



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**BİFOSFONATLARIN İNDÜKLEDİĞİ ÇENE
OSTEONEKROZLARINDA HİDROJEN
SULFİT DONÖRÜNÜN(GYY4137)
ETKİNLİĞİNİN DENEYSEL HAYVAN
MODELİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bayram SÜLEYMANLI

UZMANLIK TEZİ

Doç Dr. Cem ÜNGÖR

TRABZON - 2022





TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**BİFOSFONATLARIN İNDÜKLEDİĞİ ÇENE
OSTEONEKROZLARINDA HİDROJEN
SULFİT DONÖRÜNÜN (GYY4137)
ETKİNLİĞİNİN DENEYSEL HAYVAN
MODELİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bayram SÜLEYMANLI
ORCID: 0000-0003-3935-9216

UZMANLIK TEZİ

Doç Dr. Cem ÜNGÖR
ORCID: 0000-0002-2899-2836

TRABZON-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26.12.2022

Bayram SÜLEYMANLI

İthaf

Bu uzmanlık tezimi, adını taşıdığım, ikinci dünya savaşında şehit olan sevgili dedem Bayram Süleymanov'a ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bilgi ve birikimlerini bana aktarmasından mutluluk duyduğum sevgili hocam ve tez danışmanım sayın Doç. Dr. Cem ÜNGÖR'e,

Asistanlığım süresince üzerimde emeği geçen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan kıymetli hocalarım Doç. Dr. Yavuz Tolga KORKMAZ'a, Dr. Öğr. Üyesi Onur YILMAZ'a, Dr. Öğr. Üyesi Efe Can SİVRİKAYA'ya,

Hayatımın her döneminde destekçim olan, emeklerinin karşılığını ödeyemeyeceğim sevgili anneme, babama ve kardeşlerime,

Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalışmaktan zevk aldığım sevgili arkadaşlarım Gökçe Elif ERDAYANDI, Can ERDAYANDI, Gültekin ONAT, Fatih GİRĞİN, Cavad BAHTİYARLI, Ayşenur SAKAL, Halenur VAR, Emil MAHAMMADLI, Emre ULUBAY, Helin Merve ÖZALP ve Ayşe BAYRAKTAR arkadaşlarıma,

Birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım bölümümüz hemşireleri ve çalışanlarına,

Sevgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgeyemeyen, varlığıyla bana güç katan sevgili eşim Gül Nisa ÖZTÜRK SÜLEYMANLI'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Arş. Gör. Bayram

SÜLEYMANLI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI	iii
BEYAN	iv
İthaf	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Bifosfonatlar	4
2.1.1 Bifosfonatların Tarihçesi	4
2.1.2 Bifosfonatların Kimyasal Yapısı	4
2.1.3 Bifosfonatların Etkileri	5
2.1.3.1 Antirezorptif Etki	5
2.1.3.2 Tümörösidal Etkileri	5
2.1.3.3 Anti-anjiyojenik Etkileri	6
2.2 Bifosfonat İlaçların Sınıflandırması	6
2.2.1 Nitrojen İçermeyen Bifosfonatlar	6
2.2.2 Nitrojen İçeren Bifosfonatlar	7
2.2.2.1 Alendronat	7
2.2.2.2 İbandronat	7
2.2.2.3 Pamidronat	8
2.2.2.4 Risedronat	8
2.2.2.5 Zoledronat	8

2.3 Bifosfonat Kullanımına Bağlı Gelişen Çene Osteonekrozu	9
2.3.1 BRONJ'un Görülme Sıklığı	10
2.3.2 Hastalığın Patofizyolojisi	10
2.3.3 Çene Kemiklerinde Duyarlılık	11
2.3.4 Enflamasyon / Enfeksiyon	11
2.3.5 Anti-Osteoklastik Aktivite	11
2.3.6 Anti-Anjiyogenezis Aktivasyonu	12
2.3.7 Yumuşak Doku Toksisitesi	12
2.3.8 İmmun Yetmezlik	12
2.3.9 BRONJ Oluşumuna Zemin Hazırlayıcı Faktörler	13
2.3.10 BRONJ'un Tanısı ve Klinik – Radyolojik Bulguları	13
2.3.11 BRONJ Evreleme Sistemi	15
2.4 Kemik	18
2.4.1 Kemik Matriksi	19
2.4.2 Organik Matriks	19
2.4.3 İnorganik Matriks	19
2.4.4 Kemik Doku Tipleri	20
2.4.4.1 Primer Kemik Matriks	20
2.4.4.2 Sekonder Kemik Dokusu	20
2.4.4.3 Kortikal Kemik	20
2.4.4.4 Spongios kemik	21
2.5 Kemik Hücreleri	21
2.5.1 Osteoprogenitör Kök Hücreler	22
2.5.2 Osteoblastlar	22
2.5.3 Osteositler	22
2.5.4 Osteoklastlar	23
2.6 Hidrojen Sulfid Sinyal Molekülü	24
2.6.1 Hidrojen sulfid metabolizması	24
2.6.2 Doku rejenerasyonuna etkisi	25
2.6.3 Kemik iyileşmesi üzerine etkisi	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1 Deney Hayvanları	27
3. 2 Deney gruplarının oluşturulması	27
3.3 Deneye Hazırlık	28
3.4 Deney Aşaması	28
3.5 Ötenazi ve Histolojik Örneklerin Toplanması	33
3.6 GYY4137 molekülünün sentezlenmesi	34
3.7 Histolojik Doku Takibi	36
3.8 İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	37

5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR	67
7. KAYNAKLAR	69
8. ETİK KURUL ONAYI	



RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1: BRONJ'un klinik görünümü	14
Resim 2: BRONJ'un klinik görünümü(2)	15
Resim 3: BRONJ'un panoramik görüntülemesi	15
Resim 4. Salin enjeksiyonunun İP yapısı	29
Resim 5. BP enjeksiyonunun İP yapılması	30
Resim 6. Sıçanın yanağının ekarte edilmesi	31
Resim 7. Bistüri ile periodontal ligamentlerin kesilmesi	31
Resim 8. Bistüri ile dişin eleve edilmesi	32
Resim 9. Eleve edilmiş molar diş	32
Resim 10. Deney gruplarının birinden çekilmiş 12 adet molar diş	33
Resim 11. Alınan Histopatolojik doku örneği	34
Resim 12. Distille suda çözülmüş GYY4137 kristali	36
Resim 13. ZA+Ext grubu nekrotik kemiğin histopatolojik görüntüsü	38
Resim 14. ZA+Ext grubu nekrotik kemiğin histopatolojik görüntüsü(2)	39
Resim 15. ZA grubu molar diş kökü çevresinde artmış fibroblastik proliferasyon ve düzensiz kemik adaları	39
Resim 16. SF grubu molar diş kökü çevresinde sağlıklı kemik dokusu	41

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1: Piyasada Bulunan Bifosfonat İçeren İlaçlar	7
Tablo 2: Bifosfonatların Tedavi Endikasyonları Dozu ve Kullanım Şekli	9
Tablo 3. BRONJ evreleme sistemi	17
Tablo 4: Deney grupları	28
Tablo 5. Gruplara göre ölçüm değerlerinin dağılımı	40
Tablo 6. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının enflamasyon durumuna göre karşılaştırılması	42
Tablo 7. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının nekroz durumuna göre karşılaştırılması	43
Tablo 8. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının vasküler proliferasyon durumuna göre karşılaştırılması	44
Tablo 9. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının osteoblast durumuna göre karşılaştırılması	45
Tablo 10. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının osteoklast durumuna göre karşılaştırılması	46
Tablo 11. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının fibroblastik aktivite durumuna göre karşılaştırılması	47
Tablo 12. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının enflamasyon durumuna göre karşılaştırılması	48
Tablo 13. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının nekroz durumuna göre karşılaştırılması	50
Tablo 14. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının vasküler proliferasyon durumuna göre karşılaştırılması	51
Tablo 15. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının osteoblast durumuna göre karşılaştırılması ..	52
Tablo 16. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının osteoklast durumuna göre karşılaştırılması ..	54
Tablo 17. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının fibroblastik aktivite durumuna göre karşılaştırılması	55
Tablo 18. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının ölçüm değerlerine göre karşılaştırılması	56
Tablo 19. SF, ZA ve ZA+HS g ikili karşılaştırma sonuçları	57
Tablo 20. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının ölçüm değerlerine göre karşılaştırılması	58
Tablo 21. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının ikili karşılaştırma sonuçları	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Primer ve sekonder kemik	20
Şekil 2: Kemğin hücreleri	21
Şekil 3. Osteosit	23
Şekil 4. Osteoklastlar	24
Şekil 5. NMR Spectrum grafiğı	35
Şekil 6. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının enflamasyon durumuna göre karşılaştırılması	42
Şekil 7. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının nekroz durumuna göre karşılaştırılması	43
Şekil 8. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının vasküler proliferasyon durumuna göre karşılaştırılması	44
Şekil 9. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının osteoblast durumuna göre karşılaştırılması	45
Şekil 10. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının osteoklast durumuna göre karşılaştırılması	46
Şekil 11. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının fibroblastik aktivite durumuna göre karşılaştırılması	47
Şekil 12. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının enflamasyon durumuna göre karşılaştırılması	48
Şekil 13. ZA+HS grubunda molar diş kökü çevresindeki sağlıklı kemik dokusu	49
Şekil 14. ZA+HS grubunda molar diş kökü çevresindeki sağlıklı kemik dokusu ve normal boyutlardaki periodontal aralık	49
Şekil 15. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının nekroz durumuna göre karşılaştırılması	50
Şekil 16. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının vasküler proliferasyon durumuna göre karşılaştırılması	52
Şekil 17. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının osteoblast durumuna göre karşılaştırılması	53
Şekil 18. ZA+Ext+HS grubunda osteoklastların varlığı ve aktif remodelling görüntüsü	53
Şekil 19. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının osteoklast durumuna göre karşılaştırılması	54
Şekil 20. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının fibroblastik aktivite durumuna göre karşılaştırılması	55

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

BRONJ	Bifosfonata Bağlı Çene Kemiği Osteonekrozu
AAOMS	Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi Derneği
ZA	Zoledronik Asit
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
CTX	Karboksi-terminal Telopektid
ALP	Alkalen Fosfataz
İL-1	İnterlökin-1
BP	Bifosfonat
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
SGL	Sistatyonin Gamma-liyaz Enzimi
CBS	Sistatyonin b-sentaz Enzimi
KİMKH	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre
DESL	Düşük Enerji Seviyeli Lazer

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
ml	Mililitre
mg	Miligram

Formüller

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂	Hidroksiapatit Kristalleri
Ca	Kalsiyum
P	Fosfor
Ca₃(PO₄)₂	Kalsium Fosfat
H₂S	Hidrojen Sulfid
CO₂	Karbondioksit

ÖZET

Bifosfonatların İndüklediği Çene Osteonekrozlarında Hidrojen Sulfid Donörünün (GY4137) Etkinliğinin Deneysel Hayvan Modeliyle Değerlendirilmesi

Bifosfonata bağı osteonekroz günümüzde pratikte sık görülmektedir. Bifosfonatlar kemikte birikerek kemik remodelasyonunu bozmakta ve özellikle remodelasyonun yüksek olduğu çene kemiklerinde spontan veya çekim sonrası ilaca bağı osteonekroz oluşumunda rol oynamaktadır. Histopatolojik olarak nekroz bölgesinde kemik lakünalarında ölü osteositler, periferde azalmış osteoblast ve osteoklastlar görülmektedir. Hidrojen sulfid sinyal sisteminin yapılan bazı çalışmalarda bölgede osteositlerin oluşumunu desteklediği ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden osteosit ve osteoblastların oluşumunu indüklediği ortaya çıkmıştır.

Hidrojen sulfid sinyal molekülünün osteogenezde ve kemik remodellinginde rolü olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, H₂S'nin çeşitli sinyal yollarını düzenlemek için bir gaz ileticisi olarak hizmet ettiğini göstermiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda kök hücrelerden osteogenezde rol oynayan çeşitli hücrelerin oluşumunu da kontrol ettiği öğrenilmiştir. Hidrojen sulfid gaz halinde olduğu için saf halde kullanılamaz. Son yıllarda çeşitli hidrojen sulfid donör molekülleri geliştirilmiştir. GY4137 bu donörlerden birisidir ve yapılan çalışmalarda terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda yüksek doz Zoledronik asit(200 µg/kg) kullanarak sıçanlarda diş çekiminden sonra deneysel ilaca bağı osteonekroz modeli oluşturarak hidrojen sulfid donörünün (GY4137) intrapeitoneal(i.p) 25mg/kg/gün uygulanmasının osteonekroz alanlarındaki rejeneratif etkisi histopatolojik olarak incelenmiştir.

Bu alanda yapılan çalışmalar daha çok osteoporoz tedavisi için yapılmış olup daha önce bifosfonat ile ilişkili osteonekrozlarda hidrojen sulfid donörünün(GY4137) terapötik etkinliği araştırılmamıştır. Yapılacak çalışma hidrojen sulfid donörünün(GY4137) bifosfonat ile ilişkili osteonekrozda terapötik etkinliğinin araştırılmasına olanak sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: BRONJ, Bifosfonatlar, Hidrojen Sulfid, Osteonekroz

ABSTRACT

Evaluation Of Hydrogen Sulfite Donor (GYY4137) In Experimental Animal Model In Biphosphonate-Induced Jaw Osteonecrosis

Bisphosphonate-induced osteonecrosis is common in practice today. Bisphosphonates accumulate in the bone and impair bone remodeling and play a role in the formation of drug-induced osteonecrosis, either spontaneously or after extraction, especially in jawbones where remodeling is high. Histopathologically, dead osteocytes in bone lacunae, decreased osteoblasts and osteoclasts in the periphery are seen in the necrosis region. It has been revealed in some studies that the hydrogen sulfide signaling system supports the formation of osteocytes in the region and induces the formation of osteocytes and osteoblasts from bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Hydrogen sulfide signaling molecule is thought to have a role in osteogenesis and bone remodeling. Recent studies have shown that HS serves as a gas transmitter to regulate various signaling pathways. In addition, studies have shown that stem cells control the formation of various cells that play a role in osteogenesis. Since hydrogen sulfide is gaseous, it cannot be used in pure form. Various hydrogen sulfide donor molecules have been developed in recent years. GYY4137 is one of these donors and is used as a therapeutic agent in studies. In our study, the regenerative effect of intraperitoneal (i.p) 25mg/kg/day administration of hydrogen sulfide donor (GYY4137) on osteonecrosis areas was examined histopathologically by using high-dose Zoledronic acid (200 µg/kg) to create an experimental drug-induced osteonecrosis model in rats after tooth extraction.

Studies in this area have been mostly done for the treatment of osteoporosis, and the therapeutic efficacy of hydrogen sulfide donor (GYY4137) in bisphosphonate-related osteonecrosis has not been investigated before. The work to be done has enabled the investigation of the therapeutic efficacy of hydrogen sulfide donor (GYY4137) in bisphosphonate-related osteonecrosis.

Keywords: BRONJ, Bisphosphonates, Hydrogen Sulfite, Osteonecrosis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bifosfonat grubu ilaçlar, kemik metabolizma bozukluğuna yol açan osteoporoz, Paget hastalığı, multipl myeloma, kemik metastazı olan kanserler ve malignansi hiperkalsemisi gibi sistemik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bifosfonatlar inorganik pirofosfat analoglarıdır. Kullanımlarındaki amaç; osteoklastların hücrel fonksiyonlarının inhibisyonu veya osteoklast apoptozisi ile kemik mineral yoğunluğunda artış, serum kalsium düzeylerinde azalma sağlanmasıdır.¹ Bu durum terapötik olarak etkili olsa da kemiğin rejenerasyon mekanizmalarını bozarak, mineralizasyonu azaltır, elastikiyeti düşürür ve devital kemik alanları oluşturur.²

Bifosfonat grubu ilaçlar günümüzde anti-rezorptif, anti-anjiojenik ve tümörosidal ajanlar olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların özellikle intravenöz yolla uygulanması sonrasında renal yetmezlik, akut faz reaksiyonu, atriyal fibrilasyon gibi yan etkileri görülmüştür. Bunun yanında çene kemiklerinde osteonekroz gibi istenmeyen klinik tablolar da rapor edilmiştir.²

Bifosfonatların çene kemiklerinde oluşan osteonekrozla ilişkisi ilk olarak 2003 yılında Marx tarafından bildirilmiştir.³ Genellikle kanser hastalarında karşılaşılan bu klinik tablo başlangıçta, kullanılan kemoterapötik ajanlara ve steroidlere bağlanmış ve 'osteokemonekroz' olarak isimlendirilmiştir.⁴ Ancak sonradan, bifosfonat dışında bir neden olmayan nekroz vakalarına rastlanması bu vakaların bifosfonat ile ilişkilendirilmesine yol açmış ve eş zamanlı olarak da literatürde olgu raporlarının sayısı artmaya başlamıştır. Bu olgu raporlarında isimlendirme farklı şekillerde yapılmıştır. 2009 yılda Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi Derneği daha önce baş-boyun bölgesinden radyoterapi almamış, bisfosfonat kullanmış ve ya kullanmakta olan hastaların çenelerinde 8 haftadan uzun süre açık kalmış kemik görüntüsünü 'bisfosfonata bağlı çene kemiği osteonekrozu (BRONJ) olarak tanımlamıştır. 2014 yılından itibaren ilaç kullanımına bağlı çenelerde görülen osteonekroz (MRONJ) adıyla kapsamı genişletilmiştir.

Klinik olarak BRONJ ağız içerisinde; çoğu zaman ağrısız ekspozite alveolar kemik ve ya yumuşak dokularda enfeksiyon bulgularının eşlik ettiği hastalık olarak izlenir. İleri dereceli olgularda ise bu tabloya intra ve ekstraoral fistüller ve patolojik fraktürler de eşlik edebilir. Radyografik olarak çenelerde yaygın skleroz, alveoler kemikte kalınlaşma ve çekim boşluklarında yetersiz kemikleşme izlenir.⁴

BRONJ lokal ve sistemik risk faktörleriyle ilişkilendirilebilir. Lokal risk faktörleri arasında oral cerrahi işlemler, protez vurukları, periodontal hastalıklar gösterilebilir. Diabet, obezite gibi diğer sistemik hastalıkların varlığı, kullanılan bifosfonatın türü, dozu, veriliş yolu, süresi, kemoterapötik ve kortikosteroidler gibi faktörler de BRONJ oluşumuna zemin hazırlayan sistemik faktörler arasında gösterilebilir.⁵

BRONJ hastalarında tedavi ağrının, hassasiyetin, ödem ve enfeksiyon bulgularının ortadan kaldırılmasını hedeflemektedir. Uygulanan tedaviyi medikal ve cerrahi olarak ikiye ayırabiliriz.¹

Medikal tedavide geniş spektrumlu antibiotikler, oral antiseptik gargaralar, ağrıkesiciler kullanılmaktadır. Cerrahi tedavide sekestrotomi küretaj parsiyel rezeksiyonlar kullanılabilir. Daha geniş alana yayılmış nekroz vakalarında ise radikal yaklaşımlı geniş rezeksiyonlar yapılabilir ve bölge kompozit fleplerle onarılabilir.¹

Geçtiğimiz yıllarda, mezenkimal kök hücre (MKH) nakli alanındaki araştırmaların ilerlemesi, MKH'lerin doku rejenerasyonu için yüksek bir potansiyele sahip olduğu tespit edildiğinden rejeneratif tıpta kilometre taşları getirmiştir. Ek olarak, H₂S son zamanlarda çeşitli organ sistemlerinde bir modülatör veya hücre canlılığı / apoptoz inhibitörü olarak önerilmiştir. Son çalışmalar, H₂S uygulamasının, çoklu stres formlarını (düşük oksijen, oksidatif hasar veya serum yoksunluğu) indüklenen apoptozisi önleyerek MKH'lerin proliferasyonunu ve sağkalımını güçlendirdiğini göstermiştir.⁶⁷⁸ H₂S donörünün (GY4137), distraksiyon osteogenezi tavşan modelinde distraksiyonu desteklediği bildirilmiştir.⁹ Bununla birlikte, H₂S aracılı kemik iyileşmesinin mekanizması hala belirsizdir. Sistatyonin gama-liyaz enziminin (SGL) osteoblastlarda H₂S üreten başlıca enzim olduğunu bildirmiştir. Mekanik olarak, SGL-H₂S sistemi, yeni bir işlem düzenleyici olarak RUNX2 sülfhidrasyonu yoluyla osteogenez aktivitesini artırır, böylece kemik iyileşmesini artırır. Bu bulgular, H₂S metabolizmasının veya H₂S donörlerinin modülasyonunun, osteoporoz veya diğer kemik hastalıklarının tedavisi için terapötik bir yaklaşım olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, moleküler mekanizmalar araştırılmalıdır.¹⁰

Literatürde osteoblast hasarının önlenmesinde Hidrojen Sulfide donörünün(GY4137) kullanımının etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır.¹¹ Bunun yanında distraksiyon osteogenezi tavşan modelinde Hidrojen Sulfide donörünün(GY4137) kullanımının bölgedeki kemik miktarı ve kalitesinin arttırdığı ve plazmada miktarının arttığı gösterilmiştir.¹² BRONJ tedavisinde Hidrojen Sulfide donörünün(GY4137) kullanımı literatürde bildirilmemiştir.

Çalışmamızın amacı ilaca bağlı çene osteonekrozu gelişen bireylerde hidrojen sulfid d  n  r  n  n(GYY4137) sistemik uygulanmasının BRONJ oluşturulmuş sıçanlarda kemik iyileşmesi, yumuşak doku iyileşmesi ve osteonekrozdaki histopatolojik olaylara etkisini deneysel hayvan modeli ile değerlendirmektir.

Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi (KT  ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve KT   Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Bifosfonatlar

2.1.1 Bifosfonatların Tarihçesi

Bifosfonatlar sağlık alanında ilk olarak, radyoaktif maddelerin kemiğe taşınması için, kemik görüntülemesinde kullanılmıştır. Fleish ve ark. difosfonatın in vitro olarak hidroksiapatiti çözmesi ve in vivo olarak kemik rezorpsiyonunu engellediğini raporlamalarından sonra tıpta tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır.¹³

Nitrojen içermeyen 1. kuşak bifosfonatlar 90'lı yılların başında sentezlenerek uygulamaya girmiştir. Günümüzde sık kullanılan nitrojen içerikli bifosfonatlardan olan pamidronat'ın FDA onayı almasıyla kanserlerin kemik metastazları, multipl myeloma ve hiperkalsemi gibi hastalıkların tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır. Aynı yıl Fosamaxın oral kullanıma sunulmasıyla beraber osteoporozun tedavisinde ilerleme kaydedilmiştir. Günümüzde sık kullanılan Risedronat ise 2001 yılında FDA onayı almış ve klinik kullanıma girmiştir.¹⁴

Zoledronik asit 2001 yılında FDA onayı aldıktan sonra malignansi hiperkalsemisinin tedavisinde kullanılmış ve onu takiben antineoplastik ajan olarak multipl myeloma tedavisinde kullanılmıştır.¹⁴

2.1.2 Bifosfonatların Kimyasal Yapısı

Bifosfonatlar inorganik pirofosfatın analoglarıdır. Oksijen atomlarının karbon atomları ile yer değiştirmesi ile oluşurlar. Bu moleküller kemik turnoverinin yüksek olduğu alanlara büyük ilgi gösterirler. Bu molekülde bulunan P-C-P bağları sayesinde olur. Bu yapı Ca^{+2} iyonlarına kolayca bağlanmayı sağlar.²

2.1.3 Bifosfonatların Etkileri

2.1.3.1 Antirezorptif Etki

Antirezorptif etki Bifosfonatların en güçlü ve önemli etkilerinden biridir. Bu bileşikler kemikteki mineral kristallerine bağlanırlar ve tekrar enjeksiyonlarda kemik matriksinde birikerek kumulatif etki yaparlar. Osteoklastlar üzerinde etkilidirler ve farklılaşmasını inhibe ederek etki ederler. Ayrıca osteoblastları osteoklast inhibe edici faktör sentezi için uyarırlar. In vitro olarak osteoklast apoptozunu aktive ettikleri de gösterilmiştir.¹⁵ Bu etkiler osteoklast sayısını azaltır, kemik rezorpsiyonu azalır ve serum kalsium seviyesinde azalma ile kemik turnoverini baskılar.¹⁶

1. Kuşak bifosfonatlar(tiludronate, etidronat ve klodronat) osteoklastlar içerisinde birikerek ATP'nin sitotoksik analoglarına metabolize olur ve hücre içerisinde birikirler. Bu birikme sorunu ATP ile yarışır ve osteoblastlar yaşamsal fonksiyonlar için gerekli enerjiyi alamazlar. Bu apoptozisi tetikler. Osteoklastların sayısı azalır ve kemik rezorpsiyonu bloke edilmiş olur. Bu da kemik turnoverini baskılar.¹⁷¹⁸

2. kuşak bifosfonatlar(aledronat, pamidronat, ibandronat, risedronat ve zoledronik asit) ise mevalonat yolu enzimlerinden "Farnes-Difosfat Sentaz"ı inhibe ederek etki ederler. Bu enzim kolesterol ve sterol sentezinde rol aldığından, hücreler bu bileşikler sentezledikleri yol bloke olacağı için, osteoklastik aktivite inhibe olur.¹⁹

2. kuşak bifosfonatların hidroksiapatite bağlanarak, hidroksiapatit kristallerinin yıkımını bloke ettiği ve böylece kemik rezorpsiyonunu baskıladığı bir mekanizma da bu ajanların antirezorptif etkilerini açıklamak için öne sürülmektedir.²⁰

2.1.3.2 Tümörosidal Etkileri

Bifosfonatların günümüzde antirezorptif etkileri kadar tümörosidal etkileri de vardır. Kemik dokularında osteoklast kökenli kemik rezorpsiyonuna neden olan ve tümör gelişimine neden olan bazı faktörlerin inhibisyonu, bu ajanların tümörosidal etkilerinin temeli olarak görülmektedir. Ancak tümörosidal etkinin antirezorptif etki sayesinde olduğu düşünülmektedir.²¹

Osteoklast inhibisyonu IL-6 üretimi ve kemik matiksinden salınan büyüme faktörlerinin azalmasına sebep olmaktadır.²² Bifosfonatların tümorosidal etkilerine bakıldığında son zamanlarda yapılan çalışmalar 2. kuşak bifosfonatların tümör hücrelerini doğrudan apoptozise uğratarak etki ettiğine dikkat çekmektedir. Bunun yanında kanser hücrelerinin adezyon proliferasyon ve invazyon gibi yeteneklerini sınırlarlar.²³

2.1.3.3 Anti-anjiyojenik Etkileri

Anjiyojenez mevcut damarlardan yeni damarların oluşması sürecini tanımlar. Tümörler yeni oluşmaya başladığı zaman süreç anjiyojenez ile başlamaktadır. Bifosfonatların nitrojen içerikli olanları kapiller oluşumu endotelial hücre proliferasyonu ve göçü gibi anjiyojenez basamaklarını inhibe eder.²¹

Kemik iliğinde bulunan monositler tarafından hücre içine endositoz yolu ile alınan bifosfonatlardan zoledronik asit bazik-fibroblast büyüme faktörü(bFGF) aracılığı ile anjiyojenezi inhibe ettiği ve apoptozisi aktive ettiği gösterilmiştir.²⁴ Benzer bulgular Stresing ve ark. tarafından da rapor edilmiştir.²⁵

Bu çalışmalara dayanarak bifosfonatların anjiyojenezi inhibe ettiği ve kemik iliğinden myeloid hücrelerin tümör bölgesine göçünü engellediği gösterilmiştir.²³

2.2 Bifosfonat İlaçların Sınıflandırması

2.2.1 Nitrojen İçermeyen Bifosfonatlar

30 yılı aşkındır nitrojen içermeyen 1. Kuşak bifosfonatlar 30 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. 1. Kuşak ilaçların kemik rezorpsiyonunu engellemedeki etkileri zayıftır.²⁶ Bu bifosfonatlar intraselüler olarak metabolize edilir ve ATP'nin sitotoksik analoglarına dönüşürler. Bu analoglar hidrolize edilemiyorlar.¹⁴ Bu gruptaki bifosfonatlar; Etidronat (Didronel), Tiludronat (skelid), Klodronat(Bonefos, Loron)'tır.

2.2.2 Nitrojen İçeren Bifosfonatlar

Bu gruptaki bifosfonatlar mevalonat yolağı üzerinden etki ederler. Farnesil difosfat ve geranil difosfatın oluşumunu düzenleyen enzimlerin inhibisyonuna neden olurlar.²⁷²⁸ Bu gruptaki Bifosfonatlar; Alendronat, Pomidronat, İbandronat, Risedronat, Zoledronat, Olpadronat, Neridronat'tır.

Tablo1:Piyasada Bulunan Bifosfonat İçeren İlaçlar

Oral Bifosfonatlar		
Ticari form	Üretici firma	Etkin madde
Actonel	Procter&Gamble Pharmaceuticals	Risedronate
Boniva	RocheLaboratories	İbandronate
Fosamax	Merck&Co.	Alendronate
Fosamax Plus D	Merck&Co.	Alendronate
Skelid	SanofiPharmaceuticals	Tiludronate
Didronel	Procter &GamblePharmaceuticals	Etidronate
IntravenözBifosfonatlar		
Ticari form	Üretici firma	Etkin madde
Aredia	Novartis	Pamidronate
Zometa	Novartis	Zolendronicacid
Bonefos	Schering AG	Clodronate

2.2.2.1 Alendronat

1995-den günümüze kadar oral kullanılan bifosfonat grubu ilaçtır. Osteoklastların aktif olduğu bölgelere bağlanarak aktivitelerini düşürür ve rezorpsiyonu önler. Alendronat kemik turnover hızını azalarak remodelasyonu önler.²⁹

2.2.2.2 İbandronat

FDA tarafından 2005 yılında onaylanan ibandronat osteoklast aktivitesini inhibe eder kemik rezorpsiyonunu ve kemik turnover hızını azaltır.³⁰

2.2.2.3 Pamidronat

İntravenöz kullanım için önerilen 2 bifosfonattan biridir. Hidroksiapatit ile birleşir ve demineralizasyonu engeller. Osteoklast aktivitesini bloke ederek güçlü antirezorptif etki sağlar. Kanserle bağlı hiperkalsemilerde etkilidir ve sık kullanılır.²⁹³⁰

2.2.2.4 Risedronat

Risedronik asit, osteoklast aktivitesini azaltarak, kemik rezorpsiyonunu ve kemik turnoverini inhibe eder.³⁰

2.2.2.5 Zoledronat

Nitrojen içeren bifosfonatlardan olan zoledronik asit, osteoklast aktivitesini ve kemik rezorpsiyonunu engeller. Hidroksiapatite afinitesi yüksektir ve direkt kemiğe bağlanır. Uygulama şekli intravenözdür ve böbrekler tarafından metabolize edilmeden atılır. Kanserle bağlı hiperkalsemi, meme kanseri ve multipl myelom osteolitik kemik metastazlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır.³¹

Tablo 2:*Bifosfonatların Tedavi Endikasyonları Dozu ve Kullanım Şekli*

Bifosfanat	Endikasyon	Doz	Kullanım yolu
Etidronate(didronel)	Paget hastalığı Heterotopik Ossifikasyon	300-750mg/gün 6 ay	Oral
Tiludronate (Skelid)	Paget hastalığı	400mg/gün 3 ay	Oral
Alendronate (Fosamax)	Osteoporoz Paget hastalığı	10mg/gün, 70mg/hafta	Oral
Risedronate (Actonel)	Osteoporoz Paget Hastalığı	5 mg/gün, 35mg/hafta	Oral
Ibandronate (Bovina)	Postmenopozal osteoporoz	2.5mg/gün, 150mg/ay	Oral
Pamidronate (Aredia)	Malignansi hiperkalsemisi Multiple myeloma Kemik metastazı Paget Hastalığı	90mg/ 3 hafta	IV
Zoledronate	Malignansi hiperkalsemisi Multiple myeloma Kemik metastazı Paget Hastalığı	4 mg/ 3 hafta	IV

2.3 Bifosfonat Kullanımına Bağlı Gelişen Çene Osteonekrozu

İlk kez 2003 yılında Marx tarafından bildirilen bifosfonata bağlı çene osteonekrozu(BRONJ) bildirilmiştir.³ AAOMS tarafından yapılan BRONJ tanımı “bifosfonat tedavisi görmüş, maksillofasiyal bölge radyoterapi öyküsü olmayan, çene kemiklerinde ekspoz kemikle karakterize ve 8 hafta süreyle iyileşmeyen lezyonlar” şeklindedir. Bifosfonat grubu ilaçların kullanımına bağlı

olarak gelişen, kemikteki turnover'ın baskılanmasına sebep olan, mikro-yaralanmaların onarılamamasına bağlı gelişim mekanizması BRONJ için tarif edilmiştir.³²

Bifosfonatlar diğer kemiklere oranla çenelerde daha fazla toplanma eğilimindedirler. Allen ve ark. alendronat kullanımının mandibulada kortikal kemik oluşumunu iliak kemiğe oranla 10-20 kat azalttığını raporlamışlardır.³³

2.3.1 BRONJ'un Görülme Sıklığı

BRONJ görülme sıklığını tespit etmek, lezyonun tespit edilebilmesindeki karmaşıklık ve klinik seyirdeki farklılıklar nedeniyle zordur.²⁹ Yapılan çalışmalarda %0.94-10 arasında BRONJ olguları rapor edilmiştir.^{34,35} Hoff ve ark. meme kanseri ve multipl myeloma olan toplam 1886 hastayı inceledikleri çalışmada sırasıyla %1.2 ve %2.4 oranında BRONJ bildirmişlerdir.³⁶ Wang ve ark. ise meme %CA 2.5, myeloma %3.8 ve prostat kanseri için %2.9 oranında BRONJ raporlamışlardır.³⁷

BRONJ gelişiminde maksilla ve mandibulanın tutulum riski de değerlendirilmelidir. Maksilla ve mandibulanın tutulum oranlarına bakıldığında literatürde mandibulanın tutulum oranının maksilladan 2 kat daha fazla olduğu görülmektedir.^{38,39}

2.3.2 Hastalığın Patofizyolojisi

Hastalığın ortaya çıkmasından yıllar geçmiş olsa da patofizyolojisi tam olarak belli değildir. Bunun için çeşitli teoriler ileri sürülmüştür.^{40,3} Hastalığın sadece çene kemiklerinde ortaya çıkması faktörü de farklı teorilerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bunlar arasında kemik rezorpsiyonunun aşırı baskılanması, kronik mikritravma, kemik remodelasyonun bozulması, angiogenesis inhibisyonu, bağışıklığın baskılanması, D vitamin eksikliği, yumuşak dokulara toksik etki, enflamasyon ve enfeksiyon gibi teoriler vardır.^{41,34,42}

Kemik rezorpsiyonunun aşırı baskılanması kemik turnoverının baskılanmasına sebep olur ve kemik doku kendini yenileyemez. Bu da yumuşak doku toksisitesinin ortaya çıkmasına zemin hazırlar ve dokuların direnci düşer. BRONJ için gerekli zemin oluşur.⁴³ Ancak bifosfonatların söylenen etkiyi yapabilmesi için dokularda yeterli miktarda toplanması gerekir.

2.3.3 Çene Kemiklerinde Duyarlılık

Bifosfonatlar kemik turnoverinin yüksek olduğu bölgelerde daha fazla birikirler. Çene kemiklerinde rezorpsiyon ve remodelasyon hızının diğer kemiklerden yüksek olması bu ilaçların bölgeye afinitesini artırır. Osteonekroz ilk olarak alveol kemikte görülür. Sonradan bazise doğru yayılmaya başlar. Çene kemiklerindeki bu turnover hızına bağlı olarak artmış remodelasyonun predispozan bir faktör olduğu düşünülmektedir.^{40,33} Yapılan hayvan çalışmaları bifosfonat kullanımının, intrakortikal kemik turnoverini azalttığını göstermiştir.^{33,44,40} Bunun yanında osteonekroz oluşabilecek hastalardan alınan örneklerle kontrol grubunun karşılaştırıldığı çalışmada osteoklastik aktivitenin arttığı ve yeni kemik formasyonunun azaldığı gösterilmiştir.⁴⁵

2.3.4 Enflamasyon / Enfeksiyon

BRONJ'a enfeksiyon ve enflamasyonun etkileri tartışmalı olarak kalmaktadır. Yapılan çalışmalarda BRONJ bölgelerinden alınan örneklerde Actinomycesler ve başka birçok bakteri izole edilmiştir. Buna rağmen ekspozite kemik bölgeleri oral bakterilerle kontamine olacağından bölgenin net mikroflorasını izol etmek zordur. Bunun yanında alınan örneklerde virüs ve mantar türleri de izole edilmiştir.⁴⁰

Uzun süreli bifosfonat kullanan hastalarda kemik turnoveri durmaya yakın bir noktada olduğu için, nekroze kemik bölgeleri yeterince çabuk dokular tarafından uzaklaştırılmaz ve kronik osteomyelitis oluşma riski artar.⁴⁶

Enfeksiyon faktörünün BRONJ oluşmasında esas faktör olup olmadığı, bu ilaçların uzun süreli kullanımının neden olduğu lenfopeninin enfeksiyon oluşumunda artışa yol açıp açmadığı ve nekrotik alana enfeksiyonun sonradan katılıp katılmadığı bilinmemektedir.⁴⁷

2.3.5 Anti-Osteoklastik Aktivite

Bu ilaçlar, osteoklastların farklılaşmasını ve fonksiyonunu inhibe ederek apoptozisi tetikler, bu sayede kemiğin yeniden şekillenmesini ve turnover'ı inhibe eder. Bifosfonatların uzun süreli kullanımı, osteoklastların fonksiyonunun bozulmasına yol açar ve osteoblastlar kemiği rezorbe edemez. Bu da asellüler kemik matriksinde hücre ölümüne yol açar. Bunu takiben kapiller damar

dejenerasyonu, avaskülerite ve mikrofraktürler oluşur. Bunun sonucunda oral bakteriler kemiğe invaze olur ve nekroz gelişmesine sebep olur.⁴⁸

2.3.6 Anti-Anjiyogenezis Aktivasyonu

Anjiogenezi dediğimizde epitel hücrelerinin migrasyonu, farklılaşması ve büyümesiyle yeni kan damarlarının oluşması tanımlanmaktadır. Anjiyogenez, tümör büyümesini ve kan damarlarına invazyonu etkileyerek metastazda rol oynar. Anjiogenez için, vasküler endotelial büyüme faktörü(VEGF) gibi sinyal moleküllerinin, endotelial reseptörlere bağlanması gerekmektedir. VEGF yeni kan damarlarının oluşumunu tetikler.^{33,49} Anjiyogenez inhibisyonu bu nedenden dolayı önemli bir hipotezdir.⁴⁰ Zoledronik asit uygulamasının, in vitro çalışmalarda, anjiogenezi inhibe ettiğini göstermiştir.^{50,24}

2.3.7 Yumuşak Doku Toksisitesi

Bu ilaçların esas hedefi osteoklastlar olsa da yumuşak dokular üzerinde toksik etkileri bildirilmiştir. Oral epitel, servikal ve prostat hücreleri bifosfonata maruz kaldıktan sonra bu hücrelerde proliferasyonun azaldığı ve apoptozisin arttığı görülmüştür.⁴⁰

Alveol kemiğinde biriken bifosfonatlar oral epitel üzerinde de toksik etkilidir. Bu ilaçları kullanan bireylerde oral mukoza bütünlüğü bozulduğundan, kemik ekspozite olur ve burada çoğu zaman sekonder enfeksiyon oluşur. Bu da osteonekroz oluşumuna zemin hazırlar.^{46,47}

2.3.8 İmmün Yetmezlik

Kanser tedavisi gören hastaların anamnezinde çeşitli kemoterapi ajanları ve steroid kullanma öyküsü genellikle vardır. Kemoterapi ajanları ve steroidler enfeksiyon oluşumuna ortam oluşturmaktadır. Oral mukozanın direncinin düşmesi sonucu enfeksiyon gelişir ve BRONJ oluşması için ortam hazır olur.⁵¹

Yapılan hayvan deneylerinde ekspozite kemik oluşumu mukozada ülserasyon iyileşmenin gecikmesi ve enflamasyon gibi çeşitli olayların bifosfonatların kemoterapi ve steroidlerle beraber kullanımında oluştuğunu göstermiştir.^{51,40} Mevcut teoriler BRONJ oluşumunun multifaktöryel olduğunu düşündürmektedir.⁴⁰

2.3.9 BRONJ Oluşumuna Zemin Hazırlayıcı Faktörler

Lokal Faktörler⁴²

- Diş çekimleri
- Ağız içi invaziv cerrahi uygulamaları
- Diş eti hastalıkları
- Travma
- Kötü ağız hijyeni
- Dental enfeksiyon mevcudiyeti
- Sigara, alkol kullanımı

Sistemik Faktörler⁴²

- Kullanılan bifosfonatın türü, dozu
- Hastanın genel sistemik durumu
- Kemiğe metastaz yapmış kanser vakaları
- Kortikosteroid terapisi
- Diabetes mellitus
- Kematerapötik ilaç kullanımı

2.3.10 BRONJ'un Tanısı ve Klinik – Radyolojik Bulguları

Bu hasta grubunda tanı koyabilmek için hastanın medikal ve dental hikayesi dinlenilir. Bu hikayenin klinik bulgularla örtüşmesi gerekir. BRONJ lezyonları ağız içinde çoğu zaman asemptomatik olarak bulunur ve küçük lezyonların hasta farkında değildir. Bu tabloya enfeksiyonun katılmasıyla beraber hastalarda semptom olur, hastalar ağrı semptomları ile doktora başvuru yapar ve lezyon bu şekilde ortaya çıkar. BRONJ tanısının koyulmasında erken dönemdeki bulgulardan biri de diş mobilitesidir. Bu diş mobilitesi herhangi bir periodontal hastalıkla ilişkili değildir.^{38,52,39}

Radyografik değerlendirmede ise; ortopantomografi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri kullanılabilir. Radyografik bulguları, erken dönem ve geç dönem bulgular olarak ikiye ayırabiliriz. Lezyon başlangıç aşamasında ise radyografik bulgular sınırlıdır ve

periodontal aralıkta daralma, kortikal kemikte kalınlaşma, gecikmiş iyileşme ile karakterize çekim boşlukları, alveoler bölgelerde radyolüsent alanlar şeklinde görülebilir. Geç dönem bulgular arasında ise geniş osteolizis alanları, sekestrasyon oluşumu ve patolojik fraktürler, izlenebilecek bulgular arasındadır.^{53,54}

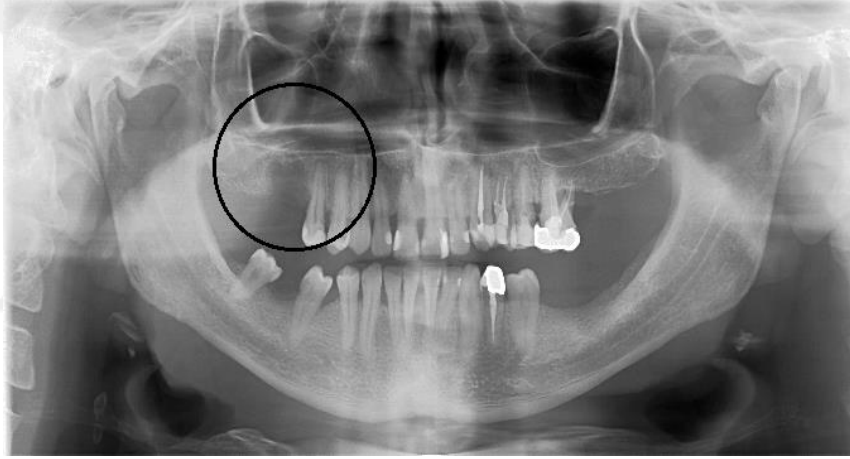
Son yıllarda semptomatik ve asemptomatik BRONJ lezyonları olan bireylerde, 3 fazlı kemik taramaları görüntüleme amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemle nekroz bölgelerinde yüksek düzeyde radyonüklid emilimine bağlı olarak, lezyonun tanısı, geleneksel yöntemlere göre 10-14 gün kadar daha erken koyulabilir. Başka bir görüntüleme yöntemi de tetrasiklin kemik floresan metodudur. Bu yöntemle, osteonekroz alanlarının sınırları net bir şekilde belirlenebilir. Bu yöntemde sadece canlı kemik alanları görüntü verdiğinden, cerrahi tedaviye destek amacıyla kullanılmaktadır.³⁸



Resim 1: BRONJ'un klinik görünümü



Resim 2: BRONJ'un klinik görünümü(2)



Resim 3: BRONJ'un panoramik görüntülemesi

BRONJ riskini değerlendirmek için bazı serum belirteçleri vardır. Marx ve ark. serum kollajen terminal telopeptid(CTX) düzeylerinin önemli olduğunu ve BRONJ gelişmiş hastalarda değerlendirilmesi gerektiğini belirtmiştir.³⁵ Serum CTX seviyelerinin marker olarak Kabul edilmesi bazı otörler tarafından eleştirilse de ilaç tatili için yararlı olabileceği kabul edilmiştir.⁵⁵

2.3.11 BRONJ Evreleme Sistemi

Hastalıkların evrelendirilmesi farklı evrelerdeki belirti ve bulguların gruplandırılması ve değerlendirilmesi sürecini tanımlamaktadır. Evreleme tedavi yönteminin seçilmesinde ve sonuçların tahmin edilmesinde önemlidir. BRONJ lezyonlarının evrelendirilmesi için farklı sistemler önerilmektedir. Weitzman ve ark. 2006 yılında evreleme sistemi önermiştir fakat bu

kullanılabilirliğini kaybetmiştir.⁵⁶ McMahon ve ark. önerdiği sistemde ise, hastalığın erken evrelerinde radyolojik ve histolojik sonuçlara göre evreleme teklif etmişlerdir. Ancak bu öneri, uygulaması zaman alıcı ve zor olduğu için kabul görmemiştir.⁵⁷ Kwon ve ark. ise serum CTX düzeylerini baz alan evreleme sistemi teklif etmiş ancak sonradan bu sistem de kabul görmemiştir.⁵⁵

Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi Derneği (AAOMS) 2009 yılında BRONJ evreleme sistemi önermiştir ve kabul görmüştür.³²



Tablo 3. BRONJ evreleme sistemi

BRONJ Evresi	Tedavi Yaklaşımı
Risk kategorisinde Oral veya IV bifosfonat kullanan hastada nekrotik kemik bulunmamakta	Herhangi bir tedavi gerekli değildir Hasta bilgilendirilmelidir
Evre 0 Klinik olarak nekrotik kemik gözlenmemekte Spesifik olmayan semptomlar ve klinik bulgular mevcut	Semptomatik tedavi Ağrı kesiciler Antibiyotik kullanımını da içeren sistemik tedavi
Evre 1 Asemptomatik hastada enfeksiyon bulgusu olmadan açığa çıkmış nekrotik kemik varlığı	Oral antibakteriyel ağız gargarası (klorheksidin glukonat %0.12, 2 ay süre ile günde 2 kez) Hastanın 3 aylık aralarla klinik takibi Hasta eğitimi Bifosfonat tedavi endikasyonlarının hekimi tarafından tekrar değerlendirilmesi
Evre 2 Açığa çıkmış nekrotik kemik varlığı İlgili bölgede ağrı ve eritemle birlikte enfeksiyon varlığı Pürülan drenaj olabilir, olmayabilir	Oral antibakteriyel ağız gargarası (klorheksidin glukonat %0.12, 2 ay süre ile günde 2 kez) Oral antibiyotiklerle sempomatik tedavi Ağrı kontrolü Yumuşak doku irritasyonunu ortadan kaldırmak için yüzeysel debridman Oral antibakteriyel ağız gargarası Ağrı kontrolü Antibiyotik tedavisi Cerrahi olarak nekrotik kemiğin debridmanı veya rezeksiyonu
Evre 3 Ağrı ve enfeksiyonla birlikte açığa çıkmiş nekrotik kemiğe aşağıdaki bulgulardan 1 veya birkaçının eşlik etmesi: Nekrotik kemiğin alveoler kemik sınırlarını aşarak patolojik kemik kırığına sebep olacakkadar büyük olması (örn. Maksillada maksiler sinüz ve zigomaya kadar uzanması) Ekstraoral fistül varlığı Oroantral/oronazal açıklığın varlığı Osteolizis varlığı	

BRONJ tanısının doğrulanması için kriterler:

- Bifosfonat tedavisi altında olan, çene kemiklerine radyoterapi uygulanmamış hastalarda 8-12 haftada iyileşmeyen açığa çıkmış kemik varlığının olması osteonekroz tanısını doğrular.
- Hastalığın evresine bakılmaksızın, etkilenmemiş kemik açığa çıkartılmadan mobil kemik, sekestr parçaları uzaklaştırılmalıdır. Açığa çıkmış nekroze kemik içindeki dişin çekimi düşünülmelidir.
- Hastanın allerjisi yoksa genellikle uzun süreli düşük doz penisilin grubu tercih edilmelidir. Yüksek dozlar akut alevlenmelerde kullanılabilir. Amoksisilin 500 mg, 14 gün süreyle günde 3 kez (Metronidazole ile kombine edilebilir), Metronidazole 250 mg, 14 gün süreyle günde 3 kez kullanılmalıdır.

2.4 Kemik

Kemik dokusu iskelet sisteminin en önemli bölümünü oluşturur ve bağ doku kökenlidir. Destek, dayanıklılık ve koruyucu gibi görevleri vardır. Kafatası ve toraksta olan yaşamsal organları korur. Metabolik değişiklikler şeklinde yaralanma nutrisyonel etkilenmelere ve endokrinolojik olaylara cevap verir.^{58,59} Kemik dokusunun aşağıdaki temel konksiyonları vardır:

1. Mekanik fonksiyon; Kasların kemiklere yapışma yerleri ve bu kasların fonksiyonu için dayanak görevi görmesidir.
2. Koruyucu fonksiyon; Kafatası ve toraks boşluğundaki organların ve diğer dokuların korunması. Kemik iliğini içerisinde muhafaza ederek kan elemanlarının oluşumunu sağlaması.
3. Metabolik fonksiyon; Fosfat, kalsium ve kalsium iyonlarının depolanması ve homeostaz fonksiyon.

Kemik dokusu vücutta iyon dengesinin sağlanmasında önemlidir. Vücuttaki total kalsiumun %99'u, fosforun %88'i, magnezyumun %50'sini kendinde tutar ve bu iyonlar için depo görevi görür. Büyümenin sağlanmasında çok önemlidir ve hematopoetik hücreler barındıran bir doku olarak görev yapar.^{60,61}

Kemik morfolojik yapı olarak, kortikal, spongiyoz ve non-lamellar olarak 3'e ayrılır. Non-lamellar kemik erişkinde genelde bulunmaz. Embriyonik dönemde ve hiperparatiroidizmin olduğu olgularda görülmektedir.

Kortikal kemik, sert bir yapıda olup, kompakt veya lamellar kemik olarak da bilinir. Tüm kemiklerin dış yüzeyleri kortikal kemikten oluşur, aynı zamanda uzun kemiklerin gövde kısmı da kortikal kemikten oluşur. Lamellar yapılar Haversian ve Volkman kanallarının etrafında yerleşir. Bu sistem kemiğin vasküler desteğini oluşturur ve kemik hücreleri arasında bağlantı kurar.

Spongiyoz kemik ise uzun kemiklerin metafiz ve diafiz bölgelerinde, yassı kemiklerin ise merkezinde bulunmaktadır. Spongiyoz kemik, kortikal kemiğe destek sağlayan, trabeküler yapıda, süngerimsi şekilde bulunur. Bu yapı kan damarları içerir ve kemiğin beslenmesi ve trabeküler kemiğin desteklenmesinde rol oynar.⁶²

2.4.1 Kemik Matriksi

Kemik, organik ve inorganik kısımlardan oluşur. %65-70 oranında inorganik, %30-35 oranında organik kısım vardır. Bu organik bileşenlerin %95'i kollajenden oluşur. Ağırlıklı olarak tip 1 kollajen bulunmaktadır. Geri kalan kısım ise hücrelerden ve sudan oluşmaktadır.^{62,63}

2.4.2 Organik Matriks

Kemiğin organik yapısı kollajenden ve kolajen olmayan protein yapıdan oluşur. %90-96 oranında kollajen ve %4-10 oranında ise kollajen olmayan protein yapılar organik yapıyı oluşturur. Kollajen yapılar arasında farklılıklar vardır. Organik matriksin esas yapısal bileşeni Tip 1 ve Tip 5 kollajenden oluşur. Derideki kollajenle benzer özellikler taşır ve daha yoğun, mekanik olarak daha dirençli bir yapısı vardır. Bu mekanik dirençli yapı inorganik matriksin oluşması için gerekli yapıyı oluşturur.⁶⁴

2.4.3 İnorganik Matriks

İnorganik matriks dediğimizde, en önemli bileşen Hidroksiapatit(HA) kristalleridir. Kemiğin en önemli bileşeni olan bu kristaller $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ kimyasal yapıdadır ve 20-80 nm uzunluğundadır.

Kemik dokusunun sertlik ve dayanıklılığını sağlayan inorganik matriks, kemiğin kuru ağırlığının %50'ni oluşturmaktadır. Ancak hacim olarak %25'lik kısma denk gelmektedir.^{58,65} HA kristalleri kemiğin kollajen lifleri ile bağlantı halindedir. Yüksek gerilme ve sıkışma direncine sahip kemik dokusu bunun sayesinde devamlılığını sürdürür ve dayanıklılığını korur.^{66,58}

2.4.4 Kemik Doku Tipleri

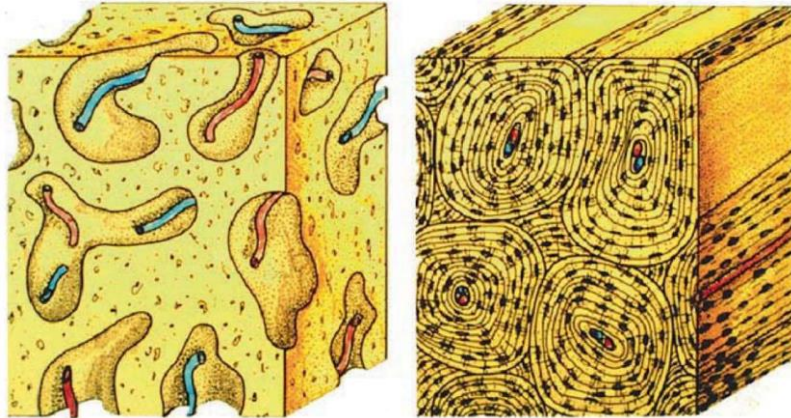
Kemik dokusu primer ve sekonder kemik olmak üzere iki tiptir.⁶⁷

2.4.4.1 Primer Kemik Matriks

Primer kemik dokusu organik matriksin düzensiz olduğu embrion sürecinde gözlenir. Alana düşen hücre sayısı yüksektir ve zamanla sekonder kemiğe dönüşür. Embrion döneminde esas olarak görülür, kafatası yassı kemiklerinde ve diş alveol soketlerinde rastlanabilir.⁶⁸

2.4.4.2 Sekonder Kemik Dokusu

Embriyonik gelişim sürecinde primer kemiğin yerini, 3-7 μ kalınlıktaki lamellerden oluşan sekonder kemiğe bırakır. Sekonder kemik de makroskopik olarak kortikal ve spongiyoz kemikten olarak ikiye ayrılır.⁶⁷



Şekil 1. Primer ve sekonder kemik

2.4.4.3 Kortikal Kemik

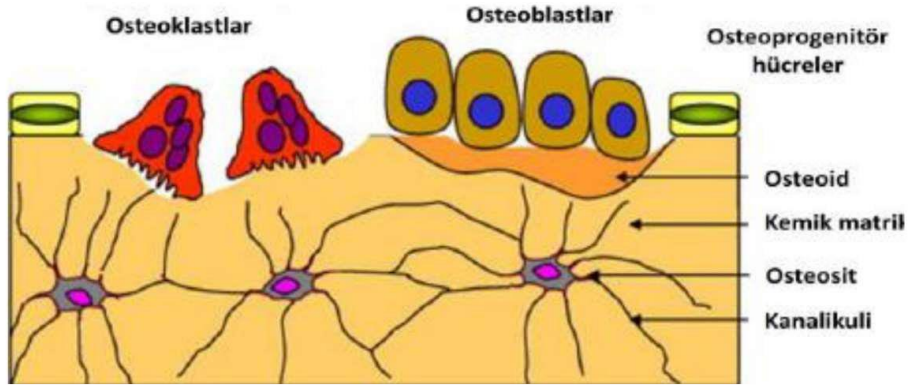
Kortikal kemik tüm yassı kemiklerin dış kısmını ve uzun kemiklerin gövdesini oluşturur. Erişkin iskeletin %80'ini oluşturan kortikal kemik, homojen dağılımlı, kompakt bir görünüme sahiptir. Mikroskopik olarak ise lamellar kemik ve düzenli kanallardan oluşan bir yapıdır. Haversian

kanalları uzun eksene paralel yerleşir ve bu kanallar Volkman kanalları ile bir birine bağlanır. Bu sayede periost ile kemik iliği arasında bağlantı sağlanır ve kemik metabolizmasında rol oynar. Haversian sistemi 4-20 kanaldan ibarettir ve biofonksiyonel kuvvetlere cevap vermesini sağlar. Kemik hücreleri bu kanallar üzerinde yerleşir, ince kanalcıklar vasıtasıyla birbirlerine ve damar içeren kanallara bağlanırlar. Her kanal endosteum ile çevrilidir ve içind ekan damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu bulunmaktadır.^{69,70}

2.4.4.4 Spongioz Kemik

Trabeküler kemik bölgelerinin birbiriyle anastomoz yaparak oluşturduğu süngerimsi bir yapıdır. Bu yapı kemiklerin iç bölgelerinde ve büyüme merkezlerinde yer alır.⁶² Kemik trabekülleri arasında birbiriyle bağlantılı boşluklar ve boşlukların içerisinde kemik iliği vardır. Bu trabeküler yapının kemiği beslemesi ve kortikal kemiği destekleme fonksiyonları vardır. Hacimsel olarak bütün vücudun kemiklerinin %20'ni oluşturur ve dirençsiz bir yapıdır.⁷¹

2.5 Kemik hücreleri



Şekil 2: Kemiğin hücreleri⁷²

2.5.1 Osteoprogenitör kök hücreler

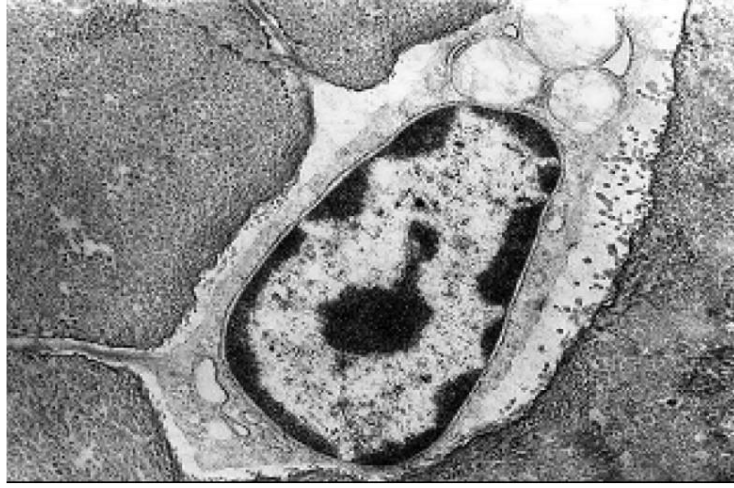
Osteoprogenitör hücreler mezenkim hücrelerinden köken alır. İğsi şekilli, soluk boyanan, oval çekirdekli hücrelerdir. Mitozla bölünüp farklılaşarak, osteoblast, osteoklast, fibroblast ve kondroblastlara dönüşürler.⁶⁹

2.5.2 Osteoblastlar

Osteoblastlar osteoprogenitör hücrelerden köken alırlar. Şekil itibarıyla silindirik ve kübik şekilli olabilirler. Aktif kemik oluşturan tüm bölgeleri tek tabaka şeklinde kaplarlar. Kemik matriksinin organik kısmının oluşmasından sorumludurlar ve demineralize organik matriksin kalsifikasyonunu başlatır ve kontrol ederler.^{73,74} Kemik proteinlerinin %90'ını oluşturan Tip 1 kollajeni, kemik matriks proteinlerini ve büyüme faktörlerini salgırlar. Bunun yanında kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesinde osteoklastlarla beraber rol alırlar. Osteoblastlar kemik oluşumu bittiği zaman mineralize matrikse gömülerek osteositlere dönüşürler ve çevreleri için matriks sentezleyerek sabit bir yapıya dönüşürler.⁷⁴

2.5.3 Osteositler

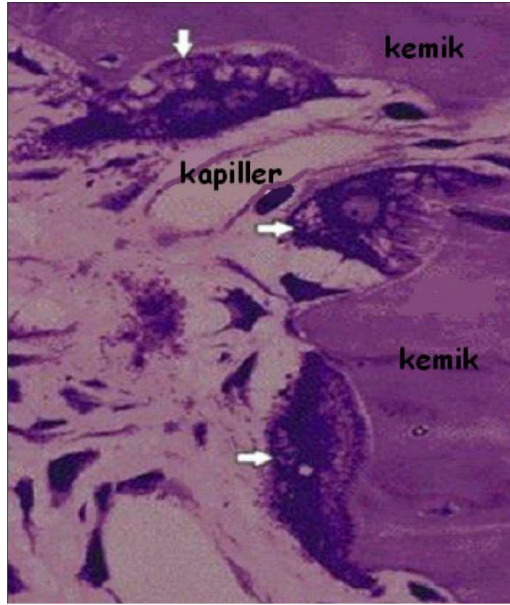
Osteositler lameller kemik lamelleri arasında, laküna denen boşluklarda yer almaktadırlar. Kanaliküller ile birbirlerine bağlanan komşu lakünalar besin maddelerinin hücreden hücreye geçişini sağlarlar. Kemik ekstrasellüler matriksinin devamlılığının korunmasında önemli rol alan osteositler kemik matriksinin bakımından sorumludurlar ve herhangi bir nedenle ölümlerini takiben matrikste çözünmeler gözlenmektedir.⁷³



Şekil 3. Osteosit⁷³

2.5.4 Osteoklastlar

Çok çekirdekli büyük hücreler olan osteoklastlar, kemik iliğindeki monosit-makrofaj gibi progenitör hücrelerden köken almaktadırlar. Bu hücreler kemik rezorpsiyonundan sorumludurlar. Ayrıca “Howship lakünaı” adı verilen yüzeysel çukurların içerisine yerleşmişlerdir.⁷³ Osteoklastların kemik matriksine bakan yüzündeki düzensiz yapıda olan fırçamsı kenarları kemik rezorbsiyonu için mikro çevre oluşturmakla görevlidir. Osteoklastlardan kemik matriksini rezorbe edebilen asit, kollajenaz ve diğer proteolitik enzimler salınır. Bu enzimlerin meydana getirdiği asidik ortam, kalsifiye olmuş temel maddeyi çözünür serbest hale getirmektedir. Bu süreç farklı bölgelerdeki kemiğin rezorpsiyonunu takiben osteoblastlar tarafından oluşturulan yeni kemik oluşumu ile yer değişimini içerir. Kemiğin yapım ve yıkım olayları sonucu remodelinginde, osteoklastlar osteoblastlarla beraber önemli rol alırlar.^{73,74}



Şekil 4. Osteoklastlar⁷³

2.6 Hidrojen Sülfid Sinyal Molekülü

Hidrojen sülfid (H_2S), çürük yumurtaların kokusuna sahip renksiz ve zehirli bir gazdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, H_2S 'nin çeşitli sinyal yollarını düzenlemek için bir gaz ileticisi olarak hizmet ettiğini göstermiştir.⁷⁵ H_2S kemik kütlesinin oluşması ve korunmasıyla da ilgilidir çünkü Ca^{2+} iyon akışını Ca^{2+} kanalları üzerinden düzenleyerek kök hücre işlevini kontrol eder. H_2S eksikliği, kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını bozar. Buna göre, sistatyonin b-sentaz (CBS) eksikliği olan bireyler osteopenik bir fenotip sergiler.⁷⁶

2.6.1 Hidrojen sülfid metabolizması

Hidrojen sülfid metabolizmasındaki her hangi bir dengesizlik kusurlu kemik hemostazı ile ilgilidir. Memelilerde H_2S , iki piridoksal-50-fosfata bağlı enzim tarafından katalizlenen L-sisteinden(sistatyonin b-sentaz (CBS) ve sistatyonin g-liyaz (SGL)) sentezlenir. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (KİMKH) ve KİMKH türevi osteoblastlar, kemik mineral yoğunluğunu (KMY) korumak için kemik oluşumundan ve osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunun dengelenmesinden sorumludur. KİMKH'lerin H_2S üretilip üretilmediği veya H_2S seviyelerinin KİMKH fonksiyonunu etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. Yapılan çalışmada KİMKH'lerin hem CBS hem de SGL'i ifade ettiğini ve H_2S ürettiğini gösterilmiştir . Daha da önemlisi H_2S KİMKH'lerde kök hücre özelliklerini korumak için gereklidir.⁷⁶

2.6.2 Doku rejenerasyonuna etkisi

Geçtiğimiz yıllarda, mezenkimal kök hücre (MKH) nakli alanındaki araştırmaların ilerlemesi, MKH'lerin doku rejenerasyonu için yüksek bir potansiyele sahip olduğu tespit edildiğinden rejeneratif tıpta kilometre taşları getirmiştir. Ek olarak, H₂S son zamanlarda çeşitli organ sistemlerinde bir modülatör veya hücre canlılığı / apoptoz inhibitörü olarak önerilmiştir. Son çalışmalar, H₂S uygulamasının, çoklu stres formlarını (düşük oksijen, oksidatif hasar veya serum yoksunluğu) indüklenen apoptozisi önleyerek MKH'lerin proliferasyonunu ve sağkalımını güçlendirdiğini göstermiştir.^{77,8,6} Başka bir çalışma H₂S donörünün (GYY4137) distraksiyon osteogenezi tavşan modelinde distraksiyonu desteklediğini bildirmiştir.⁹ Diğer bir çalışmada ise endojen hidrojen sulfid seviyelerinin distraksiyon osteogenezi sırasında yükseldiği bildirilmiştir.¹²

2.6.3 Kemik iyileşmesi üzerine etkisi

Bununla birlikte, H₂S aracılı kemik iyileşmesinin mekanizması hala belirsizdir. Sistatinyonin gama-lyaz enziminin (SGL) osteoblastlarda H₂S üreten başlıca enzim olduğu bildirilmiştir. Mekanik olarak, SGL-H₂S sistemi, yeni bir işlem düzenleyici olarak RUNX2 sülfhidrasyonu yoluyla osteogenez aktivitesini artırır, böylece kemik iyileşmesini artırır. Bu bulgular, H₂S metabolizmasının veya H₂S donörlerinin modülasyonunun, osteoporoz veya diğer kemik hastalıklarının tedavisi için terapötik bir yaklaşım olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, moleküler mekanizma araştırılmalıdır.¹⁰

H₂S, KİMKH'lerde kök hücre özelliklerini korumak için gereklidir.⁷⁶ Bu hipotez, çalışmamızda bifosfonatla ilişkili çene osteonekrozlarında hidrojen sulfid donörünün etki mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Özellikle bu etkisini nekroz alanındaki boş kemik lakunalarına KİMKH'in göçünü sağlayarak göstereceğini düşünmekteyiz. BP ile ilişkili osteonekroz gelişmiş alana kök hücrelerin göçü kemik rejenerasyonunu arttırabilir ve klinik olarak iyileşme ile sonuçlanabilir.

Son yıllarda BP ile ilişkili osteonekroz gelişiminin engellenmesi ve tedavisini öngören birçok çalışma yapılmıştır. Farklı türde sistemik ve lokal preparatların etkinliğini değerlendiren yayınlar mevcuttur. H₂S donörünün bu süreçte olan etkisini değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Yapmayı planladığımız projede sistemik olarak uygulanan H₂S donörünün BP ile ilişkili osteonekroz

oluşumunu önlemede etkinliğini değerlendirmektir. Çalışmamızdan elde edilecek sonuçlar ile birçok hastanın muzdarip olduğu bu sıkıntılı medikal süreçte hastaların tedavisi ve yaşam kalitesine olumlu anlamda katkıda bulunulması istenmektedir. Ayrıca bu çalışmadan yola çıkarak H₂S donörünün birçok farklı kemik yıkım bozukluğunda tedavi sürecine ışık tutması düşünülmektedir.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 03.09.2019 tarihli, 2019/48 protokol no'lu onayı ile Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde yürütülmüştür. Çalışmamızda 42 adet ergin dişi 250-300 gr ağırlığında wistar sıçan kullanılmıştır. Tüm hayvanlar çalışma öncesi sistemik enfeksiyon ve anatomik malformasyon açısından değerlendirilmiştir. sıçanlar Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde her grup için ayrı kafeslerde, aynı laboratuvar şartlarında barındırılmıştır. Hayvanlar için standart şartlar olan 20 ± 2 C° sıcaklık, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık %50 $\pm$ 10 nem oranı ve havalandırma tertibatı olan güneş alan bir ortam sağlanmıştır. Hayvanlar herhangi bir kısıtlama ve özel koşul uygulamaksızın standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir.

3.2 Deney gruplarının oluşturulması

Bu çalışma klasik cerrahi, farmakolojik⁷⁸ ve histomorfometrik^{79,80} yöntemlerin kullanılacağı in vivo deneysel bir çalışmadır. Çalışmada rastgele seçilmiş 250-300 g ağırlığında ve kontrol grubunda 6, diğer deney gruplarında da 12 adet olmak üzere toplam 42 adet dişi sıçan kullanılmıştır.

Sıçanlar deney boyunca 12 saat karanlık-aydınlık ortamda tutulacak, standart yemlerle beslenecektir. Sıçanların hepsi 8 haftalıkken deney periyoduna dahil edilmiştir. Tüm Sıçanlar deney başladıktan 16 hafta sonra sakrifiye edilmiştir

Tablo 4: Deney grupları

Gruplar	İsimlendirme
1. Kontrol grubu.	Kontrol
2. Serum grubu	SF, SF+Ext
3. Zoledronik asit grubu	ZA, ZA+Ext
4. Zoledronik asit + Hidrojen sulfit grubu	ZA+HS, ZA+Ext+HS

- 1.Kontrol grubundaki hayvanlar normal anatomik değerlendirme için kullanılmıştır.
- 2.Serum grubunda sağ birinci molar çekilmiş SF+Ext grubu oluşturulmuştur. Sol birinci molar çekilmeyerek SF grubu oluşturulmuştur.
- 3.Zoledronik asit grubu sağ birinci molar çekilerek ZA+Ext grubu oluşturulmuştur. Sol birinci molar çekilmeyerek ZA grubu oluşturulmuştur.
- 4.Zoledronik asit + Hidrojen sulfit grubu sağ birinci molar çekilerek ZA+Ext+HS grubu oluşturulmuştur. Sol birinci molar çekilmeyerek ZA+HS grubu oluşturulmuştur.

3.3 Deneye Hazırlık

Çalışmamızdaki sıçanlardan diş çekimi öncesi anestezi uygulamak için önce tartılarak ağırlıkları belirlendi. Her hayvan için uygun anestezi dozu hesaplandıktan sonra 50mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® flk., Pfizer, 50mg/ml solüsyon) ve 10mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun ® enj. %2 sol. Bayer, Germany) işlem yapılacak gruba intraperitoneal olarak uygulanıp, karanlık, sessiz bir odada bekletildi.

3.4 Deney aşaması

1. Kontrol grubu: cerrahi işlem uygulanmadı. 8. haftanın sonunda hayvanlar sakrifiye edilmiştir.



Resim 4. Salin enjeksiyonunun İP yapılışı

3. Serum grubu: cerrahi işlem uygulanmadı. Bu gruptaki 12 sıçana 8 hafta boyunca haftada 2 kere intraperitoneal (i.p.) 0.1 mg/kg serum fizyolojik enjekte edildi., 8 haftanın sonunda hayvanlar sakrifiye edildi.



Resim 5. BP enjeksiyonunun İP yapılması

3.Bifosfonat + Diş çekim grubu: bu gruptaki 12 sıçana 8 hafta boyunca haftada 2 kere 200 µg/kg zoledronat(Ostezolen®, Recordati, Türkiye) i.p. enjekte edildi, hayvanlar bir gece aç bırakıldıktan sonra cerrahi işlem(mandibula sağ birinci molar diş çekimi) gerçekleştirildi ve hayvanlar 8 hafta daha yaşatıldı. Diş çekim işlemini takip eden 8. haftanın sonunda sakrifiye edildi.

4.Bifosfonat + Diş çekimi + Hidrojen sulfid grubu: bu gruptaki 12 sıçana 8 hafta boyunca haftada 2 kere 200 µg/kg zoledronat(Ostezolen®, Recordati, Türkiye) i.p. enjekte edildi, hayvanlar bir gece aç bırakıldıktan sonra cerrahi işlem(mandibula sağ birinci molar diş çekimi) gerçekleştirildi. Diş çekimini takip eden 7 gün boyunca sıçanlara Hidrojen sulfid donörü(GY4137) 25 mg/kg/gün i.p. olarak enjekte edildi. Diş çekimini takip eden 8. haftanın sonunda hayvanlar sakrifiye edildi

Strandartizasyon: Diş çekimi için kullanılacak cerrahi ekipman steril örtü üzerine yerleştirildi. Mandibula sağ 1.molar dişe ulaşmak için yanak ekarte edildi. 15 no'lu bistüri ucuyla atravmatik şekilde periodontal ligamanlar kesildi. Dişlerin köklerini korumak için bistüri ucuyla elevasyon

gerçekleştirildi. Diş lükse edildikten sonra portegü yardımıyla atravmatik şekilde çekildi. Bütün deney gruplarında aynı cerrahi yöntemle aynı diş çekildi.



Resim 6. *Sıçanın yanağının ekarte edilmesi*



Resim 7. *Bistüri ile periodontal ligamentlerin kesilmesi*



Resim 8. *Bistüri ile dişin eleve edilmesi*



Resim 9. *Eleve edilmiş molar diş*



Resim 10. Deney gruplarının birinden çekilmiş 12 adet molar diş

3.5 Ötenazi ve Histolojik Örneklerin Toplanması

Sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Sağ ve sol mandibula, diş çekim soketi ve yumuşak dokuyu da içerecek şekilde diseke edildi. Histolojik ve histopatolojik analiz için fiksatif solusyona konularak laboratuara gönderildi.



Resim 11. Alınan Histopatolojik doku örneği

3.6 GYY4137 molekülünün sentezlenmesi

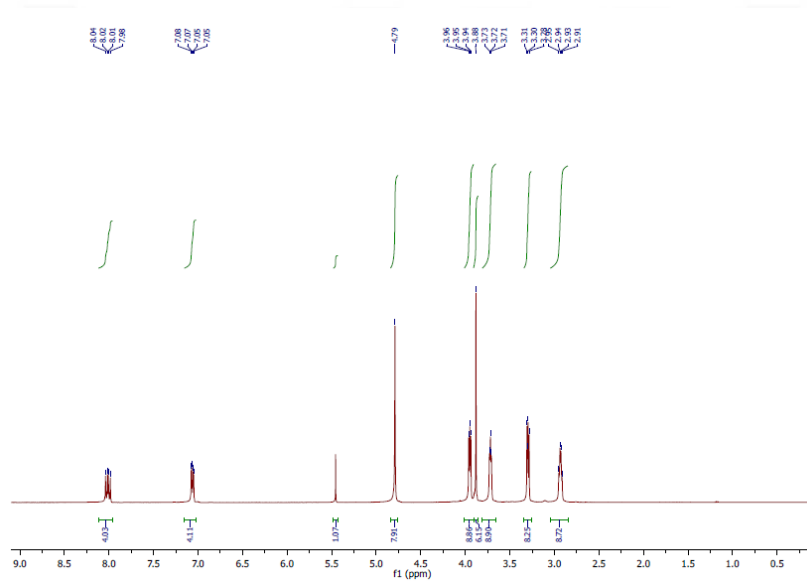
Hidrojen sülfür (H_2S) tıpkı Nitric oxide (NO) ve karbon monoxide gibi biyolojik öneme sahip endojen gazotransmitter türler arasında yer almaktadır. Özellikle H_2S in potansiyel biyolojik önemi ile alakalı yapılan son yıllardaki çalışmalarda elde edilen sonuçlar bu molekülün bu sahadaki öneminin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Genellikle biyolojik deneylerde kullanılan ve H_2S salınan ilaçlar, Sodyum hidrosülfide ($NaHS$) gibi basit sülfide tuzlarının sulu çözeltide H_2S salınımı ile ortaya çıkmaktadır. Ancak hücrelerden endojen H_2S salınımı sülfid tuzlarından az miktarda ve çok yavaş bir oranda açığa çıkmaktadır. Bu nedenle H_2S i geniş bir zaman diliminde serbest bırakabilen organik bileşikler dizayn edilmiştir.⁸¹

Bu çalışmada hem in vitro hem de in vivo olarak yapılan deneylerde H_2S salınımı oldukça yavaş olarak bilinen *Morpholinium 4-methoxyphenyl(morpholino)phosphinodithioate* (GY4137) bileşiğinin kullanılması planlandı. GYY4137, Lawesson's reaktifi ve morpholine bileşiklerinin dichloro methane (DCM) içerisinde muamele edilmesi sonucunda kristal formda elde edilebilen bir bileşiktir. Bu çalışmada ticari olarak satın alınan Lawesson's reaktifi ve morpholine bileşikleri 0 °C'de DCM içerisindeki reaksiyonu sonucunda sentezlendi.

Bu çalışmada kullanılan tüm reaktifler, aksi belirtilmedikçe ticari olarak mevcuttu. 1H NMR Spectra: Bruker 400 (Bruker Biospin AG, Fallanden, Switzerland) spectrometre.

Lawesson's reaktifinin (10 g, 0.025 mmol) Dichlorometan (100 mL) içerisindeki 0 °C'deki çözeltisine, Morpholine (9.62 g 0.11 mol) yine Dichlorometan (50 mL) içerisindeki çözeltisi damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı 4 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon sonucunda oluşan ürün reaksiyon ortamında çöker. Bu iyonik tuz süzüldü ve Dichlorometan (3x100 mL) kullanılarak yıkandı ve vakum altında kurutuldu. 12.4 g Beyaz renkli katı 67% verimle elde edildi. Daha önce karakterize edilmiş bir literatür bileşiği olan GYY4137 için alınan ^1H NMR spektrumunun literatür ile uyumlu olduğu belirlendi.⁸²

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.04 – 7.98 (m, 2H), 7.08 – 7.05 (m, 2H), 3.96 – 3.94 (m, 4H), 3.88 (s, 3H), 3.73 – 3.71 (m, 4H), 3.31 – 3.28 (m, 4H), 2.86 (dd, $J = 9.5, 5.4$ Hz, 4H).



Şekil 5. NMR Spectrum grafiği



Resim 12. *Distille suda çözülmüş GYY4137 kristali*

3.7 Histolojik Doku Takibi

Çalışmamızın histopatolojik değerlendirmesi Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda yapılmıştır. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra alınan kemik dokuları, %10 paraformaldehit'de tespit edilmiştir. Sonrasında dekalsifikasyon için %10 EDTA (pH 7.4) solüsyonunda yumuşayınca kadar bekletilmiştir ve her gün solüsyon yenilenmiştir. Dokular yumuşadıktan sonra tekrar suda yıkanmış ve ardından rutin ışık mikroskopi takibi yapıp parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan Leica mikrotom (Leica, Germany) ile 5 µm kalınlığında alınan kesitler için adheziv lamalar kullanılmıştır. Ardından alınan kesitlerde hematoksilin-eozin boyamalar gerçekleştirilmiştir. Ardından kesitler dehidrate edilip, ksilenle şeffaflandırma sonrası kapatılmış ve ışık mikroskobunda değerlendirilmeye alınmıştır.

Doku örneklerinde ışık mikroskobu düzeyinde çekim soketlerinin iyileşme potansiyeli değerlendirilmiştir. Alınan kesitlerde enflamasyon, nekroz, vasküler proliferasyon, osteoblast varlığı,

osteoklast varlığı ve fibroblastik proliferasyon değerlendirilmiştir. Hücre sayımı için osteoblast, osteoklast, osteosit ve fibroblast sayımı eşit büyüklükte alanlardan yapılmıştır.

3.8 İstatistiksel Analizler

Çalışmada yer alan değişkenlerin normal dağılıma uygunluk gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Değişkenlerin tanımlayıcı istatistiklerinin gösteriminde ortanca (minimum-maksimum) değerleri verildi.

SF, ZA, ZA+HS, SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının her biri için enflamasyon, nekroz, vasküler proliferasyon, osteoblast, osteoklast ve fibroblastik aktivite durumunun gösteriminde sayı (n) ve yüzde değerleri verildi.

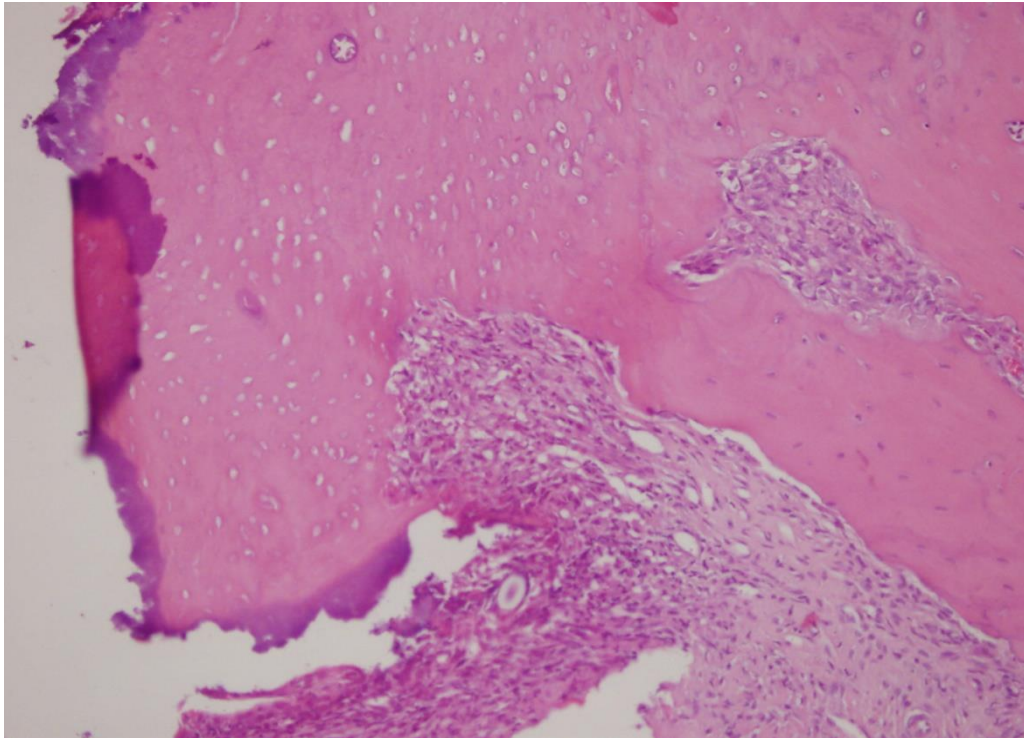
SF, ZA, ZA+HS, SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının enflamasyon, nekroz, vasküler proliferasyon, osteoblast, osteoklast ve fibroblastik aktivite durumu açısından karşılaştırılmasında Ki-Kare testi kullanıldı.

Yine, SF, ZA, ZA+HS, SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının osteoblast sayısı, fibroblast sayısı, osteoklast sayısı ve vasküler yapı sayısı açısından karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalar için Bonferroni metodu tercih edildi.

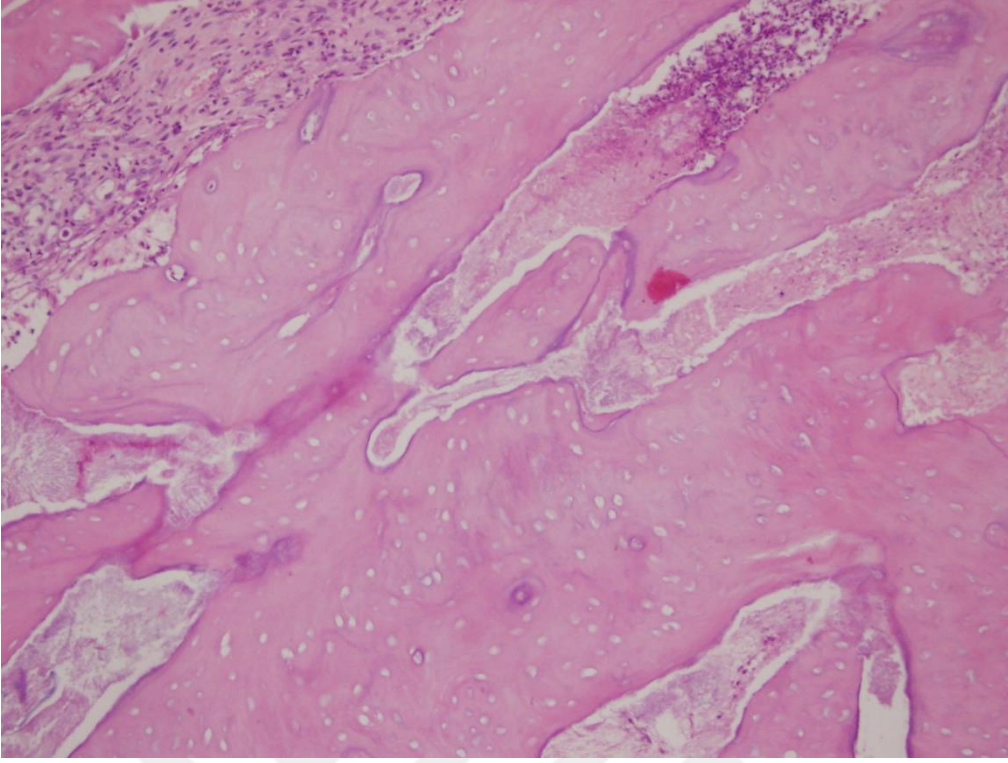
İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM Corp. Released 2019. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

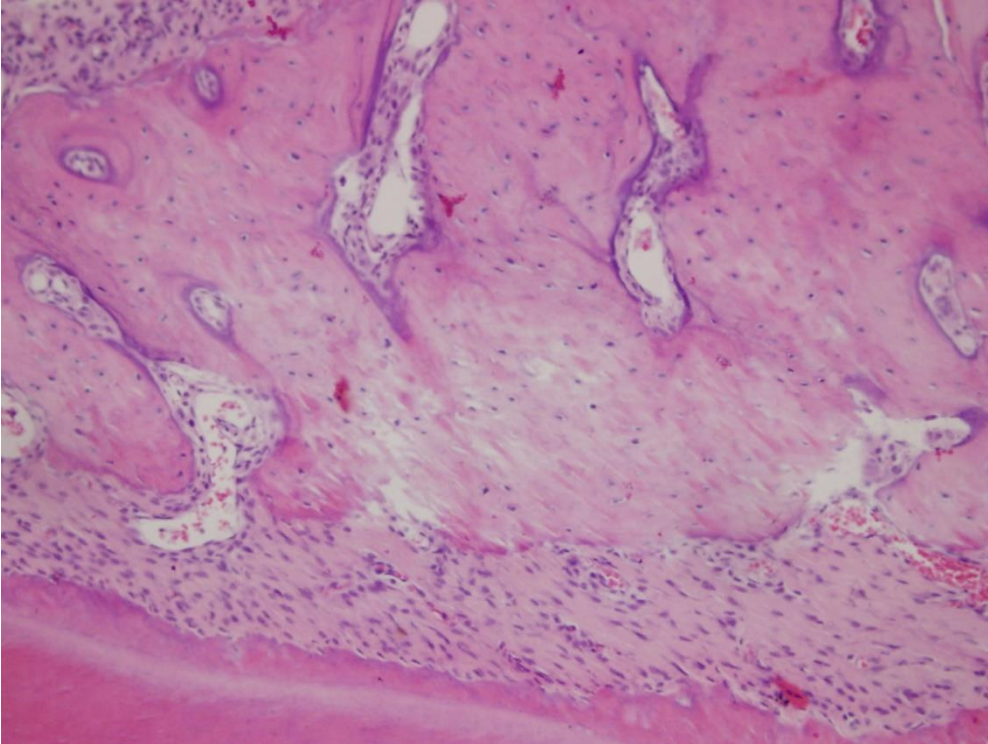
SF grubunun %83.3'ünde (n=10) enflamasyon yokken, %16.7'sinde (n=2) vardır. Yine SF grubunun tamamında (n=12, %100.0) nekroz, vasküler proliferasyon ve osteoklast yoktur. Bu sıçanların %33.3'ünde (n=4) osteoblast yokken, %66.7'sinde (n=8) vardır. Benzer şekilde %66.7'sinde (n=8) fibroblastik aktivite yokken, %33.3'ünde (n=4) vardır (Tablo 1). SF+Ext ve ZA+Ext+HS gruplarının %50.0'sinde (n=6) enflamasyon yokken, %50.0'sinde (n=6) vardır. SF+Ext ve ZA+HS gruplarının tamamında (n=12, %100.0) nekroz yokken, ZA grubunun %83.3'ünde (n=10), ZA+Ext grubunun %33.3'ünde (n=4), ZA+Ext+HS grubunun %58.3'ünde (n=7) nekroz yoktur. SF+Ext grubunun %66.7'sinde (n=8), ZA grubunun %50.0'inde (n=6), ZA+Ext grubunun %33.3'ünde (n=4), ZA+Ext+HS grubunun %16.7'sinde vasküler proliferasyon vardır. Benzer şekilde SF+Ext ve ZA+Ext grubu sıçanların tamamında (n=12, %100.0), ZA grubunun %83.3'ünde (n=10), ZA+HS ve ZA+Ext+HS gruplarının %66.7'sinde (n=8) osteoblast vardır. SF+Ext grubunun %16.7'sinde (n=2), ZA ve ZA+Ext gruplarının %50.0'sinde (n=6), ZA+HS grubunun %91.7'sinde (n=11), ZA+Ext+HS grubunun tamamında (n=12, %100.0) osteoblast vardır. Yine, SF+Ext, ZA ve ZA+Ext gruplarının %83.3'ünde (n=10), ZA+Ext grubunun %16.7'sinde (n=2) ve ZA+Ext+HS grubunun %50.0'sinde (n=6) fibroblastik aktivite vardır.



Resim 13. ZA+Ext grubu nekrotik kemiğin histopatolojik görüntüsü



Resim 14. *ZA+Ext grubu nekrotik kemiğin histopatolojik görüntüsü(2)*



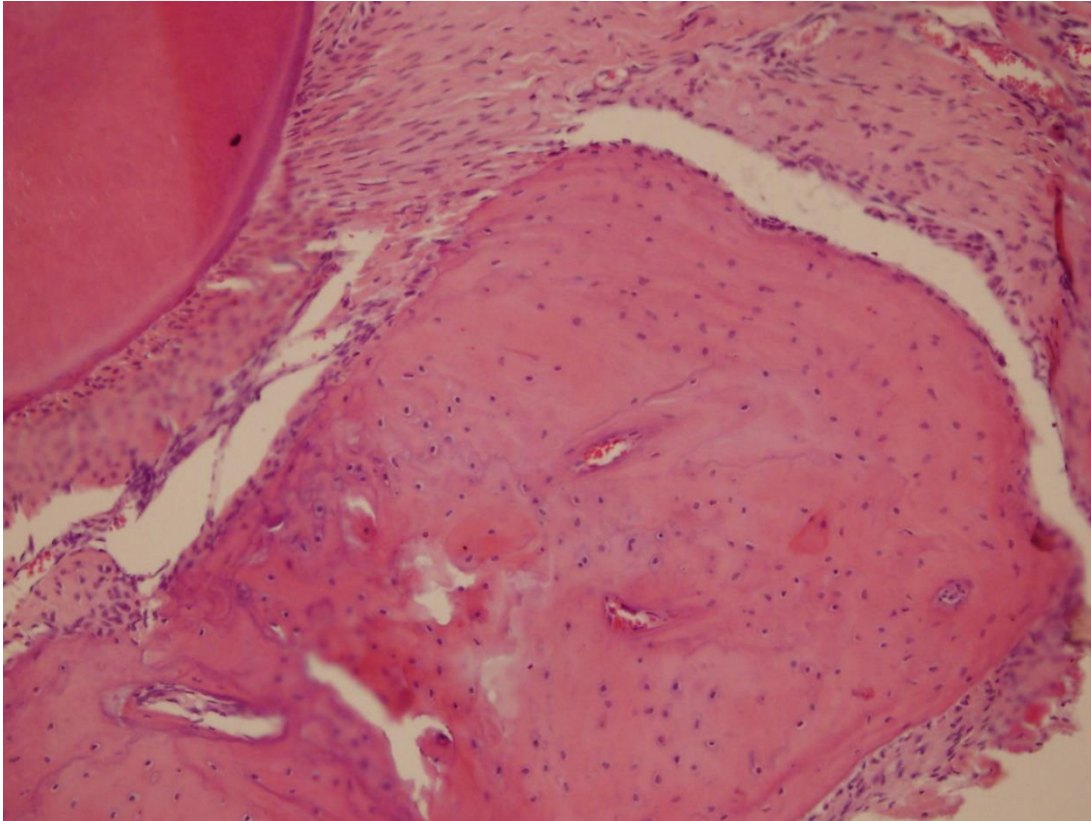
Resim 15. *ZA grubu molar diş kökü çevresinde artmış fibroblastik proliferasyon ve düzensiz kemik adaları*

Tablo 5. Gruplara göre ölçüm değerlerinin dağılımı

	Yok n (%)	Var n (%)
SF		
Enflamasyon	10 (83.3)	2 (16.7)
Nekroz	12 (100.0)	0 (0.0)
Vasküler Proliferasyon	12 (100.0)	0 (0.0)
Osteoblast	4 (33.3)	8 (66.7)
Osteoklast	12 (100.0)	0 (0.0)
Fibroblastik Aktivite	8 (66.7)	4 (33.3)
SF+Ext		
Enflamasyon	6 (50.0)	6 (50.0)
Nekroz	12 (100.0)	0 (0.0)
Vasküler Proliferasyon	4 (33.3)	8 (66.7)
Osteoblast	0 (0.0)	12 (100.0)
Osteoklast	10 (83.3)	2 (16.7)
Fibroblastik Aktivite	2 (16.7)	10 (83.3)
ZA		
Enflamasyon	2 (16.7)	10 (83.3)
Nekroz	10 (83.3)	2 (16.7)
Vasküler Proliferasyon	6 (50.0)	6 (50.0)
Osteoblast	2 (16.7)	10 (83.3)
Osteoklast	6 (50.0)	6 (50.0)
Fibroblastik Aktivite	2 (16.7)	10 (83.3)
ZA+Ext		
Enflamasyon	2 (16.7)	10 (83.3)
Nekroz	4 (33.3)	8 (66.7)
Vasküler Proliferasyon	8 (66.7)	4 (33.3)
Osteoblast	0 (0.0)	12 (100.0)
Osteoklast	6 (50.0)	6 (50.0)
Fibroblastik Aktivite	2 (16.7)	10 (83.3)
ZA+HS		
Enflamasyon	11 (91.7)	1 (8.3)

Nekroz	12 (100.0)	0 (0.0)
Vasküler Proliferasyon	12 (100.0)	0 (0.0)
Osteoblast	4 (33.3)	8 (66.7)
Osteoklast	1 (8.3)	11 (91.7)
Fibroblastik Aktivite	10 (83.3)	2 (16.7)
ZA+Ext+HS		
Enflamasyon	6 (50.0)	6 (50.0)
Nekroz	7 (58.3)	5 (41.7)
Vasküler Proliferasyon	10 (83.3)	2 (16.7)
Osteoblast	4 (33.3)	8 (66.7)
Osteoklast	0 (0.0)	12 (100.0)
Fibroblastik Aktivite	6 (50.0)	6 (50.0)

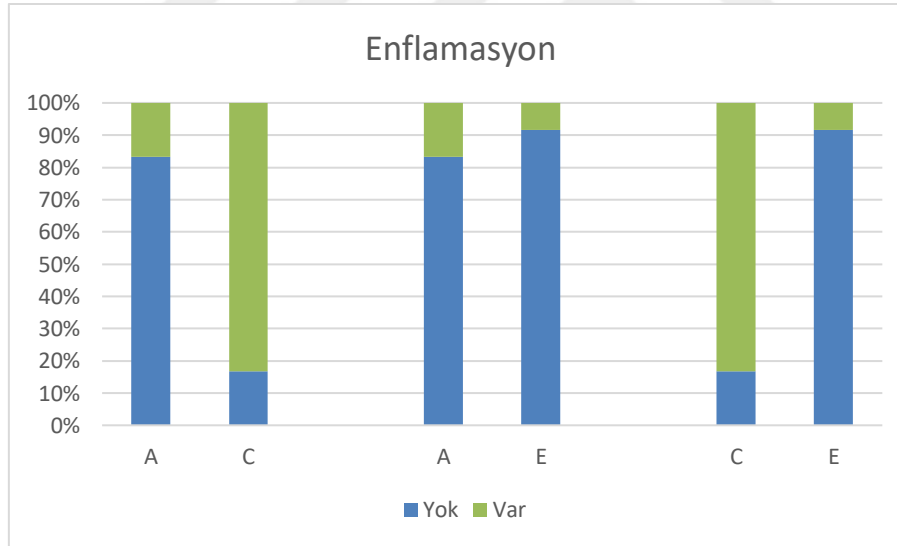
SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında enflamasyon durumu açısından anlamlı farklılık vardır (sırayla; $p=0.004$, $p=0.001$). SF ve ZA+HS grupları arasında enflamasyon durumu açısından anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 2) (Şekil 1).



Resim 16. SF grubu molar diş kökü çevresinde sağlıklı kemik dokusu

Tablo 6. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının enflamasyon durumuna göre karşılaştırılması

	Enflamasyon		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF	10 (83.3)	2 (16.7)	0.004
ZA	2 (16.7)	10 (83.3)	
SF	10 (83.3)	2 (16.7)	>0.999
ZA+HS	11 (91.7)	1 (8.3)	
ZA	2 (16.7)	10 (83.3)	0.001
ZA+HS	11 (91.7)	1 (8.3)	

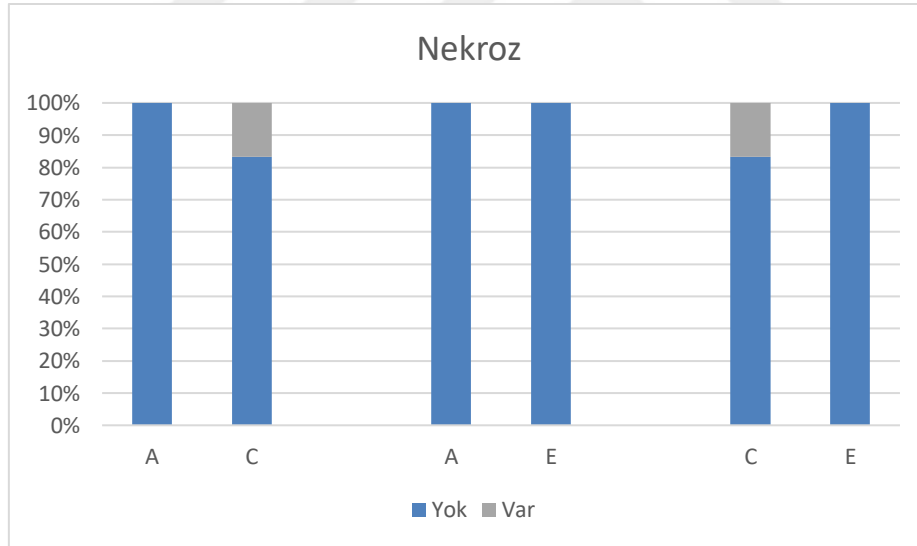


Şekil 6. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının enflamasyon durumuna göre karşılaştırılması

SF ve ZA, SF ve ZA+HS, ZA ve ZA+HS grupları arasında nekroz durumu açısından anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$) (Tablo 3) (Şekil 2).

Tablo 7. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının nekroz durumuna göre karşılaştırılması

	Nekroz		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF	12 (100.0)	0 (0.0)	0.478
ZA	10 (83.3)	2 (16.7)	
SF	12 (100.0)	0 (0.0)	-
ZA+HS	12 (100.0)	0 (0.0)	
ZA	10 (83.3)	2 (16.7)	0.478
ZA+HS	12 (100.0)	0 (0.0)	

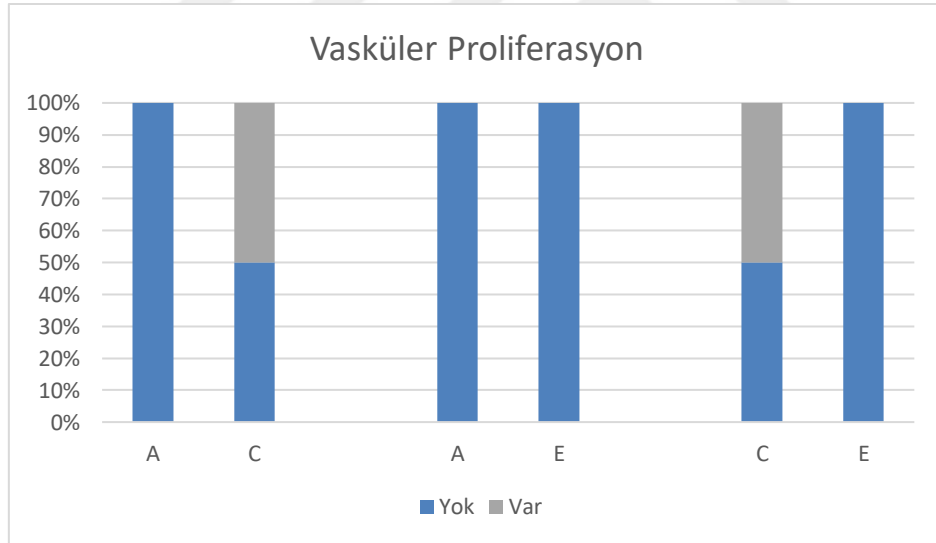


Şekil 7. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının nekroz durumuna göre karşılaştırılması

SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında vasküler proliferasyon durumu açısından anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p=0.014$) (Tablo 4) (Şekil 3).

Tablo 8. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının vasküler proliferasyon durumuna göre karşılaştırılması

	Vasküler Proliferasyon		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF	12 (100.0)	0 (0.0)	0.014
ZA	6 (50.0)	6 (50.0)	
SF	12 (100.0)	0 (0.0)	-
ZA+HS	12 (100.0)	0 (0.0)	
ZA	6 (50.0)	6 (50.0)	0.014
ZA+HS	12 (100.0)	0 (0.0)	

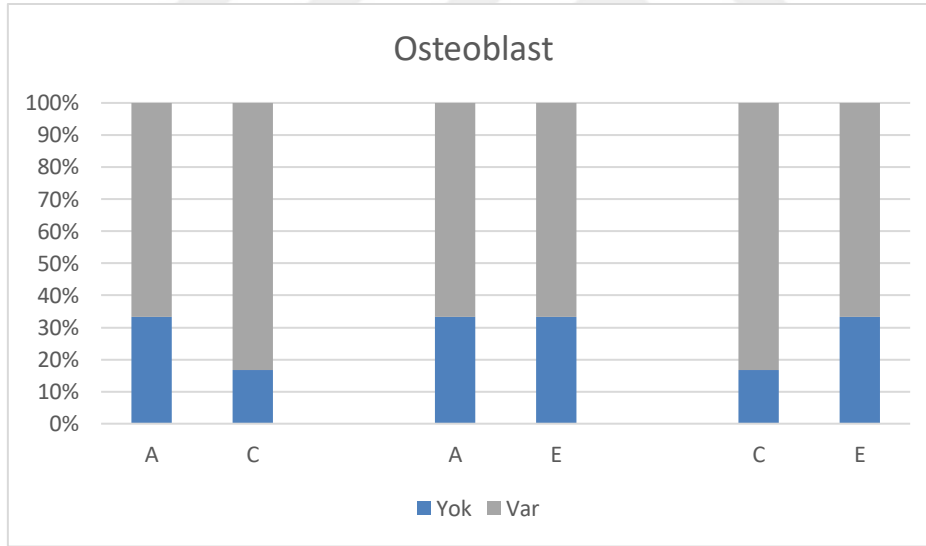


Şekil 8. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının vasküler proliferasyon durumuna göre karşılaştırılması

SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında osteoblast durumu açısından anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 5) (Şekil 4).

Tablo 9. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının osteoblast durumuna göre karşılaştırılması

	Osteoblast		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF	4 (33.3)	8 (66.7)	0.640
ZA	2 (16.7)	10 (83.3)	
SF	4 (33.3)	8 (66.7)	>0.999
ZA+HS	4 (33.3)	8 (66.7)	
ZA	2 (16.7)	10 (83.3)	0.640
ZA+HS	4 (33.3)	8 (66.7)	

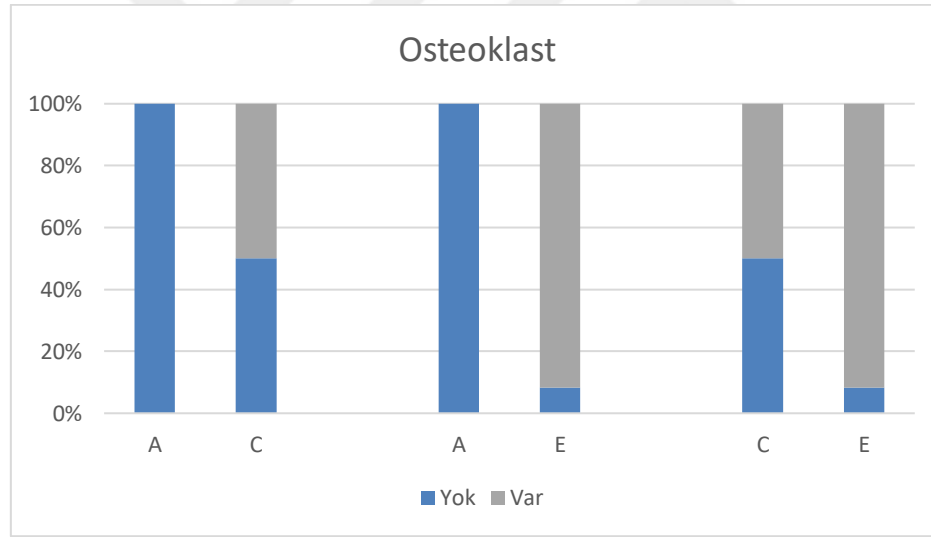


Şekil 9. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının osteoblast durumuna göre karşılaştırılması

SF ve ZA, SF ve ZA+HS grupları arasında osteoklast durumu açısından anlamlı farklılık olduğu bulunmuştur (sırayla; $p=0.014$, $p<0.001$). ZA ve ZA+HS grupları arasında osteoklast durumu açısından anlamlı farklılık yoktur (Tablo 6) (Şekil 5).

Tablo 10. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının osteoklast durumuna göre karşılaştırılması

	Osteoklast		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF	12 (100.0)	0 (0.0)	0.014
ZA	6 (50.0)	6 (50.0)	
SF	12 (100.0)	0 (0.0)	<0.001
ZA+HS	1 (8.3)	11 (91.7)	
ZA	6 (50.0)	6 (50.0)	0.069
ZA+HS	1 (8.3)	11 (91.7)	

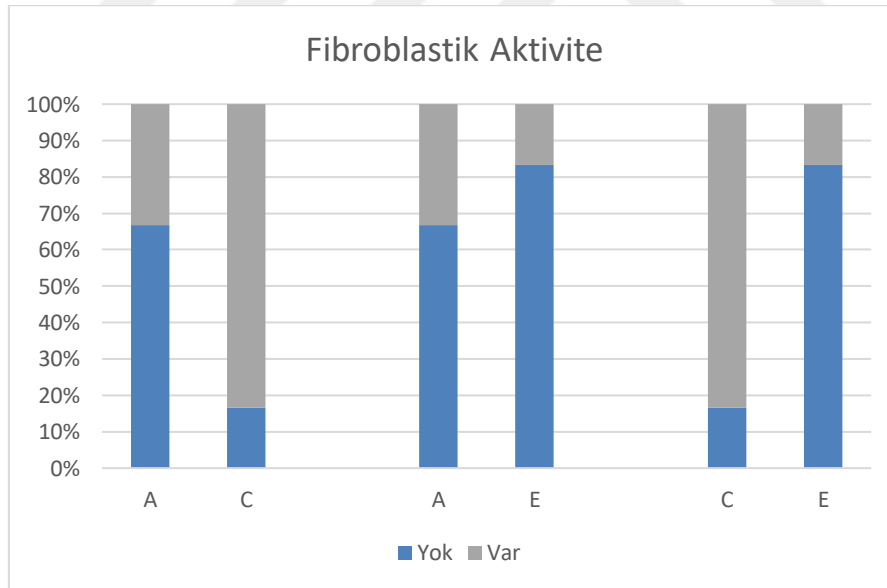


Şekil 10. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının osteoklast durumuna göre karşılaştırılması

SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında fibroblastik aktivite durumu açısından anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir (sırayla; $p=0.038$, $p=0.004$). SF ve ZA+HS grupları arasında osteoklast durumu açısından anlamlı farklılık yoktur (Tablo 7) (Şekil 6).

Tablo 11. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının fibroblastik aktivite durumuna göre karşılaştırılması

	Fibroblastik Aktivite		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF	8 (66.7)	4 (33.3)	0.038
ZA	2 (16.7)	10 (83.3)	
SF	8 (66.7)	4 (33.3)	0.640
ZA+HS	10 (83.3)	2 (16.7)	
ZA	2 (16.7)	10 (83.3)	0.004
ZA+HS	10 (83.3)	2 (16.7)	

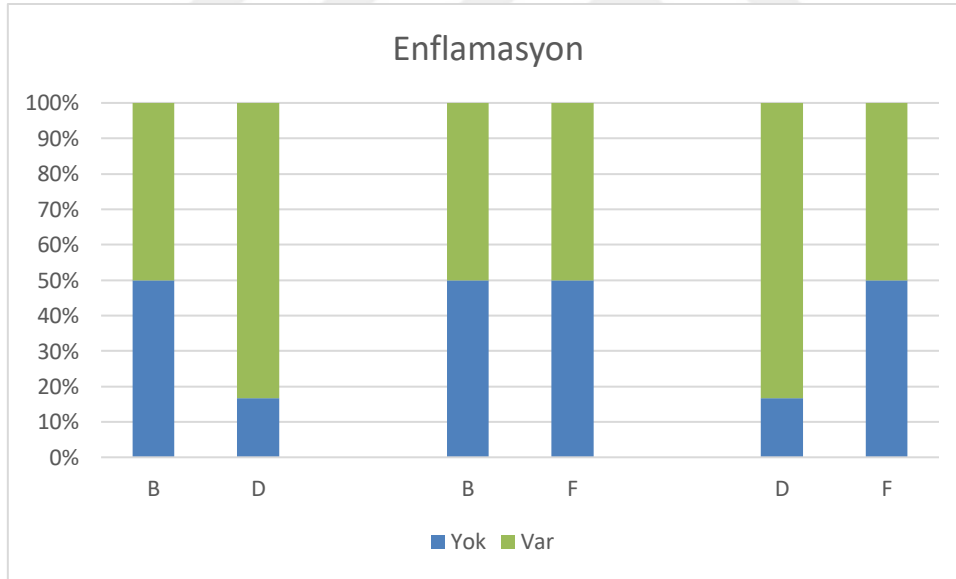


Şekil 11. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının fibroblastik aktivite durumuna göre karşılaştırılması

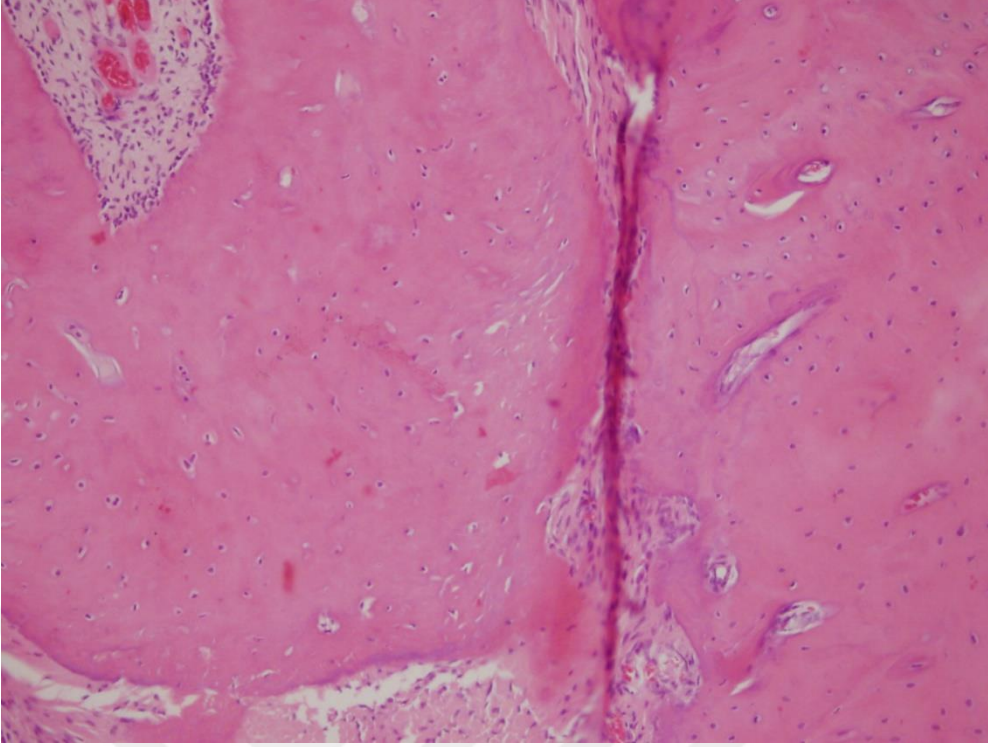
SF+Ext ve ZA+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında enflamasyon durumu açısından anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo 8) (Şekil 7).

Tablo 12. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının enflamasyon durumuna göre karşılaştırılması

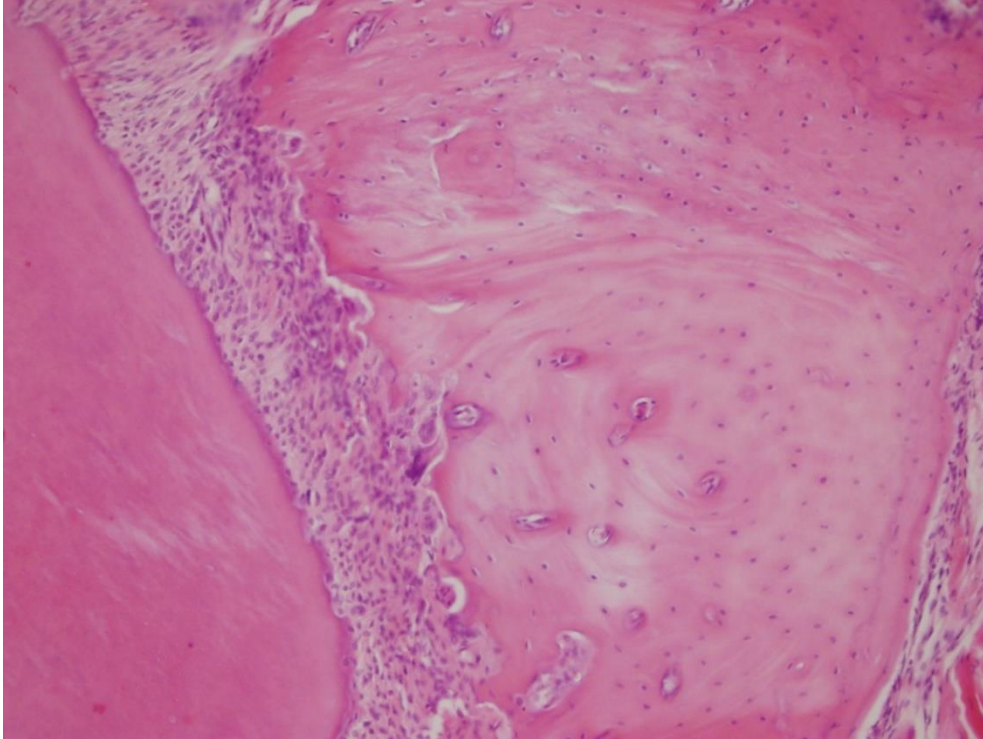
	Enflamasyon		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF+Ext	6 (50.0)	6 (50.0)	0.193
ZA+Ext	2 (16.7)	10 (83.3)	
SF+Ext	6 (50.0)	6 (50.0)	>0.999
ZA+Ext+HS	6 (50.0)	6 (50.0)	
ZA+Ext	2 (16.7)	10 (83.3)	0.193
ZA+Ext+HS	6 (50.0)	6 (50.0)	



Şekil 12. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının enflamasyon durumuna göre karşılaştırılması



Şekil 13. ZA+HS grubunda molar diş kökü çevresindeki sağlıklı kemik dokusu

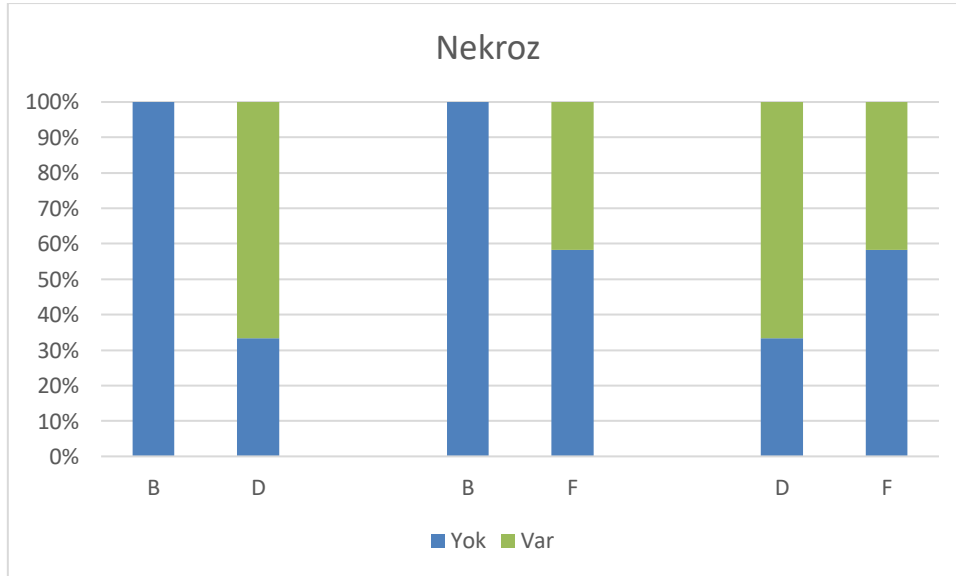


Şekil 14. ZA+HS grubunda molar diş kökü çevresindeki sağlıklı kemik dokusu ve normal boyutlardaki periodontal aralık

SF+Ext ve ZA+Ext, SF+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında nekroz durumu açısından anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir (sırayla; $p=0.001$, $p=0.037$). ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında nekroz durumu açısından anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0.05$) (Tablo 9) (Şekil 8).

Tablo 13. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının nekroz durumuna göre karşılaştırılması

	Nekroz		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF+Ext	12 (100.0)	0 (0.0)	0.001
ZA+Ext	4 (33.3)	8 (66.7)	
SF+Ext	12 (100.0)	0 (0.0)	0.037
ZA+Ext+HS	7 (58.3)	5 (41.7)	
ZA+Ext	4 (33.3)	8 (66.7)	0.413
ZA+Ext+HS	7 (58.3)	5 (41.7)	

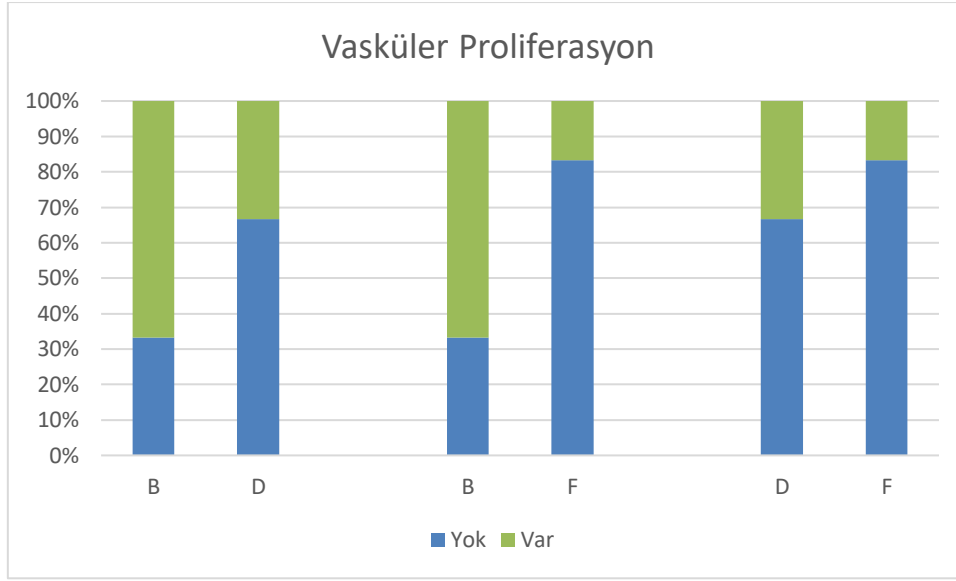


Şekil 15. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının nekroz durumuna göre karşılaştırılması

SF+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında vasküler proliferasyon durumu açısından anlamlı farklılık vardır ($p=0.038$). SF+Ext ve ZA+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında vasküler proliferasyon durumu açısından anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$) (Tablo 10) (Şekil 9).

Tablo 14. *SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının vasküler proliferasyon durumuna göre karşılaştırılması*

	Vasküler Proliferasyon		p
	Yok n (%)	Var n (%)	
SF+Ext	4 (33.3)	8 (66.7)	0.221
ZA+Ext	8 (66.7)	4 (33.3)	
SF+Ext	4 (33.3)	8 (66.7)	0.038
ZA+Ext+HS	10 (83.3)	2 (16.7)	
ZA+Ext	8 (66.7)	4 (33.3)	0.640
ZA+Ext+HS	10 (83.3)	2 (16.7)	

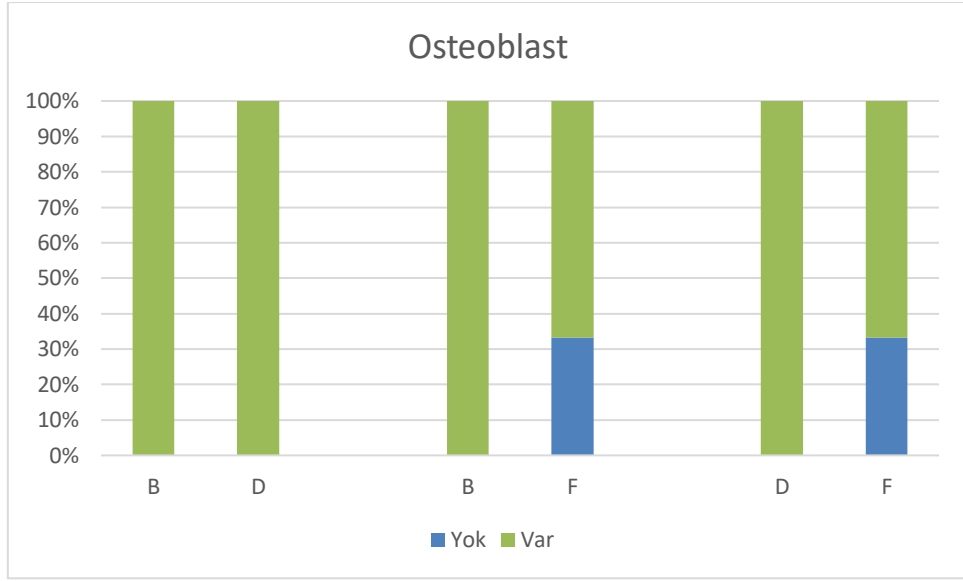


Şekil 16. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının vasküler proliferasyon durumuna göre karşılaştırılması

SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS grupları arasında osteoblast durumu açısından anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo 11) (Şekil 10).

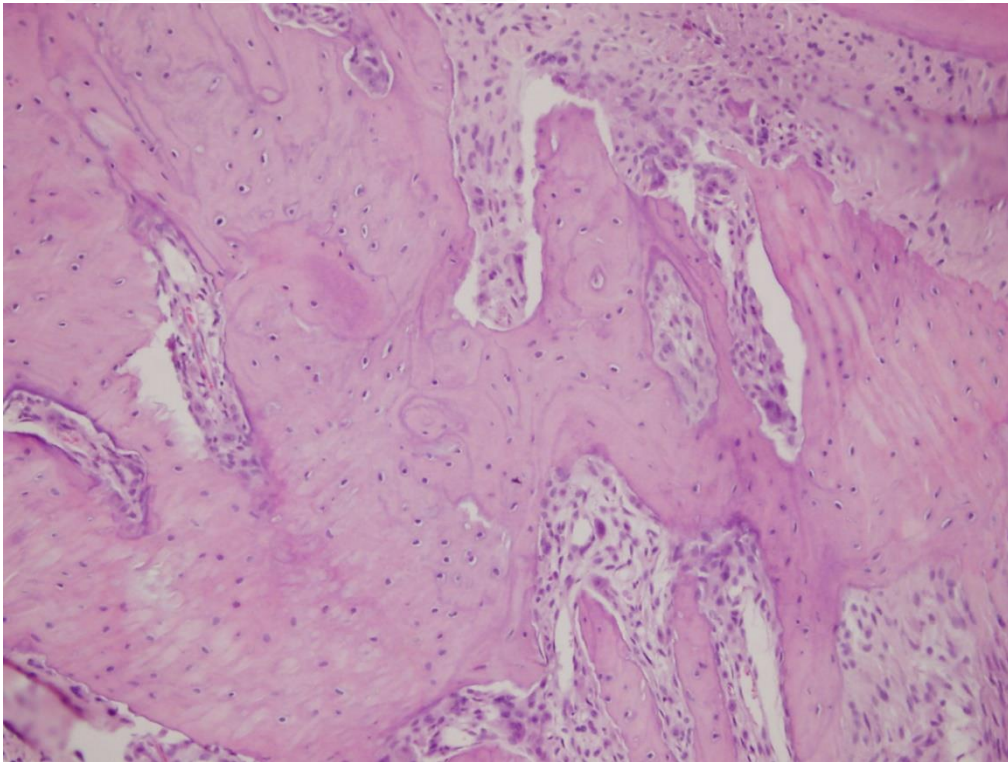
Tablo 15. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının osteoblast durumuna göre karşılaştırılması

	Osteoblast		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF+Ext	0 (0.0)	12 (100.0)	-
ZA+Ext	0 (0.0)	12 (100.0)	
SF+Ext	0 (0.0)	12 (100.0)	0.093
ZA+Ext+HS	4 (33.3)	8 (66.7)	
ZA+Ext	0 (0.0)	12 (100.0)	0.093
ZA+Ext+HS	4 (33.3)	8 (66.7)	



Şekil 17. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının osteoblast durumuna göre karşılaştırılması

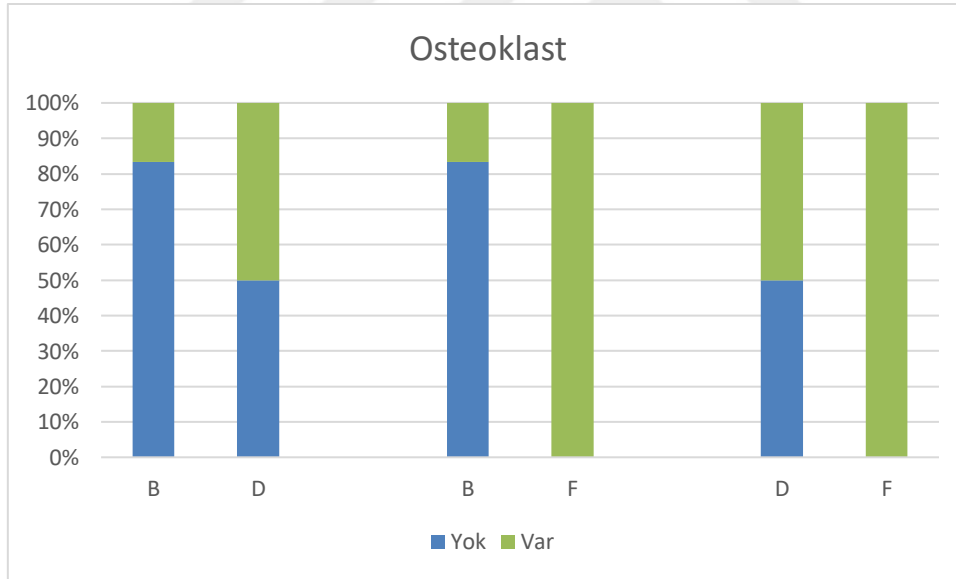
SF+Ext ve ZA+Ext+HS, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında osteoklast durumu açısından anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir (sırayla; $p < 0.001$, $p = 0.014$). SF+Ext ve ZA+Ext grupları arasında osteoklast açısından anlamlı farklılık yoktur ($p > 0.05$) (Tablo 12) (Şekil 11).



Şekil 18. ZA+Ext+HS grubunda osteoklastların varlığı ve aktif remodelling görüntüsü

Tablo 16. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının osteoklast durumuna göre karşılaştırılması

	Osteoklast		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF+Ext	10 (83.3)	2 (16.7)	0.193
ZA+Ext	6 (50.0)	6 (50.0)	
SF+Ext	10 (83.3)	2 (16.7)	<0.001
ZA+Ext+HS	0 (0.0)	12 (100.0)	
ZA+Ext	6 (50.0)	6 (50.0)	0.014
ZA+Ext+HS	0 (0.0)	12 (100.0)	

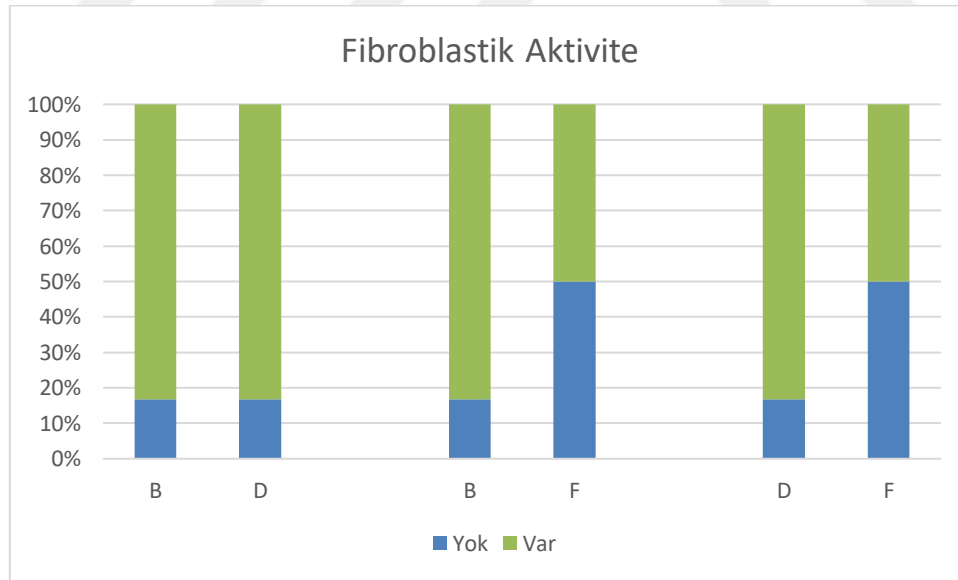


Şekil 19. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının osteoklast durumuna göre karşılaştırılması

SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının arasında fibroblastik aktivite durumu açısından anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo 13) (Şekil 12).

Tablo 17. *SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının fibroblastik aktivite durumuna göre karşılaştırılması*

	Fibroblastik Aktivite		p
	Yok	Var	
	n (%)	n (%)	
SF+Ext	2 (16.7)	10 (83.3)	>0.999
ZA+Ext	2 (16.7)	10 (83.3)	
SF+Ext	2 (16.7)	10 (83.3)	0.193
ZA+Ext+HS	6 (50.0)	6 (50.0)	
ZA+Ext	2 (16.7)	10 (83.3)	0.193
ZA+Ext+HS	6 (50.0)	6 (50.0)	



Şekil 20. *SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının fibroblastik aktivite durumuna göre karşılaştırılması*

SF grubunun osteoblast ortancası 11.00 (min=0.00, mak=70.00), ZA grubunun osteoblast ortancası 30.50 (min=0.00, mak=110.00) ve ZA+HS grubunun osteoblast ortancası 14.00'tür (minimum=0.00, maksimum=95.00). SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında osteoblast ölçümleri açısından anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$). SF grubunun fibroblast ortancası 0.00 (min=0.00, mak=160.00), ZA grubunun fibroblast ortancası 71.50 (min=0.00, mak=440.00) ve ZA+HS grubunun fibroblast ortancası 14.00'tür (minimum=0.00, maksimum=57.00). SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında fibroblast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır ($\chi^2= 7.828$, $p=0.020$). SF grubunun osteoklast ortancası 0.00 (min=0.00, mak=2.00), ZA grubunun osteoklast ortancası 0.50 (min=0.00, mak=10.00) ve ZA+HS grubunun osteoklast ortancası 2.50'dir (minimum=0.00, maksimum=16.00). SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında osteoklast ölçümleri açısından anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($\chi^2= 12.864$, $p=0.002$). SF grubunun vasküler yapı ortancası 0.50 (min=0.00, mak=5.00), ZA grubunun vasküler yapı ortancası 6.00 (min=0.00, mak=25.00) ve ZA+HS grubunun vasküler yapı ortancası 1.50'dir (minimum=0.00, maksimum=6.00). SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında vasküler yapı ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır ($\chi^2= 15.319$, $p<0.001$) (Tablo 14).

Tablo 18. SF, ZA ve ZA+HS gruplarının ölçüm değerlerine göre karşılaştırılması

		SF		ZA		ZA+HS			
		Ortanca		Ortanca		Ortanca			
		(Min-Mak)		(Min-Mak)		(Min-Mak)		χ^2	p
Osteoblast		11.00	(0.00-	30.50	(0.00-	14.00	(0.00-	2.244	0.326
sayısı		70.00)		110.00)		95.00)			
Fibroblast	sayısı	0.00	(0.00-	71.50	(0.00-	14.00	(0.00-	7.828	0.020
		160.00)		440.00)		57.00)			
Osteoklast		0.00 (0.00-2.00)		0.50 (0.00-10.00)		2.50 (0.00-16.00)		12.864	0.002
sayısı									
Vasküler	yapı	0.50 (0.00-5.00)		6.00 (0.00-25.00)		1.50 (0.00-6.00)		15.319	<0.001
sayısı									

Min: Minimum, Mak: Maksimum

SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında fibroblast değerleri açısından anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir (sırayla; $p=0.011$, $p=0.033$). SF ve ZA+HS grupları arasında osteoklast

değerleri açısından anlamlı farklılık vardır ($p<0.001$). SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında da vasküler yapı değerleri açısından anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir (sırayla; $p<0.001$, $p=0.004$) (Tablo 15).

Tablo 19. SF, ZA ve ZA+HS g ikili karşılaştırma sonuçları

	SF-ZA	SF-ZA+HS	ZA-ZA+HS
	p	p	p
Fibroblast sayısı	0.011	0.787	0.033
Osteoklast sayısı	0.075	<0.001	0.070
Vasküler yapı sayısı	<0.001	0.408	0.004

SF+Ext grubunun osteoblast ortancası 20.00 (min=4.00, mak=82.00), ZA+Ext grubunun osteoblast ortancası 88.00 (min=2.00, mak=430.00) ve ZA+Ext+HS grubunun osteoblast ortancası 4.50'dir (minimum=0.00, maksimum=42.00). SF+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında osteoblast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır ($\chi^2= 14.852$, $p=0.001$). SF+Ext grubunun fibroblast ortancası 63.00 (min=0.00, mak=250.00), ZA+Ext grubunun fibroblast ortancası 342.50 (min=0.00, mak=610.00) ve ZA+Ext+HS grubunun fibroblast ortancası 3.00'tür (minimum=0.00, maksimum=110.00). SF+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında fibroblast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır ($\chi^2= 13.923$, $p=0.001$). SF+Ext grubunun osteoklast ortancası 0.00 (min=0.00, mak=4.00), ZA+Ext grubunun osteoklast ortancası 0.50 (min=0.00, mak=5.00) ve ZA+Ext+HS grubunun osteoklast ortancası 5.50'dir (minimum=1.00, maksimum=20.00). SF+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında osteoklast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır ($\chi^2= 200.911$, $p<0.001$). SF+Ext grubunun vasküler yapı ortancası 3.00 (min=0.00, mak=5.00), ZA+Ext grubunun vasküler yapı ortancası 20.50 (min=0.00, mak=42.00) ve ZA+Ext+HS grubunun vasküler yapı ortancası 2.50'dir (minimum=0.00, maksimum=6.00). SF+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında vasküler yapı ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır ($\chi^2= 8.381$, $p<0.015$) (Tablo 16).

Tablo 20. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının ölçüm değerlerine göre karşılaştırılması

	SF+Ext		ZA+Ext		ZA+Ext+HS			
	Ortanca		Ortanca		Ortanca			
	(Min-Mak)		(Min-Mak)		(Min-Mak)		χ^2	p
Osteoblast sayısı	20.00	(4.00-82.00)	88.00	(2.00-430.00)	4.50	(0.00-42.00)	14.852	0.001
Fibroblast sayısı	63.00	(0.00-250.00)	342.50	(0.00-610.00)	3.00	(0.00-110.00)	13.923	0.001
Osteoklast sayısı	0.00	(0.00-4.00)	0.50	(0.00-5.00)	5.50	(1.00-20.00)	200.911	<0.001
Vasküler yapı sayısı	3.00	(0.00-5.00)	20.50	(0.00-42.00)	2.50	(0.00-6.00)	8.381	0.015

Min: Minimum, Mak: Maksimum

SF+Ext ve ZA+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında osteoblast değerleri açısından anlamlı farklılık vardır (sırayla; $p=0.019$, $p<0.001$). ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında fibroblast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır ($p<0.001$). SF+Ext ve ZA+Ext+HS, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında osteoklast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır (sırayla; $p<0.001$, $p=0.001$). Yine, SF+Ext ve ZA+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında da vasküler yapı ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır (sırayla; $p=0.013$, $p=0.011$) (Tablo 17).

Tablo 21. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının ikili karşılaştırma sonuçları

	SF+Ext-		ZA+Ext-	
	SF+Ext-ZA+Ext		ZA+Ext+HS	
	p	p	p	p
Osteoblast sayısı	0.019	0.140	<0.001	
Fibroblast sayısı	0.076	0.051	<0.001	
Osteoklast sayısı	0.339	<0.001	0.001	
Vasküler yapı sayısı	0.013	0.945	0.011	

5. TARTIŞMA

Bifosfonatlar yara iyileşmesini ciddi ölçüde etkileyen ilaçlardan bir tanesidir.⁸³ Endojen inorganik pirofosfatların kemik metabolizmasını düzenleyen ve metabolize olmayan sentetik analoglarıdır. Bifosfonatlar karmaşık bir etki mekanizması üzerinden etki ederler. Kemik remodellinginin hücrel ve biyokimyasal metabolik yoluna etki ederler. Özellikle, osteoklastik aktiviteyi güçlü bir şekilde inhibe ederler.⁸⁴ Bifosfonatlar; kemik dokusunun remodelyasyonu sırasında, osteoklastik aktivite sonucunda kemikten salınan kalsiyum ve fosfor kristallerinin üzerine tutunurlar. Bu etkiler nitrojen içeren ve içermeyen bifosfonatlar için benzerdir, ancak hücrel etkileri farklıdır.⁸⁵ Nitrojen içermeyen bifosfonatlar⁸⁶ osteoklastlar tarafından hidrolize edilemeyen ATP analoglarını inaktive etmek amacıyla metabolize edilirler. Bu durum osteoklastlar için sitotoksiktir ve apoptozisi tetikler.^{87,49} Nitrojen içeren bifosfonatların etki mekanizmasına baktığımızda, mevalonat yolundaki farnesil pirofosfat sentetaz enzimini inhibe ettiklerini görülmektedir. Ek olarak, nitrojen içeren bifosfonat grubu ilaçlar osteoklastların kendini yenileme oranını azaltarak osteoblastları tetikler.⁸⁸ Bütün bu etkilerin yanında tümör hücrelerinin apoptosisini tetiklemek, parenkim dokusuna tümör hücrelerinin adhezyonunu önlemek ve tümörün çevre dokulara invazyonunu inhibe ederek, antitümörosidal etki gösterirler.⁴⁹

Bifosfonat grubu ilaçların antianjiyogenetik ve T-hücrelerini aktive etme özellikleri vardır.⁸⁹ İntravenöz(i.v.) olarak kullanılan bifosfonatlar gelişmiş biyoyararlanıma sahiptirler ve gastrointestinal yan etki göstermezler.⁴⁹ Sıklıkla kemik metastazları, osteoporoz, multiple miyelom ve diğer kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılırlar. Bifosfonatların uzun süreli kullanımı sonucunda gelişen ve ciddi bir yan etki olan çene kemiğinin osteonekrozu (ONJ), ilk kez Marx ve ark³ tarafından tanımlanmıştır. İ.v bisfosfonatlarla tedavi edilen hastaların maksillofasiyal bölgelerinde açığa çıkmış nekrotik kemik ile karakterize ve iyileşmeyen alanların mevcut olduğu gözlemlenmiştir. Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi Derneği (AAOMS), 2009 yılında yayınladıkları bildiride, daha önce baş-boyun bölgesinden radyoterapi almamış, bisfosfonat kullanmış ya da kullanmakta olan hastaların çenelerinde 8 haftadan uzun süre mukozadan açığa çıkan kemik görüntüsünü ‘bisfosfonata bağlı çene kemiği osteonekrozu (BRONJ)’ olarak tanımlamıştır.³²

Çene kemiğinde osteonekroz geliştiği zaman kemik dokusu, küçük travmalardan sonra bile genellikle iyileşemez ve kemik açığa çıkar. Kemik bütünlüğünün bozulduğu, kemiğin açığa çıktığı

çenelerin bifosfonatla ilişkili osteonekrozunda iyileşme sürecini hızlandırmak ve sorunsuz bir iyileşme sağlamak ilk hedef olmuştur.²⁹

Kemik dokusu, remodeling mekanizmasını kullanarak yaşamını sürdüren özel bir bağ dokusudur. Kemikteki yıkım osteoklastik aktivite sonucu gerçekleşirken, yapım osteoblastik aktivite sonucunda gerçekleşmektedir. Kemikte bir hasar meydana geldiğinde kemik iyileşme mekanizmalarıyla kendini yeniler.⁹⁰ Yara iyileşmesi; bütünlüğünü kaybetmiş dokunun normal fizyolojik, anatomik ve histolojik yapısının yeniden geri kazanılması şeklinde tanımlanır. Beraberinde yara iyileşmesi, organize ve sistemli bir takım hücresel ve biyokimyasal olaylardan oluşmaktadır. Bir diş çekim socketinin iyileşmesi sekonder yara iyileşmesi için güzel bir örnektir. Dişin çekilmesinin hemen ardından, çekim socketi kanla dolmaktadır. Diş çekim socketlerinde oluşan pıhtı 24-48 saat içinde organize olur ve ilk haftada oluşan pıhtı, inflame hücrelerin üzerine göç ettiği geçici bir fibrin iskele oluşturur. Bu aşamada pıhtı organize olur ve yüzeyinbe yara etrafındaki epitel yürümeye başlar. Bunu takiben ikinci haftada pıhtı fibroplazi yoluyla organize olmaya devam eder ve çevre kemikten yeni kan damarları pıhtının merkezine doğru ilerlemeye başlar. Üçüncü haftada, granülasyon dokuları diş çekim socketini doldurmaya başlar ve yaranın etrafında bir kemik iskelesi oluşur. Yara yüzeyine yürüyen epitel, hiç yara izi bırakmadan bölgeyi tamamen epitelize eder ve iyileşme tamamlanır.^{91,92,93}

Literatürde yara iyileşmesini değerlendirmek için in vivo çalışmalarda birçok hayvan modeli kullanılmıştır. Bunlar arasında, köpek, koyun, maymun gibi hayvan modelleri olmakla birlikte, hayvan teminindeki zorluklar nedeniyle araştırmacılar başka modeller üzerinde çalışmaya yönelmişlerdir. Yara iyileşmesinin değerlendirildiği birçok çalışmada deney hayvanı olarak sıçan kullanılmıştır.^{94,95} Sıçan kullanımı maliyet ve bakım açısından daha avantajlı bir model olmanın yanı sıra kemik metabolizmaları ve fizyolojileri hakkında daha fazla bilgi olması açısından tercih edilmektedir.⁹⁶ Sıçanların deney hayvanı olarak sık tercih edilmesinin diğer nedeni de, hızlı üreyebilmesi, deney uygulama aşamasında kullanımının pratik ve postoperatif bakımının kolay olması, kısa sürede genetik açıdan benzer gruplar oluşturulabilmesidir. Araştırmalarda yara iyileşmesi modeli için dişi sıçanların mandibular dişleri çekildiği için bizde çalışmamızda aynı modeli kullanmayı tercih ettik. Literatürde araştırmacılar tarafından oluşturulan fare, sıçan, köpek, domuz gibi çeşitli BRONJ hayvan modelleri mevcuttur.⁹⁷ Deneysel olarak oluşturulan bifosfonata bağlı osteonekroz hayvan modeli için en sıklıkla sıçanların tercih edildiği görülmüştür.^{98,99} Bizde çalışmamızda BRONJ oluşturmak için sıçan modelini tercih ettik.

Araştırmalarda sıçanlarda BRONJ hayvan modeli oluşturmak için zoledronik asit kullanılmaktadır. Ancak sıçanlarda zoledronik asitin kullanımıyla ilgili standart bir doz veya uygulama yöntemi bulunmamaktadır. Çalışmalarda birbirinden farklı dozlar, farklı aralıklarla, farklı uygulama yöntemleriyle kullanılmış ve yine farklı başarı oranlarında BRONJ oluşumu grlmştir.^{99,98,100} Wistar sıçanlarda çalışma yapan Gutierrez ve ark.⁹⁴ deneklere 7 ve 14. günlerde 0.06 mg/kg zoledronatı intraperitoneal yolla uygulamışlardır. Deneklerin 2. haftada diş çekimlerini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları histolojik incelemelerde enfeksiyon, osteonekroz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu parametrelerinin kontrol grubundan daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Takaoka ve ark.⁹⁵ Sprague Dawley sıçanlarda gerçekleştirdikleri bir çalışmada diabetik ve sağlıklı sıçanlara bifosfonat uygulamışlardır. 21 hafta boyunca 2 haftada bir 0.035 mg/kg zoledronat i.v olarak verilen deneklerin sol maksiller molar dişleri çekilmiştir. ekimi takiben 2, 4 ve 8. haftalarda sakrifikasyonları gerçekleştirilen sıçanlardan elde edilen kesitler histolojik olarak incelenmiş ve bifosfonatın etkisi değerlendirilmiştir.

Dayisoğlu ve ark.¹⁰¹ yaptıkları çalışmada, BRONJ oluşturulan sıçanların alveol onarımında paratiroid hormonun etkilerini değerlendirmişlerdir. Sıçanlara, sekiz hafta boyunca her üç günde bir 0.1mg/kg zoledronik asit (ZOL) intraperitoneal olarak enjekte etmişlerdir. 4 haftalık tedaviden sonra, mandibular sol 1.molar dişi çekmişlerdir. Bizim alışmamızda kullanılan zoledronik asitin dozu, uygulama şekli ve süresi Dayisoğlu ve ark.¹⁰¹'nin yaptıkları çalışma referans alınarak yapılmıştır.

Günümüzde BRONJ gelişen hastalarda medikal tedavi, medikal/cerrahi tedavi ve medikal/cerrahi tedaviye ek olarak çeşitli destekleyici tedavileri içeren birçok tedavi yöntemi kullanılmaktadır. Destekleyici tedaviler arasında; ozon tedavisi, hiperbarik oksijen tedavisi, trombosit konsantreleri, teriparatit tedavisi, DESL uygulamaları ve FDT gibi yöntemler kullanılmaktadır.^{102,103}

Fliefel ve ark.¹⁰²'nin yaptığı sistematik derlemede; minimal invaziv cerrahi tedavinin BRONJ tedavisinde en sık kullanılan yöntem olduğu gösterilmiştir. İnceledikleri alışmalarda BRONJ gelişen toplam 767 hastanın sekestrektomi, küretaj veya debridman ile tedavi edildiği grlmştir. Bu sonuçlar, Alons ve ark.¹⁰⁴ 'nin yedi hastayı sekestrektomi ve küretaj ile tedavi ettiği çalışma ile korelasyon göstermiştir. Mitsimponas ve ark.¹⁰⁵ BRONJ gelişen hastalarda kemik debridmanı, apse drenajı, ülser eksizyonu ve ekspoz alanların primer olarak kapatılması dahil olmak üzere çeşitli cerrahi prosedürler kullanmışlardır. Bu yöntemler ile hastalarda %53'lk bir genel başarı oranı elde

ettiklerini bildirmişlerdir. Eckert ve ark.¹⁰⁶ opere edilen 24 hastada% 58 başarı oranı bildirmişlerdir. Araştırmacılar cerrahi prosedür olarak, nekrotik kemiğin rezeksiyonu ve yumuşak dokuda primer kapama yapmışlardır. Millesi ve ark.¹⁰⁷ BRONJ gelişen hastayı sekestrektomi, debridman ve kısmi rezeksiyonla 6 ayda tedavi etmişler ve genel olarak % 50 başarı oranı bildirmişlerdir. Otto ve arkadaşları⁴³ ise tekrarlayan BRONJ vakalarında cerrahi tedavinin, tek iyileştirici tedavi olduğunu savunmuşlar ve radikal tedaviyi uygulamışlardır.

AAOMS yönergesinde ise göre cerrahi tedavinin mümkün olduğu kadar uzun süre ertelenmesi gerektiği ve ilaç tedavisinin öncelikli tercih edilmesi gerektiği bildirilmektedir.⁴⁰ Van den Wyngaert ve ark.¹⁰⁸ ve Scoletta ve ark.¹⁰⁹ BRONJ'un medikal tedavisinin vakaların% 50'sinde mukozal iyileşme sağladığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, çalışma grubundaki BRONJ lezyonlarının iyileşme oranı, tedavi sırasındaki BRONJ evresi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu ve daha yüksek evrelerde daha düşük iyileşme oranları olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte Gomez Font ve ark.⁶⁸ BRONJ'un tedavisinde uzun süreli antibiyotik kullanımını ve günde 3-4 kez klorheksidin gargara kullanımını önermişlerdir.

BRONJ tedavisinde büyüme faktörlerinin uygulanması da yumuşak ve sert doku iyileşmesini arttırdığı için bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. Kemotaktik ajanlar gibi davranarak, anjiyogenezi, göçü, proliferasyonu ve kök hücrelerin kemik oluşturan hücrelere farklılaşmasını uyarırlar.¹¹⁰ Bazı çalışmalarda tekrarlayan BRONJ vakalarının kemik rezeksiyonu ve ardından topikal PRP ile tedavi edildiği bildirilmiştir.^{88,111} Cardoso ve ark.¹¹² yaptıkları bir çalışmada; toplam 30 Wistar Albino sıçanda BRONJ geliştirilmesi sonrası cerrahi tedaviye ek olarak PRP uygulamasını değerlendirmişlerdir. Sıçanları eşit iki gruba ayırmışlar ve 15 günde bir olmak üzere toplamda dört kere intravenöz olarak 0.035 mg/kg oranında zoledronik asit uygulamışlardır. İlk gruptaki sıçanlarda diş çekimi sonrası gelişen BRONJ modeline karşı sekestrektomi ve PRP uygulaması yapmışlardır. İkinci gruptaki sıçanlarda ise diş çekimi sonrası gelişen BRONJ modeline sadece sekestrektomi uygulamışlardır. Çalışma sonuçlarını mikro BT ile değerlendirmişlerdir. Çalışmadan elde edilen sonuçlarda BRONJ gelişimi sonrası sekestrektomiye ek olarak PRP uygulamasının iyileşmeye anlamlı katkı sağladığı bildirilmiştir.¹¹²

Hidrojen sulfit (H₂S), çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda önemli roller oynayan gaz halindeki sinyal molekülü olarak kabul edilmiştir.¹¹³ H₂S'nin endojen konsantrasyonları genellikle düşüktür, bu da kesin biyolojik fonksiyonlarının ayırt edilmesini zorlaştırır. H₂S'nin fizyolojik rollerinin araştırılması, hücre kültürü ve hayvan çalışmalarında molekülün eksojen olarak

uygulanması ile yapılmaktadır. Eksojen bir H₂S kaynağına olan bu ihtiyaç, kimyagerlerin biyolojik koşullar altında H₂S salınımı yapan kimyasal moleküller geliştirmeleri için benzersiz bir zorluk sağlar. H₂S donörleri olarak adlandırılan bu moleküller belirli tetikleyicilerin etkisi ile H₂S salgılar ve endojen üretimi taklit eder.¹¹⁴

Yakın zamanda geliştirilen H₂S donörleri, klinik öncesi ve erken klinik çalışmalarda çeşitli patolojik süreçlere karşı umut verici etkiler göstermektedir. Örneğin, H₂S donörlerinin, anti-inflamatuar tedavi sırasında gastrointestinal ülserlerin önlenmesinde etkili olduğu bulunmuştur. Özellikle, kimyasal yapısı kükürt içeren ve H₂S salabilen çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan köklü ilaçlar vardır. Dolayısıyla, bu ilaçların terapötik etkisi, kısmen ilaç metabolizması sırasında meydana gelen H₂S salınımının ve/veya bu ilaçların endojen hidrojen sülfid üretimi üzerindeki etkisinin sonucu olabilir.¹¹⁵

Önceden sadece toksik bir ajan olarak bilinen hidrojen sülfid (H₂S), son yıllarda kardiyovasküler sistemin homeostazında anahtar rol oynayan önemli bir endojen gazotransmitter olarak kabul edilmiştir. H₂S'nin miyokardiyal iskemi/reperfüzyona (I/R) karşı sergilediği koruyucu role ilişkin artan kanıtlar, H₂S'nin kardiyoprotektif etkisini açıklayan olası etki mekanizmasına artan bir ilgi literatürde araştırmaların artmasına sebep olmuştur. Şu anda, anti-inflamatuar, antioksidan, iyon kanalları gibi proteinleri değiştirebilen sulhidrasyon mekanizmaları gibi birçok etki mekanizması öğrenilmiş ve doğrulanmıştır. Mitokondriyal koruma ve anti-apoptotik mekanizmaların yanında pro-anjiyogenez etkisi bile tarif edilmiştir.¹¹⁶

Kemik kaybına karşı hidrojen sülfidin terapötik potansiyelini araştırmak için yapılan bir çalışmada sıçanların GYY4137 (suda çözünür bir hidrojen sülfür donörü, günde 25 mg/kg, i.p.) ile tedavi edilmesi serumdaki osteokalsin düzeylerini önemli ölçüde arttırmıştır. Aynı sıçanların GYY4137 ile tedavisi osteoblast yüzey alanını arttırmıştır. Modellenmiş mikro graviteye maruz bırakılan MC3T3-E1 hücrelerinde, GYY4137, artan mRNA ekspresyonu ve alkalik fosfataz aktivitesi ile gelişmiş osteoblastik farklılaşmayı uyardığı görülmüştür. GYY4137'nin modellenmiş mikro graviteye maruz kalan sıçanlarda kemik yapısını koruduğunu ve modellenmiş mikro gravite altında MC3T3-E1 hücrelerinde osteoblastik farklılaşmayı desteklediğini gösterilmiştir.¹¹⁷

Ma ve ark¹¹⁸ H₂S'nin glukokortikoid kaynaklı osteoporoz üzerindeki terapötik etkilerini araştırmıştır. Deksametazonun (Dex) in vivo olarak kemik iliğinde iki H₂S üreten enzimi, sistatyon β-sentaz ve sistatyon g-liyaz'ı azalttığını bulmuşlardır. GYY4137'i tedavisi, Dex'in kemik oluşumu

üzerindeki inhibitör etkisini önemli ölçüde azaltmıştır. GYY4137, Wnt ligandlarının artan üretimi yoluyla Wnt sinyalini aktive ederek osteoblastogenezi desteklediği gösterilmiştir.

GY4137 ayrıca, ERK 1/2'ye bağlı bir antioksidan mekanizma yoluyla osteoblastların oluşumunu ve farklılaşmasını uyarabilir ve hidrojen peroksit tarafından indüklenen MC3T-E1'in oksidatif hasarını başarılı bir şekilde inhibe edebilir.¹¹⁹ GYY4137'nin SIRT1 yolu aracılığıyla partikül kaynaklı inflamasyonu ve osteolizi önleyebildiği bulunmuştur.¹²⁰ GYY4137, kontrollü salımlı bir H₂S donörü olarak, endojen H₂S oluşumunu simüle edebilir ve eksojen bir donör olarak sodyum sülfürden daha fazla avantaja sahiptir.¹²¹ Endojen H₂S takviyesi olarak GYY4137'nin intraperitoneal enjeksiyonu ile sıçan plazmasındaki H₂S'nin fizyolojik seviyesi artırılabilir ve kalsiyum ve fosfor metabolizmasının dengesini düzenlemek için kullanılabilir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda Deneysel BRONJ Modeli oluşturduğumuz sıçanlarda GYY4137 molekülü kullanılmıştır.

Scheper ve ark.¹²² oral mukozayı temsil eden insan hücre kültürü, insan dişeti fibroblast hücre kültürlerini kullanarak bir çalışma yayınlamışlardır. Hücre kültürleri 0.25, 0.50, 1 veya 3 lml/l artan doz miktarlarında zoledronik asit'e maruz bırakılmış ve hücrelerdeki apoptozun fiziksel belirtileri mikroskopik olarak belirlenmiş. İlk hücre hasarı 3 lml/l dozda 6 saat gibi bir erken vakitte gözlenirken, 1 ve 0.5 lml/l zoledronik asit'e maruz bırakılan hücrelerde sırasıyla 10 ve 14 saatte gözlemlendi. 24 saatte hem keratinosit hem fibroblast hücrelerinin parçalandığı ve yüzen ölü hücreler göstermeye başladığı görüldü, bu da zoledronik asitin doza bağlı şekilde apoptozu tetiklediğini gösterir. Çalışmamızda da benzer şekilde zoledronik asit grubunda kontrol grubuna göre daha fazla epitel kaybı ve enflamasyon oluşmuştur.

Vasconcelos ve ark.¹²³ 2012 yılında yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında sıçanlar 3 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubunda 10, zoledronik asit grubunda 12, klodronat uygulanan grupta 12 olmak üzere 34 dişli sıçan kullanılmıştır. Bütün sıçanlarda diş çekimi ve dişin çekildiği arka tarafında 3 mm uzunluğunda ve 1 mm derinliğinde yumuşak doku yarası oluşturulmuştur. Diş çekim bölgesinde, zoledronik asit grubunda klodronat ve kontrol gruplarına kıyasla nekrotik kemik ve mikrobiyal kolonilerin oranı anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Zoledronik asit grubuna kıyasla klodronatta bağ dokusu oranı anlamlı derecede daha yüksek olmasına rağmen, ancak kontrol grubuna göre anlamlı bulunamamıştır. Yumuşak doku yara bölgesinde, nekrotik kemik ve mikrobiyal kolonilerin oranları zoledronik asit ve klodronat gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Bağ dokusu oranı, klodronat ve zoledronik asit gruplarına kıyasla kontrol

grubunda önemli ölçüde daha artmış olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla zoledronik asit grubunda enflamasyon açısından fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu örneklem sayısının az olması ile açıklanabilir. Nekrotik kemik değerlendirildiğinde zoledronik asit grubu örneklerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda Vasconcelos ve ark.¹²³ çalışmasında mikrobiyal kolonilerin anlamlı artışı ile bizim çalışmamızda yer alan inflamasyon artışının pozitif benzerlik gösterdiği düşünülmektedir. Çalışmamızdaki bu bulgular literatürde BRONJ modeli oluşturulan sıçanların histopatolojik verileri ile korelasyon göstermekte ve zoledronik asit uygulanan sıçanlarda önemli oranda iyileşme problemi olduğu görülmektedir.

Literatürde GYY4137 molekülünün daha önce BRONJ modeli üzerinde etkilerini araştıran çalışma bulunamamıştır. Çalışmamızda GYY4137 molekülünün BRONJ lezyonları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Diş çekimini takiben rezidüel alveoler kemikte enflamasyon nedeniyle ortama salınacak olan bifosfonatın yumuşak dokuda ve makrofajlar üzerinde toksisiteye neden olması nedeniyle fibroblastik aktivitede artış, olası osteonekroz alanları ve şiddetli enflamasyon beklenmektedir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular güncel literatürü ve konuyla ilgili hipotezleri desteklemektedir. SF, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS gruplarındaki fibroblastik aktivite açısından anlamlı fark bulunamamıştır. SF grubunda ZA+Ext+HS grubuna göre vasküler proliferasyon daha fazla idi, bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. SF grubunda ZA+Ext grubuna göre vasküler proliferasyon daha fazla olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. ZA+Ext grubunda ZA+Ext+HS grubuna göre vasküler proliferasyon daha fazla olsa da bu fark anlamlı değildi. Osteoblastlara baktığımızda ZA+Ext+HS grubunda osteoblast daha az denekte görülse de SF ve ZA+Ext gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Osteoklastlara baktığımızda ZA+Ext+HS grubunda SF ve ZA+Ext gruplarına kıyasla daha fazla denekte osteoklast vardı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. ZA+Ext grubunda SF grubuna kıyasla daha fazla denekte osteoklast görülmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. ZA+Ext grubunda SF grubuna kıyasla daha fazla nekroz görülmüştür, bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. ZA+Ext+HS grubunda da SF grubuna kıyasla daha fazla nekroz görülmüştür, bu fark da istatistiksel olarak anlamlıydı. ZA+Ext grubunda ZA+Ext+HS grubuna göre daha fazla nekroz görülse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

ZA+Ext grubunda osteoblast sayılarına bakıldığında SF ve ZA+Ext+HS gruplarına göre daha fazla osteoblast vardı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. ZA+Ext grubunda osteoblastların daha fazla olması kemiğin matürasyonunun tamamlanmaması ile açıklanabilir. ZA+Ext+HS grubunda osteoklast sayıları SF ve ZA+Ext gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha

yüksek bulunmuştur. Bifosfonatların osteoklastlar üzerindeki toksik etkilerini dikkate aldığımızda bu durum GYY4137'nin bu etkiyi azaltması ve osteoklast proliferasyonunu arttırması ile açıklanabilir. ZA+Ext grubunda SF ve ZA+Ext+HS gruplarına göre daha fazla fibroblast vardı, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ZA+Ext grubunda fibroblastların daha fazla matürasyonun bozulduğu, remodelasyonun azalması veya olmaması anlamına gelmektedir. İkili karşılaştırmalara baktığımızda ZA+Ext+HS grubunda fibroblast sayısı ZA+Ext grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu GYY4137 molekülünün zoledronik asitin oluşturduğu osteonekrozu engelleyebileceğini düşündürmektedir. ZA+Ext grubunda vasküler yapı sayılarına baktığımızda SF ve ZA+Ext+HS gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. SF grubundaki beklenen normal iyileşme çekim sonrası 8'ci haftada tamamlanmıştır. ZA+Ext+HS ve SF grubunda vasküler yapı sayısının yakın olması ve ZA+Ext grubundan daha düşük olması geç evrede ZA+Ext grubunda iyileşmenin hala tamamlanmadığı ve matür kemiğin oluşmaması ile açıklanabilir. İkili karşılaştırmalara baktığımızda ZA+Ext+HS grubunda vasküler yapı sayısı ZA+Ext grubuna kıyasla daha az bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır. GYY4137 molekülü bifosfonatın etkisini azaltmış ve nekroz oluşumunun daha az denekte oluşmasını sağlamıştır.

Hidrojen sulfit donörlerinin tıpta kullanımı umut vaad etmektedir. Çalışmamız GYY4137'nin BRONJ vakalarında kullanımını değerlendiren ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Bu molekülün BRONJ üzerindeki etkilerini değerlendiren daha geniş klinik ve hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın limitasyonları:

- 1.Hayvan çalışması olması
- 2.Histomorfometrik analiz yapılmaması
- 3.BRONJ' un hayvan modelini oluşturmak için kullanılan zoledronik asitin dozuyla ilgili standart protokolün olmaması
4. Değerlendirmek için az sayıda sıçan kullanılması
- 5.GYY4137 molekülü ile ilgili standart ptotokolün olmaması

6. SONUÇLAR

1. SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında enflamasyon durumu açısından anlamlı farklılık vardır. SF ve ZA+HS grupları arasında enflamasyon durumu açısından anlamlı farklılık bulunamamıştır.
2. SF ve ZA, SF ve ZA+HS, ZA ve ZA+HS grupları arasında nekroz durumu açısından anlamlı farklılık yoktur.
3. SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında vasküler proliferasyon durumu açısından anlamlı farklılık tespit edilmiştir.
4. SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında osteoblast durumu açısından anlamlı farklılık tespit edilmemiştir.
5. SF ve ZA, SF ve ZA+HS grupları arasında osteoklast durumu açısından anlamlı farklılık olduğu bulunmuştur . ZA ve ZA+HS grupları arasında osteoklast durumu açısından anlamlı farklılık yoktur.
6. SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında fibroblastik aktivite durumu açısından anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. SF ve ZA+HS grupları arasında osteoklast durumu açısından anlamlı farklılık yoktur.
7. SF+Ext ve ZA+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında enflamasyon durumu açısından anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir.
8. SF+Ext ve ZA+Ext, SF+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında nekroz durumu açısından anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında nekroz durumu açısından anlamlı bir farklılık yoktur.
9. SF+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında vasküler proliferasyon durumu açısından anlamlı farklılık vardır. SF+Ext ve ZA+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında vasküler proliferasyon durumu açısından anlamlı farklılık yoktur.
10. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS grupları arasında osteoblast durumu açısından anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir.
11. SF+Ext ve ZA+Ext+HS, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında osteoklast durumu açısından anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir. SF+Ext ve ZA+Ext grupları arasında osteoklast durumu açısından anlamlı farklılık yoktur.
12. SF+Ext, ZA+Ext, ZA+Ext+HS gruplarının arasında fibroblastik aktivite durumu açısından anlamlı farklılık olmadığı belirlenmiştir.

13. SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında osteoblast ölçümleri açısından anlamlı farklılık yoktur.
14. SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında fibroblast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır.
15. SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında osteoklast ölçümleri açısından anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir
16. SF, ZA ve ZA+HS grupları arasında vasküler yapı ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır.
17. SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında fibroblast değerleri açısından anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir.
18. SF ve ZA+HS grupları arasında osteoklast değerleri açısından anlamlı farklılık vardır.
19. SF ve ZA, ZA ve ZA+HS grupları arasında da vasküler yapı değerleri açısından anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir.
20. SF+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında osteoblast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır
21. SF+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında fibroblast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır.
22. SF+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında osteoklast ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır.
23. SF+Ext, ZA+Ext ve ZA+Ext+HS grupları arasında vasküler yapı ölçümleri açısından anlamlı farklılık vardır.

7. KAYNAKLAR

1. McLeod NMH, Brennan PA, Ruggiero SL. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw: A historical and contemporary review. *Surgeon*. 2012. doi:10.1016/j.surge.2011.09.002
2. Shannon J, Shannon J, Modelevsky S, Grippo AA. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *J Am Geriatr Soc*. 2011. doi:10.1111/j.1532-5415.2011.03713.x
3. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic [1]. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003. doi:10.1016/S0278-2391(03)00720-1
4. Hellstein JW, Marek CL. Bisphosphonate osteochemonecrosis (bis-phossy jaw): Is this phossy jaw of the 21st century? *J Oral Maxillofac Surg*. 2005. doi:10.1016/j.joms.2005.01.010
5. Brozoski MA, Traina AA, Deboni MCZ, Marques MM, Naclério-Homem M da G. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rev Bras Reumatol*. 2012.
6. Guo Z, Li CS hen., Wang CM ia., Xie YJ in., Wang AL in. CSE/H2S system protects mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis via mitochondrial injury, endoplasmic reticulum stress and PI3K/Akt activation pathways. *Mol Med Rep*. 2015. doi:10.3892/mmr.2015.3651
7. Xie X, Sun A, Zhu W, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells preconditioned with hydrogen sulfide enhances repair of myocardial infarction in rats. *Tohoku J Exp Med*. 2012. doi:10.1620/tjem.226.29
8. Fox B, Schantz JT, Haigh R, et al. Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: Is H2S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *J Cell Mol Med*. 2012. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01357.x
9. Jiang X, Chen Y, Lu K, Zhang H, Fan X. GYY4137 promotes bone formation in a rabbit distraction osteogenesis model: A preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015. doi:10.1016/j.joms.2014.11.012
10. Zhang Q, Shi S, Liu Y, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*. 2010. doi:10.4049/jimmunol.0990118
11. Yang M, Huang Y, Chen J, Chen YL, Ma JJ, Shi PH. Activation of AMPK participates hydrogen sulfide-induced cyto-protective effect against dexamethasone in osteoblastic

- MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.033
12. Jiang XW, Zhang Y, Cheng YZ, Fan XS, Deng X, Peng HY. The expression of endogenous hydrogen sulfide signal during distraction osteogenesis in a rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018. doi:10.1016/j.ijom.2017.07.021
 13. Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *Adv Organ Biol*. 1998. doi:10.1016/S1569-2590(08)60154-8
 14. Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone*. 2011. doi:10.1016/j.bone.2011.04.022
 15. Russell RGG. Bisphosphonates: From bench to bedside. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. ; 2006. doi:10.1196/annals.1346.041
 16. Lam DK, Sándor GKB, Holmes HI, Evans AW, Clokie CML. A review of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management. *J Can Dent Assoc (Tor)*. 2007.
 17. Kimmel DB. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res*. 2007. doi:10.1177/154405910708601102
 18. V.M. C, S. Z, A.I. Z. Bisphosphonate use and the risk of adverse jaw outcomes: A medical claims study of 714,217 people. *J Am Dent Assoc*. 2008.
 19. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: Current status. *Clin Cancer Res*. 2006. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0843
 20. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008. doi:10.4065/83.9.1032
 21. Mundy GR. Bisphosphonates as anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 1999. doi:10.1517/13543784.8.12.2009
 22. Polascik TJ. Bisphosphonates in oncology: Evidence for the prevention of skeletal events in patients with bone metastases. *Drug Des Devel Ther*. 2009. doi:10.2147/dddt.s3169
 23. Gnani M, Clézardin P. Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: A brief review of published literature. *Cancer Treat Rev*. 2012. doi:10.1016/j.ctrv.2011.09.003
 24. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302(3). doi:10.1124/jpet.102.035295
 25. Stresing V, Fournier PG, Bellahcène A, et al. Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone*. 2011;48(2). doi:10.1016/j.bone.2010.09.035
 26. Lagman RL. Principles and Practice of Palliative Care and Supportive Oncology. *Clin J Pain*.

2005;21(1). doi:10.1097/00002508-200501000-00014

27. Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ, et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: Recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol*. 2008;19(3). doi:10.1093/annonc/mdm442
28. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296(2).
29. Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones*. 2009;8(2). doi:10.14310/horm.2002.1226
30. Abrahamsen B. Adverse effects of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int*. 2010;86(6). doi:10.1007/s00223-010-9364-1
31. Sarin J, DeRossi SS, Akintoye SO. Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. *Oral Dis*. 2008;14(3). doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01381.x
32. 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;67(5 SUPPL.). doi:10.1016/j.joms.2009.01.009
33. Allen MR, Burr DB. The Pathogenesis of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: So Many Hypotheses, So Few Data. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(5 SUPPL.). doi:10.1016/j.joms.2009.01.007
34. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: Incidence and risk factors. *J Clin Oncol*. 2005. doi:10.1200/JCO.2005.02.8670
35. Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis: Risk Factors, Prediction of Risk Using Serum CTX Testing, Prevention, and Treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007. doi:10.1016/j.joms.2007.08.003
36. Hoff AO, Toth BB, Altundag K, et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res*. 2008;23(6). doi:10.1359/jbmr.080205
37. Wang EP, Kaban LB, Strewler GJ, Raje N, Troulis MJ. Incidence of Osteonecrosis of the Jaw in Patients With Multiple Myeloma and Breast or Prostate Cancer on Intravenous Bisphosphonate Therapy. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(7). doi:10.1016/j.joms.2007.03.006

38. Ruggiero SL, Mehrotra B. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Diagnosis, prevention, and management. *Annu Rev Med.* 2009;60.
doi:10.1146/annurev.med.60.063007.134350
39. R.E. M, Y. S, M. F, V. B. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11).
40. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, 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. doi:10.1016/j.joms.2014.04.031
41. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone.* 2007;41(3). doi:10.1016/j.bone.2007.04.196
42. Rizzoli R. Bisphosphonates treatment in patients with osteoporosis. *Ther Umschau.* 2012;69(3). doi:10.1024/0040-5930/a000270
43. Otto S, Pautke C, Opelz C, et al. Osteonecrosis of the jaw: Effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(11). doi:10.1016/j.joms.2010.07.017
44. Allen MR, Burr DB. Mandible Matrix Necrosis in Beagle Dogs After 3 Years of Daily Oral Bisphosphonate Treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(5).
doi:10.1016/j.joms.2008.01.038
45. Wong PK, Borromeo GL, Wark JD. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in non-malignant bone disease. *Rheumatol Int.* 2013;33(9). doi:10.1007/s00296-013-2771-7
46. Rasmusson L, Abtahi J. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: An update on pathophysiology, risk factors, and treatment. *Int J Dent.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/471035
47. Tubiana-Hulin M, Spielmann M, Roux C, et al. Physiopathology and management of osteonecrosis of the jaws related to bisphosphonate therapy for malignant bone lesions. A French expert panel analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009;71(1).
doi:10.1016/j.critrevonc.2008.10.009
48. Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008;19(6). doi:10.1007/s00198-007-0540-8
49. Landesberg R, Woo V, Cremers S, et al. Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1218(1). doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05835.x
50. Bezzi M, Hasmim M, Bieler G, Dormond O, Rüegg C. Zoledronate Sensitizes Endothelial

Cells to Tumor Necrosis Factor-induced Programmed Cell Death: Evidence for the suppression of sustained activation of focal adhesion kinase and protein kinase B/Akt. *J Biol Chem.* 2003;278(44). doi:10.1074/jbc.M308114200

51. Yamashita J, McCauley LK. Antiresorptives and osteonecrosis of the jaw. *J Evid Based Dent Pract.* 2012;12(3 SUPPL.). doi:10.1016/S1532-3382(12)70046-5
52. Otto S, Schreyer C, Hafner S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - Characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2012;40(4). doi:10.1016/j.jcms.2011.05.003
53. Rocha GCMA, Jaguar GC, Moreira CR, Neves EG, Fonseca FP, Pedreira EN. Radiographic evaluation of maxillofacial region in oncology patients treated with bisphosphonates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(SUPPL. 5). doi:10.1016/j.tripleo.2011.08.016
54. Treister N, Sheehy N, Bae EH, Friedland B, Lerman M, Woo S. Dental panoramic radiographic evaluation in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis.* 2009;15(1). doi:10.1111/j.1601-0825.2008.01494.x
55. Kwon YD, Kim DY, Ohe JY, Yoo JY, Walter C. Correlation Between Serum C-Terminal Cross-Linking Telopeptide of Type I Collagen and Staging of Oral Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(12). doi:10.1016/j.joms.2009.04.067
56. Weitzman R, Sauter N, Eriksen EF, et al. Critical review: Updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients-May 2006. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007;62(2). doi:10.1016/j.critrevonc.2006.12.005
57. McMahon RE, Bouquot JE, Glueck CJ, et al. Staging Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw Should Include Early Stages of Disease. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(9). doi:10.1016/j.joms.2007.04.021
58. Junguiera LC, Kelley RO (1998). Basic Histology. Temel Histoloji. Çeviren Aytekin Y. Barıç Kitabevi, İstanbul 12-29.
59. Türkmen M (2006). Distraksiyon Osteogenezisinde Yumuşak Doku Değişiklikleri. Dozktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
60. Koloğlu S (1998). Osteoporoz. 1. Baskı. Ajans-Türk Basın ve Basım Ağ, Ankara; 1-12.
61. Sencer E (2000). Endokrinoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul; 48-66.
62. Bronner F, Worrel FW (1999). Orthopaedics: principles of basic and clinical science, CRC Press, Boca Raton FL; 234-236.
63. Selvi F (2008). Deneyisel olarak oluşturulan kırıklara bifosfonat ilaç kullanımının etkilerinin

histopatolojik olarak incelenmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

64. 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 Invest.* 1983;72(4):1396-1409. doi:10.1172/JCI111096
65. Craft PD, Mani MM, Pazel J, Masters FW. Experimental study of healing in fractures of membranous bone. *Plast Reconstr Surg.* 1974;53(3):321-325. doi:10.1097/00006534-197403000-00013
66. Guyton AC, Hall JE (2007). *Physiology Review*. 11th ed. Çeviren: Çavuşoğlu H. Yeğen B, Nobel Tıp Kitabevi Ltd. Şti., İstanbul, 3-9.
67. Soydan N (1985). Genel Histoloji. 1. Basım. İstanbul, İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul; 100-119.
68. Gómez-Font R, García M, Olmos J. Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13:E318-24.
69. Fawcett DW (Don W. *A Textbook of Histology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 1986.
70. Erkoçak A (1980). Genel Histoloji. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara; 236-257.
71. Ten Cate AR (1984). *Oral Histology, Development, Structure and Function*. Fourth Edition, The C.V Mosby Company, New York; 123-134.
72. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Diaz-Flores L. Adult stem cells and repair through granulation tissue. *Front Biosci.* 2009;14(4).
73. Junguiera LC, Kelley RO (1998). Basic Histology. Temel Histoloji. Çeviren Aytekin Y. Barış Kitabevi, İstanbul 12-29. - Поиск в Google.
[https://www.google.com/search?q=Junguiera+LC%2C+Kelley+RO+\(1998\).+Basic+Histology.+Temel+Histoloji.+Çeviren+Aytekin+Y.+Barış+Kitabevi%2C+İstanbul+12-29.&aq=chrome..69i57.956j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com/search?q=Junguiera+LC%2C+Kelley+RO+(1998).+Basic+Histology.+Temel+Histoloji.+Çeviren+Aytekin+Y.+Barış+Kitabevi%2C+İstanbul+12-29.&aq=chrome..69i57.956j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8). Accessed March 8, 2022.
74. Am LPGPCT of H 3rd EJJ, 2007;286. MA. No Title.
75. Wang R. The Gasotransmitter Role of Hydrogen Sulfide. *Antioxid Redox Signal.* 2003. doi:10.1089/152308603768295249
76. Liu Y, Yang R, Liu X, et al. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca²⁺ channel sulfhydration. *Cell Stem Cell.* 2014.

doi:10.1016/j.stem.2014.03.005

77. Xie X, Sun A, Zhu W, et al. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with Hydrogen Sulfide Enhances Repair of Myocardial Infarction in Rats. *Tohoku J Exp Med*. 2011. doi:10.1620/tjem.226.29
78. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo De Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid - Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Cranio-Maxillofacial Surg*. 2014. doi:10.1016/j.jcms.2013.11.005
79. Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry. In: *Methods in Molecular Biology*. ; 2017. doi:10.1007/978-1-4939-7172-5_5
80. Martelli SJR, Damian MF, Schinestsck AR, Schuch LF, Cascaes AM, Vasconcelos ACU. Imaging and histomorphometric evaluation of mandible and tibia of rats treated with bisphosphonates. *Oral Maxillofac Surg*. 2019. doi:10.1007/s10006-019-00807-9
81. Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*. 2008;117(18):2351-2360. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753467
82. Feng W, Teo X-Y, Novera W, et al. Discovery of New H₂S Releasing Phosphordithioates and 2,3-Dihydro-2-phenyl-2-sulfanylenebenzo[d][1,3,2]oxazaphospholes with Improved Antiproliferative Activity. *J Med Chem*. 2015;58(16):6456-6480. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00848
83. Hillner BE, Ingle JN, Berenson JR, et al. American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. American Society of Clinical Oncology Bisphosphonates Expert Panel. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000;18(6):1378-1391. doi:10.1200/JCO.2000.18.6.1378
84. Ott SM. Long-term safety of bisphosphonates. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1897-1899. doi:10.1210/jc.2005-0057
85. Mashiba T, Mori S, Burr DB, et al. The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. *J Bone Miner Metab*. 2005;23 Suppl:36-42. doi:10.1007/BF03026321
86. Tanvetyanon T, Stiff PJ. Management of the adverse effects associated with intravenous bisphosphonates. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2006;17(6):897-907. doi:10.1093/annonc/mdj105
87. Fleisch H. Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. *Recent results cancer Res Fortschritte der Krebsforsch Prog dans les Rech sur le cancer*. 1989;116:1-28. doi:10.1007/978-3-642-83668-8_1

88. Lee CYS, David T, Nishime M. Use of platelet-rich plasma in the management of oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a report of 2 cases. *J Oral Implantol*. 2007;33(6):371-382. doi:10.1563/1548-1336(2007)33[371:UOPPIT]2.0.CO;2
89. Vincenzi B, Santini D, Dicuonzo G, et al. Zoledronic acid-related angiogenesis modifications and survival in advanced breast cancer patients. *J Interf cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res*. 2005;25(3):144-151. doi:10.1089/jir.2005.25.144
90. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001;10(4). doi:10.3171/foc.2001.10.4.2.
91. Thapliyal GK. Peterson's Principles of Oral & Maxillofacial Surgery. *Med Journal, Armed Forces India*. 2006;62(1):89. doi:10.1016/S0377-1237(06)80173-5
92. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-528. doi:10.1016/s0039-6109(05)70566-1
93. Phillips SJ. Physiology of wound healing and surgical wound care. *ASAIO J*. 2000;46(6):S2-5. doi:10.1097/00002480-200011000-00029
94. Vidal-Gutiérrez X, Gómez-Clavel J-F, Gaitán-Cepeda L-A. Dental extraction following zoledronate, induces osteonecrosis in rat's jaw. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;22(2):e177-e184. doi:10.4317/medoral.21609
95. Takaoka K, Yamamura M, Nishioka T, et al. Establishment of an Animal Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws in Spontaneously Diabetic Torii Rats. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144355. doi:10.1371/journal.pone.0144355
96. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CKJ. Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 1997;15(2):221-226. doi:10.1002/jor.1100150210
97. Iannaccone PM, Jacob HJ. Rats! *Dis Model Mech*. 2009;2(5-6):206-210. doi:10.1242/dmm.002733
98. Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med Hypotheses*. 1996;46(2):150-154. doi:10.1016/s0306-9877(96)90016-x
99. Csonka C, Pataki T, Kovacs P, et al. Effects of oxidative stress on the expression of antioxidative defense enzymes in spontaneously hypertensive rat hearts. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(7):612-619. doi:10.1016/s0891-5849(00)00365-8
100. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol*. 2002;3(12):1129-1134. doi:10.1038/ni1202-1129
101. Dayisoğlu EH, Şenel FÇ, Üngör C, et al. The effects of adjunctive parathyroid hormone

- injection on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: An animal study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013. doi:10.1016/j.ijom.2013.05.001
102. Fliefel R, Tröltzsch M, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(5):568-585. doi:10.1016/j.ijom.2015.01.026
 103. Minamisako MC, Ribeiro GH, Lisboa ML, Mariela Rodríguez Cordeiro M, Grando LJ. Medication-Related Osteonecrosis of Jaws: A Low-Level Laser Therapy and Antimicrobial Photodynamic Therapy Case Approach. *Case Rep Dent*. 2016;2016:6267406. doi:10.1155/2016/6267406
 104. Alons K, Kuijpers SCC, de Jong E, van Merkesteyn JPR. Treating low- and medium-potency bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws with a protocol for the treatment of chronic suppurative osteomyelitis: report of 7 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(2):e1-7. doi:10.1016/j.tripleo.2008.09.021
 105. Mitsimponas K, Sereti M, Semergidis T. O.130 Bisphosphonate associated osteonecrosis: role of surgery. *J Cranio-Maxillofac Surg*. 2008;36. doi:10.1016/s1010-5182(08)71254-x.
 106. Eckert AW, Maurer P, Meyer L, et al. Bisphosphonate-related jaw necrosis - Severe complication in Maxillofacial surgery. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(1). doi:10.1016/j.ctrv.2006.09.003.
 107. Millesi G, Wutzl A, Biedermann E, Karschigijew G, Ewers R. Bisphosphonate induced osteonecrosis of the JAWS (BIONJ): six months follow up. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007;36(11). doi:10.1016/j.ijom.2007.08.298.
 108. Van den Wyngaert T, Claeys T, Huizing MT, Vermorken JB, Fossion E. Initial experience with conservative treatment in cancer patients with osteonecrosis of the jaw (ONJ) and predictors of outcome. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2009;20(2):331-336. doi:10.1093/annonc/mdn630
 109. Scoletta M, Arduino PG, Dalmasso P, Brocchetto R, Mozzati M. Treatment outcomes in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110(1):46-53. doi:10.1016/j.tripleo.2010.02.020
 110. Nase JB, Suzuki JB. Osteonecrosis of the jaw and oral bisphosphonate treatment. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(8):1115-1170. doi:10.14219/jada.archive.2006.0350
 111. 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). doi:10.14219/jada.archive.2007.0294.
112. Cardoso C, CURRA C, Curi M, et al. Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis using platelet-rich plasma: microtomographic, microscopic, and immunohistochemical analyses. *Braz Oral Res.* 2019;33. doi:10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0050
 113. Wu D, Wang H, Teng T, Duan S, Ji A, Li Y. Hydrogen sulfide and autophagy: A double edged sword. *Pharmacol Res.* 2018;131:120-127. doi:10.1016/j.phrs.2018.03.002
 114. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem Pharmacol.* 2018;149:110-123. doi:10.1016/j.bcp.2017.11.014
 115. Zaorska E, Tomasova L, Koszelewski D, Ostaszewski R, Ufnal M. Hydrogen Sulfide in Pharmacotherapy, Beyond the Hydrogen Sulfide-Donors. *Biomolecules.* 2020;10(2). doi:10.3390/biom10020323
 116. Citi V, Piragine E, Testai L, Breschi MC, Calderone V, Martelli A. The Role of Hydrogen Sulfide and H₂S-donors in Myocardial Protection Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Curr Med Chem.* 2018;25(34):4380-4401. doi:10.2174/0929867325666180212120504
 117. Yang M, Zhang K, Zhang X, et al. Treatment with hydrogen sulfide donor attenuates bone loss induced by modeled microgravity. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019;97(7):655-660. doi:10.1139/cjpp-2018-0521
 118. Ma J, Shi C, Liu Z, et al. Hydrogen sulfide is a novel regulator implicated in glucocorticoids-inhibited bone formation. *Aging (Albany NY).* 2019;11(18):7537-7552. doi:10.18632/aging.102269
 119. Xu Z-S, Wang X-Y, Xiao D-M, et al. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(10):1314-1323. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.016
 120. Liu L, Zhou M, Zhu R, et al. Hydrogen sulfide protects against particle-induced inflammatory response and osteolysis via SIRT1 pathway in prosthesis loosening. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2020;34(3):3743-3754. doi:10.1096/fj.201900393RR
 121. Liu Z, Han Y, Li L, et al. The hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E(-/-) mice. *Br J Pharmacol.* 2013;169(8):1795-1809. doi:10.1111/bph.12246
 122. Scheper M, Chaisuparat R, Cullen K, Meiller T. A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010;3:6. doi:10.1186/1755-1536-3-6
 123. Vasconcelos ACU, Berti-Couto SA, Azambuja AA, et al. Comparison of effects of clodronate

and zoledronic acid on the repair of maxilla surgical wounds - histomorphometric, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, osteoprotegerin, von Willebrand factor, and caspase-3 evaluation. *J oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol*. 2012;41(9):702-712. doi:10.1111/j.1600-0714.2012.01140.x

