

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ-DİŞ-ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ A.D
DOKTORA PROGRAMI

**Kronik Zoledronat Kullanımının Çene Kemikleri ve Uzun Kemikler
Üzerinde TNF- α , IL-6, IL-8, RANKL ve Osteoprotegerin Oranları
Yönünden Hayvan Modeliyle İncelenmesi**

DOKTORA TEZİ

Arş. Gör. Dt. Mustafa ÇANKAYA

Haziran 2011
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ-DİŞ-ÇENE HAST. VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

KRONİK ZOLEDRONAT KULLANIMININ ÇENE KEMİKLERİ VE UZUN KEMİKLER
ÜZERİNDE TNF- α , IL-6, IL-8, RANKL ve OSTEOPROTEGERİN ORANLARI
YÖNÜNDEN HAYVAN MODELİYLE İNCELENMESİ

Arş. Gör. Dt. Mustafa ÇANKAYA

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih:

Tezin Sözlü Savunma Tarihi: 17.06.11

Tezin Danışmanı: Doç. Dr. Figen ÇİZMECİ ŞENEL

Jüri Üyesi: Prof.Dr. Kenan ARAZ

Jüri Üyesi: Prof.Dr. Ertuğ DAYI

Jüri Üyesi: Doç.Dr. Kürşat ER

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Ahmet ALVER

Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Haziran 2011

TRABZON

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde ve doktora eğitimim boyunca katkılarını esirgemeyen ve pozitif enerjisiyle her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Figen Çizmeci Şenel'e,

Çalışmamızın gerçekleşmesi sürecinde kıymetli destekleri olan Farmakoloji A.D. öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Mine Kadioğlu Duman'a, Arş. Gör. Dr. Efnan Muci'ye ve yardımcı personel Temel Şahin'e,

ELISA testlerinin uygulanması sürecinde sağladıkları katkılardan dolayı Doç. Dr. Ahmet Alver ve Yrd. Doç. Dr. Fulya Balaban Yücesan'a,

Çalışmanın yürütüldüğü Deney Hayvanları Cerrahi Araştırma Merkezinin değerli personeline,

Doktora süreci boyunca birlikte çalıştığım Anabilim Dalımızın öğretim üyesi Doç. Dr. Alper Pampu'ya, bölümümüzün araştırma görevlilerinden; Nuray Y. Altıntaş, Ezher H. Dayısoylu, Fatih Taşkesen, Kerem T. Atasoy, Burak Cezayirli, Zeynep Gümrükçüoğlu, Sadi Memiş, Ümmügülsüm Coşkun ve tüm bölüm personelimize,

Bugüne kadar karşılıksız ve sonsuz destekleriyle yanımda olan, canımdan çok sevdiğim, babam ve annem; Ali Çankaya ve Tülin Çankaya'ya, sevgili kardeşlerim Dr. Sertaç Çankaya ve Ekin Çankaya'ya,

Doktora tez çalışmam boyunca en az benim kadar heyecan duyup her türlü çalışmayı takip eden değerli arkadaşım Esra Adanur'a,

Sevgi, saygı ve tüm içtenliğimle,

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Önsöz.....	i
İçindekiler.....	ii
Kısaltmalar.....	v
 1. GİRİŞ.....	 1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemik Doku Hakkında Genel Bilgi.....	3
2.2. Kemik Matriksi.....	3
2.2.1. Kemiğin Organik Matriksi.....	4
2.2.2. Kemiğin İnorganik Kısmı.....	4
2.3. Kemik Dokusunun Çeşitleri.....	4
2.3.1. Primer Kemik Doku.....	4
2.3.2. Sekonder Kemik Doku.....	5
2.4. Kemiğin Makroskopik Yapısı.....	5
2.4.1. Süngerimsi Kemik.....	5
2.4.2. Sert Kemik.....	5
2.5. Kemik Lamel Sistemleri.....	6
2.5.1. Havers Sistemi.....	6
2.5.2. Ara Lamel Sistemi.....	6
2.5.3. Dış ve İç Çembersel Lameller Sistemi.....	7
2.6. Kemik Zarları.....	7
2.7. Kemik Hücreleri.....	7
2.7.1. Osteoprogenitör Hücreler.....	7
2.7.2. Osteoblastlar.....	8
2.7.3. Osteositler.....	9
2.7.4. Osteoklastlar.....	9

2.8. RANK/RANKL Osteoprotegerin Sistemi.....	10
2.8.1. RANK.....	10
2.8.2. RANKL.....	11
2.8.3. Osteoprotegerin.....	11
2.9. Sitokinler.....	13
2.9.1. İnterlökin-6.....	13
2.9.2. İnterlökin-8.....	14
2.9.3. TNF- α	15
2.10. ELISA Yöntemi.....	16
2.11. Bifosfonatlar.....	17
2.11.1. Bifosfonatların Etki Mekanizmaları.....	19
2.11.2. Bifosfonatların Farmakokinetik Özellikleri.....	19
2.11.3. Bifosfonatların Farmakolojik Özellikleri.....	20
2.11.4. Bifosfonatların Kullanılışları.....	21
2.11.5. Zoledronat.....	23
2.11.5.1. Endikasyonları.....	24
2.11.5.2. Kontrendikasyonlar ve Uyarılar.....	24
2.11.5.3. Etkileşimler.....	25
2.11.5.4. Etki Mekanizmaları.....	25
2.11.5.5. Zoledronatın Etkileri.....	25
2.11.6. Bifosfonatlarla İlgili Yan Tesirler.....	27
2.11.7. Bifosfonatlarla İlgili Çene Osteonekrozları.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Deney Hayvanları.....	36
3.2. Gruplar ve İlaç Uygulamaları.....	36
3.3. Biyokimyasal Analizler.....	38
3.4. İstatiksel Yöntem.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. RANKL Bulguları.....	42

4.2. Osteoprotegerin Bulguları.....	44
4.3. TNF- α Bulguları.....	46
4.4. Interlökin-6 Bulguları.....	48
4.5. Interlökin-8 Bulguları.....	50
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	60
7. ÖZET.....	62
8. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	63
9. KAYNAKLAR.....	65
10. ÖZGEÇMİŞ.....	77

KISALTMALAR

AAOMS: Amerikan Ağız-Çene-Yüz Cerrahisi Birliği
AF: Atrial fibrilasyon
ATP: Adenozintrifosfat
BMD: Kemik mineral dansitesi
BMP: Kemik morfojenik faktör
BRONJ: Bifosfonatlara bağlı gelişen çene osteonekrozu
BT: Bilgisayarlı tomografi
cAMP: Siklik Adenozin mono fosfat
FGF: Fibroblast büyüme faktörü
GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni stimulatör faktör
IFN: İnterferon
IL: İnterlökin
iv: İntravenöz
LIF: Lösemi inhibitör faktör
M-CSF: Makrofaj koloni stimulatör faktör
OPG: Osteoprotegerin
PDGF: Platelet kökenli büyüme faktörü
PTH: Paratiroid hormon
RANK: Nükleer faktör kappa β reseptör aktivatörü
RANKL: Nükleer faktör kappa β reseptör aktivatörü ligandı
RT: Radyoterapi
TGF: Transforme edici büyüme faktörü
TNF: Tümör nekrotizan faktör
TNF- α : Tümör nekrotizan faktör alfa

TNFR: Tümör nekrotizan faktör serbestleştirici

TRAF: Tümör nekrotizan faktör serbestleştirici ile ilişkili faktör

sTNFR: Çözülebilir tümör nekrotizan faktör serbestleştirici

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ZA: Zoledronik asit - Zoledronat

1. GİRİŞ

Bifosfonatlar inorganik pirofosfatların analoglarıdır. Kimyasal yapı iskeleti fosfat-karbon-fosfat (P-C-P) şeklindedir. Bu yapısı nedeniyle iskelet sistemi içerisindeki hidroksiapatite karşı yüksek afinitesi vardır. Bifosfonatlar, aktif kemik remodelinginin olduğu bölgelerde hidroksiapatite bağlanarak osteoklast gelişimini ve aktivitesini inhibe ederler ve böylece hücre ölümünü inhibe ederek mineralizasyonu etkilemeden kemik rezorpsiyonunu azaltırlar. Osteoklastların bu şekilde inhibe olması da kemik yapım yıkım döngüsünü çeşitli oranlarda etkileyerek azaltır (1).

Bifosfonatlar multiple myeloma, Paget hastalığı, göğüs kanseri, metastatik kemik kanserleri, osteoporöz gibi hastalıklarda yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Nitrojen içeren ve nitrojen içermeyen olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Nitrojen içeren bifosfonatlar içermeyenlere oranla daha potentirler. Nitrojen içeren bifosfonatların oral ve intravenöz formları mevcuttur. Zolendronik asit (ZA); intravenöz bifosfonatların en potent olanıdır (2).

Yaşam boyunca iskelet sistemindeki homeostazinin sağlanması için kemikte meydana gelen değişim döngüsüne remodeling adı verilir. Bu değişimin iki bileşeni kemik yıkımı ve kemik yapımıdır. Remodeling olayında osteoblast ve osteoklastlar bir denge içerisinde hareket ederler. Bu denge içerisinde; nükleer faktör kappa β reseptör aktivatör ligand (RANKL), nükleer faktör kappa β reseptör aktivatör (RANK) ve bir molekül olan osteoprotegerin (OPG) anahtar rol oynamaktadır (3).

Osteoblastlar yüzeylerinden RANKL açığa çıkarırlar. RANKL osteoklast prekürsörlerinden açığa çıkarılan RANK ile etkileşerek osteoklast farklılaşmasını aktive eder. Olgun osteoklastlardaki RANK ile RANKL'in etkileşmesi osteoklastın aktivasyonuna ve sağ kalımının uzamasına neden olur. Osteoprotegerin, osteoblastlar ve stromal hücreler tarafından salınır ve görevi RANK ve RANKL etkileşimini bloke etmektir (4).

Sitokinler doğal ve adaptif immünitede görev alırlar ve hücrelerin immün işlevlerinden sorumlu proteinlerdir. Lenfositlerin büyüme ve farklılaşmasında, antijen eliminasyonunda, hematopoetik hücrelerin gelişiminde rol oynarlar. Tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α), interlökin 6 (IL-6), interlökin 8 (IL-8) de spesifik etkileri olan sitokinlerdir (5).

2003 yılından günümüze bifosfonata bağlı geliştiği düşünülen çene nekrozlarında (BRONJ) hızlı bir artış olmuştur ve bu konuyla ilgili vaka serilerini içeren klinik raporlar yayınlanmıştır (6,7). Bifosfonata bağlı gelişen osteonekrozlar; bifosfonat kullanan, baş-boyun bölgesinden radyoterapi görmemiş hastalarda görülen, 8 haftayı geçtiği halde iyileşmeyen lezyonlar şeklinde tanımlanmaktadır (8). Bu hastalarda osteonekroz, çeneler haricindeki başka hiçbir iskeletsel bölgede görülmemektedir.

Bu hastalarda; etiyoloji, patogenezi ve tedavi konularını aydınlatmaya yönelik çalışmalarda henüz net bir sonuç ortaya konamamıştır, konu ile ilgili birçok araştırma yürütülmektedir ve invaziv dental işlemlerden uzak durulmasının gerekliliği vurgulanmaktadır.

Çalışmamızda BRONJ'un patogenezi içinde rol alması muhtemel olan RANKL, OPG, TNF- α , IL-6, IL-8 değerleri, kronik kullanıma uygun olacak şekilde ratlara 10 hafta boyunca ZA uygulamasını takiben, tibia ve mandibula oranları karşılaştırılarak olası farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. İlgili değerler tespit edilerek BRONJ'un oluşumunda olası osteoblast hücrelerinin rollerinin anlaşılmasına katkıda bulunulması hedeflenmiştir. Ayrıca ilgili olabilecek enflamatuvar mediatörler seçilerek BRONJ'un enflamatuvar boyutu hakkında seçilen parametreler çerçevesinde farklılık olup olmadığının tespiti araştırmaya değer görülmüştür.

Çalışmamız Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde yetiştirilen hayvanlar kullanılarak gerçekleştirilmiş ve KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKUSU HAKKINDA GENEL BİLGİ

İskelet sisteminin en önemli yapı taşı olan kemikler, organizmadaki diğer bağ dokularında da olduğu gibi hücreler, lifler ve temel maddeden oluşmuş ancak yapısındaki kalsiyumdan ötürü sertleşmiş bir destek dokusudur (9).

Kemik doku, destek fonksiyonu ile vücudun normal pozisyonunu sağlar. Kaslarla aktive olma şeklinde hareket etmeyi sağlar. Kalsiyum, fosfor ve magnezyum için depo organıdır. Hemapoetik dokuların muhafazası ile görevlidir. Sarı kemik iliğindeki adipoz doku ile enerji depolama gibi işlevleri gerçekleştirir (10,11).

Basınç, çekilme, eğilme ve bükülmelere karşı yüksek derecede dayanıklı olan kemik, aynı zamanda oldukça hafif bir materyalden yapılmıştır. Kemik, kaba şeklinden mikroskobik yapısına kadar tüm organizasyon seviyelerinde minimum ağırlık ve maksimum ekonomik materyalle çok büyük bir dayanıklılığa sahiptir. Dayanıklılığına ve sertliğine rağmen, bireyin yaşam süresi boyunca yıkılıp yapılan dinamik bir dokudur. Kemiğin az kullanılması sonucu atrofi, aşırı kullanılması durumunda ise hipertrofi ortaya çıkar (12).

2.2. KEMİK MATRİKSİ

Kemik matriksi iki esas öğeden oluşmuştur. Bunlardan birisi organik matriks, diğeri ise inorganik matrikstir. Kemiğin %60-65'ini inorganik bileşenler, %30-35'ini ise organik bileşenler oluşturur. Erişkin memelilerde, organik bileşenlerin %95'i kollajendir (12,13).

2.2.1. Kemiğin Organik Matrisi

Kemiğin organik matrisi %90-95 kollojen liflerden, geri kalanıda ana madde denilen jelatinöz bir ortamdan ibarettir. Kollojen lifler başlıca kemiğin kuvvet çizgileri boyunca uzanır. Bu lifler kemiğe kuvvetli bir gerilme direnci sağlar. Organik kemik matrisinin temel yapısal birimini oluşturan kollajeni çoğunlukla tip I kollojen, daha az miktarda tip V kollojendir. Çok sert olmasına karşın, kemiklerin kolay kırılmamasını sağlayan öğeler, bu kollajen fibrillerdir. Kollojen fibriller, hidroksiapatit kristallerinin birikmesi için organik çerçeve görevi görür (12,14).

Ana madde, hücre dışı sıvı ile proteoglikanlardan, özellikle kondroidin sülfat ve hyaluronik asitten oluşur. Bunların kesin işlevi bilinmemekle beraber, kalsiyum tuzlarının depolanmasının kontrolüne yardım ettikleri düşünülmektedir (14).

2.2.2. Kemiğin İnorganik Kısmı

Kemik dokusuna inorganik maddeler sertlik kazandırır. İnorganik maddelerin başında %85'lik bir oranla kalsiyum fosfat gelir. Bunu %10'luk bir oranla kalsiyum karbonat takip eder. Ayrıca az miktarda olmak üzere kalsiyum florit, magnezyum florit, magnezyum hidroksit ve magnezyum sülfat bileşikler bulunur. Bundan başka sitrat iyonları ve karbonat iyonları da yer alır (12,14).

Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte içiçe organize olmuşlardır. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, kollojenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır (9).

2.3. KEMİK DOKUSUNUN ÇEŞİTLERİ

Kemik dokusunun primer (olgunlaşmamış, birincil) kemik ve sekonder (olgun, ikincil) kemik dokusu olmak üzere iki çeşidi vardır.

2.3.1 Primer Kemik Doku: Fötal gelişim ve kemik onarımı sırasında ilk oluşan kemik dokusudur. Bu dokuda, gelişmesi tamamlanmış olgun kemik dokusunda görülen doku organizasyonu yoktur. Birim alana düşen hücre sayısı olgun kemik dokusundan daha fazla olup, hücreler rastgele dağılım gösterir. Bu yüzden, bu kemiğe ağıs kemik ya da dokuma kemiği denir. Esas olarak fetüste bulunan olgunlaşmamış kemiğe,

erişkinlerde birkaç bölgede rastlanır. Bunlar; kafatası yassı kemikleri, dişlerin alveol soketleri ve tendonların kemiğe girdiği yerlerdir (9,12,14).

2.3.2. Sekonder Kemik Doku: Erişkinlerde bulunan kemik çeşididir. Olgunlaşmamış kemik dokusunun yerini aldığı için bu dokuya sekonder (ikincil) kemik dokusu denir. Kollojen fibrillerin düzenli dağılmasına bağlı olarak gelişen ince kemik lamelleri, olgun kemiğin kendine özgü lameller sistemine sahip olmasına neden olur. Olgun kemikler süngerimsi ve sert kemik olmak üzere iki tip kemik içerir (9,14).

2.4. KEMİĞİN MAKROSKOBİK YAPISI

Uzun kemiklerin büyümekte olan uç kısımlarına epifiz denir. Kemiğin esas gövde kısmına diyafiz, epifizle diyafiz arasında bulunan geçici bölgeye de metafiz adı verilir. Epifiz bölgesi kemiğin oluşumunda ve büyümesinde rol oynayan epifiz plağı denilen yapıyı içerir. Kemiğin büyümesinin tamamlanmasının ardından metafiz bölgesi kaybolur (9,12).

2.4.1. Süngerimsi Kemik

Kısa ve uzun kemiklerin epifiz ve metafizi ile yassı kemiklerin iç kısımlarında yer alan süngerimsi (spongioz) kemik, bulunduğu yerlerde sert kemikten oluşmuş ince bir tabakayla örtülüdür. Süngerimsi kemik yapısında kemik trabekülleri mevcuttur ve bu trabeküllerin aralarında, birbiriyle ilişkili labirent gibi düzensiz boşluklar vardır. İçleri kemik iliğiyle dolu bu boşluklar, sert kemiğin ilik boşluğu olarak devam eder. Kemik hücreleri, trabeküllerin yapısını oluşturan kemik lamelleri üzerinde bulunur ve besinlerini trabeküller arası boşluklarda bulunan kemik iliğindeki damarlardan elde ederler (12,15).

2.4.2. Sert Kemik

Sert (kompakt) kemik uzun kemiklerin gövde kısmını ve tüm kemiklerin dış yüzeylerini oluşturur. Makroskopik olarak homojen ve dolgun yapıda olan sert kemiğin, mikroskopik incelemede düzenli yerleşim gösteren lamel ve kanal sistemleri içerdiği görülür. Kemik hücreleri lameller üzerinde bulunur. Bu hücreler, ince kanalcıklar aracılığıyla hem birbirleriyle hem de damar içeren kanallarla ilişki kurar. Uzun kemiklerin ortalarında içi

kemik iliğiyle dolu silindirik bir boşluk bulunur. Sert kemikten yapılmış kalın duvarlı bu boşluğa ilik boşluğu denir (12).

Kemik dokusu kıkırdığın aksine bol damarlıdır. Ancak matriksinin sert olması difüzyona elverişli değildir. Dolayısıyla dokunun beslenmesi kanaliküli denilen ince kanallar aracılığı ile olmaktadır (9). Kanalikülilerin birbirine bağladığı lakün adı verilen boşluklarda osteosit adı verilen kemik hücreleri bulunur. Hücreler sitoplazmik uzantılarıyla birbirleri ve komşu damarlarla ilişki kurarak metabolizma gerçekleştirirler (9,16).

Kemiğin içinde kan damarlarının dolaştığı kanallara kemik kanalları denilir. Havers ve Volkman kanalları olarak iki çeşittir ve sadece sert kemikte bulunur. Havers kanalları sert kemiğin uzun eksenine paralel yerleşim gösterir. Çapı 20-110 mikron arasında değişir. İç yüzeyi gevşek bağ dokusu ile sarılmış olan Havers kanalında bir veya iki kan damarı bulunur. Bu damarlar çoğunlukla kapiller ve postkapiller venüllerdir; nadiren arterioller de bulunabilir. Enine kesitlerde yuvarlak, boyuna kesitlerde uzun borucuklar şeklinde görülür. Havers kanalları, kendilerine dikey veya eğik yönde seyreden Volkmann kanalları aracılığıyla birbirleriyle sürekli ilişki kurar. Volkman kanalları, kemiğin enine yerleşim gösteren kanallarıdır ve kemiğin periosteumdan endosteuma kadar uzanır. Kemiğe giren damar ve sinirler, Volkman kanalları ile içteki kemik dokusuyla ilişki kurar. Havers kanalları etrafında iç içe yerleşmiş kemik lamelleri varken; Volkmann kanalları etrafında bu lameller bulunmaz (9,12,16).

2.5. KEMİK LAMEL SİSTEMLERİ

Kemik dokusunda, kemik lamelleri adı verilen birbirine paralel ince kemik tabakaları bulunur. Kollojen fibrillerin dağılımı ve özel yerleşimi kemik lamellerinin ortaya çıkmasında önemli rol oynar. Yapısı gereği süngerimsi kemikte daha düzensiz olan kemik lamelleri sert kemikte üç ayrı şekilde yerleşim gösterir. Bunlar; Havers sistemi (osteon), ara lamel sistemi (intersisyal sistem) ve dış ve iç çembersel lamel sistemidir (12,15,16).

2.5.1. Havers Sistemi: Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran, dairesel lamellerin meydana getirdiği bütünlüğe Havers sistemi ya da osteon denir. Merkezi bir kanal çevresinde yerleşmiş 4-20 dairesel lamelden oluşur (17).

2.5.2. Ara Lamel Sistemi: Havers sistemleri aralarında değişik büyüklükte, üçgen veya düzensiz şekilli lamelli kemik alanları vardır. Bu alanlara ara lamel sistemi denir. Havers

sistemi ve ara lamel sisteminin sınırları yapıştırıcı çizgi denilen keskin bir hat ile birbirinden ayrılır. Ara lameller büyüme ve yeniden şekillenme sırasında yıkılan eski Havers sistemlerinden artakalan lamellerdir (16,17).

2.5.3. Dış ve İç Çembersel Lameller Sistemi: Bu lameller, kemik iliği boşluğunun çevresinde ve periosteumun hemen altında yer alır. Bunların lamelleri merkezleri kemik iliği boşluğu olmak üzere, dairesel olarak yerleşmişlerdir. Her iki çembersel sistem arasında çok sayıda Havers sistemi vardır (17).

2.6. KEMİK ZARLARI

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan oluşan tabakalarla örtülüdür. Dıştakine periosteum, içtekine de endosteum denir (9,17).

Periosteumun dış tabakası kollojen lifler ve fibroblastlardan oluşmuştur. Demetler halinde periosteal kollojen liflerden oluşan sharpey lifleri, matriks içine girerek periosteuma kemiğe bağlar (17). Çocuklarda daha gevşek, yetişkinlerde daha sıkı bir şekilde kemiğe bağlanır (18). Hücreden daha zengin olan periosteumun iç tabakası, bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme potansiyeline sahip olan yassı hücrelerden yana zengindir. Bu osteoprogenitor hücreler; konumları, yassı şekilleri çok az miktarda granüllü endoplazmik retikulumları ve az gelişmiş golgi kompleksleri ile özellik kazanırlar (17).

Endosteum, periosteuma benzeyen fakat daha az gelişmiş olan ve kemiğin iç boşluğunu döşeyen diğer bir bağ dokusu tabakasıdır. Endosteum ince bir osteoprogenitör hücre tabakasıyla birlikte, çok az miktarda bağ dokusu içerir (19).

Periosteum ve endosteumun temel işlevleri, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları sürekli olarak sağlamaktır. Bu nedenle kemik cerrahisinde periosteum ve endosteumun korunmasına çok dikkat edilir (17).

2.7. KEMİK HÜCRELERİ

Kemik hücreleri; osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır.

2.7.1. Osteoprogenitör hücreler: Mitozla bölünüp farklılaşarak osteoblastlara dönüşebilen öncü hücrelerdir. Periosteumun iç yüzünde yer alan osteoprogenitör hücrelere periosteal hücreler, endosteumda yer alan osteoprogenitör hücrelere endosteal hücreler denir. Uzunca, oval şekilli nükleusları olan, soluk asidofil veya hafif sitoplazmalı yassı, mekik şekilli

hücrelerdir. Sitoplazmaları organelden zengindir. Bu hücrelerin farklılaşma aşamaları henüz kesinlik kazanmamıştır. Mezenkimal hücrelerden köken aldıkları ve osteoblastlar dışında yağ hücreleri, kondroblastlar ve fibroblastlara dönüştükleri bilinmektedir (20).

2.7.2. Osteoblastlar: Osteoblastlar kemik oluşumundan sorumlu hücrelerdir. Yaşam süreleri birkaç aydan birkaç yıla kadar değişebilir. Kemikleşme bölgelerinde, gelişmekte olan kemiklerin periosteumunun kemiğe temas eden derin bölgelerinde diziler halinde bulunurlar. 15-20 μ büyüklüğündeki bu hücreler kısa uzantılarıyla birbirine tutunur. Kemikte yeni matriks oluşumu sırasında kübik veya silindirik epitel hücreleri şeklinde yan yana gelerek tabaka oluşturur (12). Matriks mineralizasyonunu başlatır ve düzenlerler, ayrıca otokrin ve parakrin mekanizmaları kullanarak; komşu osteoblastları, osteositleri ve osteoklastları kontrol ederler (18,21). İmmünohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalar sitoplazmalarında alkalen-fosfataz, osteopontin ve osteokalsinin; membranlarında RANKL salgılandığı ve paratiroid hormon, prostoglandinler, vitamin D3, östrojen ve sitokinlerle ilgili reseptörlerin bulunduğunu ortaya koymuştur (18,22).

Osteoblastlar, kemik matriksinde kalsiyum depolanmasını düzenlerler ve kemik oluşumu sırasında kemik matriksinin organik kısmını yani kollajen fibrilleri, proteoglikanları, glikozaminoglikan ve glikoproteinleri salgırlar. Henüz kalsifiye olmamış olan bu tür organik maddelere osteoid denir (12). Osteoblastlar sadece osteoidin oluşumuyla görevli değildir, ayrıca indirek olarak osteoidin mineralizasyonundan da sorumludurlar (23). Kemik mineralleri hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Kristal oluşumu başlangıcında nükleatör adı verilen makromoleküllerin görev aldığı düşünülmektedir. Bu görevi gerçekleştirdiği düşünülen en güçlü aday kemik matriksinde bulunan osteoblast kaynaklı sialoprotein gibi fosfat içeren proteinlerdir. Osteoblastlar ayrıca mineralizasyon sürecine fosfoproteinlerinde fosforilasyona neden olan alkalen-fosfataz gibi enzimleri sağlayarak katkıda bulunur (24).

Osteoblastlar yüzeylerinden RANKL açığa çıkarırlar. RANKL osteoklast prekürsörlerinden açığa çıkarılan RANK ile etkileşerek osteoklast farklılaşmasını aktive eder. Olgun osteoklastlardaki RANK ile RANKL'ın etkileşmesi osteoklastın aktivasyonuna ve sağkalımının uzamasına neden olur. Osteoprotegerin (OPG), osteoblastlar ve stromal hücreler tarafından salgınır ve görevi RANK ve RANKL etkileşimini bloke etmektir (25).

2.7.3. Osteositler: Osteoblastlardan farklılaşan, bölünme yetenekleri olmayan hücrelerdir. Sınırlı olarak kemik matriksini sentezleme ve reabsorbe etme yetenekleri vardır. Heterokromatik nükleuslu, hafif bazofil sitoplazmalı bu hücreler lakunalar içinde yer alırlar. Kesitlerde genellikle büzüşürler, sitoplazmaları hemen hemen hiç belli olmaz. Kanaliküllerde uzanan sitoplazmik uzantıları arasında yer alan gap junctionlar sayesinde beslenerek yaşamlarını sürdürürler (20). Osteositlerin yarı ömrü 25 yıldır (18). Osteositler mekanik kuvvetleri biyolojik aktiviteye çeviren mekanosensör hücrelerdir. Fiziksel kuvvetlerin algılanması osteositleri prekürsör hücreleri, osteoblastları ve osteoklastları hedef alan intraselüler haberciler üretmesine ve salgılamasına neden olur (26).

2.7.4. Osteoklastlar: 1980'lerden önce multinükleer osteoklastların kökeni tartışmalı bir konuydu. Günümüzde genel olarak osteoklastların; periferik kandaki monositlerin, histiositlerin ve makrofajların da köken aldığı kemik iliğindeki hematopoetik progenitor hücrelerin farklılaşması sonucu oluştuğu kabul edilmektedir (27).

Kemiğin büyüme ve yeniden şekillenme sürecindeki fizyolojik rezorpsiyonu ve kalsiyum homeostazisi için osteoklastların aktivitesi gereklidir. Osteoklastlara ayrıca dişlerin erüpsiyonu sırasında da ihtiyaç vardır (28). Osteoklastlar 20-100 µm çapında ve 50'ye yakın çekirdeği olabilen dev hücrelerdir. Osteoklastların yer aldığı kemik yüzeyindeki sığ çukurlara Hawship çukurları (Hawship's lacunae) adı verilir. Kemik yıkımından aktif olarak sorumlu olan osteoklastlarda çok belirgin bir kutuplaşma göze çarpar. Çekirdekler daha çok hücrenin dış yüzeyine yani düzgün hatlı kısmına yakın yer alırken, kemiğin yıkımından sorumlu olan tarafta hücre zarı girintili ve çıkıntılı bir hal alır. Buraya fırçamsı kenar denir. Kemik yıkımı sırasında önce kalsiyum tuzlarının ortadan kaldırılması daha sonra da organik maddenin eritilmesi gerekir. Bunun için fırçamsı kenar aracılığıyla matrikse verilen organik asitler kalsiyum tuzlarını çözer. İnorganik matriks bileşenlerinin çözülmesinden sonra bu hücrelerin salgıladığı kollojenaz gibi lizozomal enzimler hücre dışı alanda kollojeni parçalar (12).

Osteoklastların farklılaşmasında üç bağımsız geçiş yolu rol oynar. Bunlar; siklik adenosin monofosfat (cAMP) ile ilişkili yol, glikoprotein 130 ile ilişkili yol ve 1,25 dihidroksikolekalsiferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) reseptörle ilişkili gidiş yollarıdır (27). Osteoklastların olgunlaşması için ayrıca ilik stromal hücreleri ve osteoblastların varlığı gereklidir. Bu hücreler osteoklastogenezis için gerekli iki faktör olan RANKL ve makrofaj koloni stimulator faktör (M-CSF) üretimini yaparlar (29). Aktif osteoklastların oluşumu için osteoblastik stromal hücreler ile osteoklast prekürsörleri arasında yakın bir ilişki olması gereklidir ve bu

proçes IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, lösemi inhibitör faktör (LIF), onkostatin M, tümör nekrotizan faktör (TNF), granülosit makrofaj koloni stimulatörfaktör (GM-CSF), geniş bir grup sitokin ve koloni-stimulatör faktör tarafından etkilenir (27).

2.8. RANK/RANKL OSTEOPROTEGERİN SİSTEMİ

1997’de, birbirinden bağımsız iki araştırma grubu tarafından, kemik yıkımını engelleyen ve osteoprotegerin (OPG) olarak isimlendirilen yeni bir protein bulunmuştur (30,31). Daha sonra bu konudaki çalışmalar hızlanarak fizyolojik ve patolojik kemik rezorpsiyonunu kontrol eden iki farklı protein daha keşfedilmiştir. Bunlardan, reseptör aktivator nükleer kappa B (RANK) osteoklastlarda bulunan ve RANK ligand (RANKL) ile uyarılarak kemik yıkımına neden olan reseptördür (29,32,33).

2.8.1. RANK: TNF reseptör ailesine bağlı, 616 aminoasitten oluşan bir transmembran proteindir (3). Anderson ve arkadaşları tarafından Opg/RANKL kompleksinin reseptörü olarak tanımlanmıştır (34). Preosteoklastlara RANKL’in bağlanmasını sağlayan tek reseptördür (33). RANK; osteoklast prekürsörleri, B ve T lenfositler, dendritik hücreler ve fibroblastlar gibi monosit/makrofaj kökenine sahip hücrelerde bulunur (35). RANKL yüksek bir afinite ile RANK’a bağlanmaktadır ve bu durum osteoklastogenez için gereklidir (36,37).

RANKL’in RANK’a bağlanması ile en az yedi hücre içi sinyal yolağı uyarılır. Bunlardan dördü (NF- κ B inhibitörü/ NF- κ B, c-jun aminoterminal kinaz/ aktivatör protein-1, c-myc ve kalsinörin/ uyarılmış T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) c1) doğrudan osteoklastogeneze aracılık eder. Diğer üçü ise osteoklast aktivasyonuna (src ve MKK6/p38/MITF) ve canlılığını sürdürmesine (src ve hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz) aracılık eder (33).

RANKL, RANK’a bağlandıktan sonra oluşacak sinyallerden ilki TNF serbestleştirici (TNFR) faktör ile ilişkili faktörlerin (TRAF) RANK’ın sitoplazmik kısmındaki kendine özgü bölüme bağlanmasıdır (38,39). TRAF2, TRAF5 ve TRAF6 hepsi birlikte RANK’a bağlanmasına rağmen Lomaga ve ark. TRAF6 (-) farede osteopetrozis geliştiğini rapor ederek sadece TRAF6 ‘nın osteoklastlar için önemli olduğunu belirtmişlerdir (40). RANK/RANKL kompleksi hücre içine alınarak lizozomlarda yıkılır (41).

2.8.2. RANKL: 317 aminoasitlik bir polipeptid olan RANKL; sitoplazmada bulunan N-terminal bölgesi, transmembran bölgesi ve ekstrasellüler C-terminal bölgesi olan tip 2 transmembran bir proteindir. RANKL plazmada hücre membranına bağlı form ve çözülebilir form olarak iki biçimde bulunmaktadır (42). Normal ve patolojik durumlarda kemik rezorpsiyonun anahtar mediyatörü olan RANKL, TNF ligand ailesinin bir üyesidir. Lenf nodları, timus ve akciğerde daha fazla olmak üzere dalak ve kemik iliği gibi dokularda ve osteoblastlarda sentezlenir. RANKL sentezi transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel seviyelerde hormonlar (1,25 dihidroksi vitD₃), büyüme faktörleri ve peptidler (Fibroblast büyüme faktörü-2, PTH ilişkili protein gibi), sitokinler (IL-1 β , IL-6, IL-11 ve TNF- α gibi) ve glukokortikoidler gibi pek çok faktör tarafından düzenlenir. Osteoblastlarda ve stromal hücrelerde RANKL sentezlenmesi, osteoklast oluşumu ve aktivasyonunu uyaran pek çok faktör ile uyarılır (30,32,33,41,43) BMP-2 (Kemik morfojenik protein) aynı zamanda kondrositlere etki ederek RANKL ekspresyonuna neden olmaktadır (44).

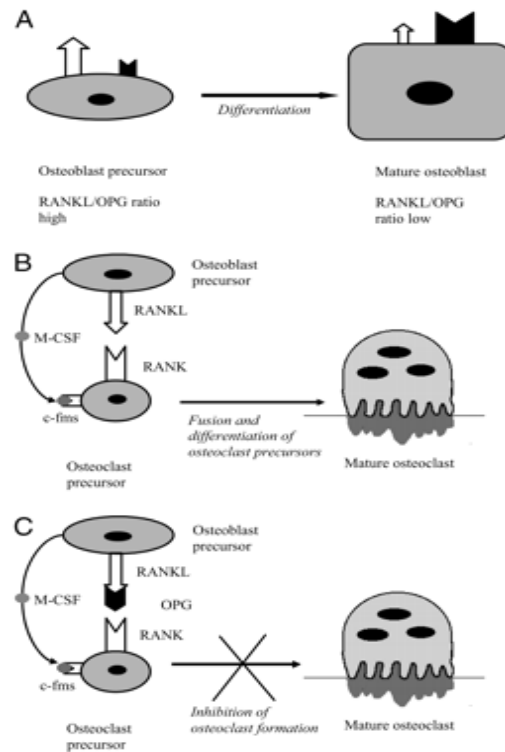
RANKL; öncül ve olgun osteoklastlar, uyarılmış T ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunan kendine ait reseptörü RANK'a bağlanarak bu hücreleri uyarır. RANKL'in kemikteki ana görevi osteoklast oluşumunu ve apoptozun inhibisyonunu sağlamaktır (33). Osteoblastlar yanında T hücrelerinden de artmış miktarda RANKL salgılanması artrit ve diğer inflamatuvar hastalıklara bağlı kemik kaybında RANKL'in rol oynayabileceğini düşündürmektedir (45). RANKL periferik kandaki monositler için kemoatraktan özelliğe sahiptir (46,47). RANKL kodlayan gendeki delesyonlar sonrası osteopetrosis gelişmekte ve fonksiyonel olgun osteoklastlar oluşmamaktadır ve dışarıdan RANKL verilmesi üzerine RANKL (-) ratlarda kemikte mevcut anormallikler düzeltilmektedir (42).

2.8.3. Osteoprotegerin: Osteoprotegerin RANKL için tuzak reseptör olarak görev yapan (Şekil 2-1); RANK-RANKL birleşmesini negatif yönde etkileyen TNF ailesinin üyesi olan bir reseptördür (48) OPG, osteoblastlar ve kemik iliği stromal hücreleri gibi mezenşimal hücrelerden köken alan çözünebilir glikoprotein yapısındadır. OPG, RANK ve RANKL'in aksine transmembran ve sitoplazmik kısımlar içermez (49). İnsan ve mürin OPG'i 401 aminoasitten oluşmuştur. OPG N-terminal bölgesinde dört adet sisteinden zengin yalancı tekrarlanan kısım içerir. Bu dört kısım uzayan bir yapı oluşturarak RANKL trimerindeki oluğa bağlanır. Bunların dışında OPG'in 2 adet ölüm bölgesi ve C-terminalde heparin bağlayan bir bölgesi ve 21 aminoasitlik sinyal peptidi bölümü bulunur (50,51) OPG,

osteoblastlar dışında kardiyovasküler sistem, böbrek, karaciğer, dalak, beyin, akciğer ve kemik iliği gibi pek çok doku ve hematopoetik ve immün hücreler tarafından sentezlenir. Salgılanması pek çok sitokin, peptid, hormon ve ilaç tarafından düzenlenir. Transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α), TGF- β , IL-1 α , IL-18, BMP'ler ve mRNA OPG seviyelerini artıran 17 β -östradiol bunlardan birkaç tanesidir. Kemik yıkımını arttırdığı bilinen glukokortikoidler, siklosporin A, PTH, prostaglandin E₂, fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ise OPG sentezini inhibe ederler (33).

OPG (-) ratlarda daha düşük kemik mineral densitesi (BMD), trabeküler ve kortikal kemik pörözitesi, parietal kemiklerde inceltme, osteoporoz ve kemik kırığı insidansında artış tespit edilmiştir (52). OPG genindeki mutasyonlar; hiperfosfotazya hastalığına neden olmaktadır (53). Yüksek OPG plazma konsantrasyonlarının kadınlar ve erkeklerde daha güçlü kemiklerle ilişkili olduğuna dair bulgular mevcuttur (54).

Kemik iliği hücrelerinin sentezlediği OPG'nin yaşla azaldığı görülmüştür (55). OPG'nin vasküler kalsifikasyonu önleyici etkisi vardır (56). OPG'nin RANKL'ın neden olduğu kemik kaybını enflamatuvar parametreleri değiştirmeden bloke ettiği rapor edilmiştir (57).



Şekil 2-1: RANK/RANKL/OPG Sisteminin şematik işleyişi (The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, doi:10.1210/jc.2005-0794)

2.9. SİTOKİNLER

Çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen ve salgılanan polipeptidler olan sitokinler; enflamasyon, hücre büyümesi, iyileşmesi ve yaralanmaya karşı sistemik yanıtı da içine alan bağışıklık ve enflamatuvar olayları düzenlerler (5). Sیتokinler çok geniş bir protein grubu olmakla beraber bu moleküllerin ortak bir çok özellikleri vardır:

- Sیتokinler doğal ve spesifik bağışıklığın efektör fazında üretilirler ve bağışıklık ve enflamatuvar yanıtların oluşmasını ve düzenlenmesini sağlarlar.
- Sیتokin salınımı kısa, kendini sınırlayan bir olgudur. Genel olarak sitokinler öncül moleküller olarak depolanmazlar ve sentezleri yeni gen transkripsiyonu ile başlatılır.
- Sیتokinler genellikle diğer sitokinlerin sentezini etkiler; ikinci veya üçüncü bir sitokin birinci sitokinin biyolojik etkisine ortam hazırlayabilir.
- Sیتokinlerin aynı hedef hücrede farklı bir çok etkileri vardır.
- Sیتokinler birçok farklı hücre tiplerine etki ederler. Bu özelliğe pleiotropizm denir.
- Sیتokinler çeşitli hücreler tarafından üretilir.
- Sیتokinler diğer polipeptid hormonlar gibi hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar (58,59)

2.9.1. İnterlökin-6:

IL-6 ilk olarak preaktivasyon halindeki normal insan lenfositleri ve Epstein Barr virüsüne transformasyona uğratılmış B lenfositler tarafından immunglobulin salgılatan bir faktör olarak tanımlanmıştır. 184 aminoasitten oluşmaktadır. Başlıca T ve B lenfositler, monositler, fibroblastlar, keratinositler, endotelial hücreler, astrositler, kemik iliği stromal hücreleri ve mezenkimal hücreler tarafından sentez edilir. Lenfosit, monosit, mesane ve akciğer hücreleri tarafından oluşturulabildiği gibi kardiyak miksoma, myeloma ve hipernefroma gibi tümör hücrelerince de oluşturulabilmektedir (60). IL-1, TNF, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), interferon (IFN) beta ve sikloheksimid IL-6 gen ekspresyonunu arttırıcı etki oluşturur. Glukokortikoidler, IL-6 gen belirmesini negatif olarak etkilerler (61).

IL-6, B lenfositlerin immunglobulin salınımı için bir kofaktör olarak rol oynar. B lenfositlerin ayrışım sıralamasının geç dönemlerinde B lenfositleri için büyüme faktörü olarak görev yapar (62).

IL-6 kemik rezorpsiyonunda potent düzenleyici işlevi gösterir (3). Kemikteki ana IL-6 kaynakları osteoblastik hücreler ve stromal hücrelerdir (63). Ankilozan spondilitli hastalarda lokal ya da sistemik kemik kaybından IL-6, TNF- α , IL-1 gibi sitokinlerin sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar vardır (64-65). IL-6 osteoklastik aktiviteyi, osteoblastik ve osteoklastik etkileşimleri artırarak, indirek yolla indükler. Bu nedenle artmış osteoklast ortamında IL-6'nın osteoklastogenezisi artırmadığı gösterilmiştir (66-67). Yüksek orandaki IL-6 oranları kemik rezorbsiyonunu arttırırken, fizyolojik miktarlar diğer sitokinlerle etkileşim içinde olmadığı sürece bu işlevi görmezler (68). IL-6'nın artmış oranları RANKL oranlarını da arttırmaktadır (3). TNF- α 'nın osteoblastlardan ve osteoblasta benzer osteosarkoma hücrelerinden IL-6 üretimini artırdığı rapor edilmiştir (69).

2.9.2. İnterlökin-8:

Periferik kan mononükleer hücreleri, fibroblastlar, endotelial hücreler ve keratinositler tarafından sentezlenir. Yapımı IL-1 ve TNF tarafından uyarılmaktadır. İmmün cevapta inflamasyon bölgesine nötrofil kemotaksisine sebep olan en önemli mediatördür (70). Bu özelliği ile monosit kökenli büyüme faktörü olarak da adlandırılmıştır. Invitro olarak nötrofillerde respiratuvar patlamayı ve katalizin enzimi varlığında lizozomal enzim salınımını artırır. Nötrofillerin *C.albicans* üzerine öldürücü etkisi IL-8 ile artırılır. Nötrofiller üzerinde spesifik IL-8 reseptörleri gösterilmiştir. İmmün cevapta inflamatuvar bölgeye lökosit migrasyonuna sebep olması vücut savunmasında hayati öneme sahip olduğunu düşündürmektedir (61). In vitro ve in vivo kanıtlar aktif Behçet hastalarından alınan lenfositlerin kendiliğinden TNF- α , IL-6 ve IL-8 salgıladıklarını göstermiş ve nötrofil fonksiyonunu aktive ettiği bilinen bu proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerine uygun olarak aktif Behçet hastalarının serumlarında artmış olduğu bulunmuştur (71). Tedavi edilmeyen hızlı ilerleyen periodontitis vakalarında artmış serum IL-8 oranları gösterilmiş ve bu oranlar tedavi uygulamalarını takiben düşmüştür (72,73).

2.9.3. TNF- α :

Ev sahibi hücrelerin gram (-) bakterilere karşı esas mediatörüdür. Diğer infeksiyöz organizmalara karşı yanıtta da rol oynar. TNF' nin hücresel kaynağı lipopolisakkarit (LPS) ile aktive olan mononükleer fagositlerdir. T hücreleri, aktive NK hücreleri ve aktive mast hücreleri de bu proteini salgılar. İnsan TNF'si nonglikolize bir transmembranöz protein olup, molekül ağırlığı 17 kdaltondur. İki çeşit TNF vardır. Bunlar; genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- α (kaşektin) ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (lenfotoksin) dır (5).

TNF- α enflamasyonda üretilen potent osteoklastojenik sitokinlerden biridir. TNF- α otokrin bir mekanizma ile RANKL stimülasyonu oluşturarak osteoklast farklılaşmasına arabuluculuk eder (74). Periodontitis, ortopedik implant kaybı ve kronik enflamatuvar osteolizis ile ilgili diğer formlarda da TNF- α etkinliği gösterilmiştir (75).

İki tip TNF reseptörü vardır. Bunlar, sitotoksik aktiviteyi ve fibroblast proliferasyonunu arttıran TNFR Tip 1 ile T hücre proliferasyonuna neden olan TNFR Tip 2'dir. Buna ek olarak TNF reseptörlerinin çözünebilir formlarında (sTNFR) mevcuttur ve bunlar hücre yüzeyindeki TNF reseptörlerinin yıkımı sonucu proteinlerden kaynaklanırlar. sTNFR'lerin biyolojik önemi TNF ile yarışıp onun etkilerini bloke etmesidir (5). TNFR Tip 1, TNF- α 'nın programlı hücre ölümü ve NF κ B aktivasyonu gibi çoğu biyolojik aktivitesine aracılık etmektedir (76).

TNF- α vasküler hücrelerde fosfolipaz A, platelet aktive edici faktör ve serbest radikal oluşumunu artırır. Serbest radikaller permeabilityyi artırarak ödeme neden olur (77).

TNF'nin biyolojik fonksiyonları konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda etkisi lokaldir. Lökositler ve endotel hücreleri üzerine otokrin ve parakrin etki yapar. Bu etkiler mikroorganizmalara verilecek inflamatuvar yanıt açısından önemlidir. TNF'nin biyolojik etkilerinden bazıları şöyle sıralanabilir:

- TNF- α , damar endotelinde bazı adezyon moleküllerinin [“Hücre içi adezyon molekül” (ICAM)-1, “vasküler hücre adezyon molekül” (VCAM)-1, “endotelial lökosit adezyon molekül” (ELAM)-1] ortaya çıkmasına yol açar. Bu moleküller endotelin önce nötrofiller, sonra da mononükleer lökositler için yapışkan olmasını sağlayarak lökositlerin inflamasyon yüzeyine toplanmasına yol açar.

- TNF- α , başlıca nötrofiller, daha az eozinofiller ve mononükleer fagositler olmak üzere lökositlerin mikroorganizmaları öldürmesini aktive eder.

- TNF- α , IL-1, IL-6, kemokinler ve TNF- α 'nın kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarır.

- Sınıf 1 “major histocompatibility complex” (MHC) molekül ekspresyonunu arttırarak sitotoksik lenfositlerin virüsle enfekte olmuş hücreleri ortadan kaldırmasını güçlendirir (78- 81).

TNF- α 'nın sistemik etkileri ise şöyledir:

- TNF- α endojen pirojendir. Hipotalamik etkiyle ateş oluşur. Bu etkiyi IL-1 ile uyarır. Ateşin TNF- α ve IL-1'e yanıt olarak yükselmesi sitokinle uyarılmış hipotalamus hücreleri tarafından arttırılan prostaglandin E2 senteziyle olur.

- TNF- α mononükleer fagosit ve vasküler endotelin IL-1 ve IL-6; hepatositlerin ise serum amiloid A, C-reaktif protein, C3 ve α 2 makroglobulin gibi akut faz proteinlerini sentezlemesini uyarır.

- Damar endotelinin prokoagülan ve antikoagülan fonksiyonlarında değişiklikler yaparak pıhtılaşma sistemini aktive eder.

- T hücre aktivasyonu ve B hücre proliferasyonunu indükler (İmmünglobulin yapımı)

- TNF- α osteoblastik alkalen fosfataz aktivitesini, osteoklastların kemik rezorbsiyonunu, kondrositlerin kıkırdak döngüsünü, fibroblast ve sinoviyal hücrelerin proliferasyonunu uyarır (82).

TNF- α 'nın birçok özel etkileri, aşırı yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan öldürücü sonuçlar doğurmaktadır. NO ve prostasiklin aracılığıyla, miyokard kasılabilirliğini bozmak ve damar düz kaslarını gevşetmek ve intravasküler koagülasyona neden olmak suretiyle kan basıncını ve doku perfüzyonunu, yaşamı tehdit edecek hipoglisemilere yol açmak (glukozun kas tarafından aşırı kullanımına ve karaciğer tarafından glukozun yerine konulamamasına bağlı) bunlar arasında sayılabilir (83,84).

TNF- α makrofaj indüklü anjiogenezise yol açan makrofajları etkileyerek periodontal hastalıkta görülen vasküler değişikliklerde rol oynayabilir (85). Ayrıca dişeti fibroblastları dahil bütün fibroblastları etkileyerek kollojenaz üretmelerine neden olur, osteoklastların aktivasyonunda da rol oynar ve bunları kemik rezorbsiyonu için stimule eder (86).

2.10. ELISA YÖNTEMİ:

Antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tekniklere genel olarak immunotest (enzyme immunoassay, EIA) denir. Enzimle işaretli antikor

reaktiflere dayalı bu testler, tanı laboratuvarlarında oldukça önemli bir yere sahiptir. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) sistemleri 1960'larda radioimmunoassay yöntemlerine alternatif aranırken bulunmuştur. EIA'de kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması, otomatize edilebilmesi diğer iki tekniğe olan üstünlükleridir. Daha önemlisi laboratuvarlara çok fazla sayıda örnekle çalışma olanağı verdiği gibi analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır (87). En önemli özelliği hassasiyet ve spesifiktir.

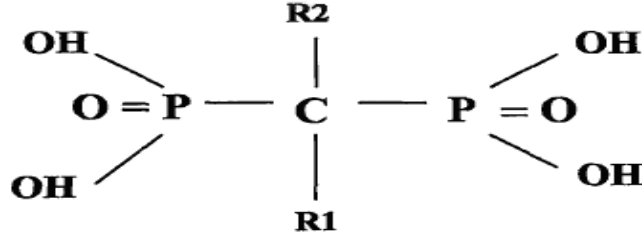
EIA diye isimlendirilen yöntemler, homojen ve heterojen olmak üzere iki çeşittir. Homojen tekniklerde, enzim bir hapten ile konjuge haldedir. Tekniğin esası, bu konjugatın antikor ile reaksiyona girmesi halinde enzim aktivitesinin başlamasına dayanır. Ancak bu tekniğin düşük moleküler ağırlıklı maddeler kullanma zorunluluğunun bulunması, pahalı ve zahmetli olması gibi dezavantajları vardır. Bu nedenlerden dolayı fazla sık kullanılmazlar (88).

Tanı laboratuvarlarında kullanılan enzim immunotestler heterojen yöntemlerdir. Heterojen EIA'de bağlı olan ve olmayan reaktifler birbirinden yıkama işlemi ile fiziksel olarak ayrılırlar. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), heterojen EIA'e örnektir. ELISA'da bir enzimle konjuge edilmiş antikor (veya antijen), substratı ile reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturur. ELISA testleri antijeni veya antikoru (sınıfa özgül antikor da olabilir) ölçmek için kullanılabilir (89).

2.11. BİFOSFONATLAR:

İnorganik pirofosfatın, P-O-P grubu yerine, P-C-P (Şekil 2-2) grubu içeren ve bu gruptaki karbon atomu üzerinden süstitüe edilmiş organik analoglarıdır. İki C-P bağı aynı karbon üzerinde olduğu için bu bileşiklere kimyaca geminal bifosfonatlar denilse de bifosfonatlar adı yerleşmiştir. İnorganik pirofosfat, kalsiyum fosfata sıkı şekilde bağlanır ve kalsiyum fosfatın çökme ve kristal oluşturmalarını bozarak in vivo ektopik kalsifikasyon yapmasını önler (90). Alman kimyagerler tarafından 19.yy ortalarında üretilen bifosfonatlar, ilk olarak endüstride kalsiyum tuzlarının petrol borularını kaplamasını engellemek için kullanılmışlardır (91,92). Bifosfonatların biyolojik özelliklerinin 1968'de rapor edilmesiyle birlikte klinik kullanımları gündeme gelmiştir ve ilk olarak böbrek taşı oluşmasını önlemek amacıyla kullanılmışlardır (93). Pirofosfat ağızdan alındığında çok hızlı hidroliz olduğundan, sistemik etkili ilaç olarak değeri kısıtlıdır; sadece ^{99m}Tc (teknesyum) ile işaretlenmiş olarak

iskelet sintigrafisinde kullanılır ve radyoizotopsuz şekli diş macunları içine anti tartar ajan olarak katılır (90). P-C-P yapısına eklenen R1 ve R2 yan zincirleri bifosfonat molekülüne karakteristik özelliklerini vermektedir (94).



Şekil 2-2: Bifosfonat molekülünün şematik yapısı

Antirezorptif yapıdan sorumlu major zincir azot grubu olan R2 zinciridir (92).

Bifosfonatlar kimyasal olarak azot içeren ve içermeyenler olarak ikiye ayrılırlar (Tablo 2-1). Etidronat, clodronat ve tiludronat eski nesil azot içermeyen bifosfonatlardır. Günümüzde bu moleküllerin yerini daha güçlü kimyasal yapıya sahip olan azot içeren bifosfonatlar almıştır. Azot içeren bifosfonatlara başlıca örnekler alendronat, ibandronat, pamidronat ve zoledronat molekülleridir (25).

Tablo 2-1 : Tescilli bifosfonat isimleri ve rölatif potensileri

Bifosfonat	Tescilli İsim	Rölatif Potensi
Etidronate	Didronel	1
Tiludronate	Skelid	50
Alendronate	Fosamax	1000
Residronate	Actonel	1000
Ibandronate	Boniva	1000
Pamidronate	Aredia	1000-5000
Zolendronate	Zometa	10000↑

2.11.1. Bifosfonatların Etki Mekanizmaları:

Nitrojen içermeyen bifosfonatlar 1. jenerasyon bifosfonatlar olarak da adlandırılırlar. R2 zincirleri kısadır (92). Azot içermeyen bifosfonatlar osteoklast hücresi içerisine alındıktan sonra hidrolize olamayan ve sitotoksik etkiye sahip olan adenozintrifosfat (ATP) analoglarına metabolize olurlar. Bu ATP analogları fonksiyonel olmadıkları için hücresel enerji metabolizması aksatarak osteoklastın apoptozise uğramasına neden olurlar (95).

Azot içeren bifosfonatlarda bundan farklı birçok mekanizma ile osteoklast hücresinin kemik yıkım aktiviteleri ve hücresel sağ kalımı engellenir. Hücre içerisine alınan azotlu bifosfonat molekülü esas olarak mevalonik asit gidiş yolundaki farnesilpirofosfat sentaz (FPPS) enziminin aktivitesini inhibe eder. Bunun sonucunda farnesilpirofosfat ve geranil-geranil pirofosfat gibi ara ürünlerin oluşması engellenir ki bunlar guanozintrifosfat (GTP) bağlı Ras, Rho ve Rac gibi hücre proliferasyonu, sağ kalım ve hücre iskeleti organizasyonunda görevli sinyal proteinlerin aktivasyonunu engeller. Ras hücre içi vezikül transportunda görevli bir protein olup engellenmesi durumunda osteoklastik kemik yıkımı sekteye uğrar. Bu mekanizmalar dışında ayrıca FPPS aktivitesinin bozulması azot içermeyen bifosfonatlara benzer şekilde ATP analoglarının oluşmasına ve osteoklast apoptozisine yol açar (92,95).

2.11.2. Bifosfonatların Farmakokinetik Özellikleri:

Bifosfonatlar oral biyoyararlanımı çok düşük olan ilaçlardır. Sistemik biyoyararlanımları %1'in altındaki değerlerden %10'a kadar değişir; ayrıca bireyler arasında fazla değişme gösterir. Bu durum, etidronat gibi kemikte rezorpsiyonu inhibe eden dozu, mineralizasyonu inhibe eden dozuna yakın olan ilaçlarda sorun yaratabilir. Besinle birlikte alınma, özellikle kalsiyum ve demir varlığında biyoyararlanımlarını kompleks teşkil etme nedeniyle daha da düşürür. Günlük doz sabah aç karna bir kezde verilir. Yaklaşık %30-65 oranında plazma proteinlerine bağlanırlar veya plazmada çok ufak kümeler halinde bulunurlar: kalan kısmı serbesttir. Absorbe edilen ilacın bir kısmı kemiğe geçerek tutunur; bu kemiğe alım (uptake) oranı klodronat için yaklaşık %20, etidronat için %50 ve alendronat ve pamidronat için daha fazladır (90). Bifosfonatların dolaşımdaki yarılanma süresi kısadır ve 30 dakika ile 2 saat arasında değişir (96). Kemik dokuya geçtikten sonra ilgili dokunun döngüsüne göre 10 yıl kadar kaldıkları bildirilmiştir (97,98). Kemiğe çok hızlı geçerler, başka bir deyişle kan içinde kemikten ilk geçişlerinde kandaki miktarın neredeyse tümü kemikte tutunur. İntravenöz (i.v.) olarak verilen alendronatın %95'ten fazlasın kemiğe geçmek

suretiyle 60 dakikada plazmadan kaybolduğu görülmüştür. Kronik uygulamada iskelet içindeki bağlanma yerlerinin doyurulmasının, onlarca yıllık uygulamadan sonra bile meydana gelmeyeceği bildirilmiştir (92).

2.11.3. Bifosfonatların Farmakolojik Özellikleri:

Bifosfonatlar, pirofosfat gibi, kalsiyum fosfat kristallerine yüksek afiniteyle bağlanırlar. Böylece kristalin büyümesini, kümelenmesini ve çözünmesini inhibe ederler. Bifosfonatlar, bu yolla kemik yıkımını azaltma özelliği yanında kemik yıkımından sorumlu osteoklastların ana hücreden differansiye olma ve olgunlaşmasını da baskılamakta; dolayısıyla sayı ve aktivitede azalmaya neden olmaktadır (99). Bifosfonatlar kemik dokusunda hidroksiapatite bağlanırlar. Osteoklastların bifosfonat içeren hidroksiapatit kristallerini fagosit etmesi, onların metabolik etkinliğini inhibe eder ve daha fazla kemik rezorbe etmelerini önler. Osteoklastların bifosfonat içeren kemikle temasa geçtiklerinde inhibe edildikleri in vitro olarak gösterilmiştir. Bu durum hücrede morfolojik değişikliğe de neden olur. Osteoklastlarda etkinlik azalmasının yanı sıra sayıca azalmaya da neden olur. Etkinlik azalmasının, osteoklastların rezorpsiyon yapan fırçamsı yüzeyindeki asidifikasyon yapan olayların bozulması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Deney hayvanlarında deneysel olarak oluşturulan yumuşak doku kalsifikasyonunu ve idrar yolu taşı ve diş taşı oluşmasını inhibe ettikleri gösterilmiştir (90). Hayvan deneylerinde tümörün indüklediği osteoklastogenezisi azalttığı, sağkalımı uzattığı, kemik fraktürü ve ağrısını azalttığı gösterilmiştir (100,101).

Bifosfonatların osteoblastlara olan etkisi osteoklastlara olan etkisi kadar iyi açıklanamamıştır. Aminobifosfonatlar teropatik dozlarda osteoblast diferansiasyonunu ve kemik depozisyonunu stimule ederler. Yüksek dozlarda ise bifosfonatlar, osteoblastlara sitotoksik etki göstererek apoptozislerine neden olurlar (4).

Bifosfonatların düzenli kullanımının kemik mineral yoğunluğunda artışa neden olduğu bilinmektedir. BMD artışında kesintili ya da günlük dozlama rejimlerinin eşit derecede etkili olduğu, dozlama aralığından çok efektif total dozun önemli olduğu rapor edilmiştir. Bifosfonat molekülleri arasında BMD artışı üzerindeki etkinlikleri açısından küçük farklar olmasına karşın bu durum kırık riski azalması konusunda kliniğe tam olarak yansımamaktadır. Analizler vertebral kırıklarda gözlenen azalmanın sadece %20'sinin kemik kütlesindeki değişimle açıklanabildiğini göstermektedir (102,103).

Bifosfonatlar tümöral hücrelerde apoptozise neden olarak ve kemikteki tümör hücrelerinin intraselüler matrikse geçmesine engel olarak tümör invazyonunu engellerler. Ayrıca anti-anjiyojenik etkileri, metastazı önleyerek anti-tümöral etkilerine katkı sağlamaktadır (92,104).

2.11.4. Bifosfonatların Kullanılışları:

Bifosfonatlar genellikle oral yolla ve acil durumlarda ya da uzun intervalli kronik uygulamalarda i.v. infüzyonla uygulanırlar. İntravenöz verilış için injeksiyonluk solüsyonları 250-500 ml salin içinde seyreltilerek yavaş (en az 2 saatte) infüze edilir (90).

Bifosfonatlar; osteoporoz, multiple myeloma, akciğer kanserleri, prostat kanserleri ve göğüs kanserleri, Paget hastalığı, metastatik kemik tümörleri, hiperkalsemi tedavilerinde, ektopik kalsifikasyonlarda, nükleer tıpta iskelet işaretleme gibi durumlarda kullanılmaktadır (105).

Hayvanlardaki pekçok osteoporoz modelinde kemik kaybını önledikleri, kitlesini artırdıkları ve kemiklerin mekanik sağlımlıklarını artırdıkları gösterilmiştir. Osteoporozlu insanlarda da kemik döngüsünü inhibe ederek kemik kaybını yavaşlattıkları saptanmıştır. Yıkımın azalmasına sekonder olarak kemik oluşumunda gelişen azalmanın, kemik yıkımındaki azalmadan daha az olması sebebiyle bazı osteoporozlularda kemik kitlesini artırırılar (90). Bifosfonatların düzenli kullanımının kemik mineral yoğunluğunda artışa neden olduğu bilinmektedir. BMD artışında kesintili ya da günlük dozlama rejimlerinin eşit derecede etkili olduğu, dozlama aralığından çok efektif total dozun önemli olduğu rapor edilmiştir. Bifosfonat molekülleri arasında BMD artışı üzerindeki etkinlikleri açısından küçük farklar olmasına karşın bu durum kırık riskinin azalması konusunda kliniğe tam olarak yansımamaktadır. Analizler vertebral kırıklarda gözlenen azalmanın sadece %20'sinin kemik kütleindeki değişimle açıklanabildiğini göstermektedir (95,102,103)

Radyografik (morfometrik) vertebra kırıkları; radyografik olarak morfometrik analizlerle tespit edilen asemptomatik osteoporotik kırık tipidir (106). Bifosfonatlar radyografik vertebra kırıklarını belirgin derecede azaltmaktadır. Günlük alendronat, risedronat ve ibandronat kullanımının vertebral kırıkları 3 yıl içerisinde %40-%50 oranında azalttığı rapor edilmiştir (25). Literatürde radyografik kırıkların azaltılmasında intravenöz bifosfonat olan zoledronatın da oldukça etkili olduğu saptanmıştır (107). Postmenopozal osteoporoza karşı rutin olarak günde tek doz oral yolla verilirler. Bu durumun profilaksisi için, tedavi için

kullanılan dozun genellikle yarısı kadar kullanılır. Aledronatın tedavi için ve risedronatın profilaksi için haftada bir verilen tablet şekilleri üretilmiştir. Uzun süreli postmenopozal osteoporoz profilaksisi ve tedavisi için östrojenle yapılan hormon replasman tedavisi artık birinci sırayı alan uygulama olmaktan çıkmış, bifosfonatlar birinci tercih haline gelmiştir. Bifosfonatların uygun olmadığı durumlarda alternatifleri kalsitriol veya kalsitonindir (90).

Uzun süre kortikosteroid verilecek hastalarda doza ve süreye bağımlı bir şekilde gelişen osteoporoza karşı koruma içinde postmenopozal osteoporoz profilaksisinde kullanılan dozda verilirler. Günde 7.5 mg veya daha fazla prednizolon veya eşdeğeri dozunda 3 ay ya da daha uzun kortikosteroid verilecek hastalarda bifosfonatlarla profilaksi tavsiye edilir (90).

Bifosfonatlar ayrıca; fibröz displazi, heteretropik osifikasyonlar, ankilozan spondilit gibi kemikle ilişkili hastalıkların tedavisinde de tercih edilmektedir (108).

Kemik metastazlarının genel tedavi prensipleri içinde cerrahi tedavi ve radyoterapi gibi lokal tedavilerin yanısıra ağrı tedavisi, sistemik kemoterapi, hormonal tedavi ve radyofarmasötikler gibi sistemik tedaviler de bulunmaktadır. Bifosfonatlar son yıllarda kemik metastazlarında standart tedavi haline gelmiştir (109). Malign tümörler, metastaz sonucu lokal olarak veya maligniteye bağlı humoral hiperkalsemi denilen durumda olduğu gibi salgıladıkları paratiroid hormonu ile ilişkili peptidler ve kemik rezorbe eden sitokinler aracılığı ile osteoliz ve hiperkalsemi yaparlar. Bifosfonatlar kemikte yerleşmiş tümörün veya metastazın yaptığı lokal kemik yıkımını ve lokal ağrıyı, ayrıca hiperkalsemiyi etkin şekilde azaltabilirler. Ancak kanda dolaşan sitokinlerin ve peptidlerin yaptığı, maligniteye bağlı tümoral hiperkalsemiye karşı etkinlikleri düşüktür (90).

Pamidronat, multiple myeloma ve litik meme metastazlarında kullanılır. Pamidronatın plasebo ile karşılaştırıldığı 745 hastalık bir çalışmada iskelet komplikasyonlarını anlamlı derecede azalttığı ve geciktirdiği gösterilmiştir. İskelet komplikasyonları gelişinceye kadar geçen ortalama süre 6 ay daha uzun bulunmuş, analjezik kullanımında da pamidronat grubu daha avantajlı bulunmuştur (110).

Yeni jenerasyon bifosfonat olarak geliştirilen zoledronat ise hem litik hem de blastik lezyonlarda etkilidir. Zoledronatın etkinliği meme, prostat, akciğer kanseri ve diğer solid tümörlerin kemik metastazlarında kanıtlanmıştır. Tedavinin birincil hedefi patolojik fraktür, spinal kord basısı, kemiklere radyoterapi ve cerrahi uygulaması, hiperkalsemi gibi iskeletle ilgili en az bir olay gelişim oranları ve zamanı olarak belirlenmiştir. Rosen ve arkadaşlarının meme kanseri ve myelomada zoledronat ve pamidronatın karşılaştırıldığı prospektif çalışmasında iskeletsel komplikasyonların her iki grupta azaldığı ve zoledronat uygulanan

grupta bu komplikasyonların %20 daha fazla azaldığı rapor edilmiştir. Analjezik kullanımı her iki grupta aynı bulunmakla beraber, litik kemik lezyonlarında da ilk lezyon gelişmesi zoledronat grubunda daha uzun bulunmuştur (111).

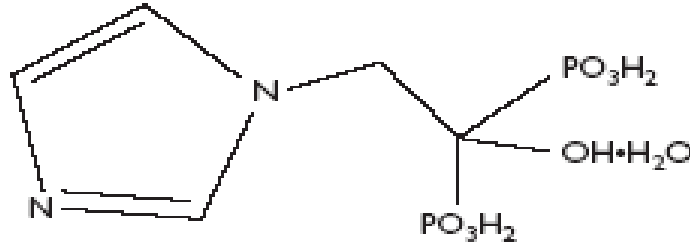
İskelet olaylarına olumlu katkıları yanında bifosfonatların ileri evre kanserlerde kemik metastazına bağlı gelişen ağrıların palyasyonunda da etkili oldukları bildirilmiştir. Çalışmalarda bifosfonat kullanımı sırasında kemik ağrıları, analjezik kullanımı, yaşam kalitesi, fonksiyonları ve performansı değerlendirilmiştir. Osteolitik kemik metastazı olan meme kanserli olgularda 12 aylık oral klodronat kullanımı ile hem ağrı hem de analjezik kullanımı ihtiyacı anlamlı olarak azalmıştır (109).

Tümörle ilgili olmayan hiperkalsemi durumlarında (hiperparatiroidizm, tirotoksikoz, D vitamini intoksikasyonu v.b.) durumlarda gelişen hiperkalsemilerde oral veya i.v. bifosfonatlar denenmişlerdir. Ancak etkinlikleri, özellikle hiperparatiroidizme bağlı olanda, tümöre bağlı kemik hastalığında gelişen hiperkalsemiye göre daha düşüktür (90).

Bifosfonatlar deney hayvanlarında deneysel heterotropik kalsifikasyon ve osifikasyonu önleyebilirler. İnsanlarda etidronat yumuşak dokudaki heterotropik kalsifikasyona karşı denenmiş ve etkinliği tartışmalı olarak değerlendirilmiştir (90).

2.11.5. Zoledronat:

Üçüncü jenerasyon, imidazol halkası heterosiklik nitrojen içeren bir bifosfonattır (Şekil 2-3). İmidazol halkası, iki adet nitrojen grubu barındırır. Bu yapısı ile diğer bifosfanatlardan ayrılır ve muhtemelen diğerlerinden farklı etkiye sahip olmasını bu yapıya borçludur. Beyaz bir kristal toz şeklinde olup molekül ağırlığı 290,1 gramdır. Suda ve sodyum hidroksit solüsyonlarında çözünbilme özelliğine sahiptir. Zoledronat infüzyon solüsyonu için üretilen flakon, 4.264 mg zoledronik aside eşdeğer inaktif bileşiğinde 4 mg zoledronat (anhidro), hacim yapıcı ajan, sodyum sitrat ve tamponlayıcı ajan içermektedir. Genel olarak bifosfonatlar için öngörülen osteoklast inhibisyonu ve dolayısı ile kemik rezorbsiyonu etkisi zoledronat için de geçerlidir (112).



Şekil 2-3: Zoledronat molekülünün şematik görünümü.

2.11.5.1. Endikasyonları: Zoledronat, 2001 yılında FDA tarafından onaylanmış olup primer olarak malignant hastalıkların yarattığı hiperkalsemini tedavisinde, multiple myeloma ve dokümanite edilmiş tümör metastazlarında standart antineoplastik tedaviyle birlikte kullanımı ve prostat kanserinde birden fazla hormonal terapi sonrasında devam eden hastalık durumundaki endikasyonu tanımlanmıştır (113). Bu onkolojik endikasyonlar dışında paget hastalığı ve postmenopozal osteoporoz tedavisinde kullanımı 2007 yılında FDA onayını almıştır. Onkolojik endikasyonlarda önerilen doz 4 haftada bir 4 mg zoledronatın 15 dk'lık intravenöz infüzyon yoluyla verilmesidir. Paget hastalığı ve postmenopozal osteoporozda önerilen zoledronat dozu ise yılda bir 15 dk'lık infüzyonla 5 mg şeklindedir (25).

2.11.5.2. Kontrendikasyonlar ve Uyarılar: Zoledronat; i.v. infüzyon için toz içeren flakon, zoledronat, diğer bifosfonatlar veya zoledronat formülasyonu içindeki yardımcı maddelerin herhangi birine karşı klinikte anlamlı aşırı duyarlılığı olanlarda kontrendikedir. Hastalar zoledronat uygulamasından önce yeterince hidrate olmaları açısından değerlendirilmelidirler. Zoledronat tedavisine başladıktan sonra, serum kalsiyum, fosfat ve magnezyum düzeyleri, serum kreatinin gibi standart hiperkalsemi ile ilişkili metabolik parametreler dikkatle izlenmelidir. Hipokalsemi, hipofosfatemi ya da hipomagnezemi oluşursa, kısa vadeli destek tedavisi gerekli olabilir. Bifosfonatların böbrek fonksiyon bozukluğu raporlarıyla ilişkisi vardır. Böbrek fonksiyonunda kötüleşme potansiyelini arttırabilecek faktörler, önceden mevcut böbrek bozukluğu ve 8 mg dozunda kronik olarak Zoledronat uygulanması ya da halen önerilmekte olandan daha kısa bir infüzyonun kullanılmasını içermektedir. Daha seyrek olsa da, önerilen dozlarda kronik zoledronat uygulaması yapılan bazı hastalarda serum kreatininde artış da ortaya çıkabilir. Zoledronat ile tedavi sırasında kişisel risk faktörleri de dikkate alınarak böbrek fonksiyonu uygun bir şekilde takip edilmeli ve böbrek fonksiyonunda

bozulma kanıtı gösteren hastalar, zoledronat ile tedaviye devam edilmesinin olası yararlarının, ortaya çıkabilecek riskleri aşıp aşmadığı da göz önüne alınarak uygun bir şekilde değerlendirilmelidir. Gebelik ve emzirme döneminde kullanımı açısından gebelik kategorisi D olarak bildirilmiştir (114).

2.11.5.3. Etkileşimler: Klinik çalışmalarda, yaygın olarak kullanılan anti-kanser ilaçlar, diüretikler, antibiyotikler ve analjezikler ile birlikte zoledronat uygulanmış ve klinikte belirgin herhangi bir etkileşmeye rastlanmamıştır. Zoledronat plazma proteinlerine in vitro belirgin bağlanma göstermez ve insan sitokrom P450 enzimlerini inhibe etmez, ancak resmi boyutta klinik etkileşme çalışmaları yapılmamıştır. Bifosfonatlar aminoglikozidler ile birlikte uygulandıklarında, her iki ilacın da aditif etkisinin olabileceği ve bunun sonucunda gerekenden daha uzun süre daha düşük serum kalsiyum düzeyi oluşabileceği göz önüne alınarak dikkatli olunmalıdır. Tedavi sırasında hipomagnezemi gelişme ihtimaline karşı da dikkatli olunmalıdır. Cam şişeler ile ve polivinilklorür, polietilen ve polipropilenden (önceden % 0.9 a/h (ağırlık/hacım) sodyum klorür çözeltisi veya % 5 a/h glukoz çözeltisi ile doldurulmuş) yapılan çeşitli tipte infüzyon torbaları ve infüzyon setleri ile yapılan çalışmalarda zoledronat ile bir geçimsizlik saptanmamıştır (114).

2.11.5.4. Etki Mekanizmaları: Zoledronat kemik döngüsü içerisinde osteoklastlar üzerinde çeşitli etkileşimler ile inhibisyon oluşturur. Osteoklast formasyonunu ve osteoklastların rezorpsiyon aktivitelerini inhibe eder (113). Osteoklastların apoptotik hücre ölümünü indüklemesi de ayrı bir mekanizmadır (115). Diğer bifosfonatlara benzer şekilde hidroksiapatite karşı yüksek afinitesi nedeniyle direk olarak mineralize kemiğe bağlanma yapar. Bu şekilde kemik rezorpsiyonu ile açığa çıkan bifosfonat, osteoklastları tekrar etkileyerek inhibisyon yapar (116). Zoledronat diğer azot içeren bifosfonatlara benzer şekilde mevalonat gidiş yolunu bozarak etki eder. Bunun sonucu olarak osteoklast aktiviteleri bozulur ve apoptozis meydana gelir (25, 113). Zoledronatın rol oynadığı ileri sürülen diğer etki mekanizmaları; osteoklast matürasyonunun inhibisyonu, osteoklastların rezorpsiyon bölgesine göç etmelerinin engellenmesi, sitokin üretiminin azalması, direk antitümör etkinliği (sitostatik-sitolitik etki) tümör hücrelerinin yayılmasının ve kemik matrikse adezyon yolu ile invazyonunun engellenmesi ve tümörlerde anti-anjiyojenik etki olarak sıralanabilir (117-120).

2.11.5.5. Zoledronatın Etkileri: Zoledronatın osteoklastların matürasyonu ve işlevi üzerinde direk etkisi olduğu invitro olarak gösterilmiştir. Rat kalvarya kültürlerinde, zoledronat

osteoklast matürasyonunu ve kemik yüzeyinde toplanmalarını inhibe etmiştir (117). Osteoklast matürasyonu, progenitör ve prekürsör hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını füzyonun takip edilmesi ve daha sonra kemik yüzeyinde monositik prekürsörlerin olgunlaşmasından ibaret bir süreçtir. Zoledronat ayrıca olgun osteoklastların işlevsel etkinliğini de baskılamaktadır. In vivo ve in vitro testler zoledronatın çeşitli uyaranlara yanıt olarak olgun osteoklastlar tarafından oluşturulan kemik rezorpsiyonunu diğer bifosfanatlara göre daha güçlü olarak inhibe ettiğini göstermiştir. Bu etki zoledronatta, pamidronata göre 850 kat daha fazladır (121). Fare kalvaryum kemik kültürü üzerinde yapılan in-vitro çalışmalarda ZA'nın diğer 5 bifosfonata göre vitamin D3 kaynaklı kalsiyum salınımını daha potent bir biçimde inhibe ettiği gözlenmiştir (122). Walter ve arkadaşları yaptıkları in vitro çalışmada zoledronatın fibroblast ve osteoblastların migrasyonunu anlamlı ölçüde azalttığını ve apoptozisi anlamlı ölçüde artırdığını rapor etmişlerdir (123). Benford ve arkadaşlarının osteoklast apoptozisi üzerinde yaptıkları in-vitro çalışmada azot içeren ve içermeyen bifosfonatların etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada tüm bifosfonatlar apoptozise neden olurken, zoledronatın diğerlerine oranla osteoklast apoptozisinin bir belirteci olan caspase-3 benzeri proteazların aktivasyonunu daha fazla artırdığı saptanmıştır (115). Fetal fare kalvaryum kemiğinden elde edilen hücre kültüründe zoledronatın osteoklast formasyonunu doza bağımlı olarak azalttığı bulunmuştur. Bununla birlikte osteoblast proliferasyonu ve DNA (deoksiribonükleik asit) sentezi üzerine yüksek konsantrasyonlara kadar etki göstermemiştir (122). Mevalonat gidiş yolunun engellenmesi üzerinde yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada eşit konsantrasyonlarda zoledronat ve risedronat protein frenilasyonunu total olarak inhibe ederken pamidronat kısmen etkilemiş, clodronate, etidronat ve tiludronat etki göstermemiştir (124). Pataki ve arkadaşlarının invivo çalışmasında, ratların zoledronat ile kısa dönem tedavisi, pamidronat ile karşılaştırılmış ve kortikal kemiği etkilemeden, trabeküler kemikte kalsiyum ve hidroksi prolin içeriği ile radyografik dansiteyi önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır (125). Overektomili ratlarda haftalık 1.5 µg/kg subkütan zoledronat enjeksiyonu lomber vertebranın dansitesini korumuş ve overektomi sonrası 52. haftada mekanik gücü sağlamıştır (126). ZA'nın tümör hücrelerinin kemik yüzeylerine ataçmanını ve meme ve prostat kanseri hücrelerinin kemiğe invazyonunu engellediği rapor edilmiştir (127). Tüm bifosfonat grubu ilaçlara oranla zoledronatın çok daha düşük konsantrasyonlarının prostat kanser hücresi gelişimini engellediği belirtilmektedir (113). Moschetta ve arkadaşları multiple myelomalı hastalar üzerinde yaptıkları araştırmada zoledronatın kemik iliği makrofajları üzerinde etkili olarak, onların hücre proliferasyonu,

migrasyonu ve salgıladıkları anjiojenik sitokinlerin inhibisyonuna neden olarak antianjiojenik ve antitümoral etki gösterdiklerini ortaya koymuştur (128). Naidu ve arkadaşları rat osteoblastlarını içeren kültür ortamında zoledronatın artan dozları ile beraber hücre canlılığının azaldığını rapor etmişlerdir (4).

Osteoporoz modelleri üzerinde zoledronatın kemik mineral yoğunluğu, kemik mimarisi ve dayanıklılığı ve biyokimyasal belirteçlere etkisinin araştırıldığı çalışmalar, zoledronatın kemik üzerine pozitif etkilerini göstermektedir. Overektomize sıçanlarda 52 hafta boyunca değişik dozlarda verilen zoledronatın tüm vücut, lomber spin ve femurdaki kemik kaybını doza bağımlı olarak engellediği tespit edilmiştir (126). Erişkin overektomize maymunlarda yapılan bir çalışmada 16 aylık zoledronat tedavisi sonunda kortikal kemik porozitesindeki artışın engellendiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte üriner belirteçler kemik yıkımının belirgin derecede düştüğünü, kemik yapımının arttığını göstermiştir (127).

2.11.6. Bifosfonatlarla İlgili Yan Tesirler: Bifosfonatların oral kullanımda ortak yan etkileri dispepsi, bulantı, kusma, mide ağrısı, diyare ve seyrek olarak ülserasyon yapmalarıdır. İntravenöz yoldan, hızlı infüze edilmeleri kanda agregat haline gelmelerine ve akut böbrek yetmezliğine neden olmuştur. Yüksek dozda ve özellikle i.v. verildiklerinde hafif hipokalsemi yapabilirler. Bifosfonatlarla birlikte aminoglikozit grubu antibiyotikler verilirse bu etki çok belirginleşir (90).

Bifosfonat kullanımına bağlı olarak sklerit, iridosiklit, orbital myozit ve uveit gibi yan etkiler de bildirilmiştir. Oluşan oftalmolojik komplikasyonların doza bağımlı olduğu ve böbrek fonksiyonları ile ilişkili olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir. (130-132)

Bifosfonat kullanımının atriye fibrilasyon (AF) geçirme riskini artırdığına dair bazı çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle özellikle AF gelişimi riski taşıyan hipertansif, diyabetik, kalp hastalığı ve ekokardiyografik anormalliklere sahip kadın hastalarda bifosfonat kullanımı ile AF riskinde bir artış olabileceği göz ardı edilmemeli, bu hastalar AF semptomları hakkında bilgilendirilmeli ve kontrollerinde bu muhtemel yan etki açısından da sorgulanmalıdırlar (133).

Etidronat günde 800 mg'ın üstündeki dozlarda uzun süre verilirse iskeletin mineralizasyonunu inhibe eder ve çocuklarda raşitizm ve erişkinlerde osteomalazi yapar. Paget hastaları bu etkiye daha duyarlıdır ve söz konusu etki onlarda günde 400 mg dozunda bile ortaya çıkar. Pamidronat ve diğer aminobifosfonatlar i.v. verildikten sonra geçici hiperpireksi ve lenfopeni yapabilirler; bu etki etidronat ve klodronat ile olmaz. Etidronat,

tübüler fosfat reabsorbsiyonunu artırarak plazmanın fosfat düzeyini yükseltebilir ve i.v. verildiklerinde ağızda metalik bir tat oluşturabilirler (90).

Bifosfonat kullanımı, gastrointestinal sistemde özellikle özafagusta mukoza hasarına neden olmaktadır. Çeşitli endoskopik çalışmalarda bifosfonatların neden olduğu gastrik ve duodenal ülserler rapor edilmiştir (134). Hayvan modeli ile gerçekleştirilen çalışmalarda oral bifosfonat kullanımının neden olduğu mukozal hasarın yüzey teması nedeniyle gerçekleştiği belirtilmiş ve i.v. kullanımı takiben mukozal hasar gözlenmediği rapor edilmiştir. İlgili mukozal hasarın mevcut hidrofobik fosfolipid bariyerin zayıflaması sonucu olduğu belirtilmiştir (135, 136).

Bu yan etkilerin yanısıra bifosfonatlara bağlı olarak maksillofasiyal bölgeye özgü yan etkiler mevcuttur. Phossyjaw ilk kez 19. yüzyıl ortalarında kibrit sanayinde çalışan işçilerde gözlenen olağan dışı çene nekrozları sonrası tanımlanmıştır (137). Lorinser bu vakaları ilk olarak 1845 te rapor etmiştir (138). Bu işçiler diş ağrısı ve çekim sonrasında iyileşmeyen soketler, sekestrizasyon ve yumuşak doku enfeksiyonlarından dolayı problem yaşamaktaydı ve bu durumun beyaz fosfor buharının inhalasyonu nedeniyle geliştiği düşünülmektedir. Phossyjaw endüstride hijyenik koşulların ve havalandırma sistemlerinin geliştirilmesi ile azalarak elimine edildi (2).

Günümüzde de bifosfonat kullanımına bağlı ve yakın zamanda ortaya çıkmış olan bifosfonatlarla ilgili çene osteonekrozları (BRONJ) giderek artan vaka sayısı ile dikkat çeken ve üzerinde bir çok araştırma yapılan bir konu haline gelmiştir.

2.11.7. Bifosfonatlarla İlgili Çene Osteonekrozları:

Bifosfonata bağlı çene kemiği nekrozu ya da osteomyeliti ilk kez 2003'te Marx ve Stern tarafından bildirilmiştir (139). BRONJ; bifosfonat tedavisi görmüş veya görmekte olan ve çeneler bölgesinde radyoterapi (RT) hikayesi bulunmayan hastada maksilla ya da mandibulada 8 haftadan uzun süredir var olan ekpoze kemik durumunu açıklamak için kullanılan bir terimdir (Şekil 2-4) (140). BRONJ sadece çenelerde rapor edilmiş bir durumdur ve tüm dünyada rapor edilen vaka sayısı artarak devam etmektedir (141-143).

BRONJ oluşumunun patogenezi hakkında çeşitli görüşler ileri sürülmüştür ancak bu konu halen tam olarak aydınlatılamamıştır. BRONJ patogenezi konusunda ortak görüşlerin başında bu yeni fenomenin multifaktöryel bir olgu olduğu düşüncesi gelmektedir. Bifosfonatların yüksek dozda kullanılmaları hem osteoblastlar hem de osteoklastlarda

sitotoksik etkilere sebep olur ve buna bağı olarak kemik yenilenme mekanizması bozulur. Kemikte yenilenmenin azalması nekroz riskini artırmaktadır. Bunun yanında yine bifosfonatların kan akımını azalttıkları, antianjiojenik özellik gösterdikleri ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünü (VEGF) azalttıkları çeşitli çalışmalarda gösterilmiş ve oluşan değişimlerin sürece katkı sağladığı düşünülmüştür (104-144). Çene kemiklerinde biriken bifosfonat miktarının oral epitel üzerinde toksik etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu sitotoksik etkinin yumuşak dokuda dehisens oluşturduğu ve oluşan boşluktan kemiğin uzun süre bakteri invazyonuna açık hale geldiği ileri sürülmüştür (145,146).

Osteomyelit ya da osteonekrozun sadece çenelerde görülmesi hakkında birçok yorum yapılmıştır. Oral kavitenin geniş bir mikrofloraya sahip olması, oral kavitede asla aseptik bir ortam oluşturulamaması ve travmaya yatkın olması çene kemiklerinde osteonekroz oluşma riskini artırdığı ileri sürülmektedir ayrıca tüm iskelet sisteminden farklı olarak çene kemikleri dişler aracılığı ile sürekli dış çevreyle ilişkidir (92).



Şekil 2-4: Mandibula posterior bölgede oluşan BRONJ vakası.

Dixon ve ark. (147) alveolar krestin tibiadan 10 kat daha yüksek remodelling hızına sahip olduğunu, mandibular kanal seviyesinde 5 kat, mandibula inferior border seviyesinde ise 3.5 kat daha yüksek remodelling hızı olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun sonucunda

çenelerin alveolar kemiği daha yüksek oranda BP alımı yapar ve daha yüksek konsantrasyonda birikim sağlanmış olur. Bu durumda diş çekimi gibi bir travma sonrasında alveolar kemik osteoklastik kemik rezorbsiyonunu takiben yeni kemik oluşumu mekanizmasını gerçekleştiremez ve nekrotik hale gelir. Kemiğin üzerini kaplayan mukoza kan desteğini kaybederek yıkılır ve böylece klinik olarak tespit edilen ekspoze kemik meydana gelir.

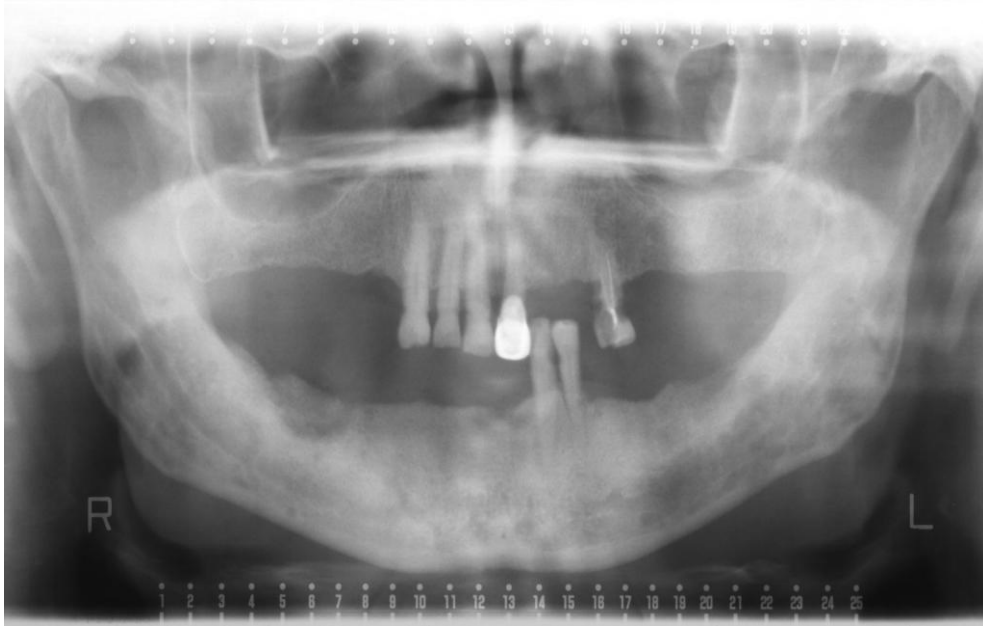
Lehrer ve ark. (148) BRONJ' un genetik mutasyona bağlı olarak oluştuğu hipotezini savunmuşlardır. Matriks metalloproteinaz ailesinden matriks metalloproteinaz-2 genindeki mutasyonun bifosfonatların oluşturduğu osteonekrozlarla ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Arduino ve ark. (149) gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda VEGF polimorfizminin ve haplotiplerinin BRONJ oluşumu açısından bir risk faktörü olduğunu rapor etmişlerdir. Sarasquete ve ark. (150) gerçekleştirdikleri derlemede BRONJ oluşumuna neden olabilecek genetik faktör olarak CYP2C8 genindeki polimorfizme işaret etmişlerdir.

BRONJ gelişimi açısından risk faktörleride göz önünde bulundurulması gereken bir konudur. Bunlar ilaçla ilişkili, lokal, demografik ve sistemik faktörler olarak sınıflandırılabilir (8). İlaçla ilişkili faktörler tedavinin süresi ve ilacın potansiyel derecesidir (8,151,152). Marx ve ark. (140) çalışmalarında uzun kullanım süresi ve iv. uygulamaların riski yükselttiğini belirtmişlerdir. Önceleri BRONJ vakalarının sadece nitrojen içeren bifosfonatlarda oluştuğu düşünülmüş fakat daha sonra nitrojen içermeyen bifosfonatlara bağlı oluşan BRONJ vakaları da gösterilmiştir (7,152,153). Lokal risk faktörleri AAOMS (Amerikan Ağız-Çene-Yüz Cerrahisi Birliği Derneği) tarafından (8) dentoalveolar cerrahi, lokal anatomi, eşlik eden diğer oral hastalıklar olarak belirtilmiştir. İntravenöz yoldan BP kullanan hastalarda uygulanan dentoalveolar cerrahi ; BRONJ riskini dentoalveolar cerrahi uygulanmayanlara oranla en az 7 kat arttırmaktadır (8,152,155). Anatomik açıdan mandibular lingual torus, mylohyoid çıkıntı ve palatinal torus en riskli bölgelerdir (8). AAOMS (8) lezyonların mandibulada maksillaya göre 2:1 oranında daha fazla görüldüğünü rapor etmiştir. Ayrıca eşlik eden periapikal veya periodontal problemler de önemli risk faktörleridir. Demografik ve sistemik faktörler yaş, kanser tanısı, ırk, kanser tanısına eşlik eden osteopeni olarak belirlenmiştir.

BRONJ'un ayırıcı tanısı açısından; çene kemiği metastazları, multiple myeloma, osteoradyonekroz, osteomyelit gibi olgular göz önünde bulundurulmalıdır. Bifosfonata bağlı osteonekroz olduğu düşünülen klinik tablo kemikteki metastazı gizleyebilir ya da hem osteonekroz hem metastaz birarada görülebilir (156).

BRONJ'un klinik bulguları arasında: devital, ekspoze kemik yüzeyi, spontan ağrı, dişlerde hassasiyet, mukozada ülserasyon, dişeti ve kemikte inflamasyonun tüm bulguları, trismus, halitozis, deride fistül, parestezi, aktinomiçes enfeksiyonu, maksiller sinüzit veya oroantral fistüller gibi spesifik olmayan bulgular yer alabilir (92).

BRONJ vakalarında görüntüleme yöntemi olarak panoramik ve periapikal grafiiler rutin olarak kullanılmaktadır. Radyografi BRONJ ve metastatik osteoblastik lezyonları tam olarak ayırt edemez, fakat osteolizis ve osteoskleroz bileşimi varlığında kullanışlıdır. Panoramik grafi, lokal kemik alanlarının dansitesinin artmasına yol açan kemik iliği fibrozisi ve periosteal kalınlaşma ile birlikte süngerimsi kemik oluşumunu tespit eder. Tipik olarak nekrotik kemik medüller kavitenin içinde veya iltihabi doku içinde sekestrum yerleşmesi ile karakterizedir (Şekil 2-5). Panoramik grafinin dezavantajı, sınırlı-iki boyutlu görüntü içermesidir. Bundan başka erken dönem lezyonların atlanabilmesi ile sonuçlanan görüntü kalitesinin nekrotik ve sağlıklı kemik arasındaki sınırı ayırmada zorluk oluşturabilmesidir. Bununla birlikte konsensüs rutin radyolojik araştırmanın bir parçası olarak konvansiyonel radyografilerin ilk olarak kullanılmasını önerir (157).



Şekil 2-5: Mandibuler posterior bölgede oluşan BRONJ vakasında panoramik görüntü.

Bilgisayarlı tomografi (BT) BRONJ hastalarında hastalığın evresine dayanarak osteolitik ve osteosklerotik bölgelerin teşhisinde kullanılır. Daha yoğun kemik nekrotik

alanları pü ve yumuşak doku ödemi ile birlikte enfekte alanları temsil eder. Malign metastatik osteoliz ile benign osteolizin ayırıcı tanısı BT ile zor olabilmektedir. Bunların dışında kemik sintigrafileri ve kontrastlı MRI gibi teknikler de BRONJ'un değerlendirilmesi ve erken tanısında kullanılmaktadır (157,158).

Marx ve ark. (159) BRONJ riskinin kemik döngüsü belirteçleri kullanılarak tahmin edilmesine yönelik yaptıkları çalışmada oral bifosfonat kullanan ve BRONJ gelişen 30 hastayı değerlendirmiştir. Çalışmada hastaların serum CTx seviyeleri takibe alınmış ve BRONJ semptomları ve hikayesi ile ilişkisi incelenmiştir. Yazarlar çalışmanın sonucu olarak CTx seviyesinin 100 pg/ml'nin altına düştüğünde yüksek risk, 100–150 pg/ml seviyesinin orta derecede risk ve 150 pg/ml'nin üzerinin düşük BRONJ riskine sahip olduğunu belirtmektedir.

BRONJ vakalarının histolojik yapısı incelendiğinde kemik iliğinde fibrozisle birlikte akut-kronik inflamatuvar hücreler, plazma hücreleri ve çeşitli fungal-bakteriyel mikroorganizma kolonizasyonları görülmektedir (92). Mikrobiyolojik ve patolojik incelemelerde nekrotik alanlarda yüksek aktinomiçes oranları göze çarparken, genel olarak yumuşak ve sert dokularda şiddetliden kronik enfeksiyona kadar değişen bakteriyel kolonizasyonlar izlenmektedir (141).

Genel olarak intravenöz bifosfonat kullanan hastalarda BRONJ insidansının %0,8–12 arasında değiştiği rapor edilmiştir (8). Durie ve ark. (160) internet tabanlı araştırmalarında meme kanseri ve multiple myeloma hastalarından oluşan 1203 hasta değerlendirilmiş, meme kanserli 299 hastadan 13'ünde BRONJ tespit edilirken 904 multiple myelom hastasından 62'sinde BRONJ saptanmıştır. Aynı çalışmada ZA kullanan 211 hastanın %10'unda BRONJ görülürken pamidronat kullanan 413 hastanın %4'ünde BRONJ ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada multiple myeloma hastalarının %9,9'unda, meme kanseri hastalarının %2,9'unda, prostat kanseri hastalarının %6,5'inde BRONJ ortaya çıkmıştır (151). Her iki çalışmada da ZA kullananlarda ilk BRONJ belirtilerinin pamidronat grubuna göre daha erken görülmeye başlandığı belirtilmektedir. Wang ve ark. (161) çalışmalarında meme kanseri hastalarında %2,5, multiple myelomada %3,8 ve prostat kanseri hastalarında %2,9 oranında BRONJ insidansı saptamışlardır. Hoff ve ark. (162) intravenöz bifosfonat tedavisi gören 1338 göğüs kanseri vakasında 16 (%1), ve 548 multiple myeloma hastasında 13 (%2) hastada BRONJ gözlediklerini rapor etmişlerdir. Bifosfonat üreticilerine sunulan spontan BRONJ raporları yaklaşık 1/100.000 hasta / yıl olgu bildirim oranı göstermektedir (163). Mavrokki ve ark. osteoporoz hastaları arasında BRONJ görülme oranını % 0.01-0.04 olarak belirtmişlerdir (164).

AAOMS yayınladığı raporla BRONJ hastalarını evrelemiş ve buna göre tedavi stratejileri önermiştir. Görülen ekspozite kemik olmayan ve bifosfonat kullanan hastaları risk altında olan hastalar olarak nitelendirmişlerdir. Diğer evreler ise şu şekilde değerlendirilmiştir:

Evre 0:

- Klinik olarak tespit edilen nekrotik kemik yok
- Non-spesifik semptomlar mevcut

Bu semptomlar;

- Odontojenik bir neden olmadan dental ağrı
- TME bölgesine de yansıyan künt kemik ağrısı
- Sinüs duvarının enflamasyona bağlı kalınlığının azalmasıyla sinüs ağrısı
- Duyusal sinirlerde zedelenme.

Klinik bulgular;

- Kronik periodontal bir hastalık bulunmadan diş kaybı
- Pulpal neden ya da çürük bulunmadan periodontal/periapikal fistül

Radyolojik bulgular;

- Alveol kemiğinde kronik periodontitis olmaksızın kemik kaybı
- Yoğun trabeküler kemik ve remodele olamamış persiste çekim soketleri
- Lamina duranın daralması
- İnferior alveolar kanalın daralması
- MRI; kemik iliğindeki değişimler takip edilebilir.
- Nükleer kemik tomografisi; fosfor32 / Teknetyum 99m (Tc99m) ile osteoblastik aktivite ve iskeletsel vaskülarite incelenebilir
- Tc99m - sestamibi ile tümör infiltrasyonu sebebiyle litik görüntü veren ve BRONJ olan doku ayırdedilebilir.
- Pet-Scan: metabolik ve morfolojik imaj elde ederek, hipermetabolizma olan alanları tespit eder.

Evre 0 için açıklanan bu bulgular daha önce Evre 1-2-3 düzeyinde BRONJ'a maruz kalmış ve iyileşmiş, mevcut ekspoze kemiği olmayan hastalarda da görülebilir.

Evre 1: Asemptomatik ve enfeksiyon belirtisi olmadan ekpoze kemik

Evre 2 : Ağrı ve enfeksiyon gözlenen ekpoze ve nekroz kemik

Evre 3: Ekspoze, nekroz kemik ve aşağıdakilerden biri ya da birkaçı gözlemleniyorsa

- Ekspoze alanın alveol kemiğini aştığı (zygoma, inferior border vs)
- Patolojik fraktür
- Ekstraoral fistül
- Oro antral / oro nazal açıklık
- Osteolizis varlığı

TEDAVİ SEÇENEKLERİ

- Risk grubu: Oral hijyen eğitimi, sık kontroller ve geri çağırımlar
- Evre 0: Semptomatik tedavi
- Evre1 : Klorhexidin %0.12, cerrahi uygulanmamalı
- Evre 2: Antibiyotik + oral gargara
- Actinomyces sık rastlanan bir mikroorganizmadır.
- İzole edilen mikroorganizmaların büyük çoğunluğu penisiline duyarlıdır.
- Gerekli ise kombine antibiyotik kullanılabilir.
- Evre-3: Debridman, rezeksiyon, antibiyotik terapisi, uzun dönem palyatif tedavi, akut enfeksiyon ve ağrının tedavisi

Bifosfonatlar ile tedaviden önce, hastanın dikkatli bir intraoral muayeneden geçirilmesi, tedavisi mümkün olmayan dişlerin çekimi, invaziv dental girişimlerin tamamlanması ve optimal periodontal sağlığın elde edilmiş olması önerilmektedir (AAOMS). Hastalar durum hakkında bilgilendirilmelidir. Radyoterapi veya kemoterapi görecektir olan hastalardaki protokol bu hastalarda da kullanılmalıdır. Diş hekimi ya da oral maksillofasiyal cerrahlar ile medikal onkolog arasında multidisipliner yaklaşım sağlanmalıdır. Ayrıca, oral cerrahinin bir çok vakada BRONJ gelişimine neden olması dolayısıyla bifosfonat kullanımı hikayesi bulunan hastalarda diş çekimi haricindeki alternatif tedavilerin tercih edilmesi daha uygun

olacaktır (165). Restoratif işlemler diş çürüğünü ve sorunlu tedavileri giderecek şekilde olmalıdır. Kronlar ve geniş kapsamlı sabit protetik tedaviler bazı hastalarda uygun olmayabilir. Protezler retansiyon, stabilite ve oklüzyon açısından değerlendirilmelidir. Gerekli düzenlemeler yapılmalıdır (166). Tam ya da kısmi dişsiz hastalarda protezlerin mukozaya yaptığı basınç minimize edilmelidir. Protezlerin yumuşak astar malzemesi ile astarlanarak yumuşak doku travmasının azaltılması bu konuda yardımcı olacaktır (167).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları:

Bu çalışma için Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır. Çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edilen ratlar yine aynı merkez bünyesinde barındırılarak yürütülmüştür. Çalışmada 30 adet, dişi, 12 haftalık Sprague-Dawley (Ağırlık 190 ± 20 gr) rat kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hayvanlar, veteriner hekim tarafından genel sağlık durumları yönünden kontrol edilerek ve menstrual siklusları senkronize edilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Ratlar oda sıcaklığı sabit ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 12 saatlik gece ve gündüz döngüsü mevcut, serbest şekilde su ve yeme ulaşabilecekleri ortamda tutulmuşlardır. Ratlar çalışma süreci boyunca günlük olarak cilt değişiklikleri, apse formasyonu, enfeksiyon, genel güçsüzlük, gıda ve su alımı gibi kriterler yönünden değerlendirilmiştir. Diürenal değişimleri en aza indirmek üzere çalışma saat 9:00 ile 16:00 saatleri arasında yürütülmüştür.

3.2. Gruplar ve İlaç Uygulamaları:

Kullanılan hayvanlar randomize olarak herbiri 10 adet rat içeren 3 gruba ayrılmıştır. Birinci grup (K1) ilk kontrol grubu olarak kullanılmıştır ve 10 haftalık çalışma süreci boyunca herhangi bir enjeksiyona tabi tutulmamıştır. İkinci gruba (S1) ilaç uygulanan grup hacmince izotonik tuz solusyonu (SF) enjeksiyonu 10 haftalık çalışma periyodunca uygulanmıştır. Üçüncü grup (Z1); çalışma grubu, 10 hafta süre ile 0.1 mg/kg dozunda zoledronat enjeksiyonu yapılan gruptur. Zoledronat enjeksiyonları: $0,5 \text{ cc}$ Zometa® (4 mg flakon, Novartis) ile $9,5 \text{ cc}$ SF ile hazırlanan solüsyon ile yapılmıştır. Enjeksiyonlar haftada 3 kez ve intraperitoneal olarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonlarda 1 ml hacimli insülin enjektörleri kullanılmıştır. Her enjeksiyon öncesi ratlar tartılarak, karşılık gelen hacimde enjeksiyon yapılmıştır. Tüm enjeksiyonlar aynı uygulayıcı tarafından hangi preperatın enjeksiyonunu yaptığını bilmeden gerçekleştirilmiştir. 10 haftalık çalışma periyodu boyunca zoledronatın

izole etkilerini gözlemek üzere ratlara herhangi bir cerrahi ya da dental uygulama yapılmamıştır. Çalışma süresince herhangi bir rat kaybı olmamıştır. Son enjeksiyonun yapılmasının ardından ratların sakrifikasyonları için bir hafta beklenmiştir. Daha sonra ratların intraperitoneal olarak uygulanan ketamine/xylazine enjeksiyonu ile anestezipleri sağlanmış ve sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyonlar sonrası cerrahi el aletleri yardımıyla ratların mandibulaları ve tibiaları örnek hazırlamak amacıyla diseke edilmiştir. Diseksiyon sonrası cerrahi testere yardımıyla mandibula sağ posterior bölgede 1. ve 2. molar dişleri içeren segment ve sağ tibianın 1/3 üst bölgesi çıkarılmış ve biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80°C 'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3-1,2).



Şekil 3-1: ELISA testleri için hazırlanan mandibuler posterior kemik segmenti.

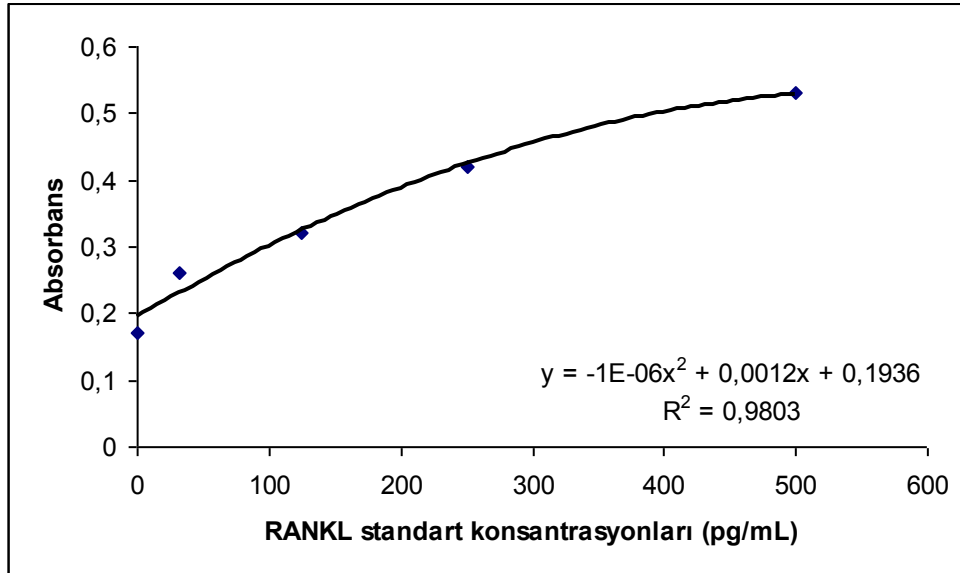


Şekil 3-2: ELISA testleri için hazırlanan tibia kemik segmenti.

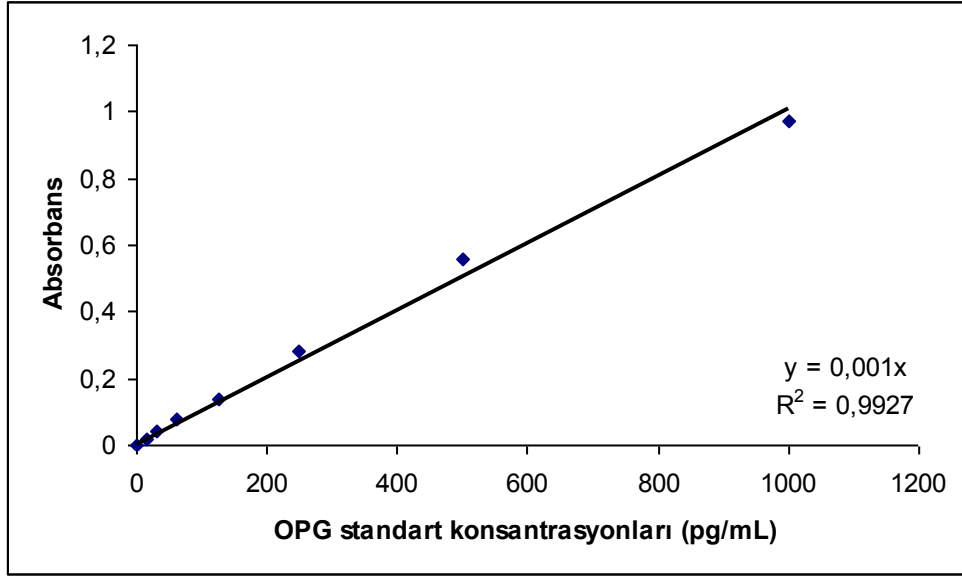
3.3. Biyokimyasal Analizler:

Bütün dokular pH 7,4 olan ve proteaz inhibitörleri (aprotinin 2 µg/ ml, löpeptin 5 µg/ml, pepstatin 0,7 µg/ml ve PMSF 100 µg/ml) içeren fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi içinde homojenizatör (Ultraturux-T18) kullanılarak parçalandı (homojenize edildi). Homojenatlar 5 dakika 4°C de santrifüj edildi. Süpernatant maddeler daha önceden soğutulan ependorf tüplere koyuldu ve son olarak Triton X-100 % 0,01 konsantrasyonunda eklendi. Örnekler yeniden 5 dakika 4°C de santrifüj edildi.

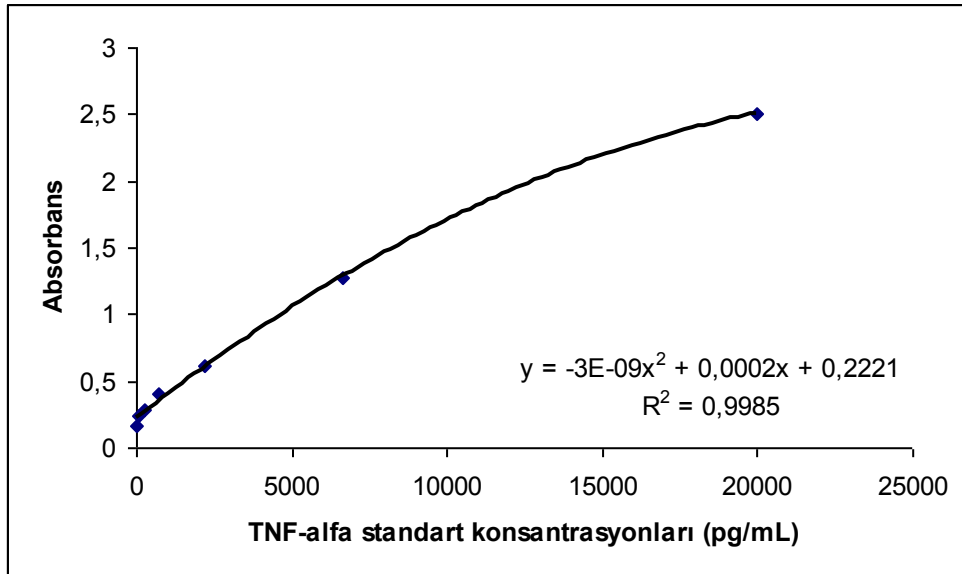
RANKL değerleri; Uscn Life Inc. (Katolog: E0855Ra, Wuhan, China) rat ELISA kiti ile, Osteoprotegerin değerleri; Uscn Life Inc.(Katolog: E0108Ra, Wuhan, China) rat ELISA kiti ile, TNF-α değerleri; Ray-Bio Tech. Inc. (Katolog: ELR-TNF alpha-001) rat ELISA kiti ile, IL-6 değerleri; Bender MedSystems (Ref: BMS625 Vienna, Austria) IL-8 değerleri; Cusabio Biotech. Co. Ltd. (Katolog: CSB-E07273r, Wuhan, China) rat ELISA kiti ile üretici talimatlarına uyularak standart grafikler oluşturulduktan sonra pg/mg protein olarak hesaplandı (Şekil 3- 3-7).



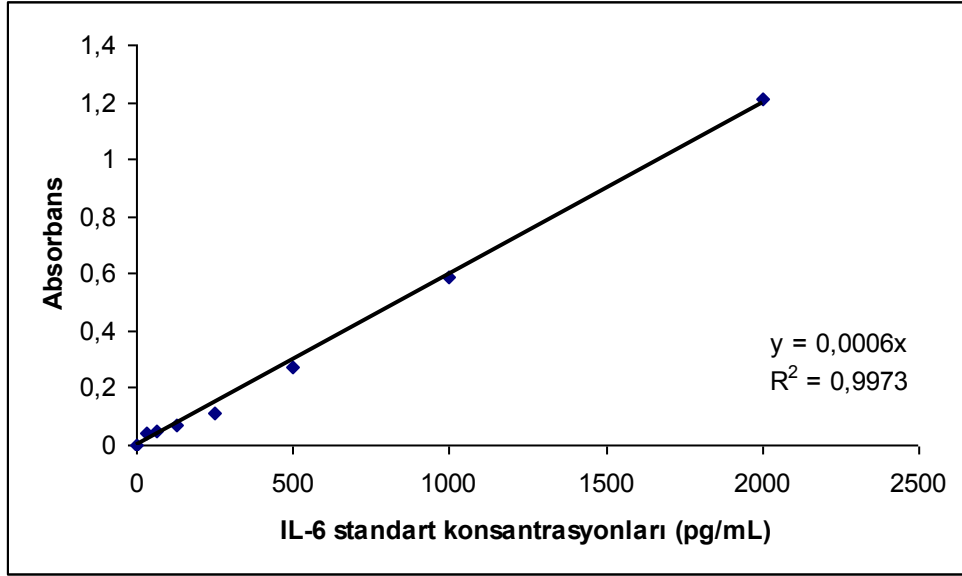
Şekil 3-4: RANKL standart konsantrasyonları.



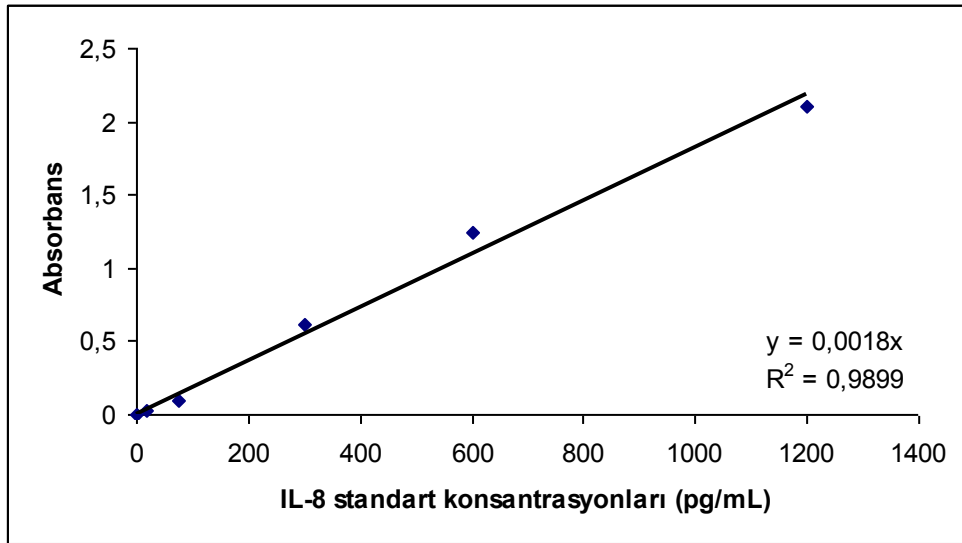
Şekil 3-3: Osteoprotegerin standart konsantrasyonları.



Şekil 3-5: TNF- α standart konsantrasyonları .



Şekil 3-6: IL-6 standart konsantrasyonları



Şekil 3-7: IL-8 standart konsantrasyonları.

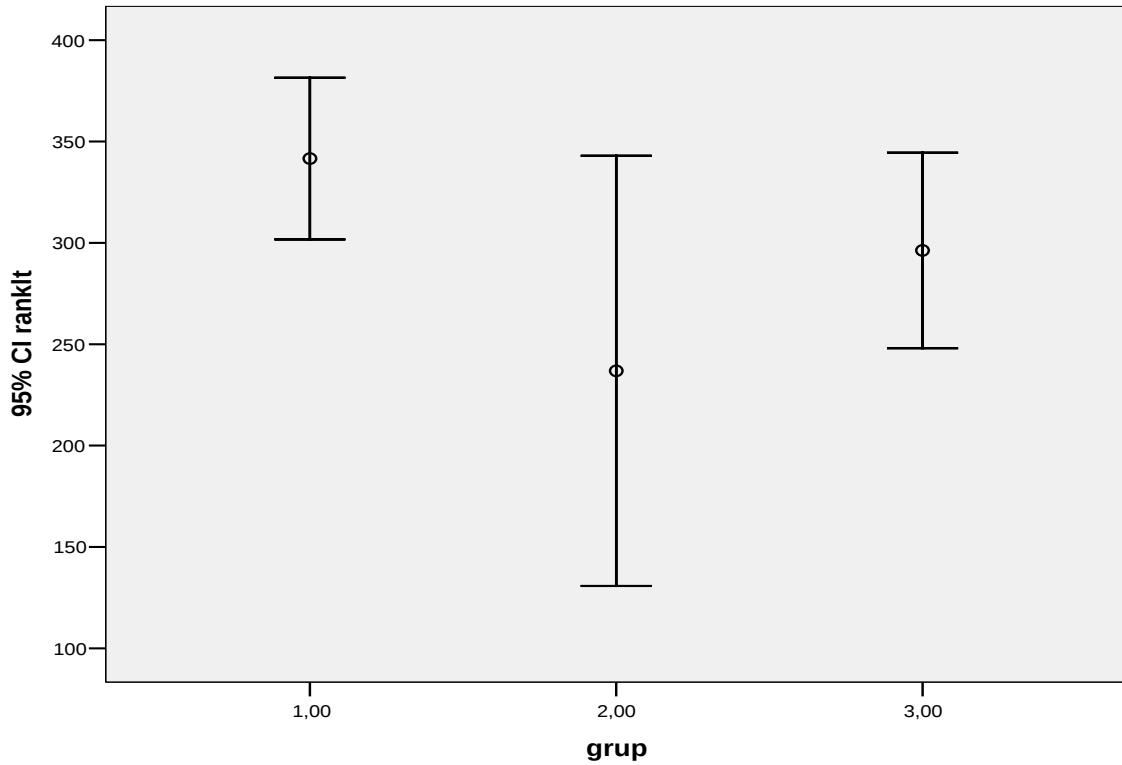
3.4. İstatistiksel Yöntem:

RANKL, OPG, TNF- α , IL-6, IL-8 parametrelerine ait değişkenlerle ilgili tanımlayıcı değerler saptanmıştır. Gruplar arası genel karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi ve gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak değerlendirilmiştir.

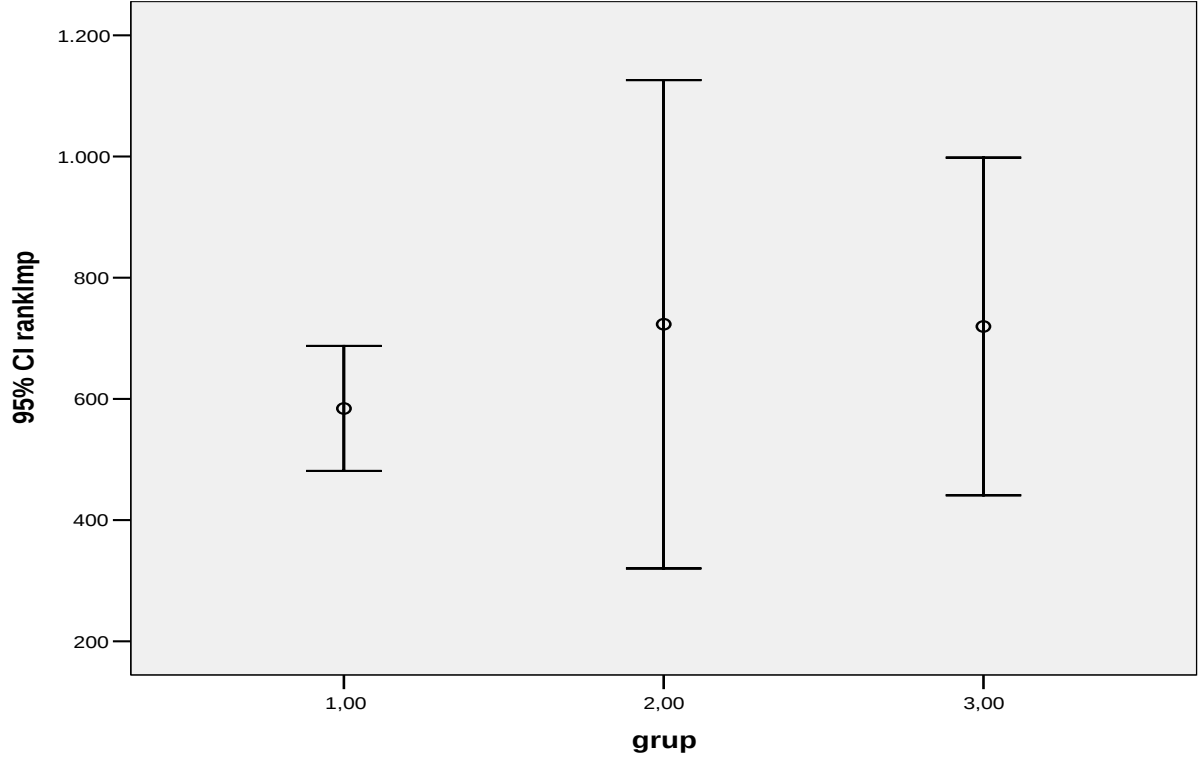
4. BULGULAR

4.1. RANKL Bulguları:

RANKL ile ilgili ortalama, standart sapma, en büyük ve en küçük değerler hesaplandı (Tablo 4-1). Tibia RANKL değerleri Z1 grubunda her iki kontrol grubuna göre artarken, Mandibula RANKL değerleri her iki kontrol grubuna göre azalmaktadır ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tibia RANKL değerleri için $p=0,055$; Mandibula RANKL değerleri için $p=0,44$ olarak bulunmuştur (Grafik 4-1,2).



Grafik 4-1: RANKL Tibia Değerleri Grafiği(Grup 1: Z1, Grup 2: K1, Grup 3: S1)



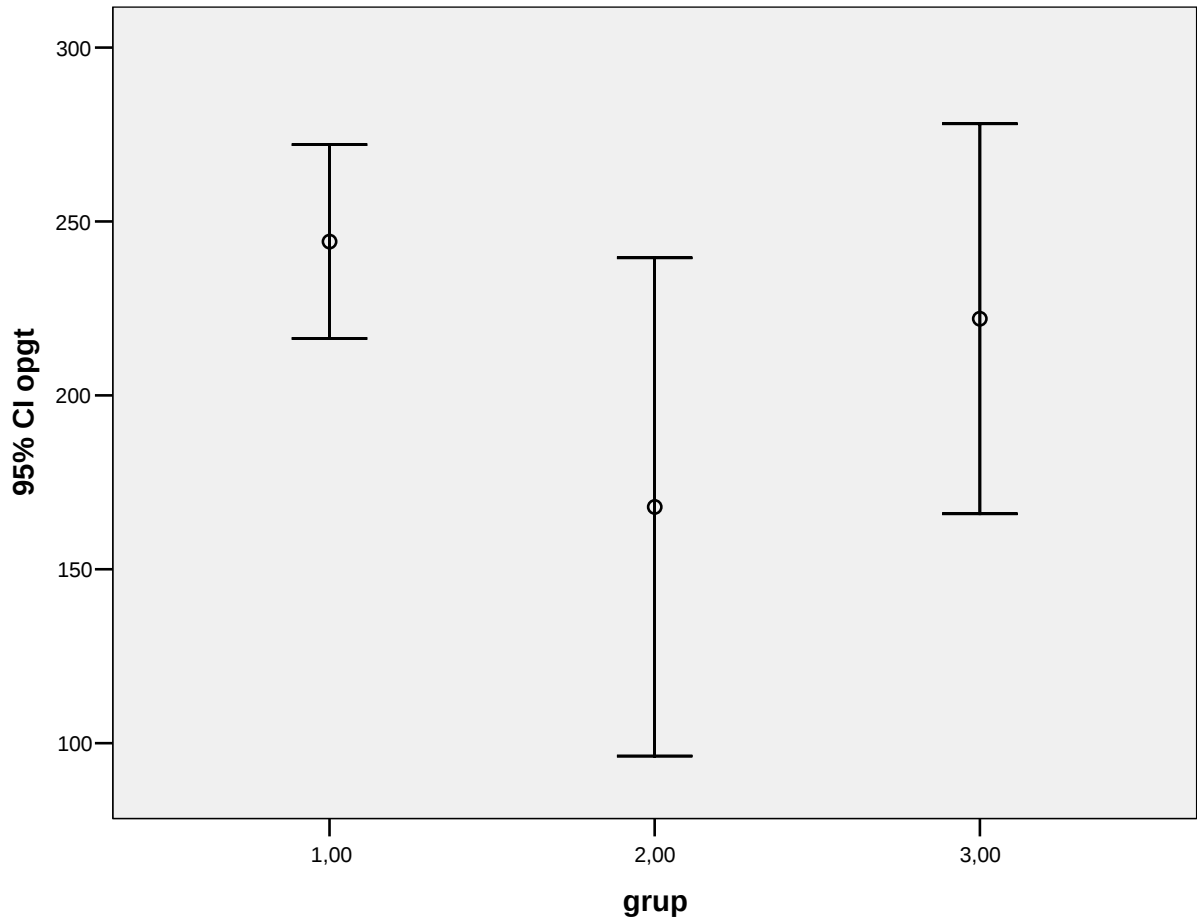
Grafik 4-1: RANKL Mandibula Değerleri Grafiği(Grup 1: Z1, Grup 2: K1, Grup 3: S1)

Tablo 4-1: RANKL Mandibula ve Tibia Değerleri

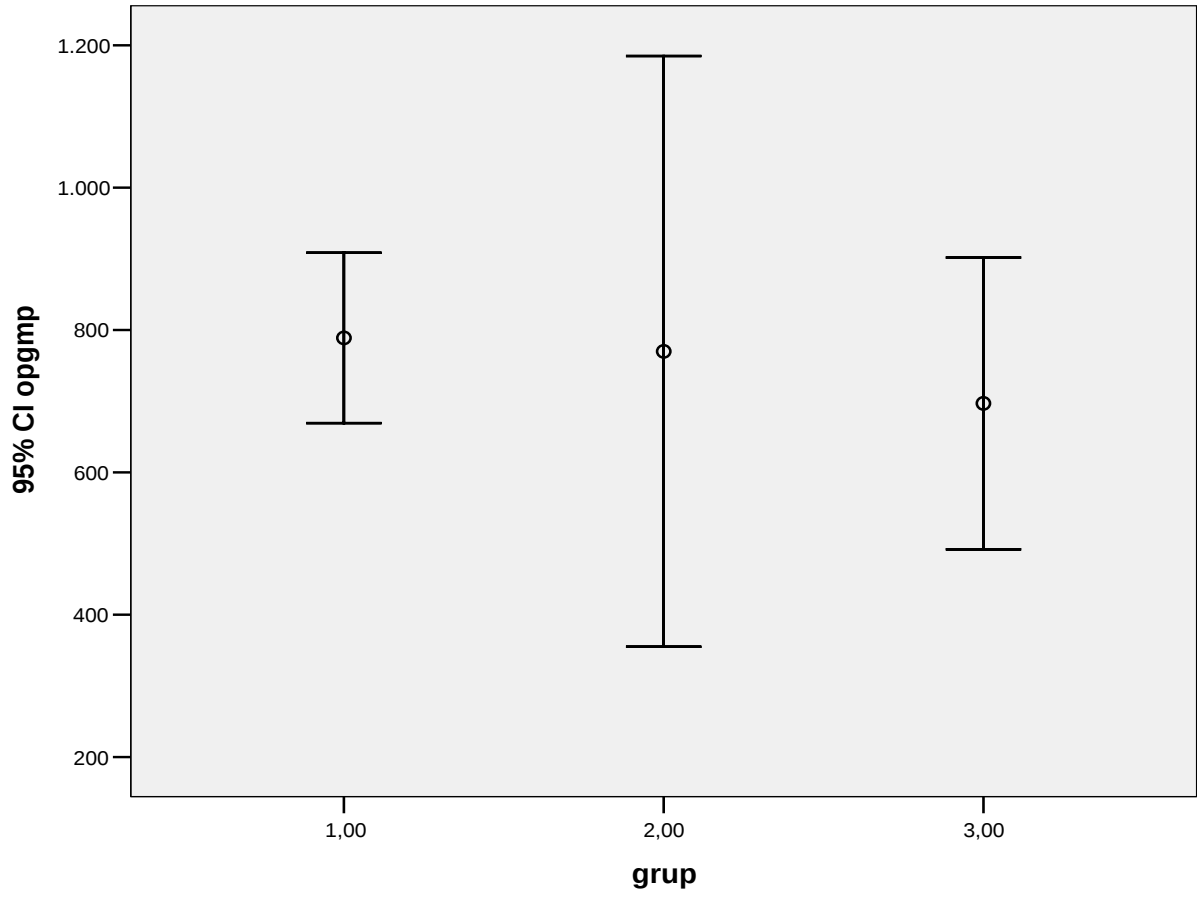
GRUPLAR	MAND. Min.	MAND. Max.	MAND. Ort.	MAND. SS	TIBIA Min.	TIBIA Max	TIBIA Ort.	TIBIA SS
Z1	365,79	821,52	584,15	144,17	206,85	412,47	341,58	55,75
K1	388,91	1134,24	723,21	324,53	177,21	386,60	236,86	85,48
S1	454,92	1045,43	719,47	224,41	254,77	352,20	296,25	38,84

4.2. Osteoprotegerin Bulguları:

Osteoprotegerin ile ilgili ortalama, standart sapma, en büyük ve en küçük değerler hesaplandı (Tablo 4-2). Mandibula OPG değerleri her iki kontrol grubuna göre artarken bu artış istatistiksel olarak $p=0,74$ ile anlamlı bulunmamıştır. Tibia OPG değerleri her iki gruba göre $p=0,045$ ile anlamlı olarak artmış olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırmalarda Z1 grubu ile K1 grubu arasında $p=0,037$ ile anlamlı fark bulunurken diğer ikili karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunmamıştır (Grafik 4-3,4).



Grafik 4-3: Osteoprotegerin Tibia Değerleri Grafiği(Grup 1: Z1, Grup 2: K1, Grup 3: S1)



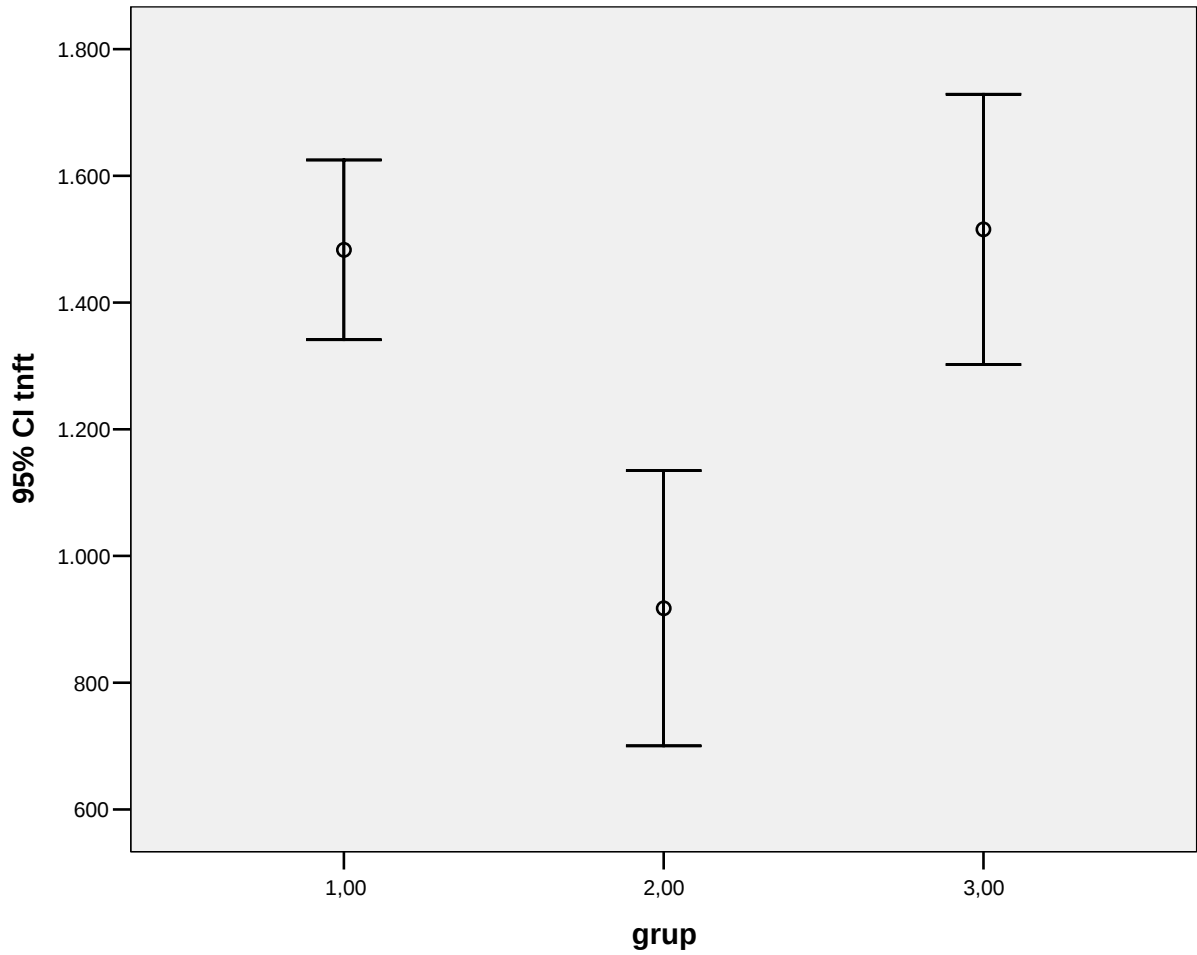
Grafik 4-4: OPG Mandibula Değerleri Grafiği(Grup 1: Z1, Grup 2: K1, Grup 3: S1)

Tablo 4-2: Osteoprotegerin Mandibula ve Tibia Değerleri

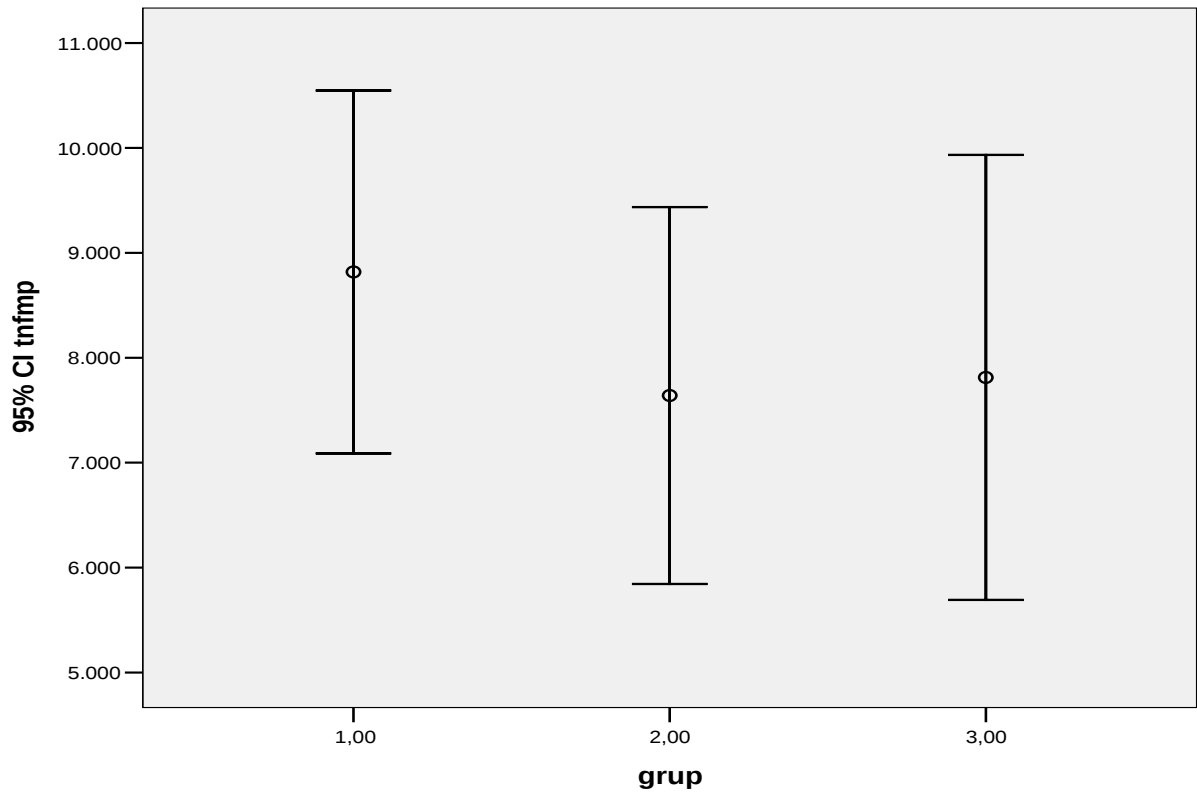
GRUPLAR	MAND. Min.	MAND. Max.	MAND. Ort.	MAND. SS	TIBIA Min.	TIBIA Max.	TIBIA Ort.	TIBIA SS
Z1	582,27	1163,84	788,86	167,23	213,94	329,20	244,23	38,95
K1	504,42	1101,56	769,93	260,82	117,49	263,44	167,91	57,69
S1	517,06	870,68	696,79	165,12	179,49	295,39	222,03	45,15

3.5. TNF- α Bulguları:

TNF- α ile ilgili ortalama, standart sapma, en büyük ve en küçük değerler hesaplandı (Tablo 4-3). TNF- α mandibula değerleri arasında $p=0,57$ ile anlamlı bir fark bulunmamıştır. TNF- α tibia değerleri arasında $p=0,005$ ile anlamlı fark bulunmuştur. Yapılan ikili karşılaştırmalarda $p=0,002$ ile Z1 grubu ve $p=0,009$ ile S1 grubu; K1 grubundan anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Z1 ve S1 grubu arasında ise $p= 0.713$ ile anlamlı bir fark bulunmamıştır (Grafik 4-5,6).



Grafik 4-5: TNF- α Tibia Değerleri Grafiği (Grup 1: Z1, Grup 2: K1, Grup 3: S1)



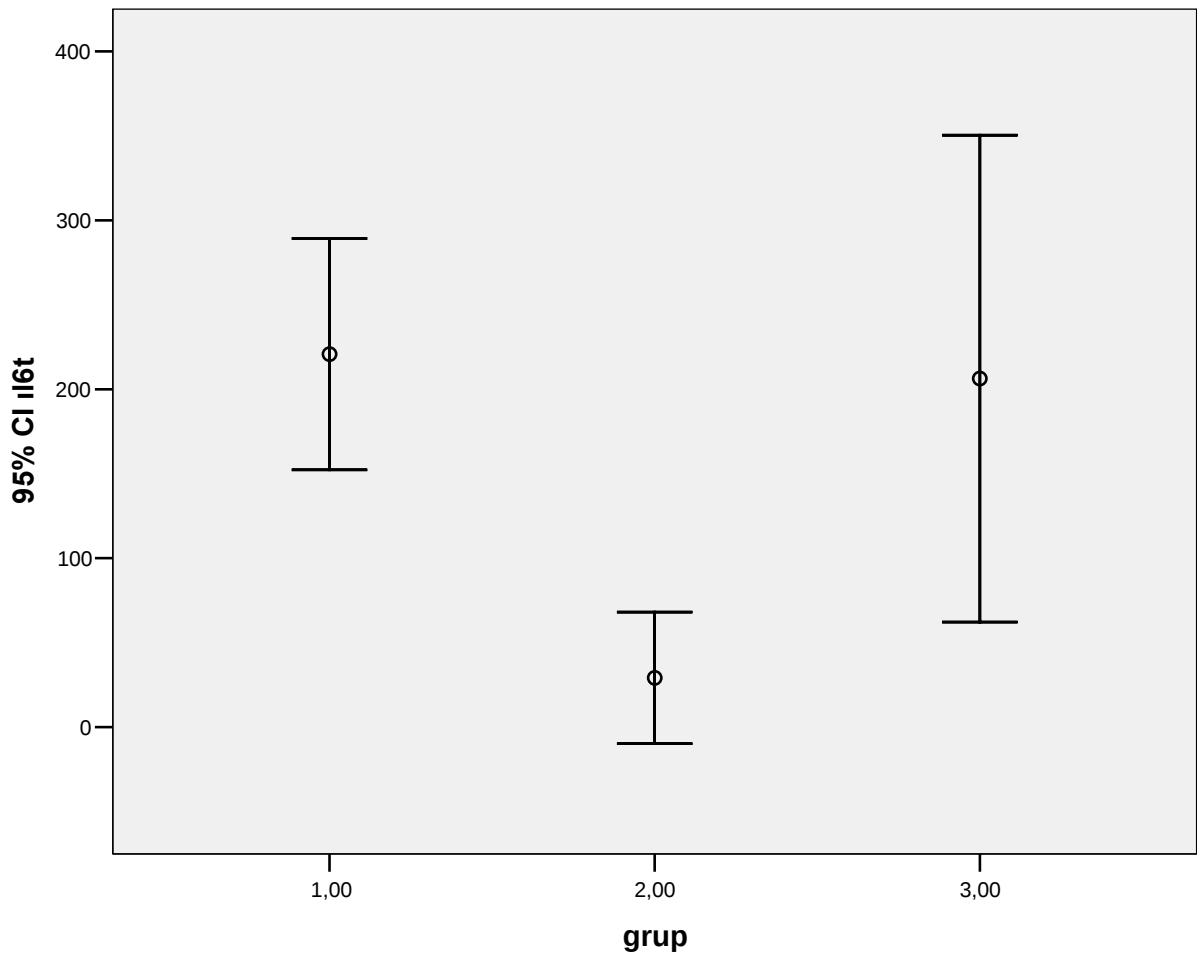
Grafik 4-6: TNF- α Mandibula Değerleri Grafiği (Grup 1:Z1, Grup 2: K1, Grup 3:S1)

Tablo 4-3: TNF- α Mandibula ve Tibia Değerleri

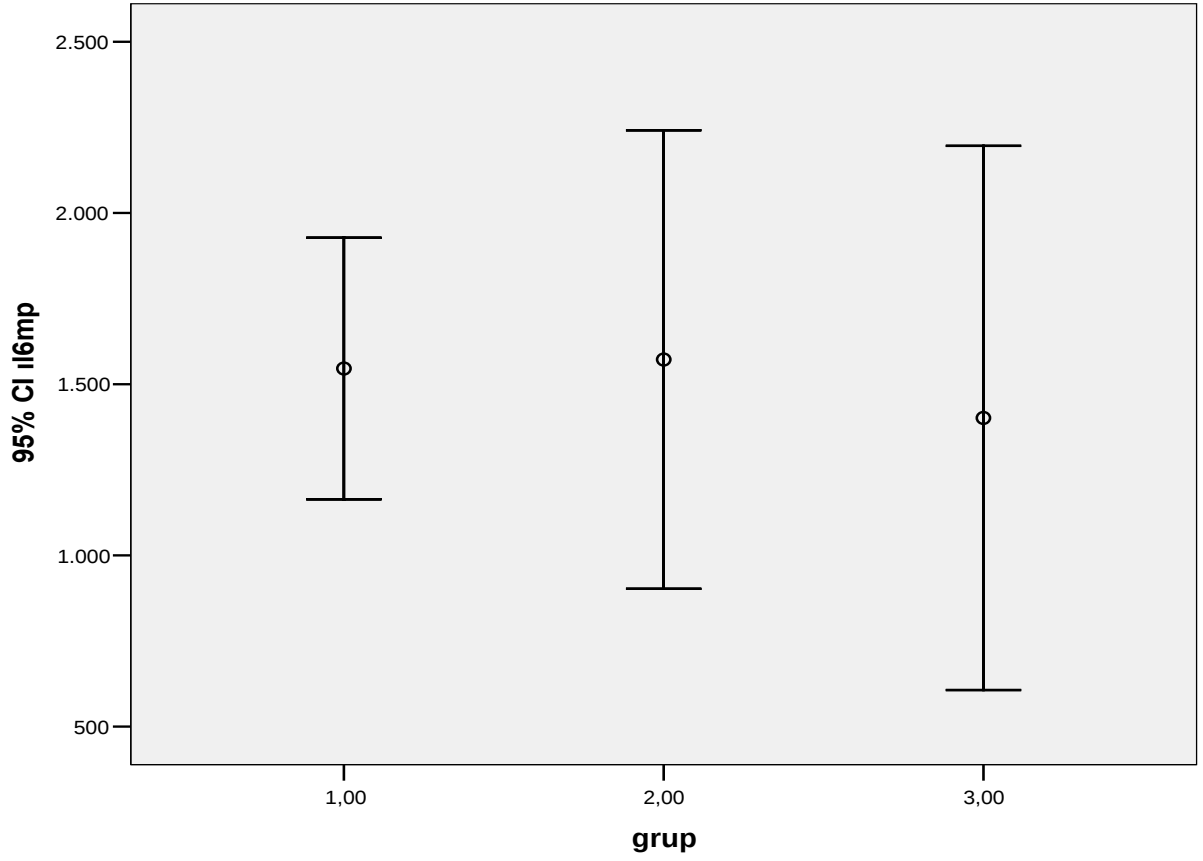
GRUPLAR	MAND. Min.	MAND. Max.	MAND. Ort.	MAND. SS	TIBIA Min.	TIBIA Max.	TIBIA Ort.	TIBIA SS
Z1	4925,10	12324,12	8818,05	2417,91	1214,09	1732,80	1483,17	198,36
K1	5558,96	9172,97	7640,33	1446,92	694,69	1166,75	917,45	174,99
S1	5304,24	9710,37	7812,20	1707,99	1336,06	1799,49	1515,54	171,88

3.6. Interlökin-6 Bulguları:

IL-6 ile ilgili ortalama, standart sapma, en büyük ve en küçük değerler hesaplandı (Tablo 4-4). Mandibula IL-6 değerleri yönünden $p=0,85$ ile anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tibia IL-6 değerleri arasında $p=0,008$ ile anlamlı fark bulunmuştur. İkili karşılaştırmalarda $p=0,02$ ile Z1 ile K1 arasında ve $p=0,028$ ile S1 ile K1 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken; $p=0,71$ ile Z1 ile S1 grupları arasında herhangi bir fark bulunmamıştır (Grafik 4-7,8).



Grafik 4-7: IL-6 Tibia Değerleri Grafiği (Grup 1: Z1, Grup 2: K1, Grup 3: S1)



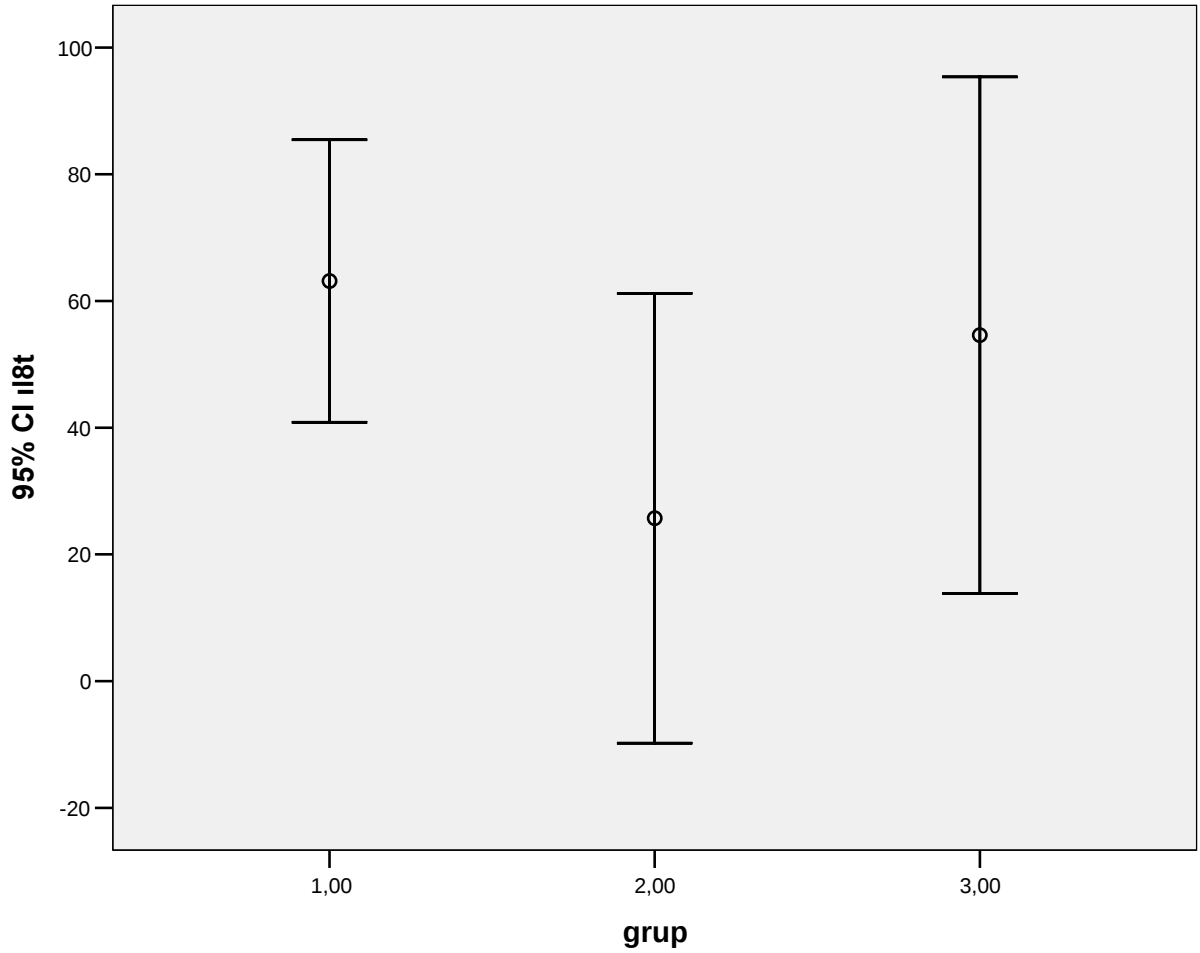
Grafik 4-8: IL-6 Mandibula Değerleri Grafiği (Grup 1: Z1, Grup 2: K1, Grup 3: S1)

Tablo 4-4: IL-6 Mandibula ve Tibia Değerleri

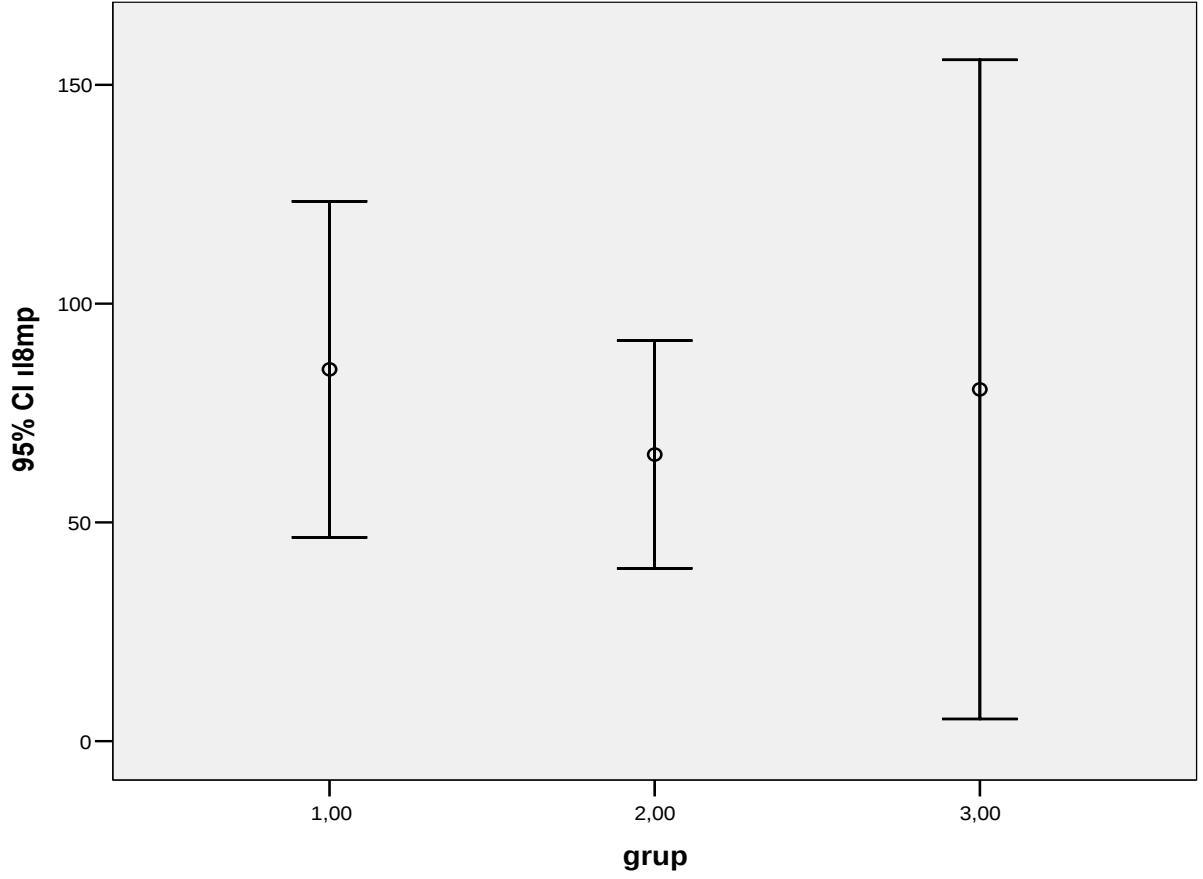
GRUPLAR	MAND. Min.	MAND. Max.	MAND. Ort.	MAND. SS	TIBIA Min.	TIBIA Max.	TIBIA Ort.	TIBIA SS
Z1	630,55	2412,36	1545,74	533,75	101,26	412,43	220,79	95,74
K1	795,45	2084,39	1572,05	539,35	2,63	65,31	29,16	31,35
S1	664,13	2367,87	1401,39	640,01	60,51	360,80	206,30	116,08

3.7. Interlökin-8 Bulguları:

IL-8 ile ilgili ortalama, standart sapma, en büyük ve en küçük değerler hesaplandı (Tablo 4-5). Mandibula ve tibia değerleri yönünden sırasıyla $p=0,71$ ve $p=0,103$ ile IL-8 değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Grafik 4-9,10).



Grafik 4-9: IL-8 Tibia Değerleri Grafiği (Grup 1: Z1, Grup 2: K1, Grup 3: S1)



Grafik 4-10: IL-8 Mandibula Değerleri Grafiği (Grup 1: Z1, Grup 2: K1, Grup 3: S1)

Tablo 4-5: IL-8 Mandibula ve Tibia Değerleri

GRUPLAR	MAND. Min.	MAND. Max.	MAND. Ort.	MAND. SS	TIBIA Min.	TIBIA Max.	TIBIA Ort.	TIBIA SS
Z1	9,52	182,86	84,98	53,69	17,33	116,08	63,15	31,16
K1	45,42	99,92	65,51	20,96	2,95	74,11	25,71	28,58
S1	32,36	180,89	80,39	60,65	11,41	103,26	54,61	32,83

5. TARTIŞMA

Bifosfonatlar; osteoporozis , Paget hastalığı, malignite hiperkalsemisi, osteolitik kemik metastazı ve multipl myelomanın osteolitik lezyonlarında gittikçe artan oranlarda kullanılmaya başlanmış olan yeni nesil ilaçlardır (168). Bifosfonatlar , kemik mineralizasyonunda endojen bir regülatör olan pirofosfatların kimyasal yapısına benzer olan sentetik bileşiklerdir (2). Pirofosfatlarda iki fosfat grubu fosfoanhidrid aracılığıyla birleşirken, bifosfonatlarda iki fosfat grubunun birleşmesi fosfodiester bağı ile gerçekleşir. (P-C-P yapısı). Bu dizilim bifosfonatların asit ortamdaki veya pirofosfatazlar nedeniyle olan hidroliz reaksiyonuna daha dirençli olmasını sağlar (97,169). BP'lerin dolaşımdaki yarılanma ömürleri; 30 dakika ila 2 saat arasında değişen oldukça kısa bir periyottur (96). Bununla birlikte kemik dokusuna bağlandıktan sonraki yarılanma ömrü iskeletsel turnover hızına bağlı olarak 10 yıla kadar uzamaktadır (96,169). Lin ve ark. bifosfonatların farmakokinetiğini inceledikleri bir çalışmada insan kemiğine bağlanan bifosfonat bileşiğinin 12 yıla kadar etki gösterebildiğini belirlemişlerdir (98). Kemik yüzeyine tutunan BP osteoklastlar tarafından bağlandıktan sonra osteoklasta bağlı kemik rezorbsiyonu sürecini engellerler (170). Bununla birlikte BP'ler antianjiyogenik etkiye de sahiptir, dolaşımdaki vasküler endotelial büyüme faktör düzeyinde düşüşe neden olurlar (104,144).

Bifosfonata bağlı çene kemiği nekrozu ya da osteomyeliti ilk kez 2002 de Marx ve Stern tarafından bildirilmiştir (139). BRONJ; BP tedavisi görmüş veya görmekte olan ve çeneler bölgesinde radyoterapi hikayesi bulunmayan hastada maksilla ya da mandibulada 8 haftadan uzun süredir var olan ekpoze kemik durumunu açıklamak için kullanılan bir terimdir (8). BRONJ sadece çenelerde rapor edilmiş bir durumdur ve tüm dünyada rapor edilen vaka sayısı artarak devam etmektedir.

Son yıllarda bifosfonat kullanımına ait major komplikasyonlardan sayılan BRONJ üzerinde bilimsel tartışmalar ile konuya yönelik araştırmalar devam etmekte ve bu durum epidemik bir problem olarak görülmektedir (6). Konu ile ilgili yapılan hayvan çalışmalarında ratlar, tavşanlar ve köpekler kullanılmışsa da ağırlıklı olarak rat modelinin uygulandığı gözlemlenmiş ve mevcut çalışma ile ilgili hayvan modeli olarak ratlar seçilmiştir. Osteonekroz vakalarının büyük oranda intravenöz yolla uygulanan pamidronat ve zoledronat

gibi potent bifosfonatların kullanımı sonrasında geliştiği belirlenmiştir. Bununla birlikte oral bifosfonatların kullanımı sonrasında da ender olarak BRONJ vakaları rapor edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan bifosfonat grubu ilaç olarak zoledronat ve ratlarda uzun süreli i.v. ilaç infüzyonundaki zorluklar nedeniyle intraperitoneal uygulama seçilmiştir. Bifosfonat kullanım süresine paralel olarak BRONJ riskinin arttığı bildirilmiştir (8). Bu nedenle daha önce 8 haftalık uygulama ile BRONJ'a neden olduğu Senel ve ark. (171) tarafından bildirilen çalışma rehber alınarak 10 haftalık ilaç uygulama periyodu seçilmiştir.

BRONJ yeni ve değişik bir klinik tablodur. Veriler bu ilaç grubu ile osteonekroz arasında bir ilişki olduğunu göstermekle birlikte gerçek mekanizma saptanamamıştır. Osteomyelit ya da osteonekrozun sadece çenelerde görülmesi araştırmaya değer bulunan bir konudur. Dixon ve ark. (147) alveolar krestin tibiadan 10 kat daha yüksek remodelling hızına sahip olduğunu, mandibular kanal seviyesinde 5 kat, mandibula inferior border seviyesinde ise 3.5 kat daha yüksek remodelling hızı olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun sonucunda çenelerin alveolar kemiği daha yüksek oranda BP alımı yapar ve daha yüksek konsantrasyonda birikim sağlanmış olur. Bu durumda diş çekimi gibi bir travma sonrasında alveolar kemik osteoklastik kemik rezorbsiyonunu takiben yeni kemik oluşumu mekanizmasını gerçekleştiremez ve nekrotik hale gelir. Kemiğin üzerini kaplayan mukozanın kanlanması bozulması ile klinik olarak tespit edilen ekspoze bir kemik meydana gelir. Bifosfonatların kan akımını azalttıkları, antianjiyogenik özellik gösterdikleri ve vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) azalttıkları çeşitli çalışmalarda gösterilmiş ve oluşan değişimlerin sürece katkı sağladığı düşünülmüştür (104,144).

Bununla birlikte yumuşak doku toksisitesi üzerinde yoğunlaşan çalışma ve görüşlerde mevcuttur. 30 nmol/ml aledronatın, 10 nmol/ml risedronatın in vitro gastrointestinal epitel hücrelerinde proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir ve aynı etkinin oral epitel hücreleri içinde geçerli olduğu ileri sürülmüştür (145). Yara iyileşmesi sırasında keratinositlerin fibroblastları büyüme faktörleri üretmeleri yönünde stimule ettikleri ve de daha sonra fibroblastların keratinosit oluşumunu çift yönlü parakrin şekilde indüklediği bildirilmiştir (172). Bifosfonatların ise fibroblastların ve keratinositlerin oluşumunu olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir (173). Landersberg ve ark. (174) pamidronat tedavisi sonrası oral mukozal hücrelerin gerçekleştirdiği yara iyileşmesinin inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Scheper ve ark. (146) kemikten serbestleşen zoledronatın gingival fibroblast ve epitel hücrelerinde apoptosizi artırdığını ve hücre proliferasyonunu azalttığını rapor etmişlerdir.

Walter ve ark. (123) bifosfonatların endotelial hücreler, fibroblastlar ve osteojenik hücreler üzerindeki olumsuz etkilerini rapor etmişlerdir.

BRONJ'un olası oluşum mekanizmasında bakteriyel kolonizasyon üzerinde de durulmuştur. Bakterilerin yüzeye yapışmaları; adeziv matriks moleküllerini fark eden mikrobiyal yüzey komponent proteinleri (MSCRAMM) ile olmaktadır (175). Direk protein ilişkisi ile nitrojen içeren bifosfonatların sahip olduğu katyonik amino grubunun bakteri ile elektrostatik etkileşimi artıracağı ileri sürülmüştür (176). Bifosfonatla kaplı hidroksiapatit eklem protezine artmış oranda *S. Aureus* adezyonunu bildiren çalışma yayınlanmıştır (175). Kumar ve ark. BRONJ oluşumunda mikrobiyal biofilm tabakasının rolü olduğunu bildirmişlerdir. (177). BRONJ ile ilgili yapılan yayınlarda Aktinomiçes kolonizasyonu da vurgulanmaktadır (7,178).

Lehrer ve ark. (148) BRONJ' un genetik mutasyona bağlı olarak oluştuğu hipotezini savunmuşlardır. Matriks metalloproteinaz ailesinden matriks metalloproteinaz-2 genindeki mutasyonun bifosfonatların oluşturduğu osteonekrozlarla ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Arduino ve ark. (149) BRONJ tablosu gelişen 30 kadın hasta ile bifosfonat tedavisi görmekte olan fakat BRONJ gelişmeyen 30 kadın hastayı karşılaştırdıkları çalışma sonucunda VEGF polimorfizminin ve haplotiplerinin BRONJ oluşumu açısından bir risk faktörü olduğunu rapor etmişlerdir. Sarasquete ve ark. (150) gerçekleştirdikleri derlemede BRONJ oluşumuna neden olabilecek genetik faktör olarak CYP2C8 genindeki polimorfizme işaret etmişlerdir.

BRONJ'un ortaya çıkışında bifosfonatların RANK/RANKL/OPG sistemi üzerine olan etkilerinin bu yeni fenomen konusunda etkin olup olmadığı, ve olası etkilerin hangi yönde olduğu araştırılması gereken konular içerisinde gösterilmiştir. Mevcut çalışma BRONJ oluşumu esnasında rol alabileceği düşünülen RANKL, OPG, TNF- α , IL-6, IL-8 gibi parametrelerin değerlendirildiği bir çalışmadır. Yapılan araştırma ile ilgili parametrelerin kronik zoledronat kullanımı sonrası kemik içerisinde hangi yönlerde değişim gösterdiği ve bifosfonatlara bağlı osteonekrozların sadece çenelerde görülmesi ile ilgili olarak araştırılan değerler yönünden çene kemikleri ile diğer kemikler arasında farklı bir etkilenme olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Kemiğin iki ana görevi vardır. Destek dokusu olarak stabiliteyi sağlarken, metabolik olarak da vücut sıvılarındaki kalsiyum dengesini sağlamada kaynak görevini görmektedir. Bazı durumlarda fonksiyonel gereksinimlere adaptasyon genetik olarak kontrol edilir, fakat Wolff

kanunlarına uygun olarak yaşam boyunca remodelasyon aktiviteleri ile değişkenlik gösterir (179).

Kemik mineralize matriks ve tanımlanabilen 3 çeşit hücre tipinden oluşmuş bifazik bir dokudur. Bu bifazik yapı kemiğe sertlik, fleksibilite ve güç kazandırır. Kemik özel bir bağ dokusudur. Burada hücreler arası madde kalsifiye olmuştur (kemik matriks).

Bu 3 ayrı hücre;

- 1- Osteositler, matriksin lakuna adı verilen kavitelerinde yerleşim gösterir
- 2- Osteoblastlar, matriksin organik kısımlarının sentezini yaparlar
- 3- Osteoklastlar, kemik dokusunun rezorpsiyonu ve yeniden modellenmesini sağlayan çok çekirdekli dev hücrelerdir (180).

Osteoblastlar yüzeylerinden RANKL açığa çıkarırlar. RANKL osteoklast prekürsörlerinden açığa çıkarılan RANK ile etkileşerek osteoklast farklılaşmasını aktive eder. Olgun osteoklastlardaki RANK ile RANKL'in etkileşmesi osteoklastın aktivasyonuna ve sağkalımının uzamasına neden olur (25). RANKL (-) farelerde ciddi osteopetrozis ve lenf nodlarının azlığı yanında diş, timus ve erken dönemde T ve B hücrelerinde farklılaşma defekti görülmüş, dalak yapısı ve payer plaklarının ise normal olduğu belirlenmiştir (33). Osteoprotegerin RANKL için tuzak reseptör olarak görev yapan ; RANK-RANKL birleşmesini negatif yönde etkileyen TNF ailesinin üyesi olan bir reseptördür (48). RANKL ve OPG oranlarının kronik zoledronat kullanımı sonrası çene kemikleri ve uzun kemikler üzerinde olası farklı değişimleri gözlemlenmek üzere çalışmaya dahil edilmiştir. TNF- α enflamasyonda üretilen potent osteoklastojenik sitokinlerden biridir. TNF- α otokrin bir mekanizma ile RANKL stimülasyonu oluşturarak osteoklast farklılaşmasına arabuluculuk eder (74). TNF- α ; oranları tespit edilerek özellikle mandibulada olası azalması ve dolayısıyla RANKL oranlarını etkilemesi veya ilacın etkilerine cevap olarak uzun kemiklerde artarken çene kemiklerinde normal değerlerinde kalması gibi BRONJ oluşumu açısından spesifik değişimler gösterip göstermediği gözlemlenmek üzere çalışmaya dahil edilmiştir. IL-6 kemik rezorpsiyonunda potent düzenleyici işlevi gösterir (3). Kemikteki ana IL-6 kaynakları osteoblastik hücreler ve stromal hücrelerdir (63). IL-6; IL-1 ve TNF, ile RANKL ve M-CSF oranlarını artırmak suretiyle osteoklast diferansiasyonunu arttırmaktadır. IL-6 sentezi sinerjistik otokrin yol ile de stimule olmaktadır. IL-1, IL-6, TNF ve PTH; IL-6 üretimini sinerjistik olarak arttırmaktadır. Ayrıca IL-6 östrojen azalmasına bağlı osteoporozisten sorumlu olmasına rağmen; osteoklastogenezisi RANKL/OPG sisteminden bağımsız olarak yönlendirme yetisine de sahiptir (42). IL-6 hem TNF ve RANKL oranlarını değiştirebilmesi

hem de bağımsız olarak osteoklastojenezise olan etkileri gözönüne alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. IL-8 ise yapımı IL-1 ve TNF tarafından uyarılan; immün cevapta inflamasyon bölgesine nötrofil kemotaksisine sebep olan en önemli mediatördür (70). IL-8 oranları; zoledronat kullanımı sonrası olası değişimler ve dolayısıyla meydana gelebilecek farklı immün yanıtlar düşünülerek araştırmaya değer bulunmuştur.

Bifosfonat kullanımına bağlı OPG oranının değişimini inceledikleri çalışmada Viereck ve ark. (181) primer insan osteoblastları üzerinde in vitro olarak Pamidronat ve Zoledronatın; doza bağımlı olarak OPG oranlarını artırdıklarını rapor etmişler ve bu durumun osteoklastik aktivitenin baskılanmasına neden olacağını bildirmişlerdir. Araştırmamızda da belirtilen çalışma ile aynı yönlü olarak mandibula ve tibia OPG değerleri artmış olarak bulunurken bu değerlerden tibia ile ilgili olanların istatistiksel değer taşıdığı görülmüştür. OPG oranları tek yönlü olarak ele alındığında bu sonuçlara dayanılarak osteoklastik aktivitenin baskılandığından söz edilebilir yalnız söz konusu baskılanmanın çene kemiklerine özel bir durum olarak ortaya çıkmadığı düşünülmüştür.

Nishida ve ark. (182) nitrojen içeren bifosfonat, YM529/ONO-5920, ile stromal hücrelerle yaptıkları çalışma sonrası kültür ortamındaki kemik iliği stromal hücrelerinde bifosfonatla birlikte RANKL ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığını rapor etmişler ve bu durumun bifosfonatların kemik rezorpsiyonu inhibisyonuna neden olan bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da mandibulaya ait RANKL değerleri Nishida ve ark. (182) tarafından belirtildiği gibi azalma gösterirken, tibiaya ait değerler artmış olarak gözlenmiştir. Tek başına ele alındığında RANKL değerleri yönünden zoledronatın mandibulada daha az osteoklastik aktivasyona neden olacak şekilde değişime neden olduğu düşünülmüştür.

Pan ve ark. (183) kemik hücrelerinden elde ettikleri primer osteoblast benzeri hücreler ile yaptıkları çalışmada; zoledronatın istatistiksel olarak anlamlı dereceye erişmesine de OPG oranlarını artırırken RANKL oranlarını düşürdüğünü ve bu değişimleri TNF- α converting enzim (TACE) aracılığı ile gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. İlgili çalışmada belirtilen değişimler ile çalışmamızda gözlenen mandibula değerleri paralellik göstermektedir. Belirtilen sonuçlar doğrultusunda Zoledronatın; OPG artışı ile osteoklastik inhibisyona neden olurken aynı zamanda RANKL oranlarında oluşturduğu azalma ile osteoklastik aktivasyonu da azalttığı düşünülmüştür.

Koch ve ark. (184) Zoledronat, İbandronat ve Clodronatın RANKL ve OPG gen ekspresyonuna olan etkilerini insan osteoblastları üzerinde araştırdıkları in vitro çalışmada;

5×10^{-7} M, 5×10^{-6} M, 5×10^{-5} M olmak üzere 3 ayrı konsantrasyon kullanmışlardır. Zoledronat ve İbandronatın yüksek doz uygulanan grupta RANKL artışına neden olurken, diğer iki konsantrasyonda RANKL oranlarında düşüşe neden olduğu belirtilirken Clodronatın herhangi bir istatistiksel değişime neden olmamakla beraber daha çok RANKL oranlarını azaltıcı etki içerisinde olduğu rapor edilmiştir. OPG oranlarının ise yüksek konsantrasyonlarda Zoledronat ve İbandronat için artarken, Clodronat için OPG üzerine belirgin bir etki gözlenmemiştir. Koch ve ark.'nın çalışmasının oluşturduğu sonuçlar her ne kadar değişik dozlarda değişik sonuçlar içerse de genel olarak zoledronata bağlı değişimler araştırmamız ile benzerlikler göstermektedir.

Multiple myeloma teşhisi konmuş 10 hasta üzerinde yapılan çalışmada, ilgili hastalardan elde edilen mezenşimal stromal hücrelerle hazırlanan kültürde hücreler önce IL-1 β aktivasyonuna maruz bırakılmış ve daha sonra İbandronat ortama eklenerek kontrol grubu ile RANKL oranları yönünden karşılaştırma yapılmıştır (185). Sonuç olarak İbandronatın artmış RANKL seviyelerini azalttığını bulmuşlardır ve araştırmamızda mandibula için hesaplanan RANKL oranları değişimi ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. Ancak ilgili çalışmada bifosfonat uygulamadan önce kültüre osteoklast aktivatörü olan IL-1 β eklenmesi ve bifosfonat olarak İbandronat seçilmiş olması çalışmalar arasında yer alan temel farklılıkları oluşturmaktadır.

60 Paget hastası üzerinde yapılan serum RANKL ve OPG başlangıç değerleri ile tedavi olarak verilen Pamidronat sonrası 30, 60, 90, 120 gün sonraki değerler karşılaştırılmıştır (186). Sonuç olarak OPG değerlerinin bir artış trendi içerisinde 90 ve 120 günlük süreçlerde de istatistiksel anlamlılığı yakalayacak şekilde arttığını belirtmişlerdir. RANKL değerleri yönünden bir miktar düşüş gözlemlendiğini ancak düşüşün süreçle çok fazla değişim göstermediğini ve hiçbir zaman istatistiksel anlamlılığı yakalamadığını rapor etmişlerdir. Belirtilen OPG artışı araştırmamızda da her iki kemik türünde de gözlenmiştir ancak mevcut çalışmadaki RANKL oranlarındaki düşüş araştırmamızda yalnız mandibula değerlerinde gözlenmiştir.

Mountzios ve ark. (187) tümör teşhisi daha önceden konmuş ve metastaz tespit edilerek Zoledronat tedavisi başlanan hastalarda başlangıç ve tedavi sonrası 6 aylık çeşitli parametrelerin serum düzeyleri karşılaştırılmış. İstatistiksel olarak anlamlı değişimin yalnız serum CTX değerlerindeki azalma oranlarında görüldüğü tespit edilmiştir. RANKL oranları göğüs ve akciğer kanseri hastalarında düşerken, prostat kanseri hastalarında artmış. OPG oranları prostat kanseri olan hastalarda artarken diğer hastalarda düşmüş olarak bulunmuş.

Araştırmacılar sonuçta totalde RANKL/OPG oranlarının düştüğünü belirtmişler yalnız sonuçların serum isoformların göreceli stabilizasyonu, döngüsel varyasyonlar gibi fizyolojik ek faktörler, menstrual değişimler, yaş, cinsiyet gibi değişkenler nedeniyle ihtiyatla ele alınması gerektiğini belirtmişlerdir.

İnsan gingival fibroblastlarının bifosfonatlarla etkileşimi sonrası ürettikleri RANKL, OPG ve IL-6 düzeylerinin ELİSA testi ile araştırıldığı in vitro bir çalışmada kültür ortamında Alendronat ve Pamidronat ile inkübasyona tabi tutulan insan gingival fibroblast hücrelerinin LPS veya IL-1 β ile stimülasyonu sonrası RANKL değerlerinin azaldığı ve OPG oranları ile IL-6 oranlarının arttığı rapor edilmiştir (188). Çalışmada elde edilen RANKL ve OPG oranları değişim yönü çalışmamızdaki mandibula değerleri ile paralellik gösterirken, IL-6 oranlarındaki artış tarafımızca yalnız tibia değerlerinde gözlenmiş ancak hem S1 hemde Z1 grubunda ilgili artışın gözlenmesi üzerine IL-6 oranlarındaki artışın ilaca bağlı bir durum olmadığı düşünülmüştür.

42 poliostatik Paget hastasında yapılan bir çalışmada; hastalara Risedronat verilerek 120 günlük tedavi sonrası serum OPG ve IL-6 değerlerinin değişimi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre serum OPG oranları tedavi başlangıcına göre anlamlı olarak artarken, serum IL-6 oranlarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (189). İlgili sonuçlar araştırmamızın OPG ve IL-6 değerleri değişimi yönünden benzerlikler içermektedir.

Araştırmamızda tibia ile ilgili elde edilen OPG oranlarının istatistiksel olarak anlamlı artışı osteoklastik inhibisyonun zoledronat tarafından artırıldığını işaret etmektedir. Aynı zamanda gözlenen RANKL değerlerindeki artışın istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da Zoledronatın etkisi sonucu olduğu düşünülmüştür. RANKL değerlerinde meydana gelen artış; osteoblastik inhibisyonu telafi etme yönünde osteoklastik aktivasyon oluşturmak üzere oluşan bir durum olarak yorumlanmıştır. Mandibula OPG oranlarındaki artış yine osteoklastik inhibisyona işaret etmektedir ancak mandibula RANKL değerlerinin de azalmış olması eş zamanlı olarak mandibulada osteoklastik aktivasyonun da azaldığını göstermiştir. Mandibulada tibiadan farklı oluşan bu etki mandibula RANKL değerlerinin zoledronat kullanımı sonrası farklı yönde etkilendiğini ve bu farklı etkileşimin bifosfonata bağlı gelişen osteonekrozların oluşumu açısından çene kemikleri için bir predispozan faktör olarak rol oynayabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada araştırılan parametreler yönünden mandibula ile tibia arasında farklı bir etkileşim RANKL değerleri açısından ortaya çıkmıştır ve bu durum BRONJ'un sadece çenelerde görülmesi ile ilgili olarak araştırılan parametreler açısından mandibulada osteoklastik aktivasyonun azalmasına işaret etmektedir.

Araştırmada elde edilen IL-8 değerleri yönünden hem mandibulada hem de tibiada gruplar arasında herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Bu durumda IL-8 ve ona bağlı etkileşimlerin BRONJ oluşum mekanizmasında herhangi bir belirgin etki göstermediği düşünülmüştür.

Araştırmada elde edilen TNF- α ve IL-6 değerleri değişimler yönünden paralellik göstermektedir. Mandibulada elde edilen değerler her iki parametre yönünden herhangi bir farklılık göstermezken tibia değerleri hem Z1 hem de S1 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiştir ancak ilgili değişimler S1 gruplarında da değişim gösterdiği için ilaca bağlı değişim olarak değerlendirilmemiştir, her iki artışında ratlarda oluşan stres kaynaklı artışlar olduğu düşünülmüştür. Yıldırım ve ark. yaptıkları bir çalışmada soğuğa maruz bırakılmanın ratlarda strese neden olduğunu ve bunun da IL-6 oranlarını anlamlı derecede artırdığını rapor etmişlerdir (190). Maes ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada insanlarda travmatik olaylarda sonra gerçekleşen post-travmatik stress ile ilişkili olarak da anlamlı derecede artmış IL-6 oranları ve IL-6 reseptör sayısını bildirmişlerdir (191).

Bifosfonatlar sebep oldukları komplikasyonlar olmasına rağmen halen geçerli yararları nedeniyle geniş bir hastalık grubunda kullanılmaya devam etmektedir. Bifosfonatlara bağlı osteonekrozlar ise medikal ve dental ekiplerin bilinçlenmesi ve önlem alması gereken bir konu olarak görünmektedir. Henüz patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen BRONJ hakkında pek çok çalışma yapılmaktadır. Özellikle RANK/RANKL/OPG sistemi üzerinden yapılan çalışmalar patogeneizde yer alan ve sert dokuda oluşabilecek değişiklikler hakkında kayda değer bilgiler sunmaya aday çalışmalar olarak düşünülmektedir. Araştırmamız yaptığımız literatür taramalarına göre direk kemik doku kullanılarak bu konuda yapılmış ilk çalışmadır. BRONJ adı verilen bu yeni fenomenin anlaşılması ve sonrasında olası tedavi seçeneklerinin ortaya konabilmesi için yeni çalışmaların gerçekleşmesi literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bifosfonatlara bağlı osteonekrozlar; yeni ve patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamış ve üzerinde çok sayıda araştırma yürütülen bir konudur.
- Tibia RANKL değerleri Z1 grubunda her iki kontrol grubuna göre artarken, Mandibula RANKL değerleri her iki kontrol grubuna göre azalmaktadır ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- Mandibula OPG değerleri her iki kontrol grubuna göre artarken bu artış istatistiksel olarak $P=0,74$ ile anlamlı bulunmamıştır. Tibia OPG değerleri her iki gruba göre $P=0,045$ ile anlamlı olarak artmış olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırmalarda Z1 grubu ile K1 grubu arasında $P=0,037$ ile anlamlı fark bulunurken diğer ikili karşılaştırmalarda anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- $TNF-\alpha$ mandibula değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. $TNF-\alpha$ tibia değerleri ise K1 grubuna göre hem S1 hem de Z1 grubunda artmış olarak bulunmuştur ancak bu artış her iki grupta da görüldüğü için ilaca bağlı bir değişim olarak değerlendirilmemiş ve strese bağlı bir değişim olarak düşünülmüştür.
- Mandibula ve tibia değerleri yönünden IL-8 oranları arasında herhangi bir farklılık bulunmamıştır.
- Mandibula IL-6 değerleri yönünden anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tibia IL-6 değerleri arasında ise anlamlı fark bulunmuştur. Ancak söz konusu farklılık hem S1 hem de Z1 grubunda görüldüğü için ilaca bağlı bir değişim olarak değerlendirilmemiş ve strese bağlı bir değişim olarak düşünülmüştür.
- Araştırmamızda tibia ile ilgili elde edilen OPG oranlarının istatistiksel olarak anlamlı artışı osteoklastik inhibisyonun zoledronat tarafından artırıldığını işaret etmektedir. Aynı zamanda gözlenen RANKL oranlarındaki artışta istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da zoledronatın etkisi ile artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. RANKL oranlarında meydana gelen artış, osteoblastik inhibisyonu telafi etme yönünde osteoklastik aktivasyon oluşturmak üzere gerçekleşen bir reaksiyon olarak yorumlandı.
- Mandibula OPG oranlarındaki artış yine osteoklastik inhibisyona işaret etmektedir ancak mandibula RANKL değerlerinin azalmış olması eş zamanlı olarak mandibulada osteoklastik aktivasyonun da azaldığını göstermiştir. Mandibulada tibiadan farklı oluşan bu etki RANKL

değerlerinin zoledronat kullanımı sonrası farklı yönde etkilendiğini ve bu etkileşimin bifosfonata bağlı gelişen osteonekrozların oluşumu açısından predispozan bir faktör olabileceği şeklinde yorumlandı.

- BRONJ'un sadece çenelerde görülmesine neden olabilecek şekilde mandibula RANKL değerlerinin tibia değerlerinin aksine azalması, patogeneizde osteoklastik aktivasyonun azalmasının rol oynayabileceği doğrultusunda bir sonuç ortaya çıkarmıştır. Bu bulgunun daha uzun dönemi kapsayan ya da daha yüksek dozda zoledronat uygulanan çalışmalar ile sürdürülmesi araştırmaya değer olarak düşünülmüştür.
- Çalışmamızda değerlendirilen parametreler dışında kalan, osteoklastojeneziste önemli rolü olan ve BRONJ oluşum mekanizmasında rol alabilecek IL-1, M-CSF, RANK v.b. oranların araştırıldığı çalışmaların yapılmasının mekanizmanın aydınlatılması yönünde katkıları olabileceği düşünülmüştür.
- Çalışmamız bulguları doğrultusunda BRONJ ile ilgili terapötik yaklaşımlar gerçekleştirebilme üzerine azalan RANKL değerlerini artırabilecek epidermal growth faktör (EGF), heregulinbeta1 (HRG- β 1) gibi RANKL aktivatörlerinin lokal olarak çenelere uygulandığı çalışmalar araştırmaya değer olarak düşünülmüştür.

7. ÖZET

Kronik zoledronat kullanımının çene kemikleri ve uzun kemikler üzerinde TNF- α , IL-6, IL-8, RANKL ve osteoprotegerin oranları yönünden hayvan modeliyle incelenmesi

Giriş: Bifosfonatlar kemik rezorpsiyonu inhibisyonunda etkili bir ilaç grubudur. Bifosfonatlarla ilgili çene osteonekrozları ya da osteomyelitleri ilk olarak 2003 yılında Marx ve Stern tarafından açıklanmıştır. Bu durum, bifosfonatlara bağlı olası ve önemli bir geç ters etkidir ve de patogenezi halen netleşmemiştir.

Bu çalışma ratlarda kronik bifosfonat uygulamasından sonra TNF- α , IL-6, IL-8, RANKL ve OPG seviyelerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmada 30 adet dişi Sprague-Dawley rat kullanıldı. Ratlar rastgele 3 gruba bölündüler. Z1; zoledronat grubu, 10 hafta boyunca zoledronat enjekte edilen grup. S1; kontrol grubu, 10 hafta boyunca tuz solusyonu enjekte edilen grup ve K1; herhangi bir enjeksiyon yapılmayan kontrol grubu. Z1 grubuna zoledronat enjeksiyonu 0,1mg/kg dozunda haftada 3 kez yapıldı. 10 hafta sonunda herhangi bir dental girişim yapılmadan ratlar sakrifiye edildi. 1. ve 2. molarları içeren mandibula posterior bölge ve tibianın 1/3 üst bölgesi subperiosteal olarak diseke edildi. Dokuların ELISA testine hazırlamak amacıyla homojenizasyonu yapıldı. TNF- α , IL-6, IL-8, RANKL ve osteoprotegerin değerleri ELISA kitleri kullanılarak elde edildi.

Sonuçlar: Tibia OPG oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmasa da mandibula OPG oranlarındaki artış osteoklastogenezis inhibisyonunu olarak yorumlandı. Tibia RANKL değerlerinde artış olmasına rağmen mandibula RANKL değerlerinde düşüş kaydedildi.

TNF- α ve IL-6 tibia değerleri hem Z1 hem de S1 grubunda; ilaca bağlı olduğu düşünülmeyen artış meydana getirdi. Mandibula TNF- α ve IL-6 değerlerinde gruplar arası bir fark gözlenmedi. IL-8 oranları hem mandibula hem de tibiada çalışılan gruplar arasında bir farklılık oluşturmadi.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre BRONJ'un sadece çenelerde oluşması; azalmış RANKL oranlarına bağlı olarak gerçekleşen osteoklastik aktivasyondaki azalma nedeniyle ilişkili olabilir. Klinik uygulamalar öncesi uzun dönem çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. ABSTRACT

The evaluation of chronic zoledronate usage on jaw and long bones by TNF- α , IL-6, IL-8, RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model

Introduction: Bisphosphonates are a group of medications that are effective in inhibiting bone resorption. Bisphosphonate-related osteonecrosis or osteomyelitis of the jaws (BRONJ) is an important possible late adverse effect of bisphosphonates, and the pathogenesis of this new phenomenon remains unclear.

The aim of the study was to evaluate the TNF- α , IL-6, IL-8, RANKL and OPG levels after chronic bisphosphonate application in rat.

Material and Method: 30 female Sprague-Dawley rats were used in this study. They were randomly divided into three groups. Z1; zoledronate group was injected with zoledronate for 10 weeks, S1; control group was injected with saline solution for 10 weeks and C1; control group that was not given any injection. Z1 group received injection of zoledronate at a dose of 0.1 mg/kg, 3 times a week. After 10 weeks, without any dental intervention, the rats were sacrificed. The posterior region of the mandible including first and second molars and 1/3 upper side of tibia were dissected subperiosteally. Homogenization of tissues were performed before ELISA tests. All of the concentrations of the selected parameters were determined using ELISA kits.

Results: The increase on tibia osteoprotegerin levels were statistically significant. ($p < 0.05$) While not reaching statistical significance the increase in osteoprotegerin levels of the mandible considered as inhibition of osteoclastogenesis. There was an elevation on RANKL tibia levels however mandible RANKL levels revealed a decrease.

The TNF- α and IL-6 ratios showed an increase on tibia levels both in Z1 and S1 groups which were considered as not to be related with drug administration. There were no difference on mandible TNF- α and IL-6 levels. IL-8 levels revealed no difference between the studied groups both in mandible and tibia.

According to our data; the occurrence of BRONJ only in jaws could be related with the lack of osteoclastic activation related with the decrease on RANKL levels. Long term investigations have to be made before clinical applications.

9. KAYNAKLAR

1. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL: Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.*, 62:527-534, 2006.
2. Cheng A, Mavrokokki A, Carter G, Stein B, Fazzalari NL, Wilson DF, Goss AN: The dental implications of bisphosphonates and bone disease. *Aust Dent J* 50 Suppl., 2:4-13, 2005.
3. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F: IL-6, RANKL, TNF-alpha/ IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15:49-60, 2004.
4. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA: The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol and Endodontology*, 106:5-13, 2008.
5. Güner İ, Özmen D, Bayındır O: Sitokinler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.*, 17:65-74, 1997.
6. Marx RE: Pamidronate (Aredia) and zoldronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.*, 61:1115, 2003.
7. Senel FC, Tekin US, Bagis B: Severe osteomyelitis of the mandible associated with the use of non-nitrogen-containing bisphosphonate (Disodium Clodronate): Report of a case. *J Oral Maxillofac Surg.*, 65:562-5, 2007.
8. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons; Position paper: Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg.*, 65: 369-76, 2007.
9. Dağdeviren A, Selçukbiricik S: Fizyoloji Histoloji-Embriyoloji, 3.Baskı, İstanbul, Klinisyen Tıp Kitapları Serisi, Kelebek Matbaacılık, 2007, s. 60-64.
10. Koloğlu S: Osteoporoz. 1. Baskı, Ankara, Ajans-Türk Basın ve Basım A.Ş., 1998, s.1-5.
11. Öber A, İzzetoğlu GT: Histoloji.1. Basım, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 2006, s.88-104.
12. Akay MT: Genel Histoloji. 6. Basım, Ankara, Palme Yayıncılık, 2006, s. 147-173.
13. Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CC, Plum F: Cecil Essentials of Medicine. Fourth edition, WB. Saunders Company, 2000, pp. 555-576.
14. Guyton AC, Hall JE: Tıbbi Fizyoloji (Çev. H. Çavuşoğlu).11.Basım, Nobel Tıp Kitabevi, 2007, s. 980-983.
15. Ovalle WK, Nahirney PC: Netter Temel Histoloji (Çev. S. Müftüoğlu, F.Kaymaz, P. Atila) 1. Basım, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009, s.131-156.
16. Fawcett DW: Bloom and Fawcett, A Textbook of Histology, Eleventh Edition. W.B. Saunders Company, Igaku-Shoin / Saunders Philadelphia, 1986, pp. 199-207.
17. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Temel Histoloji (Çev. Y. Aytekin). 8. Basım, Barış Kitapçılık, İstanbul, 1998, s. 132-148.
18. Mills SE: Histology for Pathologists. Third edition, Lippincott Williams & Wilkins business, Virginia, 2007, pp 80-94.
19. Gökçimen A: Genel Tıbbi Histoloji. 1. Basım, Isparta, Süleyman Demirel Üniversitesi Basımevi, 2006, s. 92-102.
20. Eşrefoğlu M: Genel ve Özel Histoloji. 1. Basım, Malatya, Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık, 2004, s. 101-112.

21. Marks SC, Popoff SN: Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat*, 1988, 183, p.1-44.
22. Boyce BF, Xing L: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473:139-146, 2008.
23. Gheron Robey P: Principles of Bone Biology. In J.P. Bilezikian, L. G. Raisz & G.A. Rodan, San Diego Academic Press, 2002, Vol.1, pp. 225-237.
24. Mackie E.J: Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The Int J of Biochem & Cell Biol.*, 35:1301-1305, 2003.
25. Yıldız A: Osteoporozlu tavşan modelinde sistemik zoledronik asit uygulamasının titanyum implant osseointegrasyonu üzerine etkisi. Doktora tezi, Çukurova Üniv. Sağlık Bilimleri Enst., Adana 2008.
26. Tate KML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW: The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36:1-8, 2004.
27. Li Z, Kong K, Qi W: Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343:345-350, 2006.
28. Lerner UH: Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biology*, 19:107-120, 2000.
29. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and identical to TRANCE/RANKL, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, p.3597-3602.
30. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89:309-319, 1997.
31. Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, et al: Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 234:137-142, 1997.
32. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93:165-176, 1998.
33. Kurban S, Mehmetoğlu İ: Osteoprotegerin, Rank ve Rank Ligandı. *Türk J Biochem*, 32(4), 178-184, 2007.
34. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656):75-9, 1997.
35. Khosla S: Minireview; the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 142: 5050-5, 2001.
36. Nagakawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, et al: RANK is essential signalling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 253:395-400, 1998.
37. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci.*, 96:3540-5, 1999.
38. Wong BR, Josien R, Young Lee S, Vologodskaya M, Steinman RM & Choi Y: The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem.*, 273:28355-9, 1998.
39. Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC: The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor associated factors in the signaling mechanism of receptor activator of NF- κ B, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem.*, 273:34120-7, 1998.

40. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, et al: TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 1999, 13,p. 1015-24.
41. Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR: RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39, p.1077-81.
42. Sayans MP, Martin JM, Angueira FB, et al: RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010, 109(5), p.679-686.
43. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC: RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22, p. 549-53.
44. Usui M, Xing L, Drissi H, Zuscik M, O'Keefe R, Chen D, Boyce BF: Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP-2. *J Bone Mineral Research*, 23(3): 314-25, 2008.
45. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, et al: RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos dependent induction of interferon-beta. *Nature*, 416:744-9,
46. Breuil V, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A, Rezzonico R, Euller L, Rossi B: The receptor activator of nuclear factor kappa β ligand is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J.*, 17:1751-53, 2003.
47. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritzer C, Sturn DH, Wiedermann CJ: Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis Rheum.*, 50: 2309-16, 2004.
48. Fili S, Karalaki M, Schaller B: Therapeutic implications of osteoprotegerin. *Cancer Cell Int.*, 12(9), 26, 2009.
49. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ: RANK, RANKL and Opg in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskeletal Med.*, 2(1), 56-64, 2009.
50. Ito S, Hata T: Crystal structure of RANK ligand involved in bone metabolism. *Vitam Horm.*, 67, 19-33, 2004.
51. Sordillo EM, Pearse R: RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma. *Cancer*, 97(3), 802-12, 2003.
52. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, et al: *Genes Dev.*, 12(9), 1260-8, 1998.
53. Cundy T, Hedge M, Naot D, Chong B, King A, Wallace R, Mulley J, Love DR, Siedel J, et al: A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Gen.*, 11(18), 2119-27, 2002.
54. Samelson EJ, Broe KE, Demissie S, Beck TJ, Karasik D, Kathiresan S, Kiel DP: Increased plasma osteoprotegerin concentrations are associated with indices of bone strength of the hip. *J Clin Endoc Metab.*, 93(5), 1789-95, 2008.
55. Makhlef HA, Mueller SM, Mizuno S, Glowacki J: Age-related decline in Opg expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun.*, 268(3), 669-72, 2000.
56. Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, Stolina M, Kosteniuk PJ, Demer LL: Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in ldlr(-) mice. *Circulation*, 117(3), 411-20, 2008.
57. Stolina M, Schett G, Dwyer D, Vonderfecht S, Middleton S, Duryea D, Pacheco E, Van G, Bolon B, Feige U, Zack D, Kostenuik P: RANKL inhibition by Opg prevents bone loss without affecting local or systemic inflammation parameters in

- two rat arthritis models: comparison with anti TNF alpha or anti IL-1 therapies. *Arthritis Res Ther.*, 11(6), 187, 2009.
58. Nororiha IL, Neimir Z, Stein H, Walder R: Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant.*, 10(6): 775-86, 1995.
 59. Abbas AK, Lichtman AH, Poper JS: Cytokines. Cellular and molecular immunology, Philadelphia, WB Saunders company. 1994: 240-261.
 60. Kishimoto T: The biology of interleukin-6. *Blood*, 1989, 74:1-10.
 61. Baykal Y, Karaayvaz M, Kutlu M: İnterlökinler. *T Klin J Med Sci*, 18: 77-84, 1998.
 62. Stahl RAK: Chemoattractive cytokines and immune renal injury: *Nephrol Dial Transplant*, 10(3): 307-9, 1995.
 63. Holt I, Davie MWJ, Marshall MJ: Osteoclast are not the major source of interleukin-6 in mouse parietal bone. *Bone*, 18:221-6, 1996.
 64. Gratacos J, Collado A, Filella X: Serum cytokines (IL-6,TNF- α , IL-1 β and IFN- γ) in ankylosing spondylitis : a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol* 33: 927-931, 1994.
 65. Dequeker J, Geusens P: Osteoporosis and arthritis. *AnnRheum Dis* 49: 276-280, 1990.
 66. Hattersley G, Dorey E, Horton MA, Chambers TJ: Human macrophage colony-stimulating factor inhibits bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone. *J Cell Physiol* 137:199-203, 1988.
 67. Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Finlay DM, et al: Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med.*, 182:1461-8, 1995.
 68. Linkhart TA, Linkhart SG, MacCharles DC, Long DL, Strong DJ. Interleukin-6 messenger mRNA expression and interleukin-6 protein secretion in cells isolated from normal human bone: regulation by interleukin-1. *J Bone Miner Res.*, 6:1285-94, 1991.
 69. Kurokouchi K, Kambe F, Yasukawa K, Izumi R, Ishiguro N, Iwata H, et al. TNF-alpha increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF-kappaB in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J Bone Miner Res.*, 13:1290-9, 1998.
 70. Samanta KA, Oppenheim JJ, Matsushima K: Interleukin-8 dynamicaly regulates it's own receptor expression on human neutrophil. *Biol Chemistry*, 265: 187-9, 1990.
 71. Yıldırım M, Kılınç Y, Ceyhan A: Behçet hastalığı patogenezindeki yenilikler. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 16(3): 29-34, 2009.
 72. Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J,Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C: Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Lab Invest.*, 78(6):755-62, 1998.
 73. Fredriksson M, Bergstrom K, Asman B: IL-8 and TNF-alpha from peripheral neutrophils and acute phase proteins in periodontitis. *J Clin Periodontol.*, 29(2):123-8. 2002.
 74. Zou W, Hakim I, Tschoep K, Endres S, Shavit Z: Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *J Cell Biochem.*, 25(83): 70-83, 2001.
 75. Sato T, Selleri C, Anderson S, Young NS, Maciejewski JP: Expression and modulation of cellular receptors for interferon-gamma, tumour necrosis factor, and Fas on human bone marrow CD34+ cells. *Br J Haematol.*, 97(2):356-65, 1997.

76. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV: The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, 81(4):495-504, 1995.
77. Kılıçturgay K: İmmunolojiye Giriş. 3. baskı, Bursa: Güneş & Nobel Tıp Kitapevleri, s.128-37, 1994.
78. Aydınтуğ O, Tokgöz G: Klinik immünoloji'de stokinler. 1. baskı, Ankara: Antıp A.Ş. Yayınları, s.85-100, 1997.
79. Aggarval BB, Kohr WS, Hass PE: Human Tumor Necrosis Factor. *J Biol Chem.*, 260:2345-52, 1992.
80. Stark M, Jones SJ, Blake L: Tumor necrosis factor. *Lancet*, 345:468-73, 1995.
81. Harmandar O.: Nötrositik asitli siroz hastalarında serum ve asit sıvısı tnf alfa, IL-6, nitrik oksit ve myeloperoksidaz seviyelerinin asit enfeksiyonu açısından tanısai ve prediktif değeri.Uzmanlık tezi, Trakya Üni. Tıp Fak., Edirne 2008.
82. Arai K, Lee F, Miyajam A, Miyatake S, Arai N, Yokota T: Cytokines: Coordinators of Immune and Inflammatory Responses. *Ann Rev Biochem.*, 59:783-836, 1990.
83. Baykal Y. Antiinflamatuvar sitokinler. *GATA Bülteni* 40:113-7, 1998.
84. Beutler BA: The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol* 57:16-21, 1999.
85. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N: Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tnf- α . *Nature*, 329(6140), 630-2, 1987.
86. Graves DT, Cochran D: The contribution of IL-1 and tnf to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74(3): 391-401, 2003.
87. Çırak M: ELISA sistemleri. *T Klin Tıp Bilimleri*, 19:242-8, 1999.
88. Babacan F, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M ed: İnfeksiyon Hastalıkları. İnfeksiyon Hastalıklarının İmmünoserolojisi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, s.98-9, 1996.
89. Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS: Quantitation of antigen. In: *Cellular and Molecular Immunology*, 3rd edition, Philadelphia: WB Saunders Company, pp. 59-60, 1997.
90. Kayaalp O: Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 2. cilt, 12. baskı, Pelikan yayıncılık, 2009, s. 1139-41.
91. Font RF, Garcia ML, Martinez JMO: Osteonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments: Uptade. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*, 13: 318-24, 2008.
92. Soydan S, Şenel F, Araz K: Bifosfonata bağıli olarak çene kemiklerinde gelişen osteonekrozun patogenezi ve tedavisi. *Hacettepe Diş Hek. Fak. Dergisi*, 33(3): 61-68, 2009.
93. Reid IR. Anti-resorptive therapies for osteoporosis. *Seminars in cell-development biology.*, 19, pp.473-8, 2008.
94. Arslan AH: Postmenopozal osteoporozun mandibulaya etkilerinin dansitometrik açıdan incelenmesi ve osteoporozlu hastalarda implant uygulamaları. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2004.
95. Green JR. Bisphosphonates: Preclinical Review. *The Oncologist*, 9(Supp 4): 3-13, 2004.
96. Martin TJ, Grin V: Bisphosphonates – mechanisms of action. *Australian Prescriber*, 23: 130-2, 2000.
97. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, et al: Celluler and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88(12 Suppl): 2961-78, 2000.

98. Lin JH, Russel RG, Gertz B: Pharmacokinetics of alendronate: an overview. *Int J Clin Pract.*, 101: 18-26, 1999.
99. Watts NB: Treatment of osteoporosis with bisphosphonates. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 27 (2):419-39, 1998.
100. Hortobagyi GN: Moving into the future: Treatment of bone metastases and beyond, *Cancer treatment reviews* 31: 9–18, 2005.
101. Boddy JJ: Bisphosphonates for malignancy related bone disease: current status, future developments, *Support Care Cancer* 14:408–18, 2006.
102. Owens G, Jackson R, Lewiecki EM: An integrated approach: Bisphosphonate Management for the Treatment of Osteoporosis. *Am J Manag Care*, 13:290-308, 2007.
103. Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW Jr, Dequeker J, Favus M: Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med.*, 333:1437-1443, 1994.
104. Kapitola J, Zak J: Effect of pamidronate on bone blood flow in oophorectomized rats. *Physiol. Res.*, 47: 237-40, 1998.
105. Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS: Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol*, 7, 508-14, 2006.
106. Guglielmi G, Diacinti D, van Kuijk C, Aparisi F, Krestan C, Adams JE, Link TM: Vertebral morphometry: current methods and recent advances. *Eur Radiol.*, 18(7):1484-96, 2008.
107. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Mautalen C, Mesenbrink P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Eriksen EF, Cummings SR; HORIZON Pivotal Fracture Trial Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*, 356:1809-1822, 2007.
108. Kamoun-Goldrat A, Ginisty D, Merrer M: Effect of bisphosphonates on tooth eruption in children with osteogenesis imperfecta. *Eur J Oral Sci.*, 116: 195-8, 2008.
109. Işıkdogan A: Metastatik kemik tümörlerinde medikal tedavi. *Türkiye Klinikleri J Orthop-Traumatol Special Topics*, 1:17-23, 2008.
110. Lipton A, Theriault RH, Hortobagyi GN: Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases: long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer*, 88:1082–90, 2000.
111. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M, et al: Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma: a phase 3, double blind comparative study. *Cancer J.*, 7:377-87, 2001.
112. Ayan M.: Sistemik olarak verilen zoledronik asitin titanyum dental implantların osteointegrasyon düzeylerine etkisi. Doktora tezi., Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya 2008.
113. Li EC, Davis LE: Zoledronic acid: a new parenteral bisphosphonate. *Clin Ther.* 25(11): 2669-2708, 2001.
114. www.zometa.com/about/zometa/index.jsp.
115. Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ: Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone*, 28:465–473, 2001.

116. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, Ebetino FH, Rogers MJ: Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl disphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther*, 296:235–242, 2001.
117. Evans CE, Braidman IP: Effects of two novel bisphosphonates on bone cells, in vitro. *Bone Miner*, 26: 95-107, 1994.
118. Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A: In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia*, 12:220-229, 1998.
119. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M: Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res*, 60:2949-2954, 2000.
120. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR: Novel antiangiogenic effects of bisphosphonate compound zoledronic acid. *J pharmacol Exp Ther*, 302:1055-1061, 2002.
121. Green JR, Müller K, Jaeggi KA: Preclinical pharmacology of CGP42'446, A New heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res.*, 9:745–51, 1994.
122. Green JR: Chemical and biological prerequisites for novel bisphosphonate molecules: Results of comparative preclinical studies. *Semin Oncol*, 28(Suppl 6):4–10, 2001.
123. Walter C, Pabst A, Ziabart T, Klein MO, Al-Nawas B: Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Diseases*, 17(2):194-199, 2011.
124. Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sebti S, Ralston SH, Hamilton A, Rogers MJ. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: Inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res*, 15:1467–1476, 2000.
125. Pataki A, Müller K, Green JR: Effects of short term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *Anat. Rec.*, 249:458–68, 1997.
126. Hornby SB, Evans GP, Hornby SL, Pataki A, Glatt M, Green JR: Long Term Zoledronic acid Treatment Increases Bone Structure and Mechanical Strength of Long Bones of Ovariectomized adult rats. *Calcified Tissue international*, 72:519–527, 2003.
127. Jergas M, Glüer C: Assessment of fracture risk by bone density measurements. *Seminars in Nuclear Medicine*, 27(3):261–275, 1997.
128. Moschetta M, Pietro GD, Roberta R, Gnoni A, Mangialardi G, Guarini A, Ditonna P, Musto P, Dauria F, Ricciardi MR, Dammacco F, Ribatti D, Vacca A: Bortezomib and zoledronic acid on angiogenic and vasculogenic activities of bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Eur J Cancer*, (46) 420-9, 2010.
129. Binkley N, Kimmel D, Bruner J, Haffa A, Davidowitz B, Meng C, Schaffer V, Green J: Zoledronate prevents the development of absolute osteopenia following ovariectomy in adult rhesus monkeys. *J Bone Miner Res*, 13:1775–1782, 1998.
130. Moorthy RS, Valluri S, Jampol LM: Drug-induced uveitis. *Surv Ophthalmol.*, 42:557-70, 1998.
131. Malik AR, Campbell SH, Toma NM: Bilateral acute anterior uveitis after alendronate. *Br J Ophthalmol.*, 86: 1443, 2002.

132. Cengaver T, Öksüz H, Güngören A: Aledronat tedavisine bağlı gelişen bir uveit olgusu. *Türkiye Klin J Ophthalmolog.*, 16:67-8, 2007.
133. Keleş T, Avşar AF: Bifosfonatlar ve atriyal fibrilasyon riski. *Türkiye Klin J Cardiovasc Sci*, 21(2), 275-8, 2009.
134. Lanza F: Bisphosphonate mucosal injury – the end of the story?. *Digestive and liver disease*, (35): 67-70, 2003.
135. Elliot SN, Mcknight NM, Mcnaught WK, Wallece JL: Aledronate induces gastric injury and delays healing in rodents. *Life sci.* , (62), 77-91, 1998.
136. Lichtenberger LM, Romero JJ, Blank MA: Effect of bisphosphonates on the surface hydrophobicity phosphotidylcholine concentration of gastric mocosa. *Gastroenterology*, (116) 237, 1999.
137. Hellstein JW, Marek CL: Bisphosphonate Osteochemonecrosis (Bis-phossy jaw): Is this phossy jaw of the 21st century? *J Oral Maxillofac Surg.*, 63: 682-9, 2005.
138. Editor's Note: Phosphorus necrosis under control. *B Dent J.*, 76: 343, 1944.
139. Marx RE, Stern DS: Biopsy principles and techniques. *Oral and Maxillofacial Pathology: A Rationale for Diagnosis and Treatment*. Chicago: Quintessence; 36-38, 2002.
140. Marx RE: Oral & intravenous bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. Quintessence Book; 2007.
141. Dannemann C, Gratz KW, Reiner MO, Zwahlen RA: Jaw osteonecrosis related to bisphosphonate therapy. A severe secondary disorder. *Bone*, (40): 828-34., 2007.
142. Eckert AW, Mauer P, Meyer L, Kriwalsky MS, Rohrberg R, Schneider D, Bilkenroth U, Schbert J: Bisphosphonate-related jaw necrosis- Severe complication in maxillofacial surgery. *Cancer Treatment Reviews*, (33); 58-63, 2007.
143. Vescovi P, Campisi G, Fusco V, Mergoni G, Manfredi M, Merigo E, Solazzo L, Gabriele M, et al: Surgery-triggered and non surgery-triggered Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ): A retrospective analysis of 567 cases in an Italian multicenter study. *Oral Oncol.*, 47(3):191-4, 2011.
144. Kapitola J, Zak J, Lacinova Z, Justova V: Effect of growth hormone and pamidronate on bone blood flow, bone mineral and IGF-I levels in the rat. *Physiol. Res.*, 49(Suppl 1):101-6, 2000.
145. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB: Perspective: Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone*, (41):318-20, 2007.
146. Scheper MA, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF: A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 3:6, 2010.
147. Dixon RB, Tricker ND, Garetto LP: Bone turnover in elderly canine mandible and tibia. *J Dent Res.*, 76:336, 1997.
148. Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, Pessin-Minsley M, Pfail J, Stock RG, Kogan R: Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws, bone markers, and a hypothesized candidate gene. *J Oral Maxillofac Surg.*, 67:159-61, 2009.
149. Arduino PG, Menegatti E, Scoletta M, Battaglio C, Mozzati M, Chiecchio A, Berardi D, Vandone AM, Donadio M, Gandolfo S, Scully C, Broccoletti R. : Vascular endothelial growth factor genetic polymorphism and haplotypes in female patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Pathol Med*. Jan 20. 2011, e-pub.
150. Sarasqueste ME, Gonzalez M, San Miquel JF, Garcia-Sanz R: Bisphosphonate-related osteonecrosis: genetic and acquired risk factors. *Oral Dis.*, 15(6): 382-7, 2009.

151. Bamias A, Kastiritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, Koutsoukou V, Gika D, Anagnostopoulos A, Papadimitriou C, Terpos E, Dimopoulos MA: Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: Incidence and risk factors. *J Clin Oncol.*, 23: 8580-87, 2005.
152. Badros A, Weikel D, Salama A, et al: Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: Clinical features and risk factors. *J Clin Oncol.*, 24: 945, 2006.
153. Crepin S, Laroche ML, Sarry B, Merle L: Osteonecrosis of the jaw induced by clodronate, an alkylbisphosphonate: case report and literature review. *Eur J Clin Pharmacol.* 66(6):547-54, 2010.
154. Montazari AH, Erskine JG, Mc Quaker IG: Oral sodium clodronate induced osteonecrosis of the jaw in a patient with myeloma. *Eur J Haematol.* 79(1):69-71, 2007.
155. Hoff AO, Toth BB, Altundag K, et al: Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous bisphosphonate therapy. *J Clin Oncol 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings (post meeting addition).* 24:8528, 2006. Available at http://meeting.jco.org/cgi/content/abstract/24/18_suppl/8528.
156. Bedogni A, Saia g, Ragazzo B, Capelli P, Dalessandro E, Nocini PF, Lo Muzio, Blandamura S: Bisphosphonate-associated osteonecrosis can hide jaw metastases. *Bone.*, 41: 942-5, 2007.
157. Rizzoli R, Burlet N, Cahal D, Delmas PD, Eriksen EF, Felsenberg D, Grbic J, Jontell M, Landesberg R, Laslop A, Wollenhaupt M, Papapoulos S, Sezer O, Sprafka M, Reginster J:(Çev. Vural CA). Çene kemiğinin osteonekrozu ve osteoporoz için bifosfonat tedavisi. *Bone*, (1): 59-66, 2009.
158. Ruggerio SL, Drew SJ: Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonate therapy. *J Dent Res.*, (86), 1013-21, 2007.
159. Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis: Risk Factors, Prediction of Risk Using Serum CTX Testing, Prevention, and Treatment. *J Oral Maxillofac Surg.*, 65:2397-2410, 2007.
160. Durie BG, Katz M, Crowley J: Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med.*, 353(1):99-102, 2005.
161. Wang EP, Kaban LB, Strewler GJ, Raje N, Troulis MJ: 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):1328-31, 2007.
162. Hoff AO, Toth BB, Altundağ K, Johnsonn MM, Warneke CL, Hu M. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res.*, 23: 826-36, 2008.
163. Bilezikian JP: Osteonecrosis of the jaw—do bisphosphonates pose a risk? *N Engl J Med.*, 355:2278–81, 2006.
164. Mavrokki T, Cheng A, Stein B, Goss A: Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg.*, 65: 415-23, 2007.
165. Melo M.D, Obeid G. Osteonecrosis of the maxilla in a patient with a history of bisphosphonate therapy. *J Can Dent Assoc.*, 71(2) : 111-3, 2005.
166. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. *J Am Dent Assoc.*, Vol 136, No 12:1658–1668, 2005.
167. Lam DK, Sandor GKB, Holmes HI, Evans AW, Clokie CML. A review of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management. *JCDA (www.cda-adc.ca/jcda)* 2007; 73: no.5.

168. Ruggerio SL, Fantasia J, Carlson E: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 102: 433-9, 2006.
169. Spraridans RW, Twiss IM, Talbot S: Bisphosphonates in bone diseases. *Pharm World Sci.*, 20: 206-13, 1998.
170. Rodan GA, Fleisch HA: Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest.*, 97: 2692-6, 1996.
171. Senel FC, Kadioglu MD, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersöz S, Gunhan O: Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 109:385-391, 2010.
172. Werner S, Krieg T, Smola H: Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.*, 127, 998-1008, 2007.
173. Kyrgidis A, Triaridis S, Antoniadis K: Effects of bisphosphonates on keratinocytes and fibroblasts having a role in the development of osteonecrosis of the jaw. *Bioscience Hypot.*, (2):153-59, 2009.
174. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S: Inhibition of oral mucosa cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.*, 2:34-6, 2008.
175. Ganguli A, Steward C, Butler SL, Philips GJ, Meikle ST, Lloy: Bacterial adhesion to bisphosphonate coated hydroxiapatite. *J Mater Sci Mater Med.*, 16:283-7, 2005.
176. Kos M, Luczak K. Bisphosphonates promote jaw osteonecrosis through facilitating bacterial colonisation. *Biosci Hypot.*, 2: 34-6, 2009.
177. Kumar SK, gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW, Sedghizadeh PP. The role of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Curr Osteoporos Rep.*, 8(1):40-8, 2010.
178. Naik NH, Russo TA: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the role of actinomyces. *Clin Infect Dis.*, 49(11):1729-32, 2009.
179. Christian CA: General principles of fracture treatment. In: Canale ST (ed) *Campbell's Operative Orthopaedics*. 9 th ed. St Louis: Mosby, 1998: pp.1993–2041.
180. Özmen S: İnaktivite osteoporozunun önlenmesinde zoledronik asitin etkinliği. Uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bak. Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hast., İstanbul 2006.
181. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blascke S, Grundker C, Hofbauer LC: Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 291:680-686, 2002.
182. Nishida S, Tsubaki M, Hoshino M, Namimatsu A, Uji H, Yoshioka S, Tanimori Y, Yanae M, Iwaki M, Irimajiri K: Nitrogen-containingbisphosphonate, YM529/ONO-5920, inhibits RANKL expression in a cultured bone marrow stromal cell line ST2. *Bioch Biophys Res Com.*, 328:91-97, 2005.
183. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, Zannettino AC: The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TACE. *J Bone Miner Res.*, 19: 147-54, 2004.
184. Koch FP, Merkel C, Ziebart T, Smeets R, Walter C, Al-Nawas B: Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *J Craniomaxillfac Surg*. Oct 26, 2010, e-pub.

185. Fernandez M, Pino AM, Figueroa P, Rodriguez J: The increased expression of RANKL of multiple myeloma bone marrow stromal cells is inhibited by the bisphosphonate ibandronate. *J Cellular Biochemistry*, 111:130-7, 2010.
186. Martini G, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, Franci MB, Campagna S, Avanzati A, Paola V, Valleggi F, Nuti R: Serum Opg and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone* 40:457-63, 2007.
187. Mountzios G, Terpos E, Syrigos K, Papadimitriou C, Papadopoulos G, Bamias A, Mavrikakis M, Dimopoulos MA: Markers of bone remodeling and skeletal morbidity in patients with solid tumors metastatic to the skeleton receiving the bisphosphonate zoledronic acid. *Transl Res.*;155(5):247-55, 2010.
188. Tipton DA, Seshul BA, Dabbous MK: Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and IL-6. *J Perio Res.*, 46(1):39-47, 2011.
189. Mossetti G, Rendina D, Flippo G, Viceconti R, Domenico G, Cioffi M, Postiglione L, Nunziata V: Interleukin-6 and osteoprotegerin systems in Paget's disease:relationship to risedronate treatment. *Bone*, 36:549-56, 2005.
190. Yıldırım NC, Yürekli M: The effect of adrenomedullin and cold stress on IL-6 levels in some rat tissues. *Clin Exp Immunol*, 161(1) 171-5, 2010.
191. Maes M, Lin A, Delmeire L, Gastel AV, Kenis G, Jongh R, Bosmans E: Elevated serum IL-6 and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol Psch*, 45(7) 833-39, 1999.

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa Çankaya 15.04.1981 tarihinde Trabzon’da doğdu. İlköğrenimini 1992’de 24 Şubat İlköğretim okulunda tamamladı. Ortaokul ve Liseyi Trabzon Kanuni Anadolu Lisesinde okudu. 2000-2005 tarihleri arasında Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesinde yüksek öğrenimini tamamladı. 2005 yılında K.T.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A.D.’na araştırma görevlisi olarak atandı ve halen aynı anabilim dalında çalışmalarını yürütmektedir.