomatik olarak dairesel ilgili alan (Region of Interest; ROI) çizildi (Şekil 3-9). İncelenecek örneğe ait olan vokseller ile çevresinde bulunan havanın voksellerini ayırmak için histogramda bir eşik değeri belirlendi. Siyah vokselin 0 ile belirtilip minimum yoğunluğu ifade ettiği, beyaz vokselin ise 255 ile belirtilip maksimum yoğunluğu gösterdiği histogram üzerinde eşik değeri belirlendi. Belirlenen ROI'lar ve eşik değeri verileriyle hacimsel oranlar ayrı ayrı hesaplandı (Şekil 3-11). Örneklere ait veriler CTVol (Ver. 2.3.2.0) programına aktarıldı ve örneklere ait üç boyutlu modelleme görüntüleri elde edilmiştir.

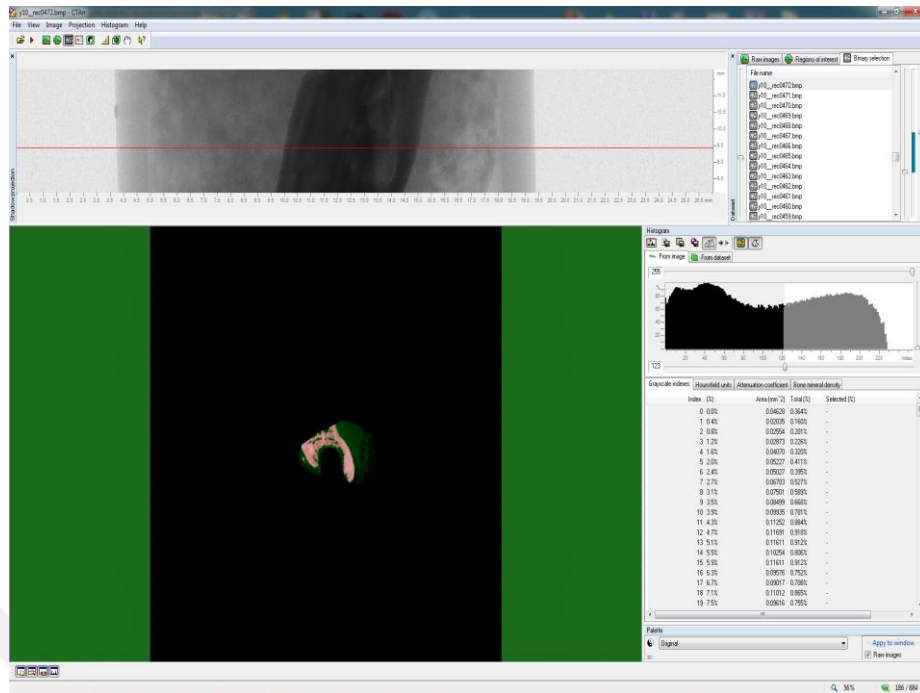
BMD(g/cm^3) analizinin yanı sıra Yapı Modeli İndeksi (Structure Model Index=SMI), hacim (cm^3), kökler arası doku kalınlığı (mm) ve kortikal kemik kalınlığı (mm) ölçümleri CTAn (Ver. 1.16.4.1+) yazılımı ile hesaplanmıştır (Şekil 3-12). Radyolojik değerlendirme sonucu iyileşmenin olmadığı, kısmen olduğu ve tamamen olduğu örnek görüntüler Şekil 3-13' de görüldüğü gibidir.



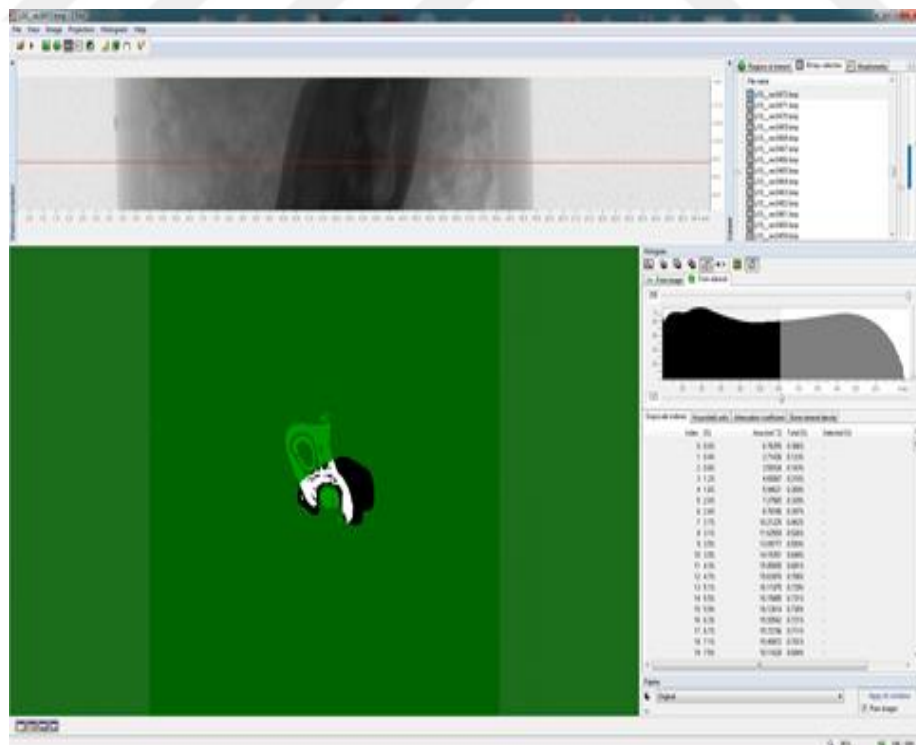
Şekil 3-8: NRecon’ da görüntünün analize hazırlanması - rekonstrüksiyon işlemi

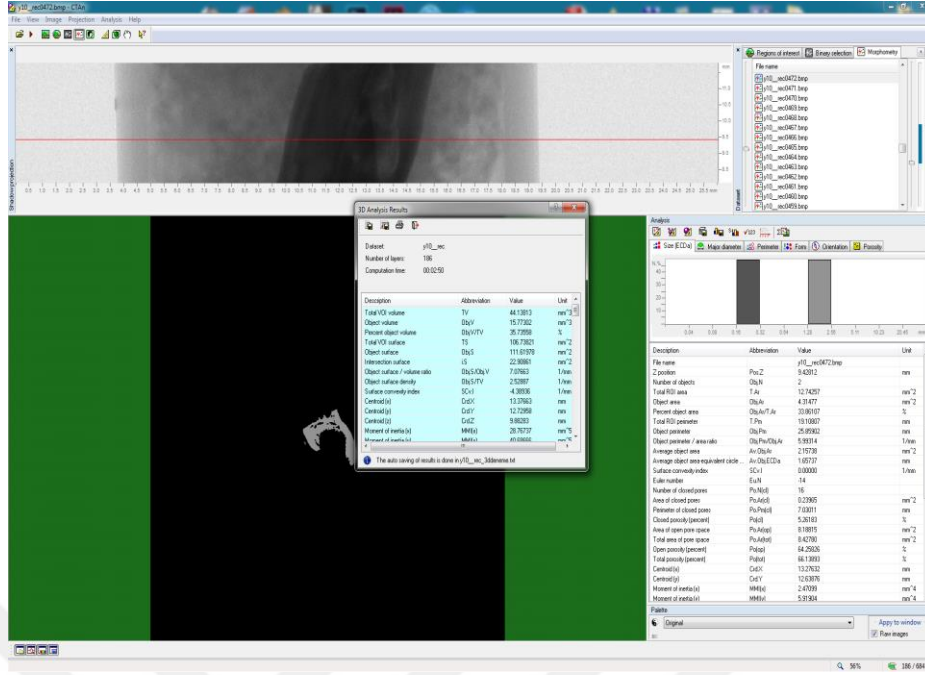


Şekil 3-9: CTAn programı ile analizi yapılacak alanın belirlenmesi (ROI seçimi)

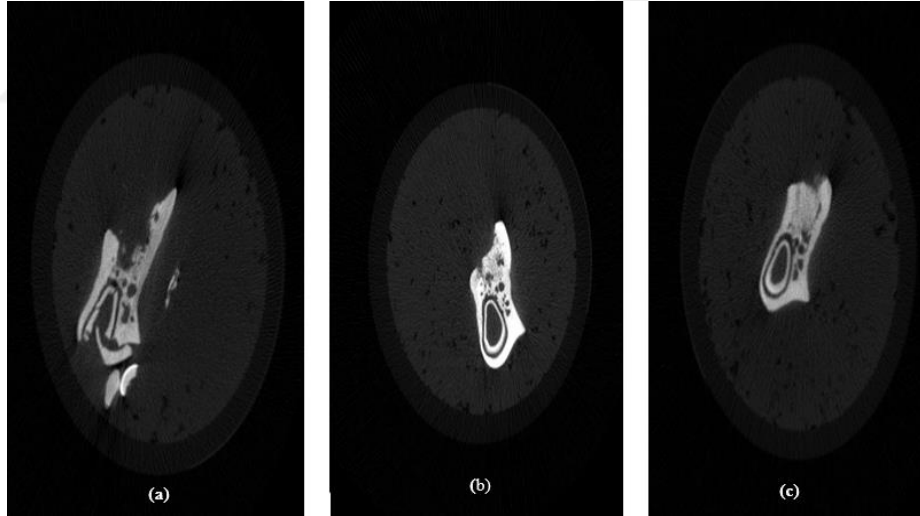


Şekil 3-10: CTAn programı





Şekil 3-12: CTAn programı ile analiz yapılması ile elde edilen sonuçlar



Şekil 3-13: İyileşmenin olmadığı (a), kısmen görüldüğü (b) ve tamamlandığı (c) radyolojik görüntüler

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Parametrelerin haftalar arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.



4. BULGULAR

Çalışma toplam 48 deney hayvanı üzerinde yapılmıştır. Kontrol grubu “Grup 1”, ZOL grubu “Grup 2”, GS4012 grubu “Grup 3”, ZOL+GS4012 grubu “Grup 4” olarak adlandırılmıştır.

4.1. İstatiksel Bulgular

4.1.1. Deney Hayvanlarının Ağırlık Bulguları

Deney hayvanlarından 4. haftada sakrifiye edilen grupların ağırlık bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-1’de, 6. haftada sakrifiye edilen grupların ağırlık bulgularının karşılaştırılması ise Tablo 4-2’de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: 4. haftada sakrifiye edilen grupların ağırlık açısından karşılaştırılması

	Op günü	1.hafta	2.hafta	3.hafta	4.hafta
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
	(medyan)	(medyan)	(medyan)	(medyan)	(medyan)
Grup 1	307±30,4 (293)	319,33±25,3 (308,5)	337,83±27,95 (324,5)	348±34,25 (336)	357,67±35,15 (345)
Grup 2	287,67±20,1 (290)	302,83±24,19 (311,5)	319,17±26,64 (327)	331,67±24,84 (335,5)	338,5±24,24 (342,5)
Grup 3	308,5±46,85 (289,5)	322,67±54,06 (309)	330,83±58,66 (317)	339,83±57,05 (330,5)	348±55,34 (340)
Grup 4	288,17±32,5 (290,5)	293,67±32,59 (298)	301,17±29,61 (302,5)	314,33±32,93 (310,5)	326,67±36,18 (320,5)
p	0,821	0,610	0,375	0,508	0,666

Kruskal Wallis Test

4.haftada sakrifiye edilen hayvanların oluşturduğu grupta; gruplar arasında operasyon günü, operasyon sonrası 1.hafta, 2.hafta, 3.hafta ve 4.hafta ağırlık ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4-2: 6. haftada sakrifiye edilen grupların ağırlık açısından karşılaştırılması

	Op günü	1.hafta	2.hafta	3.hafta	4.hafta	5.hafta	6.hafta
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)
Grup 1	327,5±24,7 (317,5)	335,83±26,44 (328,5)	350,17±27,58 (346)	365,67±30,04 (356)	372,17±31,17 (362,5)	377,17±31,12 (368)	384,67±31,41 (374)
Grup 2	318,5±43,13 (307,5)	328±43,41 (320)	345,17±44,42 (336)	358±46,87 (357,5)	365,33±45,65 (366)	372,17±46,48 (370,5)	379,33±46,09 (376,5)
Grup 3	315,17±39,37 (314,5)	318,17±40,01 (311,5)	329,33±41,76 (323)	338,17±41,2 (330,5)	346,17±42,01 (343)	355,17±43,61 (359)	361,83±45,09 (368)
Grup 4	287,67±42,24 (290,5)	291,83±40,37 (292,5)	298,83±40,12 (303)	309,83±45,06 (310)	320,5±47,3 (321,5)	327,83±48,06 (332)	334,67±48,92 (340,5)
p	0,444	0,317	0,142	0,182	0,307	0,349	0,413

Kruskal Wallis Test

6.haftada sakrifiye edilen hayvanların oluşturduğu grupta; gruplar arasında operasyon günü, operasyon sonrası 1.hafta, 2.hafta, 3.hafta, 4.hafta, 5.hafta ve 6.hafta ağırlık ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

4.1.2. Histopatolojik Bulgular

4.1.2.1. İltihap

Deney hayvanlarının iltihap bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-3, Tablo 4-4 ve Şekil 4-1’de gösterilmiştir.

Tablo 4-3: İltihap düzeylerinin değerlendirilmesi

İltihap	4.hafta	6.hafta	¹ p
	Medyan (Min-Max)	Medyan (Min-Max)	
Grup 1	0 (0-1)	0 (0-0)	0,317
Grup 2	2,5 (2-3)	3 (3-3)	0,056
Grup 3	0 (0-1)	0 (0-0)	0,317
Grup 4	2 (2-3)	2 (2-3)	1,000
² p	0,000*	0,000*	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

* $p<0.05$

Tablo 4-4: İltihap düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi

	İltihap	
	4.hafta	6.hafta
	p	p
Grup 1-Grup 2	0,002*	0,001*
Grup 1-Grup 3	1,000	1,000
Grup 1-Grup 4	0,002*	0,001*
Grup 2-Grup 3	0,002*	0,001*
Grup 2-Grup 4	0,241	0,005*
Grup 3-Grup 4	0,002*	0,001*

Mann Whitney U Test

*p<0.05

Grup 1’de; 4.hafta ve 6.hafta iltihap düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 2’de; 6.haftadaki iltihap düzeyi, 4.haftadan daha yüksek olmakla birlikte, bu farklılık anlamlılığa yakın ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

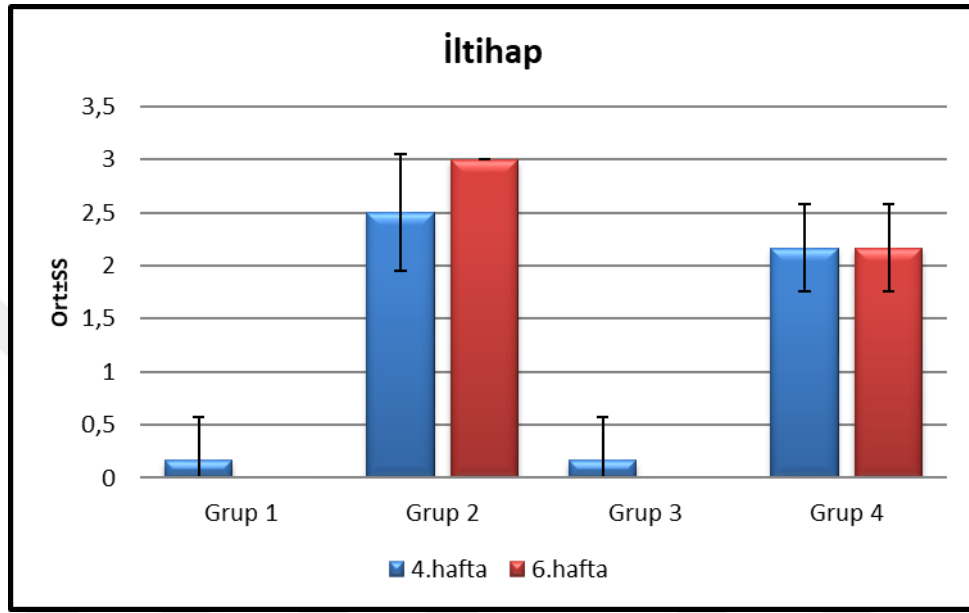
Grup 3’de; 4.hafta ve 6.hafta iltihap düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 4’de; 4.hafta ve 6.hafta iltihap düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

4.haftada kurban edilen grupta; gruplar arasında iltihap düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Grup 2’nin iltihap düzeyi, Grup 1 ve Grup 3’ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4’ün iltihap düzeyi, Grup 1 ve Grup 3’ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında 4.hafta iltihap düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Grup 2 ve Grup 4 arasında 4.hafta iltihap düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

6.haftada kurban edilen grupta; gruplar arasında iltihap düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Grup

2'nin iltihap düzeyi, Grup 1, Grup 3 ve Grup 4'ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4'ün iltihap düzeyi, Grup 1 ve Grup 3'ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında 6.hafta iltihap düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4-1: Gruplar arasında iltihap bulgularının karşılaştırılması

4.1.2.2. Fibrozis

Deney hayvanlarının fibrozis bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-5, Tablo 4-6 ve Şekil 4-2'de gösterilmiştir.

Tablo 4-5: Fibrozis düzeylerinin değerlendirilmesi

Fibrozis	4.hafta	6.hafta	¹ p
	Medyan (Min-Max)	Medyan (Min-Max)	
Grup 1	3 (2-3)	1,5 (1-3)	0,041*
Grup 2	1,5 (0-2)	2,5 (2-3)	0,020*
Grup 3	3 (2-3)	2 (1-3)	0,057
Grup 4	2,5 (2-3)	2 (2-3)	0,575
² p	0,015*	0,151	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

* $p<0.05$

Tablo 4-6: Fibrozis düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi

	Fibrozis	
	4.hafta	6.hafta
	P	P
Grup 1-Grup 2	0,011*	0,073
Grup 1-Grup 3	1,000	0,665
Grup 1-Grup 4	0,575	0,118
Grup 2-Grup 3	0,011*	0,116
Grup 2-Grup 4	0,020*	0,575
Grup 3-Grup 4	0,575	0,206

Mann Whitney U Test

*p<0.05

Grup 1’de; 4.haftadaki fibrozis düzeyi, 6.haftadan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p:0.041; p<0.05).

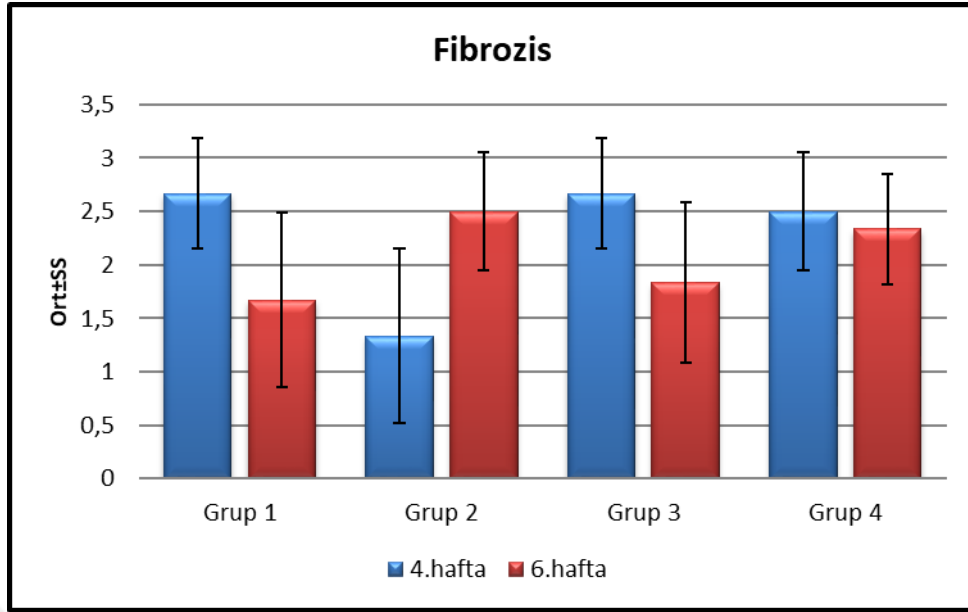
Grup 2’de; 6.haftadaki fibrozis düzeyi, 4.haftadan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p:0.020; p<0.05).

Grup 3’de; 4.haftadaki fibrozis düzeyi, 6.haftadan daha yüksek olmakla birlikte, bu farklılık anlamlılığa yakın ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

Grup 4’de; 4.hafta ve 6.hafta fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

4.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında fibrozis düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.015; p<0.05). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Grup 2’nin fibrozis düzeyi, Grup 1, Grup 3 ve Grup 4’ten anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p<0.05). Grup 1, Grup 3 ve Grup 4 arasında 4.hafta fibrozis düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

6.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında fibrozis düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p:0.151; p>0.05).



Şekil 4-2: Gruplar arasında fibrozis bulgularının karşılaştırılması

4.1.2.3. Epitel Proliferasyonunun Defekti Kapatma düzeyi

Deney hayvanlarının epitel proliferasyonunun defekti kapatma bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-7, Tablo 4-8 ve Şekil 4-3’de gösterilmiştir.

Tablo 4-7: Epitel proliferasyonunun defekti kapatma oranı düzeylerinin değerlendirilmesi

Epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyi	4.hafta	6.hafta	¹ p
	Medyan (Min-Max)	Medyan (Min-Max)	
Grup 1	2,5 (2-3)	3 (3-3)	0,056
Grup 2	1,5 (0-2)	1,5 (1-3)	0,604
Grup 3	3 (2-3)	3 (3-3)	0,138
Grup 4	2 (1-2)	2 (1-3)	0,206
² p	0,007*	0,003*	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

* $p < 0.05$

Tablo 4-8: Epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi

	Epitel proliferasyonunun defekti kapatma oranı	
	4.hafta	6.hafta
	p	p
Grup 1-Grup 2	0,020*	0,007*
Grup 1-Grup 3	0,575	1,000
Grup 1-Grup 4	0,030*	0,021*
Grup 2-Grup 3	0,011*	0,007*
Grup 2-Grup 4	0,465	0,268
Grup 3-Grup 4	0,014*	0,021*

Mann Whitney U Test

* $p < 0.05$

Grup 1’de; 6.haftadaki epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyi, 4.haftadan daha yüksek olmakla birlikte, bu farklılık anlamlılığa yakın ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Grup 2’de; 4.hafta ve 6.hafta epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

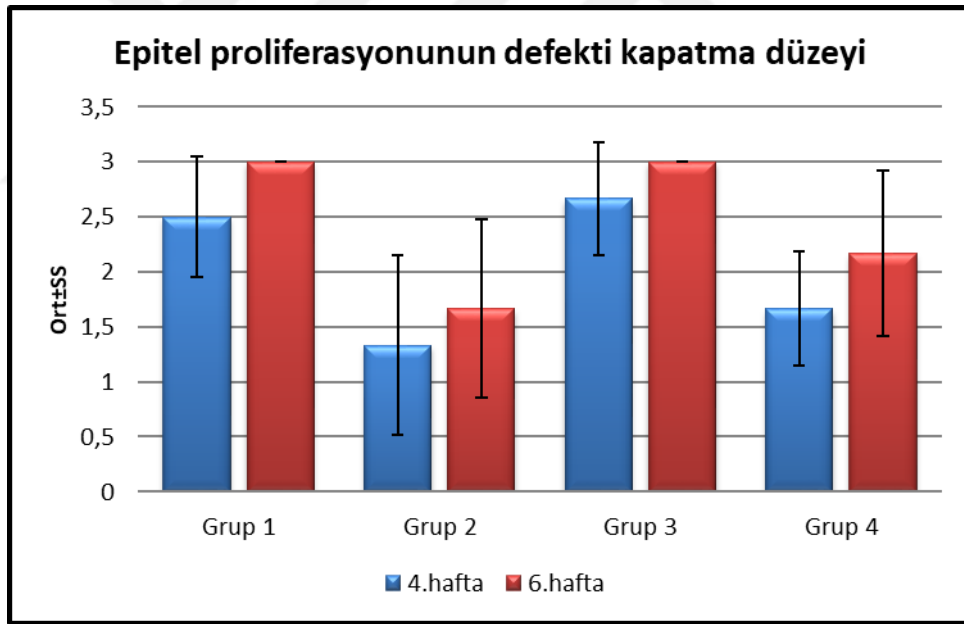
Grup 3’de; 4.hafta ve 6.hafta epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

Grup 4’te; 4.hafta ve 6.hafta epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

4.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p: 0.007$; $p < 0.05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Grup 1’in epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyi, Grup 2 ve Grup 4’ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Grup 3’ün epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyi, Grup 2 ve Grup 4’ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında 4.hafta epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık

bulunmamaktadır ($p>0.05$). Grup 2 ve Grup 4 arasında da anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

6.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.003$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Grup 1'in epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyi, Grup 2 ve Grup 4'ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3'ün epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyi, Grup 2 ve Grup 4'ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında 4.hafta epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Grup 2 ve Grup 4 arasında da anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4-3: Gruplar arasında epitel proliferasyonunun defekti kapatma düzeylerinin karşılaştırılması

4.1.2.4. Nekroz

Deney hayvanlarının nekroz bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-9, Tablo 4-10 ve Şekil 4-4’de gösterilmiştir.

Tablo 4-9: Nekroz düzeylerinin değerlendirilmesi

Nekroz	4.hafta	6.hafta	¹ p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Grup 1	0,14±0,08 (0,18)	0±0 (0)	0,007*
Grup 2	0,75±0,14 (0,73)	1,02±0,21 (0,95)	0,025*
Grup 3	0,1±0,09 (0,1)	0±0 (0)	0,022*
Grup 4	0,46±0,1 (0,44)	0,49±0,14 (0,48)	0,749
² p	0,000*	0,000*	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

* p<0.05

Tablo 4-10: Nekroz düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi

	Nekroz	
	4.hafta	6.hafta
	p	p
Grup 1-Grup 2	0,004*	0,002*
Grup 1-Grup 3	0,399	1,000
Grup 1-Grup 4	0,004*	0,002*
Grup 2-Grup 3	0,004*	0,002*
Grup 2-Grup 4	0,006*	0,004*
Grup 3-Grup 4	0,004*	0,002*

Mann Whitney U Test

*p<0.05

Grup 1’de; 4.haftadaki nekroz düzeyi, 6.haftadan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p:0.007; p<0.05).

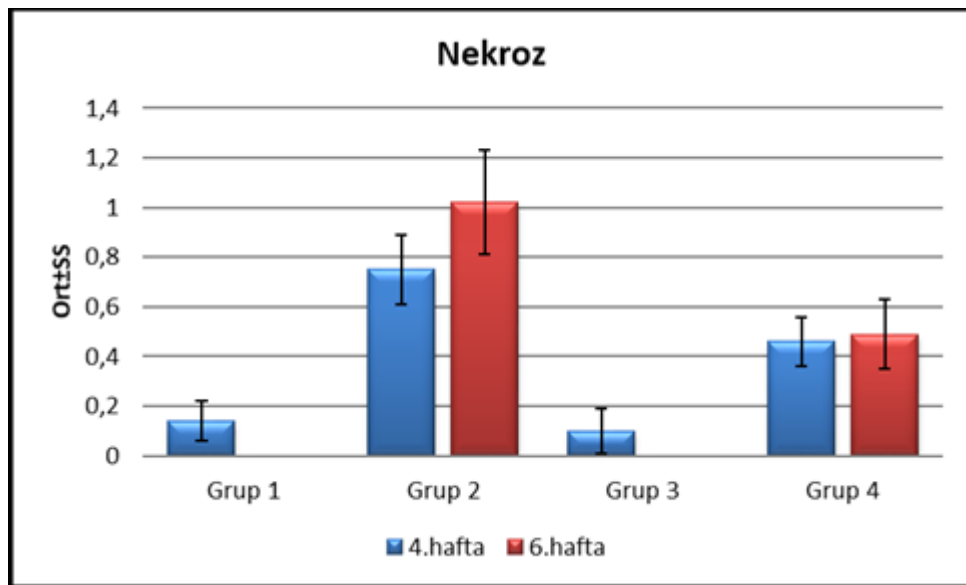
Grup 2’de; 6.haftadaki nekroz düzeyi, 4.haftadan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p:0.025; p<0.05).

Grup 3’de; 4.haftadaki nekroz düzeyi, 6.haftadan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p:0.022$; $p<0.05$).

Grup 4’de; 4.hafta ve 6.hafta nekroz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

4.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında nekroz düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Grup 2’nin nekroz düzeyi, Grup 1, Grup 3 ve Grup 4’ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4’ün nekroz düzeyi, Grup 1 ve Grup 3’den anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında nekroz düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

6.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında nekroz düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Grup 2’nin nekroz düzeyi, Grup 1, Grup 3 ve Grup 4’ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4’ün nekroz düzeyi, Grup 1 ve Grup 3’den anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında nekroz düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4-4: Gruplar arasında nekroz bulgularının karşılaştırılması

4.1.2.5. Yeni Kemik Yapımı

Deney hayvanlarının yeni kemik yapımına ait bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-11, Tablo 4-12 ve Şekil 4-5’de gösterilmiştir.

Tablo 4-11: Yeni kemik yapımı düzeylerinin değerlendirilmesi

Yeni kemik yapımı	4.hafta	6.hafta	¹ p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Grup 1	0,42±0,09 (0,41)	1,3±0,39 (1,42)	0,004*
Grup 2	0,08±0,13 (0)	0,07±0,08 (0,05)	0,929
Grup 3	0,39±0,08 (0,38)	1,06±0,29 (1,09)	0,004*
Grup 4	0,07±0,05 (0,08)	0,18±0,05 (0,19)	0,013*
² p	0,001*	0,000*	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

* p<0.05

Tablo 4-12: Yeni kemik yapımı düzeylerinin post hoc değerlendirilmesi

	Yeni Kemik Yapımı	
	4.hafta	6.hafta
	p	p
Grup 1-Grup 2	0,004*	0,004*
Grup 1-Grup 3	0,470	0,262
Grup 1-Grup 4	0,004*	0,004*
Grup 2-Grup 3	0,006*	0,004*
Grup 2-Grup 4	0,732	0,043*
Grup 3-Grup 4	0,004*	0,004*

Mann Whitney U Test

*p<0.05

Grup 1’de; 6.haftadaki yeni kemik yapımı düzeyi, 4.haftadan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p:0.004; p<0.05).

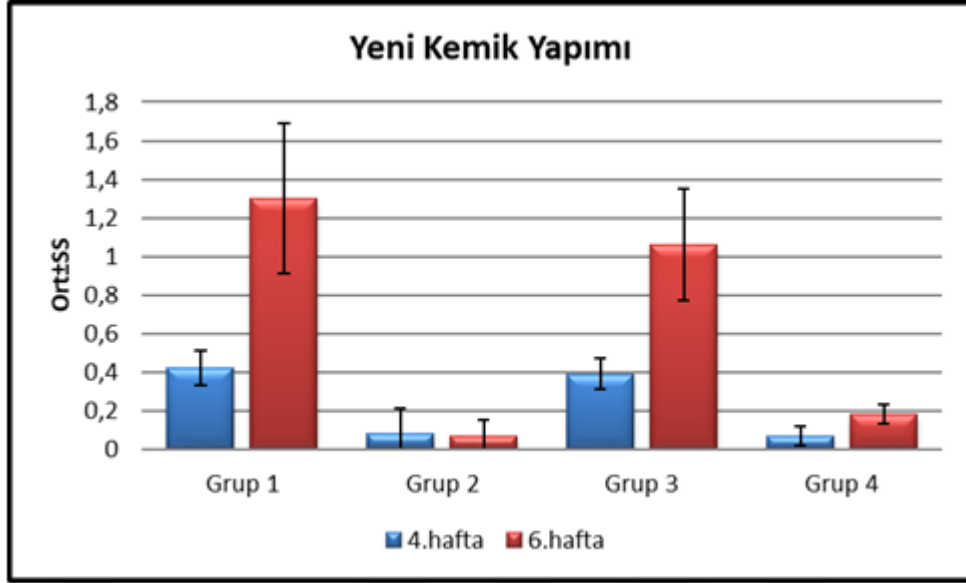
Grup 2’de; 4.hafta ve 6.hafta yeni kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Grup 3 'de; 6.haftadaki yeni kemik yapımı düzeyi, 4.haftadan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p:0.004$; $p<0.05$).

Grup 4 'de; 6. haftadaki yeni kemik yapımı düzeyi, 4. haftadan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p:0.013$; $p<0.05$).

4.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında yeni kemik yapımı düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.001$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Grup 1'in yeni kemik yapımı düzeyi, Grup 2 ve Grup 4'ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 3'ün yeni kemik yapımı düzeyi, Grup 2 ve Grup 4'ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında 4.hafta yeni kemik yapımı düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Grup 2 ve Grup 4 arasında da anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

6.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında yeni kemik yapımı düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Grup 2'nin yeni kemik yapımı düzeyi, Grup 1, Grup 3 ve Grup 4'ten anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 4'ün yeni kemik yapımı düzeyi, Grup 1 ve Grup 3'ten anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında yeni kemik yapımı düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4-5: Gruplar arasında yeni kemik yapım bulgularının karşılaştırılması

4.1.3. Radyolojik Bulgular

4.1.3.1. Kemik Mineral yoğunluğu (BMD)

Deney hayvanlarının kemik mineral yoğunluğuna ait bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-13 ve Şekil 4-6'da gösterilmiştir.

Tablo 4-13: BMD düzeylerinin değerlendirilmesi

BMD (g/cm ³)	4.hafta	6.hafta	¹ p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Grup 1	1,03±0,68 (0,82)	0,92±0,51 (0,77)	1,000
Grup 2	1,31±0,84 (0,99)	1,39±1,03 (1,01)	1,000
Grup 3	2,34±1,4 (2,35)	2,26±0,48 (2,43)	1,000
Grup 4	2,05±1,14 (1,79)	2,04±0,82 (1,74)	1,000
² p	0,267	0,088	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

Grup 1'de; 4.hafta ve 6.hafta BMD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

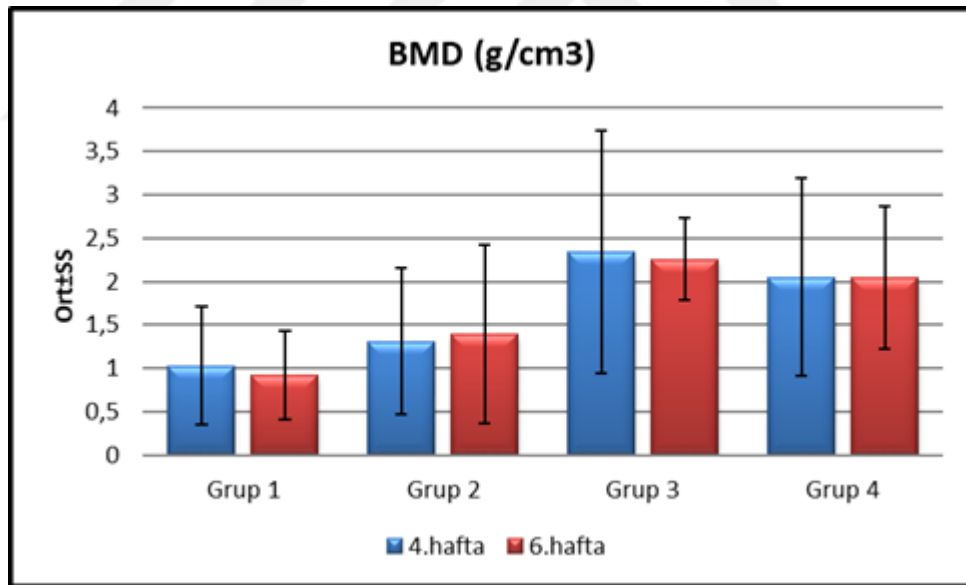
Grup 2'de; 4.hafta ve 6.hafta BMD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 3'de; 4.hafta ve 6.hafta BMD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 4'de; 4.hafta ve 6.hafta BMD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

4.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında BMD düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.257$; $p>0.05$).

6.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında BMD düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.088$; $p>0.05$).



Şekil 4-6: Gruplar arasında BMD bulgularının karşılaştırılması

4.1.3.2. SMI

Deney hayvanlarına ait Yapı Modeli İndeksi (SMI) bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-14 ve Şekil 4-7’de gösterilmiştir.

Tablo 4-14: SMI düzeylerinin değerlendirilmesi

SMI	4.hafta	6.hafta	¹ p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Grup 1	0,06±1 (-0,02)	1,28±0,57 (1,36)	0,083
Grup 2	-0,03±1,17 (-0,44)	1,41±1,41 (1,13)	0,149
Grup 3	0,02±0,52 (-0,12)	0,24±1,71 (-0,11)	0,773
Grup 4	0,85±1,87 (1,03)	0,81±0,76 (0,55)	1,000
² p	0,782	0,613	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

Grup 1’de; 6.hafta SMI düzeyleri, 4.haftadan daha yüksek olmakla birlikte daha yüksek olmakla birlikte, bu farklılık anlamlılığa yakın ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

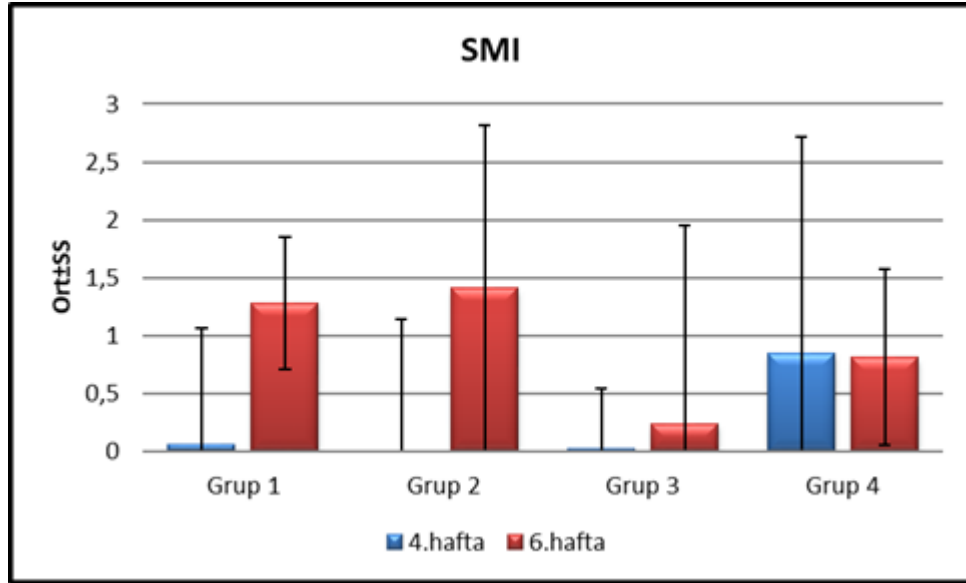
Grup 2’de; 4.hafta ve 6.hafta SMI düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 3’de; 4.hafta ve 6.hafta SMI düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 4’de; 4.hafta ve 6.hafta SMI düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

4.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında SMI düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.782$; $p>0.05$).

6.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında SMI düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.613$; $p>0.05$).



Şekil 4-7: Gruplar arasında SMI bulgularının karşılaştırılması

4.1.3.3. Hacim

Deney hayvanlarına ait hacim bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-15 ve Şekil 4-8’de gösterilmiştir.

Tablo 4-15: Hacim düzeylerinin değerlendirilmesi

Hacim (mm ³)	4.hafta Ort±SS (medyan)	6.hafta Ort±SS (medyan)	¹ p
Grup 1	7,75±1,29 (7,23)	9,67±1,14 (9,17)	0,149
Grup 2	10,58±5,04 (8,73)	9,69±2,36 (9,77)	0,773
Grup 3	7,05±0,71 (7,06)	7,59±1,83 (7,58)	0,773
Grup 4	10,59±3,13 (10,7)	8,95±3,3 (8,27)	0,386
² p	0,231	0,320	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

Grup 1’de; 4.hafta ve 6.hafta hacim düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

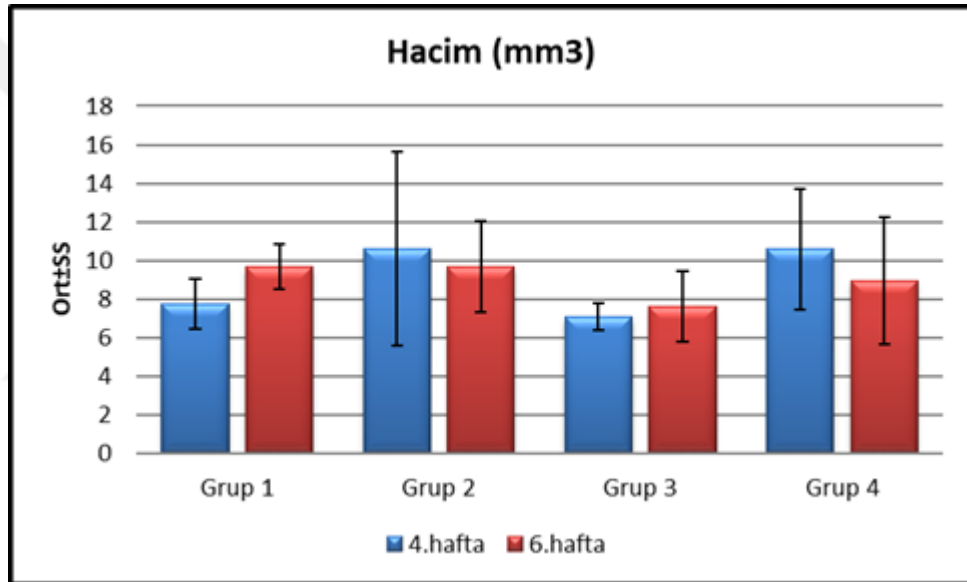
Grup 2’de; 4.hafta ve 6.hafta hacim düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 3’de; 4.hafta ve 6.hafta hacim düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 4’de; 4.hafta ve 6.hafta hacim düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

4.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında hacim düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.231$; $p>0.05$).

6.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında hacim düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.320$; $p>0.05$).



Şekil 4-8: Gruplar arasında hacim bulgularının karşılaştırılması

4.1.3.4. Kökler arası doku kalınlığı

Deney hayvanlarının kökler arası doku kalınlığına ait bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-16 ve Şekil 4-9'da gösterilmiştir.

Tablo 4-16: Kökler arası doku kalınlığı düzeylerinin değerlendirilmesi

Kökler arası doku kalınlığı (mm)	4.hafta	6.hafta	¹ p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Grup 1	0,34±0,1 (0,34)	0,26±0,1 (0,23)	0,146
Grup 2	0,45±0,21 (0,41)	0,3±0,12 (0,31)	0,386
Grup 3	0,5±0,15 (0,52)	0,53±0,16 (0,52)	0,773
Grup 4	0,43±0,27 (0,41)	0,43±0,2 (0,41)	0,773
² p	0,562	0,133	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

Grup 1'de; 4.hafta ve 6.hafta kökler arası doku kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

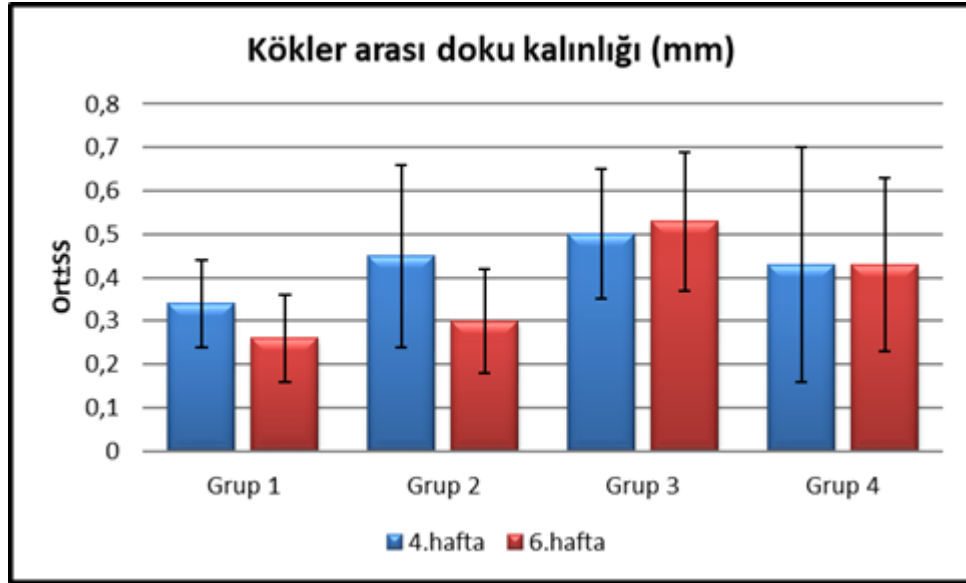
Grup 2'de; 4.hafta ve 6.hafta kökler arası doku kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 3'de; 4.hafta ve 6.hafta kökler arası doku kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 4'de; 4.hafta ve 6.hafta kökler arası doku kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

4.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında kökler arası doku kalınlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.562$; $p>0.05$).

6.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında kökler arası doku kalınlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.133$; $p>0.05$).



Şekil 4-9: Gruplar arasında kökler arası doku kalınlığı bulgularının karşılaştırılması

4.1.3.5. Kortikal kemik kalınlığı

Deney hayvanlarının kortikal kemik kalınlığına ait bulgularının karşılaştırılması Tablo 4-17 ve Şekil 4-10'da gösterilmiştir.

Tablo 4-17: Kortikal kemik kalınlığı düzeylerinin değerlendirilmesi

Kortikal kemik kalınlığı (mm)	4.hafta Ort±SS (medyan)	6.hafta Ort±SS (medyan)	¹ p
Grup 1	0,79±0,09 (0,79)	0,89±0,13 (0,89)	0,248
Grup 2	0,88±0,18 (0,85)	0,77±0,08 (0,77)	0,564
Grup 3	0,85±0,12 (0,85)	0,99±0,39 (0,87)	1,000
Grup 4	1,23±0,46 (1,18)	0,95±0,1 (0,97)	0,248
² p	0,270	0,235	

¹Mann Whitney U Test

²Kruskal Wallis Test

Grup 1'de; 4.hafta ve 6.hafta kortikal kemik kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

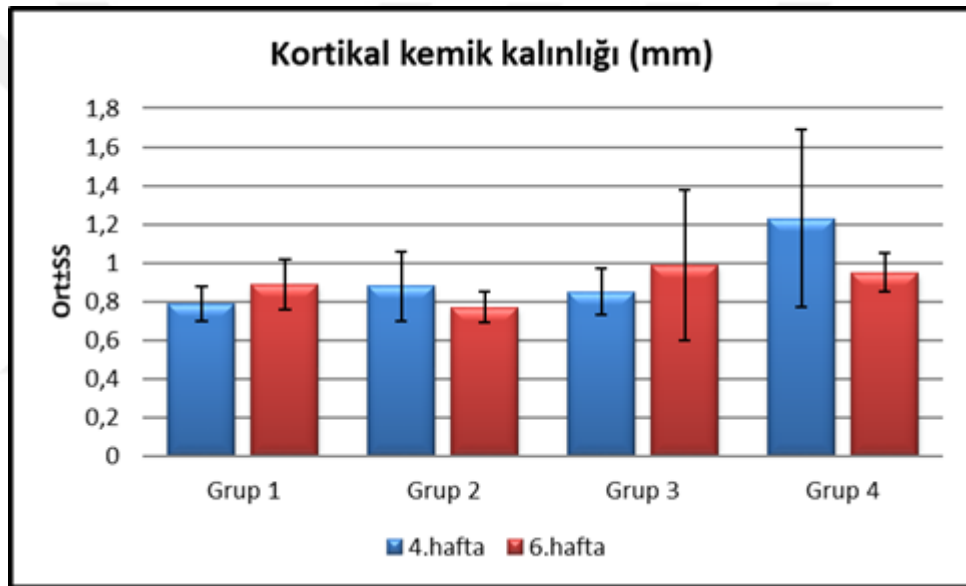
Grup 2'de; 4.hafta ve 6.hafta kortikal kemik kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 3’de; 4.hafta ve 6.hafta kortikal kemik kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 4’de; 4.hafta ve 6.hafta kortikal kemik kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

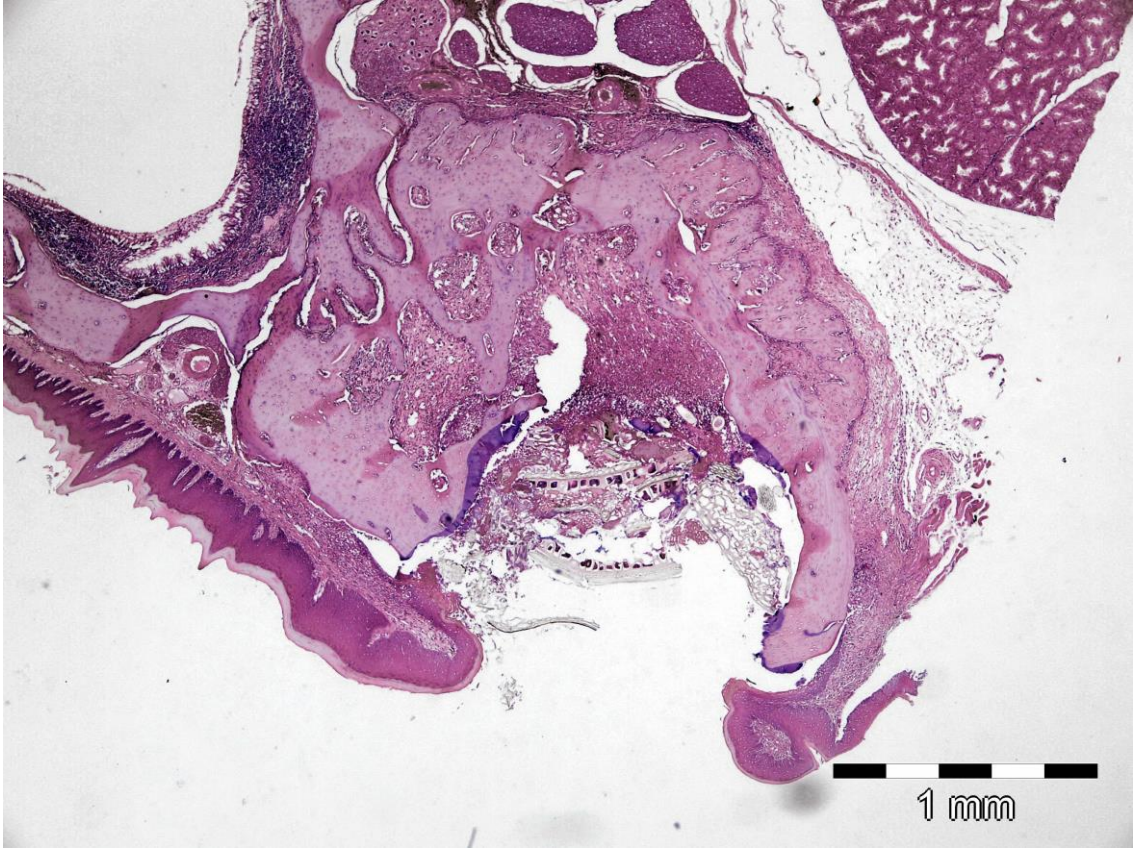
4.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında kortikal kemik kalınlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.270$; $p>0.05$).

6.haftada sakrifiye edilen grupta; gruplar arasında kortikal kemik kalınlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.235$; $p>0.05$).

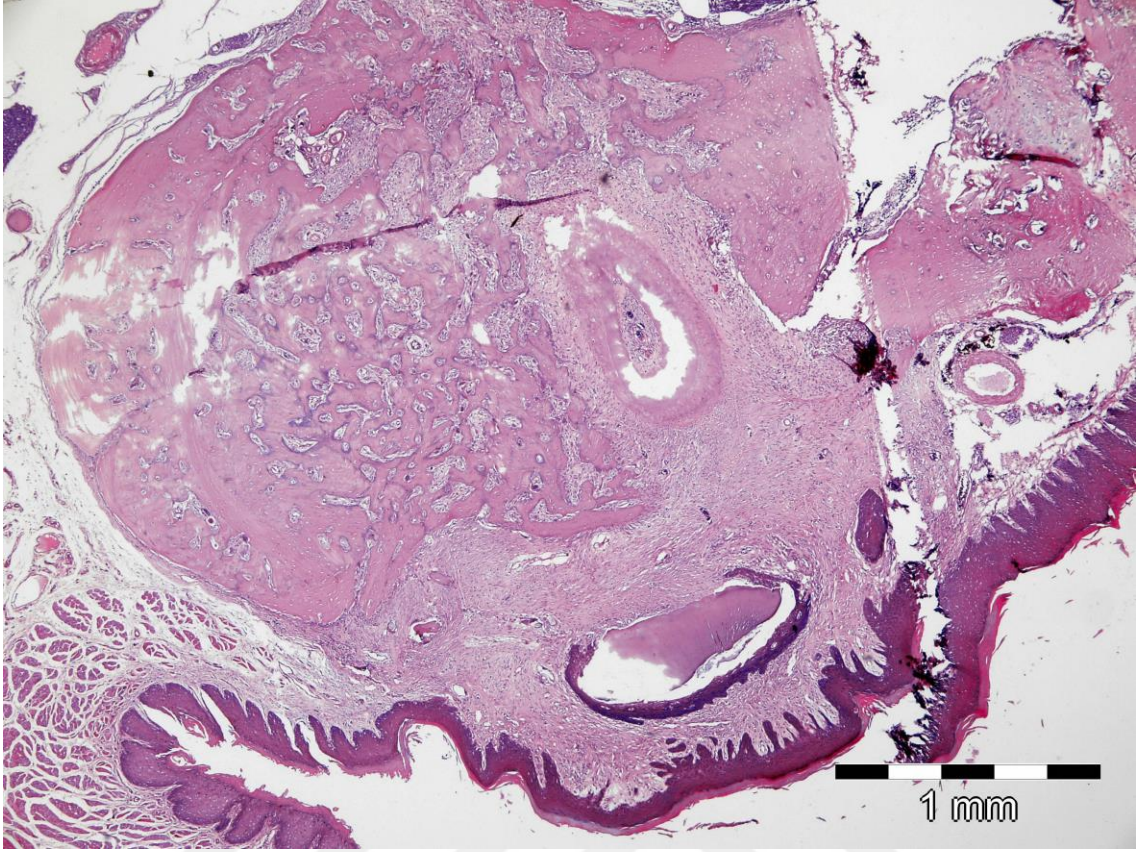


Şekil 4-10: Gruplar arasında kortikal kemik kalınlığı bulgularının karşılaştırılması

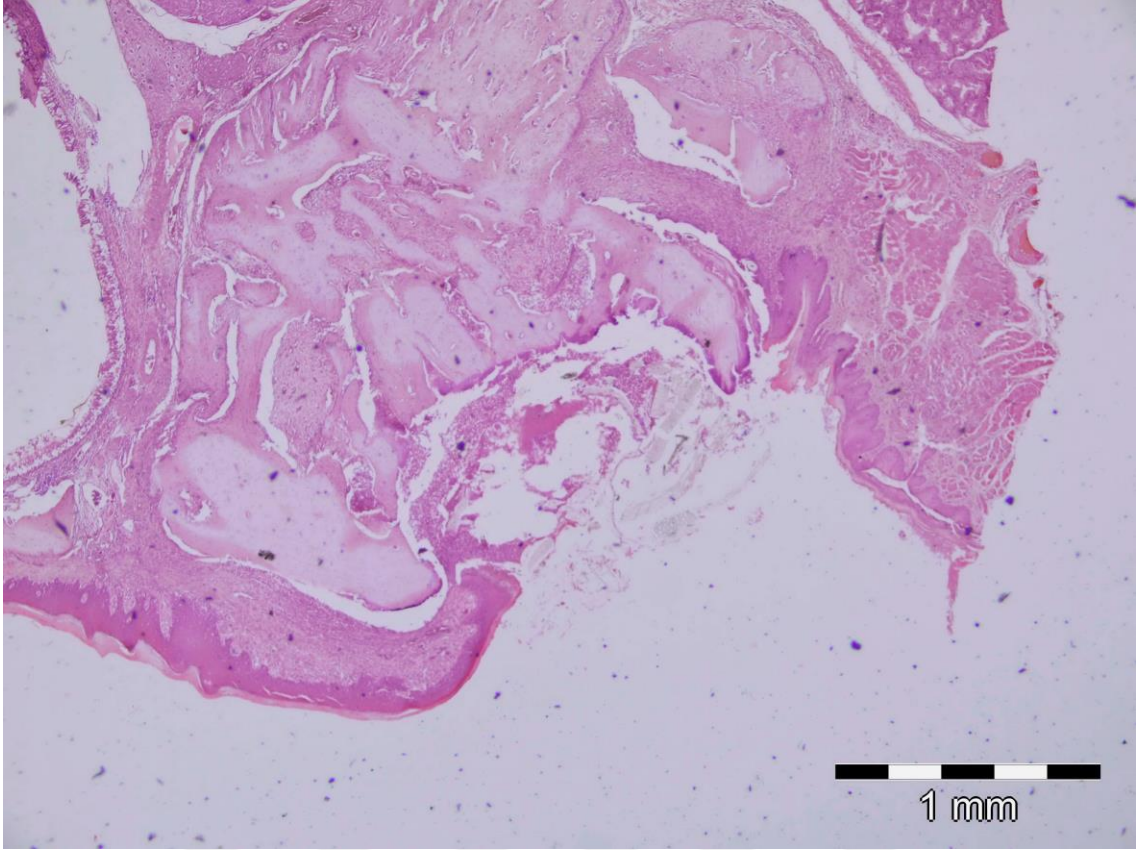
4.2. Işık Mikroskobu Değerlendirmeleri



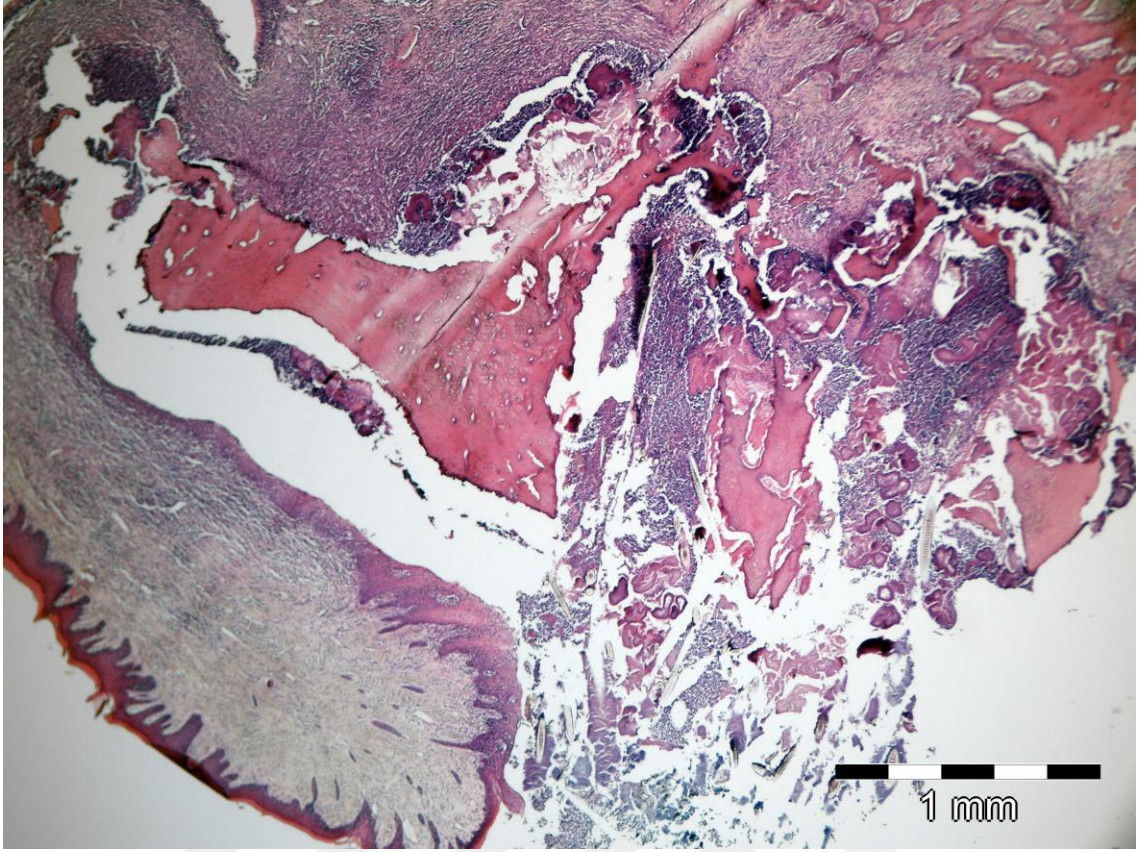
Şekil 4-11: Diş çekim boşluğu büyük oranda fibröz bağ dokusu ve içinde yeni kemik trabekülleri ile doludur. Yüzey epiteli ise soketi yaklaşık yarı yarıya örtmüş durumdadır. Soket içinde nekrotik doku ve besin artıkları vardır (Kontrol grubu 4. hafta, H&E X40).



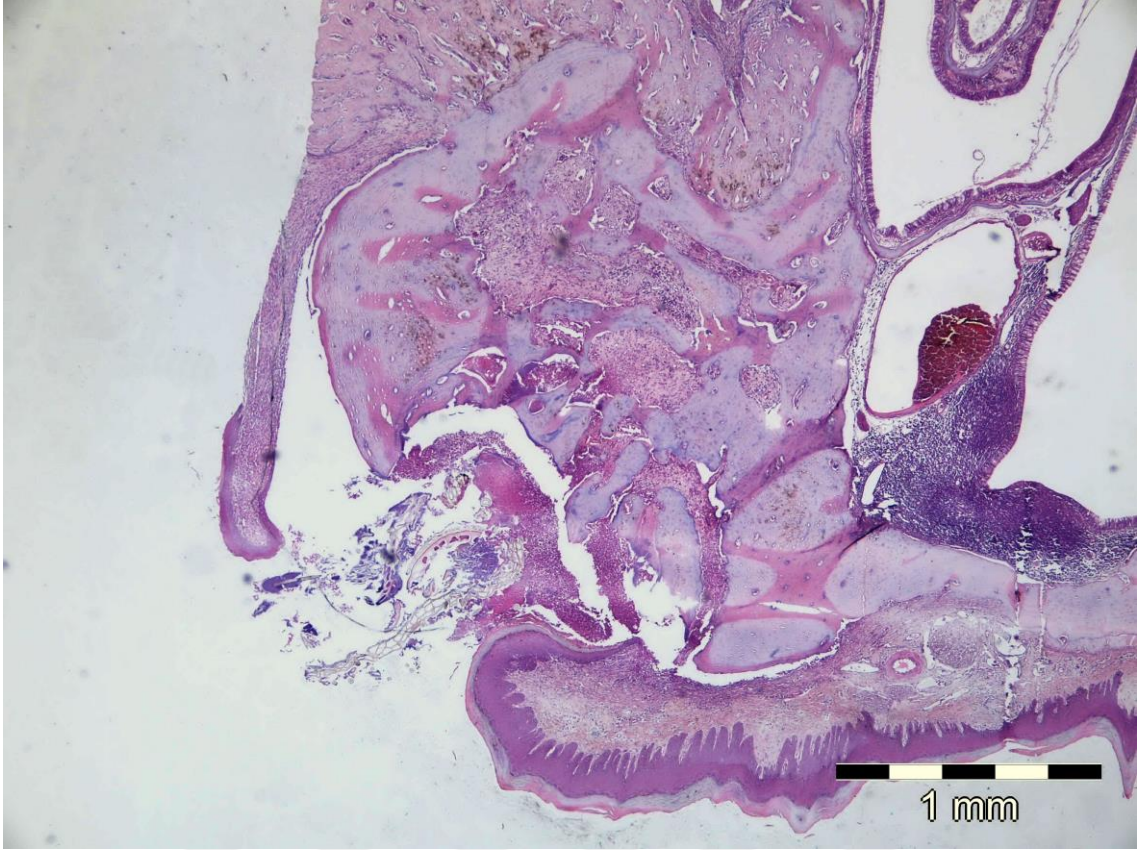
Şekil 4-12: Çekim socketinin büyük oranda yeni kemik yapımı ve fibröz bağ dokusu ile dolduğu, yüzey epitelinin rejenere olarak çekim socketini örttüğü izlenmektedir (Kontrol grubu 6. hafta, H&E X40).



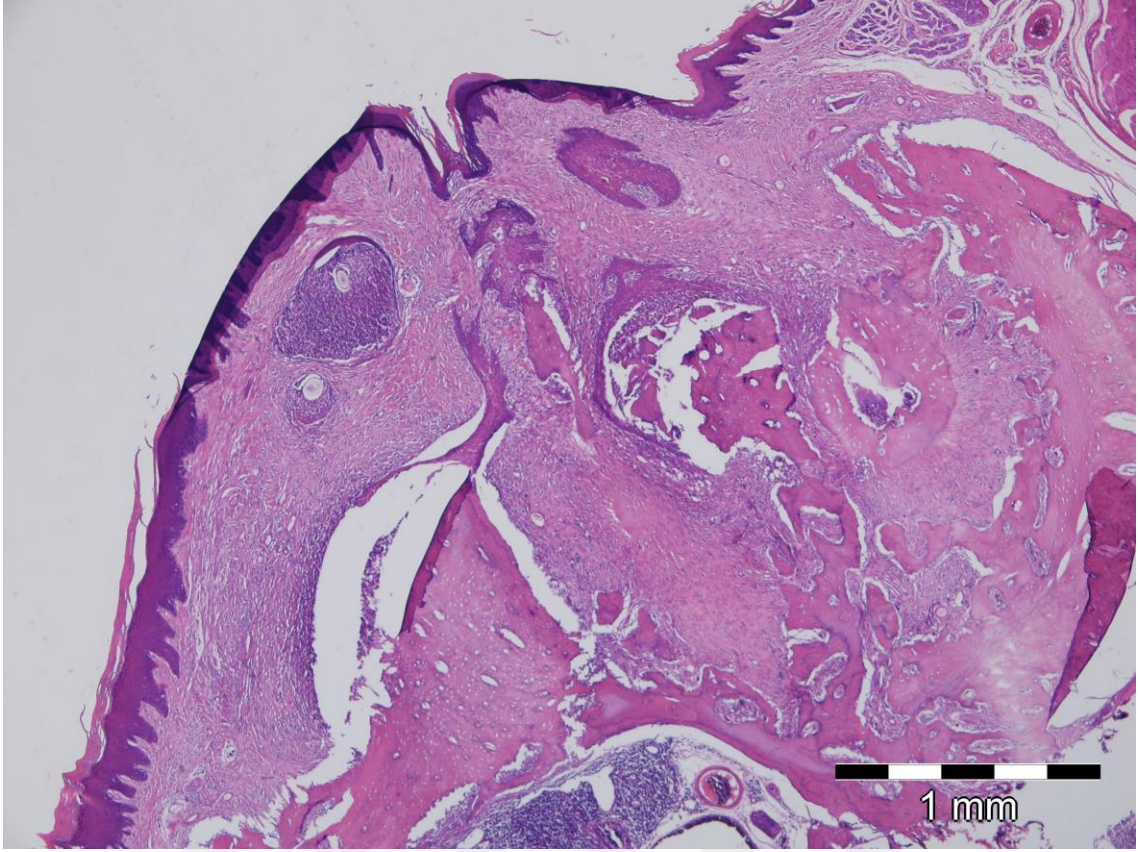
Şekil 4-13: Çekim soketinde iltihap hücresi infiltrasyonu içeren bağ dokusu içinde bir bölümü nekrotik kemik trabekülleri, çevrede kanama alanları ve fibrin demetleri izlenmektedir (ZOL grubu 4. hafta, H&E x40).



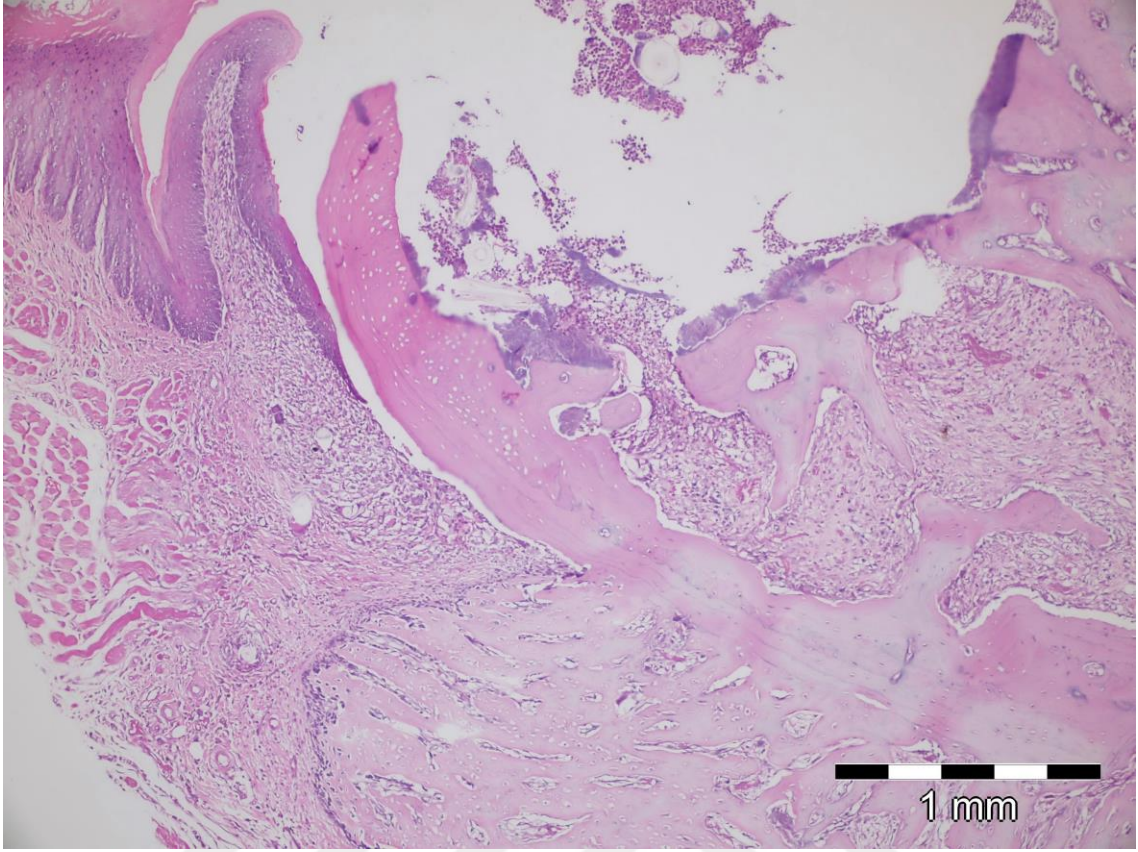
Şekil 4-14: Çekim socketinde nekrotik doku artıkları, büyük bölümü nekrotik kemik trabekülleri izlenmektedir. Bunların çevresinde yoğun iltihap hücresi proliferasyonu içeren bağ dokusu saptanmaktadır. Yüzey epitelinin bağ dokusu içine doğru proliferere olduğu dikkati çekmektedir (ZOL grubu 6. hafta, H&E X40).



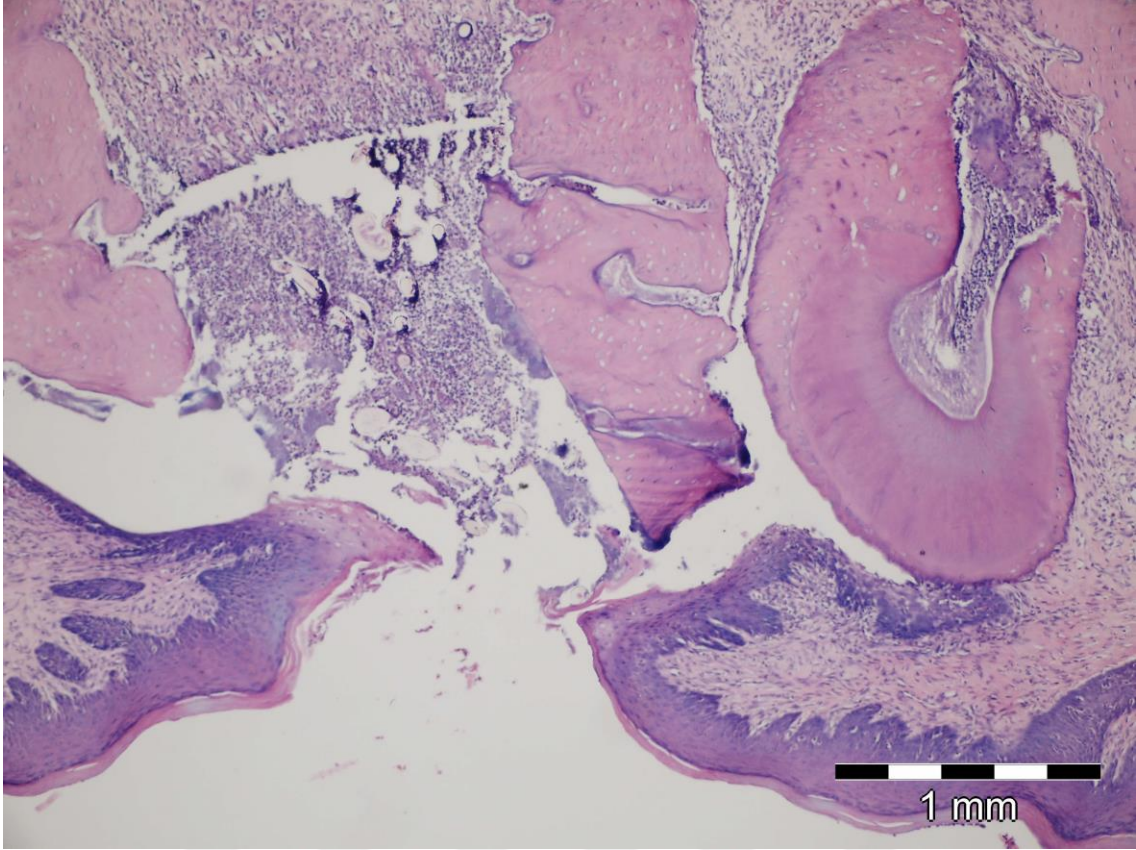
Şekil 4-15: Çekim soketinin büyük oranda yeni kemik ve fibröz doku ile dolmuş durumda olduğu ve yüzey epitelinin çekim boşluğunu yarı yarıya örttüğü gözlenmektedir. Aradaki fibröz dokuda ise iltihap hücresi infiltrasyonu vardır (GS4012 grubu 4. hafta, H&E X40).



Şekil 4-16: Çekim soketinin tamamıyla fibröz bağ dokusu ile dolduğu, bu doku içinde yeni kemik trabeküllerinin bulunduğu görülmektedir. Yüzey epiteli diş çekim boşluğunu tamamıyla örtmüş durumdadır (GS4012 grubu 6. hafta, H&E X40).



Şekil 4-17: Çekim boşluğunda fibröz bağ dokusu içinde nekrotik kemik trabekülleri izlenmektedir. Yüzey epiteli çekim boşluğu kenarlarından derine doğru prolifer olmaktadır (ZOL+GS4012 grubu 4. hafta, H&E X40).



Şekil 4-18: Çekim soketinde yoğun iltihapsal hücre infiltrasyonu içeren bağ dokusu içinde nekrotik kemik trabekülleri yanı sıra çekim boşluğunun kenarlarında canlı yeni kemik dokusu izlenmektedir. Yüzey epiteli çekim boşluğunu yaklaşık 2/3 oranında kapatmıştır (ZOL+GS4012 grubu 6. hafta, H&E X40)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı; maligniteye bağlı hiperkalseminin; meme, prostat ve akciğer kanseri gibi solid tümörlere bağlı osteolitik kemik metastazlarının; multiple myeloma bağlı osteolitik lezyonların, fibröz displazinin, osteoporozun, osteopeninin, Paget hastalığı gibi metabolik kemik hastalıklarının ve osteogenesis imperfecta gibi konjenital hastalıkların tedavisinde etkin ve yaygın olarak kullanılan bir ilaç olan bifosfonatların kullanımına bağlı çene kemiklerinde görülen osteonekrozunun oluşmasını engellemeye yönelik bir biyomateryalin etkinliğini ortaya çıkarmaktır.

Bifosfonat grubu ilaçlar, kullanım endikasyonlarındaki tedavi başarıları ve hastaların yaşam kalitelerini yükseltmelerine rağmen (Endo 2012; Wilson ve ark. 2012), BRONJ başta olmak üzere bir çok yan etkiye de neden olabilirler. Bifosfonatlar uygun dozda kullanıldığında iyi tolere edilebilir olmasına rağmen, Marx ve Stern (2002), ilk olarak bifosfonatların çenelerde avasküler kemik nekrozuna yol açtığını bildirdikten sonra literatürde görülen olgu bildirimleri ve bu olgulara yönelik tedavi araştırmaları artarak devam etmektedir.

BRONJ patogenezi hakkında çeşitli hipotezler ortaya atılmış olmasına ve risk faktörleri üzerinde çok fazla çalışma yapılmasına rağmen günümüzde hala fikir birliğine varılamamıştır (Singar ve ark. 2020; Soundia 2020). ‘Anjiyogenezin inhibisyonu’ hipotezinden yola çıkarak bir biyomateryalin lokal olarak uygulanmasıyla anjiyogenezin uyarılmayı hedeflediğimiz bu çalışmanın, hastaların yaşam kalitesini iyileştirmek amacıyla BRONJ klinik tablosunun oluşumuna engel olmak için tedavi seçenekleri arasında alternatif bir yaklaşım olarak potansiyelinin olduğunu düşünmekteyiz.

BRONJ tedavi protokolü olarak kabul edilen 2009 AAOMS bildirgesi, diğer antirezorptif ve antianjiyogenik ilaçların da bu klinik tabloya benzer çene osteonekrozu olgularının literatürde yerini almasından sonra 2014 yılında Ruggerio ve ark. tarafından yayınlanan AAOMS bildirgesi hem vakaların tanı evresi için hem de tedavileri için bir standardizasyon sağlamıştır. Günümüzde de bu klinik tablonun tedavisinde asıl amaç enfeksiyon, ağrı ve kemik nekrozu ilerlemesinin kontrolünü sağlayabilmektir. Hastaların yaşam kalitesini ciddi anlamda düşürebilen bu klinik durumun tedavisinde olguların evresine göre konservatif, cerrahi ve destekleyici tedavi yaklaşımlarının ayrı ya da birlikte uygulanması yer almaktadır (Nicolatou-Gallitis ve ark. 2019).

Literatürde destekleyici tedavi yaklaşımı olarak teriparatid, düşük doz lazer, hiperbarik oksijen, kemik morfojenik protein, trombosit zengin plazma, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri ve ozon tedavisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Fliefel ve ark. 2015; Lombard ve ark. 2016; Nicolatou-Gallitis ve ark. 2019). Bu tedavilerde de başarı oranlarının yüksek olmaması, bilim insanlarının yeni tedavi stratejilerini araştırmasına ve geliştirmesine neden olmaktadır. Bu nedenle literatürde son zamanlarda mezenkimal kök hücre ve geranilgeraniol gibi alternatif tedavi çalışmaları da önem kazanmıştır (Voss ve ark. 2017). Bifosfonatlara bağlı çene osteonekrozunun patofizyolojisinin tam olarak belirlenememesi, kesin başarı sağlayan tedavisinin bulunamamasına da neden olmaktadır.

Literatürde bifosfonatlara bağlı çene osteonekrozunun tedavisine yönelik çalışmalar çok fazla sayıda olmasına rağmen; bu klinik tablo henüz gelişmeden önlenmesini amaçlayan yayınlar daha az yer almaktadır. Buna ek olarak BRONJ tedavisinde kullandığımız bir VEGF indükleyicisi olan GS4012 biyomateryali ile ilgili olarak herhangi bir çalışmaya da rastlanılmamıştır. Ayrıca bu biyomateryal ile yapılan çalışmaların sayısının çok az olması da araştırma konumuzun özgünlüğünü ifade etmek için oldukça önemlidir.

MRONJ patogenezi için ortaya atılan teorilerden birisi de bifosfonatların antianjiyogenik etkileri ile ilgilidir. Son yıllarda popüleritesi artan bir teori haline gelen bu etki ile ilgili literatürde çok sayıda araştırma yer almaktadır. İn vivo ve in vitro çalışmalar ile bifosfonatların bu etkisini birden fazla mekanizma üzerinden oluşturduğu desteklenmiştir. Sert ve yumuşak doku iyileşmesi için temel faktör olan anjiyogenezin ve revaskülarizasyonun baskılanması MRONJ patofizyolojisinde tek başına özel bir rol üstlenmemesine rağmen; literatürdeki güncel görüşün osteonekroz gelişimine multifaktöriyel etmenlerin hepsinin bir arada neden olduğu ve bu antianjiyogenik etkinin ise oldukça önemli yere sahip olduğu yönündedir (Pabst ve ark. 2016).

Kobayashi ve ark. (2010) sıçanlarda diş çekimi sonrası sokete lokal olarak ZOL uyguladıkları çalışmada; zoledronik asidin osteogenez ve anjiyogenezi inhibe ettiğini, oral mukoza epitel hücrelerinin göçünü azalttığını ve bu durumun da soketin bakteri kontaminasyonuna yol açtığını bildirmişlerdir. ZOL ve pamidronatın alendronat gibi oral bifosfonatlara göre osteoklastlar üzerinde daha güçlü etkiye sahip oldukları, uzun dönem kullanımları sonucunda osteoklastların, kemiğin rezorbsiyonunu

engelleyerek, osteoblastların ve osteositlerin aselüler kemik matriksinden ayrılarak ölümüne neden oldukları, bununla birlikte kapiller dejenerasyon, avaskularizasyon ve mikrokırıklara eğilimin görüldüğü bildirilmektedir (Eckert ve ark. 2007; Lipton 2007). Bifosfonatlar ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü ve yeni kapiller oluşumunu da inhibe etmektedir (Dederich ve Bushick 2004).

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), vasküler endotel hücreleri için spesifik bir mitojen olarak endotel hücrelerinde proliferasyon yapar, hücre göçünü kolaylaştırır ve apoptozu inhibe eder. VEGF kan damarlarındaki geçirgenliği artırmasının yanında anjiyogenezi indüklediğinden anjiyogenezin düzenlenmesinde temel rol oynar (Turgut ve ark. 2007).

ZOL'un antianjiyogenez etkisi bir çok çalışmada belirtilmiştir (Conti 2002; Merigo ve ark. 2005; Ruggiero ve ark. 2006). ZOL'un VEGF miktarını olumsuz etkilediğini belirten çalışmalar mevcuttur (Ferretti ve ark. 2005; Kobayashi ve ark. 2010; Mozzati ve ark. 2013). Di Salvatore ve ark. (2011), in vitro çalışmasında ZOL'un VEGF salınımını azaltarak akciğer kanseri hücrelerindeki anjiyogenezi baskıladığını rapor etmiştir. Santini ve ark. (2006), kanser hastalarında bifosfonat uygulaması sonrası anjiyogenik faktörlerin serum seviyelerini araştırdığı çalışmada VEGF seviyesinde önemli miktarda azalma olduğunu ifade etmişlerdir.

VEGF'in yapısal olarak bozulduğu veya üretiminin azaldığı durumlarda, yara iyileşmesi bozuklukları görülmüştür (Swift ve ark. 1999; Lauer ve ark. 2000). VEGF'yi nötralize eden antikorların kullanılmasıyla, yara iyileşmesinde önemli bir azalma görülmesi, endojen VEGF'in yara iyileşmesinde çok önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (Howdieshell ve ark. 2001).

VEGF indükleyicisi işlevine sahip GS4012'yi bir PLGA-PEG-PLGA hidrojel içinde tutarak sürekli olarak salınımını amaçladığımız bu çalışmamız ilaca bağlı çene osteonekrozu klinik tablosunun gelişimini önlemek için araştırmacılara ışık tutacaktır.

PLGA-PEG-PLGA; sentezi ve saflaştırılması için herhangi bir organik çözücü gerektirmemesi, sistemik toksisitesi olmaması, hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçlar verilebilmesi, biyoyumlu olması, biyolojik olarak bozulabilir olması, ısıya duyarlı ve enjekte edilebilir olması gibi avantajları olan bir triblok kopolimeridir (Khodaverdi ve ark. 2012). Pratoomsoot ve ark. (2008), in vitro olarak yaptıkları yara iyileşmesi çalışmasında PLGA-PEG-PLGA hidrojin biyoyumluluğunu ifade etmişlerdir. Isıya

duyarlı bu hidrojel; insülin (Rong ve ark. 2018), deksametazon (Arakeri ve Brennon 2012), kalsitonin (Liu ve ark. 2017; Shang ve ark. 2017), kolşisin (Chen ve ark. 2020), dosetaksel (Gao ve ark. 2011), doksorubisin (Yu ve ark. 2013; Cao ve ark. 2019), bevacizumab (Xie ve ark. 2015) ve TGF-Beta 1 geni (Lee ve ark. 2003) gibi çeşitli ilaç, protein ve gen taşıyıcısı olarak kullanıldığı literatürde görülmüştür. Ayrıca kemik doku rejenerasyonunda (Yan ve ark. 2015), korneal neovaskülarizasyon tedavisinde (Liu ve ark. 2019) ve korneal yaralanmalarda biyosentetik bandaj (Pratoomsoot ve ark. 2008) gibi çeşitli kullanımları da literatürde yer almaktadır. Biz de GS4012'nin kontrollü bir şekilde dış çekim soketinde salımı için PLGA-PEG-PLGA hidrojel ile kullandık.

Shang ve ark. (2017), 37°C'de PBS içinde ağırlıkça %20'lik PLGA-PEG-PLGA hidrojelinin bozulmasını inceledikleri çalışmada 35 gün içinde kütle kaybının %70 olduğunu bildirmişlerdir. Qiao ve ark. (2005), PLGA-PEG-PLGA hidrojeline yüklenen ilacın kontrollü olarak salımının 1-6 hafta arasında yapılabildiğini ifade etmişlerdir. Literatüre uygun olarak çalışmamızda %20'lik PLGA-PEG-PLGA hidrojelinin salımını değerlendirebilmek amacıyla sakrifikasyon dönemlerini 4. ve 6. hafta olarak belirledik.

Bifosfonatların etkinlikleri, nitrojen içermeyen bir bifosfonat olan etidronat esas alınarak yapılan potens sıralamasına göre; zoledronik asit, etidronat ile karşılaştırıldığında 10.000 kat daha güçlü bir etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir. İn vitro olarak yapılan bir çalışmada, zoledronik asidin bifosfonatlar arasında hidroksiapatit kristaline karşı en yüksek afiniteye sahip olduğu belirtilmiştir (Nancollas ve ark. 2006). Ayrıca çene osteonekrozunda en sık görülen bifosfanat türünün de zoledronik asit olduğu bildirilmiştir (Ruggiero ve ark. 2004; Bamias ve ark. 2005; Marx ve ark. 2005; Khosla ve ark. 2007).

Nitrojen içeren ve en fazla etkinliğe sahip bifosfonat türü olan zoledronik asidin; BRONJ patofizyolojisini araştırmak, önlemek ve tedavi yöntemlerini geliştirmek için yapılan çalışmalarda hayvan modellerinde sıklıkla tercih edilen bir ilaç etkeni olduğu bildirilmektedir (Dodson 2009; Marino ve ark. 2012; Barba-Recreo ve ark. 2014).

Geniş bir endikasyonunun olması, tedavideki etkinliği ve alternatifinin henüz bulunamaması nedeniyle günümüzde yaygın olarak kullanılan zoledronik asit, osteonekroz riskinin yüksek ve deney hayvanlarında da en sık tercih edilen bifosfonat olması sebebiyle bu çalışmamızda tercih edilmiştir.

Literatür incelendiğinde BRONJ hayvan modelleri ile ilgili çok sayıda çalışmaların yapıldığı görülmektedir (Lelovas ve ark. 2008; Hikita ve ark. 2009; Huja ve ark. 2009; Sonis ve ark. 2009; Biasotto ve ark. 2010; Hokugo ve ark. 2010; Kobayashi ve ark. 2010; López-Jornet ve ark. 2010; Maahs ve ark. 2011; Senel ve ark. 2010; Marino ve ark. 2012; Conte Neto ve ark. 2013). Günümüzde bu çalışmalarda kullanılan deney hayvanlarının cinsleri, bifosfonatların verilme yöntemi, dozları, zamanları ve osteonekrozun gelişimine neden olan diğer etkenler ile ilgili tartışmalar hala devam etmektedir.

Hayvan modelinde esas hedef çenelerin bifosfonata bağlı osteonekrozunun klinik açıdan taklit edilmesidir (Allen 2007). İdeal olarak bir hayvan modeli radyasyon verilmeden bifosfonat tedavisi uygulanan hastada 8 haftadır iyileşmeyen çene kemiği ekspozu kriterini yerine getirmelidir. Fakat türler arası metabolik farklılıklardan dolayı insanlar için aranılan bu tanı kriterinin deney hayvanlarında görülemeyeceğini savunan araştırmacılar da vardır. Bu fikri savunan araştırmacılar, nekroz varlığı ekspoz kemik olmadan da söz konusu olabileceğinden kesin teşhis için sert ve yumuşak dokulardan histolojik inceleme yapılmasının gerekli olduğunu belirtmektedirler (Ruggiero ve ark. 2009; Fedele ve ark. 2010; Yarom ve ark. 2010).

Çalışmamızdaki deney hayvanlarında ekspoz kemik gözlense de deney grupları arasında nekroz alanlarının karşılaştırılmasını ve VEGF indükleyicisi GS4012'nin etkinliğini değerlendirebilmek için histopatolojik değerlendirme yapılmıştır.

Bifosfonatların kullanımına bağlı çene osteonekrozlarının patofizyolojisini araştırmak ve tedavi yöntemlerini geliştirmek amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda kemirgenler (sıklıkla Sprague-Dawley cinsi sıçan) ve Beagle cinsi köpek ve minipig gibi hayvan modelleri kullanılmıştır (Sharma ve ark. 2013). Günümüzde BRONJ oluşumuna yönelik standart bir hayvan modeli belirlenememesine rağmen; deney uygulamalarında kullanımının ve bakımının daha kolay olması, maliyetinin daha uygun olması, büyük hayvanlara göre daha kolay müdahaleye imkan tanınması, fizyolojileri hakkında yeterli kaynak bulunması gibi avantajları nedeniyle çalışmamızda Sprague-Dawley cinsi sıçan modeli kullanılmıştır (Egermann ve ark. 2005). Ayrıca dişi sıçanların hormonal farklılıklarına bağlı olarak değişen metabolizmaları nedeniyle çalışmamızın sonuçlarına olası etkilerini elimine etmek için erkek sıçan tercih edilmiştir.

Diş çekimi gibi dentoalveolar girişimlerin BRONJ gelişimini anlamlı derecede arttırdığı bilinmektedir (Badros ve ark. 2006; Vahtsevanos ve ark. 2009; Ruggiero ve ark. 2014). Hikita ve ark. (2009), diş çekimi sonrasında erken evrede çekim soketindeki alveolar kemiğin aktif osteoklastlar tarafından rezorbe edilmesinden dolayı diş çekim boşluklarının bifosfonatların kemik üzerindeki temel etkilerinin gösterilmesi açısından ideal bir alan olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan kaynak taramalarında diş çekiminin, BRONJ oluşumunun amaçlandığı hayvan modellerinde sıklıkla uygulandığı görülmektedir. Biasotto ve ark. (2010) dentoalveolar cerrahi uygulanan hastalarda, BRONJ gelişme riskinin 44 kat artması nedeniyle sıçanlarda diş çekimini takiben soketin cerrahi olarak bir frez ile genişletildiği kemik defektini hayvan modelinde uygulamışlardır. Bu nedenle biz de çalışmamızda diş çekimi sonrasında bir frez ile soketi genişleterek standart bir hayvan modelini uyguladık.

Diş çekimi yara iyileşmesi evreleri sıçanlarda ve insanlarda birbirine benzer olsa da kemik yenilenmesi sıçanlarda çok daha hızlı bir şekilde meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalarda sıçanlardaki kemik metabolizmasının insanlara göre üç kat daha hızlı olduğu bildirilmiştir (Okamoto ve de Russo 1973; Devlin 2000). Bu nedenle, osteonekroz oluşumunu değerlendirmek için insandaki sekiz haftalık sürece karşılık, sıçanlarda dört haftalık bir sürenin yeterli olacağı düşünülmüştür (Conte Neto ve ark. 2013). Biz de çalışmamızda sıçanlarda diş çekimi sonrası 4. ve 6. hafta olmak üzere iki farklı sakrifikasyon zamanlamasını tercih ettik.

Literatürde BRONJ gelişiminin amaçlandığı hayvan modellerinde hem mandibulanın, hem de maksillanın tercih edildiği çalışmalar yer almaktadır (Hikita ve ark. 2009; Sonis ve ark. 2009; Biasotto ve ark. 2010; Hokugo ve ark. 2010; Maahs ve ark. 2011; Marino ve ark. 2012). Biz de zoledronik asit uygulaması ile indüklenen BRONJ sıçan modeli için aletlerin manipülasyonunun daha kolay ve görüş açısından daha rahat bir bölge olması nedeniyle deney hayvanlarının diş çekimlerini yaparken mandibulada sol tarafı tercih ettik. BRONJ klinik tablosunun daha çok mandibulada görülmesi sebebiyle, kullanılan GS4012 biyomateryalinin mandibuladaki diş çekim bölgelerine olan etkisinin değerlendirilmesi, çalışmamızın bulgularını klinik açıdan önemli duruma getirmektedir.

Bifosfonatların uygulanma yolu açısından çok sayıda farklı hayvan çalışması yapılmıştır. Zoledronik asidin i.v. olarak (Biasotto ve ark. 2010; Marino ve ark. 2012),

s.c. olarak (Sonis ve ark. 2009; Kobayashi ve ark. 2010) ve i.p. yol ile (Bi ve ark. 2010; Senel ve ark. 2010; Aghaloo ve ark. 2011) verilmiş hayvan çalışmaları literatürde bulunmaktadır. Bunların dışında ise Amanat ve ark. (2007) tarafından bifosfonatların lokal enjeksiyonunu denedikleri bir çalışma da literatürde yerini almıştır. Bifosfonatların oral yoldan alındığında biyoyararlanımının çok az olması ve deney hayvanlarına eşit dozda uygulamasının intraperitoneal olarak daha güvenli olması nedeniyle birçok çalışmada da tercih edilen i.p. tekniğini uyguladık.

Hayvan deneylerinde ZOL uygulamalarının dozları ile ilgili birbirinden farklı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sonis ve ark. (2009) zoledronik asidi 7.5 µg/kg s.c. uygularken; 0.1 mg/kg i.p. (Huja ve ark. 2009; Senel ve ark. 2010), 0.25mg/kg s.c. (Kobayashi ve ark. 2010), 0.125 mg/kg i.p. (Bi ve ark. 2010) 0.04 mg/kg i.v. (Biasotto ve ark. 2010), 66 µg/kg i.p. (Aghaloo ve ark. 2011), 20 µg/kg i.v. (Marino ve ark. 2012), 0.08 mg/kg i.v. (Aguirre ve ark. 2012) gibi dozlarda uyguladıkları yayınlar literatürde bulunmaktadır.

Hayvan çalışmalarında kullanılan farmasötik ajanların klinik açıdan uygulanan dozlarına eşdeğer olmasına dikkat edilmelidir. Klinik olarak, kanser hastalarına ZOL intravenöz infüzyon olarak her 3-4 haftada bir 4 mg'lık (60 kg'lık bir birey için yaklaşık olarak 66 µg/kg) doz şeklinde verilmektedir (Clemons ve ark. 2006). Her dozda uygulanan ZOL miktarı, insanlarda kullanılanı yaklaşık 9 kat daha düşüktür (Allen 2009). Biz de bu bilgiden yola çıkarak insanlardaki 66 µg/kg zoledronik asit dozuna karşılık sıçanlarda 7.5 µg/kg olacak şekilde ZOL dozunu uyguladık.

Bu ilacın kümülatif etkisinin olması nedeniyle insanlarda kullanılan doza göre daha yüksek dozlarda uygulanmasının çene osteonekrozu oluşturma riskini azaltacak yeni yaklaşımların araştırılması amacıyla yapılan bu çalışma için uygun olmadığı düşünülmüştür. Bu nedenle ortalama 60 kg olan bir insana ayda bir intravenöz olarak 4 mg/ml zoledronik asit uygulandığı düşünülerek sıçanlar için doz ayarlaması yapılmıştır.

Yapılan literatür taramalarına göre insanlara özdeş olacak şekilde hayvanlara verilen bifosfonatların uygulama yolu, dozu ve zamanı açısından standart bir güncel protokol bulunmamaktadır. Zoledronik asidin sıçanlarda kullanımıyla ilgili belirlenmiş standart bir protokolün bulunmaması nedeniyle çalışmacılar çene osteonekrozu oluşturmak için literatürler ile desteklenebilen, kendilerine uygun bir bifosfonat yöntemini uyguladıkları görülmüştür.

Çalışmamızda kullanılan sıçanların ağırlık bulguları literatürdeki diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Yamashita ve ark. (2011), farklı dozlarda zoledronik asit uyguladıkları Sprague Dawley cinsi sıçanlarda, 14 haftalık bir süre sonunda çalışma grupları ile kontrol grupları arasında ağırlık farkı gözlememişlerdir. Aghaloo ve ark. (2011), periodontal hastalık modeli oluşturdukları ve 15 hafta boyunca ZOL uyguladıkları, sistemik olarak sağlıklı, Sprague-Dawley cinsi sıçanlara haftada 3 kere ağırlık ölçümü yapmışlar ve kontrol grubuyla kıyasladıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan deney hayvanlarının operasyon günü ve sonrasında sakrifikasyon edilene kadar her hafta ağırlık ölçümleri yapılmıştır. 4.haftada sakrifiye edilen hayvanların oluşturduğu grupta; gruplar arasında operasyon günü, operasyon sonrası 1.hafta, 2.hafta, 3.hafta ve 4.hafta ağırlık ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). 6.haftada sakrifiye edilen hayvanların oluşturduğu grupta; gruplar arasında operasyon günü, operasyon sonrası 1.hafta, 2.hafta, 3.hafta, 4.hafta, 5.hafta ve 6.hafta ağırlık ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).

Sonis ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada zoledronik asit verdiği gruplarda 28. güne kadar mukoza bütünlüğünün korunamadığını göstermişlerdir. Kontrol grubunda ise kemik iyileşmesinin 28. güne kadar histopatolojik ve radyolojik olarak belirlenebildiğini tespit etmişlerdir. İyileşmenin 45-60 günde tamamlandığını savunan çalışmalar da literatürdeki yerini almıştır (Senel ve ark. 2010). Biz de çalışmamızda GS4012 biyomateryalinin salınımını yapan hidrojel yapılarının değişmesini ve kemik iyileşmesi sürecini dikkate alarak diş çekiminden sonra 4. hafta ve 6. hafta olmak üzere iki farklı sakrifikasyon zamanını tercih ettik.

İstatistiksel verilere göre sadece GS4012 biyomateryalinin uygulandığı gruplarda 4 ve 6. haftalar arasında iltihap, fibrozis ve epitel kapatma düzeyleri yönünden anlamlı bir fark bulunamamıştır. Nekroz düzeyinde 4. hafta, 6. haftaya göre daha yüksek, yeni kemik yapımında ise 6. hafta 4. haftaya göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Zoledronik asit ile GS4012 biyomateryalinin birlikte uygulandığı gruplarda iltihap, fibrozis, epitel kapatma düzeyleri ve nekroz açısından 4. ve 6. haftalar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yeni kemik yapımında ise 6. hafta 4. haftaya göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

İltihap ve nekrozun GS4012 biyomateryalinin zoledronik asit ile verildiği gruplarda sadece ZOL verilen gruplara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Kontrol ve sadece GS4012 uygulanan gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Epitel kapatma ve yeni kemik yapımı verilerinin ise sadece GS4012 biyomateryalinin olduğu gruplarda ZOL ile birlikte uygulandığı gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kontrol ve sadece GS4012 uygulanan gruplar arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Histopatolojik olarak elde edilen verilerin literatürdeki benzer çalışmalara göre paralellik gösterdiği görülmüştür.

Kemikteki iyileşmenin değerlendirilebilmesi için kullanılan radyolojik yöntemlerden biri olan mikro-tomografi (mikro-BT), daha çok hayvan çalışmalarında tercih edilmektedir (Şahin ve Topuz 2014). Kemiğin mikroanatomisini ve hücresel düzeyde gelişen değişimleri inceleme olanağı veren histopatolojik değerlendirme ile tam sayısal verilere ulaşmak mümkün olamamaktadır. Sayısal verilerin elde edilebilmesi için histomorfometrik ya da mikro-BT değerlendirmelere ihtiyaç duyulmaktadır. Mikro-BT'nin, histomorfometriye göre hızlı ve basit olmasının yanı sıra 3 boyutlu hacimsel ölçümlerin de yapılabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır (Gielkens ve ark. 2008). Biz de çalışmamızda diş çekimi sonrasında çekim bölgelerindeki değişiklikleri değerlendirebilmek amacıyla mikro-BT radyolojik yöntemi kullandık. İstatiksel verileri incelediğimizde gruplar arasında radyolojik açıdan herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir. Sonuç olarak;

- 1) Çalışmamız VEGF indükleyicisi olan GS4012'nin çenelerin bifosfonata bağlı osteonekrozuna yönelik kullanıldığı ilk deneysel çalışmadır.
- 2) Lokal olarak uygulanan ilaçların sistemik yoldan uygulanan ilaçlara göre yan etkileri daha az olmakta ve ilacın hedeflenen alanda daha fazla etki etmesi sağlanmaktadır.
- 3) Zoledronik asit, diş çekimi sonrası sıçanlarda yumuşak doku ve kemik dokuda iyileşmeyi genel olarak geciktirmektedir.
- 4) GS4012 biyomateryali, zoledronik asidin yumuşak dokudaki olumsuz etkilerini ortadan kaldırabilecek bir potansiyele sahiptir.

- 5) GS4012 biyomateryalinin BRONJ oluşumuna engel olabilecek bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır.
- 6) GS4012'nin yeni kemik yapımı üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildir.
- 7) GS4012'nin kontrollü salımı için kullandığımız PLGA-PEG-PLGA hidrojelinin özellikleri literatürle uyumlu bulunmuştur. Biyomateryal ve ilaçların lokal olarak salımı için bu hidrojel in çekim soketinde 4 hafta kalmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.
- 8) Bu deneysel çalışmadan elde edilen sonuçların klinik etkinliğinin ve güvenilirliğinin değerlendirilebilmesi için, dozlar ve süreler de göz önüne alınarak deneysel ve klinik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

- Adair, T. H., Montani, J. P. (2010). *Angiogenesis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.
- Adjemian, B. C., Lausten, L., Ang, D.B., Johnson, M., Katz, J., Bonewald, L.F. (2009). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: model and diagnosis with cone beam computerized tomography. *Cells Tissues Organs*, **189(1-4)**, 284-288.
- Aghaloo, T.L., Chaichanasakul, T., Bezouglaia, O., Kang, B., Franco, R., Dry, S.M. et al. (2010). Osteogenic potential of mandibular vs. long-bone marrow stromal cells. *J Dent Res*, **89(11)**, 1293-1298.
- Aghaloo, T.L., Kang, B., Sung, E.C., Shoff, M., Ronconi, M., Gotcher, J.E. et al. (2011). Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res*, **26(8)**, 1871-1882.
- Aguirre, J.I., Akhter, M.P., Kimmel, D.B., Pingel, J.E., Williams, A., Jorgensen, M. et al. (2012). Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res*, **27(10)**, 2130-2143.
- Allen, M.R. (2007). Animal models of osteonecrosis of the jaw. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, **7(4)**, 358-360.
- Allen, M. (2009). Does rat + bisphosphonate + exposed bone = an animal model of ONJ? *Imms Bonekey*, **6**, 227-231.
- 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.
- Altundal, H., Güvener, O. (2004). The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, **33(3)**, 286-293.
- Amanat, N., McDonald, M., Godfrey, C., Bilston, L., Little, D. (2007). Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res*, **22(6)**, 867-876.

- Aparicio, A., Garner, A., Tu, Y., Savage, A., Berenson, J., Lichtenstein, A. (1998). In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Journal of Leukemia*, **12(2)**, 220-229.
- Arakeri, G., Brennan, P.A. (2012). Dose-dependent sustained local release of dexamethasone from biodegradable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers in the possible prevention of TMJ re-ankylosis (Arakeri's TMJ release technique). *Med Hypotheses*, **78(5)**, 682-686.
- Ashcroft, A.J., Davies, F.E., Morgan, G.J. (2003). Aetiology of bone disease and the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *Lancet Oncology*, **4(5)**, 284-92.
- Badros, A., Weikel, D., Salama, A., Goloubeva, O., Schneider, A., Rapoport, A. et al. (2006). Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *Journal of Clinical Oncology*, **24(6)**, 945-952.
- Bamias, A., Kastritis, E., Bamia, C., Moulopoulos, L.A., Melakopoulos, I., Bozas, G. et al. (2005). Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol.*, **23(34)**, 8580-8587.
- Barba-Recreo, P., Del Castillo Pardo de Vera, J.L., García-Arranz, M., Yébenes, L., Burgueño, M. (2014). Zoledronic acid- related osteonecrosis of the jaws: experimental model with dental extractions in rats. *Journal of CranioMaxillofacial Surgery*, **42(6)**, 744-750.
- Bartl, R., Frisch, B. (2002). Bisphosphonates for bones – guidelines for treatment in all medical disciplines, *Blackwell Science Berlin*, 51-75.
- Bartl, R., Frisch, B., Tresckow, E., Bartl, C. (2007). *Bisphosphonates in Medical Practice: Action-Side-Effects-Indications-Strategies*. Berlin Heidelberg: SpringerVerlag.
- Beninati, F., Pruneti, R., Ficarra, G. (2013). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (Bronj). *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, **18(5)**, 752-758.
- Best, B., Moran, P., Ren, B. (2018). VEGF/PKD-1 signaling mediates arteriogenic gene expression and angiogenic responses in reversible human microvascular endothelial cells with extended lifespan. *Mol Cell Biochem.*, **446(1-2)**, 199-207.

- Bi, Y., Gao, Y., Ehirchiou, D., Cao, C., Kikuri, T., Le, A. et al. (2010). Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol.*, **177**(1), 280-290.
- 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**(2), 249-258.
- Biasotto, M., Chiandussi, S., Zacchigna, S., Moimas, S., Dore, F., Pozzato, G. et al. (2010). A novel animal model to study nonspontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med.*, **35**(5), 390-396.
- Bisacchi, D., Benelli, R., Vanzetto, C., Ferrari, N., Tosetti, F., Albini, A. (2003). Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. *Cancer Detect Prev.*, **27**(3), 229-238.
- Bloemendal, H.J., Logtenberg, T., Voest, E.E. (1999). New strategies in anti-vascular cancer therapy. *European Journal of Clinical Investigation*, **29**(9), 802-809.
- Bock, O., Felsenberg, D. (2008). Bisphosphonates in the management of postmenopausal osteoporosis—optimizing efficacy in clinical practice. *Clin Interv Aging.*, **3**(2), 279-297.
- Brenson, J.R., Lipton, A. (1999). Bisphosphonate in the treatment of malignant bone disease. *Annual Review of Medicine*, **50**, 237-248.
- Brozoski, M.A., Traina, A.A., Deboni, M.C., Marques, M.M., Naclério-Homem Mda, G. (2012). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rev Bras Reumatol.*, **52**(2), 265-270.
- Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. (2006). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (11th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Cao, D., Zhang, X., Akabar, M.D., Luo, Y., Wu, H., Ke, X. et al. (2019). Liposomal doxorubicin loaded PLGA-PEG-PLGA based thermogel for sustained local drug delivery for the treatment of breast cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.*, **47**(1), 181-191.

- Chang, J.T., Green, L., Beitz, J. (2003). Renal failure with the use of zoledronic acid. *N Engl J Med.*, **349(17)**, 1676-1679.
- Chapurlat, R.D., Delmas, P.D. (2006). Drug insight: bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.*, **2(4)**, 211–219.
- Chen, S., Singh, J. (2008). Controlled release of growth hormone from thermosensitive triblock copolymer systems: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.*, **352(1-2)**, 58-65.
- Chen, Y., Shi, J., Zhang, Y., Miao, J., Zhao, Z., Jin, X. et al. (2020). An injectable thermosensitive hydrogel loaded with an ancient natural drug colchicine for myocardial repair after infarction. *J Mater Chem B.*, **8(5)**, 980-992.
- Cheng, A., Daly, C.G., Logan, R.M., Stein, B., and Goss, A.N. (2009). Alveolar bone and the bisphosphonates. *Australian Dental Journal*, **54**, 51-61.
- Cheng, A., Mavrokokki, A., Carter, G., Stein, B., Fazzalari, N.L., Wilson, D.F., Goss, A.N. (2005). The dental implications of bisphosphonates and bone disease. *Australian Dental Journal*, **50**, 4-13.
- Chiandussi, S., Biasotto, M., Dore, F., Cavalli, F., Cova, M.A., Di Lenarda, R. (2006). Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol.*, **35(4)**, 236-243.
- Cigognini, D., Silva, D., Paloppi, S., Gelain, F. (2014). Evaluation of mechanical properties and therapeutic effect of injectable self-assembling hydrogels for spinal cord injury. *J Biomed Nanotechnol.*, **10(2)**, 309-323.
- Clemons, M.J., Dranitsaris, G., Ooi, W.S., Yogendran, G., Sukovic, T., Wong, B.Y. et al. (2006). Phase II trial evaluating the palliative benefit of second-line zoledronic acid in breast cancer patients with either a skeletal-related event or progressive bone metastases despite first-line bisphosphonate therapy. *J Clin Oncol.*, **24(30)**, 4895-4900.
- Conte Neto, N., Spolidorio, L.C., Andrade, C.R., S Bastos, A., Guimarães, M., Marcantonio, E. Jr. (2013). Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *International Journal of Experimental Pathology*, **94(1)**, 65-73.

- Conti, C. (2002). Vascular Endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. *Oncologist*, **7(3)**, 4-11.
- Contri, R.V., Katzer, T., Ourique, A.F., da Silva, A.L., Beck, R.C., Pohlmann, A.R. et al. (2014). Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of capsaicinoids adhesion to the skin surface. *J Biomed Nanotechnol.*, **10(5)**, 820-30.
- Cremers, S., Papapoulos, S. (2011). Pharmacology of bisphosphonates. *Bone*, **49(1)**, 42-49.
- Cremers, S.C., Pillai, G., Papapoulos, S.E. (2005). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet.*, **44(6)**, 551-570.
- Daroszewska, A., Ralston, S.H. (2005). Genetics of Paget's disease of bone. *Clinical Science*, **109(3)**, 257-263.
- Dederich, D.N., Bushick, R.D. (2004). Lasers in dentistry: separating science from hype. *J Am Dent Assoc.*, **135(2)**, 204-212.
- Devlin, H. (2000). Early bone healing events following rat molar tooth extraction. *Cells Tissues Organs*, **167(1)**, 33-37.
- Di Salvatore, M., Orlandi, A., Bagalà, C., Quirino, M., Cassano, A., Astone, A. et al. (2011). Antitumour and anti-angiogenetic effects of zoledronic acid on human non-smallcell lung cancer cell line. *Cell Prolif.*, **44(2)**, 139-146.
- Dodson, T.B. (2009). Intravenous bisphosphonate therapy and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **67**, 44-52.
- Drake, M.T., Cremers, S.C. (2010). Bisphosphonate therapeutics in bone disease: the hard and soft data on osteoclast inhibition. *Molecular Interventions*, **10(3)**, 141-152.
- Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., Dvorak, A.M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.*, **146(5)**, 1029-1039.

- Dwan, K., Phillipi, C.A., Steiner, R.D., Basel, D. (2014). Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **23(7)**. doi: 10.1002/14651858.CD005088.pub3.
- Eckert, A.W., Maurer, P., Meyer, L., Kriwalsky, M.S., Rohrberg, R., Schneider, D. et al. (2007). Bisphosphonate-related jaw necrosis severe complication in maxillofacial surgery. *Cancer Treat Rev.*, **33(1)**, 58-63.
- Egermann, M., Goldhahn, J., Schneider, E. (2005). Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int.*, **16(2)**, 129-138.
- Elad, S., Gomori, M.J., Ben-Ami, N., Friedlander-Barenboim, S., Regev, E., Lazarovici, T.S. et al. (2010). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: clinical correlations with computerized tomography presentation. *Clin Oral Investig.*, **14(1)**, 43-50.
- Endo N. (2012). [QOL evaluation for osteoporosis]. *Clin Calcium.*, **22(6)**, 845-851.
- Fang, F., Gong, C., Qian, Z., Zhang, X., Gou, M., You, C. et al. (2009). Honokiol nanoparticles in thermosensitive hydrogel: therapeutic effects on malignant pleural effusion. *ACS Nano.*, **3(12)**, 4080-4088.
- Fedele, S., Porter, S.R., D'Aiuto, F., Aljohani, S., Vescovi, P., Manfredi, M. et al. (2010). Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *American Journal of Medicine*, **123(11)**, 1060-1064.
- Ferretti, G., Fabi, A., Carlini, P., Papaldo, P., Cordiali Fei, P., Di Cosimo, S. et al. (2005). Zoledronic-acid-induced circulating level modifications of angiogenic factors, metalloproteinases and proinflammatory cytokines in metastatic breast cancer patients. *Oncology*, **69(1)**, 35-43.
- Fisher, J.E., Rogers, M.J., Halasy, J.M., Luckman, S.P., Hughes, D.E., Masarachia, P.J., et al. (1999). Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **96(1)**, 133-138.
- Fleisch, H. (1998). Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocrine Reviews*, **19(1)**, 80-100.
- Fleisch, H. (2000). *Bisphosphonates in bone disease: From the Laboratory to the Patient*. (4th ed.). California: Academic Press.

- Fliefel, R., Tröltzsch, M., Kühnisch, J., Ehrenfeld, M., Otto, S. (2015). Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, **44**(5), 568-585.
- 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**(5), 318-324.
- Frith, J.C., Monkkonen, J., Blackburn, G.M., Russell, R.G., Rogers, M.J. (1997). Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'- (beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res.*, **12**(9), 1358-1367.
- Gacche, R.N., Meshram, R.J. (2013). Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth. *Prog Biophys Mol Biol.*, **113**(2), 333-354.
- Gao, S.Y., Lin, R.B., Huang, S.H., Liang, Y.J., Li, X., Zhang, S.E. et al. (2019). PDGF-BB exhibited therapeutic effects on rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw by enhancing angiogenesis and osteogenesis. *Bone*. doi: 10.1016/j.bone.2019.115117.
- Gao, Y., Ren, F., Ding, B., Sun, N., Liu, X., Ding, X. et al. (2011). A thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for sustained release of docetaxel. *J Drug Target.*, **19**(7), 516-527.
- Garner, J., Davidson, D., Eckert, G.J., Barco, C.T., Park, H., Park, K. (2017). Reshapable polymeric hydrogel for controlled soft-tissue expansion: in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release*. **262**, 201-211.
- Gertz, B.J., Holland, S.D., Kline, W.F., Matuszewski, B.K., Freeman, A. (1995). Studies of the oral bioavailability of alendronate. *Clin Pharmacol Ther.*, **58**(3), 288-298.
- Gielkens, P.F., Schortinghuis, J., de Jong, J.R., et al. (2008). A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. *Archives of oral biology*. **53**, 558-566.

Giraud, E., Inoue, M., Hanahan, D. (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest.* **114**(5), 623-633.

Green, J.R. (2004). Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist*, **9**, 3-13.

Gong, C., Yang, B., Qian, Z., Zhao, X., Wu, Q., Qi, X. et al. (2012). Improving intraperitoneal chemotherapeutic effect and preventing postsurgical adhesions simultaneously with biodegradable micelles. *Nanomedicine.* **8**(6), 963-973.

Grosso, A., Burger, M.G., Lungeri A., Schaefer, D.J., Banfi, A., Di Maggio, N. (2017). It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.*, **5**(68). doi: 10.3389/fbioe.2017.00068.

Hansen, T., Kunkel, M., Weber, A., James, Kirkpatrick C.J. (2006). Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates- histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **35**(3), 155-160.

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**(5), 682-689.

Hikita, H., Miyazawa, K., Tabuchi, M., Kimura, M., Goto, S. (2009). Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, **27**(6), 663-672.

Hirschberg, R. (2012). Renal complications from bisphosphonate treatment. Review. *Curr Opin Support Palliat Care*, **6**(3), 342-347.

Hoff, A.O., Toth, B.B., Altundag, K., Johnson, M.M., Warneke, C.L., Hu, M. et al. (2008). Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *Journal of Bone and Mineral Research*, **23**(6), 826-836.

Hokugo, A., Christensen, R., Chung, E.M., Sung, E.C., Felsenfeld, A.L., Sayre, J.W. et al. (2010). Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res.*, **25**(6), 1337-1349.

Hong, C.C., Kume, T., Peterson, R.T. (2008). Role of crosstalk between phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase/mitogen-

activated protein kinase pathways in artery-vein specification. *Circ Res.*, **103(6)**, 573-579.

Howdieshell, T.R., Callaway, D., Webb, W.L., Gaines, M.D., Procter, Jr., C.D., Sathyanarayana et al. (2001). Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. *J Surg Res.*, **96(2)**, 173-182.

Huebsch R.F., Hansen LS. (1969). A histopathologic study of extraction wounds in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **28(2)**:187-96.

Hughes, D.E., MacDonald, B.R., Russell, R.G.G., Gowen, M. (1989). Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in longterm cultures of human bone marrow. *J Clin Invest.*, **83(6)**, 1930-1935.

Huja, S.S., Fernandez, S.A., Phillips, C., Li, Y. (2009). Zoledronic acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Archives of Oral Biology*, **54(9)**, 851-856.

Hupp, J.R., Tucker, M., Ellis, E. (2018). *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*. (7.th ed.). Philadelphia: Elsevier.

Jadu, F., Lee, L., Pharoah, M., Reece, D., Wang, L. (2007). A retrospective study assessing the incidence, risk factors and comorbidities of pamidronate-related necrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Annals of Oncology*, **18(12)**, 2015-2019.

Khodaverdi, E., Kheirandish, F., Mirzazadeh Tekie, F.S., Khashyarmanesh, B.Z., Hadizadeh, F., Moallemzadeh Haghighi, H. (2013). Preparation of a sustained release drug delivery system for dexamethasone by a thermosensitive, in situ forming hydrogel for use in differentiation of dental pulp. *ISRN Pharm.*, **27**. doi: 10.1155/2013/983053.

Khodaverdi, E., Tekie, F.S., Mohajeri, S.A., Ganji, F., Zohuri, G., Hadizadeh, F. (2012). Preparation and investigation of sustained drug delivery systems using an injectable, thermosensitive, in situ forming hydrogel composed of PLGA-PEG-PLGA. *AAPS PharmSciTech.* **13(2)**, 590-600.

Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D.W., Ebeling, P.R., Felsenberg, D. et al. (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(10)**, 1479-1491.

Kılıç, T., Yıldırım, Ö., Ahın, S., Pamir, N. (2005). Glial tümörlerin anjiogenezi. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, **15(1)**, 1-9.

Kobayashi, Y., Hiraga, T., Ueda, A., Wang, L., Matsumoto-Nakano, M., Hata, K. et al. (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(2)**, 165-175.

Koch, F.P., Walter, C., Hansen, T., Jäger, E., Wagner, W. (2011). Osteonecrosis of the jaw related to sunitinib. *Oral Maxillofac Surg.*, **15(1)**, 63-66.

Konukoğlu, D., Turhan, M.S. (2005). Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezi. *Cerrahpasa Tıp Dergisi*, **36**, 42-48.

Kreutle, V., Blum, C, Meier C, Past M, Müller B, Schütz P. et al. (2014). Bisphosphonate induced hypocalcaemia – report of six cases and review of the literature. *Swiss Med Wkly*, **144**. doi: 10.4414/sm.w.2014.13979.

Lacy, C.F., Armstrong, L.L., Goldman, M.P., Lance, L.L. (2003). *Drug Information Handbook*. Lexi-Comp Inc., 53-54.

Lai, P.L., Hong, D.W, Lin, T.Y., Chen, L.H., Chen, W.J., Chu, I.M. (2012). Effect of mixing ceramics with a thermosensitive biodegradable hydrogel as composite graft. *Composites Part B: Engineering*, **43(8)**, 3088-3095.

Landesberg, R., Cozin, M., Cremers, S., Woo, V., Kousteni, S., Sinha, S. (2008). Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.*, **66(5)**, 839-47.

Lauer, G., Sollberg, S., Cole, M., Flamme, I., Stürzebecher, J., Mann, K. et al. (2000). Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol.*, **115(1)**, 12-18.

Le, A., Shetty, V. (2010). İçinde L. Andersson, K.E. Kahnberg, M.A. Pogrel (Ed.), *Oral and Maxillofacial Surgery*. (1.st. ed.). West Sussex: Blackwell Publishing.

Lebel, E., Itzhaki, M., Elstein, D., Hadas-Halpern, I., Abrahamov, A., Zimran, A. (1999). Skeletal manifestations in Gaucher disease: Presentation and treatment. *Israel Medical Association Journal*, **1(4)**, 267-271.

- Lee, J.H., Garner, J., Skidmore, S. (2016). Fabrication of drug-loaded microparticles using hydrogel technology and recent innovation in automation. *Material Matters*, **8(3)**, 88.
- Lee, P.Y., Li, Z., Huang, L. (2003). Thermosensitive hydrogel as a Tgf-beta1 gene delivery vehicle enhances diabetic wound healing. *Pharm Res.*, **20(12)**, 1995-2000.
- Lelovas, P.P., Xanthos, T.T., Thoma, S.E., Lyritis, G.P., Dontas, I.A. (2008). The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.*, **58(5)**, 424-430.
- Lin, J.H. (1996). Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*, **18(2)**, 75-85.
- Lipton, A. (2007). The safety of zoledronic acid. *Expert Opin Drug Saf.*, **6(3)**, 305-313.
- Liu, D., Wu, Q., Zhu, Y., Liu, Y., Xie, X., Li, S. Et al. (2019). Co-delivery of metformin and levofloxacin hydrochloride using biodegradable thermosensitive hydrogel for the treatment of corneal neovascularization. *Drug Deliv.*, **26(1)**, 522-531.
- Liu, Y., Chen, X., Li, S., Guo, Q., Xie, J., Yu, L. et al. (2017). Calcitonin-loaded thermosensitive hydrogel for long-term antiosteopenia therapy. *ACS Appl Mater Interf.*, **9(28)**, 23428-23440.
- Lombard, T., Neirinckx, V., Rogister, B., Gilon, Y., Wislet, S. (2016). Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: new insights into molecular mechanisms and cellular therapeutic approaches. *Stem Cells Int.* doi: 10.1155/2016/8768162.
- López-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Molina-Miñano, F., Gómez-García, F., Vicente-Ortega, V. (2010). An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **39(9)**, 697-702.
- Luckman, S., Coxon, F.P., Ebetino, F.H., Russell, R.G.G., Rogers, M.J. (1998). Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res.*, **13(11)**, 1668-1678.

- Maahs, M.P., Azambuja, A.A., Campos, M.M., Salum, F.G., Cherubini, K. (2011). Association between bisphosphonate and jaw osteonecrosis: a study in wistar rats. *Head and Neck*, **33**(2), 199-207.
- Mansoori, L.S., Catel, C.P., Rothman, M.S. (2010). Bisphosphonate treatment in polyostotic fibrous dysplasia of the cranium: case report and literature review. *Endocrine Practice*, **16**(5), 851-854.
- Marino, K.L., Zakhary, I., Abdelsayed, R.A., Carter, J.A., O'Neill, J.C., Khashaba, R.M. et al. (2012). Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *The Journal of Oral Implantology*, **38**, 511-518.
- Marx, R.E. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.*, **61**(9), 1115-1117.
- Marx, R.E. (2011). *Oral and Intravenous Bisphosphonate Induced Osteonecrosis of the Jaws: History, Etiology, Prevention, and Treatment*. (2nd ed.). Hanover Park: Quintessence Publishing.
- Marx, R.E., Cillo, J.E. ve Ulloa, J.J. (2007). Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **65**(12), 2397-2410.
- Marx, R.E., Sawatari, Y., Fortin, M., Broumand, V. (2005). Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.*, **63**(11), 1567-1575.
- Marx, R.E., Stern, D. (Ed.). (2002). *Oral and Maxillofacial Pathology: A Rationale for Treatment*. Hanover Park, IL: Quintessence Publishing.
- Maurer, P., Sandulescu, T., Kriwalsky, M.S., Rashad, A., Hollstein, S., Stricker, I. et al. (2011). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the maxilla and sinusitis maxillaris. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, **40**(3), 285-291.
- McLeod, N.M., Brennan P.A., Ruggiero, S.L. (2012). Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw: a historical and contemporary review. *Surgeon*, **10**(1), 36-42.
- McLeod, N.M., Davies, B.J., Brennan, P.A. (2007). Bisphosphonate osteonecrosis of the jaws; an increasing problem for the dental practitioner. *Br Dent J.*, **203**(11), 641-644.

Mee, A.P. (1999). Paramyxoviruses and Paget's Disease: the affirmative view. *Bone*, **24**,19-21.

Merck (2011, 19 Nisan) VEGF Inducer, GS4012 - CAS 328073-92-3 – Calbiochem. Erişim 30.07.2019, https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/VEGF-Inducer-GS4012-CAS-328073-92-3-Calbiochem,EMD_BIO-676491#anchor_REF.

Merigo, E., Manfredi, M., Meleti, M., Corradi, D., Vescovi, P. (2005). Jaw bone necrosis without previous dental extractions associated with the use of bisphosphonates (pamidronate and zoledronate): a four-case report. *J Oral Pathol Med.*, **34(10)**, 613-617.

Migliorati, C.A. (2003). Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol.*, **21(22)**, 4253-4254.

Migliorati, C.A., Siegel, M.A., Elting, L.S. (2006). Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncology*, **7(6)**, 508-514.

Migliorati, C.A., Woo, S.B., Hewson, I., Barasch, A., Elting, L.S., Spijkervet, F.K. et al. (2010). A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis (BON) in cancer. *Support Care Cancer*, **18(8)**, 1099-1106.

Mozzati, M., Martinasso, G., Maggiora, M., Scoletta, M., Zambelli, M., Carossa, S. (2013). Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Investig.*, **17(4)**, 1259-1266.

Munier, A., Gras, V., Andrejak, M., Bernard, N., Jean-Pastor, M.J., Gautier, S. et al. (2005). Zoledronic acid and renal toxicity: data from French adverse effect reporting database. *Ann Pharmacother.*, **39(7-8)**, 1194-1197.

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

Naveau, A., Naveau, B. (2006). Osteonecrosis of the jaw in patients taking bisphosphonates. *Joint Bone Spine*, **73(1)**, 7-9.

Nicolatou-Galitis, O., Schiødt, M., Mendes, R.A., Ripamonti, C., Hope, S., Drudge-Coates, L. et al. (2019). Medication-related osteonecrosis of the jaw: definition and best

practice for prevention, diagnosis, and treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.*, **127(2)**, 117-135.

Niibe, K., Ouchi, T., Iwasaki, R., Nakagawa, T., Horie, N. (2015). Osteonecrosis of the jaw in patients with dental prostheses being treated with bisphosphonates or denosumab. *J Prosthodont Res.*, **59(1)**, 3-5.

O'Halloran, M., Boyd, N.M., Smith, A. (2014). Denosumab and osteonecrosis of the jaws- the pharmacology, pathogenesis and a report of two cases. *Aust Dent J.*, **59(4)**, 516-519.

Okamoto, T., de Russo, M.C. (1973). Wound healing following tooth extraction. *Revista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba*, **2(2)**, 153-169.

Otto, S., Pautke, C., Opelz, C., Westphal, I., Drosse, I., Schwager, J. (2010). Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration and acidic milieu on the pathomechanism. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **68(11)**, 2837-45.

Otto, S., Schreyer, C., Hafner, S., Mast, G., Ehrenfeld, M., Stürzenbaum, S. (2012). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws- Characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg.*, **40(4)**, 303-309.

Pabst, A.M., Krüger, M., Blatt, S., Ziebart, T., Rahimi-Nedjat, R., Goetze, E. (2016). Angiogenesis in the development of medication-related osteonecrosis of the jaws: an overview. *Dent J (Basel)*, **5(1)**, 2. doi: 10.3390/dj5010002.

Papapetrou, P.D. (2009). Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones (Athens)*, **8(2)**, 96-110.

Papapoulos, S.E. (2006). Bisphosphonate actions: physical chemistry revisited. *Bone*, **38(5)**, 613-616.

Pazianas, M., Cooper, C., Ebetino, F.H., Russell, R.G. (2010). Long-term treatment with bisphosphonates and their safety in postmenopausal osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag*, **21(6)**, 325-343.

Pepper, M.S. (1997). Manipulating angiogenesis: from basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **17(4)**, 605-619.

Peterson, R.T., Shaw, S.Y., Peterson, T.A., Milan, D.J. Zhong, T.P. Schreiber, S.L. et al. (2004). Chemical suppression of a genetic mutation in a zebrafish model of aortic coarctation. *Nat Biotechnol.*, **22(5)**, 595-599.

Pratoomsoot, C., Tanioka, H., Hori, K., Kawasaki, S., Kinoshita, S., Tighe, P.J. et al. (2008). A thermoreversible hydrogel as a biosynthetic bandage for corneal wound repair. *Biomaterials*. **29(3)**, 272-281.

Qiao, M., Chen, D., Ma, X., Liu, Y. (2005). Injectable biodegradable temperature-responsive PLGA-PEG-PLGA copolymers: synthesis and effect of copolymer composition on the drug release from the copolymer-based hydrogels. *Int J Pharm.*, **294(1-2)**, 103-112.

Reid, I.R. (2009). Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why? *Bone*, **44(1)**, 4-10.

Reid, I.R., Cornish, J. (2012). Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol.*, **8(2)**, 90-96.

Rocha, G.C., Jaguar, G.C., Moreira, C.R., Neves, E.G., Fonseca, F.P., Pedreira, E.N. (2012). Radiographic evaluation of maxillofacial region in oncology patients treated with bisphosphonates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.*, **114**, 19-25.

Rogers, M.J., Crockett, J.C., Coxon, F.P., Mönkkönen, J. (2011) Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*, **49(1)**, 34-41.

Rogers, M.J., Gordon, S., Benford, H.L., Coxon, F.P., Luckman, S.P., Monkkonen, J. et al. (2000). Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*, **88**, 2961-2978.

Rong, X., Ji, Y., Zhu, X., Yang, J., Qian, D., Mo, X. et al. (2018). Neuroprotective effect of insulin-loaded chitosan nanoparticles/PLGA-PEG-PLGA hydrogel on diabetic retinopathy in rats. *Int J Nanomedicine.*, **14**, 45-55.

Ruggiero, S.L., Dodson, T.B., Assael, L.A., Landesberg, R., Marx, R.E., Mehrotra, B. (2009). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 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.

Ruggiero, S.L., Dodson, T.B., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B. et al. (2014). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American

Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.*, **72(10)**, 1938-1956.

Ruggiero, S.L., Fantasia, J., Carlson, E. (2006). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, **102(4)**, 433-441.

Ruggiero, S.L., Mehrotra, B. (2009). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: diagnosis, prevention, and management. *Annual Review of Medicine*, **60**, 85-96.

Ruggiero, S.L., Mehrotra, B., Rosenberg, T.J., Engroff, S.L. (2004). Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.*, **62(5)**, 527-534.

Russell, R.G. (2011). Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*, **49(1)**, 2-19.

Russell, R.G., Preston, C., Smith, R., Walton, R.J., Woods, C.G. (1974). Disphosphonates in Paget's disease. *The Lancet*, **1**, 894-898.

Russell, R.G., Rogers, M.J. (1999). Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*, **25(1)**, 97-106.

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(6)**, 733-759.

Santini, D., Vincenzi, B., Dicuonzo, G., Avvisati, G., Massacesi, C., Battistoni, F. (2003). Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.*, **9(8)**, 2893-2897.

Santini, D., Vincenzi, B., Hannon, R.A., Brown, J.E., Dicuonzo, G., Angeletti, S. et al. (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(5)**, 1351-1357.

Sarasquete, M.E., Gonzalez, M., San Miguel, J.F., Garcia-Sanz, R. (2009). Bisphosphonate-related osteonecrosis: genetic and acquired risk factors. *Oral diseases*, **15(6)**, 382-387.

Sarıdoğan M, Gün K. (2010). Postmenopozal Osteoporoz Tedavisinde Uzun Dönem Bifosfonat Kullanımı ve Görülebilen Yan Etkiler-Derleme. *Osteoporoz Dünyasından*. **16**, 66-71.

Sato, M., Grasser, W., Endo, N., Akins, R., Simmons, H., Thompson, D.D., Golub, E., Rodan, G.A. (1991). Bisphosphonate action alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest.*, **88(6)**, 2095-2105.

Sedghizadeh, P.P., Kumar, S.K.S., 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(4)**, 767-775.

Senel, F.C., Duman, M.K., Muci, E., Cankaya, M., Pampu, A.A., Ersoz, S. et al. (2010). Gunhan O. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo.*, **109(3)**, 385-391.

Serra E, Paolantonio M, Spoto G, Mastrangelo F, Tetè S, Dolci M. (2009). Bevacizumab-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Immunopathol Pharmacol*. **22(4)**:1121-3.

Shang, H., Chen, X., Liu, Y., Yu, L., Li, J., Ding, J. (2017). Cucurbit [7]-assisted sustained release of human calcitonin from thermosensitive block copolymer hydrogel. *Int J Pharm.*, **527(1-2)**, 52-60.

Shannon, J., Shannon, J., Modelevsky, S., Grippo, A.A. (2011). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *J Am Geriatr Soc.*, **59(12)**, 2350-2355.

Sharma, D., Hamlet, S., Petcu, E., Ivanovski, S. (2013). Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--an appraisal. *Oral Diseases*, **19(8)**, 747-754.

Shetty, V., Bertolami, C.N. Wound healing. (2004). İçinde M. Miloro (Ed.), *Peterson's Principles Of Oral And Maxillofacial Surgery*. (2.th ed.). Hamilton: BC Decker Inc.

Singar, S., Parihar, A.P., Reddy, P., Maurya, A., Bamaniya, V. (2020). Medication-related osteonecrosis of the jaw: a review about etiology, risk factors, pathophysiology, and treatment. *J Indian Acad Oral Med Radiol.*, **32(1)**, 50-54

Sonis, S.T., Watkins, B.A., Lyng, G.D., Lerman, M.A., Anderson, K.C. (2009). Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before

dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol*, **45(2)**, 164-172.

Soundia Akrivoula. (2020). Characterization of Medication Related Osteonecrosis of the Jaws Pathophysiology and Local RANKL Delivery as an Experimental Intervention. Doktora Tezi. University of California, Los Angeles.

Stresing, V., Fournier, P.G., Bellahcène, A., Benzaïd, I., Mönkkönen, H., Colombel, M. et al. (2011). Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone*, **48(2)**, 259-266.

Stockmann, P., Hinkmann, F.M., Lell, M.M., Fenner, M., Vairaktaris, E., Neukam, F.W. et al. (2010). Panoramic radiograph, computed tomography or magnetic resonance imaging: which imaging technique should be preferred in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw? A prospective clinical study. *Clin Oral Investig.*, **14(3)**, 311-317.

Stumpe, M.R., Chandra, R.K., Yunus, F., Samant, S. (2009). Incidence and risk factors of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Head Neck.*, **31(2)**, 202-206.

Swift, M.E., Kleinman, H.K., DiPietro, L.A. (1999). Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest.*, **79(12)**, 1479-1487.

Şahin, F.Ü., Topuz, Ö. (2014). Diş hekimliği araştırmalarında mikrobilgisayarlı tomografi uygulamaları. *Acta Odonol Turc.* **31**, 114-120.

Tanvetyanon, T., Stiff, P.J. (2006). Management of the adverse effects associated with intravenous bisphosphonates. *Ann Oncol.*, **17(6)**, 897-907.

Tella, S.H., Gallagher, J.C. (2014). Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **142**, 155-170.

Tofe, A.J., Francis, M.D. (1974). Optimization of the ratio of stannous tin: ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate for bone scanning with ^{99m}Tc-pertechnetate. *Journal of Nuclear Medicine*, **15(2)**, 69-74.

Treister, N., Sheehy, N., Bae, E.H., Friedland, B., Lerman, M., Woo, S. (2009). Dental panoramic radiographic evaluation in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Diseases*, **15(1)**, 88-92.

- Tsurushima, H., Kokuryo, S., Sakaguchi, O., Tanaka, T., Tominaga, K. (2013). Bacterial promotion of bisphosphonate-induced osteonecrosis in Wistar rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **42(11)**, 1481-1487.
- Turgut, B., Güler, M., Demir, T., Türkçüoğlu, P., Çeliker, Ü. (2007). Oküler Anjiyogenezde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Rolü. *Türkiye Klinikleri Oftalmoloji Dergisi*, **16(1)**, 38-46.
- Vahtsevanos, K., Kyrgidis, A., Verrou, E., Katodritou, E., Triaridis, S., Andreadis, C.G. et al. (2009). Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol.*, **27(32)**, 5356-5362.
- Van Beek, E., Löwik, C., Van Der Pluijm, G., Papapoulos, S. (1999). The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogencontaining bisphosphonates. *J Bone Miner Res.*, **14(5)**, 722-729.
- Van Poznak, C. (2010). Osteonecrosis of the jaw and bevacizumab therapy. *Breast Cancer Res Treat.*, **122(1)**, 189-191.
- Vescovi, P., Merigo, E., Meleti, M., Manfredi, M., Guidotti, R., Nammour, S. (2012). Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: A concise review of the literature and a report of a single-centre experience with 151 patients. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, **41(3)**, 214-221.
- Viapiana, O., Gatti, D., Idolazzi, L., Fracassi, E., Adami, S., Troplini, S. et al. (2014). Bisphosphonates vs infliximab in ankylosing spondylitis treatment. *Rheumatology (Oxford)*, **53(1)**, 90-94.
- Vincenzi, B., Napolitano, A., Zoccoli, A., Iuliani, M., Pantano, F., Papapietro, N. et al. (2012). Serum VEGF levels as predictive marker of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Hematol Oncol.*, **5(56)**. doi: 10.1186/1756-8722-5-56.
- Voss, P.J., Poxleitner, P., Schmelzeisen, R., Stricker, A., Semper-Hogg, W. (2017). Update MRONJ and perspectives of its treatment. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.*, **118(4)**, 232-235.
- Vyas, S., Hameed, S., Murugaraj, V. (2014). Denosumab-associated osteonecrosis of the jaw--a case report. *Dent Update.*, **41(5)**, 449-450.

- Wang, C., Long, C., Xie, C., Chen, X., Zhang, L., Chu, B. et al. (2013). Two novel nanoscale preparations of micelle and thermosensitive hydrogel for docetaxel to treat malignant tumor. *J Biomed Nanotechnol.* **9(3)**, 357-366.
- Wang, E.P., Kaban, L.B., Strewler, G.J., Raje, N., Troulis, M.J. (2007). Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg.*, **65(7)**, 1328-1331.
- Watts, N.B. (2001). Treatment of osteoporosis with bisphosphonates. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, **27(1)**, 197-208.
- Watts, N.B., Diab, D.L. (2010). Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.*, **95(4)**, 1555-1565.
- Wehrhan, F., Amann, K., Möbius, P., Weber, M., Preidl, R., Ries, J. et al. (2015). BRONJ-related jaw bone is associated with increased Dlx-5 and suppressed osteopontin-implication in the site-specific alteration of angiogenesis and bone turnover by bisphosphonates. *Clin Oral Investig.*, **19(6)**, 1289-1298.
- Wilson, S., Sharp, C.A., Davie, M.W. (2012). Health-related quality of life in patients with osteoporosis in the absence of vertebral fracture: a systematic review. *Osteoporos Int.*, **23(12)**, 2749-2768.
- Wood, J., Bonjean, K., Ruetz, S., Bellahcene, A., Devy, L., Foidart, J.M. et al. (2002). Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther.*, **302(3)**, 1055-1061.
- Wu, Y.C., Chang, C.Y., Kao, A., Hsi, B., Lee, S.H., Chen, Y.H. et al. (2015). Hypoxia-induced retinal neovascularization in zebrafish embryos: a potential model of retinopathy of prematurity. *PLoS One.*, **10(5)**. doi: 10.1371/journal.pone.0126750.
- Xie, B., Jin, L., Luo, Z., Yu, J., Shi, S., Zhang, Z. et al. (2015). An injectable thermosensitive polymeric hydrogel for sustained release of Avastin® to treat posterior segment disease. *Int J Pharm.*, **490(1-2)**, 375-383.
- Yamada, J., Tsuno, N.H., Kitayama, J., Tsuchiya, T., Yoneyama, S., Asakage, M. et al. (2009). Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation. *J Surg Res.*, **151(1)**, 115-120.

- Yamashita, J., Koi, K., Yang, D.Y., McCauley, L.K. (2011). Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res.*, **17(6)**, 1405-1414.
- Yan, Q., Xiao, L.Q., Tan, L., Sun, W., Wu, T., Chen, L.W. et al. (2015). Controlled release of simvastatin-loaded thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for bone tissue regeneration: in vitro and in vivo characteristics. *J Biomed Mater Res A.*, **103(11)**, 3580-3589.
- Yang, Z., Yu, S., Li, D., Gong, Y., Zang, J., Liu, J. et al. (2018). The effect of PLGA-based hydrogel scaffold for improving the drug maximum-tolerated dose for in situ osteosarcoma treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **172**, 387-394.
- Yarom, N., Fedele, S., Lazarovici, T.S., Elad, S. (2010). Is exposure of the jawbone mandatory for establishing the diagnosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **68(3)**, 705.
- Yu, L., Ci, T., Zhou, S., Zeng, W., Ding, J. (2013). The thermogelling PLGA-PEG-PLGA block copolymer as a sustained release matrix of doxorubicin. *Biomater Sci.*, **1(4)**, 411-420.
- Zafar, S., Cullinan, M.P, Drummond, B.K., Seymour, G.J., Coates D.E. (2020). Effects of zoledronic acid and geranylgeraniol on angiogenic gene expression in primary human osteoclasts. *J Oral Sci.*, **62(1)**, 79-83.
- Zervas, K., Verrou, E., Teleioudis, Z., Vahtsevanos, K., Banti, A., Mihou, D. et al. (2006). Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *Br J Haematol.*, **134(6)**, 620-623.
- Zentner, G.M., Rathi, R., Shih, C., McRea, J.C., Seo, M.H., Oh, H. et al. (2001). Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. *J Control Release.*, **72(1-3)**, 203-215.

ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ZOLEDRONİK ASİT VERİLEN SIÇANLARDA DIŞ ÇEKİMİ SONRASI ANJİYOGENEZ TETİKLEYİCİ PARTİKÜL İÇEREN HİDROJELİN KEMİK İYİLEŞMESİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 19	% 14	% 8	% 13
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 4
2	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 2
3	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
4	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK) Öğrenci Ödevi	% 1
7	www.docstoc.com İnternet Kaynağı	% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı		Soyadı	
Doğ.Yeri		Doğ.Tar.	
Email		Uyruğu	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):