

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI**



**BİFOSFONAT UYGULANAN RATLARDA DİŞ ÇEKİMİ SONRASI
LOKAL VE SİSTEMİK MELATONİN UYGULAMASININ
KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Canan Gökçe KULFEL

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Hilal ALAN**

Uzmanlık Tezi 2020

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI**

**BİFOSFONAT UYGULANAN RATLARDA DİŞ ÇEKİMİ
SONRASI LOKAL VE SİSTEMİK MELATONİN
UYGULAMASININ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Canan Gökçe KULFEL

**Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Hilal ALAN**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDH-2019-1862 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2020**

UZMANLIK TEZİ TUTANAĞI

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı uzmanlık öğrencisi Araştırma Görevlisi Dt. Canan Gökçe KULFEL 'in 'Bifosfonat Uygulanan Ratlarda Diş Çekimi Sonrası Lokal ve Sistemik Melatonin Uygulamasının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi' isimli tezi 16.06.2020 tarihinde aşağıda isimleri yer alan jüri tarafından incelenerek başarılı bulunmuş ve kendisinin sınava alınmasına karar verilmiştir.

Doç. Dr. Ümit YOLCU

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Hilal Alan

İnönü Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi

Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Jüri Üyesi (Danışmanı)

Doç. Dr. Mahmut KOPARAL

Adıyaman Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi

Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Fatih ÖZÜPEK

Fırat Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Jüri Üyesi

ONAY

Bu çalışma yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun bulunarak uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Alaattin POLAT

İnönü Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kemik Dokusu	5
2.1.1. Kemik Matriksi	5
2.1.2. Kemik Tipleri.....	6
2.1.3. Kemik Hücreleri	8
2.1.4. Periosteum ve Endosteum.....	10
2.1.5. Kemik Oluşumu ve Kemikleşme Tipleri	10
2.1.6. Kemik Büyümesi ve Yeniden Şekillenme (Remodelling).....	11
2.1.7. Kemik Doku İyileşmesi	12
2.1.8. Kemik Metabolizmasını Etkileyen Düzenleyici Faktörler	13
2.1.9. Alveolar Kemik.....	15
2.1.10. Yara İyileşmesi	16
2.2. Bifosfonatlar	18
2.2.1. Bifosfonatların Tarihçesi	18
2.2.2. Bifosfonatların Kimyasal Özellikleri.....	19
2.2.3. Bifosfonatların Farmakolojik Özellikleri.....	22
2.2.4. Bifosfonatların Endikasyonları ve Klinik Kullanım Alanları.....	23
2.2.5. Bifosfonatların Etki Mekanizması	24
2.2.6. Bifosfonatların Yan Etkileri.....	26
2.2.7. Bifosfonata Bağlı Çene kemiği Nekrozu (BRONJ).....	27
2.3. Melatonin	38
2.3.1. Pineal Bez	38
2.3.2. Melatoninin Biyosentezi ve Metabolizması	41
2.3.3. Melatoninin Etki Mekanizması.....	44
2.3.4. Melatoninin Biyolojik Etkileri.....	45

3. MATERYAL VE METOT	51
3.1. Deney Hayvanları	51
3.2. Çalışma Grupları.....	51
3.3. Bifosfonat Dozu ve Uygulanma Yolu	53
3.4. Diş Çekimi Yöntemi	54
3.5. Melatonin Dozu ve Uygulanması	56
3.5.1. Lokal Melatonin.....	56
3.5.2. Sistemik Melatonin	57
3.6. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Çekim Soketi Bölgesinin Çıkarılması.....	59
3.7. Histolojik Teknikler ve Analizler	59
3.7.1. Histolojik Doku Takibi	59
3.7.2. Histolojik Boyama	60
3.7.3. Histolojik Analizler.....	61
3.8. İstatistiksel Değerlendirme	62
4. BULGULAR.....	64
4.1. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi	64
4.1.1. Genel Histolojik Yapının Değerlendirilmesi	64
4.1.2. VEGF İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi.....	71
4.1.3. Osteokalsin İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi	74
4.2. Histolojik Bulguların İstatistiksel Değerlendirmesi	76
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	110
KAYNAKLAR	112
EKLER.....	137
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	137
EK-2. ETİK KURUL ONAYI.....	138

TEŞEKKÜR

Cerrahi eğitimim boyunca değerli bilgilerinden yararlandığım, klinik çalışmalara teşvik eden, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen ve tezimin her aşamasında yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Hilal ALAN' a,

Gerek mesleki gerekse hayata dair bana öğrettiklerinden her zaman minnet duyacağım kıymetli hocam Sn. Doç. Dr. Ümit YOLCU' ya,

Çalışmamın olgunlaşması ve gerçekleşmesi sürecinde samimiyet ve güler yüzlülükle bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam Sn. Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR' a ve Sn. Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN' a,

Yoğun çalışma temposuna rağmen bu tezin histolojik bulgularının değerlendirilmesindeki ve yorumlanmasındaki emeklerinden ötürü Sn. Prof. Dr. Nigar VARDI ve Sn. Dr. Öğr. Üyesi Azibe YILDIZ' a,

Çalışmamın deney aşaması dâhil olmak üzere eğitimim süresince maddi manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim ağabeylerim Dt. Burakhan Hakan TANIŞIK ve Dt. Aykut AKSAN' a,

Tezim için maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne,

Hayatımın tüm iniş çıkışlarında maddi manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen, sevgilerini her zaman en derinden hissettiğim, benimle gülüp benimle üzülen, sadece mesleğimi değil beni ben yapan tüm değer yargılarını bana bir bir kazandıran, arkama dönüp baktığımda benim için hep orda olacaklarını bilmenin verdiği güven sayesinde sağlam adımlarla ilerlediğim, varlıklarıyla hayatımı yaşanılabilir kılan en büyük şansım sevgili AİLEME,

Teşekkür ederim

Arş. Gör. Canan Gökçe KULFEL

ÖZET

Bifosfonat Uygulanan Ratlarda Diş Çekimi Sonrası Lokal Ve Sistemik Melatonin Uygulamasının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Amaç: Çalışmamızın amacı bifosfonat uygulanan ve diş çekimi yapılan ratlarda sistemik ve lokal melatonin uygulamasının çekim soket iyileşmesi üzerine etkilerini histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelemektir.

Materyal ve Metot: Çalışmada 44 adet Wistar Albino cinsi rat kullanılmıştır. Denekler 11 rattan oluşan 4 gruba ayrılmıştır: Kontrol (K), Bifosfonat (BİF), Bifosfonat+Lokal Melatonin (BİF+LM), Bifosfonat+Sistemik Melatonin (BİF+SM). Kontrol grubu dışındaki tüm gruplara deneyin başından itibaren haftada 1 defa intraperitoneal olarak (0,4 mg/kg) zoledronik asit uygulanmıştır. Deneyin 28. gününde tüm deneklerin sol alt 1. büyük azı dişleri çekilmiştir. Lokal (1,2 mg) ve sistemik melatonin (10 mg/kg) diş çekimi sonrası hemen uygulanmaya başlanmıştır. Tüm denekler deneyin 56. günü sakrifiye edilmiştir. Deneklerin sol mandibulaları çıkartılıp histopatolojik olarak incelenmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Elde edilen bulgulara göre BİF+LM ve K gruplarındaki epitelizasyon BİF ve BİF+SM gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.001$, $p=0.006$, $p<0.001$, $p<0.001$). Osteonekroz değerlerinin K, BİF+LM ve BİF+SM gruplarında BİF grubundan, BİF+LM ve BİF+SM gruplarında ise K grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). K, BİF+LM ve BİF+SM gruplarının infalamasyon değerleri BİF grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.006$). İmmünohistokimyasal incelemede osteokalsin değerlerinin K, BİF+LM ve BİF+SM gruplarında BİF grubundan, BİF+LM grubunda ise BİF+SM ve K gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.023$). VEGF düzeylerinin K, BİF+LM ve BİF+SM gruplarında BİF grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$).

Sonuçlar: Elde ettiğimiz histopatolojik ve immünohistokimyasal bulguları değerlendirdiğimizde tüm gruplarda melatonin uygulamasının kemik iyileşmesindeki olumlu etkisinin antiinflamatuvar özelliğine, anjiyogenez ve yeni kemik oluşumunda artış sağlamasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu durum melatoninin uygulamasının BRONJ tedavisi ve oluşumunun engellenmesinde umut vadeden bir ajan olacağını düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Bifosfonat, diş çekimi, melatonin, rat.

ABSTRACT

Evaluation of Local and Systemic Application of Melatonin on Bone Recovery After Tooth Extraction in Bisphosphonate Applied Rats

Aim: The purpose of our study was to investigate the effects of systemic and local application of melatonin after tooth extraction in bisphosphonate applied rats, on the healing of extraction socket histopathologically and immunohistochemically.

Materials and Method: 44 Wistar Albino rats were included in the study. Subjects were divided into 4 groups each consists of 11 rats. Control (C) group, Bisphosphonate (BİF) group, Bisphosphonate + Local Melatonin (BİF+LM) group and Bisphosphonate + Systemic Melatonin (BİF+SM) group. Zoledronic acid (0.4 mg/kg) was applied intraperitoneally once a week from the beginning of the experiment to all the groups except control group. On the 28th day of the experiment lower left first molar tooth were extracted in all subjects. Local (1.2 mg) and systemic melatonin (10 mg/kg) were applied immediately after tooth extraction. All subjects were sacrificed on the 56th day of the experiment. Left mandible of the subjects were removed and examined histopathologically. Data were evaluated statistically.

Results: According to the results, epithelization in BİF+LM groups was significantly higher statistically than epithelization in BİF and BİF+SM groups ($p=0.001$, $p=0.006$, $p<0.001$, $p<0.001$). It was determined that, osteonecrosis values were significantly lower ($p<0.001$) than BİF groups in K, BİF+LM and BİF+SM groups and lower than K group in BİF+LM and BİF+SM groups respectively. İnflamation values were found significantly lower in K, BİF+LM and BİF+SM groups than BİF group ($p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.006$). When examined immunohistochemically, osteocalcin values were significantly higher than BİF groups in K, BİF+LM and BİF+SM groups and higher than BİF + SM and K groups in BİF + LM groups statistically. ($p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.023$). The levels of VEGF were determined to be significantly higher than BİF group in BİF+LM and BİF+SM groups statistically ($p<0.001$).

Conclusions: After evaluating the histopathologic and immunohistochemical results, we concluded that the positive effect of melatonin application on bone recovery in all four groups was due to the anti-inflamatuary property of the agent, anjyogenesis and increase in new bone formation capacity. Application of melatonin is considered to be a promising approach in the treatment and in preventing the formation of BRONJ.

Keywords: Bisphosphonate, melatonin, rat, tooth extraction.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
μm	: Mikrometre
AAOMS	: Amerika Oral ve Maksillofasiyal Cerrahlar Birliği (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons)
ATP	: Adenosine triphosphate (Adenozin trifosfat)
BİF	: Bifosfonat
BMP	: Kemik morfogenetik proteini (Bone morphogenetic protein)
BRONJ	: Bifosfonatla bağlı çene kemiği nekrozu
BT	: Bilgisayarlı tomografi
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat (Cyclic adenosine monophosphate)
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat (Cyclic guanosine monophosphate)
COX-1,2	: Siklooksijenaz-1,2 (Cyclooxygenase-1,2)
CTX	: C-terminal telopeptit
DDLT	: Düşük doz lazer terapisi
ELİSA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
HA	: Hidroksi apatit
HBO	: Hiperbarik oksijen
H-E	: Hematoksilen-Eozin
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor)
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
kg	: Kilogram
K	: Kontrol
LHRH	: Lüteinleştirici hormon salgılatan hormon (Luteinising hormone-releasing hormone)
LM	: Lokal melatonin

mg	: Miligram
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
MSC	: Mezenkima kök hücre (Mesenchimal stem cell)
MRONJ	: İlaça bağlı çene kemiklerinde nekroz (Medication related osteonecrosis of the jaw)
OPG	: Osteoprotegerin
OH⁻	: Hidroksil iyonu
PRP	: Plateletten zengin plazma (Platelet rich plasma)
PRF	: Plateletten zengin fibrin (Platelet rich fibrin)
PTH	: Parathormon
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü (Platelet derived growth factor)
RANK	: Reseptör aktivatör nükleer kappa b
RANKL	: Reseptör aktivatör nükleer kappa b ligandı
SM	: Sistemik melatonin
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü (Transforming growth factor)
TNF	: Tümör nekrotizan faktör
TSH	: Tiroid salgılatan hormon (Thyroid stimulating hormone)
VEGF	: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No.	Sayfa No.
Şekil 2.1. Kemik dokusu.....	7
Şekil 2.2. Pirofosfat molekül yapısı, bifosfonat molekül yapısı.....	19
Şekil 2.3. 1. kuşak, R2 yan zincirinde primer, sekonder veya tersiyer pozisyonda nitrojen içeren 2.kuşak ve R2 yan zincirinde heterosiklik halkaya sahip 3. Kuşak	21
Şekil 2.4. Pineal bez	39
Şekil 2.5. Melatoninin biyosentezi	40
Şekil 2.6. Melatoninin sentez basamakları	42
Şekil 2.7. Kemik hücreleri üzerinde melatoninin etki mekanizması (A) Melatonin MT2 reseptörü yoluyla mezenkimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını sağlar; (B) osteoblastların OPG üretimini indükler ve böylece RANKL' nin preosteoklastlara bağlanmasını engelleyerek osteoklast dönüşümünü inhibe eder; (C) antioksidan özellikleri sayesinde serbest radikalleri temizler ve kemik yıkımını engeller	46
Şekil 3.1. Deney protokolü	53
Şekil 3.2. Zoledronik asit ve intraperitoneal uygulaması	54
Şekil 3.3. Anestezi sağlamak amacı ile kullanılan ilaçlar	55
Şekil 3.4. Diş çekimi için kullanılan steril aletler.....	55
Şekil 3.5. Deneklerin dişlerinin eğri uçlu hemostat ile çekilmesi	56
Şekil 3.6. Lokal melatonin uygulaması	57
Şekil 3.7. Melatonin.....	58
Şekil 3.8. Hassas terazi	58
Şekil 3.9. Vorteks cihazı.....	58
Şekil 4.1. Kontrol Grubu: Ekstraksiyon soketinin genel görünümü. Kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), granülasyon dokusu (dört köşeli yıldızlar), ekstraksiyon yüzeyini tamamen örten epitel dokusu (oklar). H-E; 4x.	64
Şekil 4.2. Kontrol Grubu: Keratinize çok katlı yassı epitel dokusu (oklar), granülasyon dokusu (dört köşeli yıldız), kemik dokusu (beş köşeli yıldız). H-E; 10x.....	65

Şekil 4.3. Kontrol Grubu: Lakünelarda yerleşik, bazofilik boyanmış nükleuslu osteositler (ok başları), normal histolojik görünümüne sahip kemik dokusu. H-E; 20x.....	65
Şekil 4.4. BİF Grubu: Ekstraksiyon socketinin genel görünümü. Nekrotik kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), inflamatuvar hücre infiltrasyonunun bulunduğu granülasyon dokusu (dört köşeli yıldızlar), epitelizasyonun gerçekleşmediği ekstraksiyon yüzeyi (oklar). H-E; 4x.....	66
Şekil 4.5. BİF Grubu: İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başları), nekrotik kemik dokusu (beş köşeli yıldızlar). H-E; 10x.....	67
Şekil 4.6. BİF Grubu: Nekrotik kemik dokusu, osteosit içermeyen boş lakünalar (oklar başları). H-E; 20x.....	67
Şekil 4.7. BİF+LM Grubu: Ekstraksiyon socketinin genel görünümü. Kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), granülasyon dokusu (dört köşeli yıldızlar), ekstraksiyon yüzeyini örten ince kalınlıktaki epitel dokusu (oklar). H-E; 4x.....	68
Şekil 4.8. BİF+LM Grubu: İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başları), kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), ekstraksiyon yüzeyini örten ince kalınlıkta epitel dokusu (oklar). H-E; 10x.....	69
Şekil 4.9. BİF+LM Grubu: Osteosit içermeyen boş lakünalar (oklar), bazofilik boyanmış nükleuslu osteositler (ok başları). H-E; 20x.....	69
Şekil 4.10. BİF+SM Grubu: Ekstraksiyon socketinin genel görünümü. Kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), inflamatuvar hücre infiltrasyonunun olduğu granülasyon dokusu (dört köşeli yıldızlar), epitelizasyonun gerçekleşmediği ekstraksiyon yüzeyi (oklar). H-E; 4x.....	70
Şekil 4.11. BİF+SM Grubu: İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başları), sağlıklı kemik dokusu (beş köşeli yıldızlar). H-E; 10x.....	70
Şekil 4.12. BİF+SM Grubu: Osteosit içermeyen lakünalar (oklar), bazofilik boyanmış nükleuslu osteositler (ok başları). H-E; 20x.....	71
Şekil 4.13. Kontrol Grubu: Osteositlerde ve granülasyon dokusunda kavrengimsi olarak izlenen VEGF immünreaktivitesi (oklar). VEGF immün boyama; 20x.....	72
Şekil 4.14. BİF Grubu: VEGF immünreaktivitesi (oklar). VEGF immün boyama; 20x.....	72

Şekil 4.15. BİF+LM Grubu: VEGF immünreaktivitesi (oklar). VEGF immün boyama; 20x.....	73
Şekil 4.16. BİF+SM Grubu: VEGF immünreaktivitesi (oklar). VEGF immün boyama; 20x.....	73
Şekil 4.17. Kontrol Grubu: Osteositlerde ve granülasyon dokusunda kavrengimsi olarak izlenen osteokalsin immünreaktivitesi (oklar). Osteokalsin immün boyama; 20x.....	74
Şekil 4.18. BİF Grubu: Osteokalsin immünreaktivitesi (oklar). Osteokalsin immün boyama; 20x.....	75
Şekil 4.19. BİF+LM Grubu: Osteokalsin immünreaktivitesi (oklar). Osteokalsin immün boyama; 20x.....	75
Şekil 4.20. BİF+SM Grubu: Osteokalsin immünreaktivitesi (oklar). Osteokalsin immün boyama; 20x.....	76
Şekil 4.21. Gruplar arasında osteonekroz değerlerinin grafiksel gösterimi	78
Şekil 4.22. Gruplar arasında inflamasyon değerlerinin grafiksel gösterimi	78
Şekil 4.23. Gruplar arasında epitelizasyon değerlerinin grafiksel gösterimi.....	79
Şekil 4.24. Gruplar arasında VEGF değerlerinin grafiksel gösterimi	81
Şekil 4.25. Gruplar arasında osteokalsin değerlerinin grafiksel gösterimi.....	81

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No.	Sayfa No.
Tablo 2.1. R2 zincir yapısındaki farklılığa göre bifosfonatların sınıflandırılması.....	20
Tablo 2.2. BRONJ evreleri.....	32
Tablo 2.3. BRONJ tedavi protokolü	35
Tablo 3.1. Gruplara göre medikal ajanların uygulama dozu, süresi ve yolu	52
Tablo 3.2. Histolojik doku takibi işlem basamakları	59
Tablo 3.3. Mayer's H-E boyama metodu basamakları	60
Tablo 3.4. İmmünohistokimyasal boyama metodu basamakları.....	61
Tablo 4.1. Her bir grubun osteonekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve epitelizasyon skor sonuçları, med(min-max).....	76
Tablo 4.2. Gruplar arası histopatolojik değerlendirmelerin ikili karşılaştırmala	77
Tablo 4.3. Her bir grubun VEGF ve osteokalsin immünreaktivite skor sonuçları, med (min-max).....	79
Tablo 4.4. Gruplar arası immünohistokimyasal değerlendirmelerin ikili karşılaştırmaları	80

1. GİRİŞ

Diş çekimi diş hekimliğinde en sık uygulanan tedavilerin başında gelmektedir. Farklı sağlık durumlarına sahip olan birçok hastadan diş çekimi yapılmaktadır. Diş çekimi sonrasındaki süreci sorunsuz olarak geçirmek yara iyileşmesini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyen pek çok faktörü önemli hale getirmiştir. Diş çekim yarasının iyileşmesi kısaca çekim boşluğunda hematoma oluşması, pıhtının organizasyonu, yara yüzeyinin epitelizasyonu, çekim boşluğunda örgü kemiğin oluşumu, örgü kemiğin trabeküler kemik ile yer değiştirmesi ve alveol kemiğin yeniden şekillenmesi gibi aşamalardan meydana gelmektedir (1). Bu iyileşme süreci sağlıklı bireylerde genellikle sorunsuz olmakla birlikte çeşitli sebeplerle immün sistemi baskılanan, diyabeti ya da metabolik kemik rahatsızlığı bulunan hastalarda bozulabilir ya da gecikebilir. Bunun yanında iyileşme üzerinde, çeşitli metabolik ilaçların kullanımı, enfeksiyon varlığı, hastaların yaşı, sağlığı ve sigara kullanımı gibi bazı önemli faktörlerin de etkisi bulunmaktadır (2-4). Kemik iyileşme kapasitesinin azaldığı durumlarda kemik rezorpsiyonunun azaltılması, kemik iyileşmesi ve kemik metabolizmasının kontrolü için önemli bir faktör teşkil etmektedir. Bu sebeplerden ötürü kemik rezorpsiyonunu kontrol eden ve kemik depozisyonunu artıran bifosfonat ve paratiroid hormonu (PTH) gibi lokal ve sistemik olarak uygulanabilen birçok ajan kullanılmaktadır (3,5).

Bifosfonatlar, 10 yıldan fazla süredir osteoklastik aktivite üzerinde inhibitör etkileri ve antianjiyogenik özellikleri nedeniyle kemik metastazlarıyla seyreden meme, prostat, akciğer kanserlerinin, multiple myeloma gibi malignitelerin, osteoporoz, osteopeni, Paget hastalığı ve osteogenezis imperfekta gibi sistemik sağlık sorunlarının tedavisinde kullanılmaktadır (6).

Bifosfonatlar doğrudan kemik metabolizması üzerine etki ederek kemik yıkımından sorumlu osteoklastik aktiviteyi inhibe eder ve apoptozunu engellerler. Ayrıca ekstrasellüler matriksteki tümör hücrelerinin tutulumunu, tümörün invazyonunu engelleme ve tümör hücrelerinin apoptozunu sağlama gibi antitümör etkileri de bulunmaktadır (7). Bifosfonatların kemiğe spesifik afinitesi vardır, bu yüzden yeni oluşan kemikte ve osteoklastların yakınında çökelirler. Bifosfonatlar aynı zamanda vasküler obliterasyona neden olan anjiyogenezisi engelleyecek aktiviteye sahiptirler (8).

Günümüzde tedavi edici etkilerinden dolayı sıklıkla uygulanan, etkin ve güvenilir ilaçlar olarak bilinen bifosfonatlar, atriyal fibrilasyon, akut faz reaksiyonları, renal yetmezlik ve özellikle nitrojen içeren türevlerinin damar yoluyla uygulandığı durumlarda çene kemiklerinde osteonekroz gibi istenmeyen klinik tablolara neden olmaktadır (9). Bifosfonat grubu ilaçların önemli yan etkilerinden bir tanesi olan çene kemiği osteonekrozuna ait ilk vaka raporu 2003 yılında Marx ve ark. tarafından yayınlanmıştır (10). Bu tarihten itibaren giderek artan vaka raporları bildirilmiştir.

Artan sıklıkta görülen bu ciddi yan etkinin tedavisinde standardizasyon sağlanması ve vakaların sağlıklı değerlendirilmesi amacıyla 2009 yılında American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) tarafından bu patolojik durum bifosfonatlara bağlı çene kemiği nekrozu (BRONJ) olarak adlandırılmıştır (11). Daha sonraki dönemlerde hastalığın sadece bifosfonat kullanımında değil farklı antirezortif (denosumab) ve antianjiyogenik (bevasizumab) ilaçların kullanımından sonra da görüldüğünün ortaya çıkmasıyla birlikte AAOMS 2014 yılında yeni bir bildiri yayınlamış ve hastalığın ismini ilaca bağlı çene kemiklerinde nekroz (MRONJ) olarak değiştirmiştir. Bu bildiride çenelerde metastatik bir hastalık veya çenelere uygulanmış radyoterapi hikayesi bulunmayan, önceden ya da şu anda antirezortif veya antianjiyogenik ajan tedavisi görmüş/görmekte olan hastalarda, mandibulada veya maksillada 8 haftadan uzun süredir mevcut olan ağız içi/ağız dışı fistül aracılığıyla ulaşılabilen kemik veya iyileşmeyen ekspoze kemik varlığı olarak tanımlanmıştır (12).

BRONJ' un bildirilen güncel tedavi yaklaşımları hastada var olan yumuşak ve sert dokuları etkileyen, ağrı, şişlik, iltihap akıntısı, hassasiyet gibi şikayetleri geçirmeye ya da azaltmaya, kemik nekrozu gibi bulguları ortadan kaldırmaya ve hastanın yaşam kalitesini yükseltmeye dayanmaktadır. Bu yöntemler BRONJ' un hangi evrede olduğuna göre değişiklik göstermekle birlikte medikal veya medikal-cerrahi tedavileri içermektedir. Son yıllarda bu tedavi yöntemlerine ek olarak hiperbarik oksijen (HBO), plateletten zengin plazma (PRP), plateletten zengin fibrin (PRF), medikal ozon, PTH ve düşük doz lazer terapisi (DDLTL) gibi destekleyici bazı tedavi yöntemleri de kabul görmeye başlamıştır (13–15).

Bifosfonata bağlı çene kemiği osteonekrozu hastanın yaşam kalitesini düşüren olumsuz bir tablo olduğundan tedavisi önem arz etmektedir. Ayrıca bifosfonatların, kullanım endikasyonu bulunan hastalıkların tedavisindeki yararlı etkileri nedeniyle vazgeçilmez olmaları ve uygulamalarının tamamen kesilmesinin sakıncalı olması,

osteonekrozun tedavisi kadar risk unsurlarının azaltılarak oluşmasının engellenmesine yönelik yöntemleri de önemli hale getirmektedir. Bununla beraber, BRONJ tedavisinde standart bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Önerilen tedavi protokolleri ise her zaman olumlu sonuç vermemekte ve tedavi sonrası BRONJ varlığı devam etmekte hatta daha ileri evrede, daha geniş osteonekroz alanlarıyla karşı karşıya kalınabilmektedir. Bu nedenle BRONJ tedavisinde uygulanan medikal ve/veya cerrahi tedavilerin haricinde kemik ve yumuşak doku iyileşmesini olumlu yönde etkileyeceği düşünülen yeni yöntem ve ajanlar araştırılmalıdır.

Melatonin ışığın olmadığı durumlarda pineal bezden salgılanan, uyku, sirkadyen ritim, immünite ve üreme gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde etkisi olan bir hormondur. Melatonin pineal bezde sentezlendikten sonra, direkt olarak dolaşıma verilir ve membran reseptörleri sayesinde hedef hücrelerine ulaşır. Lipofilik özelliği sayesinde hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla ulaşabilmektedir (16). Melatoninin başta sirkadyen ritim olmak üzere uyku, duygu durumu, immünite, termoregülasyon, cinsel olgunlaşma ve üreme gibi çeşitli biyolojik olaylarla ilişkisi bildirilmiştir. Buna ek olarak yapılan çalışmalarda antiproliferatif ve antioksidan etkilere sahip olduğu belirtilen melatoninin kanser tedavisinde ve yaşlanmanın önlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (17). Ayrıca melatoninin antienflamatuar, anjiyogenik ve kemik oluşumunu stimüle edici etkileri de bulunmaktadır (18).

Yapılan çalışmalar melatoninin Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)'nin ekspresyonunu arttırarak proanjiyogenik aktiviteyi ortaya çıkardığını bildirmişlerdir. Melatoninin yara iyileşmesi üzerinde ve anjiyogeneziste olumlu etkileri olduğu; dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) ve fibroblast proliferasyonunu stimüle ettiği belirtilmiştir (19).

Melatonin kemik üzerine etkisini; osteoblastların proliferasyonunu ve osteoblastlardan osteoprotegerin (OPG) ekspresyonunu arttırıp reseptör aktivatör nükleer kappa B (RANK)'nin OPG ile bağlanmasını sağlayarak, bunun yanında osteoklast farklılaşma faktörünün inhibisyonu için gen eksprese ederek ve serbest radikalleri ortadan kaldırması sayesinde kemik üzerindeki osteoklast aktivitesini bozarak gösterir (20). Yapılan birçok çalışmada melatoninin kemik formasyonunda ve stimülasyonunda önemli bir aracı madde olduğu, kemik hücrelerinin (osteoblastik

hücreler) proliferasyonunu ve bu hücrelerden kollajen üretimini arttırdığı gösterilmiştir (21). Ayrıca melatoninin sialoprotein ve diğer kemik protein belirteçlerinin (alkalin fosfataz, osteokalsin) gen ekspresyonlarını stimüle ettiği de bilinmektedir (22).

Literatürde melatoninin, BRONJ oluşumu ve tedavisi üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. BRONJ ile ilgili çalışmalara, oluşum sebebi ve mekanizmasının tam olarak anlaşılammış olması ve henüz bilinen bir tedavisinin bulunmaması nedeniyle gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenlerden ötürü, yapılan bu çalışmanın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tüm bu veriler ışığında çalışmamızın amacı, bifosfonatların çene kemiklerindeki yara iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkilerinin araştırılması, lokal ve sistemik olarak uygulanan melatoninin bu olumsuz etkiler üzerindeki etkinliğinin histolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Kemik, iskelet sisteminin ana yapısını oluşturan özelleşmiş bir bağ dokusu şeklindedir. Tıpkı diğer bağ dokularında olduğu gibi hücreler ile hücreler arası matriksten oluşur. Kemiği diğer bağ dokularından ayıran en önemli özellik ise hücreler arası matriksinin mineralleşme ve kalsiyum-fosfat tuzlarıyla doygun hale gelmesidir. Kemik dokusunun üç önemli fonksiyonu vardır:

1. Mekanik fonksiyon; İskelet kaslarının tendonlarına yapışma yeri sağlaması ve bu kasların kasılması ile oluşan kuvvetlerin vücut hareketlerine yön vermesi.

2. Koruyucu fonksiyon; Kraniumdaki merkezi sinir sistemi elemanlarının, toraks boşluğundaki akciğer, kalp gibi hayati iç organların ve diğer yumuşak dokuların korunması, ayrıca bünyesindeki kemik iliği sayesinde hematopoeze (kan hücre yapımına) olanak sağlanması.

3. Metabolik fonksiyon; Kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların depolanması ve bu iyonların vücut sıvılarındaki dengesinin sağlanması.

İskelet, vücuttaki total kalsiyumun yaklaşık % 99' unu, fosforun % 88' ini, magnezyumun % 50' sini içerir ve bu inorganik bileşenler için depo görevi yapar. Kemik dokusu kendisini yapısal olarak yenileyebilen, şeklini, hacmini, içeriğini dıştan gelen mekanik uyaranlar doğrultusunda yönlendirebilen ve yaşam süresince fiziksel kuvvetlere direnç sağlayabilen bir yapıdadır (23).

2.1.1. Kemik Matriksi

Kemik % 65-70 oranında inorganik , % 30-35 oranında ise organik matriks olmak üzere 2 temel bileşenden oluşur (24).

2.1.1.1. Organik Matriks

Kemiğin organik matriksinin % 90-96' sı kollajenden, % 4-10' u ise kollajen olmayan protein yapıdaki esas maddeden oluşmaktadır. Bağ dokusunun temel bileşeni olan kollajen, dokular arasında yapısal farklılıklar gösterir. Organik kemik matriksinin temel yapısı tip 1 kollajen olmakla birlikte az miktarda tip V kollajen ve eser miktarlarda tip III, XI ve XIII kollajen içermektedir. Ayrıca matriks çeşitli sitokinleri, büyüme faktörlerini, glikozaminoglikanları, proteoglikanları; osteokalsin, osteopontin,

osteonektin gibi glikoproteinleri ve sialoproteinleri de bünyesinde barındırır. Osteopontin hücreleri matrikse bağlarken osteonektin kollajen ve hidroksiapatit (HA) kristallerini birbirine yapıştırır. Osteokalsin ise kan yolu ile gelen kalsiyumu yakalar ve osteoklastları stimüle eder. Kemik kollajeni yoğun, az çözünür ve mekanik olarak daha dirençli bir yapıya sahiptir. Bu dirençli ve lifli yapı inorganik matriksin oluşabilmesi için gerekli çerçeveyi oluşturur (24).

2.1.1.2. İnorganik Matriks

Kemiğin inorganik matriksinin en önemli bileşeni HA kristalleridir ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Kemiğin sertlik ve dayanıklılığı inorganik matriks tarafından sağlanır (24).

2.1.2. Kemik Tipleri

Kemik dokusu kollojen liflerinin doku içindeki dağılımı ve organizasyonuna göre primer (woven) kemik ve sekonder (lameller) kemik olacak şekilde iki farklı tipte bulunur.

2.1.2.1. Primer Kemik Dokusu (Woven Kemik)

Primer kemik, prenatal dönemde kan damarlarının etrafındaki osteoprogenitör hücreler tarafından üretilir ve ilk görülen kemik doku olup embriyonik iskeleti oluşturur. Yapısında yeni şekillenmiş düzensiz kollajen fibriller ile az miktarda mineral vardır. Lamel içermez ve birim alana düşen hücre sayısı yüksek olup sekonder kemik dokusundan daha fazla osteosit içerir (25). Esas olarak embriyonel dönemde görülmekle birlikte erişkinlerin kafatası yassı kemikleri ve dişlerin alveol soketlerinde de rastlanılmaktadır (26).

2.1.2.2. Sekonder Kemik Dokusu (Lameller Kemik)

Sekonder kemik dokunun kortikal kemik ve spongios kemik olmak üzere iki farklı tipi bulunmaktadır.

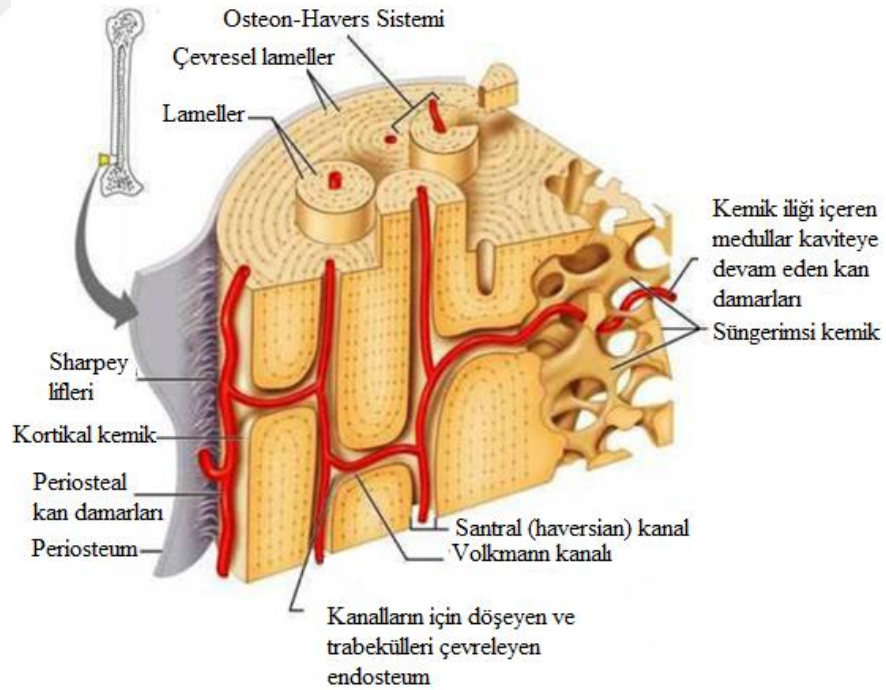
Kortikal Kemik

Kortikal kemik kemiklerin dış yüzeyinde bulunur ve erişkinlerde iskeletin % 80' ini oluşturur. Homojen, sıkı, kompakt bir görünüme sahiptir ve dış kuvvetlere dayanıklı, solid bir dokudur. Mikroskopik incelemede düzenli yerleşim gösteren kanal ve lamel sistemlerine rastlanır. Uzun eksene paralel seyreden kanallar Havers kanalları olarak

adlandırılır. Bunun dışında enine yerleşim gösterip yer yer anastomozlarla birbirine bağlanan, periost altından kemik iliğine kadar uzanan ve böylece bu iki yapı arasında bağlantıyı sağlayan farklı genişlikte Volkman besleyici kanalları da mevcuttur. Bir santral kanal (Havers kanalı) ve etrafını saran dairesel 8-15 adet kemik hücrelerini üzerinde barındıran lamelden oluşan kortikal kemik sistemine Havers sistemi veya osteon adı verilmektedir. Bu sistem, aralarında oblik olarak uzanan Volkmann kanalları aracılığıyla birbirleriyle ilişkilidir. Endosteum ile örtülü her kanal içinde kan damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu bulunur (25).

Spongioz Kemik

Kansellöz kemik de denilen, kemik trabeküllerinin birbirleriyle anastomoz yaparak oluşturduğu süngerimsi bir yapıdır. Kısa ve uzun kemiklerin büyüme uç kısımlarında ve yassı kemiklerin iç kısımlarında yer alır. Osteon bulunmaz, trabekül adı verilen plaklardan oluşur. Trabeküller arasındaki boşluklar içinde kemik iliği ve kan damarları vardır. Kompakt kemiğe göre daha yumuşak ve zayıftır ancak besin maddelerinin taşınması ve sağlamlık konusunda kompakt kemiği destekler. Vücut kemiklerinin hacimsel olarak % 20'sini oluşturur (27).



Şekil 2.1. Kemik dokusu (28)

2.1.3. Kemik Hücreleri

Kemiğin temel hücresel elemanlarını osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler, kemik yüzeyini döşeyen osteoprogenitör hücreler, kemik iliği hücreleri ve kemiğin büyüme ile gelişimini düzenleyen immün sistem hücreleri oluşturur. Osteoblast, osteosit ve osteoprogenitör hücrelerin hepsi aslen osteoblast kökenlidir. Sadece osteoblastların olgunlaşma sırasındaki farklı evrelerini temsil ederler. Monosit-makrofaj gibi progenitör hücreler ise osteoklastları oluştururlar (25).

2.1.3.1. Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör hücreler mezenkim hücrelerinden köken alan, çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Kemiği döşeyen hücreler olarak Havers kanallarında, periostun iç yüzeyinde ve rezorbe olmayan tüm kemik yüzeylerinde bulunurlar (29). Kemiğin normal büyümesi sırasında, kırık iyileşmesi veya farklı tipteki yaralanma gibi kemik yapımının uyarıldığı durumlarda aktive olarak hem sayıca artıp hem de osteoblast gibi kemik yapıcı hücrelere dönüşürlerken, erişkinlerde normal şartlarda inaktif durumdadırlar (30).

2.1.3.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar, embriyonel yaşamda mezenkim hücrelerinden, daha sonra ise bağ dokusunu oluşturan fibroblastlardan farklılaşan hücrelerdir. Metabolik olarak aktif ve olgun olan osteoblastlar kemik oluşumunu sağlarlar. Kemik dokusunun yüzeyine yakın bölgede epitelyum hücrelerini andıran şekilde yan yana dizilirler ve kemikleşme alanlarında, gelişmekte olan kemiklerin periost ile birleşim yerinde bulunurlar. Osteoblastların temel görevi, osteoid adlı organik matriksini, matriks sentezi için gereken proteinleri ve büyüme faktörlerini sentezlemektir. Bunun dışında kalsifikasyon, kemik rezorpsiyonu, kalsiyum ve fosfatın depolanma ve absorpsiyonu gibi pek çok metabolik fonksiyonda rol oynar. Osteoblastlar; PTH, prostaglandinler, D vitamini metabolitleri, kemik morfogenetik proteini (BMP), gonadal ve adrenal steroidler, bazı sitokinler, lenfokinler ve koloni stimule edici faktör için reseptörler bulundurlar. Osteoblastlar salgıladıkları bu osteoid matriks içerisinde gömülü durumda bulunurlar. Kemik yüzeylerinde yeni kemik oluşumu osteoblastlar tarafından gerçekleştirilir. Tüm canlı kemiklerde sürekli devam eden hafif bir osteoblastik aktivite görülür. Osteoblastlar aktif olarak 1 ile 10 hafta arasında yaşarlar ve bu süre boyunca bölünmezler. Yeni aktif kemik oluşumu durduğunda osteoblastların bir kısmı kemik

yüzeyini döşeyen hücreler olarak kalırken bir kısmı ise osteositlere dönüşür. Bu farklılaşma büyüme faktörlerinin salgılanması sonucunda oluşmaktadır (30).

2.1.3.3. Osteositler

Osteositler, olgun osteoblastların kemik dokusu formasyonu sırasında kalsiyum tuzlarının birikmesiyle sertleşen osteoid içinde organellerinin çoğunu kaybederek hapsolmasıyla oluşan hücrelerdir. Olgunlaşmış kemiğin esas hücreleri osteositlerdir. Osteositler, kemik matriksi sentezler ve hücreler arası etkileşimleri sayesinde kemik üzerine gelen fiziksel baskılara ve diğer lokal uyarılara karşı kemiğin yeniden şekillenmesini (remodeling) uyararak kemiği güçlendirirler (25).

2.1.3.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemik iliğindeki monosit ya da makrofaj öncü hücrelerinden köken alan hormonal ve hücrel faktörler tarafından kontrol edilen, çok çekirdekli taraksı yapıda dev fagositik hücrelerdir. Howship lakünü denilen yüzeyel çıkıntılara yerleşmiş olup kemik yıkımını sağlarlar. Kemik rezorpsiyonu başladığında bu bölgelerde kemik yüzeyine yapışır ve hidrolitik enzimler salgılayarak kemik ve kalsifiye olmuş kıkırdak matriksin yıkımını gerçekleştirirler. İçerdikleri Katepsin K adı verilen lizozomal enzimden dolayı asit fosfataza karşı güçlü histokimyasal reaksiyon gösterirler (25), (30). Yüzeylerinde osteoklast-stimule edici faktör, koloni stimule edici faktör-1, OPG ve kalsitonin reseptörleri gibi farklı reseptörler bulunur (31).

Osteoklastlar, osteoblastlarla birlikte kemik turnover'nden ve mekanik streslere bağlı olarak gerçekleşen kemik remodelinginden sorumludurlar. Osteoblastlar tarafından üç farklı sinyal molekülü osteoklastların farklılaşmasını ve düzenlenmesini sağlar. İlki makrofaj koloni oluşturu faktördür. Makrofaj üzerindeki reseptöre tutunur ve osteoklast proliferasyonunun başlamasını sağlar. Böylece RANK reseptörü aktivasyonu sağlanır. Osteoblastik hücrelerden salgılanan ikinci sinyal molekülü RANK ligandı (RANKL) aktive olan reseptöre yapışır ve bir arada bulunan tek çekirdekli fagositlerin birleşerek çok çekirdekli hale gelmelerini sağlar. Salgılanan üçüncü sinyal molekülü ise OPG' dir. Bu molekül RANKL sinyalinin makrofajlara bağlanmasını inhibe eder ve osteoklast diferansiasyonunun kısıtlanmasına yol açar. OPG osteoblastlar dışında başka dokular tarafından da salgılanabilir. Osteoklastlar ayrıca kalsiyumun kemik dokusundan kana salınmasında aktif rol oynarlar ve böylece kalsiyum homeostazının düzenlemesine yardımcı olurlar. Osteoklastların yaşam süresi 3-4

haftadır ve bu süre sonunda programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) uğramaktadırlar (31).

2.1.4. Periosteum ve Endosteum

Kemiğin iç ve dış yüzeyi sırasıyla endosteum ve periosteum denilen bağ dokusu tabakaları ile çevrelenmiştir. Periosteum, dışta fibröz tabaka denilen kollajen lifler ve fibroblastlardan, içte ise osteojenik tabaka olmak üzere iki ayrı tabakadan meydana gelmiştir. Sharpey lifleri tip V kollajeden oluşur ve organik matriks içine girerek periostu kemiğe sıkıca bağlar. Hücreden zengin osteojenik tabaka ise bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme potansiyeline sahip yassı hücrelerden (osteoprogenitör hücreler) oluşmaktadır. Eklem kıkırdağı tarafından örtülü halde bulunan yüzeylerde, tendon ve kasların kemiğe tutunduğu bölgelerde periosteum bulunmaz. Periosteumdan daha az gelişmiş olan endosteum, kemiğin tüm iç boşluklarını döşemekte ve tek kat yassı osteoprogenitör hücreler ile az miktarda bağ dokusundan meydana gelmektedir. Bu sebepten endosteum periosteumdan oldukça ince yapıdadır. Kemiğin gelişimi ya da onarımı için gerekli olan yeni osteoblastların sağlanması ve kemik dokusunun beslenmesi periosteum ve endosteumun temel görevidir. Bu sebeple cerrahi işlemlerde periosteumun korunmasına özen gösterilmelidir (32).

2.1.5. Kemik Oluşumu ve Kemikleşme Tipleri

Kemik oluşumu, endokondral ve intramembranöz olmak üzere iki şekilde meydana gelir (33). Her iki mekanizmada da öncelikle primer kemik dokusu oluşur ve primer kemik daha sonra sekonder kemik ile yer değiştirir.

2.1.5.1. Endokondral Kemik Oluşumu

Uzun kemiklerin şekillenmesi endokondral kemikleşme ile gerçekleşir ve kıkırdak hücreleri temel rol oynar. Endokondral kemikleşme iki aşamadan meydana gelir. Öncelikle kemiklerin diyafiz bölgelerinde mezenkim hücreleri kondroblastlara dönüşerek hiyalin bir kıkırdak matriks oluşturur. Sonra hipertrofiye uğrayan kondrosit hücreleri ölür ve geriye boş lakünler kalır. Kalan bu boş alanları daha sonra osteoprogenitör hücrelere dönüşecek mezenkim dokusu ile kan damarları doldurur. Daha sonra osteoprogenitör hücreler kemik matriksini oluşturacak osteoblastlara dönüşürler ve son olarak oluşan bu kemik matriksi kalsifiye olur (21).

2.1.5.2. İntramembranöz Kemik Oluşumu

İntramembranöz kemikleşme, mezenkim ya da bağ dokusu içinde oluşan osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan mineralizasyonu ile meydana gelen kemik formasyonudur. Koronoid çıkıntının bir bölümü ve simfiz bölgesi dışında kalan mandibular kemik, kafa kubbesi, parietal kemikler, oksipital ve temporal kemiklerin skuamöz kısımları, ileum, skapula, klavikula ve yüz kemiklerinin bir kısmı intramembranöz yolla meydana gelir. İntramembranöz kemik dokusuna dönüşecek mezenkim bölgesinde bol miktarda kapiller görülür. Mezenkim dokusu kapiller etrafında yoğunlaşarak osteoblastlara dönüşür ve bu bölgelere primer kemikleşme merkezi adı verilir. Osteoblastlar oluşturdukları osteoid doku zamanla mineralize oldukça bu doku içerisinde osteositlere dönüşürler ve yerlerini, çevre mezenkim hücrelerinden farklılaşan yeni osteoblastlara bırakırlar. Kan damarları etrafında meydana gelen ilk kemik, lamel içermeyen trabeküler yapıdadır ve bu trabeküller giderek büyür. Trabeküller arası boşluklarda mezenkim dokusu primer kemik iliğini meydana getirir. Süngersi kemik yeterli büyüklüğe ulaştığında kalsifiye olmayan mezenkimal hücreler periost ve endosteumu oluştururlar. Periost oluşuktan sonra süngerimsi kemik, etrafında tabaka tabaka birbiri üzerine yığılmış kompakt kemik kabuğunu oluşturur ve böylece yeni kemik oluşumu meydana gelmiş olur (21).

2.1.6. Kemik Büyümesi ve Yeniden Şekillenme (Remodelling)

Kemik büyüme mekanizması, var olan kemik dokunun bir bölümünün yıkılırken (rezorpsiyon) aynı esnada diğer bir bölümünün yapımı (apozisyon) ile meydana gelir. Kemikte yıkım miktarı yapım miktarından daha azdır ve bu sayede aynı zamanda kemik büyürken şekli de korunmuş olur.

Kemiğin yeniden şekillenme süreci beş aşamadan meydana gelmektedir;

1. Aktivasyon: Bu aşama osteoklastların, osteblast prekürsör hücreleriyle etkileşimi sonucu farklılaştığı ve kemiği rezorbe etmek için remodelingin oluşacağı alana migrasyonunun gerçekleştiği aşamadır.
2. Rezorpsiyon: Aktive olan osteoklastların kemik yüzeyine tutunup, salgıladıkları Katepsin K gibi lizozomal enzimler ile kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirdiği aşamadır.
3. Geri dönüşüm: Bu aşamada osteoklastların rezorpsiyonu sonucu oluşan düzensiz rezorpsiyon kavitesinde, kemik yüzeyindeki makrofaj benzeri tek

çekirdekli hücrelerin aktivasyonu ile bir sement hattı meydana gelir. Sonrasında rezorbsiyon kavitelerine osteoblastlar yönlendirilir.

4. Formasyon: Formasyon safhasında mezenkimal prekürsörlerden farklılaşan osteoblastlar tarafından kemik sentezi meydana getirilir. Bu aşamada osteoblast aktivitesi yaklaşık 2-3 ay boyunca sürer ve osteoid dokunun kalsifikasyonu meydana gelir. Kalsifikasyon bittikten sonra osteoblastların şekli yassı bir hal alır ve remodelling sona erer.
5. Dinlenme: Bu aşama oluşan kemik dokunun iki remodeling siklusu arasındaki süreci temsil eder (34).

2.1.7. Kemik Doku İyileşmesi

Zarar görmüş ya da kırılmış kemikte iyileşme birçok biyokimyasal ve fizyolojik süreci bünyesinde barındırır. Kemik dokudaki yapım, yıkım ve yeniden şekillenme süreçleri iyileşmeyi kolaylaştırır. Kemik iyileşmesi 3 aşamada gerçekleşir:

1. İnflamasyon evresi
2. Onarım evresi
3. Yeniden Şekillenme evresi

Kan akımı yetersizliğinde, yumuşak doku replasmanlarında, enfeksiyon ve çeşitli kemik hastalıklarının mevcut olduğu durumlarda iyileşme gecikebilmektedir. Ayrıca kortikal kemikteki mitotik aktivite spongios kemikten daha az olduğu için kemik iyileşmesi daha yavaş olmaktadır (35).

2.1.7.1. İnflamasyon Evresi

Travmanın ardından organizmanın verdiği ilk beş günde gerçekleşen yanıttır. Kemiğe gelen etki sonucunda zedelenen bölgelere komşu endosteum, periosteum, kas, damar ve yumuşak dokularda hasar meydana gelir. Damarlarda meydana gelen hasar sonucu oluşan yırtılma hematoma neden olur. Mezenkimal hücreler ilk üç gün içerisinde bölgeye göç ederler. Dokulardaki mast hücreleri ve bazofiller histamin ve bradikinin gibi iltihap mediatörlerinin salımını sağlar ve bunun sonucunda damar geçirgenliği artar. Kemik iyileşmesinde hematoma hem kemik ile yumuşak doku arasını doldurarak mekanik stabilize sağlar hem de osteoblastlara ve kondroblastlara farklılaşan olgunlaşmamış hücrelerinin bölgeye gelmesine aracılık eder. Hematom organize olarak üç dört gün içerisinde granülasyon dokusu ile yer değiştirir. Kemik ve yumuşak dokuda

granülasyon dokusunun sebep olduğu iskemi sonucu yıkım gözlenir. Bu yıkım sonucu oluşan nekrotik dokular lenfosit fagositozu ile ortadan kaldırılır (25).

2.1.7.2. Onarım Evresi

Hematom oluşumuyla başlayıp kallus oluşumuyla son bulan, yaklaşık dördüncü ve kırkinci günler arasında oluşan evredir. Bölgeyi dolduran mezenkimal hücreler ilk olarak fibroblastlara sonrasında ise osteoblastlara dönüşürler. Fibroblastların bazıları kollagen lifleri bazıları da bölgenin orta kısmında kanlanmanın az olması nedeniyle kondroblastları oluştururken, osteoblastlar mineralize osteoit dokuyu meydana getirir. Fibroblastların salgıladığı kollajen ve kondroblastların salgıladığı glikozaminoglikanlar sayesinde bir hafta içerisinde matriks sentezi en üst düzeye ulaşır. Böylece bu bölgede fibröz dokudan, kıkırdaktan, olgunlaşmamış kemik dokusundan oluşan ve yeni kemik oluşumunu sağlayacak olan yumuşak kallus meydana gelir. Kallus dokusunun oluşması ve sonrasında osteoit dokunun mineralizasyonu dört-on altı hafta süresince devam eder. Bölgenin periost ile kaplanmasıyla evre sona erer (36).

2.1.7.3. Yeniden Şekillenme Evresi

Kemiğin yeniden şekillenmesi kemik iyileşmesinin en uzun süren dönemidir. Bu dönem kallusun yerini daha düzenli olan lameller kemiğin aldığı konsolidasyon dönemidir. Bu evrede lameller yapı ve medullar kanal yeniden oluşur (35).

2.1.8. Kemik Metabolizmasını Etkileyen Düzenleyici Faktörler

Kemik formasyonu, şekillenmesi ve tamiri gibi işlevlerin uyumlu bir şekilde yürütülebilmesi için çeşitli lokal ve sistemik düzenleyici faktörlere gereksinim vardır. Sistemik düzenleyici faktörler, hem tüm vücut seviyesindeki değerler üzerinde etkili olurlarken hem de hedef hücrelerden yerel düzenleyici faktörlerin üretimini kontrol ederler. Yerel düzenleyici faktörler ise sınırlı alandaki işlevlerin kontrolünde etkilidir.

2.1.8.1. Lokal Düzenleyici Faktörler

Prostaglandinler, bazı büyüme faktörleri ve sitokinler kemik dokunun lokal düzenleyici faktörleri arasında yer almaktadır.

Prostaglandinler prostanoik asit denilen bir doymuş yağ asidi türevidirler. Kemik hücreleri tarafından sentezlenen prostoglandin E2'nin hem kemik yapımında

hem de osteoklast aktivitesinde artış sağlayarak kemik yıkımında etki gösterdiği görülmüştür (37).

Büyüme faktörleri denilen proteinler platelet, makrofaj ve fibroblast hücrelerinden salgılanarak kemik iyileşmesi sırasında, anjiyogeneziste ve kemiğin mekanik olarak işlev görmesinde rol oynarlar. BMP' ler, insülin benzeri büyüme faktörleri, TGF, platelet kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörleri (FGF) gibi proteinler bu sınıfta yer alırlar. İnsülin benzeri büyüme faktörleri ve TGF- β ' nin hem sistemik hem de lokal etkili olduğu görülmüştür. Bağ dokusu hücrelerinin proliferasyonundan sorumlu olan BMP' ler fibroblastları dönüştürme yeteneklerinden dolayı TGF grubuna dahil edilirler ve organizmada değişime uğramadan saklanırlar. BMP' ler bağ dokusu hücrelerinden kemik dokusu oluşturabilen tek büyüme faktörüdür (38).

Interlökin 1 (IL-1), IL-6, makrofaj ve granülosit koloni stimüle edici faktör ve tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF- α) gibi sitokinlerin kemik yapım yıkımı üzerinden etkilerinin bulunduğu bilinmektedir. Bu sitokinler doğrudan veya osteoklast migrasyonunu sağlayarak kemik yıkımını artırır ve kemiğin yeniden yapılanma sürecinde rol oynarlar.

2.1.8.2. Sistemik Düzenleyici Faktörler

PTH, kalsitonin, vitamin D, glukokortikoidler, cinsiyet hormonları, tiroid hormonları, vitamin A ve vitamin K gibi bazı hormon ve bileşikler, reseptörler aracılığıyla kemik hücreleri üzerinde doğrudan ya da dolaylı yolla etki gösterirler.

PTH, paratiroid bezinden salgılanarak kemik üzerinde etkisi bulunan ve plazmadaki kalsiyum seviyesini düzenleyen en önemli hormondur. Kemikten kalsiyum ve fosfor iyonlarının salınımını sağlarken böbrekte vitamin D sentezini uyarır (39). Etkilediği ana hücre osteoblasttır ancak kısmen osteoklastları da etkiler ve kemikte remodellingi uyarır. Hücresel düzeyde osteoklast ve metalloproteinaz oluşumunu uyarmakta, osteoblastik hücrelerden tip I kollajen açığa çıkmasını engellemektedir. Böylece kemik matriksinde rezorbsiyon meydana gelir ve kalsiyum serbest kalır (40).

Kalsitonin, tiroid bezinin C hücrelerinden sentezlenen ve PTH antagonisti olarak bilinen polipeptit yapıda bir hormondur. Kemik rezorbsiyonunu geçici olarak baskılar ve hem kompakt hem de trabeküler kemik yapımını arttırır. Olgun osteoklastlar üzerinde etki gösterir ve osteoklastik aktiviteyi inhibe eder (38).

Glukokortikoidler, PTH ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi hormonların etkinliğini arttır ve kemik rezorpsiyonunu baskırlar. Ayrıca osteoblastları apoptoza uğratarak osteoblast sayısını ve aktivitesini azaltırlar. Bunun sonucu olarak glukokortikoidler doz ve süreye bağılı olarak sert dokuda yapısal ve hücresele düzeyde belirgin dağılmaya yol açarak, kemik yıkımını arttırıp yapımını inhibe ederler (38).

Östrojenler kemik üzerinde etkisi bilinen hormonlardandır. Östrojen düzeyindeki azalmanın IL-1 ve IL-6 başta olmak üzere, kemik rezorpsiyonunu tetikleyen sitokinlerin üretiminde artışa yol açtığı gözlenmiştir. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda östrojenin TGF üretimini uyardığı ve böylece osteoklastların apoptozisinde artışa yol açtığı da öne sürülmüştür. Osteoblastik hücrelerde östrojen reseptörlerinin yanı sıra androjen reseptörleri de bulunur. Ergenlik döneminde salgılanan androjenlerin kemik büyümesi üzerinde arttırıcı yönde etkisinin bulunduğu, bu hormonun eksikliği durumunda ise kemikte rezorbtif aktivitenin arttığı belirtilmiştir. Östrojen ve androjenler kemik kütlelerinin korunmasında etkilidirler (41).

2.1.9. Alveolar Kemik

Maksillar ve mandibular kemiğin, diş soketlerini içeren ve dişleri destekleyen kısmı alveolar kemik olarak adlandırılır. Alveolar kemik; kretin bukkal ve lingual duvarları, interdental ve interradiküler septaları oluşturan kortikal kemik ve bu tabakalar arasında bulunan trabeküler kemikten meydana gelmiştir. Çok sayıda damar ve sinir iletiminin sağlandığı kanal sistemiyle ve periodontal ligamentle etkileşim halindedir. Alveolar kemik fetal gelişim esnasında intramembranöz ossifikasyon yolu ile meydana gelir. Periodontal ligamentle temasta olan ve alveolar soket duvarını oluşturan kompakt kemikte çok sayıda Sharpey lifleri bulunur. Alveolar kemikte kemik iliği boşlukları dıştan trabeküler yapıdaki süngerimsi kemik ile çevrelenmişken iç yüzeyleri endosteal hücre tabakası ile döşelidir. Bu endosteal hücre tabakası kemik hücresine dönüşme potansiyeline sahiptir. İnterdental ve interradiküler bölgelerde süngerimsi kemik yoğun olarak bulunmaktadır. Mandibuladaki süngerisimsi kemik oranı maksilladan daha düşüktür (42).

Alveolar kemikte, mevcut mekanik uyarılara adaptasyon sağlayabilmek adına kuvvetin geldiği basınç bölgelerinde rezorpsiyon, gerilimin olduğu bölgelerde ise fizyolojik yeni kemik oluşumu meydana gelir ve böylece kemik remodellingi gerçekleşir. Alveolar kemiğin yüksekliği, konturu ve densitesi; diş köklerinin şekli, yüksekliği, kalınlığı ve açılanması, diş dizimi, oklüzal kuvvetler, dişlerin varlığı ve aktif

fonksiyon görmeleri gibi faktörlerden etkilenir. Bu yüzden diş çekimi, alveolar kemiğin vertikal ve horizontal boyutlarını etkiler ve hatta % 50 gibi yüksek bir oranda azalmasına neden olabilir (43).

2.1.10. Yara İyileşmesi

Yara canlı dokuda anatomik bütünlükteki kayıp ve fonksiyondaki bozulma olarak tanımlanmaktadır. Yara iyileşmesinde bir travma ile başlayan sistematik, hücresel ve biyokimyasal etkileşimler nihayetinde yeni doku oluşumu ile sonuçlanır. Yara iyileşmesinin temel mekanizması doku hasarını mümkün olduğunca azaltmak, dokunun düzgün beslenmesi amacıyla perfüzyon ve oksijenlenmeyi sağlamaktır. Yaralar kısmi ve tam kalınlıkta, akut ve kronik, açık ve kapalı yaralar olarak çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Açık yaralarda cilt altı dokular açıkta kalır ve dış ortamla temas halindedir. Doku ve hücreler bu durumdan olumsuz etkilenirler. Cilt kısa sürede kapatılmazsa enfeksiyon, doku kuruluğu, eritrosit, lökosit, protein ve immun madde kaybı gibi bazı faktörler yara iyileşmesini olumsuz etkiler (44).

2.1.10.1. Diş Çekim Yarasının İyileşmesi

En yaygın oral yaralardan birisi de, diş çekimi sonrasında meydana gelen çekim soketidir. Çekim soketindeki yara iyileşmesi, hem yumuşak doku hem de kemik doku iyileşmesini kapsar (45). Diş çekiminden hemen sonra kanama meydana gelir ve eritrositler küme yaparak çöker. Fibrin ağları oluşurken, periodontal membrandaki damarlar büzülür. Doku hasarıyla orta derecede enflamatuar yanıt gelişir. Kemik dokusunda iyileşme pıhtı oluşumu, re-epitelizasyon, granülasyon dokusu oluşumu ve kemik formasyonu evrelerini içerir. Diş çekimi sonrası çekim yarasının iyileşmesi birbirini takip eden 4 aşamadan oluşmaktadır.

1. Çekimden hemen sonra soket kan pıhtısı ile dolar,
2. Kan pıhtısı sağlıklı granülasyon dokusu ile yer değiştirir (7. gün),
3. Granülasyon dokusu aşamalı olarak bağ dokusu ve genç preosseöz doku ile yer değiştirir (20. gün),
4. Alveolar soket kemik trabekülleri ile dolar (38. gün).

Diş çekiminden hemen sonraki reaksiyon kanamanın meydana gelmesi ve çekim soketine eritrositlerin küme yaparak çökmesi sonucu hasarlı hücreleri ve proteinleri içeren kanın sokete dolmasıdır. Kanamayı takiben bu hücreler fibrin ağı oluşumunu sağlayan bir seri olayları başlatır, bunun yanında periodontal membrandaki damarlar

kontrakte olur. Bu ilk saatler çok önemlidir çünkü alveol kan ile dolmaz ise yara iyileşmesi gecikebilir ve iyileşme olmayabilir. İlk 24 saatin sonunda damarlarda genişleme ve sonrasında lökosit diapedezi meydana gelir. Soketi dolduran fibrin iyileşmenin temelini oluşturur. Çekimden sonraki 48-72 saat içinde granülasyon dokusu özellikle soket tabanından pıhtı içine infiltre olmaya başladığı için pıhtı bozulmaya başlar. 72 saat içerisinde periodontal membrandan çıkan fibroblastlar yara çevresinden merkeze yayılmaya ve yüzey epiteli prolifer olmaya başlar. Dişi saran alveol kemiğinde osteolitik bir aktivasyon belirir. Bu zamanda nadiren de olsa endotel hücresi görülebilir. Dördüncü günde epitel, soket çevresi boyunca prolifer olur ve immatür bağ doku görülür. Beşinci günün sonunda yara tabanında fibroblastlardan ve damar endotelinden yapı bir doku mevcuttur. Periodontal membran artıkları halen görülebilmektedir fakat yeni oluşacak kemik ile ilgili belirti görülmez. Yedinci günde fibrin ağı içindeki fibroblastlar çoğalarak granülasyon dokusuna infiltre olur ve granülasyon dokusu pıhtı ile tamamen yer değiştirir. Periodontal membran artıklarında dejenerasyon vardır ve yeni kapillerin sayısı artmıştır. Alveolar kemikte osteolitik aktivite görülür. Yüzey epiteli ilerlemiştir ve küçük yaralarda epitelizasyon tamamlanmış olabilir. Bu aşamada yapı iskeleti tamamlanır. On dördüncü günde yapı iskeletinin yerini olgun granülasyon dokusu almaya başlar, çekim soketinin marjinal kısmı genç bağ dokusu ile kaplanır. Yaranın periferinde henüz kalsifiye olmamış genç trabeküller farkedilir ve yine bu aşamada soket tabanında osteoid doku görülmeye başlar (46). Bu genç kemik trabekülleri, periodontal membran artıklarındaki pluripotent hücrelerin osteoblastlara dönüşmeleri ile meydana gelir. Bu aşamada artık yüzey epitelizasyonu tamamlanır. Yirmi birinci günden sonrası iyileşmenin son, kemikleşmenin tamamlanma süresinin ise başlangıç evresidir. Kemik depolama özelliği bulunan ve diferansiye olan osteojenik hücrelerinin, soketin tabanından ve duvarlarından, devam etmekte olan granülasyon dokusuna migrasyonu gerçekleşir. Kemik iliği kökenli mezenkimal hücreler; sitokinler, plateletler, inflamatuvar hücreler ve kemik hücrelerinden salgılanan büyüme faktörleri tarafından osteojenik diferansiyasyon için uyarılırlar. Ek olarak, yaralanma osteojenik aktiviteyi ve soket duvarlarının remodelingini stimüle ederek, kemik matriksinde depolanan büyüme faktörleri ve sitokinlerin (TGF- β ve BMP' ler gibi) salınmasını sağlar. Kısmen kalsifiye olmuş trabeküller kemik grafilerinde görülmeye başlamıştır. Granülasyon dokusundaki damarların azalmasıyla birlikte osteoblastlar osteoid yapımına başlarlar. Alkalenleşen

ortamın sonucunda osteoblastların alkalin fosfataz yapımı uyarılır ve osteoidler üzerindeki kallusun kalsifikasyonu başlar (47).

2.2. Bifosfonatlar

2.2.1. Bifosfonatların Tarihçesi

Kemik mineralizasyonu üzerinde fizyolojik inhibitör etkisi olan pirofosfatların stabil ve sentetik karbon analogları olan bifosfonatlar ilk olarak 1865 yılında Alman kimyagerler tarafından sentezlenmiştir. Endüstride kullanım alanı bulan bifosfonatlar başlangıçta korozyon ve kireçlenme önleyici ajan gibi çeşitli işlemlerde kullanılmıştır (48). Kalsiyuma bağlanarak kalsiyum karbonat çökmesini önlemesi sayesinde ‘Su yumuşatıcı’ olarak kalsiyum tuzlarının petrol boru hatlarını kaplamasını engellemek için kullanılmıştır. Bu özelliklerinin bilinmesiyle birlikte tekstil, gübreleme ve yağ endüstrisi gibi pek çok alanda korozyon önleyici ajan olarak yer almışlardır (49).

İlk olarak 1968’de yapılan in vitro çalışmalarda bifosfonatların böbrek taşı oluşumunu önleyici potansiyeli araştırılmış (50) ve bifosfonatların HA kristallerine bağlandığı, bu kristallerin gelişimini engellediği ve kalsifikasyonu inhibe ederek antirezorbtif etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir (51). Bifosfonatların HA kristalleri üzerindeki bu etkileri kaydedildikten sonra kemik rezorpsiyonunu da önleyebileceği düşünülmüştür. Hem in vivo hem de in vitro olarak yapılan çalışmalarda bifosfonatların kemik minerallerine yüksek afinite gösterdiği ortaya koyulmuş (50) ve osteoklastlarca yürütülen kemik rezorpsiyonunu engellediği gösterilmiştir. 1960’ lı yıllarda biriken verilerle birlikte bifosfonatların klinik kullanımları yaygınlaşmış ve ilk olarak 1971 yılında etidronat Paget hastalığının tedavisi için kullanılmıştır (52). Yine aynı yıllarda Herbert Fleisch oluşturduğu rat modelinde ilk kez osteoporozun önlenmesi için bifosfonatlardan yararlanmış (53). Daha sonra bifosfonatlar tanı amaçlı kemik görüntüleme sistemlerinde de kullanılmıştır. 1970’ lerin sonunda Marion Dave Francis isimli araştırmacı teknesyum 99m metilen difosfatı kullanarak bifosfonatları kemik sintigrafisinde değerlendirmiştir (49). Teknesyum 99m metilen difosfat ile yapılan bu sintigrafik değerlendirmeler sonucunda bifosfonatların kemik yapım yıkımının fazla olduğu mandibula ve maksillada yoğun infiltrasyon gösterdikleri bildirilmiştir (54). Daha sonra Francis’ in etidronat üzerinde yaptığı çalışmalardan yola çıkarak bifosfonatların anti-tartar ve antiplak etkileri bildirilmiş ve diş macunlarında kullanılmıştır (55). Devam eden çalışmalarla birlikte daha yeni ve güçlü bifosfonatlar

bulunmuştur. Nitrojen içerikli bifosfonat olduğu bilinen pamidronat 1995 yılında FDA onayı almasıyla birlikte osteolitik metastazlar, hiperkalsemi, multipl myeloma gibi pek çok hastalıkta parenteral yolla kullanılmaya başlanmıştır. Aynı yıl içerisinde alendronat, yaklaşık beş yıl sonrasında ise risedronat FDA onayı alarak kullanıma girmiştir. En etkili ve potent olarak kabul edilen bifosfonat türevi zoledronik asit ise 2001 yılında FDA onayı aldıktan sonra, maligniteye bağlı hiperkalseminin, antineoplastik ajan olarak multipl myelom ve kemik metastazı olan tümörlerin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (48).

Yaklaşık kırk yıldır devam eden tüm bu gelişmelerin sonucunda bifosfonat türevi ilaçlar günümüz tıbbında birçok hastalığın tedavisi amacıyla kullanılan yeni sınıf ajanlar olarak literatürde yer almıştır.

2.2.2. Bifosfonatların Kimyasal Özellikleri

Bifosfonatlar kimyasal olarak, insan metabolizmasının doğal bir ürünü olan pirofosfatların (P-O-P) stabil hidrolize edilemeyen bir analogudurlar (30), (56). Pirofosfat bir oksijene bağlanmış iki fosforik asitten oluşmuştur. Bifosfonatlar ise pirofosfattaki labil PO- bağlarındaki oksijen atomu yerine taşıdığı karbon atomu sayesinde stabil PC-P bağı içerir. İçerdikleri bu karbon bağı ile pirofosfatların antimineralezyon özelliğini taşıırken, pirofosfatların aksine kimyasal ve enzimatik hidrolizlere karşı dirençlidirler (57).



Şekil 2.2. Pirofosfat molekül yapısı, bifosfonat molekül yapısı (58)

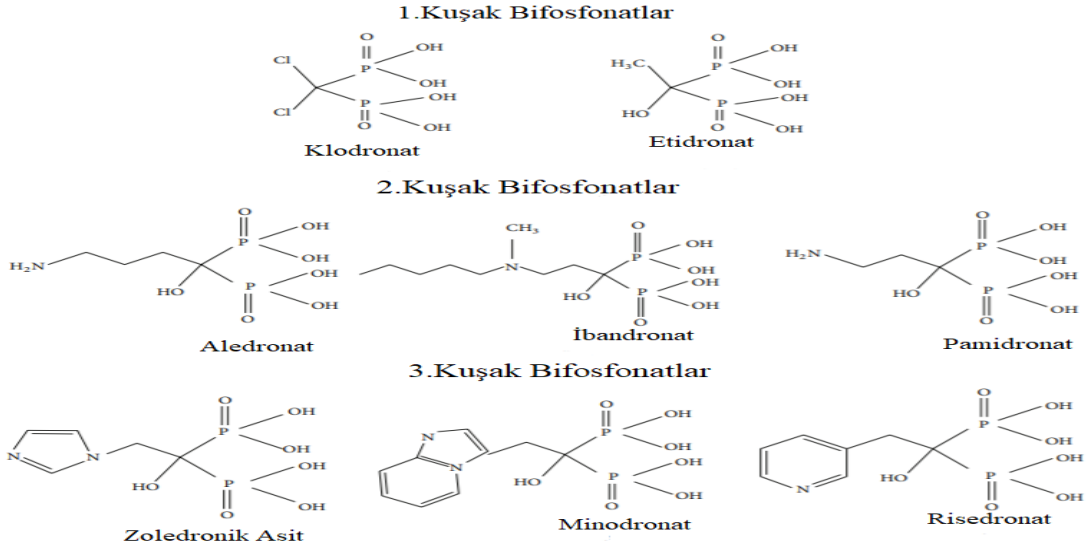
Bifosfonatların kemik matriksinde birikmelerinin ve 10 yıldan daha uzun süre yarılanma ömrüne sahip olmalarının hidrolize karşı olan bu dirençleri sebebiyle olduğu düşünülmektedir (54). Yapısında bulunan fosfat grubunun negatif yüklü yüzeyi ile HA kristallerinin pozitif yüklü yüzeyi arasındaki çekim bifosfonatların kemiğe olan yüksek afinitesini açıklar ve bu çekim sayesinde kemik minerallerine kuvvetli şekilde bağlanarak çözülmelerini önlerler. Bifosfonatlar vücutta metabolitlerine dönüşmeden kalırlar ve değişmeden atılırlar (59).

Bifosfonatlar karbon atomunun yanı sıra pirofosfatlardan farklı olarak iki farklı yan zincire sahip olup bu yan zincirler sayesinde osteoklastlardan endositoz ile hücre içine alınırlar. Bu R1 ve R2 yan zincileri bifosfonatların kimyasal, fizikokimyasal, biyolojik özelliklerindeki farklılıklardan ve aralarında gözlenen geniş aktivitelerin kontrolünden sorumludurlar (56). R1 yan zinciri kemik minerallerine bağlanmadan sorumlu iken R2 yan zinciri ise kemik rezorpsiyonunu önlemeden ve antirezorptif güç farklılıklarını belirlemeden sorumludur (57), (59). R1 yapısında farklı hidroksil iyonu (OH^-) ve amino gruplarının bulunması kalsiyum iyonlarına olan affiniteyi belirlemektedir. Örneğin R1 yan zincirindeki OH^- gruplarından biri hidrojen atomu ile yer değiştirdiğinde HA kristallerine bağlanma afiniteleri yaklaşık 2 kat artmaktadır (60). R2 yan zincirinde ise karbon atomu sayısının artışı veya azalışı kemik rezorpsiyonuna olan etkiyi belirlemektedir (61). R2 yan zincirinde nitrojen veya nitrojen içeriği bulunan bifosfonatlar, nitrojen içermeyenlere (etidronat, klondronat) oranla 3 kat daha büyük antirezorptif etkiye sahiptir. Nitrojen içeriğinin sadece bulunması değil aynı zamanda bu atomun moleküldeki bulunduğu pozisyon farklılığı da bifosfonatların farklı etkinlik gösterebilmesini sağlayabilmektedir (60).

Bifosfonatlar, üç gruba ayrılmaktadır. Birinci kuşakta azot içermeyen alkil türevleri olan etidronat, klodronat ve tiludronat gibi bifosfonatlar bulunur ve antirezorptif etkileri zayıftır. İkinci kuşak alendronat, ibandronat, pamidronat gibi bifosfonatlarda azot atomuna sahip aminoalkil R2 yan zinciri yapısı mevcuttur. Üçüncü kuşak zolendronat ve risedronat gibi bifosfonatlarda ise heterosiklik nitrojen yapı bileşiği bulunmakta ve bu yan zincirin bulunması hem daha güçlü olmalarını hem de yarılanma ömürlerinin çok daha uzun olmasını sağlamaktadır (62).

Tablo 2.1. R2 zincir yapısındaki farklılığa göre bifosfonatların sınıflandırılması

1. Kuşak Bifosfonatlar	2. Kuşak Bifosfonatlar	3. Kuşak Bifosfonatlar
Etidronat	Pamidronat	Zoledronik Asit
Klodronat	Alendronat	Minodronat
Tiludronat	İbandronat	Risedronat



Şekil 2.3. 1. kuşak, R2 yan zincirinde primer, sekonder veya tersiyer pozisyonda nitrojen içeren 2.kuşak ve R2 yan zincirinde heterosiklik halkaya sahip 3. Kuşak (62)

İlaç kuşakları arasında antirezorptif özellikler katlanarak artmaktadır (59). Bifosfonatların potens özellikleri değerlendirilirken etidronat temel alınmaktadır. Etidronatın potensi 1 birim kabul edildiğinde, alendronatın ~500, pamidronatın ~100, ibandronatın ~1.000, zoledronatın ise ~10.000 kat güçlü olduğu belirtilmiştir (56).

Bifosfonatlar ayrıca moleküler kimyasal özellikleri ve buna bağlı etki mekanizmalarına göre nitrojen içermeyenler ve içerenler olarak iki gruba ayrılır. Etidronat, klodronat ve tiludronat nitrojen içermeyen bifosfonat grubundadır. Alendronat, risedronat, pamidronat, ibandronat ve zoledronik asit ise nitrojen içeren bifosfonat grubundadırlar. Ayrıca, bifosfonatlar oral ve intravenöz olarak veriliş yoluna göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Risedronat, alendronat, tiludronat ve etidronat oral yoldan, pamidronat ve zoledronik asit intravenöz, ibandronat ve klodronat ise hem oral hem de intravenöz yoldan verilebilmektedir (63).

2.2.2.1. Zoledronik Asit

Kimyasal olarak zoledronik asit bifosfonik asit monohidrat olarak adlandırılır. İki nitrojen atomu içeren beş üyeli imidazol halkasına sahip olup molekül formülü $C_5H_{10}N_2O_7P_2 \cdot H_2O$ şeklindedir. Molekül kütlesi 290.1 gram/mol olan beyaz, kristal bir tozdur. Özellikle nötral pH' de sodyum hidroksit solüsyonu ve suda çözünürken organik solventlerde çözünmez. İnfüzyon sonrasında vücuttaki plazma konsantrasyonu hızla artar, infüzyon periyodunun sonunda en yüksek düzeyine ulaşır ve sonra yaklaşık 3-4

saat içerisinde hızla azalma gösterir. Vücutta metabolize olmaması sebebiyle değişmeden böbreklerden atılır. İlk uygulamada, uygulanan dozun yarısından fazlası kemik dokuya bağlanır geriye kalanı ise idrarla atılır. Kemik dokuya bağlanan kısım ise yavaş yavaş serbest hale gelerek sistemik dolaşıma katılır ve ardından böbreklerden atılır (64).

Zoledronik asit yeni nesil bir bifosfonat grubudur. Etki mekanizması için çeşitli yollar ileri sürülmektedir. Bunlar:

1. Osteoklast dönüşümü ve matürasyonu inhibisyonu,
2. Olgun osteoklastik aktivite ve işlevde baskılama,
3. Osteoklastlarda apoptotik hücre ölümünü indükleme,
4. Kemik rezorpsiyonu bölgesine osteoklastların toplanmasının inhibisyonu,
5. Kemik dokunun rezorpsiyon döngüsünü engelleme,
6. Sitokin üretiminin azalması (IL-6),
7. Direkt anti tümör etkinlik (sitostatik ve sitolitik) (65),
8. Tümör hücrelerinin yayılmasının ve kemik matrikse adhezyon ile invazyonunun inhibisyonu,
9. Tümörlerde anti anjiyogenik etki şeklinde sıralanabilir.

2.2.3. Bifosfonatların Farmakolojik Özellikleri

Bifosfonatlar hem oral hem de parenteral yolla uygulanabilmektedir. Oral biyoyararlanımı oldukça düşüktür ve bu yolla kullanıldığında total dozun sadece % 1' i emilir. Diyetle alınan besinlerde kalsiyum ve demir bulunması halinde kompleks oluşturma riski nedeniyle, ilaç ile birlikte alınan yiyecek ve içecekler, ilacın biyoyararlanımını düşürebilmektedir. Biyoyararlanımı korumak adına bifosfonatlar oral yoldan uzun süre açlık ardından alınmalı, sonrasında yaklaşık 1 saat boyunca hiçbir şey yenilip içilmemelidir. Bu sebeple bifosfonat kullanım rejimi sabah aç karnına günde bir kez olacak şekilde düzenlenmektedir. Sistemik metabolizmaları yoktur. Plazmadaki yarı ömürleri kısadır ve yaklaşık % 30-65 oranında plazma proteinlerine bağlanırlar. Emilen veya intravenöz yolla uygulanan dozun klodronat için yaklaşık % 20' si, etidronat için % 50' si, alendronat, pamidronat ve zoledronik asit için ise % 50' den daha fazlası (66) özellikle aktif remodeling bulunan bölgelerdeki kemik yüzeyine bağlanır. Bu kemiksel bağlanma alanları hemen hemen hiç doyumluk göstermez. Kemiğe bağlanmayan kısım ise böbreklerden hızlıca atılır (67). Bifosfonatlar, kemik mineral çözünmesinin

bulunduğu ve bu minerallerin vücut sıvılarına katıldığı iskelet bölgelerini hedef alırlar. Yarılanma ömürleri bağlandıkları aktif iskeletsel bölgelerin kemik döngü sürelerine bağlı olarak değışiklik gösterir. Kemikle bir kez birleştikten sonra uzun süre bölgede kalırlar. Rat ve farelerdeki kemiksel yarı ömür 3-12 ay arasında iken insanlarda bu süre ortalama 10-12 yıldır (56), (68) . Etki süresi ilacın kullanım süresinden çok daha uzundur. Alendronat tedavi bırakıldıktan 5 yıl sonrasına kadar etkisini sürdürürken, zoledronik asitin tek doz uygulamasından sonra bile 12 ay boyunca kemik döngüsünün azalmaya devam ettiği gösterilmiştir (63).

2.2.4. Bisfosfonatların Endikasyonları ve Klinik Kullanım Alanları

Günümüzde bisfosfonatlar çeşitli kanser türlerinin osteolitik kemik metastazlarının önlenmesi ve tedavisinde (57), (69) malign hastalıklara bağlı hiperkalseminin düzenlenmesinde (69), kemik kanserlerinde ağrının azaltılmasında, multipl miyelom olgularında, Paget hastalığında, fibröz displazide ve osteoporoz tedavisinde kullanılırlar (70). Bunlar dışında özellikle çocuklarda görülen osteogenezis imperfekta, ankilozan spondilit, juvenil osteoporoz ve gauchers hastalığı gibi durumlarda da kullanılmaktadırlar (71).

Bisfosfonatlar genellikle oral yolla, uzun süreli kronik uygulamalarda ise intravenöz infüzyonla uygulanırlar. Oral bisfosfonatlar büyük çoğunlukta günlük dozlar şeklinde uygulanır ancak alendronat ve risedronat gibi bisfosfonatların haftalık doz uygulamaları da geliştirilmiştir. Malignitelere ve maligniteye bağlı gelişen hiperkalsemi durumlarında genellikle intravenöz yol ile uygulanırken, osteoporözde ve çeşitli kemik hastalıklarında ise oral yolla uygulama tercih edilmektedir. İntravenöz yol için infüzyonla % 5 glukoz veya % 0.9 sodyum klorür çözeltisi kullanılır (72)

Kemik metastazlarında oral klodronat, intravenöz pamidronat ve zoledronik asit en sık kullanılan bisfosfonatlardır (73). Ayrıca maligniteye bağlı hiperkalsemide, multiple myelomada, metastatik kemik tümörlerinin tedavisinde patolojik kırıkların önlenmesi, spinal basının kaldırılması ve ağrının azaltılması amacıyla pamidronat ve zoledronik asit sıkça kullanılmaktadır (74). Paget hastalığı tedavisinde önce etidronat sonraları ise sadece paget hastalığında kullanmak üzere üretilmiş olan tiludronat kullanılmıştır. Daha sonra uzun yıllar intravenöz pamidronat kullanılmış ancak günümüzde zoledronik asit daha uzun etki süresi sebebiyle daha çok tercih edilir hale gelmiştir (75). Osteoporozda alendronat, risedronat, etidronat ve ibandronat post-menopozal tedavide anti-rezorbif ilaçlar adı altında sıkça kullanılmaktadır (74).

2.2.5. Bifosfonatların Etki Mekanizması

Bifosfonatların temel etki mekanizması kemik rezorpsiyonunu dolayısıyla kemik döngüsünü ve yenilenmesini inhibe etmesidir. Bu mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte son zamanlarda birbirine bağlı olan doku, hücre ve moleküler düzeyde etki mekanizmalarından söz edilmektedir. Hücresel düzeyde bifosfonatların hedefi osteoklast hücreleridir. Çalışmalar bifosfonatların hem osteoklastların hücre içindeki mevalonat yolu üzerinden çeşitli basamakları inhibe ederek hem de doğrudan osteoklastlar üzerinde dönüşümsüz hücre ölümüne sebep olarak etki ettiğini göstermiştir. Doku düzeyinde ise bifosfonatların, kemik yapım-yıkımın döngüsünde azalmaya ve yavaşlamaya yol açtığı gözlenmiştir. Kemik yıkımının inhibisyonunun yanı sıra yeni kemik yapım hızını da azaltırlar.

Bifosfonatların hücresel düzeyde etkileri dört mekanizma ile gerçekleşmektedir (76);

1. Osteoklast öncül hücrelerinin olgun osteoklastlara dönüşümünün engellenmesi: Bifosfonat füzyonu sonucu osteoklastlara dönüşecek olan makrofajların proliferasyonu önlenir. Bu sürecin TGF- β aracılığıyla olduğu düşünülmektedir.
2. Osteoklastların kemiğe kemotaksisi ve kemik dokuya tutunmasının engellenmesi: Bifosfonatlar kemik yüzeyinde bir tabaka oluştururlar ve osteoklastların kemiğe tutunmasını önlerler. Bununla birlikte osteoklast sitoplazmasına girer girmez kemik dokuya bağlanmada yardımcı olan tırtıklı membranı düzeltirler ve bağlanmanın bozulmasına sebep olurlar.
3. Erken apoptoz sonucunda osteoklastların yaşam süresinin kısaltılması: Bifosfonatlar fizyolojik hücre ölümünü hızlandırıp apoptozisi tetiklerler.
4. Osteoklast aktivitesinin inhibisyonu: Bifosfonatlar osteoklast hücrelerinin içine girdiklerinde bu hücrelerde protein sentezinin, asit ve enzim üretiminin durdurulması gibi etkilere sebep olurlar. Böylece protein yapıdaki mikrotübüller depolimerize olur ve tırtıklı zar geri çekilir.

Bifosfonatların moleküler düzeydeki etkileri nitrojen içerip içermemelerine göre iki farklı mekanizma tarafından açıklanmıştır. Nitrojen içermeyen bifosfonatlar, osteoklastlarda metabolize edilirler ve hidrolize olmayan, toksik adenzin trifosfat (ATP) analoglarına dönüşürler. Bu sitotoksik metabolitler hücre içinde birikerek rezorbtif yeteneğin azalmasına ve hücre ölümüne neden olurlar. Aksine nitrojen içeren

bisfosfonatlar ise metabolize edilemez ve osteoklastlar üzerine doğrudan etki ederler. Osteoklast fonksiyonunda gerekli olan lipidlerin sentezlendiği mevalonat yolundaki farnesil pirofosfat sentetaz enzimini inhibe ederler. Bunun sonucunda kolestrol, izopentenildifosfat, farnesildifosfat ve geranilgeranildifosfat gibi lipidlerin sentezinde inhibisyon meydana gelir (57). Farnesildifosfat ve geranildifosfat, osteoklast fonksiyonundaki düzenleyici proteinlerden Ras, Rho ve Rac gibi proteinlerin prenilasyonu için gerekmektedir. Bu proteinlerin sentezindeki inhibisyon sonucu hücre proliferasyonu, hayatta kalma süresi ve osteoklast fonksiyonu engellenmekte ve osteoklastların apoptozu meydana gelmektedir (77).

2.2.5.1. Epitel Üzerindeki Etkileri

Bifosfonatlar kemikte yeterli konsantrasyona ulaştıkları zaman kemiğe komşu, kemik yüzeyini örten yumuşak dokuda toksik etki oluştururlar. Bifosfonatların mevalonat yolundaki farnesil difosfat sentetaz enzimini inhibe etmelerinin sonucu olarak oral epiteldeki keratinositlerin hücre proliferasyonları inhibe olur. Buna bağlı olarak oral kavitedeki mukoza bütünlüğü bozulur ve iyileşmede gecikme meydana gelir (78).

2.2.5.2. Anti-anjiyogenik Etkileri

Hem in vivo olarak bifosfonat tedavisi gören multipl myeloma hastalarından alınan kemik biyopsilerinde hem de in vitro çalışmalarda bifosfonatların anti anjiyogenik etkileri gösterilmiştir. Nitrojen içerikli bifosfonatların, endotel hücre çoğalması, hücre göçü ve kapiller formun oluşumu gibi anjiyogenezin pek çok temel basamağında inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Bifosfonatların endotel hücrelerinde meydana getirdiği inhibisyonun mekanizmasının laminin ve integrin proteinlerinin azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Zoledronik asit ile tedavi edilen endotel hücreleri üzerinde yapılan in vitro çalışmada, endotel hücrelerinde azalmış hücre proliferasyon, adezyon ve göç ile birlikte anjiyogenezin de belirgin bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (79).

2.2.5.3. Tümör Hücreleri Üzerindeki Etkileri

Bifosfonatların, apoptozisi tetikleyen intraselüler sinyal iletim yolağını bloke ederek tümöral büyümeyi yavaşlattığı yani antiproliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Kemik dokuda malign metastatik hücrelerin salgıladığı kemik rezorpsiyonuna neden

olan maddelerin inhibisyonunu sağlaması ve yıkılan kemik sebebiyle açığa çıkan ve tümör gelişimini arttıran faktörlerin oluşumuna engel olması, bifosfonatların tümörosidal etkilerinin temeli olarak görülmektedir. Osteoklast inhibisyonu IL-6 üretiminin ve kemik matriksinden salınan büyüme faktörlerinin azalmasına sebep olur. Bu verilerin sonucunda, bifosfonatların tümörosit etkilerinin, anti-rezorptif etki üzerinden sağladığı fikrine varılabilmektedir (80). Son dönemlerde yapılan in vitro çalışmalar özellikle yeni nesil bifosfonatların tümör hücrelerini apoptozise uğratacak direk etkilerine dikkat çekmektedir. Bifosfonatlar ayrıca protein prenilasyonu üzerindeki inhibitör etkileri sayesinde kanserli hücrelerin adezyon, proliferasyon ve invazyon gibi yeteneklerini sınırlarlar (81).

2.2.5.4. Osteositler Ve Osteoblastlar Üzerindeki Etkileri

Bifosfonatların osteositler ve osteoblastlar üzerindeki etkileri az sayıda çalışmada ele alınmıştır (60), (82). Bifosfonat kullanan hastalarda yapılan kemik biyopsilerinde osteositler ve kanaliküllerinde immunohistokimyasal olarak bifosfonatların varlığı gösterilmiştir. Bifosfonatların osteoblastlara olan etkisi osteoklastlara olan etkisi kadar iyi açıklanamamıştır. Bazı hayvan modelleri bifosfonatların kemik remodeling bölgelerindeki osteoblastik aktiviteyi baskıladığını gösterirken (83), (84), bazı çalışmalar ise osteoblastların diferansiasyonunu desteklediği öne sürülmüştür. Farklı dozlar uygulanarak yapılan çalışmalarda bifosfonatların düşük dozda osteoblast diferansiasyonunu ve kemik depozisyonunu stimüle ederken yüksek dozlarda ise osteoblastlarda sitotoksik etki göstererek apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (85), (86). Yüksek dozlarda uygulanan bifosfonatların hem osteoblast hem de osteoklastlar üzerinde inhibisyona neden olarak kemik yenilenme mekanizmasının bozulduğu ve kemik remodelizasyonunun azalması sonucu avasküler nekroz riskinin arttığı belirtilmiştir (86). Bu farklı ve çelişkili sonuçlar kemik mikro mimarisinde bifosfonatların osteosit ve osteoblast fonksiyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

2.2.6. Bifosfonatların Yan Etkileri

Bifosfonatların genellikle iyi tolere edilen ilaçlar oldukları bilinmesine rağmen, uygulanmaları sırasında ve sonrasında pek çok yan etkiye sebep olduğu da gösterilmiştir. Oral uygulamalarda dispepsi, bulantı, kusma, mide ağrısı ve diyare gibi gastrointestinal yan etkiler bildirilmiştir. Oral yolla ilaç kullanamayan ya da daha

yüksek miktarda absorpsiyona ihtiyaç olan hastalarda intravenöz uygulama tercih edilmektedir (87).

İntravenöz yolla bifosfonat uygulanan hastaların yaklaşık % 20' sinde ise grip benzeri halsizlik, akut ateş, kemik ağrısı, renal toksisite, akut böbrek yetmezliği, geçici hipokalsemi, IL-6, TNF- α ve C-reaktif protein salınımında artış gibi yan etkiler görüldüğü bildirilmiştir (51). Bifosfonat kullanan hastaların böbrek proksimal tübüllerinde dejeneratif değişiklik, hücre nekrozu ve membranın fırçamsı yüzeyinin kaybolduğu bildirilmiştir. Ayrıca doza bağlı olarak böbrek fonksiyonlarının bozulması sonucunda sklerit, iridosiklit, orbital miyozit ve uveit gibi oftalmolojik yan etkiler de görülmektedir (88).

Belirtilen bu yan etkilerden dolayı kronik böbrek hastalarında, düşük serum kalsiyum düzeyinde, osteomalazide, vitamin D yetmezliğinde, hamilelikte (gebelik kategorisi D olarak bildirilmiştir), özefagus darlığı ve akalazya gibi özefageal boşalmayı geciktiren anormalliklerde kullanımı sakıncalı olacağından dikkat edilmesi gerekmektedir. Zoledronat tedavisine başlanılmadan önce ve tedavi süresi boyunca, serum albümin, kalsiyum, fosfat, magnezyum ve kreatinin gibi standart hiperkalsemi ile ilişkili metabolik parametreler dikkatle izlenmelidir (89).

Bu komplikasyonların yanı sıra bifosfonatlara bağlı olarak son yıllarda sık görülen yan etkilerden biri de osteonekrozdur. Osteonekroz çene kemiklerinde avasküler, iyileşmeyen, çıplak kemik alanları şeklinde ortaya çıkan çene kemiği nekrozudur. Günümüzde bifosfonat kullanımı sonucunda meydana gelen ve ciddi bir yan etki olan osteonekroz her geçen gün artan vaka sayısı ile dikkat çeken bir konu haline gelmiştir (90).

2.2.7. Bifosfonata Bağlı Çene Kemiği Nekrozu (BRONJ)

18. yüzyılda kibrit endüstrisinde çalışan işçilerde (fosfor elementine fazlaca maruz kalma nedeniyle) yalnızca çenelerde sınırlanmış osteonekroz ve enfeksiyon bulguları veren bir hastalık tanımlanmıştır. Sonraları endemik olarak vakalar ortaya çıkmaya devam etmiş ve son yıllarda bifosfonat kullanan hastalarda da benzer bulguların ortaya çıkması konuyu yeniden gündeme getirmiştir (91). İlk kez 2003' te Marx ve ark. BRONJ' u yayınladıkları raporda tanımlanmışlardır (10). Bu tarihten itibaren giderek artan vaka raporları bildirilmiştir.

AAOMS tarafından konuyla ilgili 2009 yılında bir bildiri yayınlanarak hastalık hakkında bilgilendirme yapılmıştır. Bu bildiri de BRONJ' u, 'baş-boyun bölgesine yönelik geçirilmiş veya mevcut bir radyoterapi hikayesi olmayıp bifosfonat tedavisi görmüş veya hali hazırda görmekte olan hastaların maksillofasiyal bölgesindeki çene kemiklerinde, 8 haftadan uzun süre iyileşmeyen, açığa çıkmış kemik varlığı' olarak tanımlamıştır (11). Daha sonraki dönemlerde hastalığın sadece bifosfonat kullanımında değil farklı ilaçların kullanımında da görüldüğünün ortaya çıkmasıyla birlikte AAOMS 2014 yılında yeni bir bildiri yayınlamış ve hastalığın ismini MRONJ olarak değiştirmiştir (12).

Açığa çıkmış kemiğin yanı sıra BRONJ vakalarında ek olarak ağrı, şişlik, parestezi, supürasyon, yumuşak doku ülserasyonu, intra veya ekstraoral fistüller, dişlerin kaybı, spesisik olmayan radyolojik bulgular da görülebilir. Amerikan Kemik ve Mineral Araştırma Derneği, açığa çıkmış kemik varlığı olmaksızın, bu bulguların tek başına veya birlikte bulunmasının BRONJ tanısı koymak için yeterli olmayacağını, ancak hastalığın erken evrelerinin bulguları olarak sayılabileceğini rapor etmiştir (92).

Yapılan çalışmalarda yüksek dozda zoledronik asit gibi intravenöz bifosfonat uygulanan hastalarda BRONJ görülme oranının % 8-12 arasında değiştiği gösterilmiştir (11). Bifosfonat kullanımını sonucu osteonekroz görülen hastaların % 46.5' i multiple myelom, % 38.8' i metastatik göğüs kanseri, % 6.2' si prostat kanseri, % 4.1' i osteoporoz, % 3.5' i diğer metastatik kanserler ve son olarak % 0.8' i ise Paget hastalarıdır (69), (90). Vaskülarizasyon sebebiyle vakaların yaklaşık % 60' ı mandibulada, % 30' u maksillada ve % 10 ise her iki kemikte de görülmektedir. Hastaların % 68' inde açığa çıkmış nekrotik kemik bulunmakta ve bu kemiğin genellikle mandibulanın posteriorunda ve lingual bölgede görüldüğü bildirilmektedir. Açığa çıkan nekrotik kemiğin % 37' si diş çekimi, % 28' si mevcut periodontal hastalık, % 15' i çeşitli cerrahi işlemler sonucu oluşurken % 25' i spontan olarak meydana gelmektedir (93).

İlk tanımlandığı zamandan beri BRONJ oluşumu ilgili değişik hipotezler öne sürülmüş olmasına rağmen (10), (94) fizyopatolojisi hakkında çok az veri edinilmiş ve konuyu tek başına açıklayacak bir görüş bulunamamıştır. Kemik remodelinginin bozulması, dental problemlerin mevcudiyeti, lokal travma, kanser tedavileri, azalmış anjiyogenezis ve bozulmuş kemik mikroçerçevesi sebebiyle meydana gelen mikroorganizma invazyonu gibi bir çok farklı faktörün BRONJ etyolojisinde sebep olabileceği düşünülmüştür. Tüm bu farklı verilerin sonucunda çalışmacılar BRONJ' u

multifaktöriyel bir tablo olarak tanımlamış ve kümülatif etkiler sonucunda meydana geldiğini düşünmüşlerdir (74). Maksilla ve mandibuladaki yüksek kemik turnoveri, oral floradaki çeşitli mikroorganizmaların varlığı, bifosfonatların anti-anjiyogenik etkileri nedeniyle bozulan vaskülarizasyon, oral kavitede biriken bifosfonatların neden olduğu oksidatif strese bağlı yumuşak dokuda meydana gelen toksisite gibi farklı etkenlerin BRONJ oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Bifosfonatların yüksek dozda uzun süreli uygulamaları hem osteoblastlar hem de osteoklastlar üzerinde sitotoksik etki meydana getirir. Farklı bifosfonat çeşitlerinin hem in vivo hem de invitro ortamlarda yapılan pek çok çalışmada konsantrasyona bağlı olarak bifosfonatların osteoblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir (85). Bifosfonat uygulanan osteoblast hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada uygulamayı takiben belirli konsantrasyon düzeylerinde canlı hücre bulunmadığı ve kollajen sentezinin ise dozdan bağımsız olarak azaldığı belirtilmiştir (95). Bifosfonatların antirezorptif etkisinin osteoklastların apoptozu ve osteoklast öncü hücrelerinin farklılaşmasının önlenmesi ile gerçekleştiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bifosfonat uygulamasının süre ve konsantrasyona bağlı olarak osteoklastlar üzerine sitotoksik etkisinin olduğu, osteoklastogenezis ile ilişkili genleri ve RANKL aracılığıyla gerçekleşen osteoklast farklılaşmasını baskıladığı bildirilmiştir (96). BRONJ' un patogenezinin, bifosfonatların hem osteoblast hem de osteoklast hücreleri üzerindeki bu sitotoksik etkilerinin sonucu olarak kemik dokunun yeniden şekillenme mekanizmasının bozulmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Kemikteki rezorpsiyon ve apozisyonun azalmasıyla birlikte tamir ve büyüme-gelişme fonksiyonunda bozulmalar meydana gelir. Bunun yanında bifosfonatların antianjiyogenik özellikleri de kemik yenilenmesinin engellenmesine neden olur (97). Ayrıca yumuşak doku iyileşmesi de bifosfonatlar tarafından baskılanır. Bifosfonatlar epitelyal büyüme faktörü üzerinde inhibitör etki yaparak oral epiteldeki iyileşmeyi ve yenilenmeyi bozarlar. Bu durum oluşacak dehisenslerin onarılamaması ve mikroorganizmaların bölgeye invazyonuna ortam sağlar. Kemikte biriken bifosfonatların periostu kemiğe bağlayan kollajen doku üzerine toksik etkisi ve kollajen üretimini inhibe etmesi de prognozunu olumsuz yönde etkilemekte ve doku iyileşmesinde lokal gecikmelere sebebiyet vermektedir (98), (99).

Çene kemikleri vücudun diğer kemiklerine kıyasla çok yüksek turnover oranına sahiptir ve bu oran alveol kemiğinde ömür boyu yüksek düzeyde devam ederken, iskeletin uzun kemiklerinde yaşla beraber azalmaktadır. Ayrıca mandibular kemiğin turnoveri da maksillar kemiğin 2 katı kadardır. Bifosfonatların turnoveri yüksek olan

dokulara afinitesinden dolayı çene kemikleri bifosfonatların birikim bölgeleri haline gelecektir. Bu yüksek birikim bifosfonatların osteoblast ve osteoklastlar üzerinde toksik etki oluşturmaya ve bu hücrelerde apoptoza neden olmaktadır. Anabolik ve katabolik yolların aynı anda kesintiye uğraması sebebiyle yeni kemik oluşum mekanizması bozulur, bozulan bu mekanizmaya ek olarak vasküleritede meydana gelen inhibisyon da tabloyu daha kötü hale getirir ve sonuç olarak osteonekroz ortaya çıkar. Kemiğin üzerini kaplayan mukozada oluşan toksik etkiler ve mukozanın vasküler desteğini kaybederek yıkılması meydana gelen bu nekrotik kemiğin ekspoz olmasına sebep olur. Oral kavite geniş bir mikrofloraya sahiptir, periodonsiyum sebebiyle bu flora kemikle kolaylıkla temas halinde bulunabilir. Dokularda meydana gelebilecek inflamasyon durumu ortamın daha asidik hale gelmesine neden olur ve böylece kemikte biriken bifosfonatlar ortama salınır. Kollajen üzerinde sitotoksik etkiye sahip olan bifosfonatlar, kollajenden oluşan periodontal ligament liflerinde apoptoza sebep olur. Periodonsiyum koruması ortadan kalktığında ise oral kavitedeki mikroorganizmalara karşı kemik savunmasız hale gelir. Yapılan çalışmalar BRONJ da meydana gelen osteonekrotik kemik alanlarında başlıca aktinomiçes kolonilerini tespit etmişlerdir (97).

AAOMS tarafından BRONJ gelişimine neden olan etyolojik faktörler ilaçla ilişkili, lokal, demografik, sistemik ve genetik risk faktörleri olarak sınıflandırılmıştır. Bu faktörlerin bilinmesi BRONJ' un tedavi prognozu için önemli bir etkidir (11).

İlaçla ilişkili risk faktörleri kullanılan ilacın hangi yolla kullanıldığını, ne kadar süreyle kullanıldığını ve hangi ilacın kullanıldığını içerir. Daha potent ilaçların kullanılması, ilacın oral yolla değil intravenöz yolla uygulanması ve uzun süre ilaç uygulamaları BRONJ riskini arttırmaktadır (100).

Lokal risk faktörleri diş çekimi, dental implant uygulaması, periapikal cerrahi, kist tümör cerrahisi ve periodontal cerrahi gibi dentoalveolar cerrahi işlemler; mevcut torus, ekzositoz, keskin mylohyoid sırt gibi mukozanın kalınlığının azaldığı lokal anatomik durumlar; doku ile uyumsuz protetik restorasyonlar, dental veya periodontal abses gibi eşlik eden oral problemler olarak sınıflandırılabilir. Yapılan çalışmalarda invaziv cerrahi yaklaşımların BRONJ riskini 5-21 kat (74), uygun olmayan protetik restorasyonlar ve eşlik eden abselerin ise 7 kat arttırdığı bildirilmiştir (101).

Yaş, ırk, yaşam süresi ve kanserle mücadele edilen süre gibi demografik etkenler BRONJ gelişimi için risk faktörleri arasında belirtilmiştir (63). İntravenöz bifosfonat kullanan hastalarda yapılan çalışmada artan yaş ile BRONJ' un ilişkili olduğu

görülmüştür (102). Yaşamda geçirilen her sene için BRONJ riski 1.1 kat artmaktadır (103).

Çalışmalar bifosfonatlarla birlikte kullanılan bazı antineoplastik ilaçlar (siklofosfamid) ve kortikosteroidlerin BRONJ riskini arttırdığını göstermiştir (103). Sistemik bir rahatsızlık olan diyabetin de BRONJ için risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür. Oral dokudaki iyileşmeye olan etkisinin buna sebep olabileceği düşünülmektedir ancak bu sistemik komorbidite daha fazla veriyle desteklenmediği sürece BRONJ için kesin risk faktörü değildir (104).

Tüm bu verilerin sonucunda herhangi bir sebeple bifosfonat tedavisine başlayacak olan hastanın, tedavi öncesinde detaylı bir oral ve dental muayeneden geçmesi büyük önem arz etmektedir. Yapılan muayenede gerekli görülen tüm invaziv tedaviler ve oral sağlığı bozan tüm mevcut durumlar bifosfonat terapisinden önce tamamlanmalı ve oral hijyen uygun hale getirilmelidir. Bu şekilde sonrasında hastanın konforunu ve sağlığını tehlikeye atacak olumsuz durumların önüne geçilmeye çalışılmalıdır.

2.2.7.1. BRONJ Evreleri ve Klinik Bulgular

AAOMS tarafından yayınlanan protokolda bifosfonat tedavisi uygulanan hastalar BRONJ gelişim riski ve progresyonu açısından evrelenmiş ve bu evrelere göre tedavi protokolleri belirlenmiştir. Risk Grubu, Evre 0, Evre 1, Evre 2 ve Evre 3 olmak üzere 5 grup tanımlanmıştır (12);

Tablo 2.2. BRONJ evreleri

AAOMS EVRELEMESİ	
Riskli	Oral veya intravenöz bifosfonatlar ile tedavi almış veya alacak hasta grubu olup BRONJ bulgusu mevcut değildir.
Evre 0	Oral veya intravenöz bifosfonat tedavisine başlanmış hasta grubudur. Klinik olarak nekrotik kemik bulgusu olmamasına karşın non-spesifik klinik bulgular ve semptomlar bulunmaktadır (odontojenik bir neden olmadan duyulan dental ağrı, temporomandibular eklem bölgesine yansıyan künt kemik ağrısı, sinüs duvarının inflamasyonuna bağlı sinüs ağrısı ve duyuşal sinirlerde zedelenme gibi bulgular).
Evre 1	Hastalarda enfeksiyon belirtileri bulunmaz ancak ekspoze ve nekrotik kemik veya bir prob yardımı ile kemiğe ulaşılan fistül varlığı mevcuttur.
Evre 2	Evre 1' den farklı olarak ağrı ve enfeksiyon bulguları da tabloya eklenmiştir. Ekspoze ve nekrotik kemik veya bir prob yardımı ile kemiğe ulaşılan fistül varlığı bulunan hastalarda; pürulan drenaj görülen veya görülmeyen ekspoze ve nekrotik kemik bölgesinde eritem veya ağrı bulguları gibi enfeksiyon belirtileri görülür.
Evre 3	Ekspoze ve nekrotik kemik veya bir prob yardımı ile kemiğe ulaşılan fistül varlığı bulunan hastalarda ağrı, enfeksiyon ve aşağıdaki bulgulardan bir veya birden fazlasının bulunması: Ekspoze nekrotik kemik alanının alveol kemiğini aşması , (mandibular alt sınır, ramusu, maksiller sinüsü ve zigomatik kemik) patolojik fraktür oluşumu, ekstraoral fistül varlığı, oroantral/oro nazal bağlantılar, mandibula alt sınırını veya sinüs tabanını aşan osteolizis görülmesi.

BRONJ olgularının kliniğinde alveolar kemikteki osteonekroz tipik bulgudur. Kemik açığa çıkar ve bazen tabloya ağrı da eşlik eder. Bifosfonat ile tedavi edilen hastalarda meydana gelen osteonekroz hastaların yaklaşık % 30' unda asemptomatiktir ve yıllarca bu şekilde kalabilir. Ancak hastaların büyük bir bölümünde yumuşak dokuda şişlik, ağrı, süpurasyon, intraoral veya ekstraoral drenaj gibi enfeksiyon bulguları ve diş kayıpları gibi şikayetler görülmektedir. BRONJ olgularında meydana gelen enfeksiyon

fasyalara ve derin boşluklara yayılabilir ve bu durum yaşamı tehdit eden ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Ayrıca çenelerin geniş alanlarda etkilenmeleri veya meydana gelen patolojik fraktürler sebebiyle inferior alveolar sinir hasar görebilmekte ve bunun sonucunda hastalarda parestezi gibi bulgular gelişebilmektedir (105). Üst çenede gelişen BRONJ olgularında oroantal bağlantıya ve maksiller sinüzite sebebiyet veren durumlar söz konusu olabilmektedir. Vakalarının yaklaşık % 40' ında maksiller sinüzit şikayetleri meydana gelmektedir (106). Ayrıca diş kayıpları ve enfeksiyona bağlı halitosis de sıklıkla karşılaşılan klinik durumlardandır (107).

Bifosfonat tedavisi gören BRONJ gelişmemiş hastalarda BRONJ oluşum riskini önceden tahmin edebilmek, yapılacak girişimsel işlemlere buna göre yön vermek; BRONJ gelişen hastalarda ise tanı koymak ya da koyulan tanıyı desteklemek adına çeşitli kan parametrelerinin BRONJ oluşumu ile ilişkisi değerlendirilmiştir. C terminal telopeptidler (CTX) kemik turnoverı sırasında olgun tip 1 kollajenlerin parçalanması sonucu ortaya çıkıp seruma geçerek daha sonrasında idrarla atılan fragmanlardır. Kemikteki yapım yıkım olayı arttığında özellikle rezorbsiyon sürecinde bu fragmanların serumdaki seviyesinde yükselme meydana gelir. Bu yüzden serumdaki CTX seviyesi kemik turnoverinin güçlü bir belirteçidir. Bifosfonat kullanımı gibi kemik resorbsiyonunun baskılandığı durumlarda ise serum CTX düzeyi çok düşük seviyelere inebilir (93). Yapılan bazı çalışmalarda BRONJ riskinin CTX düzeyi 100 pg/ml' nin altında olduğunda BRONJ yüksek, 100-150 pg/ml' de orta ve 150 pg/ml seviyesinde ise düşük olduğu belirtmiştir (108). Ancak serum CTX seviyesi ile yapılan bazı çalışmalarda ise tam aksi iddia edilmiş ve CTX seviyesi ile BRONJ arasında bir ilişki olmadığı öne sürülmüştür. Ayrıca artan serum CTX düzeyi osteoklast aktiviteyi değil maligniteyi gösterdiği bildirilmiştir (109). Bu çelişkili sonuçlar serum CTX seviyesiyle ilgili daha çok çalışmanın yapılması gerektiğini göstermektedir. Mevcut durumda hatalı yönlendirmeye sebep olabilmesi ve yaygın kullanımının mevcut olmaması nedeniyle tek başına serum CTX düzeyi ile BRONJ' un teşhisinin, oluşum riskinin ve tedavisinin belirlenmesi doğru bir yaklaşım olarak görülmemektedir (110).

2.2.7.2. Radyolojik Bulgular

BRONJ' un teşhisinde konvansiyonel (periapikal ve panoramik radyografiler) radyografiler en sık kullanılan görüntüleme yöntemleridir. Sadece radyografideki görüntü BRONJ' un tespiti için yeterli değildir ancak litik ve sklerotik kemik alanları rahatlıkla görülebilir. Osteonekrozda erken radyografik görüntü verecek belirgin bir

değişiklik mevcut değildir. Ancak lezyon ilerledikçe periodontal ligamentte genişleme, lamina durada daralma, trabeküler kemikte densite artışı ve iyileşemeyen remodelasyonu yetersiz çekim soketleri periapikal radyografilerde izlenebilir. Panoramik görüntülerde ise lezyon ilerledikçe trabeküler yapıda değişiklik, geniş osteolitik radyolüsent alanlarla birlikte kemik sekestrasyonu, kemik iliğinde fibrozis, periosteal kalınlaşma, yeni kemik oluşumu, kortikal kemikte erozyon ve bazen çene kemiği fraktürleri görülebilir. Her ne kadar sınırlı ve iki boyutlu görüntüler vermeleri gibi limitasyonları mevcut olsa da genel görüş periapikal ve panoramik gibi konvansiyonel grafilerin ilk başvurulacak yöntem olması yönündedir. Bilgisayarlı tomografi (BT) ile üç boyutlu görüntüleme sayesinde konvansiyonel radyografilerle görüntülenemeyen erken evreki osteosklerotik bölgeler maksillada Schneiderian membranındaki kalınlaşma izlenebilir ve kemik iliği boşluğundaki daralma tespit edilebilir (111).

Manyetik rezonans incelemelerinde kemik iliği, nörovasküler yapılar, lenfadenopatiler ve inflamasyona bağlı değişimler takip edilir. BT ve manyetik rezonans bulguları ile konvansiyonel grafilere net yansımayan ve klinik olarak tespit edilemeyen erken evre lezyonlarının tespiti sağlanabilir. Lezyonların sert ve yumuşak dokulardaki bu 3 boyutlu görüntüleri sayesinde yapılan erken teşhis tedavi prognozu açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle her ne kadar konvansiyonel grafiler ilk seçenek olarak görülse de BRONJ tanısında manyetik rezonans ve BT incelemelerine sıklıkla başvurulmaktadır (112).

2.2.7.3. BRONJ' un Tedavisi

Günümüzde BRONJ tedavisi için başarısı kesin olarak kabul görmüş bir protokol bulunmamaktadır. Mevcut tedavi protokolü BRONJ oluşumu başlamadan önce oluşabilecek risk faktörlerini ortadan kaldırmak oluştuktan sonra ise durumun daha kötüye gitmesini önlemek ve semptomları gidermek üzerine kuruludur. Bu nedenle bifosfonat tedavisi uygulanacak hastada oral hijyen optimal hale getirilmeli, invaziv dental işlemler tamamlanmalı ve ileriye yönelik sorun oluşturabilecek bütün faktörler elimine edilmelidir. BRONJ oluşumu meydana geldikten sonra invaziv cerrahi işlemlerden uzak durulması önerilmekte ve ağrı gibi semptomların giderilmesi, dokulardaki enfeksiyonun kontrol altına alınması, nekrotik alanın ilerlemesinin önlenmesi ve fonksiyonun kazandırılması hedeflenmektedir. Bifosfonat kullanan

hastanın tedavi planının oluşturulabilmesi için ilk dikkat edilmesi gereken husus hastalığın hangi evrede olduğudur. Günümüzde BRONJ tedavisi hastalığın evresine göre medikal yaklaşım, medikal/cerrahi yaklaşım ve medikal/cerrahi yaklaşımın çeşitli destekleyici tedavilerle birlikte uygulanması şeklinde yapılmaktadır (113).

AAOMS tarafından BRONJ' un klinik evreleri göz önünde bulundurarak yapılan bildiriye temel tedavi prensipleri belirlenmiştir (11). Bu bildiriye göre;

Tablo 2.3. BRONJ tedavi protokolü

AAOMS Tedavi Protokolü	
Evre 0	Ağrıyı gidermek gibi semptomatik tedaviler dışında herhangi bir tedavi endikasyonu bulunmamaktadır. Hasta düzenli kontrole çağrılmalı ve ağız hijyeni eğitimi verilmelidir.
Evre 1	Klinik olarak düzenli kontrol ve konservatif bir yaklaşım sağlanmalıdır. Hastaya ağız hijyeni konusunda önerilerde bulunulmalıdır. Antimikrobiyal ağız gargaraları ile bölgenin temizlenmesi önerilmelidir. Ayrıca devam eden bifosfonat tedavisi ile ilgili hastanın doktorundan görüş alınması gerekmektedir.
Evre 2	Semptomatik tedavi uygulanmalıdır. Ağrıyı gidermek adına analjezik ve sekonder enfeksiyonun tedavisi için antimikrobiyal gargaralarla birlikte oral penisilin, klindamisin ya da sefazolin gibi geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi uygulanmalıdır. Cerrahi tedavi konservatif olmalı veya ertelenmelidir. Yumuşak doku irritasyonunu önlemek adına yüzel debridman uygulanabilir.
Evre 3	Antibakteriyel gargara yapılmasına ek olarak oral veya intravenöz yoldan antibiyotik uygulaması önerilmektedir. Parasetamol ile kombine edilmiş narkotik analjezikler şiddetli ağrının kontrolü için kullanılabilir. Nekrotik kemiğin cerrahi olarak uzaklaştırılması gerekmektedir. Ayrıca ilerleyen durumlarda cerrahi debriman veya rezeksiyon gerekebilir.

Bazı araştırmacılar, BRONJ olgularında bifosfonat tedavisinin kesilmesi gerektiğini önermektedir. Ancak özellikle intravenöz kullanılan bifosfonatlar tek doz

kullanımlarda dahi etkisini göstermekte ve kemikte biriken bisfosfonatların yarı ömürlerinin 10 yıldan fazla olduğu bilinmektedir. Bu yüzden tedaviye ara verilmesinin ne kadar doğru bir karar olduğu tartışma konusudur (114).

BRONJ olgularında ağza açık nekrotik kemiklerden alınan örneklerde Actinomyces, Veilonella, Eikenella, Moraxella, Fusobacterium, Bacillus, Staphylococcus, Streptococcus ve Selenomonas gibi bakteri türleri görülmüştür. Tüm bu mikroorganizmalar penisiline duyarlıdır. Bu türlerin hepsinin penisiline karşı duyarlı olması sebebiyle tedavide ilk olarak penisilin kullanılmaktadır. Penisilin grubu ilaçların bazı yan etkileri bulunmasına rağmen iyi tolere edildiğinden yıllarca direnç gelişmeden kullanılabilir. Penisilin kullanılmadığı durumlarda tetrasiklin grubu ya da makrolid grubu antibiyotikler kullanılabilir. Ancak uzun süreli kullanımlarda toksisiteye sebep olduklarından dikkatli kullanılmalı ve semptomlar geçtiğinde kullanımı bırakılmalıdır (65).

2.2.7.4. BRONJ Tedavisinde Ek Yöntemler

BRONJ' un bilinen bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Yararlı etkileri olduğu düşünülen farklı tedavilere yanıt alınamaması ve hastalığın ilerlemesi hem hastaları hem de hekimleri zor duruma sokmaktadır. Ayrıca mevcut bu tedavi protokollerinde tedavinin uzun süre devam etmesi ve bu süre zarfında kullanılan medikal ajanların zararlı etkileri sebebiyle hasta kooperasyonunda ve yaşam kalitesinde bozulmalar meydana gelmektedir. Bu yüzden uygulanan yaklaşımlara ek olarak iyileşme sürecini desteklemek, hızlandırmak, tedavi başarısını arttırmak ve böylece hastanın yaşam kalitesini yükseltmek amacıyla bazı destek tedaviler önerilmektedir. Bu yöntemler hala tartışmalı olup, yapılacak daha ileriki geniş kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir (90).

Hiperbarik oksijen tedavisi (HBO)

HBO' nun mekanizması kandaki oksijeni arttırmak üzerine kuruludur. Kandaki oksijenlenmenin artması dokulardaki oksijenlenmeyi de arttıracaktır. BRONJ' un oluşum etyolojisinde bifosfonatların anti-anjiyogenik özelliklerinin de bir etken olduğu bilinmektedir. HBO üzerinde yapılan çalışmalarda bu ajanın anjiyogenezise olan olumlu etkileri bildirilmiş ve hipervaskülarizasyon oluşturduğu görülmüştür (115). Ayrıca HBO reaktif oksijen türlerinin artmasına aracı olarak, osteoklast diferansiyasyonunda rol alan RANKL fazını stimule etmekte ve böylece kemik turnoverindeki baskılanmayı kontrol

altında tutmaktadır (116). Bu etkileri dışında HBO' nun doku iyileşmesini hızlandırıcı, inflamasyonu baskılayıcı ve bakteriosidal etkileri de bulunmaktadır. Tüm bu bahsedilen etkileri sayesinde HBO' nun BRONJ' da kullanılabileceği düşünülmüştür. Ancak malignensi ve metastatik kemik tümörü varlığında (117), klostrifobisi ve akciğer rahatsızlığı bulunan hastalarda HBO uygulaması uygun görülmemektedir. Ayrıca yapılan farklı çalışmalarda HBO' nun BRONJ üzerinde etkisinin bulunmadığını savunan yazarlar da bulunmaktadır. HBO' nun BRONJ tedavisinde tek başına değil konvansiyonel tedaviye ek destek tedavisi olarak uygulanması önerilmektedir (108).

Ozon tedavisi

Ozon ksantin/ksantin oksidaz yolunu bloke ederek reaktif oksijen türlerinin üretimini engeller ve endojen antioksidan sistemi uyarır. Böylece kemik iyileşmesine olumlu etkiler sağlamış olur. Ayrıca hemoglobin oranı ve kırmızı kan hücre konsantrasyonunu arttırdığı da bildirilmiştir (118). Tüm bunların yanında mikroorganizmalar üzerindeki germisid etkisi ve analjezik özelliğinin bulunması BRONJ vakalarında ozonun yardımcı tedavi olarak kullanılmasını yaygınlaştırmaktadır (119).

Lazer Tedavisi

DDLDT' nin biostimülan özelliği sayesinde, doku iyileşmesini hızlandırması, yeni kan damarı oluşumu üzerindeki olumlu etkisi ve antiseptik etkisi BRONJ tedavisinde kullanımının yararlı olabileceğini düşündürmüştür (115). DDLDT inorganik kemik matriksini, yara iyileşmesinde fibroblastların büyümesini ve kollajen üretimini arttırmaktadır (120). Yapılan çalışmalarda DDLDT' nin antibiyoterapi ile birlikte kullanılmasının BRONJ oluşumu, ödem, halitozis ve püy akışı üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu göstermiştir (6).

Bazı Er: YAG gibi antibakteriyel etkiye sahip lazerler sert dokularda kullanılmakta ve konservatif sert doku cerrahisine olanak tanımaktadırlar. Er: YAG lazerler çok ince alanlara penetre olurlar ve kemikte çok az ısı oluştururlar. Bu avantajları sayesinde özellikle debridmanın gerektiği BRONJ' lu hastalarda nekrotize kemiği buharlaştırarak minimal invaziv çalışmaya olanak sağlarlar (115).

Plateletten Zengin Plazma (PRP)

PRP preoperatif olarak hastadan alınan kanın santrifüje edilmesiyle elde edilen ve içerdiği platelet tarafından salgılanan büyüme faktörleri sayesinde yara iyileşmesi mekanizmasını hızlandırıp arttıran bir yöntemdir. PRP' nin yumuşak ve sert doku iyileşmesindeki olumlu etkileri BRONJ gelişen ya da gelişme riski yüksek olan

hastalarda uygulanmasını gündeme getirmiştir. PRP uygulamasının BRONJ' lu hastalarda cerrahi sonrası iyileşmeyi hızlandırdığı ve ağrının azalmasına yardımcı olduğu görülmüştür (121).

Paratiroid Hormonu (PTH)

PTH 84 amino asitten oluşan bir zincirden oluşmaktadır. Teriparatit ise PTH' nin ilk 34 amino asitinden oluşan bir rekombinant insan proteindir (122). Teriparatid kemik rejenerasyonunu hızlandırır ve bifosfonatlar sebebiyle oluşan antiosteoklastik aktiviteyi tersine çevirir. Bu etkilerinden dolayı BRONJ tedavisinde kullanılması tavsiye edilmektedir. Teriparatitin başarısı ile ilgili çelişkili veriler bulunmakla birlikte, iki yıldan uzun süren kullanımlarında osteosarkom riskini arttırdığı gösterilmiştir ve metastatik kanser hastalarında uygulanmaması önerilmiştir. Bu sebeplerden, teriparatitin BRONJ hastalarında uygulanmasıyla ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır (123).

Pentoksifilin ve Alfa Tokoferol

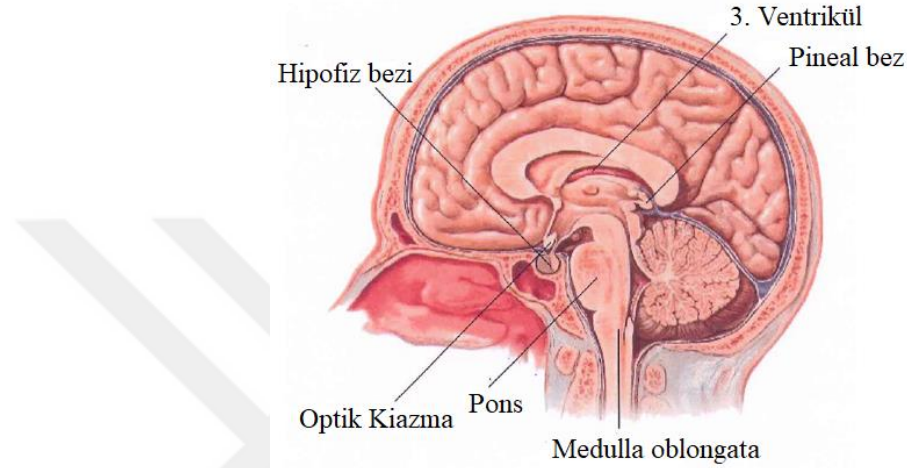
Metilksantin derivesi olan pentoksifilin ve bir E vitamini türü olan alfa tokoferol radyoterapi sebebiyle meydana gelen osteoradyonekroz ve fibrozisin tedavisinde kullanılmaktadır. Pentoksifilin kan viskozitesini azaltır, platelet fleksibilitesini artırır, fibrinolitik aktiviteyi düzenler ve periferik kan akımını arttırarak dolaşımı güçlendirir. Alfa tokoferolün ise dokudaki fibrozisi önleyerek nekroza sebep olan serbest radikallerin yol açtığı hasarı azaltabileceği bildirilmiştir (124). Antimikrobiyal tedaviye ek olarak uygulanan pentoksifilin ve alfa tokoferolün BRONJ gelişme riskini azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (125).

2.3. Melatonin

2.3.1. Pineal Bez

İlk kez milattan önce 3. yüzyılda Herophilus tarafından tanımlanan Pineal bez (Epifiz Cerebri), Latince çam kozalağı anlamına gelen pinealis kelimesinden adını almıştır (126). Melatonin ilk olarak 1917 yılında tanımlanmış ancak 1958 yılına kadar izole edilememiştir (127). En önemli gelişmeler ise Lerner ve ark. tarafından 1958' de gerçekleştirilmiştir. Lerner ve ark. pineal bez kaynaklı seratoninden türeyen bir molekülün kurbağa derisindeki melanin pigmenti içeren melanoforların renginde açılmaya neden olduğunu keşfetmişler ve bu moleküle melanofor ve seratonin moleküllerinin birleşimi olan melatonin ismini vermişlerdir (128).

Pineal bez serebral hemisferlerin arasında ve 3. Ventrikülün arkasında yer almaktadır (129). Embriyolojik olarak nöroektodermden gelişir. Konik yapıda, yaklaşık 150 miligram (100-180 mg) ağırlığında, 3-6 mm (milimetre) genişliğinde, 5-9 mm uzunluğunda ve 3-5 mm derinliğindedir. Bu boyutsal özellikleri sebebiyle en küçük endokrin bez olarak adlandırılır. Bezin etrafı piamaterdeki bağ dokusu ile çevrilidir (130).



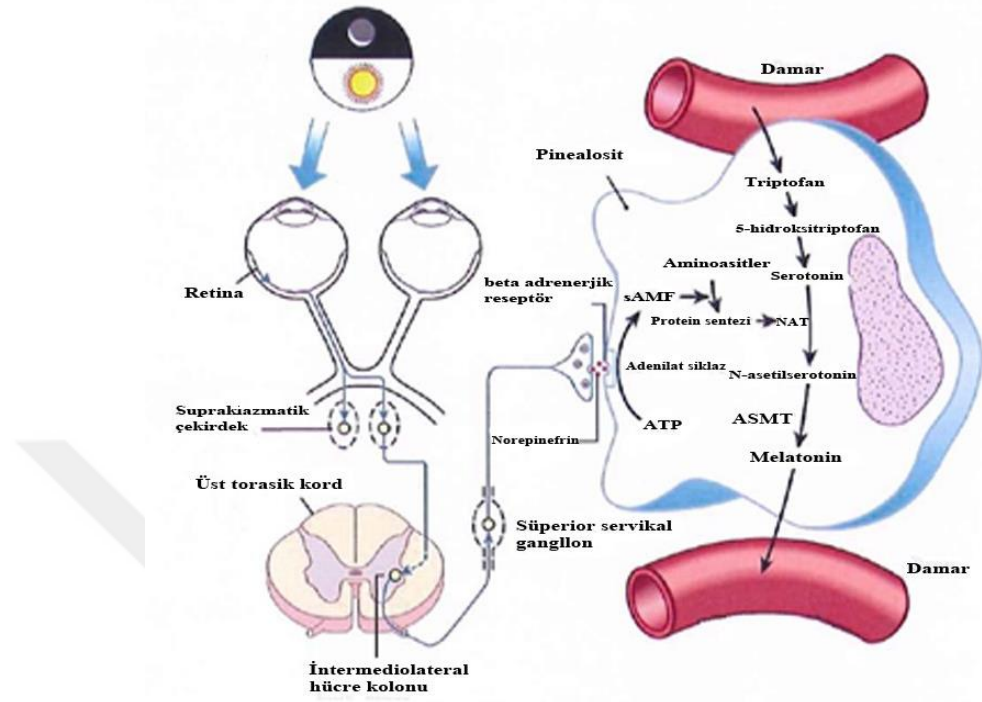
Şekil 2.4. Pineal bez (131)

Pineal bez damarsal yapı açısından zengindir öyle ki böbreklerden sonra en zengin kapiller ağa sahiptir (132). Ayrıca yapısında kan beyin bariyeri bulunmaz. Beslenmesi arteria cerebri posteriorun dalı olan arteria choroideadan, venöz dolaşımı vena cerebri magna veya internadan (126), (130), innervasyonu ise periferik sempatik, parasempatik ve merkezi sinir sisteminin sinir lifleri tarafından sağlanır. Pineal bezin hacimsel büyüklüğü çocukluk döneminde artarken 20' li yaşlardan itibaren sabit kalır. Bu yaşlardan sonra çeşitli derecelerde kalsifiye olur ancak yaşam boyu işlevini sürdürmeye devam eder (133).

Yapısında 5 tip hücre bulunur. Esas olarak kümelenmiş pinealosit hücrelerinden ve bu kümeleri çevreleyen bağ dokusundan oluşur. Pinealositler dışında intertisyel hücreler, perivasküler fagositler, nöronlar ve peptiderjik nöron benzeri hücreleri içerir (134).

Pineal bezden biyolojik aminler olarak nörepinefrin, histamin, serotonin, melatonin, dopamin, oktopamin ve peptid olarak lüteinleştirici hormon salgılatan

hormon (LHRH), tiroid salgılatan hormon (TSH), somatostatin, oksitosin analogu vazotosin ve arjinin sentezlenmektedir (17).



Şekil 2.5. Melatoninin biyosentezi (135)

Pineal bez canlılarda retina yoluyla aldığı fotik uyarıyı nöroendokrin sinyallere dönüştürür ve bu uyarıyı dönüştürdüğü iletilere yanıt olarak melatonin salgılar (16). Sinirsel invazyona bağlı olarak endokrin fonksiyonlarını gerçekleştiren pineal bez bu özelliğiyle bir nöroendokrin bez olarak kabul edilir ve hipotalamusta bulunan suprakiazmatik çekirdekle birlikte biyolojik bir saat gibi çalışır. Melatonin göze gelen aydınlık ya da karanlık uyarılara bağlı olarak salgılanmaktadır. Melatonin hormonu karanlıkta meydana gelen salgılanmasındaki artış sebebiyle karanlık hormonu olarak da anılmaktadır. Karanlığın başlamasıyla birlikte retinada oluşan uyarılar buradaki fotoreseptörlerde nöral bir iletiye dönüştürülür ve retino-hipotalamik yol ile hipotalamusa iletilirler. Bu sempatik lifler optik sistemden ayrılırlar ve hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeklerinde sonlanırlar. Burada sinaps oluşturduktan sonra omurilikte intermediolateral kordon içerisinde iletilirler. Omurilikten ayrılan bu preganglionik nöron aksonları daha sonra süperior servikal gangliondaki postsinaptik nöronlar ile sinaps yaparlar ve pineal beze ulaşırlar. Bu sempatik sinirlerden

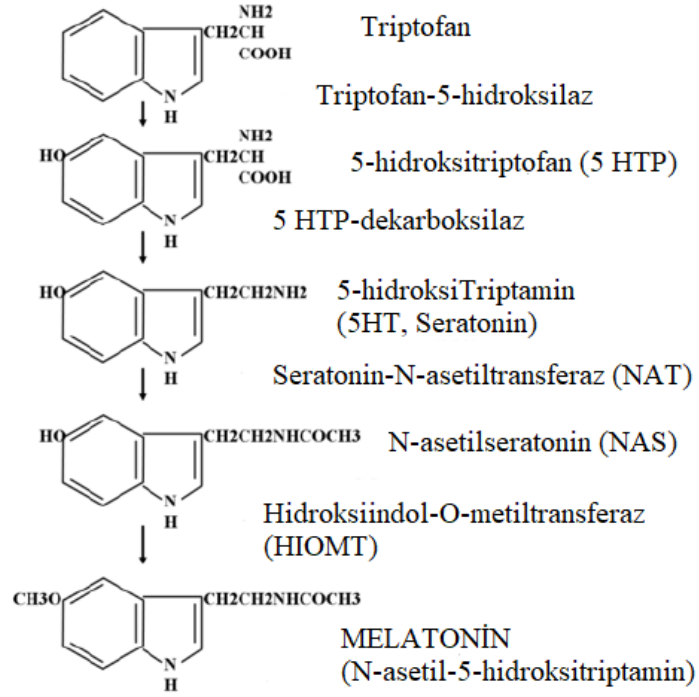
nörepinefrinin salınımı β ve α adrenerjik reseptörler üzerinden pineal bezin hücrelerini uyararak melatonin sentezini başlatır (136).

Bu reseptörler adenilat siklaz aktivasyonunu uyararak hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) yapımını arttırlar. cAMP artışıyla birlikte seratonin N asetil transferaz enzimi aktivasyonu da artar. Melatonin sentezinin % 85' i β ve % 15' i ise α reseptörlerin uyarılmasıyla gerçekleşir ve α reseptörleri aynı zamanda β 1 reseptörlerinin uyarımında da artış meydana getirir (137).

2.3.2. Melatoninin Biyosentezi ve Metabolizması

Melatonin insanda büyük oranda pineal bezden salgılanan uyku, immunité, üreme, kalp ritmi, vücut sıcaklığı gibi birçok biyolojik fonksiyonun ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesi gibi önemli süreçlerde yer alan endojen bir indolamin nörohormondur. Memelilerin dışında, bakterilerde, bitkilerde, protistalarda, omurgalı ve omurgasız hayvanlarda da bulunur. Doğal bir nörotransmitterdir ve sentezi, esansiyel bir aminoasit olan, dışardan besinlerle alınan ve dolaşımında serbest halde bulunan triptofanın pinealosit hücrelerine alınmasıyla başlar (136).

Molekül ağırlığı 232 olan melatonin N-asetil 5-metoksitriptamin olarak adlandırılır. Melatonin sentezi triptofanın pinealosit içine alınıp triptofan 5 hidroksilaz enzimiyle 5-hidroksitriptofana hidrosillenmesiyle başlayan ardışık dört enzimatik tepkime sonucunda gerçekleşir. 5-hidroksitriptofan melatonin ve seratonin sentezindeki ara metabolittir ve kan beyin bariyerinden kolaylıkla geçer. Ortaya çıkan 5-HTP 5 hidroksi triptofan dekarboksilaz enzimi aracılığı ile karboksil grubunu kaybederek kan-beyin bariyerinden geçemeyen 5 hidroksitriptamin (seratonin)' e dönüşür. Daha sonra seratonin N asetil transferaz enzimi ile asetillenerek N-asetil seratonine ve son olarak N-asetil seratonin de hidroksiindol-o-metil transferaz enzimi (HIOMT) ile melatonine (N-asetil 5-metoksitriptamin) dönüşür (138). Hidroksiindol-o-metil transferaz enzimi pineal bez dışında başka organlarda da bulunur ve bu durum melatoninin pineal bez dışında başka organlarda da sentezlendiğini kanıtlar niteliktedir. Karanlık ve aydınlık uyarı sistemi dışında manyetik alan da melatonin sentezini etkilemektedir (17).



Şekil 2.6. Melatoninin sentez basamakları (17)

Vücudumuzdaki biyolojik mekanizmalar, zamana bağlı olarak hücrelerle başlayıp organizmanın tamamına yayılırlar. Bu değişimler 'biyolojik ritimler' olarak tanımlanmaktadır. Saniyelerden yıllara değişkenlik gösteren bu ritimler belirli bir düzende seyrederek. Melatonin sentezi bilinen en önemli biyolojik ritimlerden biridir. 20 ila 28 saat arasında değişen ve yaklaşık bir gün süren melatonin sentezi 'sirkadiyen ritim' e göre düzenlenmektedir. Sirkadiyen ritim, pıhtılaşma ve büyüme faktörlerinin kontrolü, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, kalp ritmi ve kan basıncını ayarlanması gibi birçok biyolojik süreçte düzenleyici rol oynamaktadır (139). Melatonin sentezini kontrol eden Sirkadiyen ritim hipotalamusta bulunan suprakiazmatik çekirdek tarafından düzenlenir. Işıqla birlikte meydana gelen uyarılar altında hiperpolarize durumda olan retinal hücreler, karanlıkta depolarize olurlar ve böylece melatonin sentezi başlamış olur (136).

Pineal bez dolaşımdaki melatonin miktarının % 80' ini sentezlenmekte (140) ve geriye kalan kısım ise retina, gastrointestinal sistem hücreleri, ovaryum, lens, renal korteks, lenfosit, platelet, akciğerler, dalak, kalın bağırsak, kemik iliği, plasenta, monositler, timus gibi periferel doku ve hücreler tarafından sentezlenmektedir. Bununla birlikte buralarda gerçekleştirilen sentezin plazmadaki melatonin düzeyine etkisi çok azdır (127), (135), (141).

Pineal bez diğer endokrin organlardan farklı olarak melatoninini yapısında depolamaz. Melatonin yüksek lipofilik yapısı sayesinde kan beyin bariyerini rahatlıkla geçer ve hücre membranlarına difüze olur. Pineal bezdeki dolaşımın zenginliği ve lipofilik yapısı sayesinde melatonin pasif diffüzyonla dolaşıma geçer ve vücut sıvılarına hızlı bir şekilde dağılır. Dolaşımla vücuda dağılan melatonin kan, beyinomurilik sıvısı, idrar, tükürük, lenf, amniyotik sıvı, sperma ve anne sütünden izole edilmiştir (126), (137).

Yetişkin bir bireydeki serum melatonin düzeyinde 24 saatlik zaman dilimi içerisinde düzenli iniş çıkışlar görülür. Melatonin serumda gün boyuca 0-20 pg/ml gibi düşük bir oranda seyrederken gece 10-20 kat artarak 20-200 pg/ml düzeyine yükselir ve ortalama 60-70 pg/ml olarak seyrederek. Melatonin miktarı 20:00 ile 23:00 saatleri arasında artarak gecenin ortasında maksimum seviyeye ulaşır ve sabah 7:00 ile 9:00 saatleri arasında giderek azalmaya başlar (142). Bu üretim periyodunda % 80' i gece olmak üzere günde yaklaşık 30 mg melatonin sentezlenir. Gün ışığı dışında belirli şiddetteki yapay ışık da melatonin sentezini baskılamaktadır (143).

Melatonin konsantrasyonu ve kandaki maksimum değeri yaş, menstrual siklus, ergenlik, gelişim dönemi ve hastalık (çeşitli enfeksiyonlar, bağışıklık sistemi hastalıkları ve kanser) gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Melatonin serumda doğumdan hemen sonraki dönemde oldukça az miktarda saptanır. 6-8. haftalarda bu miktar oldukça artar ve 1-3 yaşlarında en yüksek seviyeye ulaşır. Bu dönemden sonra melatonin seviyesinde % 80 azalma (özellikle ergenlik dönemi öncesinde) meydana gelir ve çocukluk döneminin sonlarına doğru ortalama bir değere ulaşır (30-40' lı yaşlara kadar sabit kalır). Son olarak ise 70' li yaşlarda bir miktar daha azalma gösterir (142).

Melatoninin % 50-70' i kanda geri dönüşümlü olarak albümin ve glikoproteinlere bağlı halde bulunur. Endojen yollarla sentezlenen melatoninin dolaşımdaki yarılanma ömrü 20-30 dakika (141) iken ekzojen yolla alınan melatoninin eliminasyonu iki fazda gerçekleştiği için bu sürenin 12-48 dakika olduğu görülmüştür (142). Sentezlenip dolaşıma katılan melatoninin % 90' ından fazlası karaciğerde geriye kalan kısım ise böbrekte metabolize edilir. Melatonin karaciğerde 6-hidroksimelatoninine metabolize olur. Sonrasında metabolize olan bu ürün sülfatla birleşerek 6-sulfatoksimelatoninini meydana getirir. Meydana gelen 6-sulfatoksimelatonin melatoninin idrardaki temel metabolitidir. Dışkıda melatonin metabolitlerinin % 20' lik bölümü

bulunurken, idrarda bu oran % 70' tir. Gece idrarda bulunan bu metabolitlerin oranı artış gösterir (142).

2.3.3. Melatoninin Etki Mekanizması

Melatoninin sirkadiyen ritim düzenlenmesi, uyku düzeninin ve vücut ısısının düzenlenmesi, kardiyovasküler sistemin korunması, gastrik mukozanın korunması, üreme mekanizmasının düzenlenmesi, serbest radikallerden vücudun korunması, kanser oluşumunun önlenmesi, kemik metabolizmasının düzenlenmesi, oksidatif stresin önlenmesi, cildin ultraviyole ışınlar karşı korunması, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, antiinflamatuvar ve fetal gelişimin korunması gibi fizyolojik birçok olayda önemli rol oynar (142), (144).

Melatonin etkilerini reseptörleri üzerinden gerçekleştirmektedir. Melatonin reseptörlerinin ikisi hücre membranında diğer ikisi ise çekirdekte bulunur. Hücre membranına bağlı bulunan melatonin reseptörleri farklı farmakolojik ve farmakokinetik özellikleri sebebiyle MT1 (melatonin 1 reseptörü) ve MT2 (melatonin 2 reseptörü) olarak ikiye ayrılmıştır. Hücre çekirdeğinde ise retinoid Z ve O reseptörleri bulunur. Hipofizin, cilt, hipotalamus, preoptik bölge, ovaryum, plesanta, testis, ince bağırsak, meme, karaciğer ve dalakta MT1 reseptörleri ve retinada yoğun olmak üzere, immün sistem, adipoz dokular ve meme bezlerinde ise MT2 reseptörleri bulunmaktadır (145). Ayrıca retinal yollar, serebellum ve ganglion hücreleri MT1 ve MT2 reseptörlerinin her ikisini birden bulundurmaktadırlar (146).

MT1 reseptörünün aktivasyonu sonucu adenilat siklaz inhibisyonu meydana gelir ve cAMP seviyesinde düşüş gözlenir. Fosfolipaz aktivasyonu ile araşidonat salınımı stimule edilir ve sitozoldeki klasiyum miktarında artış görülür. MT2 reseptörü ise etkisini cAMP ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) inhibisyonu ile gösterir (147). Melatonin reseptörleri santral sinir sistemi, lenfosit, dalak, prostat hücreleri, lakrimal bez, preovulatuvar folikül, sperm, kolon mukozası, GIS, kemik iliği, platelet, eritrosit ve lökosit gibi pek çok doku ve organda bulunmaktadır (142), (148). MT1 reseptörleri sirkadiyen ritim, uyku, üreme, arteriyal vazokonstruksiyon, renal fonksiyon, hücre proliferasyonu, termoregülasyon gibi metabolik mekanizmlarda rol alırken MT2 reseptörleri sirkadiyen ritim, nöral termoregülasyon, retinadan dopamin salınımı, arteriyal vazodilatasyon ve immün cevapta rol almaktadır (148), (149). Melatonin ayrıca kalmodulin ve kalretikülin ile etkileşim içindedir (142), (148). Sitozolda bulunan kalmodulin kalsiyumun başlıca hücre içi reseptörüdür ve sitoplazmada submikroskopik

ipliklerden oluşan ve hücre dayanıklılığını arttıran sitoiskelet yapısından sorumludur. Kalretikulin ise endoplazmik retikulum içindeki kalsiyum konsatrasyonunu düzenler ve çekirdek resptörünün kontrolünden sorumludur (150).

2.3.4. Melatoninin Biyolojik Etkileri

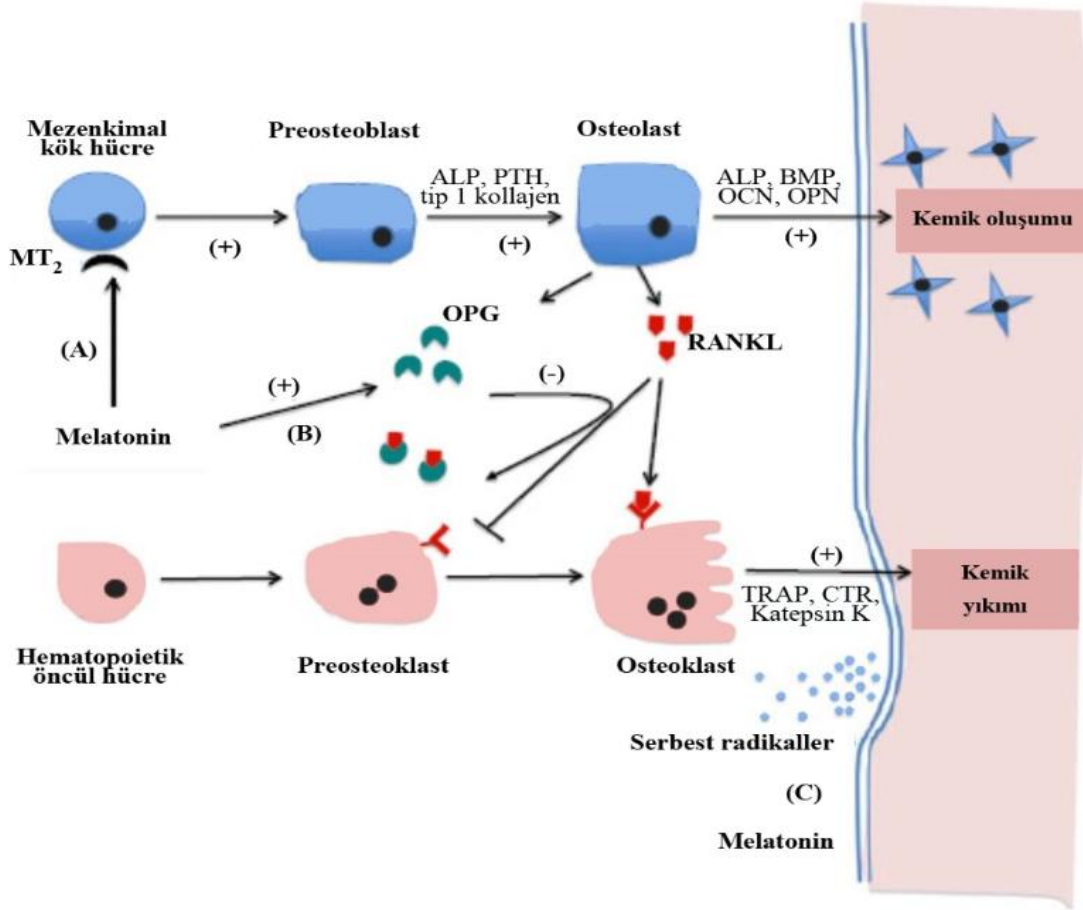
2.3.4.1. Melatoninin Kemik Doku Üzerindeki Etkisi

Kemik doku üzerindeki melatonin etkisi ilk kez epifizi çıkarılan tavuklarda görülen skolyoz sonucu belirlenmiştir (151). Kemik iliğinde melatoninin fazlaca bulunması da kemik dokusu üzerinde etkili olabileceği görüşünün ön plana çıkmasına yardımcı olmuştur (152).

Melatonin, hem osteoblastlar hem de ostaklastlar üzerinde etkilidir ve bu ikili etkiden dolayı kemiğin remodelinginde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli çalışmalarda osteoblastlar üzerinde hem MT1 hem de MT2 reseptörlerinin bulunduğu ve melatoninin preosteoblast, osteoblast ve osteoblast-benzeri hücrelerin çoğalması ve farklılaşması üzerinde olumlu etkiler meydana getirdiği bildirilmiştir (153), (154). Melatoninin kemiğin temel organik yapıtaşı olan tip 1 kollajen sentezinde artış sağladığı görülmüştür. Ayrıca alkalen fosfataz, osteopontin, kemik sialoprotein ve osteokalsin gibi kemik proteinlerinin üretimini ve kalsifiye matris oluşumunu arttırdığı da bilinmektedir (155). Bunun dışında, çeşitli çalışmalarda melatoninin yeni kemik oluşumunun önemli basamaklarından biri olan anjiyogenezisi de arttırdığı gösterilmiştir (156). Melatoninin bu yeni kemik oluşumunu arttırıcı fonksiyonları sayesinde osseointegrasyonu da arttırdığı görülmüştür. Böylece kemiğe yerleştirilen implantlarda tek başına veya büyüme faktörleri ile birlikte kullanımı oldukça yararlı sonuçlar vermektedir (157), (158).

Kemik dokuda melatoninin bir diğer etkisi ise osteoklastlar üzerinde inhibisyona neden olarak kemik rezorpsiyonunu engellemesidir. Osteoklastların faaliyetleri kemiğin yeniden yapılanma sürecinde osteblastların kontrolü altındadır. Melatoninin osteoblastlardan OPG üretimini arttırarak osteoklast aktivitesini inhibe eder. OPG RANKL' na bağlanarak yalancı reseptör görevi görür. Böylece RANKL osreoklast üzerindeki reseptörüne bağlanamaz ve kemik yıkımı önlenmiş olur (21). Yapılan çalışmalarda melatoninin 5-500 µM aralığındaki dozunun preosteoblastlar üzerindeki etkisi incelenmiş ve doza bağlı olarak RANK mRNA ve OPG seviyelerini arttırdığı görülmüştür (20). Melatonin bilinen en güçlü antioksidan ajanlardan biridir.

Osteoklastların kemik yıkımı sırasında kullandığı süperoksit radikalleri gibi serbest radikaller yıkıma yardımcı olur ve kemik yıkımı sırasında oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar. Melatoninin bu güçlü antioksidan özelliği serbest radikallerin temizlenmesine olanak sağlar ve bu sayede osteoklastların aktivitesi engellenmiş olur (159).



Şekil 2.7. Kemik hücreleri üzerinde melatoninin etki mekanizması (A) Melatonin MT₂ reseptörü yoluyla mezenkimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını sağlar; (B) osteoblastların OPG üretimini indükler ve böylece RANKL' nin preosteoklastlara bağlanmasını engelleyerek osteoklast dönüşümünü inhibe eder; (C) antioksidan özellikleri sayesinde serbest radikalleri temizler ve kemik yıkımını engellerler (160)

Bu osteoklast aktivitesini inhibe etme özelliği melatoninin osteoporoz tedavisinde kullanım alanı sağlamıştır. Osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçlara ek olarak uygulanan melatoninin doğrudan kemik rezorpsiyonu üzerinde olumlu etkiler sağlayacağı ve aynı zamanda bu ilaçlara bağlı yan etkileri de azaltacağı düşünülmektedir (21), (161). Yapılan çalışmalarda melatoninin kemik gelişimi ve

metabolizması üzerindeki etkisini hem büyüme hormonu salınımı arttırarak hem de paratiroid, kalsitonin ve östrojen gibi sistemik hormonlarla etkileşime geçerek gösterdiği bildirilmiştir (155).

2.3.4.2. Melatoninin Antioksidan Etkisi

Melatonin antioksidan özelliğini direkt antioksidan etki ile antioksidan enzimler aracılı antioksidan etki ile ve prooksidan enzimler aracılı antioksidan etki ile göstermektedir. Melatonin serbest radikaller olarak bilinen OH^- , peroksinitrit, süperoksit anyonu, nitrik oksit ve hidrojen peroksit gibi ajanların oksidatif strese bağlı olarak dokularda oluşturduğu hasarı bu ajanları direkt olarak detoksifiye ederek önler. Yapılan çalışmalarda melatoninin çok güçlü bir antioksidan olduğu bilinmekle birlikte glutatyondan 5 kat, mannitolden 14 kat, E vitamininden 2 kat ve dimetil sülfoksitten ise 500 kat daha etkili olduğu gösterilmiştir (135). Melatonin antioksidan enzim aracılı etkisini glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutamil sistein sentetaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivasyonunu ve gen ekspresyonunu reseptörleri aracılığı ile artırarak gösterdiği bildirilmiştir (135). Ayrıca melatoninin serbest radikal oluşumunu prooksidan enzimleri inhibe ederek azalttığı ve bu yolla da antioksidan sisteme katkı sağladığı görülmüştür (162).

Melatonin amfifilik özelliği sayesinde kan-beyin bariyerini ve plasentayı rahatlıkla geçerek intraselüler komponentlere kolaylıkla ulaşır ve böylece hücre zarı, organeller ve çekirdeği serbest radikallerin hasarından koruyabilir (143). Bu sayede antioksidan özelliğini organizmada geniş alanda gösterebilmekte ve dejeneratif, proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara (Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus ve romatoid artrit) karşı makromoleküllerin ve DNA'nın oksidatif hasardan korunmasına diğer antioksidanlardan farklı olarak olanak sağlamaktadır. Melatonin diğer antioksidanlardan ayıran ve daha üstün kılan bir diğer özelliği ise yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve uzun süreli kullanımlarında dahi toksik etki göstermemesi ve oksidan maddelerle etkileşimi sırasında oluşan ürünlerin de tamamen antioksidan özellik göstermesidir (16), (135), (143).

2.3.4.3. Melatoninin İmmün Sistem Üzerine Etkisi

Melatoninin immün sistem üzerinde lenfoid dokuların proliferasyonlarının, farklılaşmalarının ve fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi etkileri bulunmaktadır (142). Bu etkiler doğrudan reseptör aracılığıyla ya da steroid hormonları salınımındaki

değişiklik üzerinden gerçekleşmektedir. Doğrudan reseptör aracılığıyla olan etkisinin MT2 reseptörü yoluyla gerçekleştiği görülmüş olup, insan T lenfositlerinde melatonin varlığı tesbit edilmiştir (163). Melatoninin kuvvetli anti-apoptotik özelliği sayesinde T lenfositlerinin apoptozunu azaltıp, granülosit ve B lenfositlerin yaşam süresini uzatmaktadır (164). Monositlerden IL 1-2-6-12, Interferon- γ ve opioid peptidlerin salınımı melatonin uygulamasıyla artar ve böylece CD4 lenfositler aktive edilir (165). Ayrıca melatonin kanserde oldukça önemli etkileri olan doğal öldürücü hücrelerin sayıca artışını sağlar. Pek çok çalışmada melatoninin immünmodülatör etkisi ispatlanmış olmakla birlikte bu etkininin mekanizması ile ilgili veriler hala net değildir (166).

2.3.4.4. Melatoninin Antienflamatuar Etkisi

Melatonin güçlü bir antioksidandır. Bu antioksidan aktivitesi serbest oksijen radikallerinin üretimine ve prooksidan enzimlerin aktivasyonuna sebebiyet veren bir süreç olan inflamasyonun başlaması ve ilerlemesi ile mücadele edebilir (167). Burdan da anlaşılacağı üzere melatoninin antienflamatuar özelliği antioksidan özelliğinden ileri gelmektedir. Melatonin nükleer faktör kabba ile stimüle edilen adezyon moleküllerini inhibe eder. Adezyon moleküllerinin inhibisyonu sonucu lökositlerin endotelden migrasyonu ve adezyonu azalır, böylece polimorf nükleer lökositlerin inflamasyon alanına göçü önlenmiş olur. Ayrıca melatoninin proteolitik enzimler ve IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin oluşumunu engelleyerek doku hasarını önlediği bildirilmiştir (168), (169). Bunun yanında melatoninin inflamatuvar süreçte rol aldığı bilinen siklooksijenaz 1 ve 2 (COX_{1,2})' nin aktif bölgelerine bağlanarak COX₂ enzimini inhibe ettiği belirtilmiştir (170).

2.3.4.5. Melatoninin Analjezik Etkisi

Melatoninin analjezik etkileri deneysel ve klinik çalışma ile ortaya koyulmuştur (171). Fibromyalji ve migren gibi kronik ağrıya neden olan birçok durumda melatoninin ağrıyı azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (172). Melatoninin analjezik etkiyi hangi yolla sağladığı ve bunun altında yatan fizyolojik mekanizmayı açıklamak adına çeşitli hipotezler öne sürülmüş ancak hala tam anlamıyla açıklayan bir görüş bulunamamıştır. Melatonin analjezik etkisinin GABA- β ve opioid reseptörlerinin modülasyonundaki fonksiyonu ile gerçekleştiği düşünülse de günümüzde bu fonksiyon hala belirsizliğini korumaktadır (173).

2.3.4.6. Melatoninin Onkolojik Etkisi

Kanser tedavisinde melatonin kemoterapinin etkinliğini arttırmak, normal hücreler üzerindeki yan etkilerini azaltmak için kullanılmaktadır (174). Yapılan çalışmalarda melatoninin anti-kanser etkisini kanser hücrelerinin gelişiminde ihtiyaç duyulan faktörlerden linoleik asidin hücre içine girmesini önleyerek (175) ve kanser hücre aktivitesinin önemli göstergelerinden biri olan telomeraz enziminin aktivitesini azaltarak gösterdiği bildirilmiştir (176). Melatoninin linoleik asitin hücre içine girişini önlenmesiyle kalmodulin kalsiyumdan uzaklaşır ve hücre siklusu yavaşlayarak tümörün büyümesi engellenir.

Yapılan çalışmalarda başta meme, karaciğer ve rahim kanseri olmak üzere melatoninin çeşitli kanser türleri üzerindeki olumlu etkileri değerlendirilmiştir ve melatoninin özellikle meme kanseri üzerinde oldukça önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (177–179). Melatoninin sentezinin ve serum düzeyinin gece saatlerinde yükseldiği bilinmekle birlikte yapılan bir çalışmada bu saatlerde uyumayan kadınlarda meme kanseri riskinin önemli oranlarda arttığı belirtilmiştir (180).

Çeşitli çalışmalarda melatoninin kontrollü büyüme mekanizmasını yitirmiş kanser hücrelerinin hücre döngüsünde G1' den S fazına geçişi geciktirdiği ve kanser dokusu içerisindeki damarlanmayı azalttığı kanıtlanmıştır (181). Ayrıca, melatonin uygulanan hücrelerde p53 proteininin ekspresyonunun önemli oranda arttığı (182), bazı siklin ve siklin bağlı kinazların sentezinin ise inhibe olduğu belirtilmiştir (183).

2.3.4.7. Melatoninin Anjiyogenez Üzerindeki Etkisi

Anjiyogenez fizyolojik ve patolojik birçok olayda rol alan biyolojik bir süreçtir ve önceden mevcut olan damarlardan yeni damarların gelişmesi anlamına gelmektedir. Bu süreçte öncelikle mezodermal kökenli hücreler endotel hücrelerine farklılaşır ve daha sonra farklılaşan bu endotel hücrelerinden damar oluşumu gerçekleşir. Endotel hücrelerinden salınan VEGF anjiyogenezin ana düzenleyicilerinden biridir ve bilinen en güçlü pro-anjiyogenik faktördür. VEGF endotel hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve differensiasyonunu sağlar. Bu hücrelerin yaşam süresini uzatır ve yara iyileşmesi gibi doku onarımı süreçlerinde önemli bir rol oynar. Endotel hücreleri VEGF sayesinde proliferasyon olarak bu faktöre doğru göç edip dizilirler ve yeni damar oluşumu için öncü olan tüp formasyonunu sağlarlar. VEGF ayrıca endotel hücrelerinin kemik iliğinden dolaşıma geçmesinde önemli bir faktördür ve endotel hücrelerini

apoptozisten koruduğu bilinmektedir. Bu faktörün azaldığı durumlarda vaskülarizasyonun gerilediği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda VEGF' nin makrofajlarda, arteriollerini çevreleyen fibroblastlarda, bronşiyol epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde bulunduğu gösterilmiştir. VEGF' in endotel hücrelerindeki etkilerinin yanı sıra osteoblastlar üzerinde de kemotaktik etkilerinin bulunduğu bilinmektedir. FGF ve TGF- β gibi çeşitli büyüme faktörlerinin VEGF ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (184), (185).

Yapılan çalışmalarda melatoninin çeşitli yollar üzerinden anjiyogenezisin birçok basamağında etkili olduğu gösterilmiştir (19), (186). Melatonin hem endotel hücrelerinin progenitör hücreleri olarak bilinen fibroblast proliferasyonunu uyararak hem de anjiyogeneziste önemli rol oynayan VEGF gibi büyüme faktörlerinin salınımını arttırarak proanjiyogenik aktiviteyi destekler (187), (188). Ayrıca melatonin anjiyogenik süreci hızlandırarak yeni kan damarı oluşumunu arttırır (19), (156). Melatoninin sadece fibroblastların proliferasyonunu uyarmakla kalmaz anjiyogenezde önemli faktörlerden biri olduğu bilinen TGF- β ' yı da arttırır. Acıkan ve ark. rat distraksiyon osteogenezisi modelinde melatoninin yeni kemik oluşumu ve VEGF üzerindeki etkisini değerlendirmişler ve melatoninin hem yeni kemik oluşumunda hem de VEGF artışı üzerinde anlamlı derecede etkili olduğu sonucuna varmışlardır (189). Melatonin tüm etkilerinin yanında MSC' leri apoptozdan korur ve bu hücrelerden proanjiyogenik mitojenik faktörlerin salgılanmasını destekler (190).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDH-2019-1862 proje numarasıyla desteklenmiştir. Çalışma için etik kurul onayı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2019/A-29 protokol numarası ile alındı. Çalışmada etkisi araştırılacak olan ilaçlar, deney hayvanları ve araştırmada kullanılacak sarf malzemeler, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından temin edilen proje desteği ile sağlandı.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada hayvanlar üzerinde yapılan uygulamalar İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi ameliyathanesinde gerçekleştirildi. Bu deneysel çalışma için tamamı dişi ve ağırlıkları 250-350 gram arasında değişen (ortalama ağırlık; 300 gram) 6-7 aylık 44 adet Wistar Albino rat kullanıldı. Uzman bir veteriner tarafından çalışma boyunca tüm deneklerin sağlık durumları kontrol edildi. Denekler her deney kafesinde 5 ila 6 hayvan olacak şekilde, ortalama 24°C sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda tutuldu. Kafeslere deneklerin kolay ulaşabileceği şekilde standart besin ve su koyuldu. Deney süreci boyunca denekler düzenli olarak cilt değişiklikleri, gıda/su alımında azalma, güçsüzlük ve çene nekrozu gibi kriterler açısından değerlendirildi. 44 adet yetişkin dişi ratın başlangıç canlı ağırlıkları ölçüldü ve kuyruk kısımları numaralandırılarak rastgele 4 gruba ayrıldı.

3.2. Çalışma Grupları

Çalışmada her biri rastgele seçilen 11 hayvandan oluşan 4 grup aşağıdaki gibi sınıflandırıldı;

1. Kontrol Grubu (K): Bu gruptaki deneklere deneyin başından itibaren 8 hafta boyunca hiçbir medikal ilaç uygulaması yapılmadı. Deneklerin deneyin 28. günü sol alt 1. molar dişleri çekildi ve denekler deney sonunda (56. gün) sakrifiye edildi (n:11).

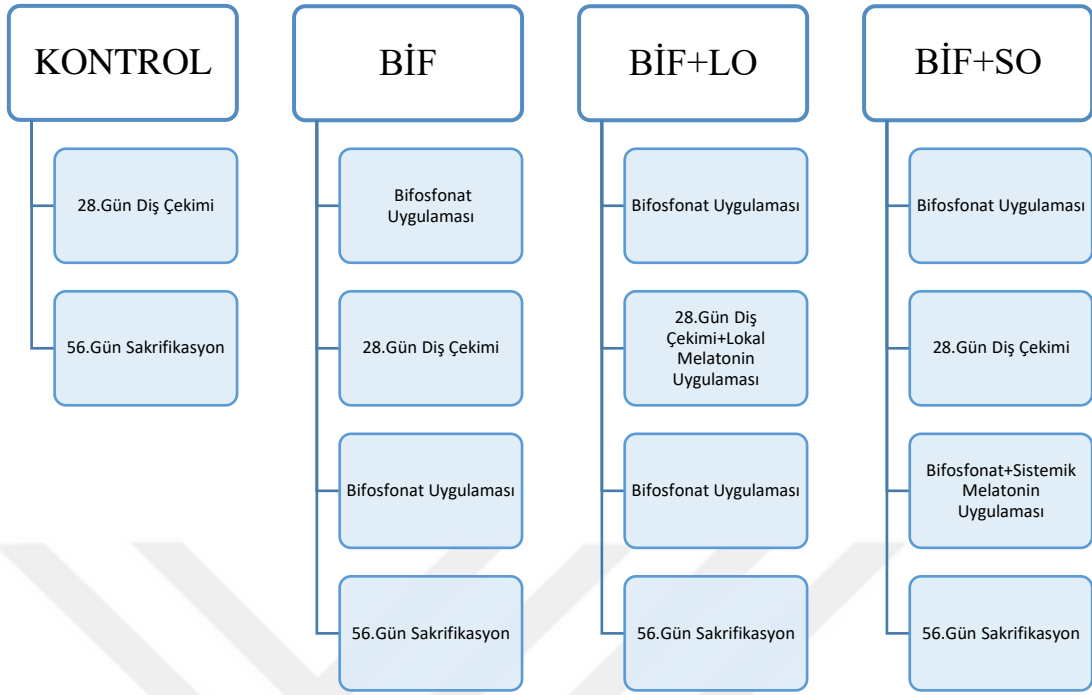
2. Bifosfonat Grubu (BİF): Bu gruptaki deneklere deneyin başından itibaren 8 hafta boyunca sistemik olarak haftada 1 defa zoledronik asit (0.4 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulandı. Deneklerin deneyin 28. günü sol alt 1. molar dişleri çekildi ve denekler deney sonunda (56. gün) sakrifiye edildi (n:11).

3. Bifosfonat ve Lokal Melatonin Uygulanan Grup (BİF+LM): Bu gruptaki deneklere deneyin başından itibaren 8 hafta boyunca sistemik olarak haftada 1 defa zoledronik asit (0.4 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulandı. Deneklerin deneyin 28. günü sol alt 1. molar dişleri çekildi. Çekimden hemen sonra diş socketinin içerisine toz halinde lokal melatonin (1.2 mg) uygulaması yapıldı ve denekler deney süresi sonunda (56. gün) sakrifiye edildi (n.11).

4. Bifosfanat ve Sistemik Melatonin Uygulanan Grup (BİF+SM): Bu gruptaki deneklere deneyin başından itibaren 8 hafta boyunca sistemik olarak haftada 1 defa zoledronik asit (0.4 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulandı. Deneklerin deneyin 28. günü sol alt 1. molar dişleri çekildi. Çekimden sonra ilki hemen post operatif olmak üzere sistemik olarak günlük melatonin (10 mg/kg) 28 gün boyunca intraperitoneal yolla uygulandı. Denekler deney sonunda (56. gün) sakrifiye edildi (n:11).

Tablo 3.1. Gruplara göre medikal ajanların uygulama dozu, süresi ve yolu

Deney Grupları	Uygulanan İlaç	Uygulama Dozu	Uygulama Süresi	Uygulama Yolu
Kontrol Grubu	Yok	Yok	Yok	Yok
Bifosfonat Grubu	Bifosfonat	0.4 mg/kg	56 Gün	İntraperitoneal
Bifosfanat ve Lokal Melatonin Uygulanan Grup	Bifosfonat Melatonin	0.4 mg/kg 1.2 mg	56 Gün Tek Doz	İntraperitoneal Lokal
Bifosfonat ve Sistemik Melatonin Uygulanan Grup	Bifosfonat Melatonin	0.4 mg/kg 10 mg/kg	56 Gün 28 Gün	İntraperitoneal İntraperitoneal



Şekil 3.1. Deney protokolü

3.3. Bifosfonat Dozu ve Uygulanma Yolu

Deney öncesinde ağırlıkları ölçülerek kiloları kaydedilen denekler için uygulanacak ilaç dozları hesaplandı. Çalışmada BRONJ modeli oluşturabilmek için Zoledronik Asit (Zometa 4 mg/5 ml intravenöz, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) kullanıldı. Zoledronik asit sekiz hafta boyunca haftada bir defa olmak üzere intraperitoneal yolla serum fizyolojik ile dilüe edilerek 0.4 mg/kg dozda uygulandı. Her hafta enjeksiyon öncesi, deneklerin vücut ağırlıkları yeniden tartıldı ve uygulanacak dozun standardizasyonu sağlandı.



Şekil 3.2. Zoledronik asit ve intraperitoneal uygulaması

3.4. Diş Çekimi Yöntemi

28. günde asepsi ve antisepsi kurallarına uygun olarak deneklerin hepsine cerrahi işleme başlamadan önce premedikasyon amacı ile intraperitoneal yolla 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (% 2 Alfazyne, Alfasan, Hollanda) enjeksiyonu yapıldı. Anestezi sağlamak için ise intraperitoneal yolla 100 mg/kg ketamin hidroklorür (% 10 Ketamol, Richter Pharma AG, Wels, Avusturya) uygulandı. Denekler derin anestezi sağlandığı kontrol edildikten sonra operasyon sahası açıkta kalacak şekilde steril örtüler ile örtüldü. İşleme başlamadan önce operasyon bölgesine, kanama kontrolünü sağlamak ve işlem sonrası meydana gelebilecek ağrıyı önlemek adına 0.5 cc 0.006 mg/ml epinefrin içeren % 4' lük artikain (Ultracain D-S Forte-Aventis, İstanbul, Türkiye) lokal anestezi ile uygulandı. Operasyonda steril cerrahi set kullanıldı. Öncelikle uygun görüş sağlamak adına Farabeuf ekartörleri ile yanak ve dil ekarte edildi ve çekim yapılacak sol mandibular molar bölge açığa çıkarıldı. Sonrasında ucu eğri hemostat yardımı ile lüksasyon uygulanarak deneklerin sol alt 1. molar dişlerinin çekimi gerçekleştirildi. Çekimden sonra bölgeye kanama kontrolü sağlamak amacıyla steril tampon uygulandı. Son olarak çekim bölgeleri 4.0 vicryl sutur (Doğsan, Türkiye) ile sütüre edildi. Çekim sonrası deneklere herhangi bir ilaç (antibiyotik vs.) uygulanmadı ve deney süresince deneklerin uygun besinler ile beslenmesi sağlandı. Çalışma prosedürleri denekler tarafından genel olarak tolere edilebildi. Ancak anesteziden hemen sonra, biri bifosfonat grubundan diğeri ise bifosfonat ve lokal melatonin uygulanan gruptan olmak üzere 2 adet denek öldüğü için çalışma dışı bırakıldı.



Şekil 3.3. Anestezi sağlamak amacı ile kullanılan ilaçlar



Şekil 3.4. Diş çekimi için kullanılan steril aletler



Şekil 3.5. Deneklerin dişlerinin eğri uçlu hemostat ile çekilmesi

3.5. Melatonin Dozu ve Uygulanması

3.5.1. Lokal Melatonin

Deneyin başından itibaren 8 hafta boyunca haftada 1 defa zoledronik asit uygulanıp 28. gün diş çekimi yapılan deneklerin çekim soketlerinin her birine toz halinde 1.2 mg melatonin uygulandı. Saf haldeki toz melatonin hassas terazide 1.2 mg olacak şekilde tartılıp eppendorf tüplere aktarıldı. Tüplerdeki toz melatonin diş çekiminden sonra kanama kontrolü yapılan çekim soketine kaşık küret yardımıyla yerleştirildi. Uygulanan melatoninin sokette stabilizasyonunun sağlanması adına bölge 4.0 vicryl suture ile sütüre edildi.



Şekil 3.6. Lokal melatonin uygulaması

3.5.2. Sistemik Melatonin

Deneyin başından itibaren 8 hafta boyunca haftada 1 defa zoledronik asit uygulanıp 28. gün diş çekimi yapılan 11 deneğe ilki hemen post operatif olmak üzere sistemik yolla günlük 10 mg/kg doz melatonin 28 gün boyunca uygulandı. Toz halindeki saf melatonin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD, CAS NO: 73-31-4) hassas terazide (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, ABD) tartıldı. Tartılan melatonin vorteks cihazında (Falc Mix-20, Lurano, İtalya) % 0.9 sodyum klorür içeren izotonik solüsyonda çözüldü. Tüpün ağzı hava geçirmemesi için parafin film ile sıkıca kapatıldı. Her denek tek tek tartılarak kullanılması gereken solüsyon miktarı hesaplandı ve 10 mg/kg melatonin deneklere intraperitoneal olarak uygulandı.



Şekil 3.7. Melatonin



Şekil 3.8. Hassas terazi



Şekil 3.9. Vorteks cihazı

3.6. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Çekim Soketi Bölgesinin Çıkarılması

Deneyin 56. gününde denekler yüksek dozda (200 mg/kg) uygulanan sodyum pentotal enjeksiyonu (Pethothal, Abbott, ABD) ile sakrifiye edildi ve sol mandibulaları çıkarıldı. Daha sonra çıkarılan mandibuladaki fazla olan yumuşak dokular trimlendi ve materyaller % 10' luk tamponlanmış formaldehit içerisine yerleştirildi.

3.7. Histolojik Teknikler ve Analizler

3.7.1. Histolojik Doku Takibi

Histolojik değerlendirme için alınan doku örnekleri % 10' luk formaldehit içerisinde 48 saat boyunca tespit edildi. Tespit işlemi sonrasında kemik doku örnekleri RDO-Gold Decalcifier (Apex Engineering Products Corporation, Aurora, IL, USA) solüsyonu içinde, çalkalayıcı tabla üzerinde 8 saat süresince dekalsifikasyon işlemine tabi tutuldu. Tespit işleminin ardından çeşme suyunda yıkanan dokular Sakura Tissue-Tek VIP marka doku takip cihazında, Tablo 3.2' de basamaklar halinde verilen histolojik doku takibi işleminden geçirildi. Doku takibi işleminden sonra dokular parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica RM 2145 marka mikrotomu ile 4 µm kalınlığında kesitler alınarak pozitif şarjlı lamlar üzerine yerleştirildi.

Tablo 3.2. Histolojik doku takibi işlem basamakları

Histolojik doku takibi işlem basamakları	
% 70 alkol	60 dk
% 80 alkol	60 dk
% 96 alkol	60 dk
% 96 alkol	60 dk
Absolü alkol	60 dk
Ksilen	60 dk x3
Parafin	40 dk x4

3.7.2. Histolojik Boyama

Kesitler histopatolojik yapının değerlendirilmesi için hematoksilin-eozin (H-E) boyama metodu ile boyandı. Ayrıca kesitlere, osteokalsin ve VEGF proteinlerinin immünreaktivitelerinin değerlendirilmesi için ise immünohistokimya boyama metodu uygulandı. H-E boyama metodu Tablo 3.3' te; immünohistokimyasal boyama metodu Tablo 3.4' te basamaklar halinde verildi.

Tablo 3.3. Mayer's H-E boyama metodu basamakları

Mayer's H-E boyama metodu basamakları	
64 °C sıcaklıkta	1 saat
Ksilen	5 dk x3
% 96 Alkol	3 dk x4
Çeşme suyu	1 dk
Mayer's hemotoksilen	15 dk
Çeşme suyu	15 dk
Eozin	5 dk
% 96 Alkol	3 dk x4
Ksilen	5 dk x3
Kapama	

Tablo 3.4. İmmünohistokimyasal boyama metodu basamakları

İmmünohistokimyasal boyama metodu basamakları	
64 °C sıcaklıkta	1 saat
Ksilen	5 dk x3
% 96 Alkol	3 dk x4
Distile su	1 dk
Antijen geri kazanımı	15 dk (tripsin enzimi)
Distile su	1 dk
PBS	1 dk
Hidrojen peroksit	10-12 dk
PBS	1 dk x3
Protein blok	5 dk
Primer antikor	60 dk
PBS	1 dk x3
Sekonder antikor	10 dk
PBS	1 dk x3
Streptavadin peroksidaz	10 dk
PBS	1 dk x3
AEC kromojen	10 dk (maksimum)
PBS	1 dk x3
Distile su	1 dk
Mayer's hematoksilen	1 dk
Çeşme suyu	1 dk
Kapama	

3.7.3. Histolojik Analizler

H-E ile boyanmış olan kesitlerdeki diş soketi alanları, osteonekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve epitelizasyon varlığı yönünden incelendi.

Osteonekroz, 8' den fazla sayıda boş laküna (osteositsiz) varlığı ile belirlendi. Osteonekroz seviyesi, 0 ila 3 arası bir ölçek kullanılarak (0 en düşük 3 en yüksek seviyeyi temsil edecek şekilde), nekrotik alanın boş laküna sayısındaki artış ile

değerlendirildi. Osteonekroz değerlendirmesi, 20' lik büyütmede, rastgele seçilen 10 alanda gerçekleştirildi (191).

İnflamatuar hücre infiltrasyonu için 20' lik büyütmede, rastgele seçilen 10 alan, infiltrasyonun yaygınlığına göre;

0; normal,

1; % 25' ten az değişiklik,

2; % 25-50 arasındaki değişiklik,

3; % 50' den fazla değişiklik olacak şekilde semikantitatif olarak skorlandı (192).

Epitelizasyon için yapılan değerlendirmede, 4' lük büyütmede, tüm soket yüzeyi incelenerek 0-3 arasında bir ölçek kullanıldı. Buna göre;

0; ekstraksiyon bölgesini tamamen kaplayan orta kalınlıkta epitel dokusu,

1; ekstraksiyon bölgesini tamamen kaplayan ince kalınlıkta epitel dokusu,

2; sadece açık cerrahi bölgenin kenarlarında ince kalınlıkta epitel dokusu,

3; açık cerrahi bölge üzerinde epitel dokusunun yokluğu olacak şekilde skorlama yapıldı (192).

İmmünohistokimyasal analizler (VEGF ve osteokalsin değerlendirmeleri), her bir kesitten 20' lik büyütmede rastgele seçilen 20 alanda gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal boyanma, immünreaktivitenin yaygınlığı ve şiddeti esas alınarak semikantitatif olarak skorlandı. Toplam boyanma skoru; yaygınlık x şiddet hesaplanarak elde edildi (193).

immünreaktivitenin yaygınlığı; 0; 0- % 25,

şiddeti; 0; yok,

1; % 26-50,

+1; hafif,

2; % 51-75,

+2; orta,

3; % 76-100.

+3; şiddetli.

Tüm analizler ve görüntü alma işlemleri, Leica DFC-280 araştırma mikroskobu ile Leica Q Win Image Analiz Sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd.,Cambridge, UK) kullanılarak yapıldı.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı tarafından geliştirilen istatistiksel yazılım programı (WSSPAS: Web-Based Sample Size & Power Analysis Software) ile yapıldı (194). Çalışmada yer alan tüm gruplardaki ölçülebilir değişkenlerin normallik testlerine göre normal dağılım

göstermediği saptandı ($p>0.05$). Bu nedenle, istatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi, tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar, Mann-Whitney-U testi ile yapıldı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler, dağılıma bağlı olarak medyan minimum-maksimum (med (min-max)) olarak ifade edildi.

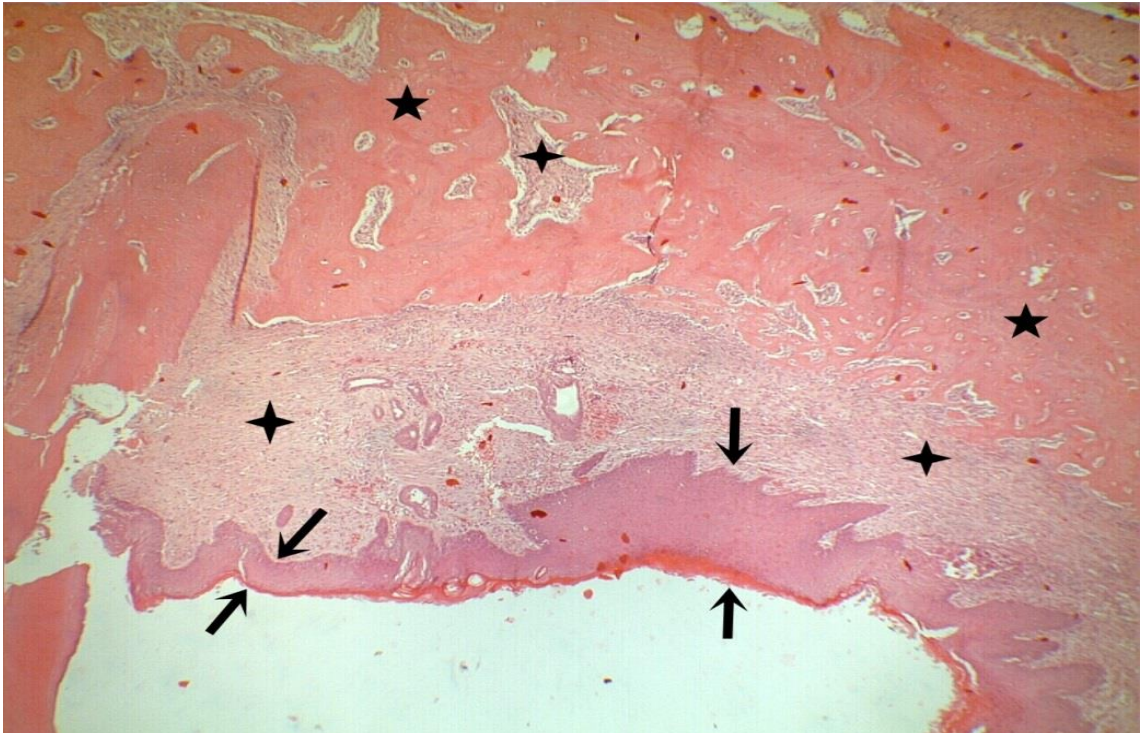


4. BULGULAR

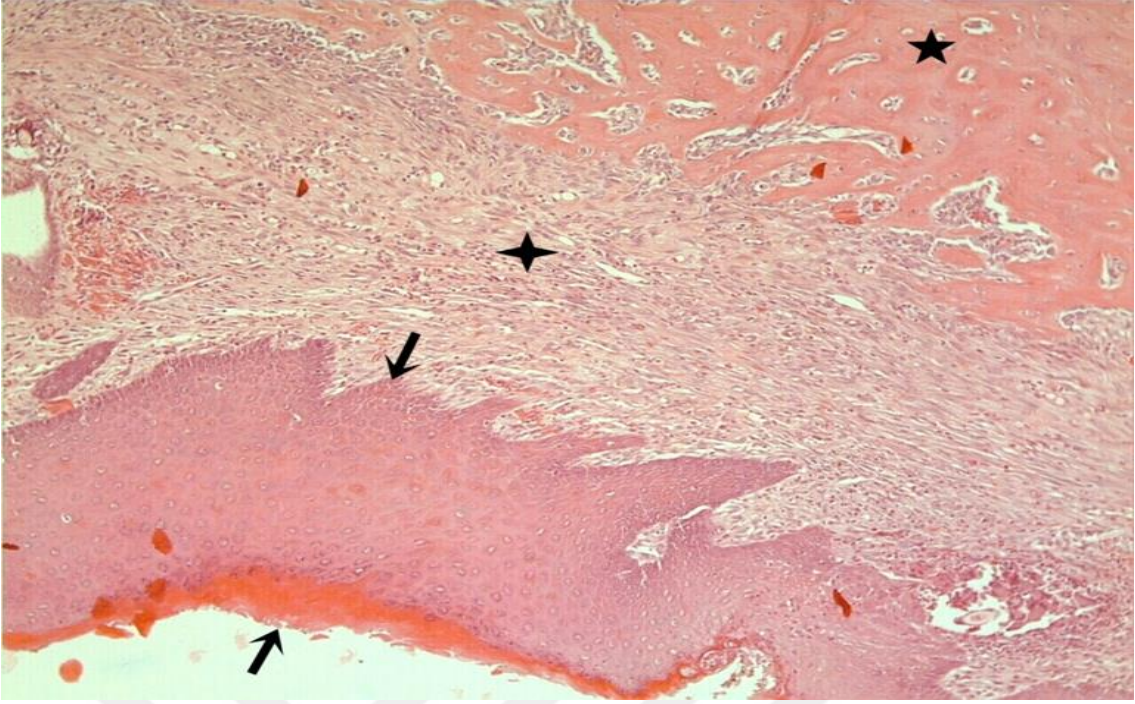
4.1. Histolojik Bulguların Değerlendirilmesi

4.1.1. Genel Histolojik Yapının Değerlendirilmesi

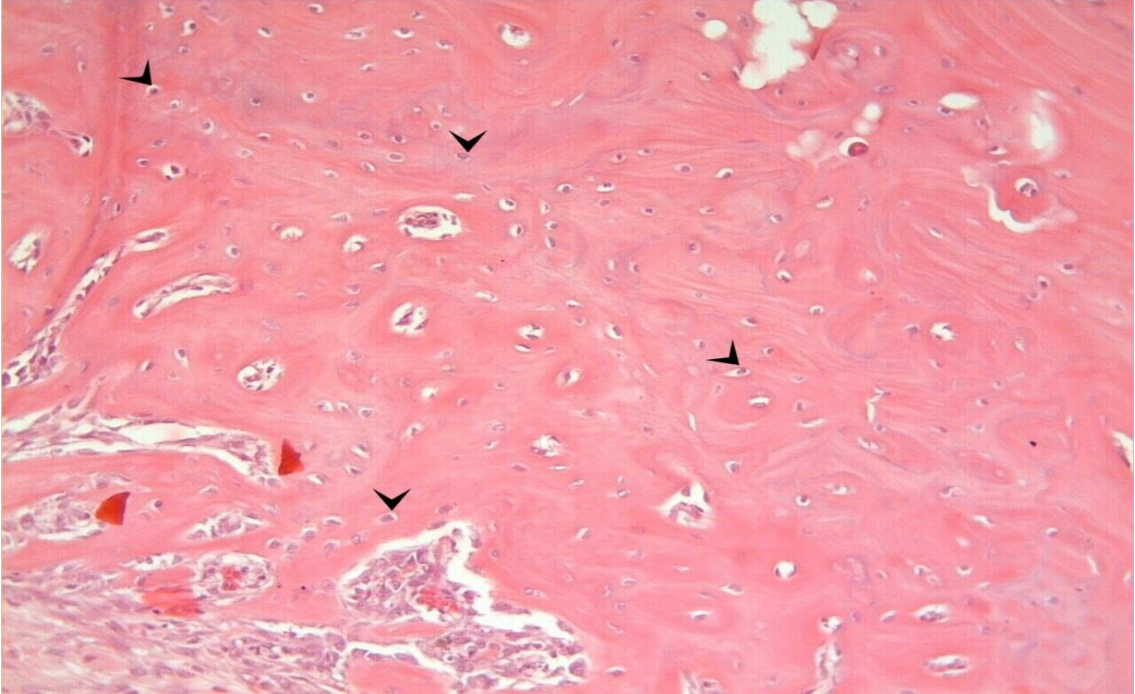
Hematoksilen- eozin boyanan kesitlerde kontrol grubunda, soket alanının apikal ve orta bölgelerinde genel olarak normal histolojik yapı sergileyen kemik trabeküllerinin varlığı dikkat çekerken, servikal bölgede granülasyon dokusunun geniş alan kapladığı görüldü. Kemik trabekülleri arasında da küçük granülasyon doku alanları mevcuttu. Soket içindeki granülasyon dokusunda izlenen inflamatuvar hücre infiltrasyonunun hafif düzeyde olduğu dikkat çekti. Bu grupta, genellikle büyük, bazofilik nükleuslu osteositlere sahip kemik trabeküllerinde, yer yer osteosit içermeyen lakünalar izlendi. Epitel dokusunun yapısı ile ilgili olarak, kontrol grubuna ait çoğu örnekte genellikle orta kalınlıkta bir epitelin tüm ekstraksiyon yüzeyini örttüğü gözlemlendi (Şekil 4.1, 4.2, 4.3).



Şekil 4.1. Kontrol Grubu: Ekstraksiyon soketinin genel görünümü. Kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), granülasyon dokusu (dört köşeli yıldızlar), ekstraksiyon yüzeyini tamamen örten epitel dokusu (oklar). H-E; 4x.



Şekil 4.2. Kontrol Grubu: Keratinize çok katlı yassı epitel dokusu (oklar), granülasyon dokusu (dört köşeli yıldız), kemik dokusu (beş köşeli yıldız). H-E; 10x.

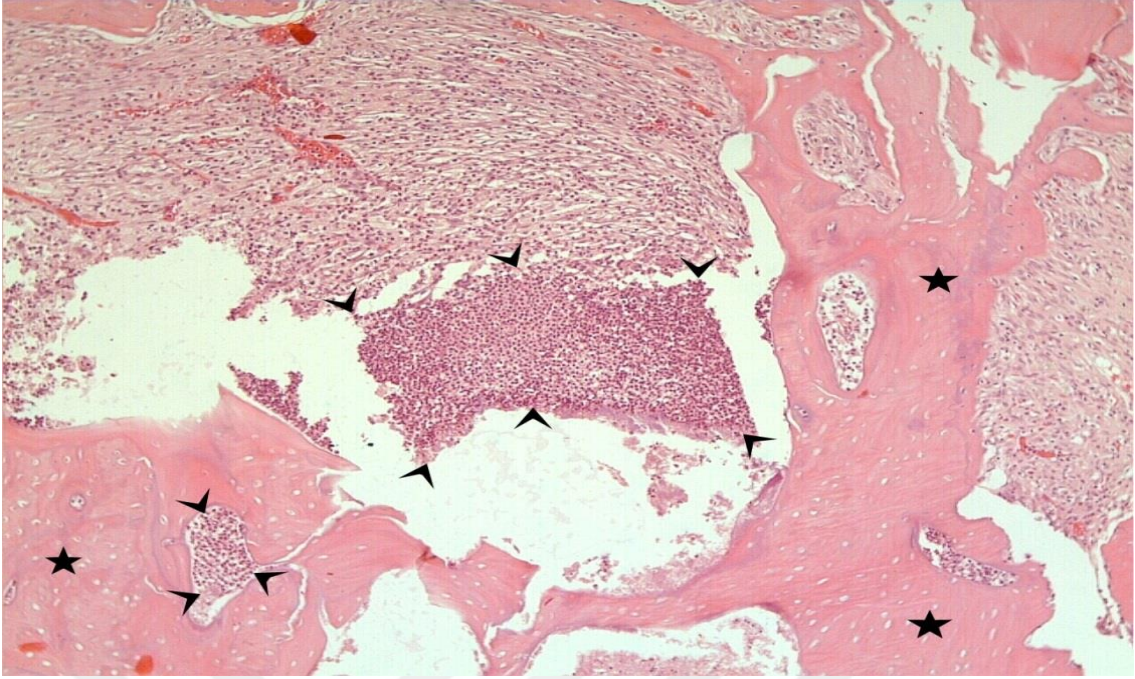


Şekil 4.3. Kontrol Grubu: Lakünelarda yerleşik, bazofilik boyanmış nükleuslu osteositler (ok başları), normal histolojik görünüme sahip kemik dokusu. H-E; 20x.

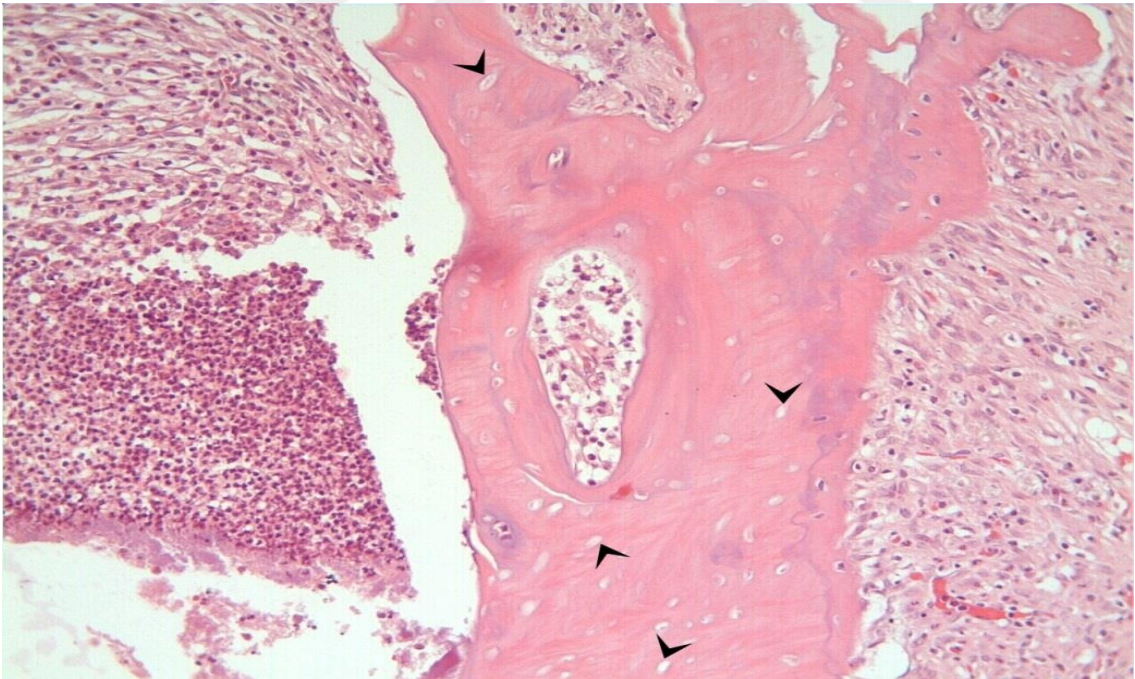
Hematoksilen-eozin boyanan kesitlerde bifosfonat grubunda, soket alanındaki iyileşmenin belirgin şekilde yavaş olduğu gözlemlendi. Bu gruptaki en belirgin bulgu, birçok örnekte, soketin tüm seviyelerindeki nekrotik kemik trabeküllerinin (osteonekroz alanları) varlığıydı. Bifosfonat grubunda gözlenen bir diğer dikkat çekici bulgu ise, kemik trabekülleri arasında bulunan inflamatuvar hücre infiltrasyonunun çok yaygın olduğu geniş granülasyon dokusuydu. Ayrıca, bu gruba ait kesitlerde, genel olarak ekstraksiyon alanlarının yüzeyinde epitelizasyonun gerçekleşmediği izlendi (Şekil 4.4, 4.5, 4.6).



Şekil 4.4. BİF Grubu: Ekstraksiyon soketinin genel görünümü. Nekrotik kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), inflamatuvar hücre infiltrasyonunun bulunduğu granülasyon dokusu (dört köşeli yıldızlar), epitelizasyonun gerçekleşmediği ekstraksiyon yüzeyi (oklar). H-E; 4x.



Şekil 4.5. BİF Grubu: İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başları), nekrotik kemik dokusu (beş köşeli yıldızlar). H-E; 10x.

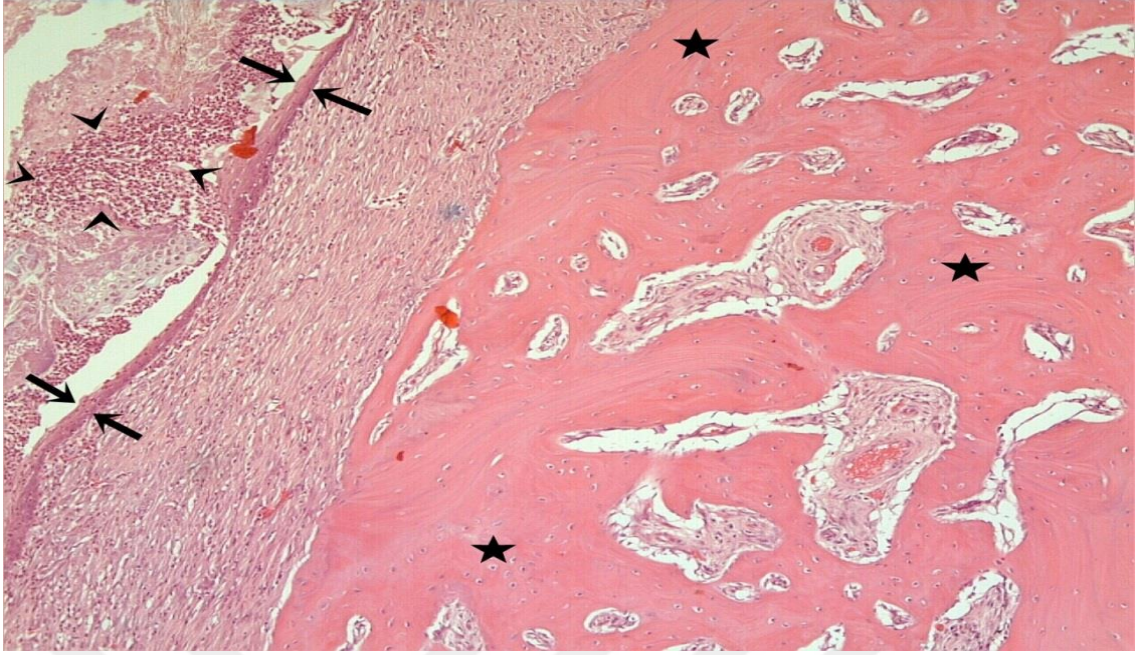


Şekil 4.6. BİF Grubu: Nekrotik kemik dokusu, osteosit içermeyen boş lakünalar (oklar başları). H-E; 20x.

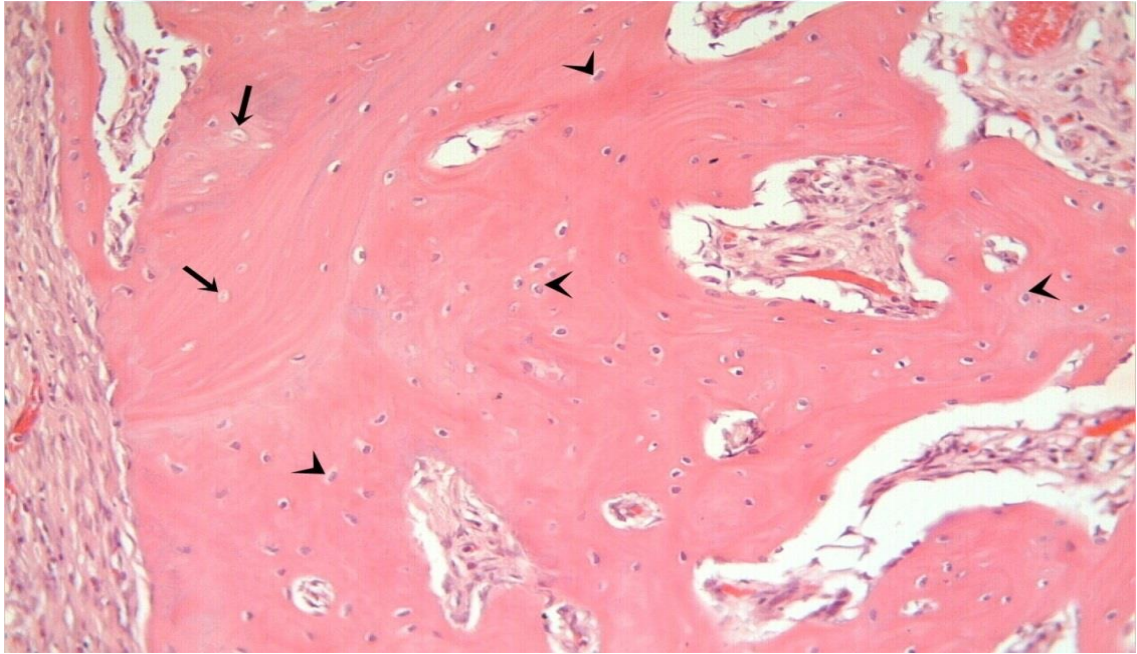
Hematoksilen-eozin boyanan kesitlerde bifosfonat ile birlikte lokal (Şekil 4.7, 4.8, 4.9) ve sistemik (Şekil 4.10, 4.11, 4.12) melatonin uygulanan gruplarda, soket alanlarında belirgin olarak iyileşme gözlemlendi. Bu iki grupta, bifosfonat grubuna göre, kemik trabeküllerinde daha az yoğunlukta boş lakünalar izlendi. Soketin apikal ve orta seviyelerinde bulunan kemik trabekülleri, sahip olduğu çok sayıda bazofilik, büyük nükleuslu osteositlerin varlığı ile normal histolojik yapıya benzer görünüm gösterdi. Servikal bölgede ise kemik trabekülleri arasında granülasyon dokularının mevcut olduğu görüldü. Ayrıca bu gruplarda, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun da belirgin şekilde azaldığı gözlemlendi. Epitel gelişimi ile ilgili olarak, sistemik melatonin grubunun genelinde bifosfonat grubuna benzer olarak ekstraksiyon alanlarının yüzeyinde epitelizasyonun gerçekleşmediği izlenirken, lokal melatonin grubuna ait bazı örneklerde farklı düzeylerde epitelizasyon varlığı gözlemlendi.



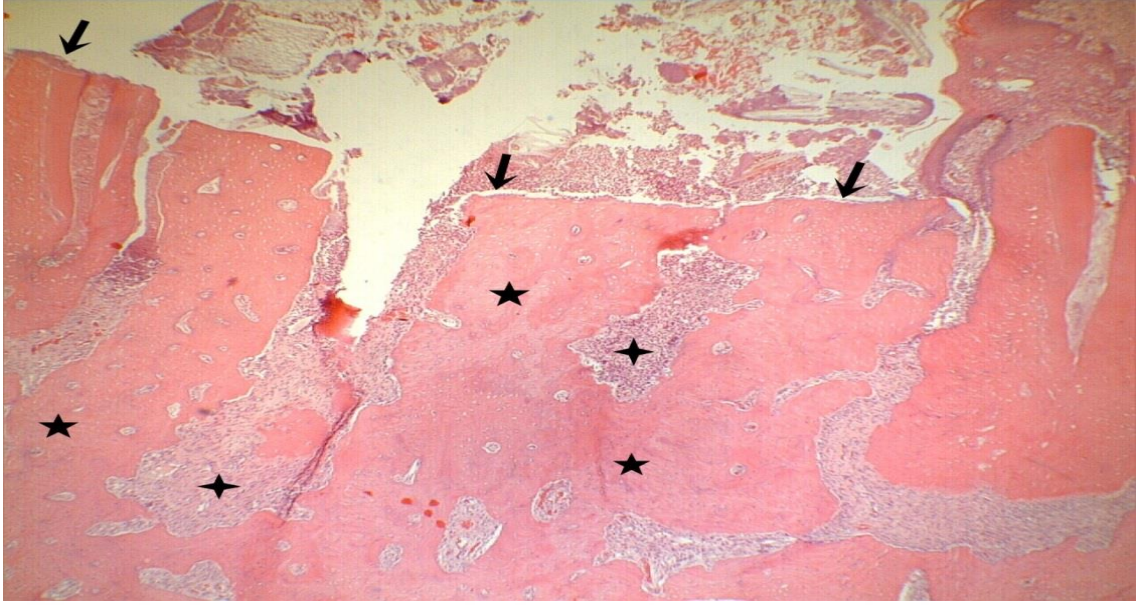
Şekil 4.7. BİF+LM Grubu: Ekstraksiyon soketinin genel görünümü. Kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), granülasyon dokusu (dört köşeli yıldızlar), ekstraksiyon yüzeyini örten ince kalınlıktaki epitel dokusu (oklar). H-E; 4x.



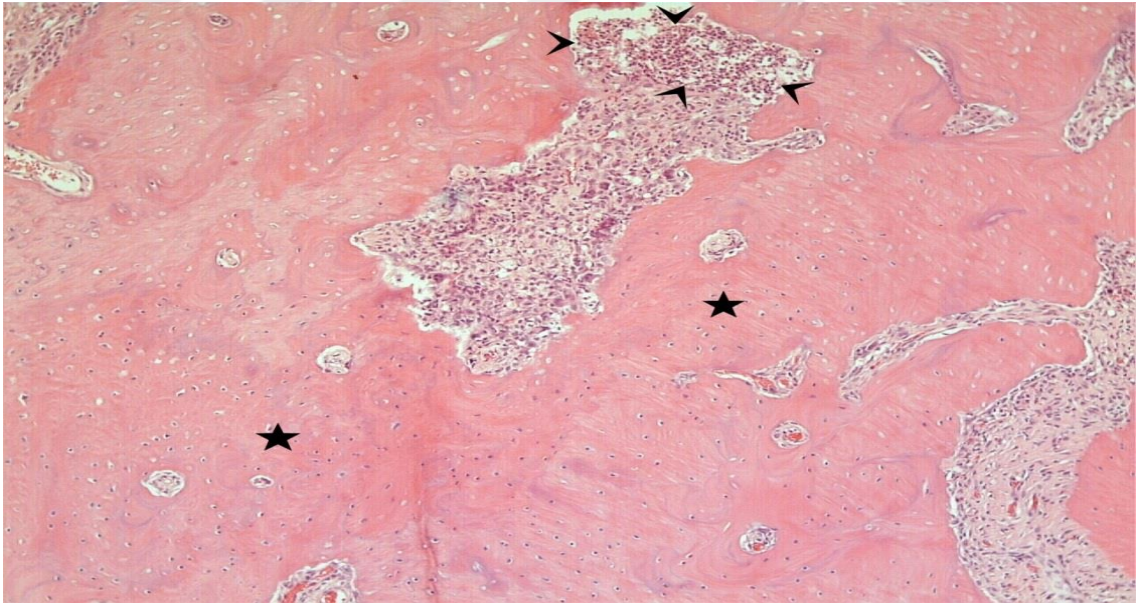
Şekil 4.8. BİF+LM Grubu: İnflamatuar hücre infiltrasyonu (ok başları), kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), ekstraksiyon yüzeyini örten ince kalınlıkta epitel dokusu (oklar). H-E; 10x.



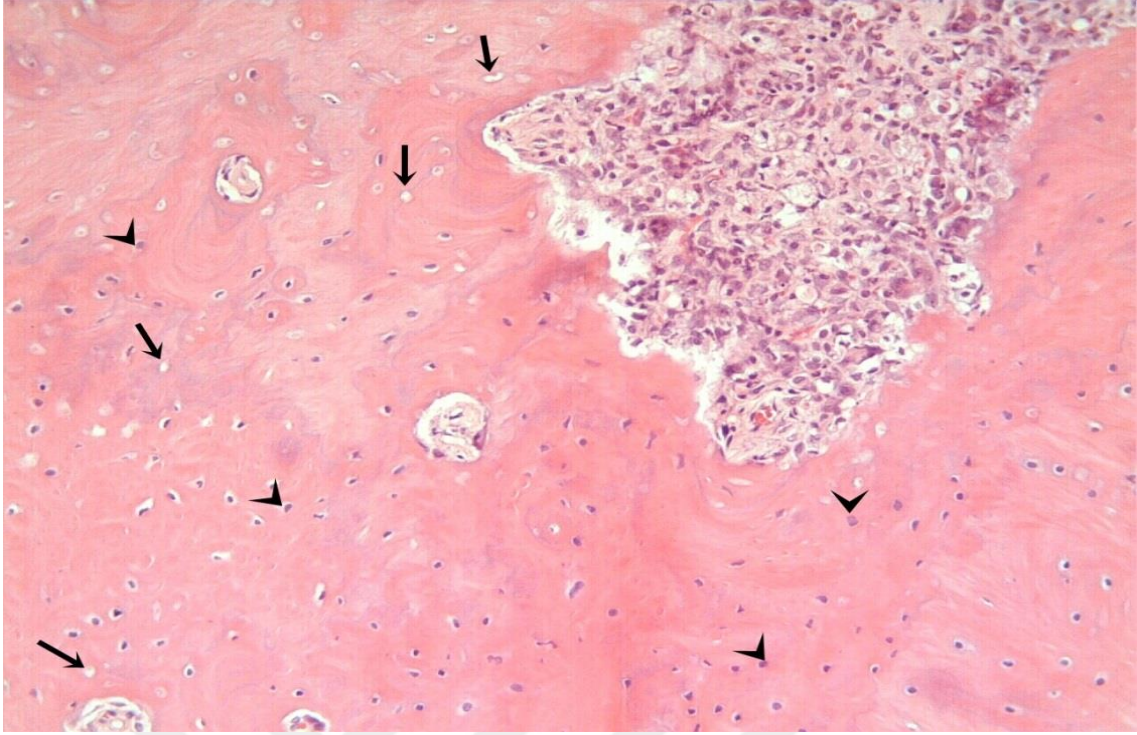
Şekil 4.9. BİF+LM Grubu: Osteosit içermeyen boş lakünalar (oklar), bazofilik boyanmış nükleuslu osteositler (ok başları). H-E; 20x.



Şekil 4.10. BİF+SM Grubu: Ekstraksiyon socketinin genel görünümü. Kemik trabekülleri (beş köşeli yıldızlar), inflamatuvar hücre infiltrasyonunun olduğu granülasyon dokusu (dört köşeli yıldızlar), epitelizeşyonun gerçekleşmediği ekstraksiyon yüzeyi (oklar). H-E; 4x



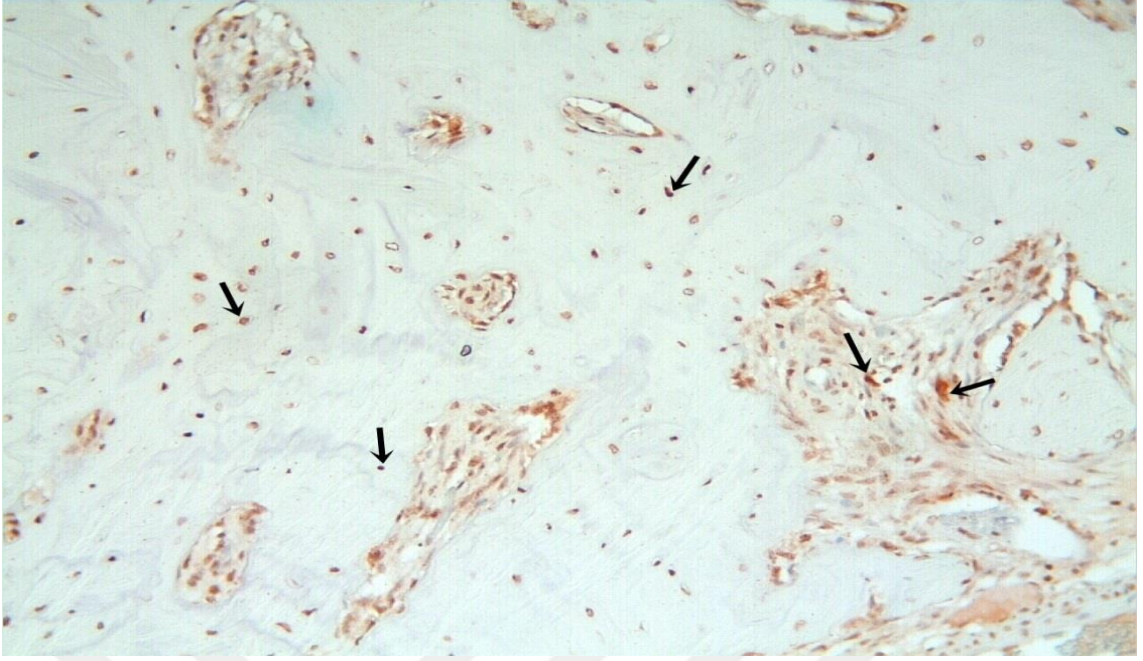
Şekil 4.11. BİF+SM Grubu: İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok başları), sağlıklı kemik dokusu (beş köşeli yıldızlar). H-E; 10x.



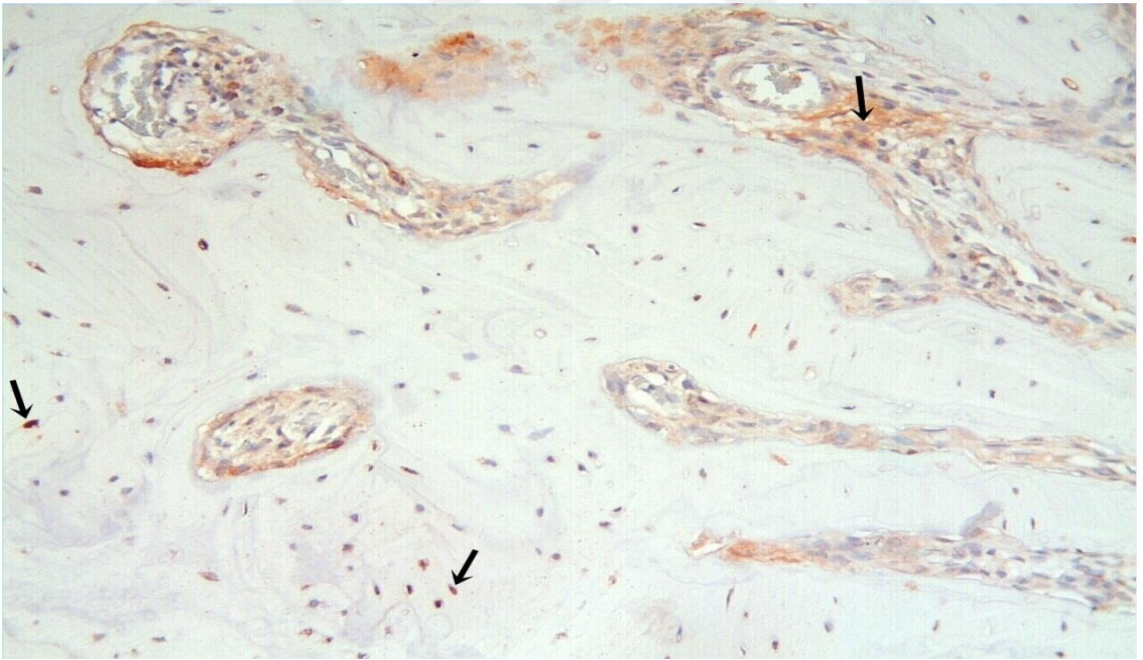
Şekil 4.12. BİF+SM Grubu: Osteosit içermeyen lakünalar (oklar), bazofilik boyanmış nükleuslu osteositler (ok başları). H-E; 20x.

4.1.2. VEGF İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi

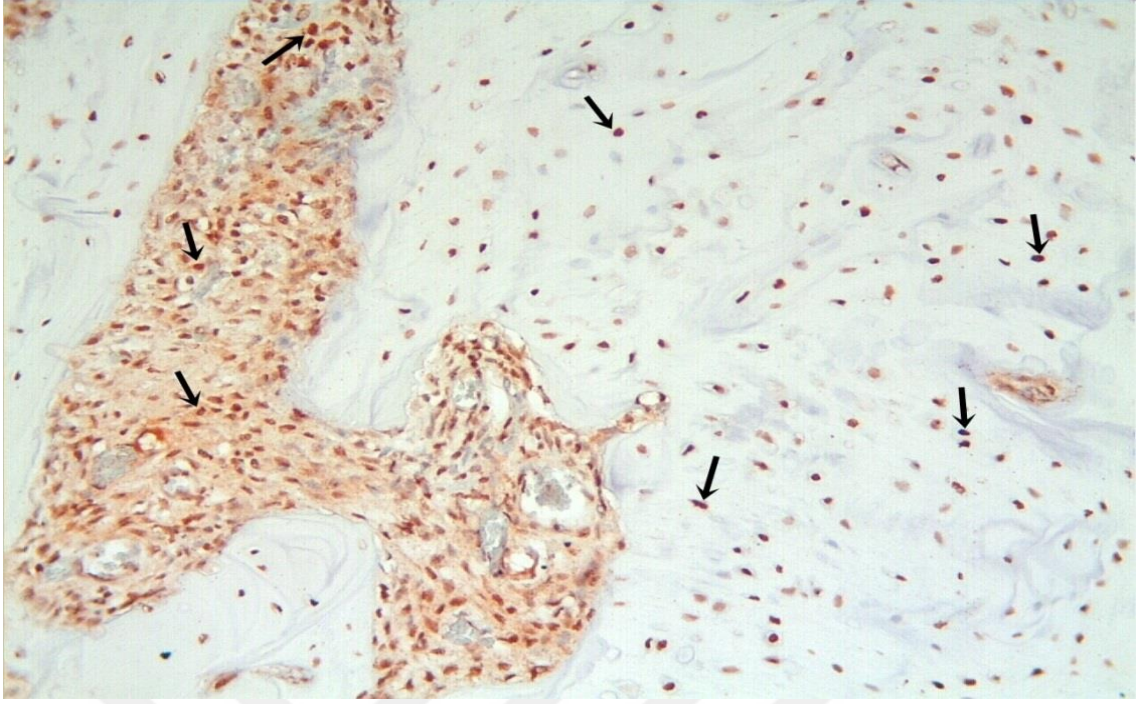
VEGF immünreaktivitesi, osteosit ve granülasyon dokusunda kahverengimsi boyanma şeklinde izlendi (Şekil 4.13). Bifosfonat grubunda (Şekil 4.14), VEGF immünreaktivitesi genel olarak düşük yaygınlık ve şiddet gösterdi. Diğer yandan, lokal (Şekil 4.15) ve sistemik melatonin (Şekil 4.16) uygulamalarının, VEGF immünreaktivitesini artırdığı gözlemlendi. Lokal ve sistemik melatonin gruplarında ise VEGF immünreaktivitesinin benzer olduğu saptandı.



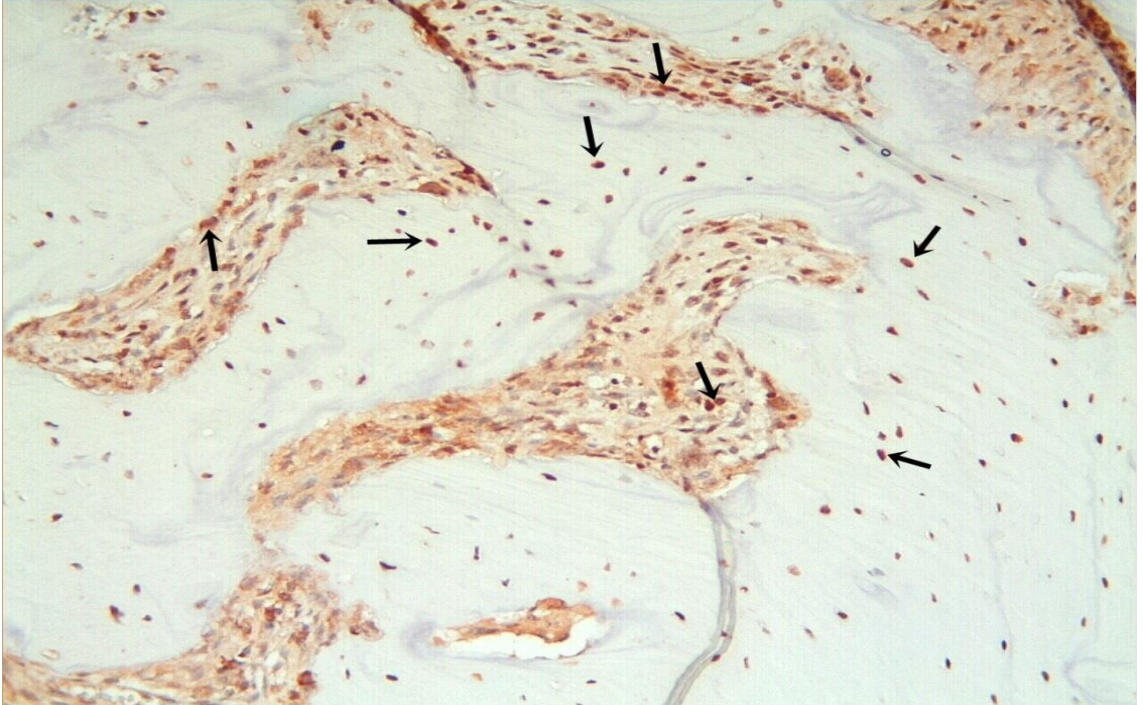
Şekil 4.13. Kontrol Grubu: Osteositlerde ve granülasyon dokusunda kavrengimsi olarak izlenen VEGF immünreaktivitesi (oklar). VEGF immün boyama; 20x.



Şekil 4.14. BİF Grubu: VEGF immünreaktivitesi (oklar). VEGF immün boyama; 20x.



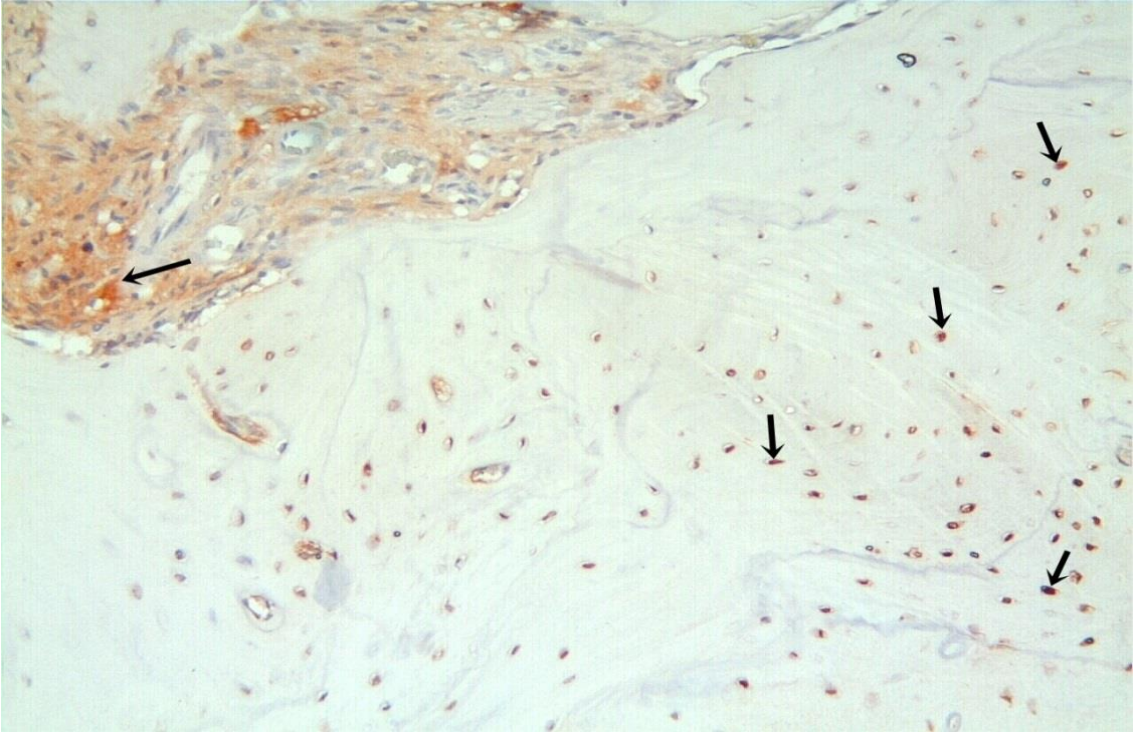
Şekil 4.15. BİF+LM Grubu: VEGF immünreaktivitesi (oklar). VEGF immün boyama;
20x.



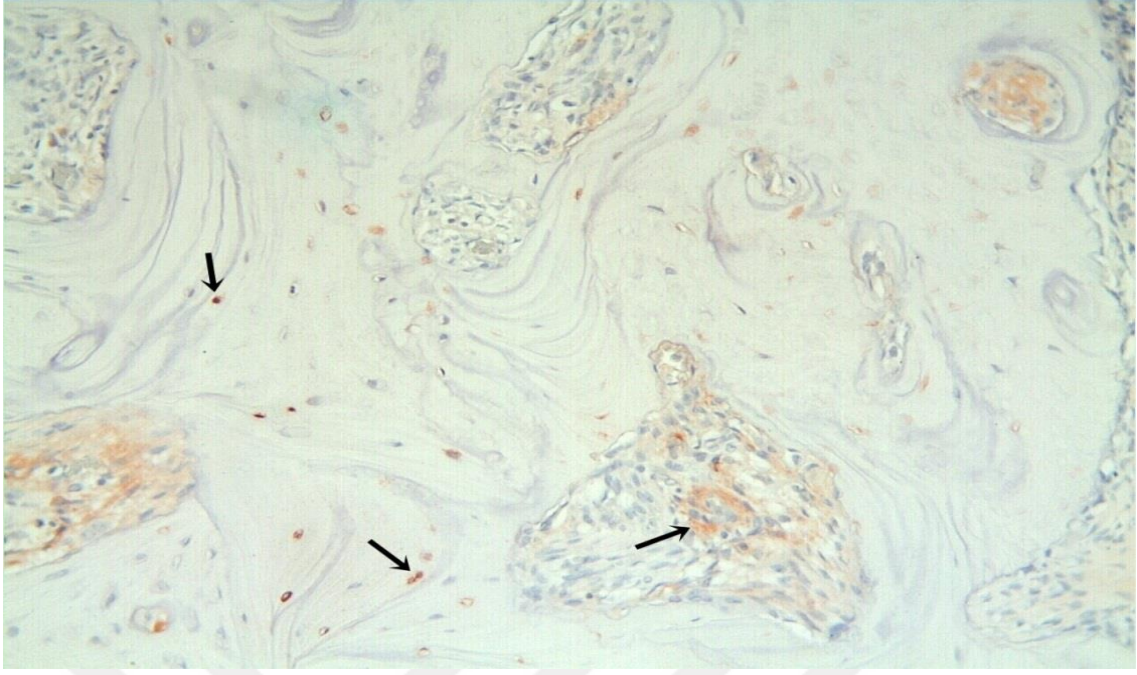
Şekil 4.16. BİF+SM Grubu: VEGF immünreaktivitesi (oklar). VEGF immün boyama;
20x.

4.1.3. Osteokalsin İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi

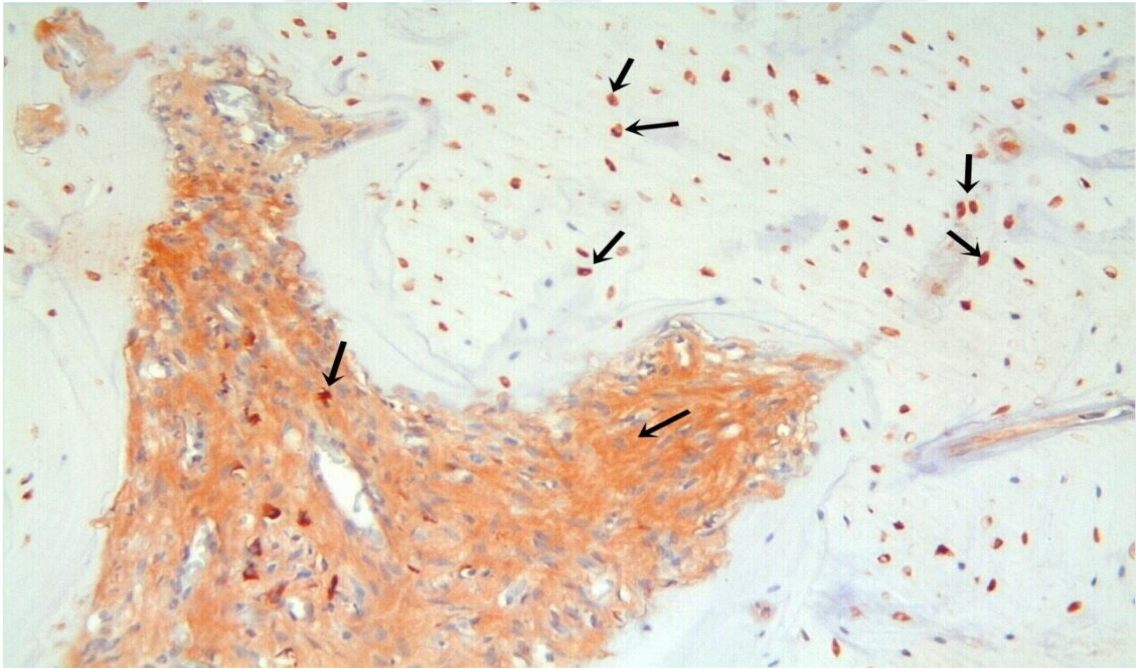
Osteokalsin immünreaktivitesi, osteosit ve granülasyon dokusunda kahverengimsi boyanma şeklinde izlendi (Şekil 4.17). Bifosfonat grubunda (Şekil 4.18), osteokalsin immünreaktivitesi, genel olarak düşük yaygınlık ve şiddet gösterdi. Diğer yandan, lokal ve sistemik melatonin uygulamalarının, osteokalsin immünreaktivitesini artırdığı gözlemlendi. Lokal melatonin grubundaki (Şekil 4.19) osteokalsin immünreaktivitesinin, sistemik melatonin grubundan (Şekil 4.20) yüksek olduğu izlendi.



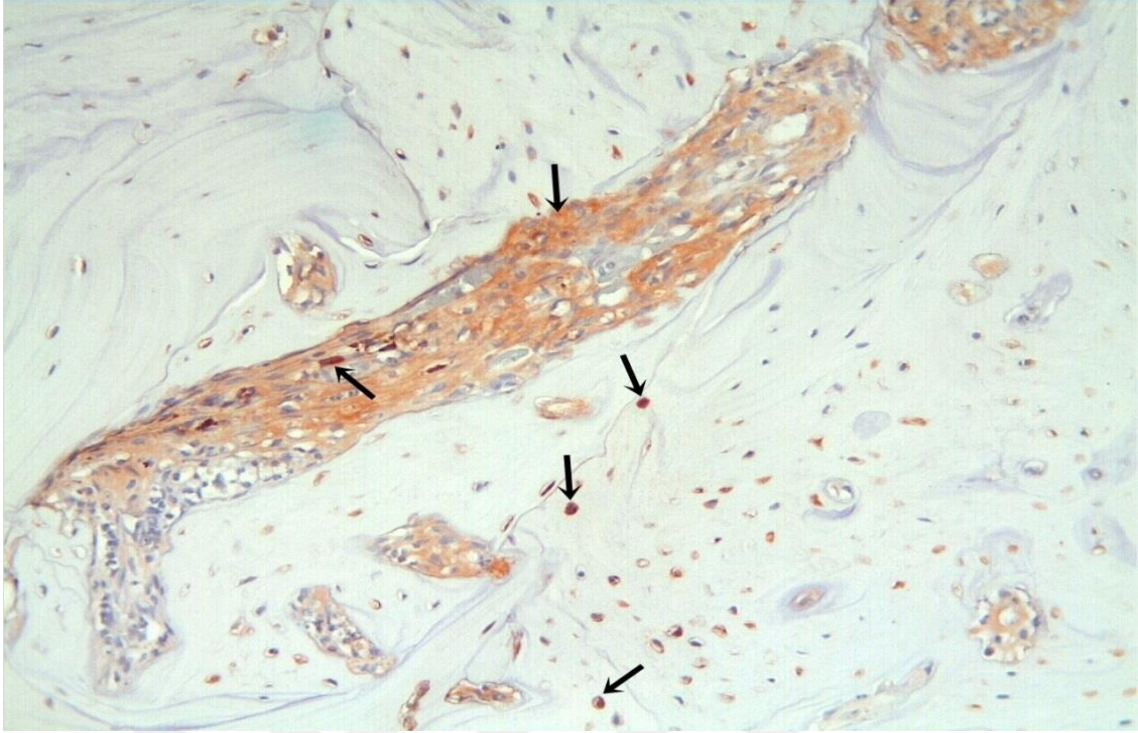
Şekil 4.17. Kontrol Grubu: Osteositlerde ve granülasyon dokusunda kahverengimsi olarak izlenen osteokalsin immünreaktivitesi (oklar). Osteokalsin immün boyama; 20x.



Şekil 4.18. BİF Grubu: Osteokalsin immünreaktivitesi (oklar). Osteokalsin immün boyama; 20x.



Şekil 4.19. BİF+LM Grubu: Osteokalsin immünreaktivitesi (oklar). Osteokalsin immün boyama; 20x.



Şekil 4.20. BİF+SM Grubu: Osteokalsin immünreaktivitesi (oklar). Osteokalsin immün boyama; 20x.

4.2. Histolojik Bulguların İstatistiksel Değerlendirmesi

Her grup kendi içinde ve diğer tüm gruplarla, osteonekroz, infiltrasyon ve epitelizasyon varlığı açısından değerlendirildiğinde, Tablo 4.1’ de belirtilen sonuçlar elde edildi.

Tablo 4.1. Her bir grubun osteonekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve epitelizasyon skor sonuçları, med(min-max)

Gruplar	Osteonekroz	İnfiltrasyon	Epitelizasyon
K	0.0 (0.0-1.0)	1.0 (0.0-3.0)	1.0 (0.0-2.0)
BİF	3.0 (0.0-3.0)	2.0 (0.0-3.0)	3.0 (2.0-3.0)
BİF+LM	1.0 (0.0-3.0)	1.0 (0.0-3.0)	2.0 (0.0-3.0)
BİF+SM	1.0 (0.0-3.0)	1.0 (0.0-3.0)	3.0 (2.0- 3.0)

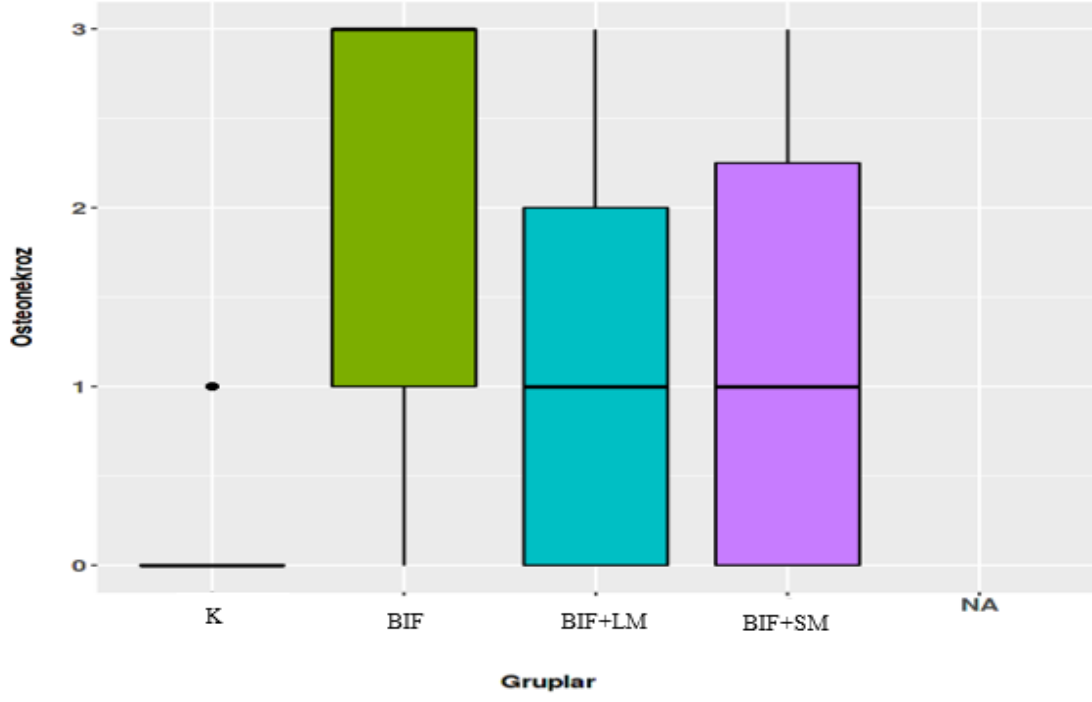
Tablo 4.2. Gruplar arası histopatolojik değerlendirmelerin ikili karşılaştırmalara

Gruplar	Osteonekroz(p)	İnfiltrasyon(p)	Epitelizasyon(p)
K-BİF	<0.001*	<0.001*	<0.001*
BİF-BİF+LM	<0.001*	0.001*	0.001*
BİF-BİF+SM	<0.001*	0.006*	1.000
BİF+LM-BİF+SM	1.000	1.000	0.006*
K-BİF+LM	<0.001*	1.000	0.168
K-BİF+SM	<0.001*	0.344	<0.001*

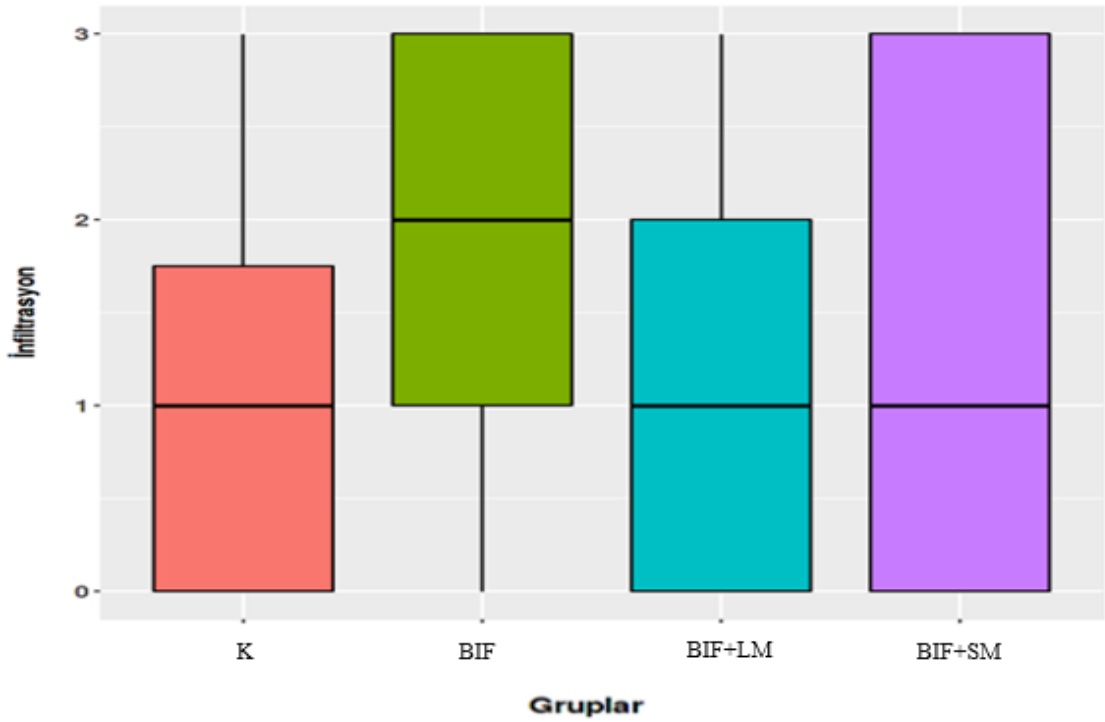
Osteonekroz değerleri bakımından gruplar arasında ikili karşılaştırmalara bakıldığında K-BİF, BİF-BİF+LM, BİF-BİF+SM, K-BİF+LM ve K-BİF+SM grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$). BİF, BİF+LM ve BİF+SM gruplarında osteonekroz değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gösterdi. BİF+LM ve BİF+SM gruplarındaki değerlerin ise BİF grubuna göre anlamlı derecede azalış gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.2).

İnflamatuvar hücre infiltrasyonu değerleri bakımından gruplar arasında ikili karşılaştırmalara bakıldığında K-BİF, BİF-BİF+LM ve BİF-BİF+SM grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ($p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.006$). BİF grubunda inflamasyon değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gösterdi. BİF+LM ve BİF+SM gruplarındaki değerlerin ise BİF grubuna göre anlamlı derecede azalış gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.2).

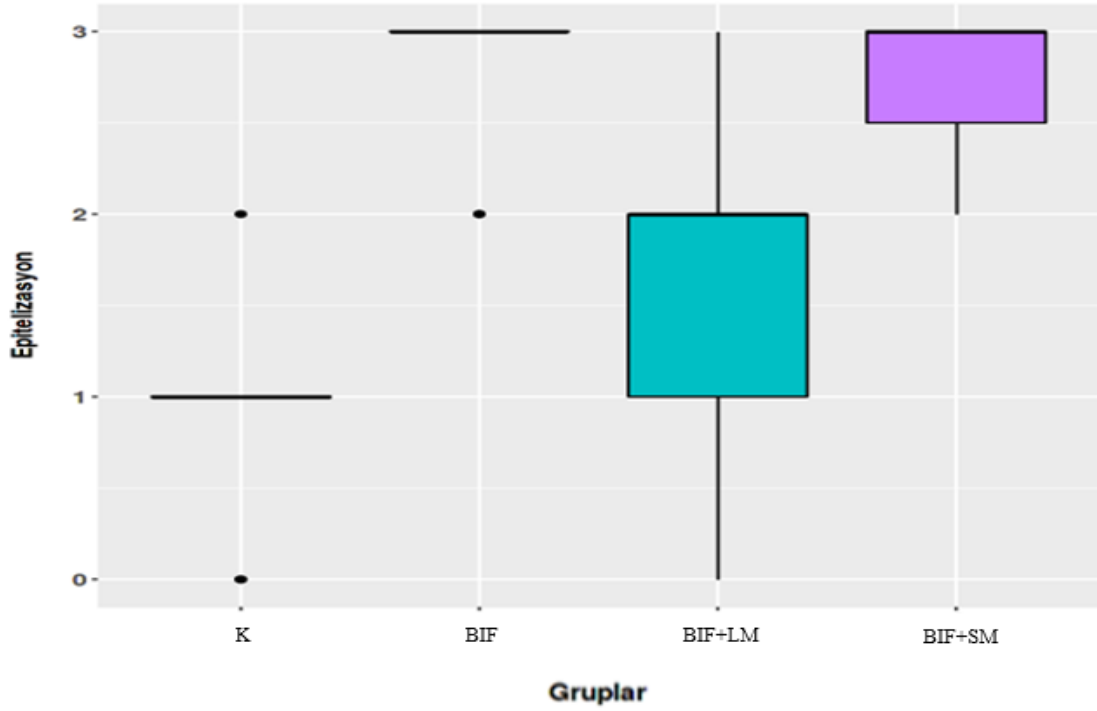
Epitelizasyon değerleri bakımından gruplar arasında ikili karşılaştırmalara bakıldığında K-BİF, BİF-BİF+LM, BİF+LM-BİF+SM ve K-BİF+SM grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ($p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.006$, $p<0.001$). BİF grubundaki epitelizasyon kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalış gösterdi. BİF+LM grubundaki epitelizasyonun ise BİF ve BİF+SM gruplarına göre anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edildi. Ayrıca BİF+SM grubundaki epitelizasyonun K grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü (Tablo 4.2).



Şekil 4.21. Gruplar arasında osteonekroz değerlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 4.22. Gruplar arasında inflamasyon değerlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 4.23. Gruplar arasında epitelizasyon değerlerinin grafiksel gösterimi

Her grup kendi içinde ve diğer tüm gruplarla, VEGF ve osteokalsin düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, Tablo 4.3' te belirtilen sonuçlar elde edildi.

Tablo 4.3. Her bir grubun VEGF ve osteokalsin immünreaktivite skor sonuçları, med (min-max)

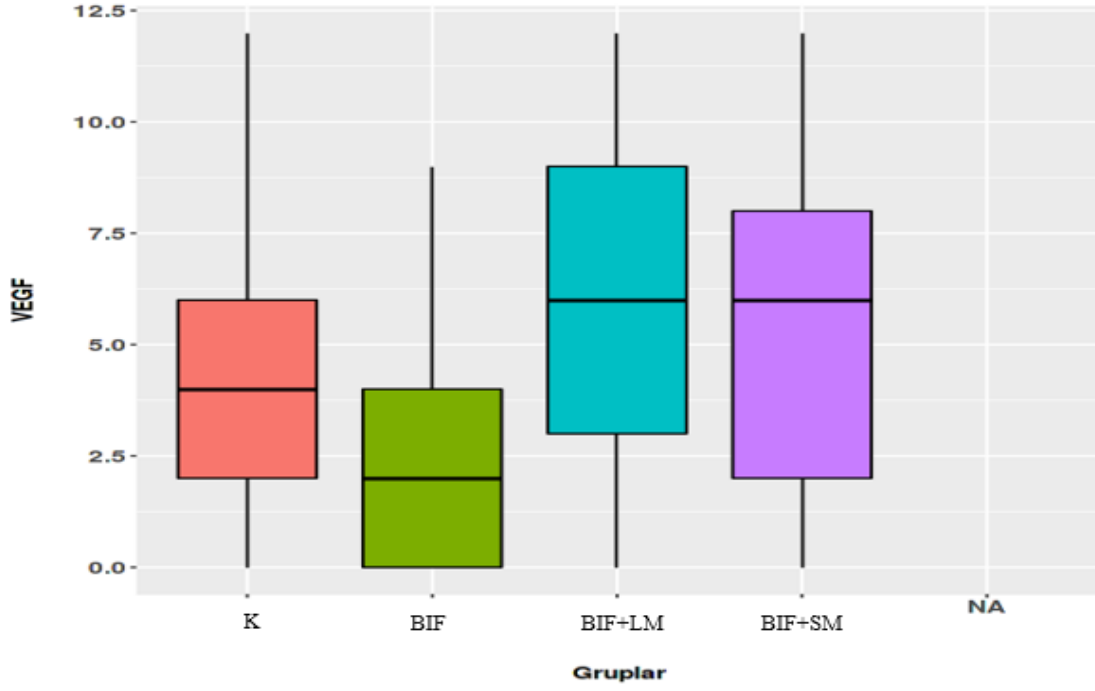
Gruplar	VEGF	Osteokalsin
Kontrol	4.0 (0.0-12.0)	2.0 (0.0-9.0)
BİF	2.0 (0.0-9.0)	1.0 (0.0-9.0)
BİF+LM	6.0 (0.0-12.0)	3.0 (0.0-12.0)
BİF+SM	6.0 (0.0-12.0)	2.0 (0.0-12.0)

Tablo 4.4. Gruplar arası immünohistokimyasal değerlendirmelerin ikili karşılaştırmaları

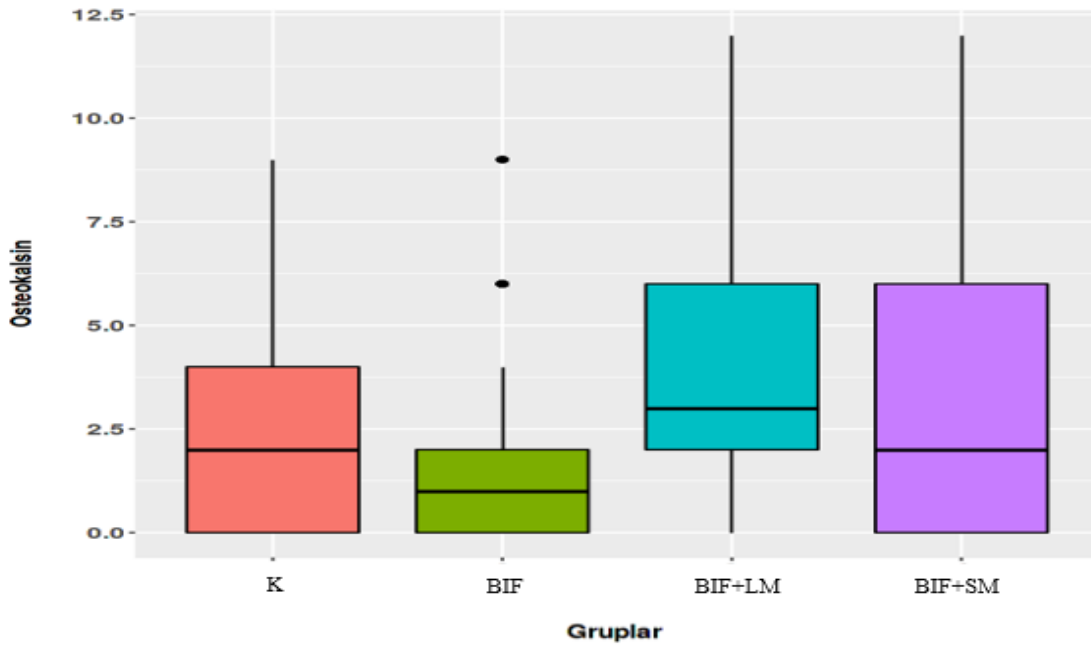
Gruplar	VEGF (p)	Osteokalsin (p)
Kontrol-BİF	<0.001*	0.001*
BİF-BİF+LM	<0.001*	<0.001*
BİF-BİF+SM	<0.001*	0.001*
BİF+LM-BİF+SM	1.000	0.001*
Kontrol-BİF+LM	0.130	0.023*
Kontrol-BİF+SM	0.260	1.000

VEGF immünreaktivite değerleri bakımından gruplar arasında ikili karşılaştırmalara bakıldığında K-BİF, BİF-BİF+LM ve BİF-BİF+SM grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$). BİF grubunda VEGF immünreaktivite değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalış gösterdi. BİF+LM ve BİF+SM gruplarındaki değerlerin ise BİF grubuna göre anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.4).

Osteokalsin immünreaktivite değerleri bakımından gruplar arasında ikili karşılaştırmalara bakıldığında K-BİF, BİF-BİF+LM, BİF-BİF+SM, BİF+LM-BİF+SM ve K-BİF+LM grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı ($p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.023$). BİF grubunda osteokalsin immünreaktivite değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalış gösterdi. BİF+LM ve BİF+SM gruplarındaki değerlerin BİF grubuna göre anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edildi. BİF+LM grubundaki değerlerin ise BİF+SM ve K gruplarına göre anlamlı derecede artış gösterdiği görüldü (Tablo 4.4).



Şekil 4.24. Gruplar arasında VEGF değerlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 4.25. Gruplar arasında osteokalsin değerlerinin grafiksel gösterimi

5. TARTIŞMA

Diş hekimliği tedavileri sırasında çeşitli cerrahi işlemler yapılmakla birlikte diş çekimi en fazla yapılan cerrahi işlem olması sebebiyle önemli yer tutmaktadır. Cerrahi sebeplerle başvuran her hastanın sistemik durumu stabil olmamakta ve birçok farklı hastalık grubuna çeşitli sebeplerle cerrahi işlem uygulanması gerekmektedir. Bifosfonat grubu ilaçlar osteoporoz, multiple myelom, paget ve metastatik tümörler gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bir ilaç türüdür (70), (71). Bifosfonat kullanan hastalarda cerrahi işlemler ilacın etki metabolizması sonucu meydana gelen yan etkileri sebebiyle diş hekimleri için sorun teşkil eder hale gelmiştir. Bu tür ilaçların kullanımının kemik metabolizmasını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Özellikle kemik iyileşmesinin bozulduğu durumlarda, ortaya çıkan osteonekrozlar ciddi komplikasyonlara yol açmaktadır. Bifosfonatların osteonekroz oluşturma mekanizması ile ilgili birçok teori bulunmakla beraber bu mekanizma hala belirsizliğini korumaktadır. Bifosfonat kullanımına bağlı çenenin osteonekrozunda en çok kabul gören teori, bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi inhibe etmesi sonucu meydana gelen kemik döngüsündeki azalmadır. Ancak yapılan birçok çalışmayla birlikte bifosfonatların osteoblastlar, anjiyogenezis, epitel ve mezenkimal hücreler üzerinde de olumsuz etkileri bulunduğu gösterilmiştir. Oluşan osteonekrozun tüm bu inhibitör etkilerin ortak sonucu olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Osteonekroz kemik iliği stromal hücreleri preosteoblastlar, olgun osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar gibi kemik hücrelerinin ölümünü tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir terimdir (195).

Osteonekrozun patofizyolojisinin net olmaması sebebiyle bu hastalığın önlenmesi ve tedavisi ile ilgili protokol tartışmalı bir konu olmaya devam etmektedir ve en uygun tedavi stratejisi henüz belirlenememiştir. Ayrıca bifosfonatların, hastalıkların tedavisindeki yararları nedeniyle vazgeçilmez olmaları ve kullanımlarının tamamen kesilmesine rağmen etkilerinin devam etmesi, osteonekrozun tedavisi kadar risk unsurlarının azaltılarak osteonekroz oluşmasının engellenmesine yönelik yöntemleri de önemli hale getirmektedir. Osteonekrozda bildirilen güncel tedavi yaklaşımı hastada var olan şikayetleri geçirmek ya da azaltmaya dayanmaktadır. Ancak önerilen tedavi protokolleri her zaman olumlu sonuç vermemekte ve tedavi sonrası osteonekroz varlığı devam etmektedir. Yanıt vermeyen başarısız tedavilerin sonucunda daha geniş

osteonekroz alanlarıyla karşı karşıya kalınabilmektedir. Bu nedenle osteonekroz tedavisinde uygulanan medikal ve/veya cerrahi tedavilerin haricinde kemik ve yumuşak doku iyileşmesini olumlu yönde etkileyeceği düşünülen yeni yöntem ve ajanlar araştırılmalıdır (13). Meydana gelen bu komplikasyonun giderilmesi için kemik iyileşmesini ve yeni kemik oluşumunu teşvik eden, damarlanmayı arttıran ve hücrelerde koruyucu etkiler gösteren ajanlar önem kazanmaktadır.

Melatonin vücutta pineal bezler tarafından üretilen endojen bir hormondur. Yapılan birçok çalışmada kemik oluşumu üzerine, anjiyogenezise olan olumlu etkileri, hücreler üzerindeki sitoprotektif etkileri ve antienflamatuar etkileri kanıtlanmıştır. Bilinen temel bir yan etkisi bulunmamaktadır. Hastaların ve hekimlerin rahat erişim sağlayabileceği maliyeti uygun bir ajandır (16), (169), (186).

Tüm bu veriler göz önüne alındığında bu çalışmada bifosfonatların kemik dokuya ve anjiyogenezise olan olumsuz etkilerinin melatonin ile önlenebileceğini göstermek amacıyla histolojik olarak osteonekroz, epitelizasyon ve inflamasyon değerleri immunohistokimyasal olarak ise osteokalsin ve VEGF değerleri incelendi. Literatürde bifosfonata bağlı kemik nekrozu üzerinde melatoninin iyileştirici etkisinin incelendiği in vitro çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmesine karşın henüz in vivo çalışma bulunmamaktadır (196), (197). Bu nedenle bu çalışmanın ilerideki çalışmalara öncü bir çalışma olacağı düşünülmektedir.

Birçok çalışmaya konu olan diş çekiminden sonra iyileşme süreci, farklı laboratuvar hayvanları, insan biyopsileri ve otopsi materyalleri gibi çeşitli örneklerden alınan dokular üzerinde histolojik ve radyolojik olarak araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda onarımın temel histolojik mekanizması açığa çıkmış ve kullanılan hayvanın yaşı, cinsiyeti, türü ve diyeti gibi pek çok etkenin yeni kemik oluşum zamanı konusunda değişikliğe sebep olabileceği bildirilmiştir (198). Hayvanlardaki diş çekim alanının histolojik iyileşme mekanizmasının insanlarınkine benzemekle birlikte daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Böylece insanlarda görülen pek çok durumun iyileşme üzerindeki etkisinin hayvan modeli oluşturularak incelenmesine olanak tanınmıştır (199).

Hayvanlarda diş çekimi sonrası iyileşmeyi etkileyen faktörler ve onarım mekanizmalarının araştırılması adına ratlar 1920' li yıllarda Bodner ve ark. tarafından kullanılmaya başlanmıştır (199). Diş çekimi üzerindeki iyileşmeyi inceleyen çalışmalarda Huebsch ve ark. yaptıkları çalışmada 33 adet sağlıklı erkek rat kullanmış ve birinci molar dişlerini çekerek çekim socketinin iyileşmesini histolojik olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmada ratların çekim sonrası onarım histogenezisinin insan ve

farklı tür hayvalarda yapılan gözlemlere uygun olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çalışmanın sonucunda ilk kemik oluşumunun 5. günde soket tabanında oluştuğu, 25. günde soketin tamamen kemik ile dolduğu ve epitelin olgun skuamöz keratinize epitel halini aldığı görülmüştür (198). Ratlarda yapılan başka bir çalışmada kemik formasyonu yaklaşık sekiz hafta boyunca takip edilmiş ve bu sürenin sonunda çekim soketinin tamamıyla yeni oluşan kemikle dolu olduğu gözlenmiştir (200).

Araujo ve ark. ise çalışmalarında 12 adet köpeğin premolar dişlerine hemiseksiyon yaparak distal köklerini çıkarmış ve çekim sonrası 8 hafta boyunca çekim soketindeki iyileşmeyi takip etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda soketin birinci haftada az miktarda yeni oluşan kemik ile dolu olduğu, ikinci haftada ise apikal ve lateral bölgelerinde büyük oranda yeni oluşmuş kemik bulunduğu görülmüştür. Dördüncü haftada krest bölgesinde demet kemiğinin tamamen kaybolarak yerini lameller kemiğin aldığı ve son olarak sekizinci haftada ise lingual ve bukkal duvar arasının mineralize doku ile dolu olduğu gözlenmiştir (201). Yine köpekler üzerinde 2003 yılında Cardaropoli ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, çekim soketleri yaklaşık 6 aylık bir süre zarfında değerlendirilmiş ve 14. günde tüm soket boyunca yeni kemik oluşumu izlenmiştir. Birinci ayda yeni oluşan kemik neredeyse soketin tamamını doldurmuş, üçüncü ayda ise birçok bölgede örgü kemiğin yerini lameller kemik almıştır. Uzun takip periyodunda gerçekleştirilen bu çalışmada altıncı ayın sonunda kemik remodelasyonunun hala devam ettiği ve mineralizasyonda azalmalar meydana geldiği görülmüştür (202).

Tüm bu bahsedilen çalışmalardan da anlaşılacağı üzere diş çekiminden sonra sokette meydana gelen iyileşme periyodu hayvan modelleri üzerinde fazlaca çalışılmış ve mekanizması büyük oranda anlaşılmıştır (203). Hayvan çalışmalarının aksine insanlarda diş çekimi sonrası soket iyileşmesinin histolojisini değerlendiren fazla sayıda klinik çalışma bulunmamaktadır.

Amler 1960 yılında insanlar üzerinde yaptığı klinik çalışmada toplam 75 çekim soketinin iyileşmesini 50 günlük süre boyunca 2 ila 3 günlük aralıklarla aldıkları biyopsiler üzerinde histolojik olarak değerlendirmiştir. Değerlendirme sonucunda ilk 24 saatte soketin pıhtı ile dolduğu, yedinci günde pıhtının yerini tamamıyla granülasyon dokusuna bıraktığı ve soket tabanında yeni oluşmuş osteoid dokunun bulunduğu görülmüştür. Bu granülasyon dokusu 20. günde yerini bağ dokusuna bırakmış ve mineralizasyon ilk olarak bu aşamada gözlenmiştir. Yaklaşık beşinci haftada (38.gün) soketin büyük çoğunluğu (2/3' ü) yeni kemik trabekülü ile dolmuştur. Epitelizasyon ise

4. günde başlayıp 24 günde tamamlanmıştır. Çalışmada ayrıca kemik rejenerasyonunun soket tabanı ve periferinden merkeze ve soket tepesine doğru olduğu belirtilmiştir (204).

Devlin ve ark. skuamöz hücreli karsinom sebebiyle mandibular kemiğin rezeksiyonu yapılan üç yetişkin erkek hastada; rezeksiyon sırasında cerrahi sebeplerden dolayı 2 hafta önce çekilmiş alt premolar dişlerin çekim soketlerinden biyopsi örnekleri almışlardır. Soket daha sonra kansersiz bir marj sağlamak üzere rezeke edilen dokuya dahil edilmiştir. Alınan histolojik örnekler incelendiğinde soket periferinde trabeküler kemik oluşumu, osteosit ve osteoblastların varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın kısıtlaması kanser için rezeksiyon geçiren bir hastadan elde edilen insan ekstraksiyon soketinin, normal iyileşmeyi temsil etmeme ihtimalinin olmasıdır. Çalışmada ekstraksiyon soketinde herhangi bir kanser bulgusu bulunmamıştır, ancak bitişik tümör hücreleri tarafından salınan büyüme faktörlerinin veya hasta sağlığının iyileşme düzenini etkilemiş olabileceği bildirilmiştir (205).

Bununla birlikte, bariz etik kısıtlamalar normal insan ekstraksiyon soketlerini çevreleyen kemiğin çıkarılmasını önler. Bu yüzden hastalıkların etki mekanizması, iyileşme periyodu, çeşitli ilaç etkileşimleri ve bunların çeşitli dokulara etkisinin değerlendirilmesi gibi pek çok durum için deney hayvanları model olarak kullanılmaktadır. In vivo hayvan modellerinde, biyomekanik testler ve yeni cihaz tasarımlarında daha çok büyük hayvanların; yumuşak ve sert dokudaki iyileşme mekanizmalarının açıklanması için ise daha çok küçük hayvanların kullanılması önerilmektedir (206). Geçmişten günümüze köpek, koyun, domuz, maymun ve tavşan gibi pek çok farklı hayvan modeli üzerinde çalışmalar yapılmış ve hala yapılıyor olsa da, büyük hayvanların bakımlarının, yetiştirme ve üreme koşullarının zor olması ve pahalı olmaları gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların belki de en önemli basamaklarından biri çalışmanın amacına yönelik uygun modelin seçilmesidir. Ratlar medikal pek çok araştırmada en sık kullanılan türlerden biridir (207). Kolay temin edilebilmeleri, üretimlerinin, gelişimlerinin, barındırma ve beslenmelerinin kolay ve ucuz olması, büyük hayvanlara göre daha kolay müdahaleye imkân tanımları, fizyolojileri hakkında yeterli kaynak bulunması ve enfeksiyona olan dirençleri gibi avantajları ratları; hayatı tehdit eden insan hastalıklarının etiyolojisini, risk faktörlerini, önleyici ve tedavi yöntemlerini değerlendiren çalışmalar için çok iyi bir aday haline getirmiştir (208). Literatürde fare, rat, köpek gibi farklı hayvan türleri üzerinde ve farklı protokollerle uygulanan pek çok BRONJ modeli bulunmaktadır (70), (209). BRONJ modeli olarak hangi hayvanın kullanılması gerektiği hala tartışmalıdır. İnsan ve hayvan

kemik yapılarının farklılık göstermesi, çalışma planlamasının (süre, ilaç, doz, hayvan seçimi gibi) ve elde edilen bulguların değişken oluşu bu tartışmalara temel oluşturmaktadır. Allen ve ark. (210) köpek modelini Biasotto ve ark. (211) ise rat modelini tercih etmişlerdir. Biasotto rat kullanımının hem daha çok hayvan kullanılabilirliği açısından yarar sağladığını hem de güvenilir ve tekrar edilebilir olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmamızda da bu bahsi geçen pek çok avantajdan ötürü rat modeli tercih edildi.

BRONJ modeli oluşturulurken hangi bifosfonat çeşidinin hangi yolla kullanılacağına dair net bir veri bulunmamakta ve çalışmalarda farklı yöntemler önerilmektedir. Çeşitli sebeplerden ötürü bifosfonat kullanan ve BRONJ oluşumu görülmüş 119 hastada yapılan çalışmada; en sık kullanılan bifosfonat türlerinin pamidronat, zoledronik asit ve alendronat olduğu görülmüştür. Çalışmada hastaların 32'sinin pamidronat, 48'inin zoledronik asit, 36'sının önce pamidronat ardından zoledronik asit ve 3'ünün ise alendronat kullandığı belirtilmiştir (90). Benzer şekilde hayvan modellerinde yapılan birçok çalışmada da yine başta zoledronik asit olmak üzere, alendronat ve pamidronat kullanılmıştır. Oluşturdukları farklı hayvan modellerinde; Biasotto ve ark. (211), Maahs ve ark. (97), Marino ve ark. (209) zoledronik asit; Conte Neto ve ark. (212) alendronat; Lopez-Jornet ve ark. (213) ise pamidronat kullanmışlardır.

Nitrojen içerikli bifosfonatlar, nitrojen içermeyenlere (etidronat, klondronat) oranla 3 kat fazla antirezorptif etkiye sahiptirler. Üçüncü kuşak zoledronik asit ve risedronat gibi bifosfonatlarda heterosiklik nitrojen yapı bileşiği bulunmakta ve bu zincirin bulunması hem daha güçlü olmalarını hem de yarılanma ömürlerinin çok daha uzun olmasını sağlamaktadır (62). Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda da zoledronik asitin kemik rezorbsiyon etkisinin diğer bifosfanatlara göre daha güçlü olduğu bildirilmiştir (214). Çalışmamızda da bu literatür verilerinden yola çıkılarak zoledronik asit tercih edildi.

Maksilla ve mandibulada bifosfonat tedavisi altında olan hastalarda uygulanacak diş çekimi gibi dentoalveolar girişimsel işlemlerin, BRONJ oluşum riskini anlamlı derecede arttırdığı bilinmektedir. Pazianas ve ark. yaptıkları çalışmada BRONJ riskinin maksilla ve mandibulada uygulanan cerrahi işlemler sonrasında dört kat arttığını belirtmişlerdir (215). Yapılan başka bir çalışmada ise kemik malignitesi sebebiyle bifosfonat kullanan hastalarda BRONJ insidansı % 0.33 - % 1.15 iken diş çekimi sonrası bu insidansın % 6.7 - % 9.1'e yükseldiği görülmüştür (216). Sadece klinik

çalışmalarda değil yapılan hayvan çalışmalarında da, bifosfonatların diş çekim yaralarındaki iyileşmeyi olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (97), (210), (217), (218). Bu sebeplerle diş çekimi, BRONJ oluşturulmak istenen hayvan modellerinde sıkça uygulanmaktadır. Literatürde, rat modellerinde BRONJ' un indüklenmesi adına zoledronik asitin kullanıldığı ve diş çekiminin uygulandığı birçok model bulunmaktadır (209), (219–221). Barba-Recreo ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada aynı doz ve sürede bifosfonat verdikleri deneklerin bir kısmında diş çekimi yaparken bir kısmında çekim uygulamamışlardır. Denekler çekimden bir hafta sonra sakrifiye edilmiş ve çekim soketleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda diş çekilen grupta osteonekroz oranı %80' i bulurken çekilmeyen grupta bu oranın % 0' a düştüğü görülmüştür. Ayrıca diş çekimi yapılmayan grupta belirgin osteonekroz odakları bulunmamıştır (222). Jang ve ark. BRONJ modeli oluşturmak istedikleri çalışmalarında 27 dişi Sprague-Dawley türü ratı üç gruba ayırmışlardır. Deneklere haftada bir 0.2 mg/kg zoledronik asit intraperitoneal olarak 12 hafta boyunca uygulanmış ve deneyin 4. haftası diş çekimi yapılmıştır. Çalışma sonucunda deneklerin % 67' sinde BRONJ oluştuğu bildirilmiş ve diş çekiminin BRONJ oluşumunda tetikleyici bir faktör olduğu belirtilmiştir (223). Benzer sonuçlar çeşitli hayvan modelleri ve klinik çalışmalarda da bildirilmiş ve dental travmanın tetikleyici bir faktör olarak BRONJ gelişme olasılığı ile ilişkili olduğu görülmüştür (97), (212). Bu literatür verilerinden yola çıkılarak çalışmamızda BRONJ oluşum olasılığını arttırmak amacıyla diş çekimi yapıldı.

Bifosfonatların kullanımı ile meydana gelen osteonekrozun en sık çene kemiklerinde görüldüğü bilinmektedir (69), (90), (203), (224) ancak diğer kemiklerde görüldüğünü rapor eden vakalar da mevcuttur (225). Maksilla ve mandibulada sık görülmesiyle ilgili ortak görüş periodontal lifler ve dişler vasıtasıyla bu kemiklerdeki yapım yıkım olayının sürekli devam etmesi sonucu bifosfonatların bu kemiklerde birikme oranının yüksek olmasıdır. Vaskülarizasyon desteğindeki farklılıklar sebebiyle çene kemiklerindeki osteonekroz olgularının % 60' ının mandibulada, % 30' unun maksillada, %10' unun ise her iki kemikte birlikte görüldüğü bilinmektedir (93). BRONJ oluşumunun incelendiği çeşitli hayvan modellerinde hem mandibulanın, hem de maksillanın tercih edildiği çalışmalar mevcuttur (210), (219), (220). Ayrıca mandibulada dişlerin bulunduğu alveol kemik bölgesindeki kemik yapım yıkım miktarının bazis bölgesine göre 3-5 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu sebeple BRONJ vakaları daha çok alveolar kret bölgesinde meydana gelmektedir (226). BRONJ' un daha çok mandibulada meydana gelmesi sebebiyle, bifosfonatların

mandibular çekim bölgesindeki etkisinin ortaya çıkarılmasının çalışmamızın klinik değerini arttıracığı düşünüldüğünden çalışmamızda mandibular kemikten diş çekimi tercih edildi. Mandibulada bir dişin çekilmesi histoloğun yeterli kesit alabilmesi açısından uygun bulunduğu için birden fazla diş çekimi denegin beslenme koşullarını etkileyebileceğinden etik bulunmadı. Literatürde de birinci molar dişin çekildiği benzer çalışmalar bulunduğu için çalışmamızda yalnızca 1. molar dişin çekimi gerçekleştirildi (5).

Diş çekimi gerçekleştikten sonra meydana gelen çekim boşluklarının, herhangi bir geciktirici hastalık, ilaç kullanımı ve enfeksiyon bulunmadığı normal koşullarda 1-2 ay içerisinde yeni kemik ile dolarak iyileştiği bilinmektedir (227). Ratlarda ise bu meknizma daha hızlı ilerler. Devlin ve ark. yaptıkları çalışmada ratlarda diş çekim sonrası çekim soketlerindeki kemik iyileşmesini incelemişler ve çekim boşluğunun en geç iki hafta içerisinde kemik ile dolduğunu bildirmişlerdir (205). Zoledronik asit sebebiyle oluşan BRONJ rat modellerinde diş çekimi sonrası meydana gelen boşluğun iyileşmesi için beklenen sürenin 2-8 hafta arasında değiştiği görülmüştür (97), (211), (218), (219).

Literatürde, zoledronik asitin ratlarda kullanımıyla ilgili standardize edilmiş bir doz veya uygulama yöntemi bulunmamaktadır. Birçok çalışmada farklı dozlar farklı bekleme sürelerinde kullanılmış ve yine farklı başarı oranlarında BRONJ oluşumu görülmüştür. Literatürde subkutan (217); intraperitoneal (97) ve intravenöz (209), (211), (218), gibi farklı yollardan zoledronik asit uygulamaları mevcuttur.

Barba- Recreo ve ark. 20 adet Wistar Albino ratta yaptıkları çalışmada denekleri dört gruba ayırmışlar ve 0.1 mg/kg zoledronik asidi 9 hafta boyunca uygulamışlardır. Çalışmada zoledronik asit birinci ve ikinci gruptaki deneklere haftada 3 doz intraperitoneal olarak, üçüncü gruptaki deneklere ise haftada bir doz intravenöz olarak uygulanmıştır. Ayrıca kontrol grubuna ayrılmış deneklere haftada üç kez olacak şekilde 0.1 mg/kg intraperitoneal salin enjeksiyonu yapılmıştır. İkinci grup haricinde bütün gruplardan deneyin 8. haftası diş çekimi gerçekleştirilmiş ve 9. haftanın sonunda denekler sakrifiye edilmiştir. Yapılan histopatolojik inceleme sonucunda birinci gruptaki deneklerde % 80 oranında osteonekroz gelişimi görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmada kanser hastalarında zoledronik asit protokolünün ayda 1 defa 0.05 mg/kg olacak şekilde uygulandığı ancak çalışmadaki dozlama sıklığının deney hayvanlarında daha yüksek bir kümülatif doz elde etmek ve nispeten kısa deney süresi boyunca ilaç maruziyetini en yüksek düzeye çıkarmak amacıyla seçildiği belirtilmiştir (222).

Zandi ve ark. BRONJ oluşturma protokollerindeki farklılığı ve anlaşmazlığı ortadan kaldırmak adına birçok yazar tarafından kabul gören bir protokol sunmuşlardır. Çalışmada ratlarda BRONJ oluşturmak için kullanılan zoledronik asit dozu, insanlarda malignitelerin yönetiminde kullanılan doza (aylık 4 mg zoledronat) karşılık gelmesi amacıyla 0.06 mg/kg olarak belirlenmiştir. Çalışma iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada 64 hayvan dört alt gruba; bu dört alt grup da 4 subalt gruba bölünerek toplamda 16 grup içeren bir pilot çalışma gerçekleştirilmiştir. Deney grubundaki bütün deneklere deneyin başından itibaren tüm deney süresi boyunca 0.06 mg/kg zoledronik asit haftada bir kez intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Bu pilot incelemenin sonucunda, en yüksek BRONJ oranının (klinik olarak kemik ekspozu veya fistül ile), üç hafta zoledronik asit uygulandıktan sonra diş çekimi gerçekleştirilip, çekimden dört hafta sonra sakrifiye edilen grupta olduğu görülmüştür. Bunun zerine çalışmanın ikinci kısmı olan ana çalışmaya geçilmiş ve 45 rat üç gruba ayrılmıştır. Birinci gruba pilot çalışmada en başarılı çıkan protokol aynı şekilde uygulanmıştır. İkinci gruptaki diş çekimi ise altıncı haftanın sonunda gerçekleştirilmiş ve sekiz hafta boyunca bifosfonat uygulanmaya devam edilip gözlem yapılmıştır. Son olarak üçüncü grup kontrol grubu olarak belirlenmiş ve diğer iki çalışma grubuyla aynı hacimde olacak şekilde haftada bir kez salin çözeltisi enjekte edilmiştir. Çalışmanın sonucunda geliştirilen protokole göre, en yüksek BRONJ oranının, diş çekiminden en az 4 hafta sonra ve çekim öncesi dört haftalık zoledronik asit enjeksiyonu ile elde edildiği belirtilmiştir. Zoledronik asit tedavisinin daha fazla uzamasının, BRONJ gelişimi insidansındaki artışla ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada yaklaşık % 83 gibi yüksek bir başarı oranı elde edilmiş ve BRONJ' un klinik bulguları 8 hafta boyunca devam etmiştir (228).

Keskinrzgar ve ark.' nın yaptıkları çalışmada BRONJ modeli oluşturmak için 80 adet rat kullanılmış ve deneklerin maksiller birinci molar dişleri çekilerek çekim bölgesinde 4 mm' lik kemik defekti oluşturulmuştur. Deneklere haftada 1 defa olmak üzere 7 hafta boyunca intraperitoneal 0.4 mg/kg zoledronik asit uygulanmış ve farklı gruplara ayrılan denekler onuncu, on beşinci ve on yedinci haftalarda sakrifiye edişmiştir. Deney sonunda deneklerin çoğunda BRONJ meydana geldiği gözlenmiştir (226).

Literatürdeki tüm bu farklılıklar ve farklı başarı oranları BRONJ oluşum modeli konusunda çelişkiye ve karmaşaya yol açmaktadır. Çalışmamızda Zandi ve ark.' nın

(228) çalışmalarındaki protokol rehber alındı. Uygulanılacak doz için ise Kenkinrüzgar ve ark.'nın (226) çalışmasından yola çıkılarak yeni bir protokol uygulandı. Çalışmamızda kısa sürede yüksek kemik birikim dozu sağlamak amacıyla zoledronik asit 8 hafta süresince haftada 1 kez intraperitoneal olarak 0.4 mg/kg dozda uygulandı.

BRONJ patogenezi hakkında pek çok farklı teori bulunmakla birlikte tek başına açıklayabilen bir görüş bulunmamaktadır. Osteonekroz kemik iliği stromal hücreleri, preosteoblastlar, olgun osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar gibi kemik hücrelerinin ölümünü tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir terimdir (195). Her ne kadar çenenin osteonekrozu, osteoklastik aktivite ve anjiyogenezin baskılanmasıyla ilişkilendirilse de osteoblast fonksiyonlarının da bifosfonatlardan etkilendiği gösterilmiştir. Osteoblastlar aynı zamanda bifosfonatların neden olduğu osteoklastik kemik rezorpsiyonunun inhibisyonunda da rol alırlar (69). Yapılan çalışmalarda BRONJ oluşumu ile ilgili bozulmuş remodeling, dental problemlerin mevcudiyeti, lokal travma, anjiyogeneziste meydana gelen azalma ve bozulmuş mikroçevre gibi farklı etyolojik faktörler öne sürülmüştür. Sonuç olarak araştırmacılar tarafından BRONJ tablosu multifaktöriyel olarak tanımlanmış ve ilacın kümülatif etkileri sonucu ortaya çıktığı belirtilmiştir (74).

Bifosfonatların bilinen en temel etkisi osteoklast ve osteoklastogenezis üzerinde gerçekleştirdikleri inhibisyonudur. Abe ve ark. yaptıkları in vitro çalışmada bifosfonatların süre ve doza bağlı olarak osteoklastlar üzerinde direkt sitotoksik etkilerinin olduğunu, RANKL aracılığıyla osteoklast farklılaşmasını inhibe ettiğini ve osteoklastogenezis ile ilgili genleri baskıladığını belirtmişlerdir (96). Bununla birlikte son araştırmalar hem osteositlerin hem de osteoblastların kemikteki bifosfonatlar için hedef hücreler olabileceğini düşündürmektedir (229). Bifosfonatların osteoblastlar üzerindeki etkileri tartışmalıdır; çok düşük konsantrasyonlarının in vitro olarak osteoblastları uyardığı görülürken (230), yüksek konsantrasyonlarının osteoblastların migrasyon kapasitesini ve hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (231). Naidu ve ark. hücre kültüründe rat kalvaryasından elde ettikleri osteoblastlara zoledronik asit ve alendronatı farklı dozlarda uygulayarak hücre canlılığı ve fonksiyonu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda ilaç konsantrasyonları arttıkça hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı ve bifosfonatların yüksek konsantrasyonlarda osteoblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (85). İnsan osteoblast hücreleri üzerinde Monero ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada ise

terapotik dozlarda alendronat uygulanan insan osteoblast hücrelerin canlılık, proliferasyon, kollajen sentezi ve mineral depolama kapasitesi açısından incelenmiştir. Çalışmada 10^{-4} mol/L konsantrasyonun üzerindeki alendronat uygulamalarında canlı hücre bulunmadığı ve alendronat uygulamasının dozdan bağımsız olarak tip 1 kollajen sentezini azalttığı tespit edilmiştir (95). Huang ve ark. yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda zoledronik asit uyguladıkları preosteoblastik hücre hattında hücre canlılığı ve apoptozu değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda 10 μ M' nin üzerindeki dozların, hücre canlılığını dikkat çekici bir şekilde azalttığı ve apoptozun indüksiyonuna yol açtığı bildirilmiştir (232).

Bifosfonatlar sadece osteoblastlar üzerinde etkili olmayıp osteoblastlar tarafından salgılanan kemik proteinlerini de inhibe etmektedirler. Bolland ve ark. 43 hastada yaptıkları çalışmada zoledronik asit kullanan hastaların üç yıl boyunca serum osteokalsin seviyelerini takip etmişler ve yalnızca intravenöz olarak 2 doz uygulanan zoledronik asitin osteokalsinin serum seviyesini yaklaşık üç yıl boyunca plaseboya göre düşük tuttuğunu bildirmişlerdir (233). Gasser ve ark. overektomili ratlarda yaptıkları çalışmada zoledronik asidin kansellöz ve kortikal kemikteki uzun dönem etkilerini araştırmışlar ve osteokalsin değerlerinin zoledronik asit tedavisi sonrasında belirgin olarak düştüğünü gözlemlemişlerdir [87]. Basso ve ark. güncel çalışmalarda, bifosfonatların osteoblastlar üzerindeki sitotoksik etkilerinin oral osteonekroz gelişiminde önemli bir rol oynadığının ortaya koyulduğunu belirtmişlerdir. Osteoblast üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada ise bu gelişmelerden yola çıkmışlar ve zoledronik asitin osteoblastlardaki alkalin fosfataz ve osteokalsin üretiminden sorumlu genlerin ekspresyonunu inhibe ederek osteoblast diferansiasyonunu azalttığını gözlemlemişlerdir (234).

Bifosfonatların osteoblast ve osteoklast hücreleri üzerindeki bu etkilerinin yanı sıra anjiyogenez üzerinde de inhibisyon etkisinin bulunduğu bildirilmiştir. Bifosfonatlar VEGF üzerinde inhibisyon etkisi göstererek anjiyogenezisi baskılar ve bu durum kemik yenilenmesinin engellenmesine ve lokal doku iyileşmesinde gecikmelere sebep olur (97). Kemik metastazı olan 25 hasta üzerinde yapılan çalışmadan pamidronat uygulamasını takiben VEGF' nin dolaşımdaki düzeyinin anlamlı oranda azaldığı belirlenmiştir (235). Basso ve ark. hücre kültüründe yaptıkları çalışmada zoledronik asit uyguladıkları epitel hücrelerinde VEGF ve FGF-b' yi değerlendirmişlerdir. Bu faktörlerin hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşmasının yanı sıra lokal

neovaskularizasyonda da önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Çalışmanın sonucunda zoledronik asidin direk olarak hücre proliferasyonunu önlediğini ve büyüme faktörlerinin epitel hücrelerinden ekspresyonunu VEGF için % 34 ve FGF-b için ise % 51 oranında azalttığını bildirmişlerdir. Yazarlar ayrıca bu büyüme faktörlerindeki azalmanın lokal yara iyileşmesini geciktirebileceğini belirtmişlerdir (236). İshiaq ve ark. hem in vivo hem de in vitro olarak yaptıkları çalışmada bifosfonatların anjiyogenezis üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. In vivo olarak osteoporoz sebebiyle alendronat kullanmaya başlayacak olan hastalar çalışmaya dahil edilerek başlangıç, 3, 6, ve 12. aylardaki kan örnekleri VEGF ve anjiyopietin-1 düzeyleri açısından değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda 6. ve 12. aylardaki kan örneklerinde VEGF ve anjiyopietin-1 düzeylerinin önemli oranda düştüğü görülmüştür. Çalışmada ayrıca in vitro olarak zoledronik asit uygulanan osteoblast ve osteosit hücre hattında da VEGF ve anjiyopietin-1 üretimi değerlendirilmiş ve zoledronik asitin bu proanjiyogenetik proteinler üzerindeki inhibisyon etkisi gösterilmiştir (237). Moreira ve ark. yaptıkları çalışmada in vitro olarak insan endotel hücreleri üzerinde in vivo olarak ise rat subkutan dokusunda alendronatın epitel ve endotel dokular üzerine etkilerini incelemişlerdir. İn vitro çalışmanın sonucunda uygulanan alendronatın hücre canlılığında anlamlı derecede düşüşe sebep olduğu görülmüştür. Ratlarda in vivo olarak gerçekleştirilen çalışmada ise alendronat polietilen glikol taşıyıcı ile subkutan dokuya yerleştirilmiştir. Denekler 7. ve 14. günlerde sakrifiye edilmiş ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Yapılan inceleme sonucunda alendronatın epitel ve endotel doku üzerindeki sitotoksik etkileri gösterilmiştir (238). Ribatti ve ark. bifosfonatların endotel hücre ve anjiyogenezis üzerindeki etkilerini in vitro olarak değerlendirmişlerdir. Bu sebeple 1, 3, 10, 30 ve 50 µM konsantrasyonda klodronat insan göbek kordonu endotel hücrelerine uygulanarak bu hücrelerin morfogenez, proliferasyon ve anjiyogenezis kapasitesine etkileri gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda klodronatın doza bağlı olarak endotel hücrelerinin ekstrasellüler matrikse bağlanma kapasitesinin yanı sıra proliferasyon, migrasyon ve invazyon yeteneğini de inhibe ederek yeni damar oluşumunu kesintiye uğrattığı bildirilmiştir (239). Bu durumun BRONJ olgularında vasküler yollarla sağlanacak olan iyileşme desteğini inhibe ettiği düşünülmektedir. Bahsedilen tüm bu çalışmaların aksine literatürde bifosfonatların anjiogenez üzerinde etkisinin bulunmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur. Maash ve ark. yaptıkları çalışmada 31 adet dişi rat kullanmışlar ve hayvanları alendronat uygulanan grup, zoledronik asit uygulanan grup ve kontrol grubu olacak şekilde üç gruba ayırmışlardır. Çalışmada alendronat, 23 hafta

boyunca gavaj yoluyla haftada 0.05 mg / kg, zoledronik asit ise 28 gün arayla intraperitoneal yoldan toplamda 5 doz olacak şekilde 0.6 mg / kg uygulanmıştır. Çalışmanın 45. gününde sağ maksillar molar dişler çekilmiş ve hayvanlar deneyin başlangıcından 150 gün sonra sakrifiye edilmiştir. Sonuç olarak histolojik incelemelerde zoledronik asit uygulanan grupta %80 oranında osteonekroz görülürken alendronat grubunda osteonekroz görülmemiştir. Ayrıca yapılan immünohistokimyasal incelemelerde ise gruplar arasında VEGF değerleri açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmüş ve yazarlar zoledronik asit ve alendronatın anjiyogenezin inhibisyonuna neden olmadığını ve bunun zoledronik asit grubunun hayvanlarında gözlenen osteonekroz ile ilişkili bir faktör olmadığını düşünmüşlerdir. Ancak çalışmada VEGF'nin değerlendirilmesi için seçilen mikroskopik alan, bifosfonatların aktif metabolizma bölgelerindeki kemik dokusuna olan afinitesi sebebiyle osteonekroz oluşumundan bağımsız olarak, çekim soketindeki vital kemik bölgesine karşılık gelmiştir. VEGF değerlerinde anlamlı bir fark bulunmamasının sebebi incelemenin bu vital kemik alanında gerçekleştirilmiş olmasından kaynaklı olabilir (97).

Kemikte biriken bifosfonatların kollojen ve epitel doku üzerindeki toksik etkileri de prognozun olumsuz yönde etkilenmesine sebep olmaktadır (98). Açıl ve ark.'nın insan gingival fibroblast ve osteoblastları üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada uygulanan bifosfonatın doza bağlı olarak kollajen üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (99). Yapılan başka bir çalışmada farklı tür bifosfonatların (zoledronik asit ve pamidronat) uygulandığı osteoblast hücrelerinde kollajen sentezinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiş ve bu durumun doku iyileşmesi üzerinde gecikmelere sebebiyet verebileceği belirtilmiştir. Bifosfonatların etkisiyle kollajen dokuda meydana gelen bu inhibisyon kollajen yapıdaki periodontal ligament hücreleri ve kemiği periosta bağlayan diğer kollajen yapıdaki liflerin apoptozuna sebep olmaktadır (240).

Otto ve ark. MSC'ler üzerinde uyguladıkları bifosfonatların konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı ve aktivitesindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada zoledronik asit, ibandronat ve klodronatın onkolojik hastalarda kullanılan 1, 3, 6 aylık ve 1, 3, 5, 10 yıllık uygulama dozları MSC'ler üzerine uygulanmıştır. Uygulama yapılan MSC hücreleri hücre canlılığı, aktivitesi, proliferasyon yeteneği ve sitotoksite değerleri açısından gözlemlenmiştir. Sonuç olarak yüksek konsantrasyon ve uzun süreli uygulamada hücre şekillerinin bozulduğu ve canlı hücre gözlenmediği belirtilmiştir. Doza bağlı hücre sel toksisitedeki gözlenen bu artışın BRONJ gelişiminden sorumlu

tutulabileceği savunulmuştur. Çalışmada ayrıca ortam asiditesinin de bifosfonatların etkisini arttırdığı ve BRONJ oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (241). Kobayashi ve ark. farelere subkutan yolla zoledronik asit uygulayarak çekim soketindeki iyileşmeyi histolojik ve histomorfometrik olarak incelemişlerdir. Histomorfometrik analiz, zoledronik asit uygulanan farelerde yeni kemik miktarının ve soketteki kan damarlarının sayısının kontrol farelerine kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Çalışmada ayrıca in vitro olarak uygulanan zoledronik asitin VEGF tarafından indüklenen anjiyogenezisi, endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Bu etkilerinin yanı sıra zoledronik asit diş çekim soketinin kapatılması için önemli bir adım olan oral epitel hücrelerinin soket sınırına göçünü önlemiştir. Streptococcus mutans' ın HA' ya yapışmasını ve sağlıklı bireylerden elde edilen oral bakterilerin çoğalmasını teşvik ettiği görülmüş ve böylece zoledronik asitin bakteriyel enfeksiyonu arttırabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, veriler zoledronik asitin osteogenezisi ve anjiyogenezisi inhibe ederek diş çekim soketinin yara iyileşmesini geciktirdiğini ve oral bakteriyel davranışları değiştirdiğini göstermiştir (217). Tüm bu etkilerin sonucu olarak kemiğin iç ve dış onarım sistemleri tamamen engellenmiş olur ve doku iyileşmesi inflamasyon fazında kesintiye uğrar. Hematom ve granülasyon dokusu oluşumunun sonrasında meydana gelmesi gereken kemik rezorpsiyonu osteoklast inhibisyonu sebebiyle duraklar ve granülasyon dokusunun ortamdaki uzaklaşması sonucu çıplak kemik yüzeyi açığa çıkmış olur. Oral kavitedeki mikroorganizmalar başta Actinomyces türleri olmak üzere kemik dokuyu istila ederler. Onarımın olmadığı mikroorganizmalar tarafından istila edilen bu çıplak kemik dokuda, yumuşak doku onarımı da meydana gelmez ve sonuç olarak BRONJ tablosu ortaya çıkar.

Günümüzde BRONJ hastalarında tedavi medikal tedavi, medikal/cerrahi tedavi ve medikal/cerrahi tedaviye ek olarak çeşitli destekleyici tedavilerin uygulanması şeklinde değişmektedir. Antibiyotik, ağız gargaraları, ağrı kesiciler, yüzeysel debridman gibi konservatif yaklaşımlar genellikle başlangıç tedavisi olarak uygulanan yöntemlerdir. Destekleyici tedaviler dokuda iyileşme potansiyelini arttırmak amacıyla uygulanan HBO tedavisi, DDLT, PRP, günlük düşük doz PTH uygulaması, medikal ozon tedavisi, BMP, otolog kemik iliği kök hücre enjeksiyonu gibi yöntemlerdir. Tedaviye yanıt alınamaması ve nüks olasılığı, bu hastalığın kontrol altına alınmasını daha da zor hale getirmektedir (13).

Melatonin yüksek lipofilik özelliği sayesinde hücreler arası matrikse ve hücrelerin tüm bölümlerine kolaylıkla ulaşabilmektedir (16). Melatoninin kana geçtikten sonra pasif difüzyonla tükürüğe ve daha sonra oral kaviteye geçtiği bilinmektedir (127).

Literatürde melatoninin kullanım için güvenli olduğu, diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve uzun süre (5 yıl gibi) kullanım da bile, toksik bir etki göstermediği bildirilmiştir (16). Baş dönmesi, baş ağrısı, bulantı ve uyku hali gibi hafif yan etkiler, plasebo tedavisine yakın seviyelerde görülmüştür (242). Yapılan çalışmalarda melatoninin yüksek farmakolojik dozlarda serumda lüteinleştirici hormon seviyesinde yükselmeye, prolaktin seviyesinde ise düşmeye sebep olabileceği bildirilmiştir (243). Ayrıca yüksek dozda melatoninin prooksidan davranış gösterdiği ile ilgili yayınlar da bulunmaktadır (244).

Literatürde ratlarda uygulanan sistemik melatoninin yüksek dozda (50 mg/kg) vücut ısısını düşürücü, düşük dozda (25 µg) ise vücut ısısını artırıcı bir etki gösterdiği bildirilmiştir (245). Yapılan pek çok çalışmada farklı hayvan modellerinde melatoninin farklı sistemik dozları kullanılmıştır. Halıcı ve ark.'nın yaptıkları çalışmada 80 adet erkek Sprague-Dawley rat iki gruba ayrılmış ve kırık modelinde melatoninin iyileşme üzerindeki etkisi incelenmiştir. Farklı zamanlarda sakrifiye edilen çalışma grubundaki deneklere günlük 30 mg/kg melatonin intraperitoneal olarak uygulanmış ve melatonin uygulamasının serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini baskılayıp, antioksidan enzim aktivitelerini düzenleyerek kırık iyileşme sürecini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (246). Acıkan ve ark. yaptıkları çalışmada, ratlarda mandibular distraksiyon osteogenezisi sırasında 25 mg/kg ve 50 mg/kg olarak iki farklı dozda melatoninin intraperitoneal olarak beş hafta boyunca haftada bir defa olacak şekilde uygulamışlar ve yeni kemik oluşumu üzerine etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır (189). Sahna ve ark. iskemi/perfüzyon modelinde in vivo olarak yaptıkları çalışmada 10 mg/kg melatoninin miyokartta oluşan oksidatif stresi anlamlı düzeyde azalttığını gözlemlemişlerdir (247). Reiter ve ark. yaptıkları çalışmalarında melatoninin farmakolojik dozu olan 1-10 mg arasında uygulamasının hem in vivo hem de in vitro olarak lipid peroksidasyonunu ve DNA'daki oksidatif hasarı azalttığını bildirmişlerdir (248). Li ve ark. yaptıkları çalışmada deneysel pulpitis oluşturulan ratlarda 10 mg/kg melatoninin intraperitoneal olarak uygulamışlar ve pulpa inflamasyonuna karşı koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir (249). Koyama ve ark. dört hafta boyunca her gün 1, 5 ve

50 mg/kg melatonin uyguladıkları farelerde, melatoninin kemik kütlesine etkisini incelemişlerdir. Günlük 5 ve 50 mg/kg verilen melatoninin kemik mineral yoğunluğunu, kemik kütlesini ve trabeküler kalınlığını anlamlı bir şekilde arttırdığını bildirmişlerdir (20). Ratlarda yapılan pek çok çalışmada melatoninin 10 mg/kg'lık dozu tercih edilmiştir (250), (251). Bu çalışmalar ışığında çalışmamızda melatonin 10 mg/kg/gün dozda intraperitoneal olarak uygulandı.

Pek çok çalışmada farklı hayvan türlerinde ve farklı dozlarda melatoninin lokal uygulaması gerçekleştirilmiş ve etkileri değerlendirilmiştir. Munoz ve ark. implantasyondan önce köpek çene kemiğinde oluşturdukları implant soketlerine 1.2 mg liyofilize toz melatonin uygulamışlar ve melatoninin implant çevresindeki yeni kemik oluşumunu arttırdığını bulmuşlardır (157). Benzer bir çalışmada, Tresguerres ve ark. cerrahi implant entegrasyonu sırasında 3 mg lokal melatonin uygulamasının trabeküler kemik implant bağlantısını ve trabeküler kemik alan yoğunluğunu artırabileceğini belirtmişlerdir (252). Calvo ve ark. 12 adet Beagle köpeğinde yaptıkları çalışmada yerleştirdikleri implantların bir kısmının çevresine kollajenize domuz kemiği greftini 5 mg liyofilize melatonin ile karıştırarak, bir kısmına ise kollajenize domuz kemiği greftini tek başına uygulayarak 3 ay beklemişlerdir. Sonuç olarak melatoninin osteoid matrisin sentezini ve mineralizasyonunu hızlandırarak trabeküler kemik oluşumunu artırdığı görülmüştür. Böylece implantların osteointegrasyonu esnasında implant yüzeyiyle temasta olan kemik miktarında artış sağlandığı belirtilmiştir (253). Cobo ve ark. tarafından 10 hasta üzerinde yapılan çalışmada bilateral alt üçüncü molar dişlerinin çekimi gerçekleştirilmiştir. Çekimin ardından çekim soketlerine 3 mg lokal melatonin veya plasebo uygulanarak melatoninin erken dönem antiinflamatuvar, analjezik ve osteojenik etkisi incelenmiştir (254). Cutando ve ark. 16 adet Beagle köpeğinde yaptıkları çalışmada diş çekimini takiben soket içerisine 2 mg lokal melatonin uygulamışlar ve melatoninin diş çekimi sonrası artan reaktif oksijen radikaller seviyelerinin normal değerlere dönmesinde etkisi olduğunu belirtmişlerdir (255). Bu bilgiler dâhilinde çalışmamızda 1.2 mg'lık melatonin dozu referans alındı ve çekim soketlerine uygulandı (156), (157).

Melatonin ve kemik metabolizması arasındaki bağlantı birçok çalışmada belgelenmiştir (20), (22), (127), (256). Roth ve ark. in vitro olarak yaptıkları çalışmada preosteoblastik hücrelerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkilerini incelemek için 50 nM konsantrasyonunda melatonin kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda melatonin

varlığında kemik iliğinden vasküler sistem yoluyla alveoler yatağa taşınan yeni preosteoblastların normalde 21 gün olan farklılaşma süresinin 12 güne indiği ve mineralizasyonunun hızlandığı bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca melatoninin osteoblastlardan tip I kollajen liflerinin sentezini ve kemik markır proteinlerinin gen ekspresyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (22). Son ve ark. preosteoblastik hücreler üzerinde, 0-250 µM aralığındaki melatonin konsantrasyonunda çalışmışlar ve melatoninin hücre farklılaşması üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak melatoninin hücrelerin alkalen fosfataz, tip 1 kollajen ve osteokalsin ekspresyon seviyelerini konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı gözlenmiştir (257). Nakade ve ark. 0-100 µM konsantrasyon aralığında uyguladıkları melatoninin insan kemik iliği ve osteoblast hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Sonuçta melatonin doza bağlı olarak hücrelerin osteojenik farklılaşmasını desteklediğini bildirmişlerdir (258). Osteoblastik hücreler haricinde melatoninin MSC' leri de etkilediği belirtilmiştir (259). Radio ve ark. yaptıkları çalışmada melatoninin insan MSC' lerinin alkalen fosfataz aktivitesini önemli derecede arttırdığını göstermişlerdir (260). Zhang ve ark. ise mikromolar düzeylerdeki melatoninin MSC' lerin osteojenik farklılaşmasını indüklediğini belirtmişlerdir (261).

İn vitro çalışmaların yanı sıra farklı modellerde yapılan bir çok in vivo çalışmada da lokal ve sistemik yollarla uygulanan melatoninin kemik dokuya olan etkileri incelenmiştir.

Acıkan ve ark. ratlarda mandibular distraksiyon osteogenezisi sırasında farklı dozlarda sistemik melatonin uygulamasının yeni kemik oluşumu üzerine etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Mandibular distraksiyon osteogenezisi; kontrol, melatonin dozu 1 ve melatonin dozu 2 olarak üç gruba ayrılan 30 erişkin dişi Sprague-Dawley ratta uygulanmıştır. Operasyondan sonra, melatonin dozu 1 ve melatonin dozu 2 gruplarındaki deneklere 7, 14, 21, 28 ve 35. günlerde sırasıyla 25 ve 50 mg/kg melatonin intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Denekler, distraksiyondan 28 gün sonra (operasyondan 43 gün sonra) sakrifiye edilmiştir. Histolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal analizlerde yeni kemik oluşumu, osteoblast, osteoklast, osteopontin ve VEGF oranları değerlendirilmiştir. Osteoblast sayısındaki artışın melatonin dozu 2 grubunda en fazla olduğu bunu sırasıyla melatonin dozu 1 ve kontrol grubunun izlediği görülmüş ve gruplar arasındaki farklar anlamlı bulunmuştur. Ayrıca melatonin gruplarında kontrol grubundan daha fazla osteoklast görülmüştür. Son olarak,

osteopontin ve VEGF düzeyleri melatonin gruplarında kontrol grubundan ve melatonin dozu 2 grubunda ise melatonin dozu 1 grubundan daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışma, sistemik melatonin uygulamasının distraksiyon osteogenezisinde yeni kemik oluşumunu arttırabileceğini düşündürmüştür (189).

Satomura ve ark. yaptıkları çalışmada melatoninin yeni kemik oluşumu süresi (kemik kırıkları, osteotomilerde, kemik distraksiyonu gibi durumlarda) ve insan osteoblast hücreleri üzerindeki etkisini göstermeyi amaçlamışlardır. Çalışmalarını in vivo ve in vitro olmak üzere iki kolda yürütmüşlerdir. İn vitro olarak 30 hastanın mandibular veya iliak kemiğinden elde ettikleri osteoblastik hücreleri incelemişler ve melatoninin 0-200 µM konsantrasyonlarda doza bağlı olarak insan osteoblastlarının çoğalmasını stimüle ettiğini; tip 1 kollajen, osteopontin, kemik sialoprotein ve osteokalsin gibi proteinlerin gen ekspresyonlarını tetiklediğini ve mineralize matriks oluşumunu uyardığını göstermişlerdir. İn vivo olarak ise ratlara 21 gün boyunca intraperitonel olarak 100 mg/kg melatonin uygulamış ve melatoninin femurda yeni oluşan kortikal kemik hacmini arttırdığını göstermişlerdir. Sonuç olarak çalışmada melatoninin insan osteoblastlarının farklılaşmasını direk olarak hızlandırdığı ve farmakolojik dozlarda kemik rejenerasyonunu tetiklemek için uygulanabileceği öne sürülmüştür (153).

Önceki çalışmalar, melatoninin lokal olarak kullanıldığında etkili bir osteoblastik malzeme olduğunu göstermiştir. Bu araştırmalarda melatoninin, yakınındaki hücreler üzerinde parakrin etkilerinin bulunduğu ve lokal bir büyüme faktörüne benzer etkiler gösterdiği ortaya koyulmuştur (152), (259).

Calvo ve ark. köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada alt çenede sağ ve sol bölgeden üç premolar ve bir birinci molar diş olmak üzere toplamda 8 adet diş çekmişlerdir. Çekim soketlerinden ilki kontrol amacıyla boş bırakılmış kalan sağdaki üç çekim soketine melatonin emdirilmiş kollajen sünger soldaki çekim soketlerine ise yine kollajen süngere emdirilmiş apigenin uygulanmıştır. Operasyondan sonra sırasıyla 30, 60 ve 90. günlerde çekim bölgelerinden biyopsiler yapılmıştır. Biyopsiler üzerinden uygulanan medikal ajanların yeni kemik oluşumu ve olgunlaşması üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. 30. günde, kontrol grubunda apigenin ve melatonin gruplarına göre daha yüksek oranda olgunlaşmamış kemik görülmüştür. Ayrıca yeni kemik oluşumu melatonin grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 60.

gündeki histomorfometrik analizlerde melatonin bölgelerindeki olgunlaşmamış kemik miktarının apigenin ve kontrol bölgelerine göre anlamlı olarak daha az bulunduğu görülmüştür. Yine 60. günde melatonin ile doldurulan defeklerdeki yeni kemik oluşumu kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 90. günde, olgunlaşmamış kemik yüzdeleri tüm gruplar için benzer, yeni kemik oluşumu ise melatonin grubunda apigenin ve kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş ancak bu fark anlamlı bulunmamıştır. Sonuç olarak melatoninin veya apigeninin topikal uygulamalarının kemik dokusunun iyileşmesinde hızlandırıcı potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Ek olarak, melatonin gibi hormonların kemik üzerinde uyarıcı etkilere sahip olduğu ve kemik kusurlarında kemik neoformasyonunu teşvik ettiği bildirilmiştir. Yazarlar diğer çalışmalara da dayanarak, melatoninin osteoblastlar üzerinde doğrudan etkisinin bulunduğunu bu etkinin de osseöz matriksin daha yüksek üretim hızı ve buna karşılık gelen kalsifikasyonu ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Ayrıca preosteoblastların hem miktar olarak artışına hem de hız olarak daha yüksek bir osteoblastast olgunluğuna erişmesine olanak sağladığını belirtmişlerdir (262).

Cobo ve ark. tarafından 10 hasta üzerinde yapılan çalışmada bilateral alt üçüncü molar dişlerinin çekimi gerçekleştirilmiştir. Çekimin ardından çekim soketlerine 3 mg lokal melatonin (2 ml hidroksetil selüloz jel içinde) veya plasebo uygulanarak melatoninin erken dönem antiinflamatuvar, analjezik ve osteojenik etkisi incelenmiştir. Osteojenik etki için operasyondan önce ve sonrasında 60. günde radyografik kemik yoğunluğu, dijital tarayıcı ile elde edilen panoramik kesitlerde Hounsfield Birimleri ölçülerek değerlendirilmiş ve sonuç olarak çekim bölgesine melatonin uygulamasının kemik yoğunluğu açısından bir farklılığa sebep olmadığı bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca çekimin hemen ardından ve melatonin uygulamasından 60 dakika sonra kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinde Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELİSA) testi ile ağrı ve inflamasyonu değerlendirmek amacıyla IL-6 ve nitrotirozin değerlerine de bakılmış ancak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yapılan diğer çalışmalar da dikkate alındığında bu sonuçları doğrulamak adına daha yüksek dozlarda melatonin uygulanarak ve numuneyi uygun bir yöntemle genişleterek daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır (254). Çalışmada osteojenik etkiyi değerlendirmek için yalnızca iki boyutlu panoramik radyografilerin kullanılarak histolojik değerlerin incelenmemesinin ve değerlendirme için beklenen 60 günlük

sürenin normal şartlar altında fizyolojik kemik oluşumu için yeterli olmasının gruplar arasındaki farkın anlamsız bulunmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

El-Gammal ve ark. maksillar premolar tek diş eksikliği sebebiyle implant uygulaması yapıp immedat yükleme gerçekleştirilecek olan 14 hastayı iki gruba ayırmış (n:7) çalışma grubunun implant soketlerine implantları yerleştirmeden hemen önce 1,2 mg/ml lokal melatonin jel uygulamışlardır. Hastaların osteointegrasyon ve marjinal kemik kaybı değerlerini 1, 3, 6 ve 12 aylık takiplerle değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda melatonin uygulanan grubun 1. aydaki osteointegrasyon değerlerinin anlamlı derecede fazla, 1. ve 3. aydaki marjinal kemik kaybı değerlerinin ise anlamlı derecede az olduğu bulunmuştur. Yazarlar topikal melatonin uygulamasının immedat yüklenen implantlar için iyi bir tedavi seçeneği olabileceğini belirtmiş ve bu çalışmanın sonuçlarını melatoninin kemik yapımını arttırıcı ve kemik yıkımını baskılayıcı etkilerine bağlamışlardır (263).

Kemik matriksinin kollajen dışı bir proteini olan osteokalsin, kemik dokusuna spesifik olup sentezi osteoblast, odontoblast ve kondroblastlar tarafından gerçekleştirilir. Kemikte ekstraselüler matrikse gömülü halde bulunur ve osteoblastik aktivitenin spesifik bir göstergesi olarak bilinmektedir (264). Osteokalsinin kimyasal yapısının HA ile etkileştiği bilinmekle beraber fonksiyonu tam olarak tespit edilememiştir. Çalışmalarda HA depolanması, mineralizasyon ve osteoblast farklılaşması ile birlikte osteokalsin sentezinde artış olduğu gösterilmiştir (265). Çalışmalarda osteokalsinin serumdaki seviyesinin paget, hipertiroidi ve hiperparatiroidi gibi kemiğin yeniden yapılanmasının arttığı hastalıklarda arttığı; steroid tedavisi, hipoparatiroidi ve hiperkalsemi gibi kemik yeniden yapılanmasının azaldığı durumlarda ise azaldığı bildirilmiştir (266). Osteokalsin kemik matriks mineralizasyonuna katılarak kemik dokusunun gelişimi ve remodellingi sırasında aktif rol oynar. Literatürden yola çıkılarak osteokalsin değerlerinin artmasının yeni kemik yapımı ile uyumlu olduğu ve yeni kemik yapımı gerçekleşen alanlarda osteokalsin seviyelerinin artması gerektiği beklenmektedir. BRONJ oluşum mekanizmasını anlamak ve değerlendirmek adına bifosfonatların osteoblastlar ve buna bağlı olarak yeni kemik oluşumu üzerindeki etkilerini değerlendirmek önemli bir basamak olacaktır. Yapılan çalışmalar ışığında bifosfonatların osteoblastların migrasyonunu, proliferasyonunu, fonksiyonunu, mineral depolama kapasitesini ve hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Bifosfonatlar bu etkilerinin yanında osteoblastların apoptozunu indükler ve direkt sitotoksik etkileri

sebebiyle de hücre canlılığını önemli ölçüde azaltırlar. Bu zararlı etkiler yeni kemik oluşumunu ve kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Melatonin sitoprotektif bir ajandır. Yeni kemik oluşumunun birçok basamağında aktif rol almaktadır. Literatürde de gösterildiği gibi hem sistemik hem de lokal melatonin uygulamasının yeni kemik oluşumunu arttırdığı, osteoblastların farklılaşmasını, fonksiyonunu ve olgunlaşmasını indüklediği ayrıca osteoblastlardan salgılanan protein ekspresyonlarına da katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda bu literatür verilerinden yola çıkılarak bifosfonatın osteoblastlar ve kemik dokusu üzerindeki sitotoksik etkilerinin melatonin tarafından önlenebileceği ve azaltılabileceği düşünüldü. Bu sebeple kemik iyileşmesini ve yeni kemik oluşumunu değerlendirebilmek amacıyla kemik dokudaki osteokalsin immünohistokimyasal olarak incelendi. BİF grubunda osteoklasin değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. Bu, bifosfonatların osteokalsin sentezini ve dolayısıyla osteoblast fonksiyonlarını inhibe ettiğini gösterdi. BİF+LM ve BİF+SM gruplarında ise osteokalsin değerleri BİF grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu durum ise lokal ve sistemik melatonin uygulamasının çekim soketlerindeki bifosfonatın baskıladığı osteokalsin üretimini artırdığını göstermektedir. Böylece melatoninin BRONJ vakalarında osteoblast fonksiyonlarını destekleyerek kemik oluşumunu indükleyebileceği düşünülmektedir. BİF+LM grubundaki osteokalsin değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Bu sonuç lokal melatonin uygulamasının fizyolojik kemik oluşum sürecini hızlandırdığını ve yeni oluşacak kemik miktarını arttırdığını ortaya koymaktadır. BİF+LM grubundaki osteoklasin değerleri BİF+SM grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdi. Bu durumun kemik dokuda bir büyüme hormonu gibi davranan melatoninin lokal uygulamasının kemik hücreleri üzerindeki parakrin etkisinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sistemik olarak uygulanan melatoninin kemik dokuya ulaşan miktarı lokal uygulanan melatonine göre daha düşük olabilir ve bu da oluşan farklılığın sebebi olabilir. Literatürde lokal ve sistemik melatonin uygulanarak kemik dokudaki osteoklasin değerlerinin birbiriyle kıyaslandığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu farklılığın açıklanabilmesi adına moleküler ve kantitatif analizlerin yer aldığı ileri klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan çalışmalarda melatoninin çeşitli yollar üzerinden anjiyogenezisin birçok basamağında etkili olduğu gösterilmiştir. Fibroblastların endotel hücrelerinin

progenitörleri olarak anjiyogeneziste önemli rol oynadığı bilinmektedir (187). Melatonin fibroblast proliferasyonunu uyarır ve böylece anjiyogenezis üzerinde olumlu etkiler gösterir (188). Çalışmalarda ayrıca MSC sayısındaki artışın da, gelişmiş anjiyogenez ve hücre proliferasyonu ile ilişkili bulunduğu bildirilmiştir. Melatonin, MSC'leri apoptozdan korur ve MSC' den hücre koruma ve onarımında yer alan anjiyogenik ve mitojenik faktörlerin (FGF'lerin) ekspresyonunu uyarır (156).

Mias ve ark. ratlarda akut böbrek yetmezliği modeli kullanarak yaptıkları çalışmada melatonin uygulamasının MSC'lerin hayatta kalmasını güçlü bir şekilde arttırdığını göstermişlerdir. Daha sonra in vivo gözlemlenen bu etkilerle ilgili mekanizmalar hakkında bilgi edinmek adına kültürlenmiş MSC'ler üzerinde melatoninin etkisini in vitro olarak test etmişlerdir. Sonuç olarak tedavi edilmemiş hücrelerle karşılaştırıldığında, melatonin MSC'lerin sağ kalımını, etkinliğini ve parakrin aktivitesini (sitokin) artıran bir ajan olarak davrandığını bildirmişlerdir (190).

Pugazhenti ve ark. yaptıkları çalışmada melatoninin yara iyileşme sürecini geliştirmek için ideal bir aday olduğunu önermişler ve tam kalınlıkta insizyonel kesi yaptıkları ratlarda yara kenarlarına 1.2 mg/kg melatonin uygulamışlardır. Denekler insizyonel kesiden sonraki 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerde sakrifiye edilmiştir. Çalışmada rodent endotelial hücre-spesifik markırı olan BS-I ve en güçlü anjiyogenik protein olan VEGF165 kullanılarak melatoninin anjiyogenez üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. BS-1' in histokimyasal analizi, 3. güne kadar melatonin ile tedavi edilen gruptaki yara bölgesinde yeni kan damarı oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını göstermiştir. Bununla birlikte, diğer tüm zaman noktalarında, melatonin grubunda kan damarı oluşumunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. VEGF165 protein seviyeleri, Western blot analizi ile değerlendirilmiş melatonin ile tedavi edilen grupta tedavi edilmeyen kontrol grubuna kıyasla anlamlı artışlar gözlenmiştir. Sonuç olarak, melatonin tedavisinin anjiyogenik süreci hızlandığı, yeni kan damarlarının oluşumunu arttırdığı ve VEGF seviyesini yükselttiği belirtilmiştir (19).

Soybir ve ark. 100 adet Wistar Albino ratta yaptıkları çalışmada melatoninin yara iyileşmesindeki anjiyogenez üzerine etkilerini araştırmışlardır. Ratlar iki gruba ayrılmış çalışma grubuna günlük 0.4 mg/kg melatonin sistemik olarak % 0.9 NaCl içerisinde çözülmüş halde, kontrol grubuna ise yalnızca % 0.9 NaCl uygulanmıştır.

Melatonin ve NaCl enjeksiyonlarına, cilt insizyonu yapılmadan hemen önce deneyin ilk gününde başlanmış ve eksizyonel biyopsilerin yapıldığı güne kadar devam edilmiştir. İlk enjeksiyonlar uygulandıktan sonra 5 cm boyutunda cilt insizyonu yapılmış, postoperatif 3., 7., 10., 14. ve 21. günlerde iyileşme dokularından eksizyonel biyopsiler alınmıştır. Anjiyogenez iyileşen dokulardaki yeni oluşan damar sayısı ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Tüm günlerde neovaskülarizasyon ve damar sayısı çalışma grubunda kontrol grubuna göre belirgin bir artış göstermiş, 21. günde melatonin grubunda görülen yeni damar sayısının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Çalışmanın sonucunda melatoninin hem anjiyogenez hem de yara iyileşmesi üzerinde olumlu bir etkisi olabileceği belirtilmiştir (186).

Ramirez-Fernandez ve ark. yaptıkları çalışmada melatoninin kemik defekti onarımı sırasındaki anjiyogenez üzerine etkilerini radyolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler ile araştırmışlardır. Değerlendirme için 20 adet Yeni Zelanda tavşanının tibialarının proksimal metafizlerine 2 adet kemik defekti oluşturulmuş ve defektlerden birine 1.2 mg liyofilize melatonin yerleştirilmiş; diğeri ise kontrol amacıyla boş bırakılmıştır. Cerrahiyi takiben, denekler sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 hafta sonra beşli gruplar halinde öldürülmüştür. Çalışmanın sonucunda, cerrahi girişimden sonraki 1. ve 2. haftada melatonin uygulanan grupta damar sayısının kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı ve bu hızlanan anjiyogenik etkilerin kemik hücresi çoğalmasını arttırabileceği bildirilmiştir (156).

Melatoninin, VEGF ekspresyonunun artması yoluyla anjiyogenezisi arttırdığı görülmektedir. Bununla birlikte, Dai ve ark. kanser hastalarında melatoninin neoplastik büyüme sırasında VEGF salgılanmasını azaltarak anjiyogenezisi engellediğini bildiren bir çalışma rapor etmişlerdir. Bu durum melatoninin kanser proliferasyonunun önlenmesi sırasında bir antianjiyogenik ajan gibi davrandığını göstermiştir (267). Melatoninin antikanser aktivitesi; immünomodülatör, antiproliferatif ve antioksidatif etkilerinden kaynaklanmaktadır. Melatoninin etkilerinin geniş spektrumu nedeniyle, tümör büyümesine karşı koyma yeteneğinde yer alabilecek mekanizmalar çeşitlidir. Melatoninin, tümör büyümesi ve yayılmasından sorumlu büyük bir biyolojik mekanizma olan anjiyogenez üzerindeki olası etkisi hakkında doğrudan bir veri yoktur. Bununla birlikte melatoninin, tümör hücrelerinde, hipoksiye bağlı faktör (HIF-1) aktivitesini baskılayarak VEGF ekspresyonunda azalmaya yol açtığı böylece tümör anjiyogenezisinin supresyonunda önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (268).

Cui ve ark. melatonin etkisinin hücre tipine, hücrenin fonksiyonel durumuna ve uygulanan melatonin konsantrasyonu gibi faktörlere bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (269).

Yara iyileşmesi biyolojik olarak, enflamatuar, proliferatif ve yeniden şekillenme olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir. Anjiyogenez, yara iyileşme sürecinin önemli bir parçası olan proliferatif aşamada meydana gelir. Fibroblastlar, anjiyogenez sırasında neovaskülarizasyonu sağlayan endotelial hücrelerinin kaynağı olarak işlev görür. Endotel hücreleri yeni kan damarı oluşumu sırasında çoğalır, göç eder ve yeni damar oluşumunu gerçekleştirirler. Bu yeni damarlar yoluyla yeni oluşan dokuya besin maddeleri ve oksijen sağlanır. Anjiyogenezin, biyolojik olarak aktif ve bilinen en güçlü anjiyogenik protein olan VEGF başta olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri tarafından başlatıldığı ve yönlendirildiği bilinmektedir (270). Normal yara iyileşmesi sırasında, 3. günde yeni kan damarı oluşumu başlar ve 7. günde zirve yapar. Bu durum granülasyon dokusu oluşumu için gereklidir (271). Kemik iyileşmesi, kemik dokularının remodellingini içeren doğal bir yara iyileşmesi olup, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, kan dolaşımı ve matriksin yeniden modellenmesini içeren karmaşık aşamalardan oluşan bir süreçtir. Anjiyogenez kemik iyileşmesi için de en önemli süreçlerden biridir (156), (272). Vasküler endotel hücreleri için oldukça spesifik bir mitojen olan VEGF endotel hücrelerinde proliferasyonu sağlar, hücrelerdeki migrasyonu kolaylaştırır ve hücre apoptozunu engeller. İn vivo çalışmalarda VEGF' nin kan damarlarındaki geçirgenliği artırmasının yanı sıra anjiyogenezi indükleyerek anjiyogenez regülasyonunda primer rol oynadığı görülmüştür (273). Çalışmalarda, VEGF' nin yapısal olarak bozulduğu veya üretiminin azaldığı durumlarda, yara iyileşmesinde bozulmalar ve VEGF' yi nötralize eden antikorların kullanıldığı durumlarda ise yara iyileşmesinde belirgin bir düşüş görüldüğü bildirilmiştir (274). Son zamanlarda, osteogenez ve kemik onarım süreçlerinde anjiyogenezin önemi daha ayrıntılı olarak araştırılmış ve kemik iliğinin yeni damarlar tarafından penetrasyonunun, anjiyogenik ve osteogenik hücrelerin تنها alanlara göç etmesine izin verdiği gösterilmiştir (275). Yamada ve ark. anjiyogenezin osteogenezde önemli bir faktör olduğunu ve kemik dokusu yenilenmesini artırabileceğini bildirmişleridir (272). VEGF osteoblast farklılaşmasını arttırdığı için osteogenez sırasında kemik oluşumu ve onarımında önemli rol oynar (276). Bizim çalışmamızda da bu literatür verileri ışığında yeni kan damarlarının oluşumu ve iyileşmenin değerlendirilebilmesi amacıyla immünohistokimyasal incelemeler ile VEGF

değerlerine bakıldı. Bifosfonatların VEGF ve anjiyopietin-1 üzerinde inhibisyona sebep olduğu bilinmektedir. Bifosfonatlar ayrıca endotelial hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve hücrelerin ekstrasellüler matrikse bağlanmasını inhibe eder. Bu etkiler anjiyogenez baskılar ve yeni damar oluşumunu kesintiye uğratar. Bunun sonucunda kemik yenilenmesi önlenir ve lokal doku iyileşmesinde gecikmeler meydana gelir. Çalışmamızda melatoninin anjiyogenez üzerindeki olumlu etkilerinin BRONJ oluşum patogeneğinde önemli rol oynayan bu vasküler inhibisyonu engelleyeceğinin düşünülmesi sebebiyle immünohistokimyasal olarak VEGF değerleri incelendi. BİF grubunda VEGF değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldı. BİF+LM ve BİF+SM grubundaki VEGF değerleri ise BİF grubuna göre anlamlı derecede artış gösterdi. Bu durum çekim soketlerinde iyileşme sırasında bifosfonatlar tarafından baskılanan anjiyogenezin melatonin tarafından indüklendiğini göstermektedir. Anjiyogenezdeki bu olumlu etkilerin yara iyileşmesini desteklediği ve dolayısıyla BRONJ oluşumunun önlenmesinde olumlu etkiler meydana getireceği düşünülmektedir. Çalışmamızda ulaşılan bu veriler literatür verileriyle uyumluluk göstermektedir.

Osteonekrozun teşhisinde kullanılan en önemli yöntemlerden biri histolojik incelemelerdir. Bifosfonat kullanan hastalarda oral bölgedeki cerrahi uygulamalardan kaçınılması gerekmekte ve bu durum kemik biyopsisini kontrendike hale getirmektedir. Bu sebeple yapılacak histolojik değerlendirmeler genellikle, kemik sekestri veya osteonekroz bölgesinin etrafından yüzeysel cerrahi debridman yapılarak elde edilen dokular üzerinden gerçekleştirilmektedir. Hayvan modelleri bu sorunu ortadan kaldırmakta ve klinik olarak gözlenebilen kemikle birlikte görülmeyen kısımların da incelenmesini histolojik olarak sağlayabilmektedir. Çalışmamızda da histolojik olarak çekim soketindeki yumuşak ve sert dokuların iyileşmesi değerlendirildi. Bu sebeple nekrotik osteositlerin (içi boş lakünaların) yoğunluğu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve epitelizasyon yönünden değerlendirmeler yapıldı.

Yapılan çalışmalarda, kemiğe bağlı halde bulunan (osteoklast yüzeylerinde depolanan) bifosfonatların pH değeri düştüğünde ortama geri salınarak osteoklast apoptozuna neden olabileceği bildirilmiştir. Otto ve ark. pH düştükçe hücresel düzeyde toksisitenin yükseldiğini ve ortam asiditesine bağlı hücresel toksisitede gözlenen artışın BRONJ gelişiminde olumsuz etkiler gösterebileceğini savunmuşlardır (241). Travma ya da inflamasyon durumunda asidifikasyon gerçekleşir ve pH değerlerinde düşüşler meydana gelir. Diş çekimini takiben oluşacak travma ve rezidüel alveol kemikteki

inflamasyona bağlı olarak geliŒecek asidifikasyon nedeniyle bağlı olduğu kemik dokudan ayrılarak ortama salınacak olan bifosfonat yumuŒak dokuda ve makrofajlar üzerinde toksisiteye neden olur. Bu durum osteonekroz alanları ve Şiddetli inflamasyonun meydana gelmesiyle sonuçlanır. BRONJ' un histolojik yapısı incelendiğinde kemik iliğinde fibrozisle birlikte akut-kronik inflamatuvar hücreler (223), plazma hücreleri ve eŒitli fungal-bakteriyal kolonizsyon grlmŒtr (58). Melatonin gl bir antioksidandır. Bu antioksidan aktivitesi serbest oksijen radikallerinin üretimine ve prooksidan enzimlerin aktivasyonuna sebebiyet veren bir süreç olan inflamasyonun baŒlaması ve ilerlemesi ile mücadele edebilir (167). Ayrıca melatoninin eŒitli adezyon moleküllerini, proteolitik enzimleri, sitokinleri (168), (169) ve inflamatuvar süreçte rol aldığı bilinen COX₂ enzimini inhibe ettiği bildirilmiŒtir (232), (261). Bu literatür verilerinden yola çıkılarak alıŒmamızda inflamasyonun değerlendirilmesi amacıyla inflamatuvar hücre infiltrasyonu incelendi. BİF grubunda inflamasyon değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artıŒ gösterdi. BİF+LM ve BİF+SM grubundaki inflamasyon değerleri ise BİF grubuna göre anlamlı derecede azalıŒ gösterdi. Bu durum melatonin uygulamasının inflamatuvar yanıtı azalttığını ortaya koydu. BİF+LM ve BİF+SM gruplarındaki inflamasyon Őiddetinin daha dŒk seviyeli oluŒu pH' ın asiditeye yönelmesini engelleyebilir. Böylece kemiğe depolanmıŒ olan bifosfonatın ortama tekrar salınımından kaynaklanan kollojen liflerde ve evre yumuŒak dokularda meydana gelen toksisitenin önlenmesi mümkün olabilir. Ayrıca melatoninin bu antiinflamatuvar ve analjezik etkisinin BRONJ tablosunda oluŒacak ağrıyı azaltmada yardımcı olabileceği dŒnld. alıŒmamızda ulaŒtıđımız sonuçlar literatür verileriyle paralellik göstermektedir.

DiŒ çekimini takiben rezidüel alveol kemiğinden inflamasyon nedeniyle ortama salınacak olan bifosfonatın yumuŒak dokuda toksisiteye ve osteonekroz alanlarına sebep olması beklenmektedir. Vasconcelos ve ark., BRONJ oluŒumunu zoledronik asit ve diŒ çekimi ile indükledikleri rat modelini histolojik olarak deđerlendirmiŒler, zoledronik asit verilen gruptaki deneklerde nekroz gözlenirken kontrol grubunda nekroza rastlanmadığını bildirmiŒlerdir (221). Farklı alıŒmalarda zoledronik asit uygulanan hayvanlarda diŒ çekimi gerekleŒtirilmiŒ ve histolojik incelemelerde osteonekroz bulgularına rastlanılmıŒtır. alıŒmamızda yapılan histolojik incelemeler sonucunda, diŒ çekimine ek olarak zoledronik asitin uygulandığı BİF grubunda meydana gelen osteonekroz, hiçbir medikal ajan uygulanmadan yalnızca diŒ çekilen kontrol grubuna

göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu sonuç, zoledronik asit kullanımı sonrasında BRONJ gelişiminde diş çekiminin yeterli bir risk faktörü oluşturabileceğini gösteren literatür verileriyle uyumluluk gösterdi (97). Osteonekrozun BİF+SM ve BİF+LM gruplarında BİF grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Bu durumun melatoninin, yeni kemik oluşumunu ve anjiyogenezi arttırması sonucu görülen iyileşme üzerindeki pozitif etkilerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte osteonekroz değerleri BİF+LM ve BİF+SM gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Çalışmamızda lokal melatonin tek doz, sistemik melatonin ise yalnızca diş çekiminden sonraki postoperatif dönemde uygulanmıştır. Melatoninin tekrarlayan lokal dozlarının ve bifosfonat ile eş zamanlı başlayarak daha uzun sürelerde kullanılan sistemik uygulamalarının oluşan bu osteonekroz tablosu üzerinde daha olumlu sonuçlar göstereceği düşünülmektedir.

Epitelizasyon sırasında epitel hücrelerinin yaranın periferinden merkezine doğru göç ederek yara kapanmasını gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Yara iyileşmesindeki epitelizasyon fazının çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve hücre döngüsü regülatörlerinin kompleks etkileşimi ile gerçekleştiği ve epitelizasyonun tam olarak 3 ila 4 hafta arasında tamamlandığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bifosfonatların hem epitel hücreleri üzerinde direkt sitotoksik etkiye sahip olduğu hem de epitelyal büyüme faktörü üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir (98), (277). Kobayashi ve ark. yaptıkları çalışmada zoledronik asitin diş socketinin kapatılması için önemli bir adım olan oral epitel hücrelerinin socket marjına göçünü önlediğini (217), Bauss ve ark. ise yüksek dozda lokal bifosfonat uygulanmasının oral epiteldeki toksik etkiyi arttırdığını bildirmişlerdir (278). Çalışmamızın sonucunda bu literatür verilerine paralel olarak BİF grubundaki epitelizasyon değerlerinde anlamlı oranda düşüş gözlemlendi. Bununla birlikte çalışmamızda bulunan BİF+LM grubundaki epitelizasyon değerlerinin BİF grubuna göre anlamlı derecede yüksek olması lokal melatonin uygulamasının zoledronik asitin neden olduğu epitelyal hasarı önlemede olumlu sonuçlar gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Melatoninin hem anjiyogenezi dolayısıyla iyileşmeyi arttırması hem de hücreler üzerinde sitoprotektif etkiler göstermesi sayesinde epitel hücrelerindeki bu olumlu sonuçları sağladığı düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızda BİF+LM grubundaki epitelizasyon değerlerinin BİF+SM grubuna göre de anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu. Bu durumun lokal uygulama sırasında epitel doku ile temas halinde bulunan melatoninin liyofilize yapısı sayesinde socket çevresindeki bu dokulara kolaylıkla diffüze

olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ancak literatürde bu durumu tam olarak açıklayacak veriler bulunmadığından konuyla ilgili moleküler mekanizmanın ve nicel analizlerin yer aldığı klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürde bifosfonata bağlı kemik nekrozu üzerinde melatoninin iyileştirici etkisinin incelendiği in vivo çalışma bulunmamaktadır. Ancak bifosfonat uygulanan osteoblast, MSC ve periodontal ligament hücreleri gibi farklı hücre kültürlerinde melatoninin sitoprotektif etkisi üzerine yapılan in vitro çalışmalar mevcuttur. Bizim çalışmamızda da bu literatür verileri temel alındı.

Camacho-Alonso ve ark. yaptıkları çalışmada melatoninin zoledronik asit ile tedavi edilen insan osteoblast hücreleri üzerindeki sitoprotektif etkilerini değerlendirmişlerdir. Bunun için osteoblast hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonda farklı dozlarda zoledronik asit (1, 5, 10, 50, 100 ve 300 mikromolar) ve melatonin (1, 10, 50, 100 ve 200 mikromolar) uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda yazarlar melatoninin, zoledronik asit ile tedavi edilen insan osteoblastları üzerinde sitoprotektif bir etkiye sahip olduğunu ve BRONJ riski olan hastalar için umut verici bir koruyucu alternatif olabileceğini bildirmişlerdir (196).

Rodriguez-Lozano ve ark. yaptıkları çalışmada, melatoninin farklı kaynaklardan elde edilmiş ve zoledronik asit uygulanmış insan MSC' leri üzerindeki olası sitoprotektif etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu amaçla periodontal ligament ve kemik iliğinden elde ettikleri insan MSC' lerine 72 saat boyunca farklı dozlarda zoledronik asit, melatonin ve zoledronik asit + melatonin uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda, kemik iliği kök hücrelerinin periodontal ligament kök hücrelerine göre daha yüksek zoledronik asit direnci gösterdiği görülmüştür. Özellikle, yüksek konsantrasyonlardaki zoledronik asit her iki hücre türünde de hücre sayısını önemli ölçüde azaltmıştır. Zoledronik asit ve melatoninin eş zamanlı tedavisinden sonra periodontal ligament ve kemik iliği kök hücreleri farklı davranışlar göstermişlerdir. Zoledronik asit uygulanan periodontal ligament kök hücrelerinin proliferasyonlarını önemli ölçüde arttırmak için yüksek dozlarda melatonin gerekliyken, daha düşük melatonin konsantrasyonlarının kemik iliği kök hücrelerinin proliferasyonunu arttırmak için yeterli olduğu bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda melatoninin zoledronik asit ile tedavi edilen periodontal ligament ve kemik iliği kök hücreleri üzerinde sitoprotektif bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Yazarlar bifosfonat tedavisi ile kombinasyon halinde melatonin gibi sitoprotektif ajanların klinik kullanımının, BRONJ gibi klinik komplikasyonlardan

kaçınmak için umut verici bir terapötik alternatif olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca BRONJ oluşum riskini azaltmak amacıyla bifosfonat uygulanırken, uygulama sonrasındaki uzun yarı ömrünü kapsayan süre boyunca ve BRONJ riskini artırıcı durumların mevcudiyetinde de (örneğin diş çekimi) önleyici ajanların kullanılabilceğini önermişlerdir (197).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Lokal ve sistemik melatonin uygulamasının, zoledronik asit ve diş çekimine bağlı gelişen çene osteonekrozu üzerindeki iyileştirici etkisinin incelendiği bu çalışmada bulguların değerlendirilmesi ile şu sonuçlara varıldı:

- BRONJ en sık; zoledronik asit kullanımında, diş çekimi gibi invaziv cerrahi girişimlerin uygulandığı durumlarda ve mandibular kemikte görülmektedir. Çalışmamız bu özelliklerin tümünü taşımaktadır. Çalışmamızda kullanılan BRONJ rat modelinin histolojik sonuçları deneklerde osteonekroz geliştiğini göstermektedir. Bu sebeple çalışmamızdaki rat modeli BRONJ patofizyolojisi ve tedavisiyle ilgili çalışmalarda uygulanabilecek güvenilir bir yöntemdir.
- Literatürde melatonin uygulamasının, diş çekimi ile indüklenen BRONJ modeli üzerindeki etkilerini değerlendiren herhangi bir in vivo çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız, bu açıdan bir ilk niteliğindedir.
- Çalışmamızda, BRONJ' un tedavisine yönelik başka herhangi bir konservatif veya cerrahi girişim uygulanmamıştır. Çalışmamızdan elde edilen, histopatolojik ve immunohistokimyasal veriler, melatonin uygulamasının çekim boşluğundaki yeni kemik oluşumunda artış ve nekrotik kemik miktarında azalma sağlaması sayesinde, zoledronik asitin neden olduğu olumsuz etkileri geriye çevirebileceğini göstermiştir. Melatonin uygulamasının kemik iyileşmesi üzerinde gösterdiği bu olumlu etkilerin ekstraselüler matriks proteinlerinde ve anjiyogeneziste görülen artışa bağlı olduğu düşünülmektedir.
- Histolojik incelemeler sonucunda zoledronik asit uygulamasının epitelizasyonu azalttığı, inflamasyon ve nekrotik kemik miktarını ise arttırdığı görülmüştür. Uygulanan melatoninin zoledronik asitin sebep olduğu bu olumsuz etkileri önlediği; epitelizasyonu arttırdığı, inflamasyonu ve nekrotik kemik oluşumunu ise azalttığı gösterilmiştir. Uygun doz ve konsantrasyonda melatonin uygulamasının, BRONJ meydana gelmiş olan bireylerde kemik ve yara iyileşmesini hızlandırabilecek tedavi seçeneği olabileceği sonucuna varılmıştır.
- İmmünohistokimyasal inceleme sonucunda osteokalsin ve VEGF düzeyi, yalnızca zoledronik asitin uygulandığı hastalık grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ayrıca lokal ve sistemik melatonin

uygulanan gruplarda diğer gruplara göre daha fazla osteokalsin ve VEGF retimi olduğu görülmüştür. Bu durum zoledronik asit uygulanmış deneklerde melatonin uygulamasının, osteokalsin ve VEGF immünreaktivitesini artırarak yeni kemik oluşumu ve iyileşmeyi hızlandırabileceğini göstermektedir.

- Bu çalışmada melatoninin çekim soket iyileşmesini hangi mekanizma ile hızlandırdığı tam olarak açıklanamamıştır. Melatonin uygulamasının etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılması için daha ileri çalışmaların planlanması gerektiği düşünülmektedir.
- Sonuç olarak melatoninin, BRONJ' un sebep olduğu olumsuz etkileri azaltabilecek umut vadeden bir ajan olduğu ve bu amaçla kullanılacak melatonin içerikli yeni ürünlerin üretiminin ileriye yönelik klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Farina R, Trombelli L. Wound healing of extraction sockets. *Endod Topics* 2011, 25(1): 16-43.
2. Jaafar N, Nor GM. The prevalence of post-extraction complications in an outpatient dental clinic in Kuala Lumpur Malaysia--a retrospective survey. *Singapore Dent J* 2000, 23(1): 24-8.
3. O'Ryan FS, Lo JC. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure: clinical course and outcomes. *J Oral Maxillofac Surg* 2012, 70(8): 1844-53.
4. Ozkan A, Bayar GR, Altug HA, Sencimen M, Dogan N, Gunaydin Y, Ergodan E. The effect of cigarette smoking on the healing of extraction sockets: an immunohistochemical study. *J Craniofac Surg* 2014, 25(4): e397-402.
5. Kuroshima S, Kovacic BL, Kozloff KM, McCauley LK, Yamashita J. (2013). Intra-oral PTH administration promotes tooth extraction socket healing. *J Dent Res* 2013, 92(6): 553-9.
6. Scoletta M, Arduino PG, Reggio L, Dalmaso P, Mozzati M. Effect of low-level laser irradiation on bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: preliminary results of a prospective study. *Photomed Laser Surg* 2010, 28(2): 179-84.
7. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Russell RGG, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998, 13(4): 581-9.
8. Maurer P, Sandulescu T, Kriwalsky MS, Rashad A, Hollstein S, Stricker I, Hölzle F, Kunkel M. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the maxilla and sinusitis maxillaris. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2011, 40(3): 285-91.
9. Shannon J, Shannon J, Modelevsky S, Grippo AA. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *J Am Geriatr Soc*, 2011, 59(12): 2350-55.
10. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*, 2003, 61: 1115.

11. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2009 May; 67(5 Suppl): 2–12.
12. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2014, 72(10): 1938–56.
13. McLeod NM, Brennan PA, Ruggiero SL. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw: a historical and contemporary review. *The Surgeon* 2012, 10(1): 36-42.
14. Brozoski MA, Lemos CA, Da MGNH, Deboni MC. Adjuvant aqueous ozone in the treatment of bisphosphonate induced necrosis of the jaws: report of two cases and long-term follow-up. *J Minerva Stomatol* 2014, 63(1-2): 35-41.
15. Vescovi P, Campisi G, Fusco V, Mergoni G, Manfredi M, Merigo E, Solazzo L, Gabriele M, Gaeta GM, Favia G, Peluso F, Colella G. 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* 2011, 47(3): 191-4.
16. Reiter, RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res* 1993, 26(11): 1141-55.
17. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997, 336(3): 186-95.
18. Chava VK, Sirisha K. Melatonin: a novel indolamine in oral health and disease. *Int J Den*, 2012: 720185.
19. Pugazhenthii K, Kapoor M, Clarkson AN, Hall I, Appleton I. (2008). Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. *J Pineal Res* 2008, 44(4): 387-96.
20. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau, KHW. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002, 17(7): 1219-29.
21. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 2003, 34(2): 81-7.

22. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999, 274(31): 22041-7.
23. Koloğlu S. *Osteoporoz*, 1. Baskı. Ankara, Ajans-Türk ve Basım AŞ, 1998: 1-12.
24. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Inves* 1983, 72(4): 1396-1409.
25. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*, 10th ed. New York, McGraw-Hill Professional Publishing, 2003: 141-59.
26. Akay MT. *Genel Histoloji*, 6. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006: 147-73.
27. Ten CA. *Oral Histology, Development, Structure and Function*, 4th ed. New York, The C.V Mosby Company, 1984: 123-34.
28. Özer T. Deneysel Kemik Defektlerinde Lokal Olarak Uygulanan Alendronatın İyileşme Üzerine Etkilerinin Histomorfometrik ve Radyolojik Yöntemler İle İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş ve Çene Çerrahisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2017.
29. Gartner LP, Hiatt JL. *Electronic image collection for color textbook of histology*, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 2001: 129-55.
30. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 4th ed. Philadelphia, Elsevier, 2016: 145-79.
31. Li Z, Kong K, Qi W. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 343(2): 345-50.
32. Eşrefoğlu M. *Genel Histoloji*. 1. ed. Malatya, Medipress Matbaacılık Yayıncılık Ltd., 2009: 169-88.
33. Lee WSS, Cowin SC. *Integrated bone tissue physiology: Anatomy and physiology*. Bone Mechanics Handbook, 2nd ed. Florida: CRC press, 2001: 1-68.
34. Çay HF, Sezer N. Kemik yapısı ve kemik döngüsü üzerine bir derleme. *Fiziksel Tıp* 2002, 5(3): 177-84.
35. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1092(1): 385-96.
36. Erol M, Atalan G, Eol H, Doğan Z, Yönez MK. Kırık İyileşmesinde Non-Steroidil Antiinflatuar İlaçların Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences* 2014, 5(2): 85-90.

37. Chow JWM, Fox SW, Lean JM, Chambers TJ. Role of nitric oxide and prostaglandins in mechanically induced bone formation. *J Bone Miner Res* 1998, 13(6): 1039-44.
38. Price JS, Oyajobi BO, Russell RG. The cell biology of bone growth. *Eur J Clin Nutr* 1994, 48: S131-49.
39. Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 2005, 187(3): 311-25.
40. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003, 423(6937): 337-42.
41. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 2002, 57: 385-410.”
42. Tetik A. Terapötik Düzeyde Warfarin Sodyum Uygulanan Sıçanlarda Diş Çekimi Sonrası Ankaferd Blood Stopper Uygulamasının Yara ve Kemik Doku İyileşmesi Üzerine Etkisinin Histopatolojik ve Histomorfometrik Olarak Tespiti. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, 2012.
43. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Clinical Periodontology* 10th ed. Philadelphia 2006.
44. Özkorkmaz EG, Özay Y. Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinde kullanılan bazı bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2009, 2(2): 63-7.
45. Larjava H. Oral Wound Healing: An overview. In: John Wiley & Sons (ed). *Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management*, 1st ed. Chichester, Blackwell Publishing, 2012: p.81-175.
46. Çakır M, Karaca İR. İmplant Uygulamaları İçin Kret Koruma Teknikleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2015, 25(1): 107-18.
47. Özkan S. Tam Gömük 20 yaş dişlerinin ekstraksiyon yaralarının postoperatif 3. Ve 7. Günde değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, İzmir: Ege Üniversitesi, 2000.
48. Russell RGG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 2011, 49(1): 2-19.
49. Russell RGG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann UDO, Kwaasi A, Hulley PA, Kavanagh KL, Triffitt JT, Lundy MW, Phipps RJ, Barnett BL, Coxon FP, Rogers MJ, Watts NB, Ebetino FH. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1117(1): 209-57.

50. Fleisch HA, Russell RGG, Bisaz S, Mühlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* 1970, 1(1): 12-8.”
51. Reid IR. Anti-resorptive therapies for osteoporosis. *Semin Cell Dev Biol* 2008, 19(5): 473-78.
52. Smith R, Russell RGG, Bishop M. Diphosphonates and Paget's disease of bone. *The Lancet* 1971, 297(7706): 945-47.
53. Minaire P, Depassio J, Berard E, Meunier PJ, Edouard C, Pilonchery G, Goedert G. Effects of clodronate on immobilization bone loss. *Bone* 1987, 8: S63-8.
54. Marx RE. Oral & Intravenous Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws: History, Etiology, Prevention, and Treatment. *Quintessence Pub Inc* 2007, 56: 45-8.
55. Gómez RF, Martínez MG, Olmos JM. Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008, 13(5), E318-24.
56. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998, 19(1): 80-100.
57. Russell RGG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999, 25(1): 97-106.
58. Soydan SS, Veziroğlu Şenel F, Araz K. Bisfosfonata bağlı olarak çene kemiklerinde gelişen osteonekrozun patogenezi ve tedavisi. *Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2009, 33(3) 61-8.
59. Lacy CF, Armstrong LL, Goldman MP, Lance LL. *Drug Information Handbook* 2003, Lexi-comp. Inc P: 53-4.
60. Bartl R, Frisch B, Tresckow BC. Bisphosphonates in medical practice. actions–side effects–indications–strategies. *In Berlin Heidelberg: Springer-Verlag* 2007, 56(9): 191-9.
61. Widler L, Jahnke WR, Green J. The chemistry of bisphosphonates: from antiscaling agents to clinical therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem* 2012, 12(2): 95-101.
62. De Rosa G, Misso G, Salzano G, Caraglia M. Bisphosphonates and cancer: what opportunities from nanotechnology?. *J Drug Deliv*, 2013: 637976.

63. McLeod NMH, Davies BJB, Brennan PA. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaws; an increasing problem for the dental practitioner. *Br Dent J* 2007, 203(11): 641-4.
64. Wang HL, Weber D, McCauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: literature review and a case report. *J Periodontol* 2007, 78(3): 584-94.
65. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami HA, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer* 2001, 84(8): 1126-34.
66. Leu CT, Luegmayr E, Freedman LP, Rodan GA, Reszka AA. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. *Bone* 2006, 38(5): 628-36.
67. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000, 88(S12): 2961-78.
68. Bryson JE, Gourlay ML. Bisphosphonate use in acute and chronic spinal cord injury: a systematic review. *J Spinal Cord Med* 2009, 32(3): 215-25.
69. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004, 62(5): 527-34.
70. 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* 2005, 50: S4-S4.
71. Marini JC. Do bisphosphonates make children's bones better or brittle?. *N Engl J Med* 2003, 349(5): 423-26.
72. Berenson JR. Recommendations for zoledronic acid treatment of patients with bone metastases. *Oncologist* 2005, 10(1): 52-62.
73. Mystakidou K, Katsouda E, Stathopoulou E, Vlahos L. Approaches to managing bone metastases from breast cancer: the role of bisphosphonates. *Cancer Treat Rev* 2005, 31(4): 303-11.
74. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc* 2005, 136(12): 1658-68.

75. Daroszewska A, Ralston SH. Genetics of Paget's disease of bone. *Clinical Science* 2005, 109(3): 257-63.
76. Fleisch H. *Bisphosphonates in Bone Disease*, 4th ed. USA, Academic Press 2000, 27-51, 123-52, 168-75.
77. Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 2004, 9: 3-13.”
78. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, Garrett-Sinha L, Raghavan S. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg* 2008, 66(5), 839-47.
79. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 302(3): 1055-61.
80. Polascik TJ. Bisphosphonates in oncology: evidence for the prevention of skeletal events in patients with bone metastases. *Drug Des, Devel Ther* 2009, 3: 27-40.
81. Gnant M, Clézardin P. Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: a brief review of published literature. *Cancer Treat Rev* 2012, 38(5): 407-15.
82. Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem* 2005, 280(8): 7317-25.
83. Iwata K, Li J, Follet H, Phipps RJ, Burr DB. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. *Bone* 2006, 39(5): 1053-8.
84. Allen MR, Follet H, Khurana M, Sato M, Burr DB. Antiremodeling agents influence osteoblast activity differently in modeling and remodeling sites of canine rib. *Calcif Tissue Int* 2006, 79(4): 255-61.
85. 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 Endod* 2008, 106(1): 5-13.
86. Reid, I. R., Bolland, M. J., & Grey, A. B. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity?. *Bone* 2007, 42(3): 318-20.
87. Cryer B, Bauer DC. Oral bisphosphonates and upper gastrointestinal tract problems: what is the evidence? *Mayo Clin Proc* 2002, 77(10): 1031-43.

88. Malik AR, Campbell SH, Toma NMG. Bilateral acute anterior uveitis after alendronate. *Br J Ophthalmol* 2002, 86(12): 1443.
89. Pazianas M, Cooper C, Wang Y, Lange JL, Russell RGG. Atrial fibrillation and the use of oral bisphosphonates. *Ther Clin Risk Manag* 2011, 7: 131-144.
90. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005, 63(11): 1567-75.
91. Tanvetyanon T, Stiff PJ. Management of the adverse effects associated with intravenous bisphosphonates. *Ann Oncology* 2006, 17(6): 897-907.
92. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Van Poznak CH, Watts N, Woo S, Shane E. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2007, 22(10): 1479-91.
93. 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* 2009, 67(1), 159-61.
94. Marx RE, Stern D. *Oral and maxillofacial pathology: a rationale for diagnosis and treatment*, 2nd ed. Hanover Park, IL: Quintessence Publishing, 2012.
95. Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farre M, Diez A, Marinoso ML, Carbonell L, Nogues X, Ballester J, Aubia J. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 1998, 22(3): 233-9.
96. Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, Kikuri T, Hasegawa T, Tei K, Shinoda H, Suzuki K, Kitagawa Y. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264. 7 cells. *Int J Mol Med* 2012, 29(6): 1007-15.
97. Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck* 2011, 33(2), 199-207.
98. Pazianas M. Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. *J Natl Cancer Inst* 2011, 103(3), 232-40.

99. Acil Y, Möller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wiltfang J, Simon MJK. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofacial Surg* 2012, 40(8), e229-35.
100. Durie BG. Use of bisphosphonates in multiple myeloma: IMWG response to Mayo Clinic consensus statement. *Mayo Clin Proc* 2007, 82(4): 516-7.
101. Silverman SL, Landesberg R. Osteonecrosis of the jaw and the role of bisphosphonates: a critical review. *Am J Med* 2009, 122(2), S33-45.
102. Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, Nooka A, Sayegh G, Guarneri V, Desrouleaux K, Cui J, Adamus A, Gagel RF, Hortobagyi GN. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2008, 23(6): 826-36.
103. Jadu F, Lee L, Pharoah M, Reece D, Wang L. A retrospective study assessing the incidence, risk factors and comorbidities of pamidronate-related necrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Ann Oncol* 2007, 18(12): 2015-19.
104. Di Fede O, Fusco V, Matranga D, Solazzo L, Gabriele M, Gaeta GM, Favia G, Sprini D, Peluso F, Colella G, Vescovi P, Campisi G. Osteonecrosis of the jaws in patients assuming oral bisphosphonates for osteoporosis: a retrospective multi-hospital-based study of 87 Italian cases. *Eur J Intern Med* 2013, 24(8): 784-90.
105. Otto S, Schreyer C, Hafner S, Mast G, Ehrenfeld M, Stürzenbaum S, Pautke C. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg* 2012, 40(4): 303-9.
106. Mast G, Otto S, Mücke T, Schreyer C, Bissinger O, Kolk A, Wolff KD, Ehrenfeld M, Stürzenbaum SR, Pautke, C. (2012). Incidence of maxillary sinusitis and oro-antral fistulae in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg* 2012, 40(7): 568-71.
107. Saldanha S, Shenoy VK, Eachampati P, Uppal N. Dental implications of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Gerodontology* 2012, 29(3): 177-87.
108. Vescovi P, Nammour S. Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ) therapy. A critical review. *Minerva Stomatol* 2010, 59(4): 181-203.”

109. Flichy-Fernández AJ, Alegre-Domingo T, González-Lemonnier S, Balaguer-Martínez J, Peñarrocha-Diago M, Jiménez-Soriano Y, Penarrocha-Diago D, Bagán-Sebastián JV. Study of serum CTX in 50 oral surgical patients treated with oral bisphosphonates. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012, 17(3): e367-70.
110. Zafeirakis A. Collagenous and non-collagenous biochemical markers of bone metastases from prostate cancer. *Hippokratia* 2010, 14(3): 164-9.
111. Favia G, Pilolli GP, Maiorano E. Osteonecrosis of the jaw correlated to bisphosphonate therapy in non-oncologic patients: clinicopathological features of 24 patients. *J Rheumatol* 2009, 36(12): 2780-7.
112. Bianchi SD, Scoletta M, Cassione FB, Migliaretti G, Mozzati M. Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007, 104(2): 249-58.
113. Ruggiero SL, Mehrotra B. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: diagnosis, prevention, and management. *Annu Rev Med* 2009, 60: 85-96.
114. Dello RN, Jeffcoat MK, Marx RE, Fugazzotto P. Osteonecrosis in the jaws of patients who are using oral bisphosphonates to treat osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007, 22(1): 146-53.
115. Otto S. Adjuvant Treatment Options in the Management of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. In: Vescovi P, Manfredi M, Merigo E (eds). *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws*, 1 ed. Berlin, 2015, Berlin, Springer, 2015: pp103-9.
116. Boykin JrJV, Baylis C. Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study. *Adv Skin Wound Care* 2007, 20(7): 382-8.
117. Carter G, Goss AN, Doecke C. Bisphosphonates and avascular necrosis of the jaw: a possible association. *Med J Aust* 2005, 182(8): 413-5.
118. Agrillo A, Petrucci MT, Tedaldi M, Mustazza MC, Marino SMF, Gallucci C, Iannetti G. New therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaws. *J Craniofac Surg* 2006, 17(6): 1080-3.
119. Clavo B, Catalá L, Pérez JL, Rodríguez V, Robaina F. Ozone therapy on cerebral blood flow: a preliminary report. *Evid Based Complement Alternat Med* 2004, 1(3): 315-9.

120. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam, M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatologic Surgery* 2005, 31(3): 334-40.
121. Adornato MC, Morcos I, Rozanski J. The treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws with bone resection and autologous platelet-derived growth factors. *J Am Dent Assoc* 2007, 138(7): 971-7.
122. Chan HL, McCauley LK. Parathyroid hormone applications in the craniofacial skeleton. *J Dent Res* 2013, 92(1): 18-25.
123. Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Fornaini C, Nammour S, Mergoni G, Sarraj A, Bagan JV. Conservative surgical management of stage I bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Dent* 2014: 107690.
124. Delanian S, Porcher R, Rudant J, Lefaix JL. Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* 2005, 23(34): 8570-9.
125. Epstein MS, Wicknick FW, Epstein JB, Berenson JR, Gorsky M. Management of bisphosphonate-associated osteonecrosis: pentoxifylline and tocopherol in addition to antimicrobial therapy. An initial case series. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010, 110(5): 593-6.
126. Erlich SS, Apuzzo ML. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J Neurosurg* 1985, 63(3): 321-41.
127. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. *J Periodontol* 2007, 78(6): 1094-102.
128. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958, 80(10): 2587-2587.
129. Mutalik S, Tadinada A. Prevalence of pineal gland calcification as an incidental finding in patients referred for implant dental therapy. *Imaging Sci Dent* 2017, 47(3): 175-80.
130. Reiter RJ. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat* 1981, 162(4): 287-313.
131. Norton NS. *Netter's Head and Neck Anatomy for Dentistry*. 2nd ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2012.

132. Tharnpanich T, Johns J, Subongkot S, Johns NP, Kitkhuandee A, Toomsan Y, Luengpailinc S. Association between high pineal fluoride content and pineal calcification in a low fluoride area. *Fluoride* 2016, 49(2): 472-84.
133. Sumida M, Barkovich AJ, Newton TH. Development of the pineal gland: measurement with MR. *Am J Neuroradiol* 1996, 17(2): 233-6.
134. Møller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 2002, 309(1): 139-50.
135. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 2009, 81(3): 445-56.
136. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005, 9(1): 11-24.
137. Cagnacci A. Melatonin in relation to physiology in adult humans: Mini Review. *J Pineal Res* 1996, 21(4): 200-13.
138. Permuy M, López-Peña M, González-Cantalapiedra A, Muñoz F. Melatonin: A review of its potential functions and effects on dental diseases. *Int J Mol Sci* 2017, 18(4): 865-77.
139. Coomans CP, Ramkisoensing A, Meijer JH. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Front Neuroendocrinol* 2015, 37: 29-42.
140. Atasoy ÖB, Erbaş O. Melatonin hormonunun fizyolojik etkileri. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi* 2017, 3(1): 52-62.
141. Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Pain control by melatonin: Physiological and pharmacological effects. *Exp Ther Med* 2016, 12(4): 1963-68.
142. Watson RR. Melatonin time line: From discovery to therapy. In Chowdhury I, Maitra SK, Verster GC (eds) *Melatonin in the Promotion of Health*, 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, 2012: pp.1-60.
143. Arendt J. Melatonin, circadian rhythms, and sleep. *N Engl J Med* 2000, 343: 1114-6.
144. Baker J, Kimpinski K. Role of melatonin in blood pressure regulation: An adjunct anti-hypertensive agent. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2018, 45(8): 755-66.
145. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005, 27(2): 101-10.
146. Özçelik F, Erdem M, Bolu A, Gülsün M. Melatonin: Genel özellikleri ve psikiyatrik bozukluklardaki rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar* 2013, 5(2): 179-203.

147. Altun A, Ugur-Altun B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int J Clin Pract* 2007, 61(5): 835-45.
148. Seifert R. cCMP and cUMP: emerging second messengers. *Trends Biochem Sci* 2015, 40(1): 8-15.
149. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: nature's most versatile biological signal?. *FEBS J* 2006, 273(13): 2813-38.
150. Acuña-Castroviejo D. A new guest playing with bone and fat. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol* 2007, 292(6): R2206-7.
151. Inoh H, Kawakami N, Matsuyama Y, Aoki T, Kanemura T, Natsume N, Iwata H. Correlation between the age of pinealectomy and the development of scoliosis in chickens. *Spine* 2001, 26(9): 1014-21.
152. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni GJ. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000, 28(4): 193-202.
153. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, Nagayama M. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res* 2007, 42(3): 231-9.
154. Yonei Y, Hattori A, Tsutsui K, Okawa M, Ishizuka B. Effects of melatonin: basics studies and clinical applications. *Anti Aging Med* 2010, 7: 85-91.
155. Liu J, Huang F, He HW. Melatonin effects on hard tissues: bone and tooth. *Int J Mol Sci* 2013, 14(5): 10063-74.
156. Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, de-Val JEMS, Delgado-Ruiz RA, Negri B, Pardo-Zamora G, Penarrocha D, Barona C, Manuel-Granero J, Alcaraz-Baños M. Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects: a radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae. *Clin Oral Investig* 2013, 17(1): 147-58.
157. Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012, 14(2): 226-35.
158. Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. *J Mater Sci Mater Med* 2008, 19(8): 2949-52.

159. Collin-Osdoby P, Li L, Rothe L, Anderson F, Kirsch D, Oursler MJ, Osdoby P. Inhibition of avian osteoclast bone resorption by monoclonal antibody 121F: a mechanism involving the osteoclast free radical system. *J Bone Miner Res* 1998, 13(1): 67-78.
160. Çetin Altındal D. Kemik Doku Mühendisliği Yaklaşımında Melatoninin Rolü: İn Vitro Çalışmalar. Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı. Doktora tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2017.
161. Şener G. (2010). Karanlığın hormonu: melatonin. *Marmara Pharm J* 2010, 14(3): 112-20.
162. Bettahi I, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C. Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: A mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J Pineal Res* 1998, 25(1): 34-40.
163. Hotchkiss AK, Nelson RJ. Melatonin and immune function: hype or hypothesis?. *Critical Reviews™ in Immunology* 2002, 22(5-6): 351-71.
164. Miller SC, Pandi PS, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol* 2006, 87(2): 81-7.
165. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1997, 159(2): 574-81.
166. Borges LDS, Dermargos A, Junior EPDS, Weimann E, Lambertucci RH, Hatanaka E. Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. *J Pineal Res* 2015, 58(2): 166-72.
167. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 2013, 54(1): 1-14.
168. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *European Journal of Pharmacology* 2001, 426(1-2): 1-10.

169. Esposito E, Paterniti I, Mazzon E, Bramanti P, Cuzzocrea S. Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. *J Pineal Res* 2010, 49(4): 321-31.
170. Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 2005, 39(2): 99-104.
171. Mantovani, M, Kaster MP, Pertile R, Calixto JB, Rodrigues ALS, Santos AR. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. *J Pineal Res* 2006, 41(4): 382-9.
172. Mease, P. (2005). Fibromyalgia syndrome: review of clinical presentation, pathogenesis, outcome measures, and treatment. *J Rheumatol Suppl*, 75, 6-21.”
173. Wilhelmsen M, Amirian I, Reiter RJ, Rosenberg J, Gögenur I. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies. *J Pineal Res* 2011, 51(3): 270-7.
174. Mills E, Wu P, Seely D, Guyatt G. Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res* 2005, 39(4): 360-6.
175. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003, 17(2): 273-85.
176. Topal T, Öter S, Korkmaz A. Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi* 2009, 19(3): 137-43.
177. Sánchez-Hidalgo M, Lee M, de la Lastra CA, Guerrero JM, Packham G. Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines. *J Pineal Res* 2012, 53(4): 366-73.
178. Subramanian P, Mirunalini S, Dakshayani KB, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine. *J Pineal Res* 2007, 43(3): 305-12.
179. Watanabe M, Kobayashi Y, Takahashi N, Kiguchi K, Ishizuka B. Expression of melatonin receptor (MT1) and interaction between melatonin and estrogen in endometrial cancer cell line. *J Obstet Gynaecol Res* 2008, 34(4): 567-73.
180. Hansen J. Light at night, shiftwork, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93(20): 1513-5
181. Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin anticancer effects. *International J Mol Sci* 2013, 14(2): 2410-30.

182. Cos S, Mediavilla MD, Fernández R, González-Lamuño D, Sánchez-Barceló EJ. Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro?. *J Pineal Res* 2002, 32(2): 90-6.
183. Liu L, Xu Y, Reiter RJ. Melatonin inhibits the proliferation of human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone* 2013, 55(2): 432-8.
184. Vural P. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün Rolü. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2018, 16(1): 53-62.
185. Bayraktar B. Ratlarda deneysel serebral iskemi modelinde iskemi sonrası anjiogenetik faktör salınımı ve serebral anjiogenezise etkisinin değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nöroşirürji Dalı. Tıpta uzmanlık tezi, İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2010.
186. Soybir G, Topuzlu C, Odabaş Ö, Dolay K, Bilir A, Köksoy F. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. *Surg Today* 2003, 33(12): 896-901.
187. Kon K, Fujiwara T. Transformation of fibroblasts into endothelial cells during angiogenesis. *Cell Tissue Res* 1994, 278(3): 625-8.
188. Maestroni GJ. T-Helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res* 1995, 18(2), 84-9.
189. Acikan I, Mehmet GUL, Artas G, Yaman F, Deniz G, Bulmus O, Kom M, Kırtay M, Dundar, S. Systemic melatonin application increases bone formation in mandibular distraction osteogenesis. *Braz Oral Res* 2018, 32: e85-92.
190. Mias C, Trouche E, Seguelas MH, Calcagno F, Dignat-George F, Sabatier F, Daniel L, Bianchi P, Calise D, Bourin P, Parini A. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem Cells* 2008, 26(7): 1749-57.
191. Koneski F, Popovic-Monevska D, Gjorgoski I, Krajoska J, Popovska M, Muratovska I, Velickovski B, Petrushesvka G, Popovski, V. In vivo effects of geranylgeraniol on the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Craniomaxillofac Surg* 2018, 46(2): 230-6.
192. da Silva Brasilino M, Stringhetta-Garcia CT, Pereira CS, Pereira AAF, Stringhetta K, Leopoldino AM, Crivelini MM, Ervolino E, Dornelles RCM, Nakamune ACMS, Chaves-Neto, A. H. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves bone formation in the alveolar socket healing after tooth extraction in rats. *Clin Oral Investig* 2018, 22(3): 1449-61.

193. Parlakpınar H, Ozhan O, Ermis N, Vardi N, Cigremis Y, Tanriverdi LH, Colak C, Acet, A. Acute and subacute effects of low versus high doses of standardized Panax ginseng extract on the heart: an experimental study. *Cardiovasc Toxicol* 2019, 19(4): 306-20.
194. Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, Yoloğlu S. WSSPAS: An Interactive Web Application for Sample Size and Power Analysis with R Using Shiny. *Türkiye Klinikleri Biyoistatistik* 2018, 10(3): 224-46.
195. Koçer G, Nazıroğlu M, Övey İS, Öz A. Zoledronic acid, bevacizumab and dexamethasone-induced apoptosis, mitochondrial oxidative stress, and calcium signaling are decreased in human osteoblast-like cell line by selenium treatment. *Biol Trace Elem Res* 2018, 184(2): 358-68.
196. Camacho-Alonso F, Urrutia-Rodríguez I, Onate-Cabrerizo D, Oñate-Sánchez RE, Rodríguez-Lozano FJ. Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human osteoblasts. *J Craniomaxillofac Surg* 2017, 45(8): 1251-7.
197. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, de los Ángeles Ros-Roca M, del Carmen Algueró M, Onate-Sánchez RE, Camacho-Alonso F, Moraleda JM. Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human mesenchymal stem cells in vitro. *J Craniomaxillofac Surg* 2015, 43(6): 855-62.
198. Huebsch RF, Coleman RD, Frandsen AM, Becks H. The healing process following molar extraction. I. Normal male rats (long-evans strain). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1952, 5(8): 864-76.
199. Bodner L, Kaffe I, Cohen Z, Dayan D. Long-term effect of desalivation on extraction wound healing: a densitometric study in rats. *Dentomaxillofac Radiol* 1993, 22(4): 195-8.
200. Guglielmotti MB, Cabrini RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic, and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg* 1985, 43(5): 359-64.
201. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* 2005, 32(2): 212-8.
202. Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2003, 30(9): 809-18.

203. Melo MD, Obeid G. Osteonecrosis of the jaws in patients with a history of receiving bisphosphonate therapy: strategies for prevention and early recognition. *J Am Dent Assoc* 2005, 136(12): 1675-81.
204. Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc* 1960, 61(1): 32-44.
205. Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002, 31(6), 641-5.
206. Auer JA, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, Rechenberg B, Hofmann-Antenbrinck M, Schneider E, Müller-Terpitz R, Thiele F, Rippe KP, Grainger DW. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord* 2007, 8(1): 72.
207. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007, 13(1): 1-10.
208. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005, 16(2): S129-38.
209. Marino KL, Zakhary I, Abdelsayed RA, Carter JA, O'Neill JC, Khashaba RM, Elsalanty M, Stevens MR, Borke JL. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *J Oral Implantol* 2012, 38(S1): 511-8.
210. Allen MR, Kubek DJ, Burr DB, Ruggiero SL, Chu TM. Compromised osseous healing of dental extraction sites in zoledronic acid-treated dogs. *Osteoporos Int* 2011, 22(2): 693-702.
211. Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, Cavalli F, Zanconati F, Contardo L, Giacca M, Di Lenarda R. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med* 2010, 39(5): 390-6.
212. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CRS. Bastos A, Guimarães M, Marcantonio Jr E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol* 2013, 94(1): 65-73.
213. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Miñano F, Gómez-García F, Vicente-Ortega V. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague–Dawley rats. *J Oral Pathol Med* 2010, 39(9): 697-702.

214. Green JR, Müller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of CGP 42' 446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res* 1994, 9(5): 745-51.
215. Pazianas M, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, Kothawala P. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. *Clin Ther* 2007, 29(8): 1548-58.
216. Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg* 2007, 65(3): 415-23.
217. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, Yatani H, Yoneda, T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab* 2010, 28(2): 165-75.
218. Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, Garrett N, Adams JS, Nishimura I. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res* 2010, 25(6): 1337-49.
219. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol* 2009, 45(2): 164-72.
220. Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, Korhan-Oral C. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011, 16(7): e879-83.
221. Vasconcelos AC, Berti-Couto SA, Azambuja AA, Salum FG, Figueiredo MA, da Silva VD, Cherubini K. Comparison of effects of clodronate and zoledronic acid on the repair of maxilla surgical wounds—histomorphometric, receptor activator of nuclear factor-kB ligand, osteoprotegerin, von Willebrand factor, and caspase-3 evaluation. *J Oral Pathol Med* 2012, 41(9): 702-12.

222. Barba-Recreo P, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid–related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2014, 42(6): 744-50.
223. Jang HW, Kim JW, Cha IH. Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2015, 37(1): 18.
224. Melo RB, Guimarães SB, Silva PGDB, Oriá RB, Melo JUDS, Vasconcelos PRL. Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio Omega-9: Omega-6 and low ratio Omega-6: Omega-3 after molar extraction in rats. *Acta Cir Bras* 2014, 29(6): 371-5.
225. Froelich K, Radeloff A, Köhler C, Mlynski R, Müller J, Hagen R, Kleinsasser NH. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the external ear canal: a retrospective study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011, 268(8): 1219-25.
226. Keskinruzgar A, Bozdog Z, Aras MH, Demir T, Yolcu U, Cetiner S. Histopathological effects of teriparatide in medication-related osteonecrosis of the jaw: an animal study. *J Oral Maxillofac Surg* 2016, 74(1): 68-78.
227. Horowitz R, Holtzclaw D, Rosen PS. A review on alveolar ridge preservation following tooth extraction. *J Evid Based Dent Pract* 2012, 12(3): 149-60.
228. Zandi M, Dehghan A, Malekzadeh H, Janbaz P, Ghadermazi K, Amini P. Introducing a protocol to create bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rat animal model. *J Craniomaxillofac Surg* 2016, 44(3): 271-8.
229. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1116(1): 281-90.
230. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003, 9(32): 2643-58.
231. Walter C, Pabst A, Ziebart T, Klein MO, Al-Nawas B. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis* 2011, 17(2): 194-9.
232. Huang X, Huang S, Guo F, Xu F, Cheng P, Ye Y, Dong Y, Xiang W, Chen, A. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep* 2016, 13(1): 613-22.

233. Bolland MJ, Grey AB, Horne AM, Briggs SE, Thomas MG, Ellis-Pegler RB, Callon KE, Gamble GD, Reid, I. R. Effects of intravenous zoledronate on bone turnover and BMD persist for at least 24 months. *J Bone Miner Res* 2008, 23(8): 1304-8.
234. Basso FG, Turrioni APS, Hebling J, de Souza Costa CA. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology* 2013, 59(6): 534-41.
235. Santini D, Vincenzi B, Avvisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, Salerno A, Denaro V, Tonini G. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002, 8(5): 1080-4.
236. Basso FG, Turrioni APS, Hebling J, de Souza Costa CA. Zoledronic acid decreases gene expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor by human epithelial cells. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2013, 51(8): 971-3.
237. Ishtiaq S, Edwards S, Sankaralingam A, Evans BAJ, Elford C, Frost ML, Fogelman I, Hampson G. The effect of nitrogen containing bisphosphonates, zoledronate and alendronate, on the production of pro-angiogenic factors by osteoblastic cells. *Cytokine* 2015, 71(2): 154-60.
238. Moreira MS, Katayama E, Bombana AC, Marques MM. Cytotoxicity analysis of alendronate on cultured endothelial cells and subcutaneous tissue. A pilot study. *Dent Traumatol* 2005, 21(6): 329-35.
239. Ribatti D, Maruotti N, Nico B, Longo V, Mangieri D, Vacca A, Cantatore FP. Clodronate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2008, 19(5): 1109-12.
240. Simon MJ, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Açil Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Investig* 2010, 14(1): 51-8.
241. Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Drosse I, Schwager J, Bauss F, Ehrenfeld M, Schieker, M. Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg* 2010, 68(11): 2837-45.

242. Hansen MV, Andersen LT, Madsen MT, Hageman I, Rasmussen LS, Bokmand S, Rosenberg J, Gögenur I. Effect of melatonin on depressive symptoms and anxiety in patients undergoing breast cancer surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Breast Cancer Res Treat* 2014, 145(3): 683-95.
243. Vijayalaxmi Thomas JrCR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 2002, 20(10): 2575-601.
244. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997, 29(08): 363-72.
245. Yönel EE, Yaprak M, Yıldız Y. Yüksek ve düşük doz eksojen melatoninin erkek ratlarda vücut ısısına etkileri. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1996, 13: 1-4.
246. Halıcı M, Öner M, Güney A, Canöz Ö, Narin F, Halıcı C. Melatonin promotes fracture healing in the rat model. *Eklem Hastalık Cerrahisi* 2010, 21(3): 172-77.
247. Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiol Res* 2005, 54(5): 491-5.
248. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998, 56(3): 359-84.
249. Li JG, Lin JJ, Wang ZL, Cai WK, Wang PN, Jia Q, Zhang AS, Wu GY, Zhu GX, Ni LX. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. *Am J Transl Res* 2015, 7(1): 66-78.
250. Öktem F, Ozguner F, Yilmaz HR, Uz E, Dündar B. Melatonin reduces urinary excretion of N-acetyl- β -d-glucosaminidase, albumin and renal oxidative markers in diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006, 33(1-2): 95-101.
251. Armagan, A, Uz E, Yilmaz HR, Soyupek S, Oksay T, Ozcelik N. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian J Androl* 2006, 8(5): 595-600.
252. Tresguerres IF, Clemente C, Blanco L, Khraisat A, Tamimi F, Tresguerres JA. Effects of local melatonin application on implant osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012, 14(3): 395-9.
253. Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, López-Marí L, Guardia J, Marínez-González JM, Barone A, Tresguerres IF, Paredes SD, Fuentes-Breto L. Actions of melatonin mixed with collagenized porcine bone versus porcine bone only on osteointegration of dental implants. *J Pineal Res* 2010, 48(3): 194-203.

254. Cobo-Vázquez C, Fernández-Tresguerres I, Ortega-Aranegui R, López-Quiles J. Effects of local melatonin application on post-extraction sockets after third molar surgery. A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014, 19(6): e628-33.
255. Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Escames G, Lopez A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J Periodontol* 2007, 78(3): 576-83.
256. Maldonado MD, Murillo-Cabezas F, Terron MP, Flores LJ, Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ. The potential of melatonin in reducing morbidity-mortality after craniocerebral trauma. *J Pineal Res* 2007, 42(1): 1-11.
257. Son JH, Cho YC, Sung IY, Kim IR, Park BS, Kim YD. Melatonin promotes osteoblast differentiation and mineralization of MC 3T3-E1 cells under hypoxic conditions through activation of PKD/p38 pathways. *J Pineal Res* 2014, 57(4): 385-92.
258. Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, Kaku T. (1999). Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res* 1999, 27(2): 106-10.
259. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ, Poeggeler B. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993, 1: 57-60.
260. Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res* 2006, 40(4): 332-42.
261. Zhang L, Zhang J, Ling Y, Chen C, Liang A, Peng Y, Chang H, Su P, Huang, D. Sustained release of melatonin from poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) microspheres to induce osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro. *J Pineal Res* 2013, 54(1): 24-32.
262. Calvo Guirado JL, López López PJ, Fernández Domínguez M, Prados Frutos JC, Gehrke SA. Histologic evaluation of new bone in post-extraction sockets induced by melatonin and apigenin: an experimental study in American fox hound dogs. *Clin Oral Implant Res* 2016.

263. El-Gammal MY, Salem AS, Anees MM, Tawfik MA. Clinical and radiographic evaluation of immediate loaded dental implants with local application of melatonin: a preliminary randomized controlled clinical trial. *J Oral Implantol* 2016, 42(2): 119-25.
264. Eastell R, Blumsohn A. The value of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *J Rheumatol* 1997, 24(6): 1215-7.
265. Boivin G, Morel G, Lian JB, Anthoine-Terrier C, Dubois PM, Meunier PJ. Localization of endogenous osteocalcin in neonatal rat bone and its absence in articular cartilage: effect of warfarin treatment. *Virchows Arch* 1990, 417(6): 505-12.
266. Takami H, Shikata JI. Serum bone Gla protein as an indicator of parathyroidectomy in patients with secondary hyperparathyroidism. *World J Surg* 1990, 14(3): 431-5.
267. Dai M, Cui P, Yu M, Han J, Li H, Xiu R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl₂ in cultured cancer cells. *J Pineal Res* 2008, 44(2): 121-6.
268. Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong JW, Kim YJ. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. *J Pineal Res* 2010, 48(2): 178-84.
269. Cui P, Luo Z, Zhang H, Su Y, Li A, Li H, Zhang J, Yang Z, Xiu, R. Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *J Pineal Res* 2006, 41(4): 358-62.
270. Abd-El-Aleem SA, Ferguson MW, Appleton I, Bhowmick A, McCollum CN, Ireland G W. Expression of cyclooxygenase isoforms in normal human skin and chronic venous ulcers. *J Pathol* 2001, 195(5): 616-23.
271. Galiano RD. Topical VEGF accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* 2004, 164, 1935-47.
272. Yamada Y, Tamura T, Hariu K, Asano Y, Sato S, Ito K. Angiogenesis in newly augmented bone observed in rabbit calvarium using a titanium cap. *Clin Oral Implants Res* 2008, 19(10): 1003-9.
273. Turgut B, Güler M, Demir T, Türkçüoğlu P, Çeliker Ü. Oküler anjiyogenezde vasküler endotelial büyüme faktörünün rolü. *Turkiye Klinikleri Journal of Ophthalmology* 2007, 16(1): 38-46.

274. Lauer G, Sollberg S, Cole M, Krieg T, Eming SA, Flamme I, Stürzebecher J, Mann K. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 2000, 115(1): 12-18.
275. Dai J, Rabie ABM. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res* 2007, 86(10): 937-50.
276. Shi ZB, Wang KZ. Effects of recombinant adeno-associated viral vectors on angiopoiesis and osteogenesis in cultured rabbit bone marrow stem cells via co-expressing hVEGF and hBMP genes: a preliminary study in vitro. *Tissue Cell* 2010, 42(5): 314-21.
277. Reid IR. Osteonecrosis of the jaw-who gets it, and why? *Bone* 2009, 44(1): 4-10.
278. Bauss F, Pfister T, Papapoulos S. Ibandronate uptake in the jaw is similar to long bones and vertebrae in the rat. *J Bone Miner Metab* 2008, 26(4): 406-8.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Canan Gökçe KULFEL

Doğum Yeri ve Tarihi: Kırşehir 1992

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dil: İngilizce

İletişim Adresi: İnönü Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve

Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, 44280-Malatya

E-posta Adresi: kulfel_gokce@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

İlkokul: Yenihayat İlköğretim Okulu

Orta Okul: Alparslan İlköğretim Okulu

Lise: Prof. Dr. İlhan Kılıçözlü Fen Lisesi

Lisans: Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2010-2015)

Uzmanlık: İnönü Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi

Anabilim Dalı (2016 Şubat-)

EK-2. ETİK KURUL ONAYI



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 17.05.2019
Toplantı Yeri : Tıp. Fak. Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2019/A-29
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : Wistar Albino
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 44 adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı: 6-7 aylık 200-300 gr

Doç. Dr. Hilal ALAN'ın yürüttüğü olduğu; "Bifosfonat Uygulanan Ratlarda Diş Çekimi Sonrası Lokal ve Sistemik Melatonin Uygulamasının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi" isimli 2019/A-29 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmesi şartıyla çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna; oy birliği ile karar verildi.

 Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Başkan	 Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR Başkan Yardımcısı KATILMADI	 Prof. Dr. Metin ATAMBAY Üye
 Prof. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN Üye	 Prof. Dr. Başak KAYHAN Üye	 Doç. Dr. Şengül YÜKSEL Üye
 Vet.Hek. Engin KORKMAZ Üye	 Akın ÖZ Sivil Üye KATILMADI	 Av. M. Umut YALÇIN Sivil Üye KATILMADI