

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KÜLTÜR ORTAMINDA BİFOSFONAT EKLENMİŞ KEMİK
REJENERASYON DENEYSEL MODELİNE MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE VE BORİK ASİT TEDAVİLERİNİN KEMİK
DOKUSUNA ETKİSİ**

Dt. Gökcan ŞAHİN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Onur ŞAHİN

İZMİR
Mayıs 2022

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KÜLTÜR ORTAMINDA BİFOSFONAT EKLENMİŞ KEMİK
REJENERASYON DENEYSEL MODELİNE MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE VE BORİK ASİT TEDAVİLERİNİN KEMİK
DOKUSUNA ETKİSİ**

Dt. Gökcan ŞAHİN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Onur ŞAHİN

Bu tez İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından 2021-TDU-DİŞF-0010 nolu proje ile desteklenmiştir.

**İZMİR
Mayıs 2022**

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / /

Tez Danışmanı:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

ONAY: Bu uzmanlık tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan uzmanlık tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

o Tezimin tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)

o Tezimin tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

....../....../....

İmza

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahribat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tez danışmanım. Doç. Dr. Onur ŞAHİN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

....../....../....

Ad-Soyad İmza

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca benden desteğini hiç esirgemeyen, yol gösteren, tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde büyük katkısı olan ve her zaman yanımda olan sevgili hocam tez danışmanım Doç. Dr. Onur ŞAHİN'e,

Tezimin labaratuvar ve histolojik incelemelerinin yapılmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr.İbrahim Mehmet TUĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Tuna ÖNAL, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZTATLICI'ya,

Cerrahi eğitimim boyunca samimiyet ve güler yüzlülükle bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşıp bana daima yol gösteren, mesleki gelişimimde büyük katkıları bulunan, birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki hocalarım Prof. Dr. Gülten KAVAK, Prof. Dr. Nergiz YILMAZ, Doç. Dr. Murat ULU, Doç. Dr. Nihat LAÇİN ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKÇAY'a,

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, klinik ve ameliyathane personeline,

Uzmanlık eğitimi boyunca hep yan yana olduğumuz çok sevgili ve değerli arkadaşlarım, Dt. Aynur TÜZÜNTÜRK, Dt. Berat Metin ADAK, Dt. Birkan TATAR, Dt. Denizcan ATALAY, Dt. Onur KUTLU, Dt. Oya TÖRÜN'e,

Varlığıyla huzur veren birlikte büyüyüp yol aldığımız sevgili eşim Bahar SAYIN ŞAHİN'e,

Sevgilerini ve desteklerini hep en yakınımda hissettiğim, benim için hep orada olacaklarının verdiği güvenle ayakta durmamı sağlayan annem Nazife ŞAHİN, babam Yakup ŞAHİN ve dayım Kamber GENÇTÜRK'e sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kemik dokusu	4
2.1.1 Kemik hücreleri.....	5
2.1.2 Kemik matriksi	7
2.1.3 Periosteum & endosteum	7
2.1.4 Kemik iliği	8
2.1.5 Osteogenez.....	9
2.1.6 Kemik fonksiyonu	11
2.1.7 Kemik mekanik özellikleri	11
2.1.8 Kemik iyileşmesi	14
2.2 Bifosfonatlar	15
2.2.1 Bifosfonatların tarihçesi	15
2.2.2 Bifosfonatların kimyasal yapısı	17
2.2.3 Bifosfonatların etki mekanizması	20
2.2.4 Bifosfonatların yan etkileri	24
2.3 İlaçlara bağlı çene kemiklerinde osteonekroz (MRONJ).....	25
2.4 Bor	27
2.4.1 Borun sağlık üzerine etkileri	29
2.4.2 Borik asit.....	31
2.4.3 Borik asitin kemik iyileşmesi üzerine etkileri.....	32
2.5 Kök hücre.....	34
2.5.1 Kök hücre düzeni	35
2.5.2 Mezenkimal kök hücrelerin rejenerasyon potansiyeli.....	36
2.5.3 Adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH).....	38
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
1.1. Gereç.....	42
3.1.1 Deney hayvanları	42
3.1.2 Deney Grupları	42
3.1.3 Cerrahi Yöntem	43
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar	48
3.2 Yöntem.....	49
3.2.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Çoğaltılması.....	49

3.2.2	Zoledronik Asit Çözeltisi	50
3.2.3	Hücre Üremesinin MTT ile Değerlendirilmesi:	50
3.2.4	Von Kossa (VK) Boyaması ve Alizarin Kırmızısı (AK) Boyaması ile Kalsiyum İçeriğinin Belirlenmesi:	50
3.2.5	İmmünohistokimya Yöntemi ile Osteokalsin, Osteonektin, Osteoprotegerin, Alkalen Fosfotaz ve RANKL Aktivitesi Tayini:	51
3.2.6	Verilerin İstatistiksel Analizi:	52
4	BULGULAR	53
4.1	Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Eldesi, Kültürü ve Karakterizasyonu.....	53
4.2	Etkili Borik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	57
4.3	Kemik Diski Modelindeki Zoledronik Asit Hasarında Bor ve Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisi	57
4.4	Kemik Diski Modelindeki Zolderonik Asit Hasarında Osteojenik Farklılaşma ve Kemiksi Adacık Oluşumuna Bor ve Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisi	61
4.4.1	Kültürde Osteojenik Farklılaşma Alizarin Kırmızısı Histokimyası	61
4.4.2	Kültürde Osteojenik Farklılaşma VonKossa Histokimyası	63
4.5	Kültürde Osteojenik Farklılaşma için İmmünohistokimya	66
4.5.1	Osteokalsin (OK) İmmünohistokimyası:	66
4.5.2	Osteonektin (ON) İmmünohistokimyası	70
4.5.3	Alkalen Fosfataz (ALP) İmmünohistokimyası.....	73
4.5.4	Osteoprotegerin (OPG) İmmünohistokimyası	75
4.5.5	RANKL İmmünohistokimyası:	79
5	TARTIŞMA	82
6	SONUÇ	108
7	ÖZET	109
8	SUMMARY	110
9	KAYNAKLAR	111
	EKLER	126
	ÖZGEÇMİŞ	127

SİMGELER VE KISALTMALAR

AK:	Alirazin Kırmızısı
ALP:	Alkalın Fosfataz
BNNT:	Boron Nitride Nanotubes
BMP:	Kemik Morfojenik Proteini
BSP:	Kemik Sialoprotein
BRONJ:	Bifosfonat Bağlı Çene Kemiklerinde Osteonekroz
COL1:	Kollajen Tip 1
Col1A1:	Kollajen Tip 1 Alfa 1
DMEM:	Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle'ı
DRONJ:	Denosumaba Bağlı Çene Kemiklerinde Osteonekroz
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
HAp:	Hidroksiapatit
HUVEC:	İnsan Göbek Damarı Endotel Hücreleri
IGF:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IHH:	Hint kirpi yolu
IL-6:	İnterlökin 6
iDGKH:	İnsan Diş Germi Kök Hücreleri
iKMKH:	İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri
iSDKH:	İnsan Süt Dişi Kök Hücleri
KD:	Kemik Diski
KMKH:	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri
M-CSF:	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MKH:	Mezenkimal Kök Hücre
MMP:	Matriks Metaloproteinaz
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik Asit
MRONJ:	İlaca Bağlı Çene Kemiklerinde Osteonekroz
ng:	nanogram
OK:	Osteokalsin
ON:	Osteonektin
OPG:	Osteoprotegerin
OPN:	Osteopontin

PBAT: Poli(butilen adipat-ko-tereftalat)
PBS: Fosfat Tamponlu Salin
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDLSC: Periodontal Ligament Kök Hücrelerinin
PKH: Perivaküler Kök Hücreleri
PLGA: Poli-(laktit-ko-glikolid-asit)
PTH-R1: Paratiroid Hormon 1 Reseptörü
PTH: Paratiroid Hormonu
RANKL: Nükleer Faktör Kappa B Ligandının Reseptör Aktivatörü
SVF: Stromal Vasküler Fraksiyon
TGF- β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TKİ: Tirazin Kinaz İnhibitörü
TZP: Trombositten Zengin Plazma
 β VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
 μ g: migrogram
 μ M: Mikromolar
VK: Von Kossa
YKH: Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök hücre
ZA: Zoledronik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Kemik dokusu hücreleri.....	6
Şekil 2 Kemik dokusu.....	9
Şekil 3 Kemik remodeling aşamaları.....	12
Şekil 4 PTH, D vitamini ve kalsitoninin serum kalsiyum konsantrasyonuna etkisi..	13
Şekil 5 Tc99 kullanılarak yapılan kemik taraması.....	16
Şekil 6 Bifosfonatların tarihi.....	17
Şekil 7 Pirofosfat ve geminal bifosfonat.....	18
Şekil 8 Bifosfonatların mevalonat yolundaki etkileri	21
Şekil 9 Periyodik tablo.....	28
Şekil 10 Borun çeşitli kullanım alanları.....	29
Şekil 11 Bor metabolizması	31
Şekil 12 Borik asitin moleküler yapısı.....	31
Şekil 13 Kök hücre farklılaşmasının aşamaları.	35
Şekil 14 Mezenkimal kök hücre kaynakları ve çeşitli soylara farklılaşma potansiyelleri.....	37
Şekil 15 Kemik halkasının şematik görüntüsü.....	44
Şekil 16 Osteotomi hatlarının anatomik oluşumlarla ilişkisinin şematik görüntüsü.	45
Şekil 17 MTT ile kültür ortamına alındıktan sonra yirmi sekiz günlük süreçte hücre çoğalması ve canlılığı gösterildi.	54
Şekil 18 MKH karakterizasyonu için CD90, 44, 73 için pozitif olma ve hematopoetik belirteçler olan CD45 negatif olma İmmünohistokimya ile gösterildi	56
Şekil 19 Dördüncü haftada tüm gruplarda konfluent olma ve boşluğu tamamen doldurma gerçekleşmedi. ZA ile az miktarda osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımı görülürken ZA+BOR, ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR gruplarında daha belirgin bir biçimde gerçekleşti	60
Şekil 20 Oluşan kemiksi adacıklar için ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında anlamlı bir artış saptandı.....	65
Şekil 21 OK immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.	69
Şekil 22 ON immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir	72
Şekil 23 ALP immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.	74
Şekil 24 OPG immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.....	78
Şekil 25. RANKL immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.....	81

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1 Kafatasının steril cerrahi örtüyle örtülmesi ve povidon-iyodin solüsyonu (Poviodex, Kimpa, Türkiye) ile yıkanması. Yumuşak doku orta hattı boyunca, sagittal düzlemde, yaklaşık 25 mm uzunluğunda tam kalınlıkta insizyonun yapılması.....	45
Resim 2 Dış çapı 9 mm, iç çapı 8 mm olan trefan frez ile (Dentium, Güney Kore) birinci halkanın sınırlarının belirlenmesi ve mono kortikal kesilerin yapılması.....	46
Resim 3 Dış çapı 5mm iç çapı 4 mm olan trefan frez ile (Dentium, Güney Kore) ikinci halkanın sınırlarının belirlenmesi ve monokortikal kesilerin yapılması.	46
Resim 4 Trefan frez ile kesiler yapıldıktan sonra disklerin kemikten ayrılmadan önceki görünümü.	47
Resim 5 Dış çapı 9 mm iç, çapı 8 mm olan kemik halkalarının dikkatli bir şekilde kalvaryumdan ayırdıktan sonra ve saklama kabına konulması.	47
Resim 6 MKH için KD kültür ortamına alındıktan sonra tutunma, çoğalma, göç etme kemik benzeri adacık yapma şeklinde farklanma davranışları gözlemlendi.....	54
Resim 7 MKH karakterizasyonu için CD90, 44, 73 için pozitif olma ve hematopoetik belirteçler olan CD45 negatif olma immunohistokimya ile gösterilmiştir.....	55
Resim 8 Dördüncü haftada tüm gruplarda konfluent olma ve boşluğu tamamen doldurma gerçekleşmedi. ZA ile az miktarda osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımı görülürken ZA+BOR, ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR gruplarında daha belirgin bir biçimde gerçekleşti.....	58
Resim 9 AK boyaması ile ZA ile oluşan az sayıda ve az miktarda boyama izlenirken ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında daha fazla sayıda ve daha koyu boyanan kemiksi adacıklar izlendi.	62
Resim 10 VK boyaması ile ZA ile oluşan az sayıda ve az miktarda boyama izlenirken ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında daha fazla sayıda ve daha koyu boyanan kemiksi adacıklar izlendi.	63
Resim 11 OK immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.	67
Resim 12 ON immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.	70
Resim 13 ALP immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir	73
Resim 14 OPG immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.....	76
Resim 15 RANKL immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir	79

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1 Bifosfonatların R1, R2 zincirlerinin moleküler yapıları, potensleri ve osteonekroz oluşturma riskleri.	19
Tablo 2 MTT ile kültür ortamında hücre çoğalması ve canlılığının istatistiksel analizi.	55
Tablo 3 MKH karakterizasyonu için istatistiksel analiz.....	56
Tablo 4 Osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunun istatistiksel analiz 60	60
Tablo 5 MTT ile yapılan analizde ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında hücrelerin daha fazla kemiksi adacık yaptığı saptandı.	61
Tablo 6 Kemiksi adacıkların boyanmasında istatistiksel analiz.....	65
Tablo 7 Oluşan kemiksi adacıklar için ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında anlamlı bir artış saptandı.....	66
Tablo 8 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı	68
Tablo 9 OK immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.	69
Tablo 10 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı 71	71
Tablo 11 ON immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.	72
Tablo 12 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı 74	74
Tablo 13 ALP immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.	75
Tablo 14 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı 77	77
Tablo 15 OPG immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.	78
Tablo 16 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı 80	80
Tablo 17 RANKL immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.	81

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Bifosfonat grubu ilaçlar günümüzde kemik metastazı gösteren meme, prostat, akciğer kanseri, multipl miyeloma gibi maligniteler ile osteoporoz, osteopeni, paget hastalığı, osteogenezis imperfekta gibi sistemik sağlık sorunlarının tedavisinde osteoklastik aktiviteyi inhibe etmeleri ve antianjiogenik özelliğe sahip olmaları sebebiyle rutin olarak kullanılmaktadır.¹

Bifosfonatlar, kemik metabolizmasında doğrudan kemik yıkımından sorumlu olan osteoklastik aktiviteyi engellemelerinin yanı sıra, osteoblastların osteoklast oluşumundaki rolünü de inhibe ederler. Ayrıca ekstrasellüler matriksteki tümör tutulumunu ve invazyonunu engellemekle beraber tümör hücrelerinin apoptozunu sağlamak gibi antitümöral etkileri de bulunmaktadır.² Bifosfonatlar fizyolojik dozlarda uygulandıklarında yeni oluşmuş kemikte ve osteoklastların yakınında kemiğe spesifik afiniteleri nedeniyle çökeler. Bunlarla beraber, vasküler obliterasyona neden olan anjiogenezisi engelleyecek aktiviteye de sahiptirler.³

Bifosfonat kullanımına bağlı çene kemiklerinde görülen osteonekroz (BRONJ) ilk kez Marx ve ark. tarafından 2003 yılında bildirilmiştir.⁴ Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahlar Birliği (AAOMS) BRONJ’u, “baş-boyun bölgesini içeren bir radyoterapi geçmişi olmadan bifosfonat tedavisi görmüş veya görmekte olan hastalarda, maksillofasiyal bölgede bir doktor tarafından teşhis konulduğu andan itibaren 8 haftada iyileşmeyen, açığa çıkmış kemik varlığı” şeklinde tanımlamıştır.⁵

2014 yılında AAOMS BRONJ terimini ilaca bağlı çene kemiklerinde osteonekroz (MRONJ) olarak revize etmiştir. Bu değişiklik antianjiogenik ajanlar (bevacizumab sunitinib) ve antirezorptif ajanlar (denosumab) kullanımından sonra artış gösteren çene kemiklerinde osteonekroz yayınları nedeniyle yapılmıştır.⁶ MRONJ, kanser hastalarının bazılarında veya osteoporoz hastalarında tedavi amaçlı kullanılan ilaçlara bağlı çene kemiklerinde ilerleyici kemik yıkımıyla karakterize bir yan etkidir. Son yıllarda diş hekimlerinin çok sık karşılaştığı bir durum haline gelmiştir. MRONJ ile ilişkili ilaçlara bakıldığında bifosfonatlar klinik olarak en geniş endikasyona sahip olan ve en çok kullanılan ilaç grubudur. Zoledronik asit ise bu grupta en yaygın olarak kullanılan ilaçtır.⁶

İlk olarak kemik iliğinde bulunan ve yaklaşık 20 yıl boyunca kemik iyileşmesini teşvik etmek amacıyla kullanılan mezenkimal kök hücreler (MKH)⁶, osteoblastlara, kondroblastlara ve adipositlere farklılaşabilen stromal hücrelerdir.⁷ MKH, yağ dokusu ve damarlarda bulunmaktadır. Ayrıca indüklenmiş pluripotent hücrelerden de üretilebilir. Kaynaklarına veya özelliklerine göre MKH'ler, kemik iliği MKH, yağ dokusu kaynaklı MKH, perivasküler kök hücre, indüklenmiş pluripotent kök hücre ve genetiği değiştirilmiş MKH olarak ayrılabilir.⁸ Bu kök hücrelerin veya çeşitli büyüme faktörlerinin greft materyalleriyle beraber kullanımı kemiğin rejenerasyon hızını ve kalitesini arttırmaktadır. Ayrıca sonuçların daha öngörülebilir olmasını sağlamaktadır.^{9,10}

Güncel literatür incelendiğinde, yapılmış çalışmalar MKH'nin yanı sıra borik asitin (BA) de lokal olarak uygulanmasının kemik rejenerasyonunu hızlandırdığını göstermektedir. Bir mineral olan bor, doğada borik asit ve borat olarak bulunmaktadır.¹¹ Kalsiyum, magnezyum ve D vitamini ile etkileşime girerek kemikte birikir.¹² Son çalışmalarda borik asitin lokal ve sistemik yollarla uygulanmasıyla kemik kırıklarının iyileştiği, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu için avantaj yarattığı ve kemiğin iyileşme sürecinde yeni kemik oluşumunu erken dönemde hızlandırdığı bildirilmiştir.^{13,14}

Literatürde bu konuda mevcut çalışmalar bulunmasına rağmen iki materyalin kombine edilerek kullanıldığı çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. İki materyalin kombine edilerek bifosfonat ilave edilmiş kemik dokusu üzerindeki etkilerini gösteren bir çalışma ise literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, sıçan kafatasından çıkarılan kemik halkalarının bifosfonat grubu ilaç olan Zoledronik Asit (ZA) ile zayıflatılmasından sonra, kemik halkalarına MKH ve BA eklenerek erken dönemde kemiğin iyileşmesinin morfolojik, histolojik ve immünohistokimyasal açıdan incelenmesi amaçlanmaktadır.

Bu tez çalışması 5 adet amaç üzerinde yoğunlaşmıştır;

1. Kemik rejenerasyonu deneysel modeli oluşturmak,
2. Kemik rejenerasyon deneysel modeline bifosfonat grubu ilaç ekleyip kemiğin değişimini in vitro olarak incelemek,

3. BA'nın bifosfonat grubu ilaç eklenmiş kemik deneysel modelindeki etkilerini in vitro olarak incelemek,
4. MKH'nin bifosfonat grubu ilaç eklenmiş kemik deneysel modelindeki etkilerini in vitro olarak incelemek,
5. BA ve MKH kombinasyonunun bifosfonat grubu ilaç eklenmiş kemik deneysel modelindeki etkilerini in vitro olarak incelemektir.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik dokusu

Kemik dokusu, mineral ve organik yapının birleşiminden oluşan özelleşmiş bir bağ dokusudur. Kemik dokusunun üç önemli fonksiyonu vardır:

- **Mekanik fonksiyon;** iskelet kaslarının tendonlarına yapışma yeri sağlaması ve bu kasların kasılması ile oluşan kuvvetlerin vücut hareketlerine yön vermesi.
- **Koruyucu fonksiyon;** kraniumdaki merkezi sinir sistemi elemanlarının, toraks boşluğundaki akciğer, kalp gibi hayati iç organların ve diğer yumuşak dokuların korunması. Bunlarla beraber bünyesindeki kemik iliği sayesinde hematopoeze (kan hücre yapımına) olanak sağlanması.
- **Metabolik fonksiyon;** kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların depolanması ve bu iyonların vücut sıvılarındaki dengesinin sağlanması.

Bunlara ek olarak kemik dokusu, iskelet kası kasılmaları esnasında oluşan kuvvetleri çoğaltan ve bunları vücut hareketlerine dönüştüren bir kaldıraç sistemidir. Kemik metabolizmasında biyokimyasal, hormonal ve hücresel faktörler kemiğin özelliklerini ve kalitesini belirlemede önemli rol oynar.^{15,16}

Kemik özelleşmiş bir bağ dokusudur, hücreler arası mineralize materyalden, kemik matriksinden ve üç farklı hücre tipinden oluşur.¹⁷

- **Osteositler:** Kemik matriksi tabakası (lamelleri) arasındaki boşluklarda bulunur.
- **Osteoblastlar:** Matriksin organik bileşenlerini sentezler.
- **Osteoklastlar:** Kemik dokusunun rezorpsiyon ve remodelinginde görev alan çok çekirdekli dev hücrelerdir.

Tüm kemikler iç yüzeyde endosteum ve dış yüzeyde periosteum olmak üzere bağ dokusu katmanıyla kaplıdır.^{17,18}

2.1.1 Kemik hücreleri

2.1.1.1 Osteoblastlar

Osteoblastlar, embriyonel yaşamda mezenkim hücrelerinden, daha sonra ise bağ dokusunu oluşturan fibroblastlardan farklılaşan, olgun, metabolik olarak aktif, kemik oluşturan hücrelerdir. Kemik dokusunun yüzeyine yakın dizilirler ve kemikleşme bölgelerinde ve gelişmekte olan kemiklerin periost ile birleşim yerinde bulunurlar (Şekil.1). Osteoblastların temel işlevi, osteoid adlı organik matriksini ve matriks sentezi için gereken proteinleri ve büyüme faktörlerini sentezlemektir. Osteoblastlar salgıladıkları bu osteoid içerisinde gömülü kalırlar bunun yanı sıra osteoklastlarla beraber kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesinde etkilidir. Osteoblastlar daha önceden osteoklastlar tarafından rezorbe edilen kemik yüzeylerinde yeni kemik oluşumunda sorumludurlar.¹⁹

Osteoblastlar, %90 tip I kollajen, proteoglikanlar, osteoprotegerin (OPG), osteonektin, osteokalsin, osteopontin gibi proteinleri içerisinde bulundururlar.²⁰

2.1.1.2 Osteositler

Osteoblastlar zamanla kendi salgıları ile çevrenir ve mineralize kemik matriksi içinde gömülü kalırlar (Şekil 1). Lakuna olarak adlandırılan bu alanlarda yıldız şekilli hücreler olan osteositler haline gelirler. Osteositlere dönüşüm esnasında hücreler, kalsifiye matriks tarafından sarılan sitoplazmik uzantı meydana getirir. Osteositlerin sitoplazmik uzantıları dendritler olarak bilinmektedir.²¹

Osteoblastlarla karşılaştırıldığında, yassı şekilde olan osteositler, azalmış şekilde granüllü endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği içerir. Ancak daha fazla nükleer kromatin sergiler. Bu hücreler kemik matriksin devamlılığının sağlanmasında rol oynar.¹⁶

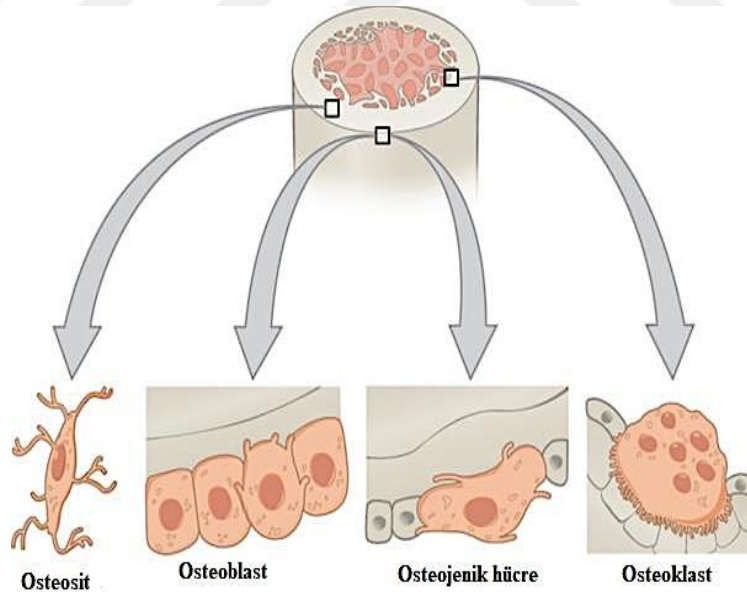
2.1.1.3 Osteoklastlar

Osteoklastlar büyük, hareketli ve çok çekirdekli hücrelerdir (Şekil 1). Kemik matriksini geliştirme görevinin yanında kemik ve kalsifiye kıkırdakların, mineral ve organik bileşenlerini parçalayan asidik enzimleri salgılama kapasitesine sahiptir.

Kemik bölgelerinde osteoklastlar, matriksteki enzim aktivitesi sonucu oluşan çöküntüler olarak bilinen rezorpsiyon bölmeleri (Howship lakunası) içinde bulunur.²¹

Osteklastlar, kemiğin fizyolojik olarak şekillenmesinde, yeniden yapılanmasında, kemik iyileşmesinde görev alırlar ve kemik rezorpsiyonundan sorumludurlar. Farklılaşma süreci, başlangıçta transkripsiyon faktörü PU-1 oluşumu ile başlar. Makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), osteoklastlara, metabolik farklılaşma sırasında bağlanır ve nükleer faktör kappa B ligandı (RANKL) oluşumunu artırır. Bu aşamada, RANKL oluşturan hücreler öncül osteoklastlarla etkileşime girer ve onları farklılaşmaya yönlendirir.²²

Osteoklast aktivitesi sinyal faktörleri ve hormonlarla kontrol edilir. Osteoklastlarda tiroid hormonu olan kalsitonin için reseptörler bulunur, ancak PTH için reseptörler yoktur. PTH ile aktive olan osteoblastlar, osteoklast uyarıcı faktör adı verilen bir sitokin üretir. Bu nedenle, bu iki hücrenin aktivitesi koordine edilmiştir ve her ikisi de kemik remodelinginde esastır.^{23,24}



Şekil 1 Kemik dokusu hücreleri.²⁵

2.1.2 *Kemik matriksi*

Kemik matriksinin organik bölümü, toplam kemik ağırlığının yaklaşık %30-35'ini oluşturur. %90'ı tip I kollajenden (COL 1), %10'u ise kollajen olmayan proteinler, proteoglikanlar, glikoproteinler, karbonhidratlar ve lipitlerden oluşur.²⁶

Organik matriks osteoblastlar tarafından sentezlenir ve mineralize olmamış matriks osteoid olarak bilinir. Osteoid içerisinde mineral çekirdeklenmesinin başlaması tipik olarak kalsiyum ve fosfat iyonlarının bırakılmasından birkaç gün sonra meydana gelir. Ancak olgunlaşması hidroksiapatit kristallerinin birkaç ay boyunca çoğalmasından sonra ve yeni matriks sentezlendiğinde tamamlanır. Kollajen lifleri arasında, kalsiyum ve fosfat iyonları çökelerek ortaya çıktıkça mineral çekirdeklenme meydana gelir ve sonuçta hidroksiapatit kristalleri oluşur. Osteoitin mineralizasyonu kemiğin üzerine gelen yüklere direnç gösterme özelliği kazandırmasını sağlar ve böylece çok hassas organları korumak için dayanıklılık ve sağlamlık verir. Ayrıca sistemik homeostaza katkıda bulunan minerallerin depolanması için ortam hazırlar.^{26,27}

İnorganik kısım, kemik matriksinin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini temsil eder. En çok hidratlanmış kalsiyum ve fosfat formundaki hidroksiapatit kristalleri bulunur. Hidroksiapatit osseöz matriksin başlıca inorganik bileşenidir, ancak bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da bulunur. Olgun kemik içerisinde farklı derecelerde mineralleşme görülür. Önemli miktarlarda amorf (kristalli olmayan) CaPO_4 da mevcuttur. Hidroksiapatitin yüzey iyonları hidratlanır, bunun sonucu kristalin çevresinde bir su ve iyon tabakası oluşur. Bu katman, hidrasyon kabuğu, kristal ve vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini kolaylaştırır.²⁶⁻²⁸

2.1.3 *Periosteum & endosteum*

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, periosteum ve endosteum adı verilen, kemik oluşturan hücre katmanları ve vaskülarize bağ dokusu ile kaplıdır. Periosteum uzun kemiklerin diyafiz kısmının dış yüzeyini kaplayan, yani eklemlili yüzeyleri kaplamayan, lifli bir kılıftır (Şekil 2). Endosteum ise tüm kemiklerin iç yüzeyini örter. Kemikteki büyük iç boşluklar endosteumla kaplıdır. Periosteum ve endosteumun

temel işlevleri, kemik dokusunun beslenmesi, onarımı ve büyümesi için gerekli olan sürekli osteoblast tedariğinin sağlanmasıdır.^{18,29}

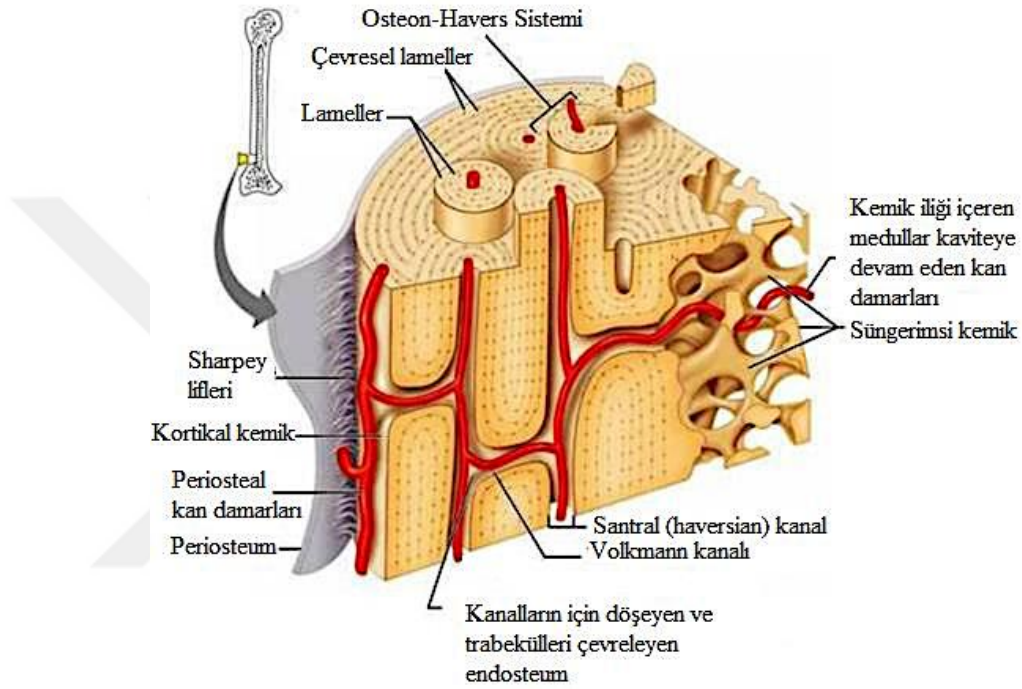
Periosteum, dış çevresel ve interstisyel lamellere uzanan, Sharpey'in lifleri olarak da adlandırılan osteojenik katmandaki güçlü kollajen lifler aracılığıyla tendon ve ligamentleri kemiğe bağlar (Şekil 2). Ayrıca, lenfatiklerin ve kan damarlarının kemiğe girip çıkarak kemiğin beslenmesini sağlar. Endosteum ise, düzleşmiş osteoprogenitör hücreler ve osteoblastları barındıran, kemiğin iç boşluğunu dolduran bölümündeki küçük spikülleri ve trabekülleri kaplayan, tek parça, çok ince yapıda bir bağ dokusu tabakasıdır ve periosteuma göre oldukça incedir . Kemiğin gelişimi ya da onarımı için gerekli olan yeni osteoblastların sağlanması ve kemik dokusunun beslenmesi periosteum ve endosteumun temel görevidir. Bu sebeple cerrahi işlemlerde periosteumun korunmasına özen gösterilmelidir.³⁰

Yüksek vaskülaritesi nedeniyle periosteumda çok sayıda endotelial perisit de vardır. Perisitler, kılcal endotelial hücreler ile fiziksel temas halinde olan hücrelerdir. Özel hazırlanmış kültür ortamı koşulları altında, bu hücreler osteoblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir. Bu nedenle, perisitler periosteum içinde tamamlayıcı bir osteoprogenitör hücre kaynağı olarak düşünülebilir.^{31,32}

2.1.4 Kemik iliği

Kemik iliği, vasküler sinüsler, hematopoetik doku adacıkları, stromal hücreler ve yağ hücrelerinden meydana gelir. Kemik iliği, temel hematopoetik organdır, birincil lenfoid dokudur (eritrosit, granülosit, monosit, lenfosit ve trombosit üretiminden sorumludur) ve önemli bir kök hücre kaynağıdır. Esas olarak hematopoetik dokudan oluşan kırmızı kemik iliği ve esas olarak yağ hücrelerinden oluşan sarı kemik iliği olmak üzere iki çeşidi vardır. Eritrositler, lökositler ve trombositler kırmızı kemik iliğinde köken alır. Her iki kemik iliği türü de çok sayıda kan damarı ve kılcal damar içerir. Doğum sırasında, vücuttaki tüm kemik iliği kırmızıdır. Yaşlandıkça, kırmızı kemik iliği azalarak sarı kemik iliğine dönüşür; yetişkin kemik iliğinin sadece yarısı kırmızıdır. Şiddetli kanama durumlarında, vücut kan hücresi üretimini arttırmak için sarı iliği kırmızı iliğe dönüştürebilir. Fibroblastlar, makrofajlar, adipositler, osteoblastlar, osteoklastlar ve endotel hücreleri kemik iliği stromasını oluşturan

hücrelerdir. Kemik iliği stroması, kemik iliği stromal hücreleri olarak da adlandırılan MKH'ler içerir. Bunlar, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent kök hücrelerdir. MKH'lerin in vitro veya in vivo olarak osteoblastlara, kondrositlere, miyositlere, adipositlere ve beta-pankreatik adacık hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir. Ek olarak kemik iliği, lökositler, eritrositler ve trombositlere köken olan hematopoetik kök hücreler içerir.^{33,34}



Şekil 2 Kemik dokusu.³⁵

2.1.5 Osteogenez

Kemik oluşması anlamına gelir. Kemik başlangıçta iki şekilde oluşabilir:

- **İntramembranöz kemikleşme:** Osteoblastların doğrudan mezenkimden ayrılıp osteoid salgılamaya başlamasıyla oluşur.
- **Endokondral kemikleşme:** Var olan hiyalin kıkırdaki matrisinin aşınıp yerini osteoid üreten osteoblastların almasıyla oluşur.

Her iki işlemde de ilk ortaya çıkan kemik dokusu primer veya woven kemiktir.

Primer kemik kalıcı değildir kısa zamanda yerini sekonder lamellar kemiğe bırakırd. Kemik gelişimi esnasında, primer kemiğin büyüme alanları, rezorpsiyon alanları ve sekonder kemik alanlarının hepsi birlikte görünür.³⁶

2.1.5.1 İntramembranöz kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme, embriyonik mezenkimal dokunun yoğunlaşması yoluyla gerçekleştiği için bu ismi alır. Frontal kemik, parietal kemikler, oksipital ve temporal kemiklerin parçaları, maksilla ve mandibula intramembranöz kemikleşme ile meydana gelir.³⁷

Mezenkimal kemik oluşumunun başlangıç noktasına kemikleşme merkezi denir. Süreç, mezenkimal hücre gruplarının osteoblastlara farklılaştığında anda başlar. Osteoblastlar osteoid matriksi üretirler ve ardından kalsifikasyon gerçekleşir, bu durum bazı osteoblastların enkapsülasyonuna yol açarak, osteositleri meydana getirir. Gelişmekte olan bu kemik adacıkları, kılcal damarlar, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreler içeren duvarlar oluşturur. Kemik duvarları arasında kalan bağ dokusuna, kan damarları ve farklılaşmamış mezenkimal hücreler nüfuz ederek kemik iliği oluşumu meydana gelir. Bir kemiğin kemikleşme merkezleri radyal olarak büyür nihayetinde orijinal bağ dokusuyla yer değiştirerek kaynaşır.^{38,39}

2.1.5.2 Endokondral kemikleşme

Endokondral ossifikasyon, hyalin kıkırdak parçası içinde gerçekleşir. Bu tip kemikleşme temelde kısa ve uzun kemiklerin yapımından sorumludur.³⁷

Başlangıçta, kemik dokusu kıkırdak modelin diyafizini çevreleyen halka şeklinde ortaya çıkar. Bu kemik halkası perikondrium içindeki osteoblast aktivitesi ile üretilir. Halka, oksijen ve besin maddelerinin kıkırdağa difüzyonunu engeller ve dejeneratif değişikliklere neden olur. Kondrositlerin ölümü, kalsifiye kıkırdak matriksinin kalıntıları tarafından oluşturulan gözenekli bir yapı ile sonuçlanır. Eski perikondrium, şimdiki periosteumdan gelen kan damarları daha önce osteoklastlar tarafından delinmiş kemik halkasından içeri girerek osteoprogenitör hücreleri merkezi

bölgeye getirir. Daha sonra, osteoblastlar kalsifiye kıkırdak matriksine tutunur ve kıkırdak matriks kalıntılarını çevreleyen primer kemik katmanlarını üretir.^{37,40}

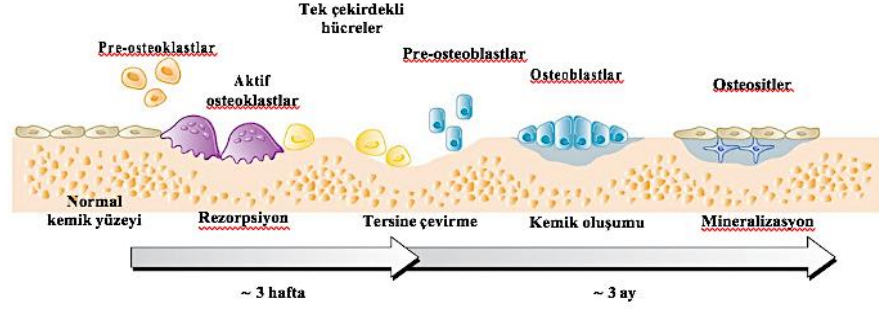
2.1.6 Kemiğin fonksiyonu

Kemiğin ana fonksiyonları vücut hareketi, organların korunması ve mineral homeostazını sağlamaktır. Mekanik süreç, çevresel faktörler ve hormonlar kemik rezorpsiyonu ve kemik yapımı arasındaki dengeyi düzenler. Ek olarak, kemik hücreleri, vücuttaki kalsiyum ve fosfor dengesini korur bu da kemiğin mekanik mukavemetine katkıda bulunur.⁴¹

2.1.7 Kemiğin mekanik özellikleri

Kemik, uyum sağlama kapasitesi yüksek ve dinamik bir dokudur. Kemiğin mekanik özellikleri vücut tarafından metabolik ve mekanik ihtiyaçlarına göre düzenlenir. Kalsiyum hidroksiapatit kristalleri kemiğin ana mineral bileşenlerini oluşturur. Hidroksiapatit, kemiğin esnekliğini, sertliğini hem de gerilme mukavemetini düzenler. İskeletsel uyum sağlama mekanizması, kemik remodelingi olarak da bilinen, kemik yapım ve yıkım süreci ile gerçekleştirilir (Şekil 3). Kemik osteoklastlar tarafından yıkılır ve daha sonra osteoblastlar tarafından yeni kemik oluşumu sağlanır.⁴¹

Kemik mekanik yüke maruz kaldığında, bölgedeki kemiği yenilemek ve onarmak için osteoklast mekanoreseptörleri doğrudan uyarılır. Ek olarak, gelen basınç kemik iliğinde osteoklast farklılaşmasını artırır. Mekanik basınca yanıt olarak osteoblastlar prostaglandin salgılayarak osteoklastlar dolaylı olarak uyarılır. Kemik matriksinin mekanik deformasyonu, osteoklastik rezorpsiyonu uyaran elektrik potansiyelini de indükler.^{42,43}



Şekil 3 Kemik remodeling aşamaları.⁴⁴

Kalsiyum homeostazı, kemiğin fizyolojisi için büyük önem arz etmektedir. Kalsiyum iyonları birçok enzim aktivitesi için şart olduğu gibi hücre adezyonu, sitoskeletal hareketleri, ekzositoz, membran geçirgenliği ve vücuttaki hücrelerdeki farklı fonksiyonlara öncülük eden proteinler için de elzemdir. İskelet yapısı toplam kalsiyumunun %99'unu içinde barındırır. Osteoblastlar mineral birikimi ile elde edilen asidi absorbe etmek için alkalileştirme ile fosfat ve kalsiyum taşınmasını içeren mekanizmalarla kalsiyum toplar, kıkırdak kalsiyum mineralizasyonu pasif difüzyon ve fosfat üretimi ile gerçekleşir. Osteoklastlar tarafından yapılan kalsiyum mobilizasyonu, asit sekresyonu ile dolaylı şekilde elde edilir. Hem kemik yapımını hem de kemik yıkımını sağlayan hücreler, kalsiyum sinyallerini kullanır. Hem osteoklast farklılaşması hem de hareketliliği kalsiyum tarafından düzenlenir.^{45,46}

Kalsiyum vücuda beslenme yoluyla alınır. Kemik, paratiroid (PTH) bezlerinden ve D vitamini metabolitlerinden gelen kalsiyum bağımlı sinyallere cevap verir, ancak paratiroid regülasyonu durursa doğrudan hücre dışı kalsiyuma cevap verir. Serum kalsiyum homeostazı, kemik yapımı ve yıkımı, kalsiyumun bağırsaklardan emilimi ve sekresyonu, böbrekler tarafından kalsiyumun yeniden emilimi ve atılımı, osteotropik hormonlar tarafından düzenlenen, çok faktörlü bir süreçtir (Şekil 4). Serumda kalsiyum konsantrasyonlarının dengesi, PTH, D vitamini ve kalsitonin arasındaki etkileşimden kaynaklanır. Kemik metabolizmasını tiroid hormonları, seks hormonları ve retinoik asitler de değiştirebilir. Besinlerden ve kemiklerden elde edilen

KALSIYUM

Diyetten Gelen Kalsiyum

D vitamini

Renal 1α hidroksilasyonu

PTH ↑

Yaşlanma ↓

Bağırsak D vitamini duyarlılığı

Net kalsiyum absorpsiyonu

KEMİK KALSIYUMU

Kemik rezorpsiyonu

Kemik formasyonu

PTH ↑

Yaşlanma ↓

Böbrek kalsiyum kaybı

PTH ↑

Östrojen ↓

D vitamini kalsiyum emiliminde rol oynar, PTH kemikten kalsiyum salınımını uyarır, böbrekten atılmasını azaltır ve D vitamininin biyolojik olarak aktif formuna (1,25-dihidroksikolekalsiferol) dönüştürülmesine yardımcı olur. Kalsiyum ve D vitamini alımının azalması ve östrojen eksikliği de kalsiyum eksikliğine katkıda bulunabilir.⁴⁸

13

T hücreleri, fizyolojik işlevi kemik rezorpsiyonunu baskılamak kalsitonini üretir. Kalsitonin reseptörleri osteoklastlar ve osteoklast öncüleri üzerinde bol miktarda bulunur. Böylece kalsitonin, mononükleer pre-osteoklastların füzyonunu önleyerek, farklılaşmayı inhibe eder sonuçta osteoklastlar tarafından sağlanan kemik rezorpsiyonun önüne geçer.^{43,49}

2.1.8 Kemik iyileşmesi

Kemik dokusunun iyileşmesi, yaralanmaya bağlı olarak hem rejenerasyon ile hem de onarım ile gerçekleşir. Rejenerasyon terimi, morfoloji ve fonksiyonun tamamen restorasyonuna imkan veren iyileşme şeklidir. Tamir terimi ise orijinal dokudan daha farklı bir morfolojide ve işlev açısından yeterli olmayan doku iyileşmesi şeklidir.⁵⁰

Kemik dokusundaki bir travma, kırık ile sonuçlanabilir. Kemik hasar gördüğünde, onarımı kolaylaştırmak için hemen çok aşamalı bir iyileşme süreci başlatılır. Doku ve hücre proliferasyonuna büyüme faktörleri, sitokinler ve sinyal molekülleri aracılık eder. Kemik onarımı üç aşamaya ayrılabilir: inflamatuvar faz, onarıcı faz ve remodeling fazı. İnflamatuvar faz doku hasar gördükten sonra başlar ve yaklaşık 2 hafta sürer. Onarım fazında ilk adım kan pıhtısı olmasıdır. Hasarlı hücrelerden salınan sitokin, enflamatuvar hücreleri bölgeye çağırır ve makrofajlar hasarlı doku ve hücrelerin fagositozunu sağlar. Osteoklastlar hasarlı kemiğin rezorpsiyona sebep olarak minerali açığa çıkartır. Bu noktada, RANKL-osteoprotegerin (OPG) oranı azalır.⁵⁰

Onarıcı faz yeni kemik matriksi ve kırıkta iskeletin oluşmaya başladığı kallus ile karakterizedir. Osteoblastlar ve kondroblastlar, kallusu meydana getirmek için proteinden oluşan bir iskele oluştururlar, daha sonra bu iskele yavaşça mineralize olarak sert kallusu oluşturur. Sert kallus olgunlaşmamış *woven* kemikten oluşur. Kırıkta ve periostal *woven* kemik oluşumunun başlamasına interleukin 6 (IL-6), OPG, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve BMP'lerin erken yukarı regülasyonu aracılık eder. Yumuşak kallustan sert kallusa geçiş zamanı, kırık oluşum anından ortalama 6-12 hafta sonra gerçekleşir.⁵⁰

Remodeling fazında kemik matriksi ve kıkırdak nihayet olgun kemiğe dönüşür. *Woven* kemik osteoblast-osteoklast ikilisinin aracılık ettiği normal kemik döngüsü ile olgun lameller kemiğe dönüştürülür. D vitamini ve kalsiyum, kemik tamiri için kritik öneme sahiptir. Remodeling aşamasının süresi, bireyin kemik metabolizmasına bağlıdır, ama genellikle yaralanma sürecinden sonra aylar geçmesi gerekir.⁴²

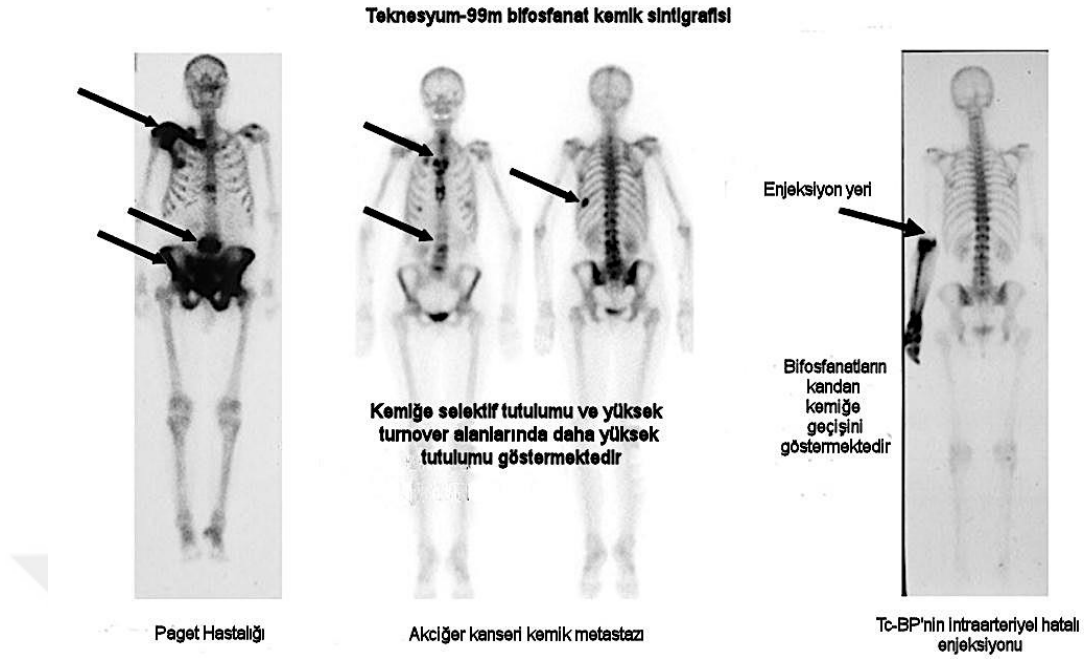
2.2 Bifosfonatlar

2.2.1 Bifosfonatların tarihçesi

Bifosfonatlar, osteoporoz, Paget hastalığı, maligniteye bağlı hiperkalsemi, osteolitik kemik metastazlarını ve multipl miyelomanın osteolitik lezyonlarının tedavisi amacıyla kullanılan ilaçlardır. İlk olarak 1865 yılında Alman kimyagerler tarafından sentezlenen bifosfonatlar (BP), kemik mineralizasyonunun fizyolojik bir inhibitörü olan pirofosfatların (PPi) stabil ve sentetik karbon analoglarıdır.⁴

Bifosfonatlar, pirofosfatların hidroksiapatit kristallerine bağlandığı ve kristal gelişimini inhibe ettiğinin bulunmasın akabinde kalsifikasyon inhibitörü olarak keşfedilmiştir. Bifosfonatların kemik minerallerine yüksek afinitesi ve hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda kalsifikasyonu önlediği gösterilmiştir.⁵¹

Science dergisinde 1969'da bifosfonatlardan nitrojen içermeyen formları etidronat ve klondronat için yayınlanmış ilk bilimsel yayında kristal formasyonu ve çözünmesi üzerinde vasküler kalsifikasyon ve kemik rezorpsiyonu etkileri tanımlanmıştır.⁵¹ Bifosfonatların bu erken bulgularına dayanarak Marion Dave Francis etidronatın fizikokimyasal etkileri için diş macunları içine dental plak uzaklaştırıcı ajan olarak kullanılma potansiyeli araştırmıştır.⁵² Francis, kalay iyonları ve kısa ömürlü gamma yayan izotop kompleksi olan Tc99m kullanarak bifosfonatları kemik sintigrafisinde değerlendirmiştir.⁵³ (Şekil 5) Ayrıca Tc99m ile yapılan kemik taramalarında da yapım ve yıkım olaylarının fazla olduğu mandibula ve maksillada yoğun infiltrasyon gösterdikleri açıklanmıştır.⁴



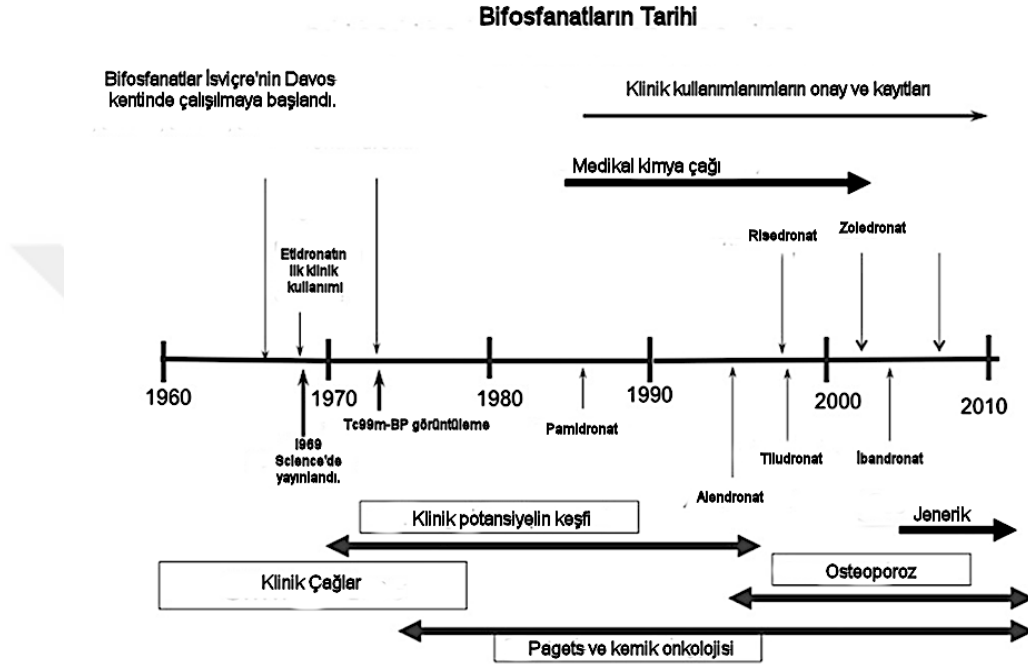
Şekil 5 Tc99 kullanılarak yapılan kemik taraması.⁵²

Osteoporozun önlenmesi amacıyla yapılan ilk yayın ise 1971'de Herbert Fleisch'in osteoporoz rat modeli üzerinde siyatik sinir kısmında osteoporozun immobilizasyonunun simule edilmesi olmuştur.⁵⁴ 1969 yılında Lancet dergisinde yayınlanan bir makalede ilk kez etidronat, çocuklarda myositis ossificans progressiva üzerinde kullanılmıştır.⁵² Progresif myositis ossifikans hastalığına sahip 16 aylık bir bebek, oral etidronat kullanılarak başarı ile tedavi edilmiştir.⁵⁵

Daha sonraları H. Fleisch ve ark., hayvan deneylerinde bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi engelleyerek kalsiyum dengesinin pozitif yönde değiştiğini göstermiştir.^{56,57}

Geçen 30 yıl içinde, yeni ve daha potent bifosfonatlar keşfedilmiştir (Şekil 6). Günümüzde, osteoklastik aktivite problemleri (kesin veya rölatif) ile karakterize tüm osteopatiler bifosfonatlar ile tedavi edilmektedir ve bu tüm kemik hastalıklarının %90'ına tekabül etmektedir.⁵⁸ Bifosfonatlar günümüzde menapoz sonrası osteoporoz tedavisi için temel ilaçtır ve tedavinin ilk basamağını oluşturmaktadır.⁵⁹

Güncel bifosfonat uygulamaları, osseo metastazların önüne geçilmesi, kemik ağrısının engellenmesi ve antiproliferatif aktiviteleri sebebiyle multipl miyeloma ve metastatik kemik hastalıklarını içermektedir. Ayrıca deneysel olarak sarkomalarda da kullanılmaya devam etmektedir. Son çıkan çalışmalarda parazit enfeksiyonlarında var olan organizmaların proliferasyonunun inhibisyonu üzerinde çalışılmaktadır.⁵⁸



Şekil 6 Bifosfonatların tarihi.⁵²

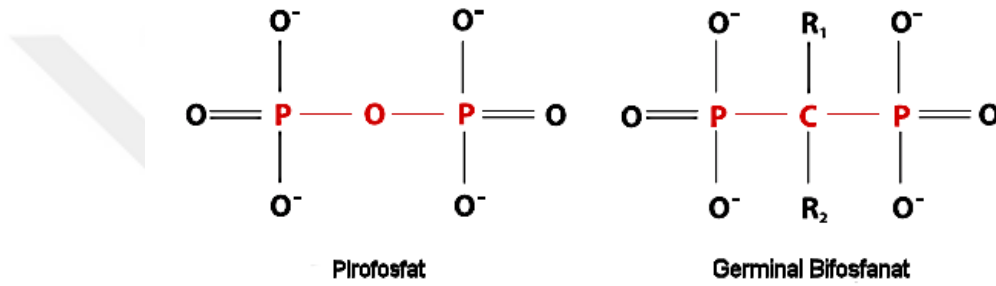
2.2.2 Bifosfonatların kimyasal yapısı

Bifosfonatlar, pirofosfonatların hidrolize edilemeyen analogu olarak, hareketli P-O-P bağları yerine ortadaki oksijen atomunun karbon ile yer değiştirmesiyle stabil P-C-P bağları içermektedir (Şekil 7).⁶⁰ Bu karbon bağlarından dolayı hidrolize dirençlidirler. Bifosfonatlar bu hidrolitik parçalanmaya dirençlidir bu özelliklerinden dolayı kemik matriksinde birikmelerine neden olup 11 yıldan daha uzun bir yarılanma ömrüne sahip olmalarını açıklamaktadır.⁴

2.2.2.1 Zoledronik asit kimyasal yapısı

Potensi en yüksek BP olan zoledronik asit (ZA) kimyasal olarak (1-hidroksi-2-(1H-imidazol-1-yl)ethane-1,1-difosfonik asit) bifosfonik asit monohidrat olarak

adlandırılır. Beyaz, kristal bir tozudur. Molekül formülü ($C_5H_{10}N_2O_7P_2H_2O$), molekül ağırlığı 290,11 g/mol'dür. Suda ve özellikle de nötral pH'de (pH: 6,8) çözünür, organik çözücülerde ise çözünmez. Zoledronik asit osteoklast aktivitesini ve kemik rezorpsiyonunu inhibe eden nitrojen içerikli bifosfonattır. Hidroksiapatite yüksek affinitesi vardır ve mineralize kemiğe direkt olarak bağlanır. Malignensi hiperkalsemisinde, multipl miyeloma, kemik metastazı yapan solid tümörlerin tedavisinde standart antineoplastik tedaviyle birlikte kullanılan bifosfonattır. Önerilen dozu her 3-4 haftada bir 4 mg'dır ve 15 dakika süreyle intravenöz infüzyon şeklinde verilmesidir.⁶¹



Şekil 7 Pirofosfat ve geminal bifosfonat.

Pirofosfatlar gibi bifosfonatlar da kemik minerallerine yüksek affinite gösterirler hem in vivo hem de in vitro olarak kalsifikasyonu önledikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^{51,57}

Ayrıca bifosfonatlar pirofosfonatlardan farklı olarak R1 ve R2 gruplarına sahiptir. R1 yapısı bifosfonatların kemik minerallerine affinitesi ve bağlanmalarından sorumlu iken R2 yapısı bifosfonatların kemik rezorpsiyonunu durdurmaktan sorumlu olarak bildirilmiştir.⁶² (Şekil 7) R1 yapısındaki farklı hidroksil (OH) ve primer amino (NH_2) grupları kalsiyum iyonların afinitesini değiştirmektedir. R1 tarafındaki hidroksil gruplarından birini hidrojen atomu ile yer değiştirdiğimizde hidroksiapatite afiniteleri yaklaşık 2 kat artmaktadır.⁵⁸ R2 yapısındaki zincirdeki karbon sayısının artması ya da azalması da kemik rezorpsiyonuna etkisini değiştirmektedir.⁶³ Nitrojen içeriğinin bulunmasının yanında atomun molekül içindeki pozisyonu da 700 kattan daha fazla etkinlik gösterebilmesine neden olabilmektedir.⁵⁸ Bifosfonatlar, 1990'lı yılların

başında yapılan sınıflamaya göre temelde 3 gruba ayrılmaktadır. Birinci grupta, azot içermeyen etidronat ve klondronat gibi bifosfonatlar bulunur. İkinci kuşak bifosfonatlarda aminoalkil R2 yapısı bulunurken üçüncü kuşak bifosfonatlarda heterosiklik nitrojen yapı bileşiğinin bulunması hem daha etkin hem de yarılanma ömrünü uzatmaktadır.⁶⁴

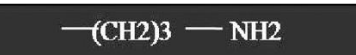
1. Kuşak: Etidronat-Klodronat-Tiludronat

2. Kuşak: Pamidronat-Alendronat-İbandronat

3. Kuşak: Zoledronat-Minodronat-Risedronat

Birinci kuşak bifosfonatlarla karşılaştırıldığında alendronat, pamidronat gibi ikinci kuşak bifosfonatlar 10-100 kat, zoledronat ve rizodranat gibi üçüncü kuşak bifosfonatlar ise 5000-20000 kat daha etkilidir. (Tablo 1)

Tablo 1 Bifosfonatların R1, R2 zincirlerinin moleküler yapıları, potensleri ve osteonekroz oluşturma riskleri.⁶⁵

	R1 zinciri	R2 zinciri	Potens	Osteonekroz oluşturma riskleri sıralaması
Etidronat	OH		X1	8
Klodronat	Cl		X10	7
Tiludronat	H		X10	6
Pamidronat	OH		X100	5
Alendronat	OH		X1000	4
İbandronat	OH		X5000	3
Risedronat	OH		X5000	2
Zolendronat	OH		X10,000	1

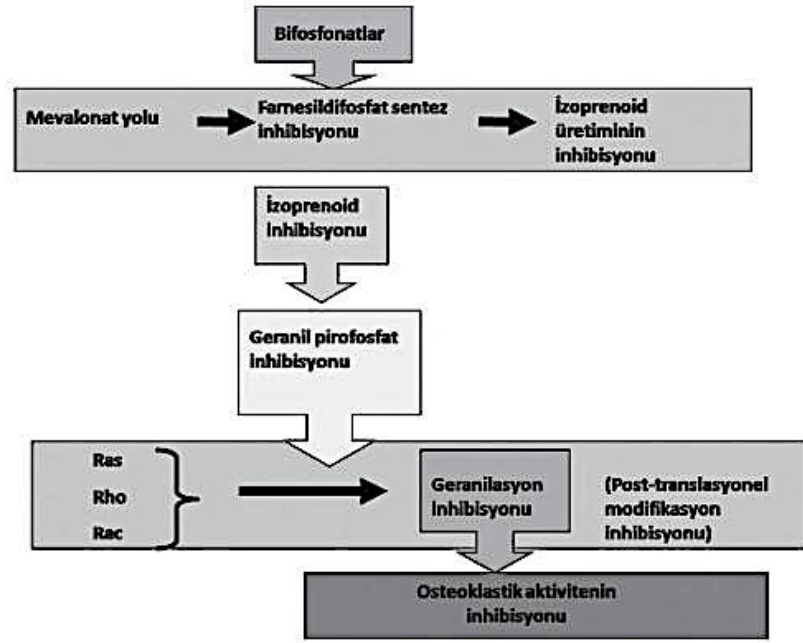
2.2.3 Bifosfonatların etki mekanizması

Bifosfonatlar, oral olarak kullanıldıklarında çok az emilim göstermektedir. Fakat bu azalmış emilim, kemik dokusundaki yüksek etkinlikleri ile kompanse edilmektedir. Bifosfonatların kandaki ortalama ömürleri kısa olmasına rağmen (30 dakika-2 saat) kemikle bir kez etkileşime girdiklerinde ortalama 10 yıl bozulmadan kalabilirler. Bifosfonatlar özellikle aktif remodelasyon olan alanlarda hidroksiapatit kristallerine çok kolay afinite olup bağlanırlar ve osteoklastlar tarafından absorbe edilirler.⁶⁴ Bifosfonatların kemik rezorbsiyonunu önleyici etkileri, kalsitoninin kemik rezorbsiyonunu önleyici etkisiyle kanıtlanmıştır.

Hidroksiapatitlerin dağılmasını önlemesine rağmen bifosfonatların kemik rezorbsiyonunu engelleyici etkileri osteoklast üzerindeki direkt inhibisyon etkilerine bağlıdır. Kemik rezorbsiyonunu engelleme iki ana mekanizma içerir, bunlar osteoklast apoptozisi ve kolesterol biyosentetik bileşenlerinin inhibisyonudur.⁶⁴ Bifosfonatlar, osteoklastın hücre içinde kolesterol üreten mevalonat yolunun anahtar enzimlerinden biri olan farnesildifosfatın sentezini engeller. Böylece osteoklastın kemik rezorbsiyonu oluşturabilmesi için gereken yüzey özellikleri oluşamaz ve osteoklastik aktivite engellenmiş olur.⁶³ (Şekil 2.8)

Doku düzeyinde, tüm aktif bifosfonatların, kemik yapım ve yıkımında azalmaya yol açtığı izlenmiştir. Hücresel düzeyde de, bifosfonatların hedefinin osteoklast olduğu bilinmektedir. Bifosfonatlar, osteoklastik kemik rezorpsiyonunu;

- Osteoklastların kemik yüzeyinde birikmesinin önüne geçerek,
- Kemik yüzeyinde osteoklast aktivitesini engelleyerek,
- Osteoklastların olgunlaşmasını baskılayıp yaşam sürelerini kısaltarak,
- Kök hücrelerin osteoklast gelişimi yönünde farklılaşmalarını önleyerek ve
- Kemikte kalsiyum-fosfor kristallerine bağlanıp minerallerin fazla çözünmesini engelleyerek inhibe eder.^{58,66}



Şekil 8 Bifosfonatların mevalonat yolundaki etkileri

2.2.3.1 Osteoklastlara direk etkileri

- *Osteoklastik aktivitenin azalması:* Osteoklastlar ile etkileşime girdiklerinde bifosfonatların hücrel aktiviteleri, RAS, Rho, Rac ve Rab gibi prenil proteinlerin sentezinin inhibe olması, asit ve enzimlerin üretiminin durdurulması gibi etkiler içerir.⁵⁸ Serumda kemik rezorpsiyon ürünlerinin seviyeleri azalır ve serum kalsiyum konsantrasyonları düşer.
- *Osteoklast adezyonunun inhibisyonu:* Kemik yüzeyindeki bifosfonat tabakası osteoklastların kemiğe tutunmasını önler ve böylece rezorpsiyon için önemli olan uygun asidik ortamın gelişmesini engellemiş olurlar.
- *Osteoklast sayısını azaltma:* Bifosfonatlar osteoklastlara dönüşmek için alınan makrofajların proliferasyonunu önlerler. Bu işlem muhtemelen T-GFβ vasıtasıyla olmaktadır.⁵⁸
- *Osteoklast apoptozisine neden olma:* Bifosfonatlar apoptozisi tetiklemiş olur. Böylece osteoklast sayısındaki azalma meydana gelir.⁵⁸

2.2.3.2 Osteoblastlara etkileri

Aminobifosfonatlar terapötik dozlarda osteoblast farklılaşmasını ve kemik birikimini uyarır. Yüksek dozlarda ise osteoblastlara sitotoksik etki göstererek ölmelerine neden olur.⁶⁷

Çalışmalar bifosfonatların osteoblastlara, osteoklast güçlenmesi ve aktivasyonunu inhibe eden bir faktör (osteoklast rezorbsiyon inhibitörü, ORI) ürettirdiği gösterilmiştir.^{58,68,69} Bifosfonatlar kemik iliği stromal hücrelerin osteojenik farklılaşmasını ve proliferasyonunu uyarır. Bu durum osteoblastik kemik formasyonuna neden olur.

2.2.3.3 Osteositler üzerindeki etkileri

Bifosfonatların osteositler üzerindeki etkileri çok az sayıda çalışmada ele alınmıştır.^{58,68} Bifosfonat kullanan hastalarda yapılan kemik biyopsilerinin kesitlerinde osteositler ve kanaliküllerde immunohistokimyasal olarak bifosfonatların varlığı gösterilmiştir. Bifosfonatların etkilerinin trabeküler ağ ve osteosit fonksiyonun serolojik değerlendirmesi yolu ile çalışılmasına daha çok ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.3.4 Epitel üzerindeki etkileri

Bifosfonatların endotel hücre çoğalmasını, adezyonunu ve migrasyonunu bozduğu in vitro olarak kanıtlanmıştır.⁶⁷ Bifosfonatlar kemikte yeterli konsantrasyona ulaştıkları zaman kemik yüzeyini örten yumuşak dokuda toksik etki oluştururlar. Bifosfonatların mevalonat yolundaki farnesil difosfat sentetaz enzimini engellemesi sebebiyle oral keratinositlerin apoptozisine neden olmadan hücre proliferasyonu inhibe edilmiş olur. Buna bağlı olarak oral kavitede mukoza bütünlüğü bozulur ve iyileşme gecikir.⁷⁰

2.2.3.5 İmmün sisteme etkileri

Pamidronat gibi bazı bifosfonatlar sitokin üretimini indüklerler. Özellikle doğal öldürücü hücreler ve hem yüzey farklılaşma antijeni 4 (CD4) pozitif hem CD8 pozitif olan T lenfositler gibi dolaşımda bulunan lenfositlerin sayısında anlamlı oranda düşme görülür. Bu düşüşün C-reaktif proteinler olan interlökin 6 (IL-6) ve tümör

nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi akut faz reaktanlarının artışından kaynaklandığı düşünülmektedir. İbandronat 10 yıl içinde lenfositlerde orta derecede artış sağlamaktadır. Kemikteki efferent sinir fibrilleri nöropeptit ve nöromodülatörlerin salınımının bloke edilmesinden etkilenebilmektedir. Bu durum bifosfonatların kemik ağrısı üzerindeki hızlı ağrı kesici etkilerini açıklamaktadır.⁵⁸

2.2.3.6 Antianjiogenik etkileri

Multipl miyeloma hastalarından alınan kemik biyopsilerinde gösterildiği gibi hem in vivo hem in vitro çalışmalarda bifosfonatların antianjiogenik etkileri kalitatif ve kantitatif olarak gösterilmiştir. Endotel hücrelerin inhibisyonunun mekanizması muhtemelen laminin reseptörleri ve integrinlerin azaltılmasını içermektedir. Ayrıca VEGF üzerindeki olumsuz etkileri de hesaba katılabilir. Bazı kemoterapötik ajanların kombinasyonu bifosfonatların antianjiogenik etkilerini artırır.⁵⁸

2.2.3.7 Tümör hücrelerine etkisi

Bifosfonatların, apoptozisi yani antiproliferatif etkiyi tetikleyen intraselüler sinyal iletimini inhibe ederek tümör büyüme oranını yavaşlattığı görülmektedir. Pamidronatların bu apoptotik etkisi insan myelom hücrelerinde gösterilmiştir. Osteoklastların inhibisyonu IL-6 üretiminin azaltır sonuçta kemik matriksinden salınan büyüme faktörleri de azalmaktadır. Bifosfonatların kemik metastazlarını önlemek amacıyla endikasyonları bulunmaktadır. Son zamanlardaki in vitro çalışmalarda modern bifosfonatların tümör hücrelerini apoptozise uğratması dikkat çekmektedir. Günümüzde nitrojen içeren bifosfonatların mitokondri odaklı apoptozisi tetikleyen yeni bir adenosin trifosfat (ATP) analogu olan ApppI formasyonunu indüklediği gösterilmiştir.⁶⁶ Bifosfonatlar ayrıca protein prenilasyon inhibitör etkileri sayesinde kanserli hücrelerin kemiğe adezyonunu engellerler.⁷¹

2.2.3.8 Protozoa üzerine etkileri

Bifosfonatlar *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toksoplazma gondii* ve *Plasmodium falciparum* proliferasyonunu inhibe ederler. Bu parazitlerin daha etkili olduğu ekonomik olarak zayıf ve ciddi toplumsal zorlukların bulunduğu coğrafyalarda

parazitik protozoon enfeksiyonlarını tedavi etmek amacıyla bifosfonatların potansiyel endikasyonları in vitro ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir.⁵⁸

2.2.3.9 Arteriyel kalsifikasyona etkileri

Alendronat ve ibandronat gibi bifosfonatların arter ve kalp kapaklarında kalsifikasyonu inhibe ettikleri deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^{72,73} Mekanizması halen belirsizdir ve klinik çalışmaların sonuçları halen mevcut değildir. Yeni verilere göre, RANK / RANKL / OPG sistemi osteoporoz ve arteriyoskleroz arasındaki bağlantıda önemli bir rol üstlenmektedir.⁵⁸

2.2.3.10 Fraktür iyileşmesinde etkileri

Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda yüksek doz etidronatın fraktürlerdeki iyileşme ve mineralizasyona etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu durum modern aminobifosfonatlar için geçerli değildir ve kırığı bulunan hastalar risk olmadan güvenle kullanabilmektedir.⁵⁸

2.2.4 Bifosfonatların yan etkileri

En sıklıkla karşılaşılan yan etkiler aşağıdaki gibidir:

1. Hipokalsemi,^{74,75}
2. Bulantı, kusma, epigastrik ağrı, yanma, reflü ve dispepsi,⁷⁶
3. Ateş, titreme, miyalji, artralji ve influenza benzeri bulgular⁷⁶
4. Renal toksisite, akut tübuler nekroz, diffuz tübuler atrofi, böbrek yetersizliği,^{74,76}
5. Konjuktivit, irit, sklerit ve üveit,^{77,78}
6. Kafa içinde duyulan sesler ve renkli görme rahatsızlıkları, görsel, olfaktoryel ve işitsel halüsinasyonlar,⁵⁸
7. Atrial fibrilasyon,⁷⁸
8. Femur başı atravmatik avasküler nekrozu,⁵⁵
9. Çene kemiklerinde görülen osteonekroz.^{4,79,80}

2.3 İlaçlara bağlı çene kemiklerinde osteonekroz (MRONJ)

BRONJ' un klinik olarak ilk kez tanımlaması Marx. tarafından yapılmıştır. Marx, 2003 senesinde kanser tedavisi için intravenöz bifosfonat grubu ilaç kullanan ve ağız içinde ekspozite nekrotik çene kemiği mevcut 36 hasta içeren vaka serisini literatüre katmıştır.⁴

American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) un 2009 yılı açıklamasına göre BRONJ tanımlaması; “Daha önce bifosfonat tedavisi almış/almakta olan ve baş boyun bölgesine radyoterapi hikayesi olmayan hastalarda, mandibula veya maksillada sekiz haftadan daha uzun süre kalıcı olan açık ekspozite kemik ile karakterize çene kemiği nekrozudur”⁸¹ olarak yapılmıştır. Daha sonra AAOMS 2014’te yaptığı yeni güncellemede, bifosfonatlar dışında diğer antirezorptif ve antianjiyogenik ilaçların da osteonekroza neden olabileceğini belirterek, özel komite kararıyla BRONJ teriminin MRONJ (Medication- Related Osteonecrosis of the Jaw) olarak güncellemişlerdir. 2009 da yapılan BRONJ tanımlamasının modifiye edilmesi ve genişletilmesiyle oluşturulan MRONJ tanımlaması; Daha önce antirezorptif ya da antianjiyogenik terapi almış/almakta olan, çene bölgesine radyoterapi ve metastaz hikayesi olmayan hastalarda; maksillofasiyal bölgede sekiz haftadan daha uzun süre kalıcı olan, açık ekspozite ya da intraoral/ekstraoral fistül yoluyla izlenebilen ekspozite kemik ile karakterize çene kemiği nekrozudur”⁸² şeklinde ifade edilmiştir.

MRONJ' un patofizyolojisi hakkında potansiyel mekanizmalar araştırmacılar arasında hala büyük bir tartışma konusudur ve kesinliğe kavuşamamıştır.^{70,83} MRONJ' un vücutta yalnızca çene kemiklerinde görülmesini açıklamaya yönelik öne sürülen hipotezler; bozulmuş kemik remodelasyonu, kemik rezorpsiyonunun aşırı baskılanması, anjiyogenezis inhibisyonu, kronik mikrotravma, doğal ya da kazanılmış immünitinin baskılanması, vitamin D eksikliği, yumuşak dokuda bifosfonat toksisitesi, inflamasyon ve enfeksiyonu kapsamaktadır.^{81,84} Bifosfonatlar yüksek remodeling özelliğine sahip olan alveol kemiğinde ve buna komşu yumuşak dokularda yüksek oranda birikirler. Mukoza bütünlüğünün bozulması halinde yara iyileşmesinin

tam olarak sağlanamadığı ve ekspoz kemiklerde sekonder enfeksiyonların oluştuğu, ilerleyen dönemde de osteonekroza dönüştüğü hipotezi öne çıkmaktadır.⁷⁰

Oral kavitenin geniş bir mikrofloraya sahip olması, oral kavitede asla aseptik bir ortam oluşturulamaması ve travmaya yatkın olması sadece çene kemiklerinde osteonekroz görülmesinin hipotezi olarak öne çıkar. Tüm iskelet sisteminden farklı olarak çene kemikleri dişler aracılığı ile sürekli dış çevreyle ilişkidir. Vaskülarizasyon özellikleri nedeniyle %60 mandibula, %30 maksillada osteonekroz görülürken, %10 her iki kemikte birlikte görülmektedir.⁸⁵

Genel olarak MRONJ tedavisi için iki tip yaklaşım mevcuttur. Bunlardan ilki konservatif yaklaşım iken diğeri ise daha ciddi olgularda nekrotik ve ekspoze kemiğin çıkarılmasından sonra mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için dokunun primer olarak kapatılmasını içeren agresif bir yaklaşımdır. Bazı büyük nekrotik kemik olgularında lokal flepler yeterli olurken bazılarında ise mikrovasküler serbest flepler gerekebilmektedir. Lokal flepler için mukozal, bukkal mukozal, bukkal yağ pedi, mylohyoid ve nazolabial flep kullanılırken, mikrovasküler serbest flepler için radial önkol ve osteokütanöz fibular flep kullanılmaktadır. Vakaların mandibular rezeksiyonu içeren radikal tedavilerinde, ilgili bölgenin rekonstrüksiyonunda miniplak ve vida sistemleri ile birlikte en yaygın kullanılan greft ise iliak krestten alınan blok grefttir.⁸⁶

MRONJ' un patofizyolojisinin hala net bir şekilde bilinmemesi, MRONJ oluşmadan önce önüne geçilmesi veya oluşuktan sonra da tedavinin hala tam olarak yapılamaması çeşitli tedavi alternatifleri üzerinde araştırmacıları yeni araştırmalar yapmaya ve ek tedaviler sunmaya sevk etmiştir. Hiperbarik oksijen tedavisi (HBO)⁸⁷, ozon tedavisi⁸⁸, düşük doz lazer tedavisi (LLLT)⁸⁹, trombosit zengin plazma (TZP)⁹⁰, Paratiroid hormon (PTH)⁹¹ tedavisi gibi çeşitli alternatif tedaviler klinisyenler tarafından uygulanmaktadır.

Bifosfonatlar teropatik dozlarda kullanıldıklarında osteoklastların rezorptif aktivitesini inhibe ederken, osteoblastları ise stimüle ederler. Osteoblastların reseptör aktivatör nükleer k β ligand (RANKL) üreterek uyardığı fizyolojik kemik

rezorbsiyonunu ise engellemezler ve kemik metabolizmasına daha az sitotoksik etki oluştururlar. Bifosfonatların yüksek dozda kullanılması ise hem osteoblastlar hem de osteoklastlarda sitotoksik etki oluşturur. Buna bağlı olarak kemik remodeling mekanizması bozulur . Kemikte remodeling azalması avasküler nekroz riskini artırır.⁹² Özellikle malignensi hiperkalsemisinde, multipl miyeloma, kemik metastazı yapan solid tümörlerin tedavisinde hastalar yüksek doz bifosfonat grubu ilaç almaktadırlar, böylelikle kemik remodelingleri bozulmaktadır. Kemik remodelingi üzerinde olumlu etkisi olduğu ve osteoblast hücrelerine farklılaşma yeteneği göz önüne alındığında mezenkimal kök hücreler ile kemik gelişiminde önemli bir element olduğu aynı zamanda bor içeren bileşiklerin tüketiminin inflamatuvar yanıtı azalttığı, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özellikleri ile de kemik kaybını önemli ölçüde sınırlandığını bilindiğinden MRONJ' un tedavisinde iyi bir seçenek olması amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

2.4 Bor

Atom ağırlığı 10.81 g, atom numarası 5, yoğunluğu 2.84 g/cm³, erime noktası 2300°C olarak bilinen Bor, metalle ametal arası yarı iletken özelliklere sahip bir elementtir (Şekil 9). Borun eşsiz kimyası, diğer birçok metabolit ve enzimle reaksiyona girmesine izin verir ve böylece insanlarda ve hayvanlarda mineral ve enerji metabolizmasını değiştirebilir. Periyodik tablodaki beşinci element olan Bor, IIIA grubu elementleri içerisinde metal olmayan tek elementtir, fakat metal ve ametal özelliklerinin ikisinde içinde barındırır. Bor doğada her zaman oksijenle birlikte bulunmaktadır ve borat olarak adlandırılmıştır.^{93,94}

lens solüsyonlarında, gargaralarda, merhemlerde ve göz damlalarında kullanılmaktadır. Ayrıca, içeriğinde bor bulunan “Bortezomib” Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı bir ilaç olarak multipl miyeloma tedavisinde kullanılmaktadır.⁹⁶

2.4.1 Borun sağlık üzerine etkileri

Bor minerali, 1980 yılının ortalarında insanlar için besinlerle birlikte veya takviye olarak dışarıdan vücudumuza zorunlu olarak alınması gereken besin ögesi olarak kabul edilmiştir. Sağlıklı ve dengeli beslenme için günlük en az 1,2 mg Bor’un gıdalarla alımının gerekli olduğu bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 70 kg ağırlığındaki bir insanın günlük alabileceği Bor miktarını 28 mg/gün veya 0,4 mg/kg olarak belirlemiştir.⁹⁷



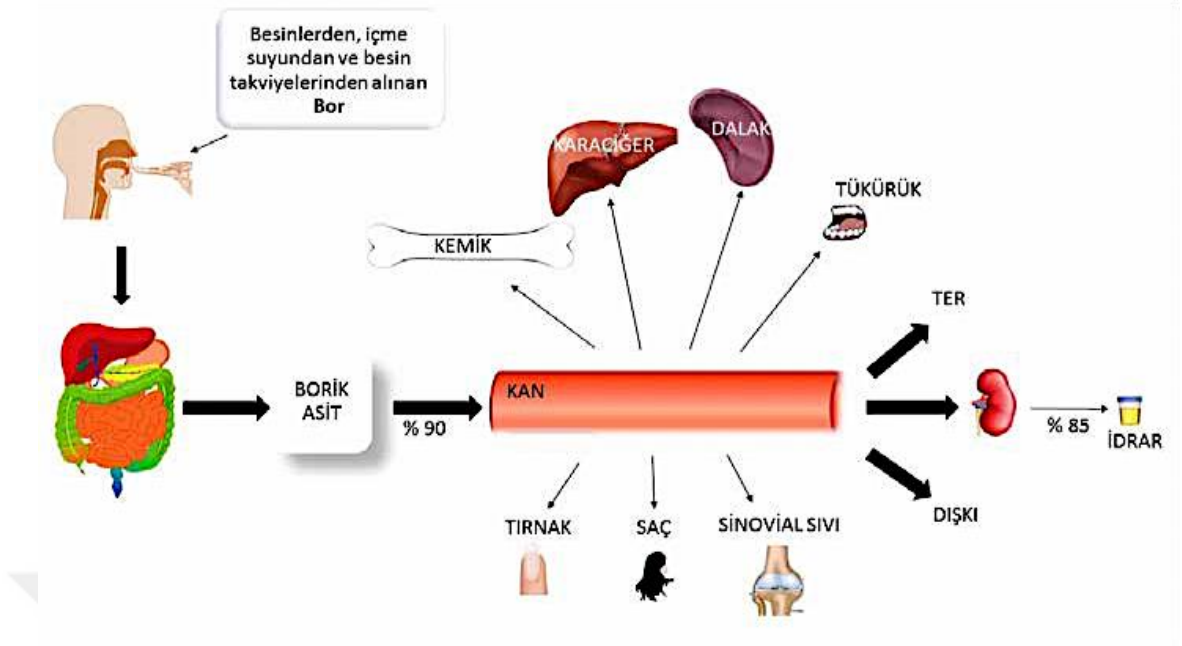
Şekil 10 Borun çeşitli kullanım alanları.⁹⁸

Bor bileşikleri insan vücuduna sindirim yoluyla, solunum yoluyla, deri yoluyla girmektedir (Şekil 11). Bor bakımından zengin olan gıdalar ise kabuklu yemişler, kuru baklagiller (10-45 ppm), meyve ve sebzelerdir (1-6 ppm). Beslenme yoluyla alınan bor, bağırsak mukozasında borik asite dönüşmekte ve pasif difüzyon yoluyla absorbe olarak kan dolaşımında da borik asit formunda bulunmaktadır. Vücuda nasıl girerse girsin, borun %90-95 kadarı vücutta birikmeden ilk 24 saat içerisinde metabolize

olmadan idrar ile dışarı atılmaktadır. Borik asitin metabolize olamamasının nedeni ise, bor ile oksijen arasındaki bağların koparılması için yüksek enerjiye (523 kJ/mol) ihtiyaç duyulmasıdır.⁹⁹

Bor, özellikle sağlıklı bir kemik yapısının oluşmasında son derece önemli rol oynayan magnezyum, vitamin D, fosfor, kalsiyum minerallerinin metabolizmasını olumlu yönde etkilemektedir.^{100,101} Nielsen yaptığı çalışmada bor içeren gıdaların kemik erimesini önleyerek artrit, osteoartrit ve osteoporoz'un engellenmesinde etkili olduğunu ortaya koymuştur.¹⁰²

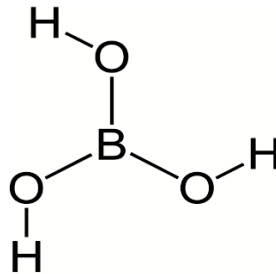
Bor hücrelerde indirgenmiş glutatyon miktarını arttırarak oksidatif stresi ve buna bağlı olarak meydana gelen oksidatif hasarı azaltmaktadır.¹⁰³ Yara iyileşmesindeki olumlu etkilerinin yanı sıra borun özellikle prostat ve akciğer kanseri gibi bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterdiği yönünde bulgular da mevcuttur.^{104,105} Doğan ve ark. borun sıçan adipoz kaynaklı kök hücreleri üzerinde çoğalma, adezyon ve farklılaşmayı arttırdığını tespit etmişlerdir.¹⁰⁶ Demirci ve ark. da bazı aktif biyolojik polimerler ile sodyum pentaborat pentahidratı (NaB) birleştirerek hazırladıkları jelin sıçanlarda ikinci derece yanık yaralarının iyileşmesini sağlarken bakteri, maya ve mantarlara karşı da antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.¹⁰⁷



Şekil 11 Bor metabolizması ⁹⁸

2.4.2 Borik asit

Kokusuz, beyaz, kristal bir yapıya sahip olan borik asidin (Şekil 12) molekül ağırlığı 61,83 g/mol olup, özgül ağırlığı ise 1,44 g/cm³'tür. Borun çözünür formları arasında en çok karşılaşılan borik asit (H₃BO₃); borakstan, kolemanitten, kernitten ve üleksitten elde edilmektedir.¹⁰⁸ Borik asidin bilinen üç formu; orto (H₃BO₃), tetra (H₂B₄O₇) ve meta (HBO₂) borik asit olup en yaygın görülen formu ortoborik asittir. Bu formlar ısının etkisiyle oluşmaktadır. Örneğin, ortoborik asit 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda metaborik asit yapısına, 160°C'nin üzerinde ise metaborik asit yapısından tetraborik asit yapısına dönüşmektedir.¹⁰⁹



Şekil 12 Borik asitin moleküler yapısı.

Son dönemde borik asidin tıp ve diş hekimliği alanında kullanımı üzerine hem hayvanlarda hem de insanlarda tıbbi amaçlı kullanımını irdeleyen çalışmalar yapılmaktadır. Borik asidin antioksidan özelliğe sahip olduğunu göstermek adına Türkez ve ark. borik asidin düşük konsantrasyonda (15 mg/L) eritrositlerde süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin aktivitesini arttırdığını, yüksek konsantrasyonda (500 mg/L) ise süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin aktivitesini azalttığını belirtmişlerdir.¹¹⁰ Ayrıca, kolay elde edilmesi, düşük toksisite düzeyi, kısa süre içerisinde idrar ile metabolize edilmeden atılması gibi önemli özelliklere sahip olması nedeniyle borik asidin özellikle tıp alanında kemoterapotik amaçlı kullanımı ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur.^{111,112}

Diş hekimliği alanında ise Demirer ve ark. deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlara, oral yoldan günlük 3 mg borik asidi 11 gün boyunca sistemik olarak verip, klinik olarak alveoler kemikteki değişiklikleri, histopatolojik olarak da doku örneklerini incelemişlerdir. Borik asit verilen sıçanlarda borik asit verilmeyen kontrol grubuna göre enflamatuar hücre infiltrasyonu, osteoklast sayısı ve alveoler kemik kaybının daha az olduğunu tespit ederek, sistemik borik asit uygulamasının, periodontal hastalıklı sıçanlarda periodontal enflamasyonu ve alveoler kemik kaybını azalttığını rapor etmişlerdir.¹¹³

2.4.3 Borik asitin kemik iyileşmesi üzerine etkileri

Kemik sağlığı için beslenme çok önemli bir faktördür. Kalsiyum, potasyum, magnezyum, fosfor, florür, mangan, bakır, demir, çinko, bor gibi mineraller ile vitaminlerin (A,B,C,D ve K vitaminleri) ve proteinlerin diyet ile yetersiz alımları kemik remodelingini engellemekte ve kemik kaybı ihtimalini arttırmaktadır.^{114,115} Bor steroid hormonları ile etkileşip, kalsiyum kaybını ve kemik demineralizasyonunu önlemede rol oynar. Menapoz öncesi ve sonrası kadınlarda bor takviyesinin üriner kalsiyum ve magnezyum atılımını belirgin bir şekilde azalttığı, serum östradiol düzeylerini ve kalsiyum emilimini artırdığı gösterilmiştir.¹¹⁶ Bor ayrıca D vitamini kullanımını olumlu bir şekilde etkiler. Bor takviyesi D vitamini eksikliği olan hayvanlarda kemik büyümesini uyarır ve D vitamini eksikliğinin karakteristik özelliği olan mineral metabolizmasındaki işlev bozukluklarını azaltır. Borun D vitamini

eksikliği olan hayvanlarda, D vitamini eksikliğinin karakteristiği olan mineral metabolizmasındaki bozulmaları da azalttığı belirlenmiştir.¹¹⁷ Gorustovich ve ark. hayvan modellerinde bor yetersizliğinin periodontal alveoler kemik remodelingindeki etkilerini araştırmıştır. Bor eksikliğinin osteogenezisteki belirgin düşüşe bağlı olarak kemik iyileşmesinde bozukluğa neden olduğunu ve bor yoksunluğunun kemik oluşumunu inhibe ederek periodontal alveoler kemik oluşumunu ve remodelingini değiştirdiğini bulmuşlardır.¹¹⁸ Nielsen ve Stoecker ise bor yetersizliğinin vertebra kemiklerinin üzerine etkisini belirlemek için bir araştırma yapmıştır. Sonuçlar bor yetersizliğinin kemik hacmi fraksiyonunu ve artmış trabeküler ayrım ve yapısal model indeksini azalttığını ortaya koymuştur. Dahası, bor yetersizliğinin femur kemiğinin kırılması için gereken kuvveti azalttığını göstermiştir. Borun ve balık yağının birlikte alınmasının, kortikal kemiğin dayanıklılığına faydalı olduğuna işaret etmiştir. Borun besin ile alınmasının trabeküler kemik mikro mimarisi için yararlı olduğu ve balık yağının kemik üzerindeki yararlı etkilerinin olduğunu göstermektedir.^{116,119}

Yapılan in vivo çalışmalarda bor yetersizliği bulunan ratlarda osteoblast yüzeyinin azaldığı ve durgun yüzey oranının arttığı gösterilmesine rağmen borun kemik regülasyonundaki moleküler mekanizması henüz net olarak anlaşılamamıştır.^{116,120}

Hakkı ve ark. da bor ile ilgili yaptıkları çalışmalarında ekstrasellüler matriks proteinlerinden COL I, osteopontin (OPN), kemik sialoprotein (BSP) ve osteokalsinin (OCN) mesajcı ribonükleik asit (mRNA) salınımını düzenlediğini bulmuştur. Aynı zamanda borun kemik morfogenezi için çok önemli olan Kemik morfogenetik proteini-4 (BMP-4), BMP-6, ve BMP-7 gibi morfogenetik protein seviyelerinin düzenlenmesinde de etkili olduğunu göstermişlerdir.¹¹⁶

Bor elementi kalsiyum, magnezyum ve D vitamini gibi hem mineral hem de vitaminler ile kemik formasyonunda rol alan hormonlarla etkileşime girerek kemik metabolizmasında önemli bir rol oynar.¹²¹

BMP'ler yeni kemik oluşumunu indükleyen çok fonksiyonlu büyüme faktörleridir. BMP'ler aynı zamanda osteojenik olmayan büyüme sürecinde de rol oynarlar. BMP-2, BMP-4, BMP-6 ve BMP-7 insan mezenkimal kök hücrelerini

osteoblastik farklılaşma için uyaran.¹²² BMP'lerin osteoblastik fenotipin uyarılmasında ve sürdürülmesinde gerekli olduğu son çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Hakkı ve ark. borun, BMP-4, BMP-6 ve BMP-7 seviyelerini düzenleyerek kemik oluşumunda önemli rol oynadığını belirtmiştir. Borun, osteoblastik transkripsiyon faktör olan runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2) seviyesini de düzenlediğini göstermiştir. Bor hem BMP'leri hem de RUNX2 seviyelerini düzenleyen ve bu sayede osteogenezi indükleyen önemli bir elementtir.¹²³ Literatürde bor içeren gıdaların yetişkin insanlarda tüketimi için 1–2 mg/gün seviyesi belirtilmektedir. Bor içeren bileşiklerin tüketiminin kemik yıkımını azalttığı, anti-inflamatuar işlev gördüğü, kan yağ oranını düşürdüğü, antikoagülan olduğu ve anti neoplastik ajan olarak görev gördüğü hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda gösterilmiştir.¹²⁴ Bor içeren gıdaların tüketiminin anti bakteriyel ve anti inflammatuar özellikleri sayesinde de kemik kaybını azalttığı belirtilmektedir.¹²⁵ Sonuç olarak yapılan çalışmalarda borun biyoaktif faydalı bir element olduğu gösterilmiştir.

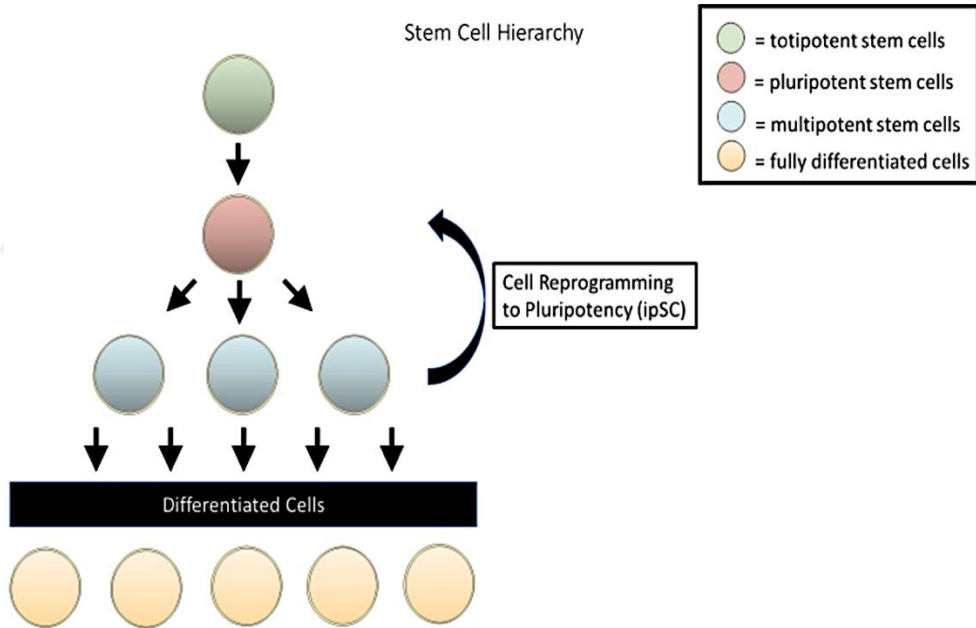
2.5 Kök hücre

Kök hücre terimi, bilimsel literatüre Ernst Haeckel tarafından 1868 yılında yapılmış bir yayın ile giriş yapmıştır. Bununla birlikte, hematopoetik sistemde kök hücrelerin varlığının kesin kanıtı 1961'de James Till ve Ernest McCulloch'un fare kemik iliğinden türetilen tek hücrelerin çoğalabileceğini ve çok sayıda farklı kan hücresi türüne dönüşebileceğini gösterdikleri deneyler sonrasında sağlanmıştır.¹²⁶

Kök hücreler limitsiz çoğalabilme, kendilerini yenileyebilme, farklı hücre türlerine dönüşebilme, hasarlı dokuları onarabilme ve rejenere etme potansiyellerine sahip hücrelerdir. Yaşam süreci boyunca yenilenebilme ve farklı türlere ayrılabilme kabiliyetlerini kaybetmeyen bu hücreler farklılaşmaları için gereken biyolojik sinyallerle karşılaşmadıkları sürece değişmezler. Kök hücrelerin eşsiz özelliği bölündüklerinde biri kök hücre olarak kalan diğeri ise farklılaşan iki hücre üretebilmeleridir.¹²⁷

2.5.1 Kök hücre düzeni

Kök hücreler kendilerini çoğaltma (kopyalama) ve ana hücrenin karakterini muhafaza ettileri halde farklı hücre tiplerine dönüşebilme özellikleri gösteren hücrelerdir. Kök hücrelerin özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine potensi adı verilir. Hücre potensi spektrumunda herhangi bir embriyonik hücre tipine ve ayrıca ekstra embriyonik hücelere bölünebilen ve farklılaşabilen hücreler totipotent olarak isimlendirilir. İnsan gelişimi modelinde totipotent hücreler aynı şekilde totipotent hücre olan zigot aracılığıyla ortaya çıkar. Zigot döllenmeyi takip eden günlerde bölünmeye devam ettikçe yavru hücreler blastosistin oluşumuna kadar totipotent olarak kalır. Bu aşamada hücre yapısı farklılaşmaya başlar ve hücreler daha sonra pluripotent olarak kabul edilir.¹²⁸ (Şekil 13)



Şekil 13 Kök hücre farklılaşmasının aşamaları.¹²⁹

Pluripotent hücreler üç germ katmanının (endoderm, mezoderm, ektoderm) hepsine köken olabilir fakat ekstra embriyonik hücelere köken olamazlar. Daha fazla olgunlaşma ve farklılaşma üzerine kök hücreler pluripotentten multipotent'e farklılaşır. Multipotent hücreler daha az sayıda farklı hücre tipine farklılaşabilmekle birlikte ancak birbiriyle ilişkili hücre tiplerine dönüşebilirler (örn. nöral kök hücreler, mezenkimal kök hücreler).¹³⁰

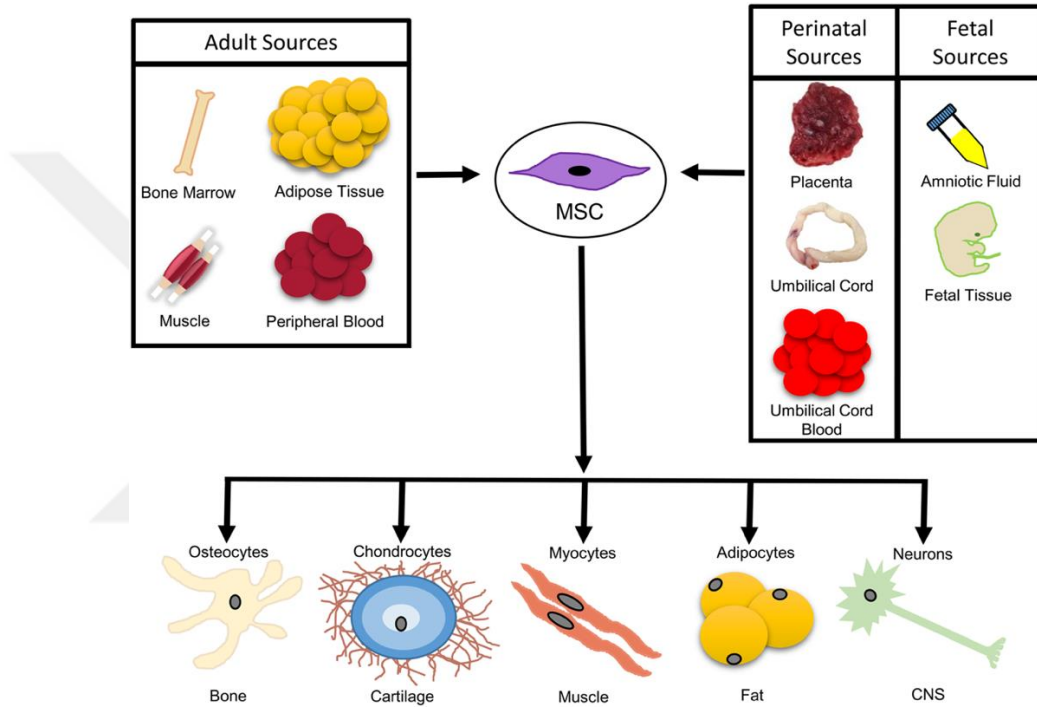
İn vivo olarak kök hücreler kökenlerine göre embriyonik, fetal ve yetişkin kök hücreler olmak üzere üç türe ayrılabilir. Embriyonik kök hücreler, döllenme sonrası blastosist olarak bilinen, implantasyon öncesi embriyodaki iç hücre kütesinden türetilir. Blastosistin iç hücre kütesinde bulunan bu pluripotent hücreler organizmayı oluşturan farklı hücre tiplerine farklılaşır ve çoğalır. Fetal kök hücreler, fetal dokularda bulunan multipotent hücrelerdir ve hematopoetik (kan, karaciğer ve kemik iliği ile ilişkili hücre tiplerine köken olur), mezenkimal (kan, karaciğer, kemik iliği, akciğer, böbrek, ve pankreatik hücreler), endotel (kemik iliği ve plasental hücrelere farklılaşabilen), epitel (karaciğer ve pankreas hücrelerine farklılaşan) ve nöral kök hücrelerine (beyin ve omurilik dokularına farklılaşan) farklılaşabilirler. Yetişkin kök hücreleri ise vücuttaki çeşitli dokularda bulunan multipotent hücrelerdir ve somatik kök hücreler olarak da isimlendirilir. En sık kullanılan insan otolog yetişkin kök hücre kaynakları kemik iliği ve yağ dokusudur. Yetişkin kök hücreleri farklılaşma potansiyeli bakımından multipotent olma eğilimindedir.¹³⁰

İnsanlardaki bir başka zengin kök hücre kaynağı göbek kordon kanıdır. Multipotent kök hücreler hem kordon kanında hem de kordon dokusunda (Wharton'un jölesi) bulunabilir. Kordon kanı bankacılığı kişinin yaşamında sonradan ortaya çıkabilecek bozuklukları tedavi etmek amacıyla daha uygun bir seçenek olarak düşünülmektedir. Ayrıca kordon kanı insan lökosit antijeninin uyumsuzluğunu gidermek için transplantasyonda da kullanılmaktadır.¹²⁹

2.5.2 Mezenkimal kök hücrelerin rejenerasyon potansiyeli

Devamlı kendini yenileyen; ektoderm, mezoderm ve endoderm gibi germ tabakalarına farklılaşabilen pluripotent embriyonik kök hücrelerin keşfinden sonra etik ve teknik kaygıların yanında teratom oluşum potansiyeli olduğu görülmüştür. Bu durum erişkin kaynaklardan alternatif multipotent kök hücreleri araştırmaya olan ilginin artmasına neden olmuştur. Hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal/stromal kök hücreler (MKH) gibi çok potansiyelli insan erişkin kök hücrelerinin, embriyonik kök hücrelere kıyasla hem ahlaki hem etik hem de güvenlik ikilemleri oluşturma ihtimali daha düşüktür. MKH'lerin çok farklı yetişkin kaynaklardan izolasyonuna ve bu hücrelerin adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve nörojenik hücreler gibi çeşitli

soylara ayrıldığına (Şekil 14) dair raporlara rağmen MKH'lerin terapötik kullanımı bir sürü engelle karşılaşmıştır. Birincisi MKH'lerin yetişkin kaynaklarından izolasyonunun donör bölge morbiditesi invaziv girişim ve ağırlı prosedürleri içermesidir. İkincisi in vitro geçişte daha da azalacak olan farklılaşma yeteneklerine sahip olmalarıdır. Üçüncüsü ise MKH'lerin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyellerinin donör yaşı, genetik ve çevresel strese maruziyetten ciddi şekilde etkilenmesidir.¹³¹



Şekil 14 Mezenkimal kök hücre kaynakları ve çeşitli soylara farklılaşma potansiyelleri.¹³¹

Alternatif kaynakları araştırmaya yönelik çalışmalar MKH'lerin göbek kordon kanı, göbek kordonu ve plasenta gibi perinatal kaynaklardan ve amniyotik sıvı gibi fetal kaynaklardan izole edilmesine sebep olmuştur. Bu dokulardan türetilen hücrelerin adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve nörojenik hücre soylarına doğru farklılaştığı bulunmuştur. Ek olarak MKH'ler immünomodülasyonun yanı sıra anti-apoptotik ve anti-oksidatif etkileri destekleyen, nöromusküler ağrıların ve diğer birçok hastalığın tedavisinde yardımcı olabilecek bir parakrin etkisine sahiptir. MKH'lerden türetilen kemokinlerin ve sitokinlerin, otoimmün hastalıklarda iyileştirici etkinliği gösterilmiştir.¹³¹

2.5.3 Adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH)

MKH'ler arasında AD-MKH'ler doku mühendisliği uygulamaları açısından önemli avantajlar sunar. AD-MKH'ler daha az donör alan morbiditesi ile daha büyük miktarlarda ve kolayca toplanabildikleri için tanımlanan en umut verici kök hücre popülasyonlarından biridir. Subkütan yağ dokusu farklı yağ doku tipleri arasında klinik olarak en önemli AD-MKH kaynağıdır. AD-MKH'ler karından, uylukdan ve koldan alınan subkütanöz yağ dokusundan elde edilebilir. Yağ dokusu insanda nispeten bol bulunduğu için AD-MKH'ler daha fazla sayıda elde edilebilir.^{132,133}

2.5.3.1 Adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

Vücudun farklı yerlerinden toplanan AD-MKH'ler farklı özellikler gösterir. Yüzeysel karın bölgesinden toplanan AD-MKH'ler üst kol, medial uyluk, trokanterik veya derin karın depolarından toplanan AD-MKH'lere göre anlamlı derecede daha az apoptoz geçirir. Farklı prosedürler AD-MKH kalitesini, işlevselliğini ve plastisiteyi değiştirebilir.¹³⁴ Beyaz ve kahverengi adipoz doku iki ana yağ dokusudur. Beyaz adipoz doku, subkutan ve viseral yağ dokularında bulunur. Subkutan depolarda AD-MKH verimleri daha fazladır. En yüksek AD-MKH konsantrasyonları kol adipoz dokusu depolarında, en büyük plastisite ise beyaz adipoz doku formundaki inguinal adipoz doku depolarında bulunur.¹³⁵ Kahverengi adipoz doku ise beyaz adipoz dokuya göre daha az bulunur, yenidoğanlarda mediasten, boyun ve interskapular alanlarda bulunabilir. Ana işlevi termogenezi sağlamaktır. Kahverengi yağ dokusu depolarında da AD-MKH'ler vardır, farklı olarak daha kolay iskeletsel miyogenik farklılaşma geçirirler.¹³⁶

Zuk ve ark. tarafından belirtilen protokol AD-MKH izolasyonu için en sık kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde göre AD-MKH'ler beyaz yağ dokusundan izole edilir. Yağ dokusu eşit hacimde fosfat tamponlu salin (PBS) ile birkaç kez yıkanır ve %0,075 kollajenaz tip II ile 30 dakika boyunca 37°C'de enzimatik sindirim ile küçük parçalara ayrılır. Sindirimden sonra, elde edilen pelet birçok hücre tipinde heterojen bir popülasyon verir ve stromal vasküler fraksiyon (SVF) olarak adlandırılır. SVF AD-MKH'ler, pre-adipositler, endotel hücreleri, fibroblastlar, endotel progenitör hücreleri, yerleşik monositler/makrofajlar, perisitler, vasküler düz kas hücreleri, lökositler,

lenfositler ve eritrositler içerir. SVF'de yaklaşık 2 ila 6 milyon hücre, 1 ml lipoaspirattan elde edilebilir. %10 fetal sıgır serumu (FBS) içeren Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle'ı (DMEM) enzim aktivitesini nötralize etmek için eklenir. Hücre süspansiyonu, yüksek yoğunluklu bir SVF elde etmek üzere 10 dakika boyunca 1200xG'de santrifüjlenir. Süpernatant atılır ve SVF peleti NH₄Cl içinde yeniden süspansiyon haline getirilir ve eritrositleri uzaklaştırmak için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir. SVF santrifüj yoluyla toplanır ve daha sonra sindirilmemiş doku fragmanlarını çıkarmak için 100 µm'lik bir ağdan süzülür. Gece boyunca %5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de kontrol besi yeri (DMEM, %10 FBS, 500 IU penisilin ve 500 µg streptomisin) ile inkübe edilir. AD-MKH'ler gece boyunca kültürlendikten sonra plastik-yapışkan olan hücreler bir popülasyon olarak elde edilir.¹³⁷

2.5.3.2 Adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma yeteneği

AD-MKH'lerin hem in vitro hem de in vivo olarak çoklu soylara farklılaşabileceğine dair çok sayıda çalışma vardır. AD-MKH'lerin mezodermal orijinli olmalarına rağmen, ektodermal, endodermal ve mezodermal kaynaklı hücrelere farklılaşabildikleri belirtilmiştir. AD-MKH'ler mezodermal orijinleri nedeniyle adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik, anjiyogenik, kardiyomiyojenik, tendonojenik ve periodontojenik soylara farklılaşabilir. İn vitro olarak AD-MKH farklılaşması spesifik indüksiyon faktörleri barındıran seçici ortam tarafından indüklenir.¹³⁸

2.5.3.3 Adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulamaları

AD-MKH'ler yara iyileşmesi için önemli olan çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin salgılayabilir. Bu durum AD-MKH'lerin kullanımını doku granülasyonu, makrofaj göçünün artması, vaskülarizasyonun sağlanması ve yara tedavileri için uygun hale getirmektedir.¹³⁹ Rigotti ve ark.¹⁴⁰ 31 ay boyunca 20 hastaya AD-MKH içeren lipoaspirat örnekleri vermişlerdir. Hastalarda yeni damar oluşumu ile ultrastrüktüel doku özelliklerinde iyileşmeler olduğu görülmüş ve bu da önemli klinik düzelmeler olduğunu göstermiştir. AD-MKH'lerin diyabet veya Tromboanjitis Obliterans hastalarında iskemi ile komplike olan yaraların tedavisinde de faydalı olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular AD-MKH'lerin atrofi, fibroz, retraksiyon ve

radasyon tedavisi ile ortaya çıkan ülser gibi semptomların da tedavisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca AD-MKH'lerin anormal skar oluşumu gibi patolojik yara iyileşmesinin tedavisinde yararlı olduğu gösterilmiştir. Hayvan modellerinde AD-MKH enjekte edilen yara izleri kontrol grubundakilere kıyasla yüzey alanında bir azalma, renk ve esneklikte ise iyileşmeler göstermiştir.^{139,141,142} AD-MKH'lerin hasarlı dokulara ve tümöral oluşumlara yönelimi onları tümörlere ve metastatik nişlere terapötik uygulama için umut verici bir ajan yapmaktadır.¹⁴³

Rekonstrüktif ve plastik cerrahi AD-MKH'lerin uygulanmasında ilerleyen bir alandır. Yağ grefti uygulamaları AD-MKH'lerin klinik rejeneratif potansiyelini yansıtmaktadır.¹⁴⁴ Yağ grefti uygulamaları için lipoaspiratı yerçekimi yoluyla ayırma ve filtrasyon veya santrifüjleme (safsızlıkları gidermek ve AD-MKH kaynağı olarak yüksek kaliteli SVF içeren nispeten saf numuneler elde etmek) gibi basit prosedürlere dayanan çeşitli standart protokoller mevcuttur.^{145,146}

AD-MKH'lerin osteoblastlara ve kondroblastlara farklılaşabildikleri iyi bilinmektedir. Bu durum kemik rejenerasyonu için klinik kök hücre tedavilerinin sonuçlarının umut verici olmasına dayanmaktadır.¹⁴⁷ 2004 yılında Lendeckel ve ark. bir olgu sunumunda AD-MKH'lerin ilk klinik kullanımını tarif etmişlerdir. Şiddetli kafa travması sonrası çok parçalı kalvaryal defekti olan 7 yaşındaki bir kız çocuğunda SVF uygun yerlere yerleştirilmiş ve rekonstrüksiyondan 3 ay sonra bilgisayarlı tomografi taramalarında yeni kemik oluşumu sahaları izlenmiştir. Kemik iliği kaynaklı MKH'lere kıyasla AD-MKH'lerin özellikle pediatrik hastalar için hücre verimi açısından daha avantajlı olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁸ Çalışmalar AD-MKH'lerin yeni kemik oluşturabildiğini ve büyük kalvaryal defektlerin yanı sıra maksilla ve mandibulayı içeren defektleri onarabildiğini göstermiştir.¹⁴⁹ AD-MKH'lerin nöron benzeri soylara farklılaşarak nörojenezi destekleyebildiği bildirilmiştir.¹⁵⁰

AD-MKH'lerin çokluğu, elde edilme rahatlığı, çoklu soylara farklılaşma ve çeşitli sitokinleri salgılama yetenekleri ve bunların immünomodülatör etkileri, AD-MKH'lerin doku rejenerasyonunda belirgin bir rol oynayabileceği anlamına gelir. Bahsedildiği gibi AD-MKH'lerin biyolojisini belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. AD-MKH'lerin rejeneratif tıp açısından uygulanabilirliğini daha iyi

anlamak için klinik öncesi çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca AD-MKH'lerin etkinliğini belirlemek için birçok klinik çalışma da yapılmış ancak çok az faz III klinik çalışma bildirilmiştir.

AD-MKH'lerin uzun vadeli güvenliğini, kesin etki mekanizmalarını ve deneysel bulguları kliniğe dönüştürme yeteneğini araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



3 GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyonu Birimi (BAP) tarafından 2021-TDU-DİŞF-0010 kodlu proje ile desteklendi ve deney işlemleri öncesinde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (77.637.435) onay alındı (Ek-1). Çalışmamızın deney süreçleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEHAM) yapıldı. Yapılan tüm işlemlerde deneklerle ilgili Yerel Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen şartların sağlanmasına özen gösterildi.

1.1. Gereç

3.1.1 Deney hayvanları

Veteriner hekimler tarafından sağlıklı oldukları belirlenen 40 adet, ağırlıkları 200 ± 50 gr arasında değişen 12 haftalık erişkin Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 3 gün boyunca (adaptasyon için) herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletildi. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar altında (22°C sıcaklık, % 30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat) tutuldu. Kuru pelletler ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı.

3.1.2 Deney Grupları

Çalışmada cerrahi olarak sıçanların kafataslarından, dış çapı 8 mm iç çapı 4 mm, genişliği 4mm olan bikortikal kemik halkaları çıkartıldı, böylece sıçan kafatası için kritik boyutta kemik defekti modeli oluşturulması amaçlandı. Sıçanların kafataslarından bikortikal olarak 2 adet kemik halkası çıkartıldı ve toplam 80 adet kemik halkası elde edildi. Kemik halkaları her grupta 16 adet olmak üzere 5 gruba ayrıldı ve kültür kuyucuklarına konuldu.

1. Grup (Kontrol grubu, n:16): kemik halkası ile osteojenik besi yeri içeren kontrol grubudur.

2. Grup (ZA grubu, n:16): kemik halkası, osteojenik besi yeri ve 50 uM zoledronik asit içermektedir.

3. Grup (ZA+ BA grubu, n:16): kemik halkası, osteojenik besi yeri, 50 uM zoledronik asit ve 6 µg/ml borik asit solüsyonu içermektedir.

4. Grup (ZA+MKH grubu, n:16): kemik halkası, osteojenik besi yeri, 50 uM zoledronik asit ve 30×10^4 sıçan karın yağı kaynaklı mezenkimal kök hücre içermektedir.

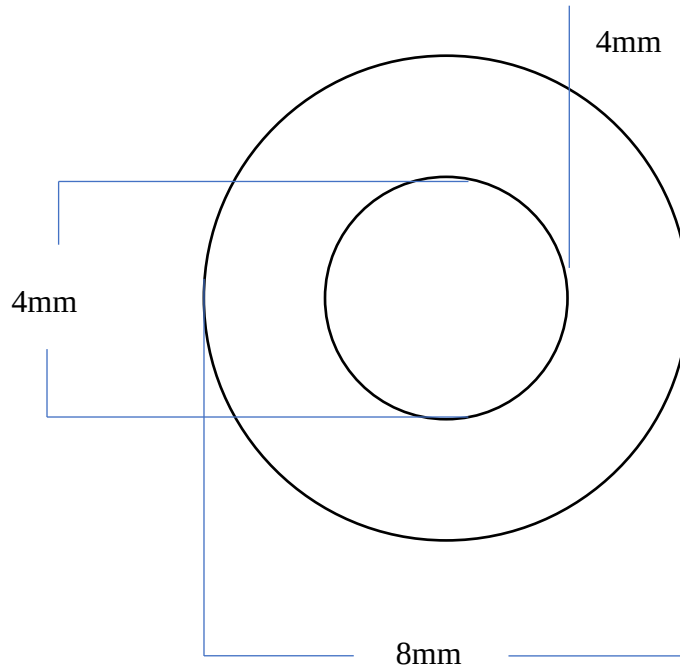
5. Grup (ZA+BA+MKH grubu, n:16): kemik halkası, osteojenik besi yeri, 50 uM zoledronik asit, 30×10^4 sıçan karın yağı kaynaklı mezenkimal kök hücre ve 6 µg/ml borik asit solüsyonu içermektedir.

3.1.3 Cerrahi Yöntem

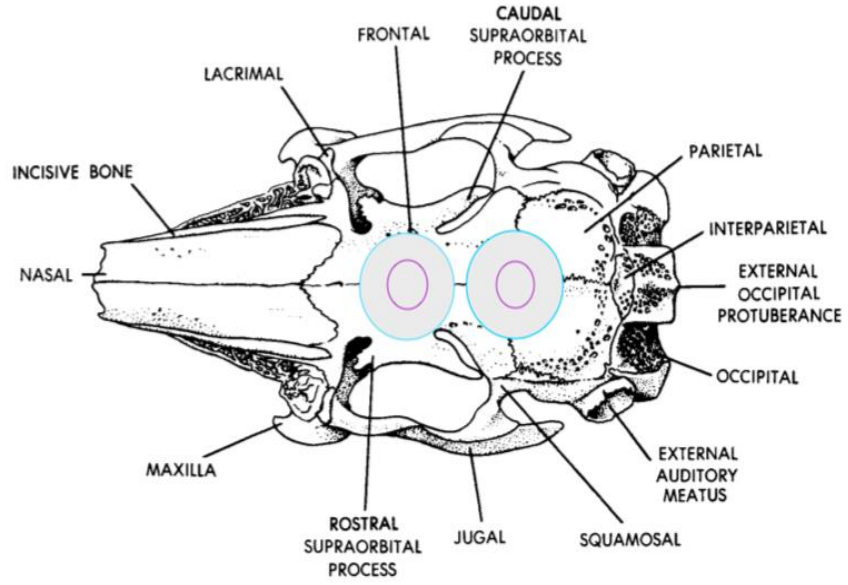
Deney hayvanları 90 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar; Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazin (Rompun; Bayer, İstanbul, Turkey)'in intramusküler enjeksiyonu ile genel anestezi altına alındı. Daha sonra deney hayvanları tespit tahtasına konularak kraniyum sabit duracak şekilde tespit edildi. Hemikraniyumlardan kulaklara kadar povidon-iyodin solüsyonu (Poviodex, Kimpa, Türkiye) ile cerrahi alanın antisepsisi sağlanması amacıyla boyandı. Asepsi, antisepsi sağlandıktan sonra cerrahi yapılacak bölge steril edilmiş cerrahi örtülerle örtüldü ve alanın izolasyonu sağlandı. Lokal anestezi, kanama kontrolü ve analjezi amacıyla 0,5 ml 1:200,000 epinefrin içeren anestezik solüsyonla (Ultracain-DS hoechst Marion Roussel, İstanbul, Türkiye) cerrahi işlem yapılacak alana ve çevresine yapıldı. 5 dakika lokal anestezinin etki göstermesi için beklendi. Daha sonra 15C numaralı bistüri ile orta hatta, kraniyal yumuşak doku üzerinde, sagittal düzlemde, yaklaşık 25-30 mm uzunluğunda, periostu içine alacak şekilde tam kalınlıkta insizyon yapıldı. Periost, frontal, parietal ve oksipital kemikler açığa çıkacak şekilde her iki yana doğru periost elevatörü kullanılarak diseke edildi. Her iki hemikranyum tamamen açıkta olacak şekilde 2 adet yumuşak doku ekartörü yerleştirildi ve ameliyat sahası cerrahi görüş açısını tamamen netleştirecek şekilde ortaya çıkarıldı. Kemik yüzeyi keskin küret ile kürete edilerek örneklerin alınacağı saha yumuşak doku artıklarından elimine edildi.

Tek tek her kalvaryumdan 2 adet kemik halkası cerrahi olarak çıkartıldı. Kemik halkalarının dış çaplarının 8 mm, iç çaplarının 4 mm olması hedeflendi. Dış çapı 9

mm, iç çapı 8 mm olan trefan frez ile (Dentium, Güney Kore) birinci halkanın sınırları frontal kemik ve parietal kemikler üzerinde olan, ikinci halkanın sınırları ise parietal kemikler ile oksipital kemik üzerinde olacak şekilde iki adet kemik kesisi serum fizyolojik irrigasyon altında cerrahi turlu aletlerle yapıldı. Bu kesiler kemik yaklaşık 0,5 mm derinliğinde olması hedeflenen monokortikal kesilerdi. Bu sayede iç taraflarından çıkartılacak olan kemik parçasının kesisi yapılırken kemik parçalarının kranyuma bağlı kalmaları sağlandı. 8 mm'lik kesiler monokortikal yapıldıktan sonra merkezleri aynı nokta olacak şekilde dış çapı 5 mm iç çapı 4 mm olan trefan frez (Dentium, Güney Kore) ile 4 mm'lik bikortikal kemik kesisi yapıldı. Bikortikal kemik kesisi bittikten sonra ayrılan kemik parçası dikkatli bir şekilde doku pensi ile dışarı çıkartıldı. Halkanın merkezinde bulunan kemik parçası çıkartıldıktan sonra monokortikal yapılan 8 mm'lik kesiler dikkatli bir şekilde aynı cerrahi işlem uygunarak bikortikal hale getirildi ve kemik halkaları dikkatli bir şekilde doku pensiyle tutularak kranyumdan çıkarıldı. Kemik halkalarının dura matere bakan yüzeylerindeki yumuşak doku artıkları keskin küretle kemiğin bütünlüğüne zarar vermeyecek şekilde temizlendi. 40 deney hayvanı için cerrahi işlem aynı şekilde tekrarlandı. Kemik halkalarının çıkarılması işlemi bittikten sonra deney hayvanları genel anestezi altındayken servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.¹⁵¹



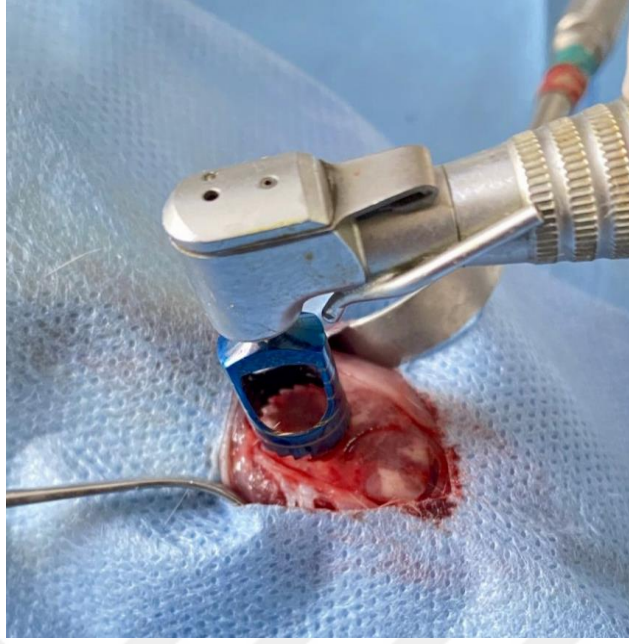
Şekil 15 Kemik halkasının şematik görüntüsü.



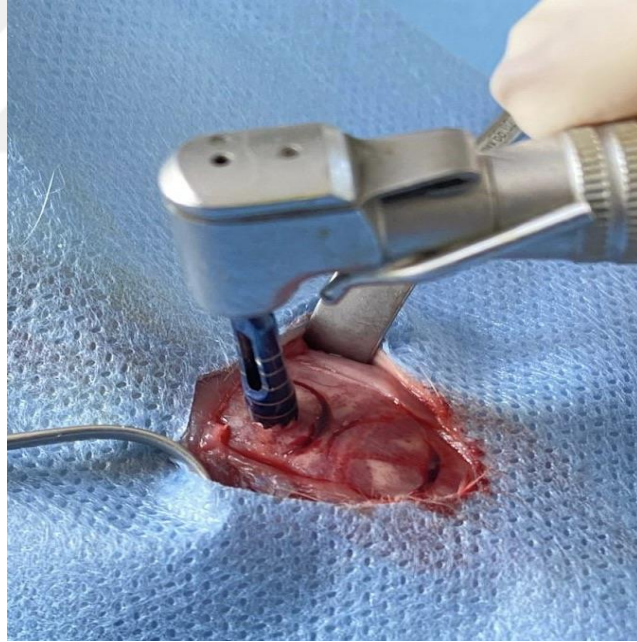
Şekil 16 Osteotomi hatlarının anatomik oluşumlarla ilişkisinin şematik görüntüsü.



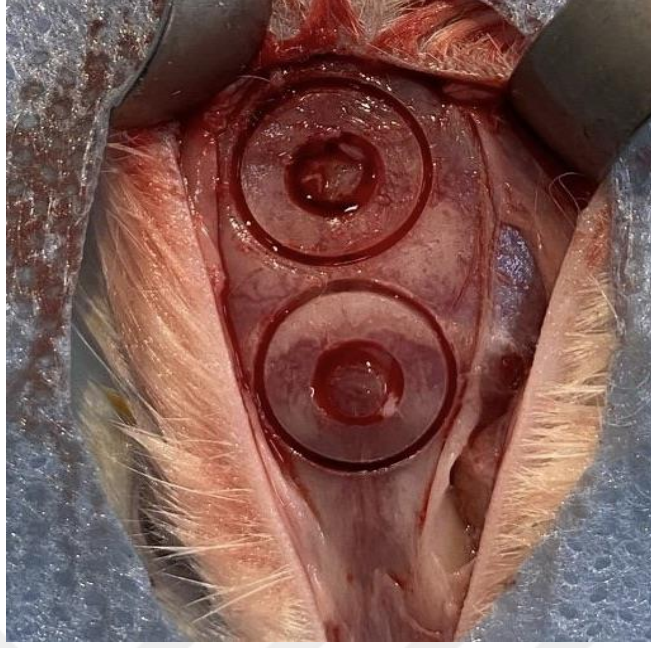
Resim 1 Kafatasının steril cerrahi örtüyle örtülmesi ve povidon-iyodin solüsyonu (Poviodex, Kimpa, Türkiye) ile yıkanması. Yumuşak doku orta hattı boyunca, sagittal düzlemde, yaklaşık 25 mm uzunluğunda tam kalınlıkta insizyonun yapılması.



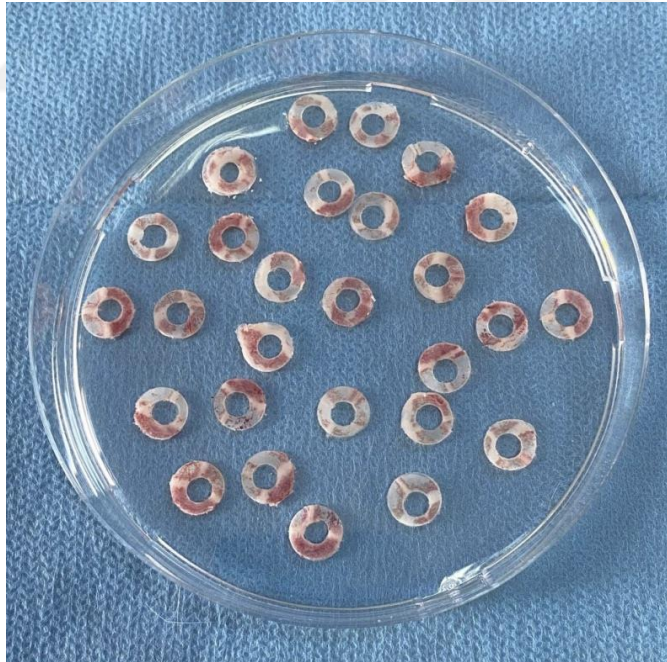
Resim 2 Dış çapı 9 mm, iç çapı 8 mm olan trefan frez ile (Dentium, Güney Kore) birinci halkanın sınırlarının belirlenmesi ve mono kortikal kesilerin yapılması.



Resim 3 Dış çapı 5mm iç çapı 4 mm olan trefan frez ile (Dentium, Güney Kore) ikinci halkanın sınırlarının belirlenmesi ve monokortikal kesilerin yapılması.



Resim 4 Trefan frez ile kesiler yapıldıktan sonra disklerin kemikten ayrılmadan önceki görünümü.



Resim 5 Dış çapı 9 mm iç, çapı 8 mm olan kemik halkalarının dikkatli bir şekilde kalvaryumdan ayırdıktan sonra ve saklama kabına konulması.

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

3.1.4.1 Osteojenik Besi Ortamı:

Sıçanlardan elde edilen kemik örnekleri için α -MEM (M4526, Sigma, A.B.D) + %0,4 penisilin (A2213, Biochrom, Almanya) + %0,4 streptomisin (A2213, Biochrom, Almanya) + %15 FCS (S0113, Biochrom, Almanya) + %0,1 amfoterisin B (A2612, Biochrom, Almanya) ve %1 gentamisin (A2612, Biochrom, Almanya) + 50 μ g/ml askorbik asit (A8960, Sigma, A.B.D), 10 mM β - gliserofosfat (G9891, Sigma, A.B.D) + 10-8M deksametazon (D2915, Sigma, A.B.D) içeren osteojenik besi ortamı yapılacak deneyler için hazırlandı.

3.1.4.2 MTT Solüsyonunun Hazırlanması:

0,5 mg/ml olacak şekilde MTT (M5655, Sigma, A.B.D) solüsyonu deneyler için hazırlandı. Solüsyon, hücre kültür besiyeri ile 1/9 oranında seyreltilerek oluşturuldu.

3.1.4.3 %10'luk nötral formalin tampon solüsyonu:

Distile su 1l , Formalin/formaldehid 100 ml (1.04002.2500, Merck, Almanya), Na_2HPO_4 16g (0306, J. T. Baker, Hollanda), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4g (5266437, Merck, Almanya) kullanılarak solüsyon hazırlandı.

3.1.4.4 Taze Substrat Solüsyonu:

Distile su, Naphthol AS MX-PO_4 (N5000, Sigma, A.B.D), N,N-Dimethylformamide (DMF) (D4551, Sigma, A.B.D), Tris-HCl MW=157.6 pH 8.3 0.2M (A2264.010, Applichem, Alm.), Red Violet LB salt (F1625, Sigma A.B.D) kullanılarak solüsyon hazırlandı.

3.1.4.5 %2,5'luk Gümüş Nitrat Solüsyonu:

Distile su 100mL , AgNO_3 2.5g (31630, Riedel-deHaen, Almanya) kullanılarak solüsyon hazırlandı.

3.1.4.6 Sodyum Karbonatlı Formaldehit Solüsyonu:

Distile su 100mL, Formalin/formaldehid 25mL (Merck, Almanya), Na₂CO₃ 5g (Merck, Almanya) kullanılarak solüsyon hazırlandı.

3.1.4.7 Alizarin Kırmızısı Boyaması Solüsyonu:

%1'lik stok alizarin kırmızısı (05600, Fluka Sigma, Steinheim) solüsyonu 1/10 distile su ile birlikte hazırlandı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Çoğaltılması

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında bulunan, -80° C'de dondurularak saklanan sıçan karın yağ dokusu kökenli MKH'ler çıkartılarak kültüre edildi bu hücrelerin plastik yüzeylere yapışma özelliğinden faydalanıldı.

MKH'ler 2,5cm²'lik hücre kültür kabında 37⁰C'de , 50 µgr/ml Gentamisin (A2712, Biochrom, Berlin, Almanya), 100 UI/ml Penisilin ve 100 UI/ml Streptomisin (A2213, Biochrom, Berlin, Almanya), 100 UI/ml Amfoterisin (A2612, Biochrom, Berlin, Almanya), %15 FBS (S0113, Biochrom, Berlin, Almanya) ve 200 mM L-glutamin (K0282, Biochrom, Berlin, Almanya) içeren α-MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Almanya) kültür kabında %5 CO₂'li ortamdaki inkübatörde arttırılmaya bırakıldı. Bu şekilde, MKH'lerin yüzeye yapışma yetenekleri ile süspanse olarak üreyen hematopoetik kök hücrelerin ayrılmaları sağlandı. Hematopoetik hücreler ise PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkamalar sonrası ortamdan ayrıştırıldı. MKH'lerin 1/3 pasaj oranında yaklaşık olarak 3 gün içerisinde yüzeyi kapladıkları gözlemlendi.

Kültür ortamında üç gün sonunda yüzeye yapışmayan hücreler besi ortamının değiştirilmesi sonucu ortamdan ayrıştırıldı. Hücre kültür kabına tutunan hücreler kültür kabını %70-80 oranında kaplayınca kadar besiyeri iki günde bir değiştirildi. Faz kontrast ataçmanlı inverted mikroskop (IX71, Olympus, Japonya) altında hücrelerin çoğalmaları kontrol edildi ve kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücre ile

kaplandığında (%70-80 konfluente ulaşıldığında) alt-kültür (pasaj) işlemine geçildi. Birincil kültür sıfıncı pasaj (P0) kabul edilerek, P2 kullanıldı.¹⁵²

3.2.2 Zoledronik Asit Çözeltisi

Çalışmada kullanılan Zoledronik Asit (ZA) (Zometa® 4 mg flakon, Novartis, İsviçre) için stok çözeltisi hazırlandı ve seyreltmeler yapılarak uygulanacak konsantrasyonlar elde edildi. Konsantrasyon bağımlı olacak şekilde kuyucuklara eklenen ZA her bir deney grubu ve kontrol grubundan üç tekrar olacak şekilde uygulama yapıldı. Kültürde kullanılacak zoledronik asit konsantrasyonu literatürdeki bilgiye dayanarak 50 uM olarak belirlendi.¹⁵³

3.2.3 Hücre Üremesinin MTT ile Değerlendirilmesi:

MTT testi ile osteoblastların mitokondrial fonksiyonlarına bakılarak canlı hücre yoğunluğu kolorimetrik olarak ölçüldü. Bu test sarı suda eriyebilen MTT boyasının mitokondrilerdeki elektron akımı yoluyla mor formazan ürünlerine dönüşmesini belirlemektedir. Hücreler MTT kullanma solüsyonu ile 4 saat inkübe edilip bekletildi, sonrasında solüsyon uzaklaştırıldı. Kültür kabının her gözüne dimetilsülfoksit (DMSO, D2650, Sigma, A.B.D.) eklendi. Formazon tuzları DMSO ile çözüldü ve absorban 570 nm’de spektrofotometrede (UNICAM, Uv visible spektrofotometre, İngiltere) ölçüldü.¹⁵²

3.2.4 Von Kossa (VK) Boyaması ve Alizarin Kırmızısı (AK) Boyaması ile Kalsiyum İçeriğinin Belirlenmesi:

Hücreler 48 gözlü kültür kaplarında inkübe edilerek bekletildi. 28. günde Von Kossa (VK) boyamaları yapılarak ALP seviyesi gözlendi. Kültür kaplarındaki besi ortamı deneyden uzaklaştırıldı ve soğuk PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkandı. Daha sonra %10’luk soğuk nötral formalin tamponda 15 dakika fikse edilerek bekletildi. Tüm tampon uzaklaştırılarak 15 dk distile suda bırakıldı. Ardından taze substrat ile kültür kapları 45 dk inkübe edildi ve 4 kez distile su ile tamamen yıkandı. Son olarak %2,5’luk gümüş nitrat ile 30 dk boyunca boyandı ve bütün gümüş nitrat uzaklaştırılarak 3 kez distile su ile tamamen yıkandı. Gümüş nitrat ayrıştırıldıktan sonra ışık mikroskobu altında incelendi. Tutunan hücrelerde ALP (alkalen fosfataz)

enzim aktivitesinin var olduğu bölgelerin kırmızı, mineralize nodüllü alanların ise kahverengi veya siyah boyandığı tespit edildi.

Kalsiyum içeriğinin ölçülmesi amacıyla 28. günde Alizarin Kırmızısı (AK) boyaması yapıldı. AK'nın %1'lik stok solüsyonu distile su ile hazırlandı ve bu solüsyon 1/10 distile su ile dilüe edilerek deneylerde kullanılmaya hazır hale getirildi. Kültür kabındaki besi ortamı detaylı bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra hücreler %70'lik soğuk etanol ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından alkol de uzaklaştırılarak 5 dk'lık sürelerle 2 defa distile su ile yıkandı. Hücreleri kaplayacak şekilde AK eklenip 30 dk inkübe edildi. Daha sonra AK uzaklaştırılıp 4 defa distile su ile yıkanarak mikroskop altında incelenmeye bırakıldı. Kalsiyum birikimi fazla olan bölgeler kırmızı kahverengi şekilde gözlemlendi.

AK pozitif koloni sayısı ile 100'den fazla hücre içeren büyük koloni (BK) sayıları ona kadar (+1), yirmiye kadar (+2) ve yirminin üstü için (+3) olarak kabul edildi.¹⁵¹

3.2.5 İmmunohistokimya Yöntemi ile Osteokalsin, Osteonektin, Osteoprotegerin, Alkalen Fosfotaz ve RANKL Aktivitesi Tayini:

Kültürler 28. günde Osteokalsin (OK), Osteonektin(ON), Alkalen fosfataz (ALP), Osteoprotegerin (OPG), ve RANKL antikoru kullanılarak immunohistokimyasal olarak incelendi. Örnekler PBS'de hazırlanmış %4'lük paraformaldehid solüsyonu (pH 7,4) ile fikse edilmesinden sonra 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra %0,5'lik tripsin solüsyonu ile 5 dk inkübe edildikten sonra %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) içinde 30 dk beklemeye bırakıldı. 1 saat bloking serumu ile inkübe edilen hücreler yıkanmadan sadece serumun alınmasından sonra primer antikorlar ile 18 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi bittikten sonra biotinlayted anti-mouse/anti-rabbit konjuge edilmiş streptavidin-horsedish peroksidaz solüsyonları ile 30'ar dk boyandı (85-9043, Zymed Histostain kit San Fransisco, A.B.D). Her bir ikincil antikor 3 kere 5'er dk PBS ile yıkandı. İmmünreaktiviteleri belirgin halde saptamak maksadıyla diaminobenzidin (DAB, 00- 2020, Zymed, San Fransisco, A.B.D) ile 5 dk boyandı. Negatif kontrollerin yapılması amacıyla PBS konuldu. Distile

su ile yıkama bittikten sonra kapatma medyumu (00-8030, Histomount mounting solution, San Fransisco, ABD) ile kapatıldı.^{152,154}

3.2.6 Verilerin İstatistiksel Analizi:

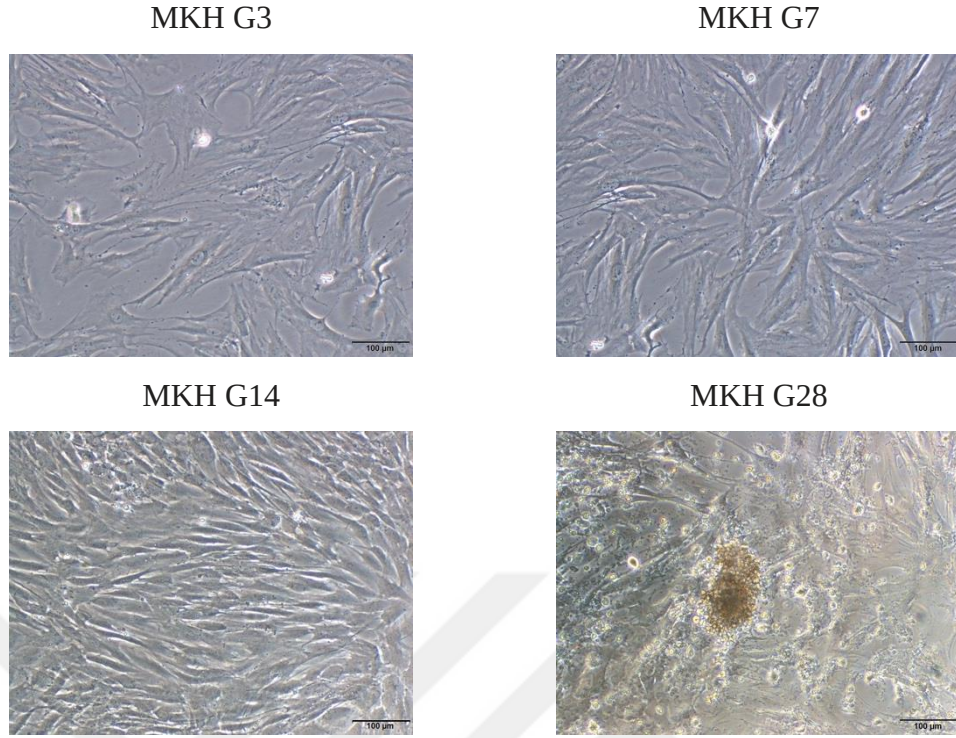
Graphpad istatistik programı (Graphpad, San Diego, CA) kullanılarak tek yönlü ANOVA analizi yapıldı. Ortalama ve standart sapmalar karşılaştırılarak bulunan değerler için anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak belirlendi.



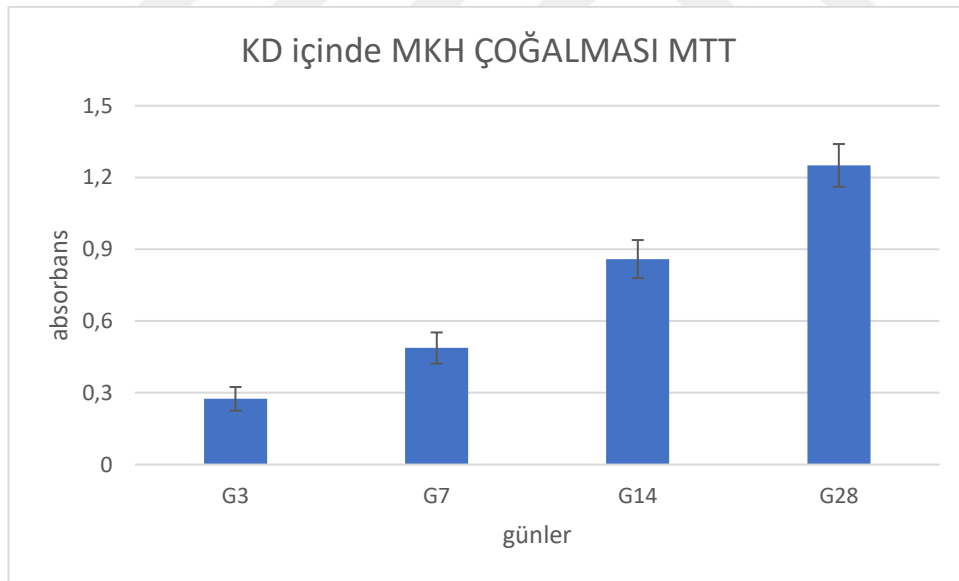
4 BULGULAR

4.1 Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Eldesi, Kültürü ve Karakterizasyonu

Sıçanların adipoz dokusundan izole edilen yağ kaynaklı mezenkimal kök hücreler (YKMKH) dondurucudan çıkarılıp kültür kaplarında kültüre edildi ve bu hücrelerin seçici olarak plastik yüzeylere yapışma özelliğinden yararlanıldı. Böylece, MKH'lerin yüzeye tutunma özellikleri ile süspanse olarak üreyen hematopoetik KH'ler ile ayrılımları sağlandı. Hematopoetik hücreler ise PBS ile yıkamalar sonrası ortamdan uzaklaştırıldı. MKH'lerin 1/3 pasaj oranında yaklaşık olarak 3 gün içerisinde yüzeyi kapladıkları saptandı. Pasajlanan hücreler kemik diski (KD) içine yerleştirilerek osteojenik besiyeri içinde çoğalma, göç etme ve farklanma kapasitesi incelendi. 28. gün sonunda yapılan analizlerde zaman dilimleri içerisinde hücre sayılarının artışı kıyaslandığında her zaman diliminde bir öncekine göre hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) bir artış olduğu gözlemlendi. Mikroskop görüntülerinde hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunup yayıldıkları ve fibroblast benzeri işsi bir morfoloji sergiledikleri belirlendi. MTT ile yapılan analizde hücrelerin çoğaldıkları ve konfluent oldukları izlendi (Resim 6).



Resim 6 MKH için KD kültür ortamına alındıktan sonra tutunma, çoğalma, göç etme kemik benzeri adacık yapma şeklinde farklılaşma davranışları gözlemlendi.



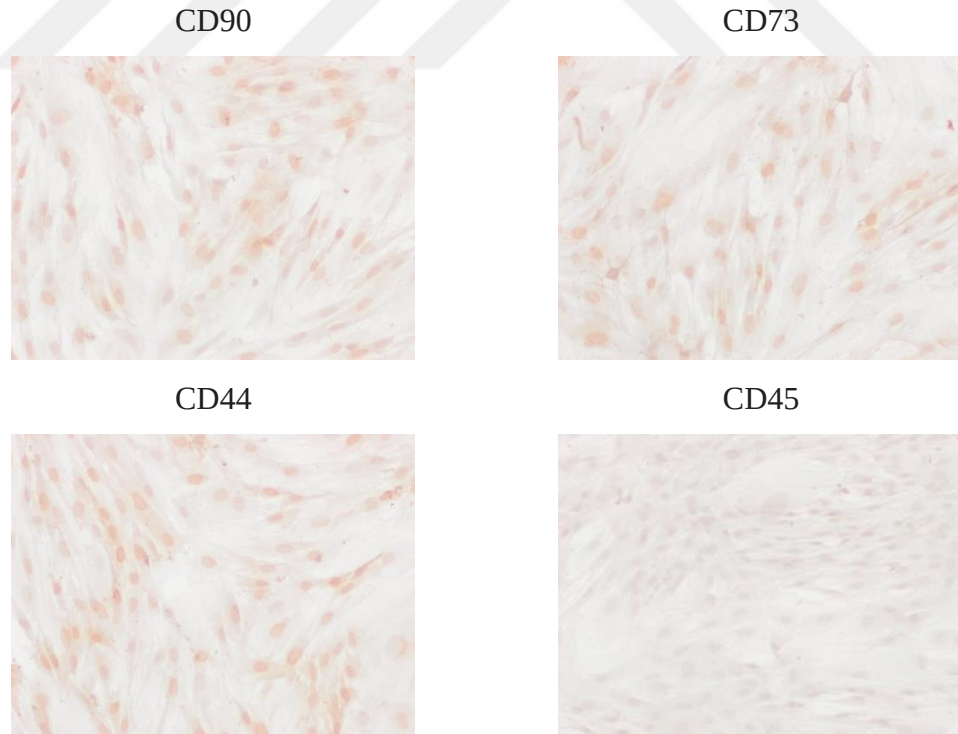
Şekil 17 MTT ile kültür ortamına alındıktan sonra yirmi sekiz günlük süreçte hücre çoğalması ve canlılığı gösterildi.

MTT ile kültür ortamına alındıktan sonra yirmi sekiz günlük süreçte hücre çoğalması ve canlılığının varlığı hücrelerin çoğaldığı saptandı (Tablo 2).

Tablo 2 MTT ile kültür ortamında hücre çoğalması ve canlılığının istatistiksel analizi.

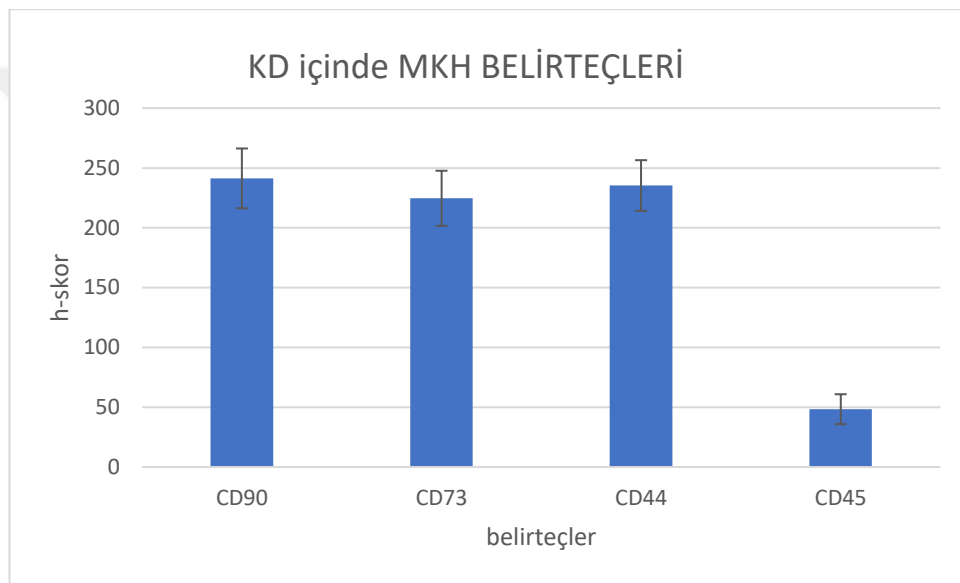
Karşılaştırma	fark	q	P değeri
G3 ile G7	-0.2127	5.086 *	p <0.05
G3 ile G14	-0.5843	13.974 ***	p <0.001
G3 ile G28	-0.9760	23.340 ***	p <0.001
G7 ile G14	-0.3717	8.888 **	p <0.01
G7 ile G28	-0.7633	18.254 ***	p <0.001
G14 ile G28	-0.3917	9.366 ***	p <0.001

Alınan ve çoğaltılan hücrelerin MKH'ler olduğu belirteçler ile gösterilmiştir. Belirteçler olarak CD90, CD44, CD73 için pozitif olma ve hematopoetik belirteçler olan CD45 negatif olma özelliği kullanılmıştır (Resim 7).



Resim 7 MKH karakterizasyonu için CD90, 44, 73 için pozitif olma ve hematopoetik belirteçler olan CD45 negatif olma immunohistokimya ile gösterilmiştir.

İmmünohistokimya boyamaları h-skor ile değerlendirilmiş ve CD90, CD44, CD73, için pozitif olma ve hematopoetik belirteç olan CD45 için negatif olma kriterleri sağlanmış, istatistiksel olarak homojen bir MKH eldesi olduğu saptanmıştır (Şekil 18).CD90 ile CD73, CD90 ile CD44, CD73 ile CD 44 birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($P>0.05$) CD45 ile CD90, CD73, CD44 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($P<0.001$)



Şekil 18. MKH karakterizasyonu için CD90, 44, 73 için pozitif olma ve hematopoetik belirteçler olan CD45 negatif olma İmmünohistokimya ile gösterildi

Tablo 3 MKH karakterizasyonu için istatistiksel analiz.

Karşılaştırma	Fark	q	p değeri
CD90 ile CD73	16.667	1.376 ns	$P>0.05$
CD90 ile CD44	6.000	0.4954 ns	$P>0.05$
CD90 ile CD45	193.00	15.935 ***	$P<0.001$
CD73 ile CD44	-10.667	0.8807 ns	$P>0.05$
CD73 ile CD45	176.33	14.559 ***	$P<0.001$
CD44 ile CD45	187.00	15.440 ***	$P<0.001$

4.2 Etkili Borik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

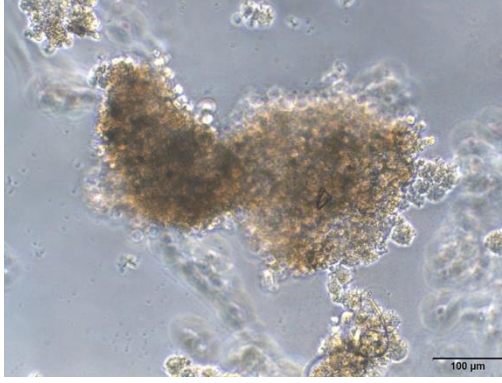
Çalışmamızda kullanılacak borik asit dozunu belirlemek amacıyla, Kara ve ark.¹⁵¹ yaptığı bizim çalışmamıza benzer kültür ortamı kullanılarak mezenkimal kök hücre üzerine etkili borik asit konsantrasyonunu belirlemek için yapılan çalışmada, MTT analizi ile en etkili borik asit konsantrasyonun 6 µg/ml bulmuşlardır. Biz de çalışmamızda bu bilgiler ışığında 6 µg/ml konsantrasyonunda borik asit kullanmaya karar verdik.

4.3 Kemik Diski Modelindeki Zoledronik Asit Hasarında Bor ve Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisi

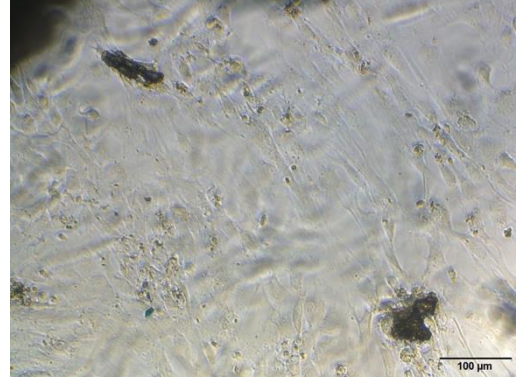
Deneyler için her bir grupta 8 adet hayvan 16 adet kemik halkası kullanıldı. Kemik diskleri kültür ortamında 48 kuyucuklu kültür tabaklarına alınıp her bir grupta 3 örnek olmak üzere yerleştirildi. Her örnek grubunda kemik disk içine; grup 1 (Hiçbir şey eklenmeyen, KONTROL), grup 2 (50 uM ZA eklenen), grup 3 (50 uM ZA ve 6 µg/ml BA birlikte uygulanan, ZA-BA), grup 4 (50 uM ZA ve 30x10⁴ MKH eklenen, ZA-MKH) ve grup 5 (50 uM ZA, 6 µg/ml BA ve 30x10⁴ MKH eklenen, ZA-MKH-BA) olmak üzere uygulamalar yapıldı.

Osteojenik farklılaşma için semikonfluent aşamada besiyerine askorbik asid, beta gliserofosfat ve deksametazon eklendi. MKH için osteoblasta yönelmesi beklendi. İlk hafta içerisinde KONTROL grubunda hücre ortaya çıksa bile çok kalıcı olmazken ZA örneklerinde benzer şekilde az miktarda hücre saptandı ancak bunlar kalıcı hücreler olarak izlendi. BOR, MKH ve BOR+MKH eklenen hücrelerde daha fazla hücrenin kalıcı ve çoğalamaya meyilli olduğu gözlemlendi. İkinci hafta ile başlayan süreçte, örneklerde kemik kaynaklı hücre üretiminin KD kenarından başladığı saptandı. Bu aşamada MKH ve BOR+MKH gruplarında hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecini ilerlettikleri izlendi. Üçüncü haftada hem KONTROL hem de BOR ve MKH eklenenlerde belirgin hücre çoğalması görüldü. ZA uygulamasının çoğalmayı, farklılaşmayı ve kemiksi adacık oluşumunu azalttığı izlendi. Dördüncü haftada ZA uygulananlarda az miktarda osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımına karşılık, KONTROL, BOR, MKH ve BOR+MKH gruplarında daha belirgin bir biçimde gerçekleşti (Resim 8).

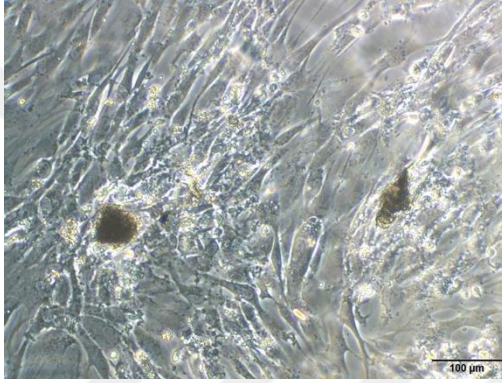
KONTROL



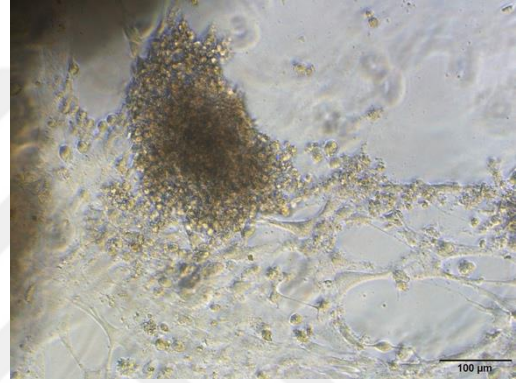
ZA



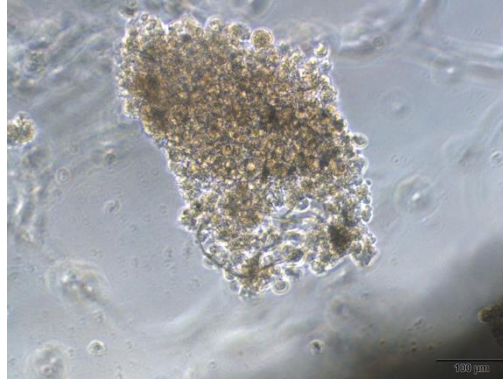
ZA+BOR



ZA+MKH



ZA+MKH+BOR



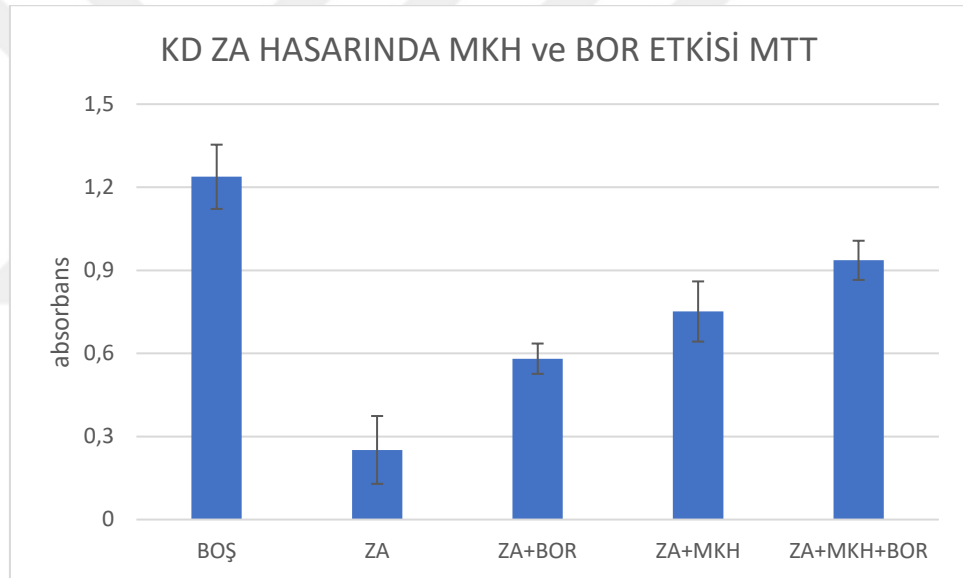
Resim 8 Dördüncü haftada tüm gruplarda konfluent olma ve boşluğu tamamen doldurma gerçekleşmedi. ZA ile az miktarda osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımı görülürken ZA+BOR, ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR gruplarında daha belirgin bir biçimde gerçekleşti.

Dördüncü haftada bütün deney gruplarında da konfluent olma ve boşluğu tamamen doldurma gerçekleşmedi. ZA ile az miktarda osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımı görülürken ZA+BOR, ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR

gruplarında daha belirgin bir biçimde gerçekleşti (Tablo 5). Dördüncü hafta sonunda yapılan MTT analizi ile hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu değerlendirildi. ZA grubunda en az sayıda hücre artışı ve kemiksi adacık oluşumu gözlenirken, ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için hücre artışı ve kemiksi adacık oluşumunun anlamlı bir şekilde ($P<0.05$) daha fazla olduğu saptandı (Tablo 5). KONTROL grup ile ZA grubu, KONTROL grup ile ZA+BOR grubu, KONTROL grup ile ZA+MKH grubu karşılaştırıldığında KONTROL grubun hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). KONTROL grup ile ZA+MKH+BOR grubu karşılaştırıldığında KONTROL grubun hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA ile ZA+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+BOR grubunun hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu açısından daha fazla olduğu görüldü bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA ile ZA+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA+MKH grubunun hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA ile ZA+BOR+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA+BOR+MKH grubunun hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA+BOR ile ZA+MKH grupları birbiriyle karşılaştırıldığında hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($P>0.05$). ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+BOR+MKH grubunun hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında hücrelerin çoğalması ve kemiksi adacık oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$).

Tablo 4 Osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunun istatistiksel analiz

Gruplar	Nokta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	medyan
KONTROL	3	1.238	0.1161	0.06701	1.238
ZA	3	0.2514	0.1225	0.07073	0.2723
ZA-BOR	3	0.5809	0.05470	0.03158	0.6069
ZA-MKH	3	0.7514	0.1086	0.06270	0.7198
ZA-MKH-BOR	3	0.9361	0.07071	0.04082	0.9541



Şekil 19 Dördüncü haftada tüm gruplarda konfluent olma ve boşluğu tamamen doldurma gerçekleşmedi. ZA ile az miktarda osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımı görülürken ZA+BOR, ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR gruplarında daha belirgin bir biçimde gerçekleşti.

Tablo 5 MTT ile yapılan analizde ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında hücrelerin daha fazla kemiksi adacık yaptığı saptandı.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KONTROL ile ZA	0.9864	17.389 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+BOR	0.6568	11.579 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+MKH	0.4864	8.574 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+MKH+ BOR	0.3017	5.318 *	P<0.05
ZA ile ZA+BOR	-0.3295	5.809 *	P<0.05
ZA ile ZA+MKH	-0.5000	8.815 ***	P<0.001
ZA ile ZA+MKH+BOR	-0.6847	12.071 ***	P<0.001
ZA+BOR ile ZA+MKH	-0.1705	3.005 ns	P>0.05
ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR	-0.3552	6.261 **	P<0.01
ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR	-0.1847	3.256 ns	P>0.05

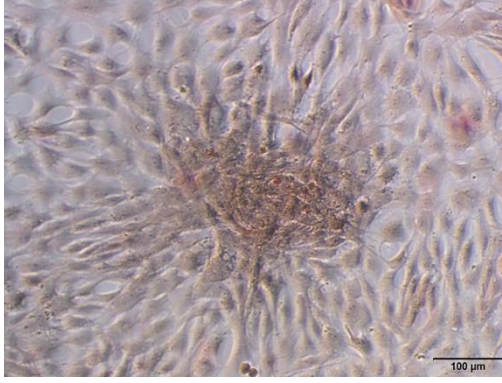
4.4 Kemik Diski Modelindeki Zoledronik Asit Hasarında Osteojenik Farklılaşma ve Kemiksi Adacık Oluşumuna Bor ve Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisinin İncelenmesi

Kemiksi adacık oluşumu için Alizarin Kırmızısı ve Von Kossa histokimyası kullanıldı. Osteojenik besiyerinde farklılaşmanın belirteçleri olarak ise Osteokalsin (OK), Osteonektin (ON), Osteoprotegerin (OPG), Alkalen fosfataz (ALP) ve RANKL protein ekspresyonu immunohistokimyasal olarak incelendi.

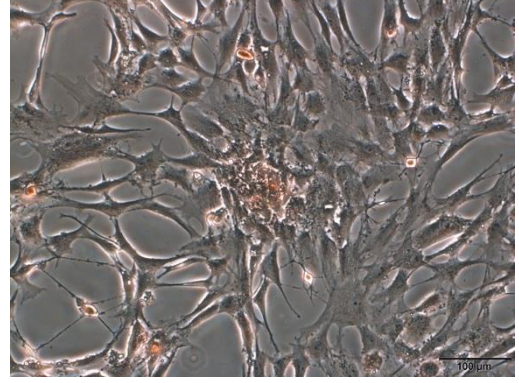
4.4.1 Kültürde Osteojenik Farklılaşma Alizarin Kırmızısı Histokimyası

Kemiksi adacık oluşumu için AK boyaması ile hücrelerin osteojenik farklılaşması gösterildi (Resim 9).

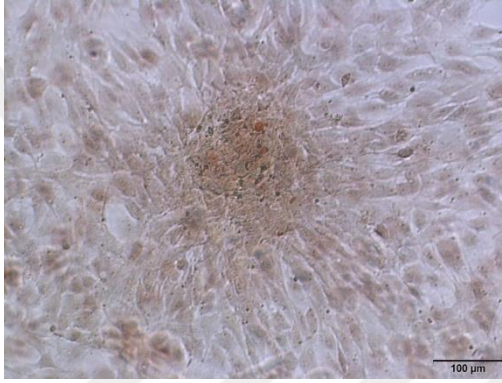
KONTROL



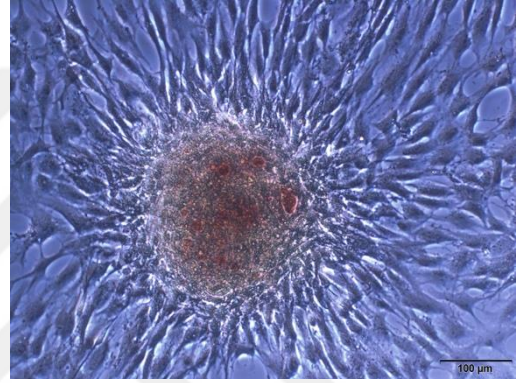
ZA



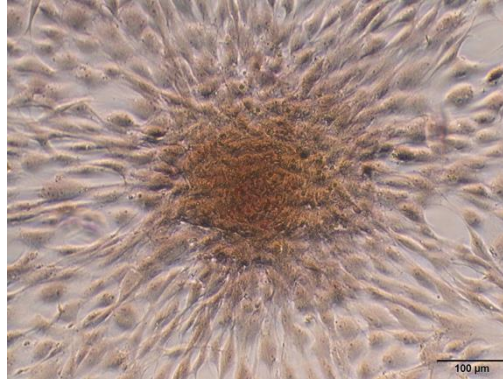
ZA+BOR



ZA+MKH



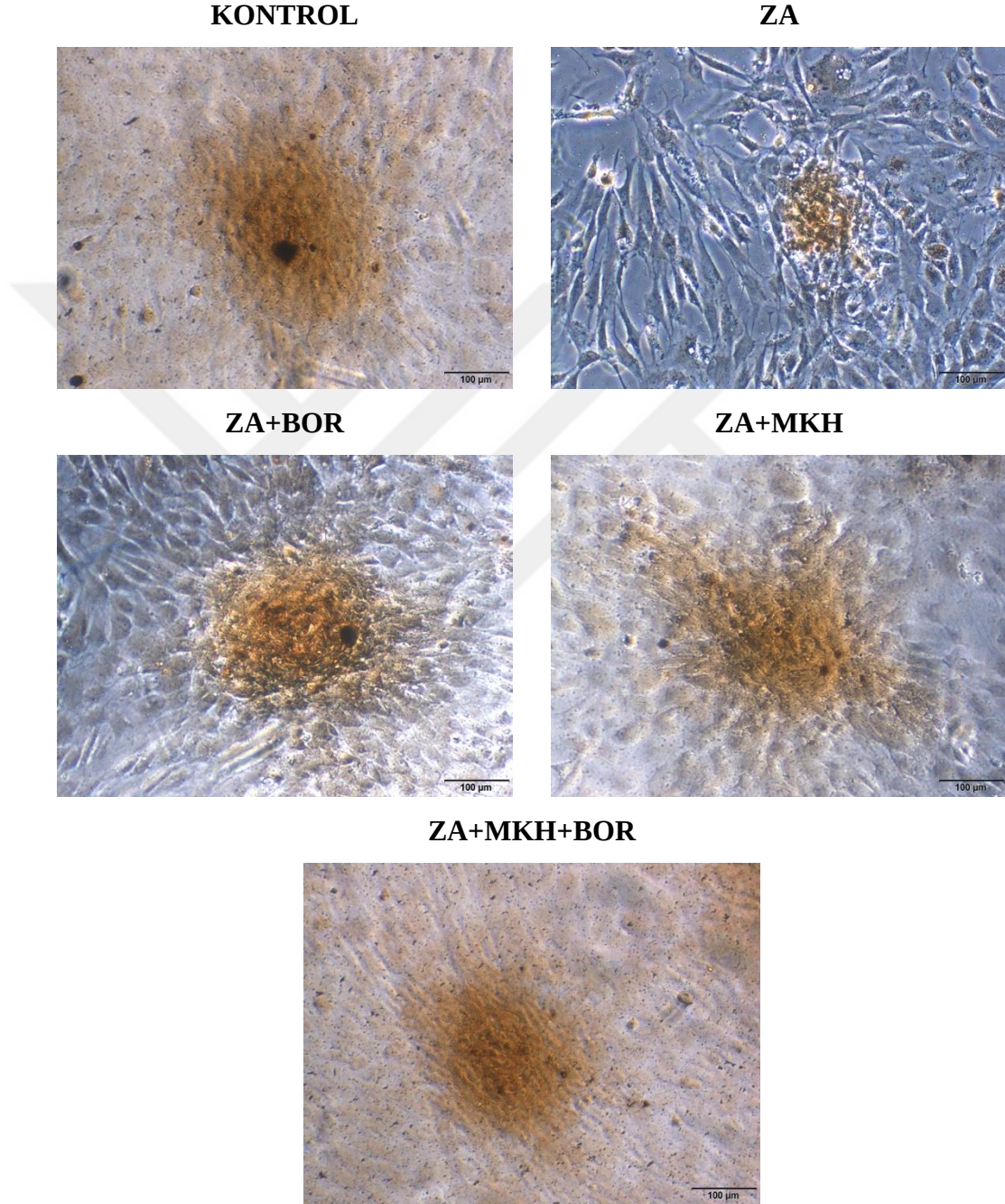
ZA+MKH+BOR



Resim 9 AK boyaması ile ZA ile oluşan az sayıda ve az miktarda boyama izlenirken ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında daha fazla sayıda ve daha koyu boyanan kemiksi adacıklar izlendi.

4.4.2 Kültürde Osteojenik Farklılaşma VonKossa Histokimyası

Osteojenik farklılaşma ile kemiksi adacık oluşumunda mineralizasyonun varlığı için VK boyaması yapıldı (Resim 10).

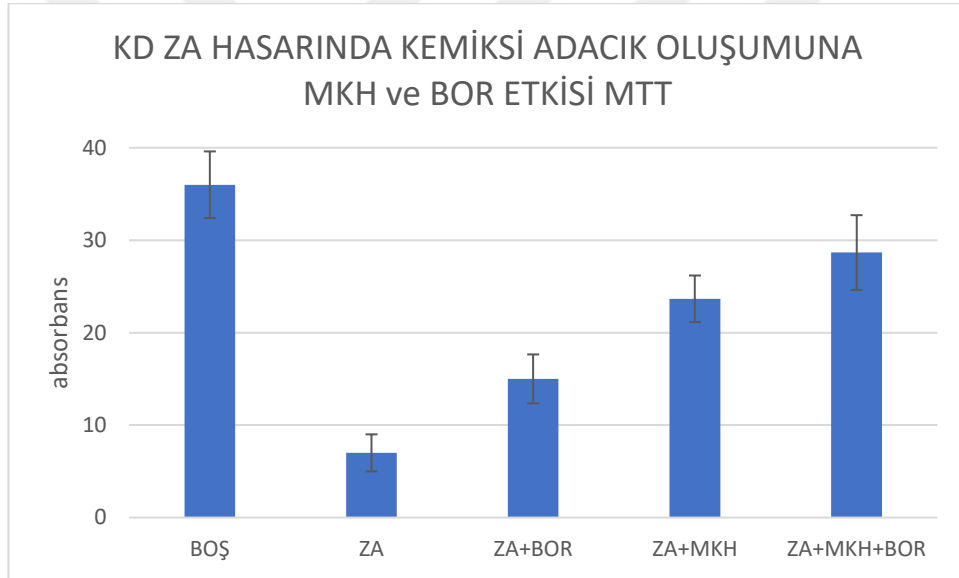


Resim 10 VK boyaması ile ZA ile oluşan az sayıda ve az miktarda boyama izlenirken ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında daha fazla sayıda ve daha koyu boyanan kemiksi adacıklar izlendi.

Osteojenik farklılaşmaya kemiksi adacık oluşumunun sayısal durumu değerlendirildiğinde anlamlı bir şekilde ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında daha fazla sayıda ve daha koyu boyanan kemiksi adacıklar izlendi (Tablo 7). KONTROL grup ile ZA grubu, KONTROL grup ile ZA+BOR grubu, KONTROL grup ile ZA+MKH grubu karşılaştırıldığında KONTROL grubun hücrelerin sayı ve boyanan kemiksi adacıklar açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). KONTROL grup ile ZA+MKH+BOR grubu karşılaştırıldığında hücrelerin sayı ve boyanan kemiksi adacıklar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$). ZA ile ZA+BOR grupları karşılaştırıldığında hücrelerin sayı ve boyanan kemiksi adacıklar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$). ZA ile ZA+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA+MKH grubunun hücrelerin sayı ve boyanan kemiksi adacıklar açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA ile ZA+BOR+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA+BOR+MKH grubunun hücrelerin sayı ve boyanan kemiksi adacıklar açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA+BOR ile ZA+MKH grupları birbiriyle karşılaştırıldığında ZA+MKH hücrelerin sayı ve boyanan kemiksi adacıklar açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+BOR+MKH grubunun hücrelerin sayı ve boyanan kemiksi adacıklar açısından daha fazla olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında hücrelerin sayı ve boyanan kemiksi adacıklar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$).

Tablo 6 Kemiksi adacıkların boyanmasında istatistiksel analiz.

Gruplar	Nokta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	Medyan
KONTROL	3	36.000	3.606	2.082	37.000
ZA	3	7.000	2.000	1.155	7.000
ZA+BOR	3	15.000	15.000	1.528	14.000
ZA+MKH	3	23.667	23.667	1.453	24.000
ZA+MKH+BOR	3	28.667	28.667	2.333	28.000



Şekil 20 Oluşan kemiksi adacıklar için ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında anlamlı bir artış saptandı.

Osteojenik farklılaşmaya kemiksi adacık oluşumunun sayısal durumu değerlendirildiğinde anlamlı bir şekilde ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında daha fazla sayıda ve daha koyu boyanan kemiksi adacıklar izlendi (Tablo 7).

Tablo 7 Oluşan kemiksi adacıklar için ZA+BOR, ZA+MKH ve ZA+BOR+MKH için gruplarında anlamlı bir artış saptandı.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KONTROL ile ZA	29.000	16.441 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+BOR	21.000	11.906 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+MKH	12.333	6.992 **	P<0.01
KONTROL ile ZA+MKH+BOR	7.333	4.158 ns	P>0.05
ZA ile ZA+BOR	-8.000	4.536 ns	P>0.05
ZA ile ZA+MKH	-16.667	9.449 ***	P<0.001
ZA ile ZA+MKH+BOR	-21.667	12.284 ***	P<0.001
ZA+BOR ile ZA+MKH	-8.667	4.914 *	P<0.05
ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR	-13.667	7.748 **	P<0.01
ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR	-5.000	2.835 ns	P>0.05

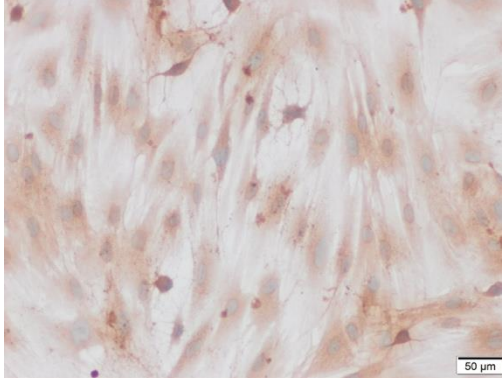
4.5 Kültürde Osteojenik Farklılaşma için İmmunohistokimya

Osteojenik besiyerinde farklanmanın belirteçleri olarak OK, ON, OPG, ALP ve RANKL protein ekspresyonu immunohistokimyasında hücrelerin spesifik olarak boyandıkları ve boyamanın gruplar arasında sayı ve intensite olarak değiştiği farklı büyütmelemlerde görülmüştür.

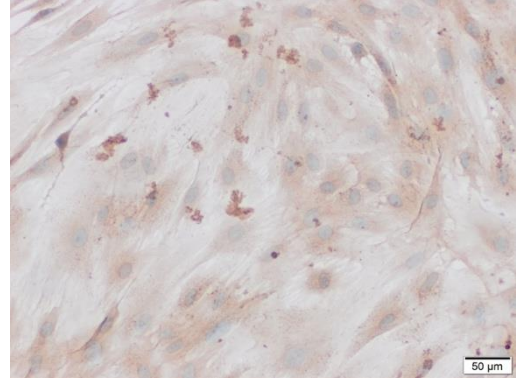
4.5.1 Osteokalsin (OK) İmmunohistokimyası

Dördüncü hafta sonunda hücrelerinin farklılaşma yönünde boyandıkları ancak bunun homojen olmayıp ve bazı hücrelerde olduğu izlendi. ZA ile azalan bu farklılaşmanın BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında arttığı gözlemlendi (Resim 11).

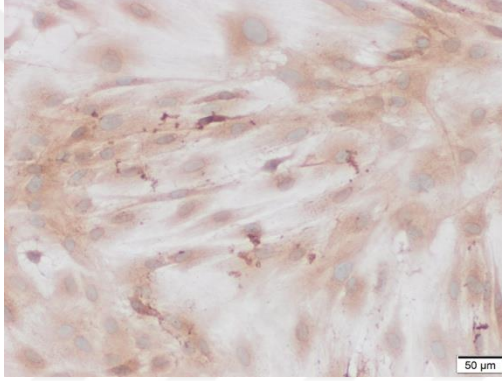
KONTROL



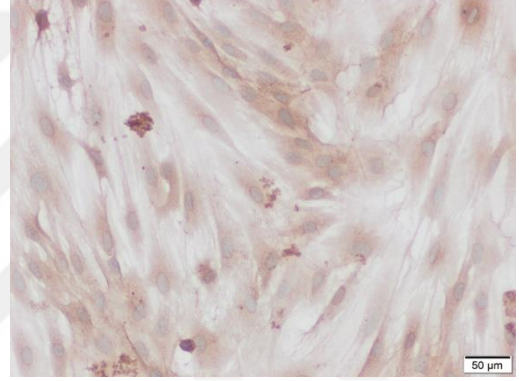
ZA



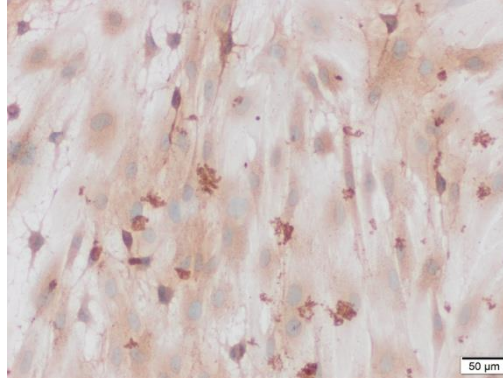
ZA+BOR



ZA+MKH



ZA+MKH+BOR



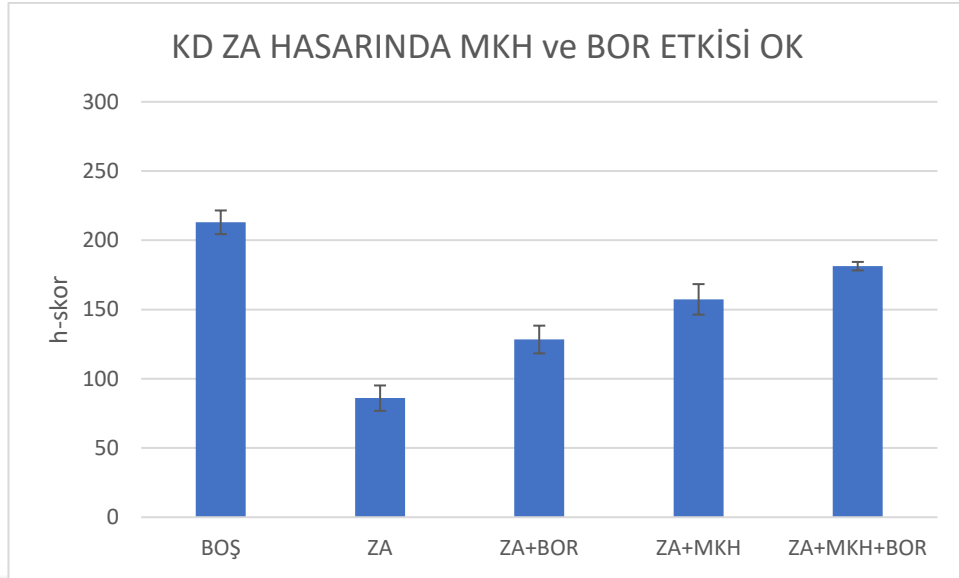
Resim 11 OK immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı (Tablo 9). KONTROL grup ile ZA grubu, KONTROL grup ile ZA+BOR grubu, KONTROL grup ile ZA+MKH grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında KONTROL grupta her

üçünde de daha fazla boyanma olduğu görüldü bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). KONTROL grup ile ZA+BOR+MKH grubu karşılaştırıldığında KONTROL grubun daha fazla boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). ZA ile ZA+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). ZA ile ZA+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$) ZA ile ZA+BOR+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA+BOR ile ZA+MKH grupları birbiriyle karşılaştırıldığında ZA+BOR grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+BOR grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+MKH grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$).

Tablo 8 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı.

Gruplar	Nokta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	Medyan
KONTROL	3	213.00	8.544	4.933	212.00
ZA	3	86.00	9.165	5.292	84.000
ZA+BOR	3	128.33	10.017	5.783	129.00
ZA+MKH	3	157.33	11.015	6.360	158.00
ZA+MKH+BOR	3	181.33	3.055	1.764	182.00



Şekil 21 OK immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı (Şekil 21).

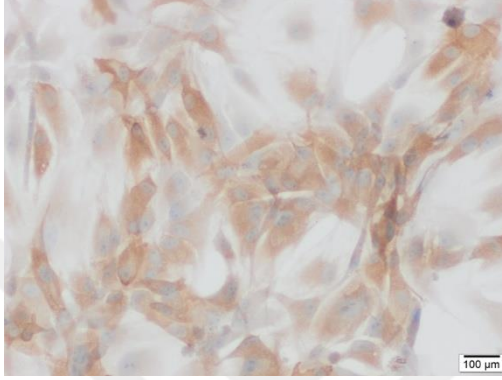
Tablo 9 OK immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KONTROL ile ZA	127.00	24.971 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+BOR	84.667	16.647 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+MKH	55.667	10.945 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+MKH+BOR	31.667	6.226 **	P<0.01
ZA ile ZA+BOR	-42.333	8.324 **	P<0.01
ZA ile ZA+MKH	-71.333	14.026 ***	P<0.001
ZA ile ZA+MKH+BOR	-95.333	18.745 ***	P<0.001
ZA+BOR ile ZA+MKH	-29.000	5.702 *	P<0.05
ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR	-53.000	10.421 ***	P<0.001
ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR	-24.000	4.719 *	P<0.05

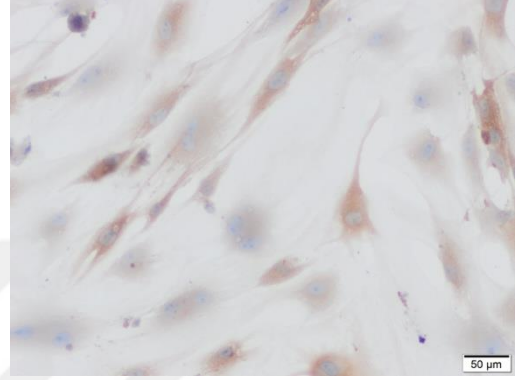
4.5.2 Osteonektin (ON) İmmunohistokimyası

Dördüncü hafta sonunda hücrelerinin farklılaşma yönünde boyandıkları ancak bunun homojen olmayıp ve bazı hücrelerde olduğu izlendi. ZA ile azalan bu farklılaşmanın BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında arttığı gözlemlendi (Resim 12).

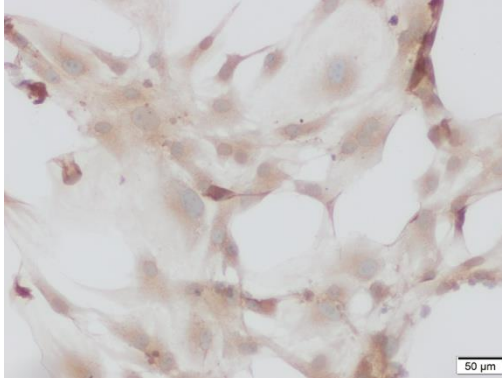
KONTROL



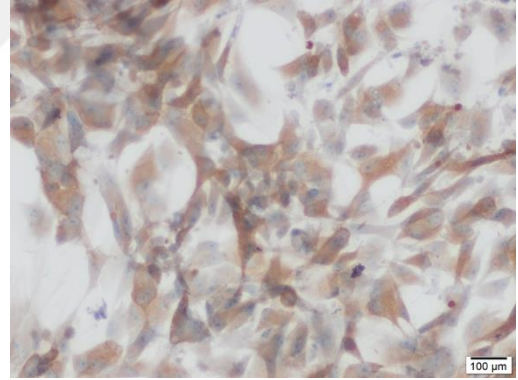
ZA



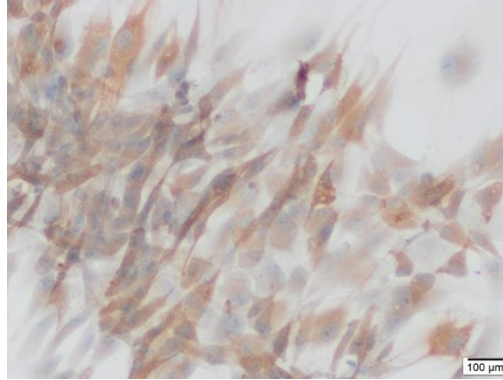
ZA+BOR



ZA+MKH



ZA+MKH+BOR

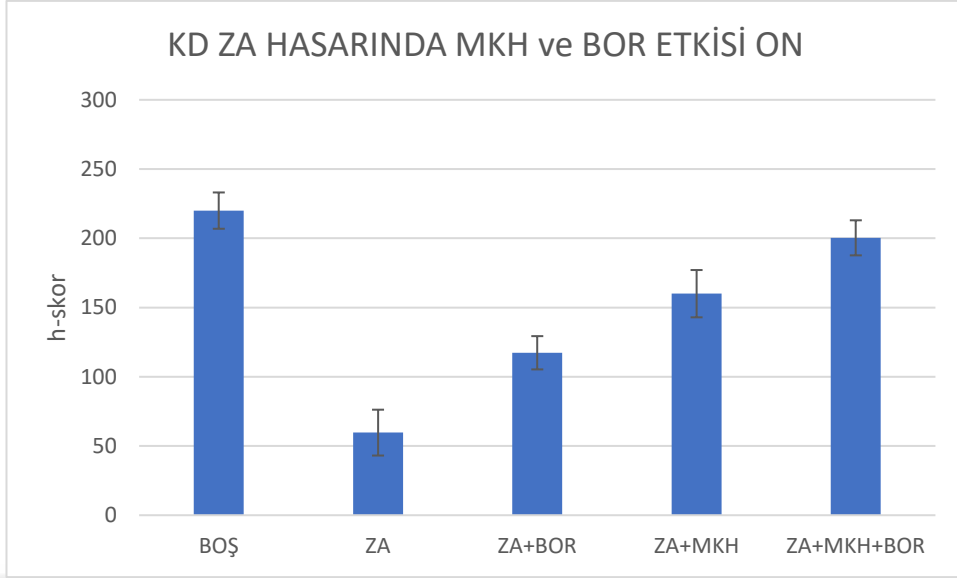


Resim 12 ON immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı (Tablo 11). KONTROL grup ile ZA grubu, KONTROL grup ile ZA+BOR grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında KONTROL grupta her ikisinde de daha fazla boyanma olduğu görüldü bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). KONTROL grup ile ZA+MKH grubu karşılaştırıldığında KONTROL grubun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$) KONTROL grup ile ZA+BOR+MKH grubu karşılaştırıldığında boyanma açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmesi ($P>0.05$). ZA ile ZA+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). ZA ile ZA+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$) ZA ile ZA+BOR+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$) ZA+BOR ile ZA+MKH grupları birbiriyle karşılaştırıldığında ZA+BOR grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+BOR grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+MKH grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$).

Tablo 10 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı.

Gruplar	Nokta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	Medyan
KONTROL	3	220.00	13.115	7.572	218.00
ZA	3	59.667	16.563	9.563	58.000
ZA+BOR	3	117.33	12.014	6.936	118.00
ZA+MKH	3	160.00	17.088	9.866	158.00
ZA+MKH+BOR	3	200.33	12.662	7.311	198.00



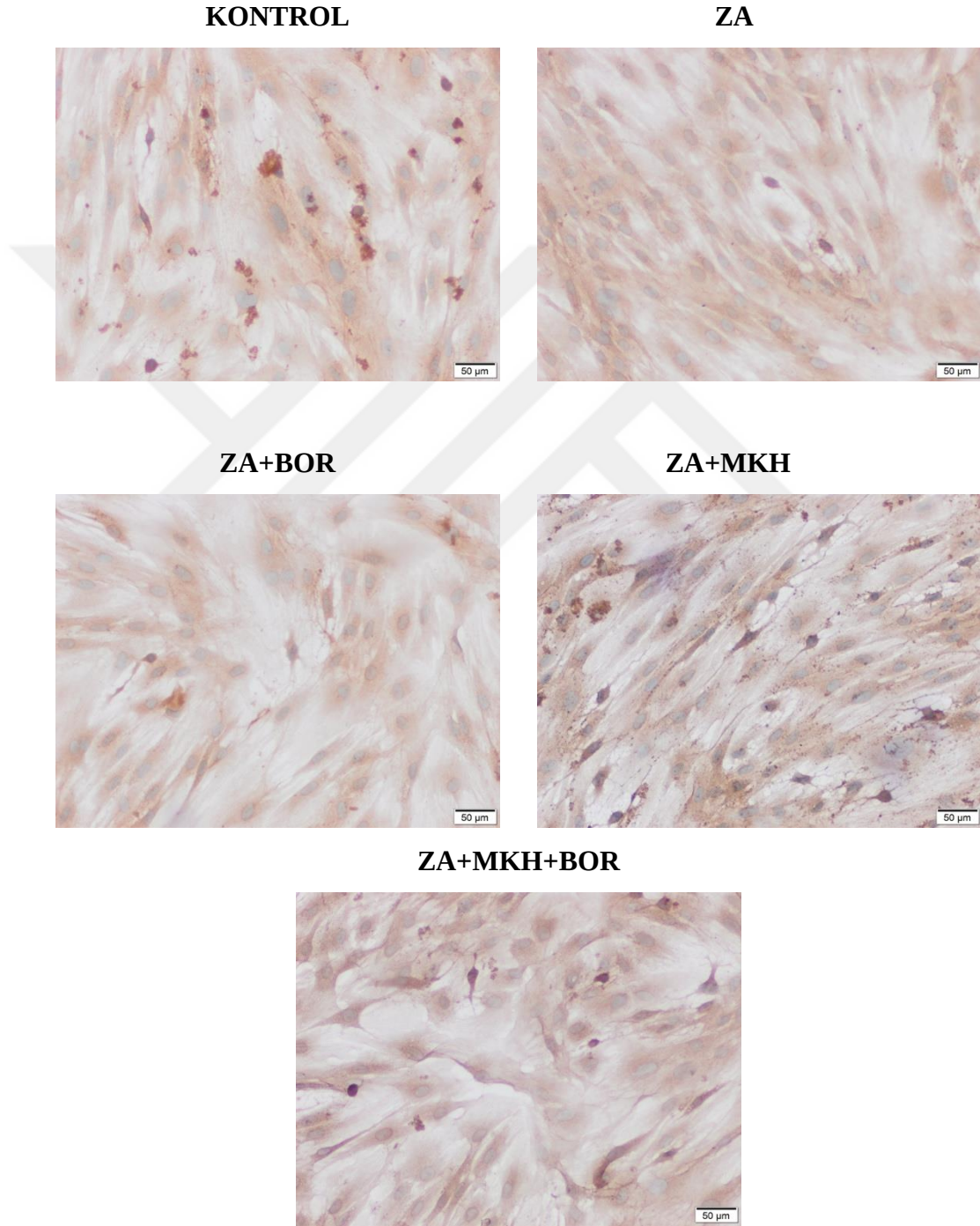
Şekil 22 ON immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

Tablo 11 ON immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KONTROL ile ZA	160.33	19.228 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+BOR	102.67	12.312 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+MKH	60.000	7.195 **	P<0.01
KONTROL ile ZA+MKH+BOR	19.667	2.358 ns	P>0.05
ZA ile ZA+BOR	-57.667	6.916 **	P<0.01
ZA ile ZA+MKH	-100.33	12.032 ***	P<0.001
ZA ile ZA+MKH+BOR	-140.67	-16.869 ***	P<0.001
ZA+BOR ile ZA+MKH	-42.667	5.117 *	P<0.05
ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR	-83.000	9.954 ***	P<0.001
ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR	-40.333	4.837 *	P<0.05

4.5.3 Alkalen Fosfataz (ALP) İmmunohistokimyası

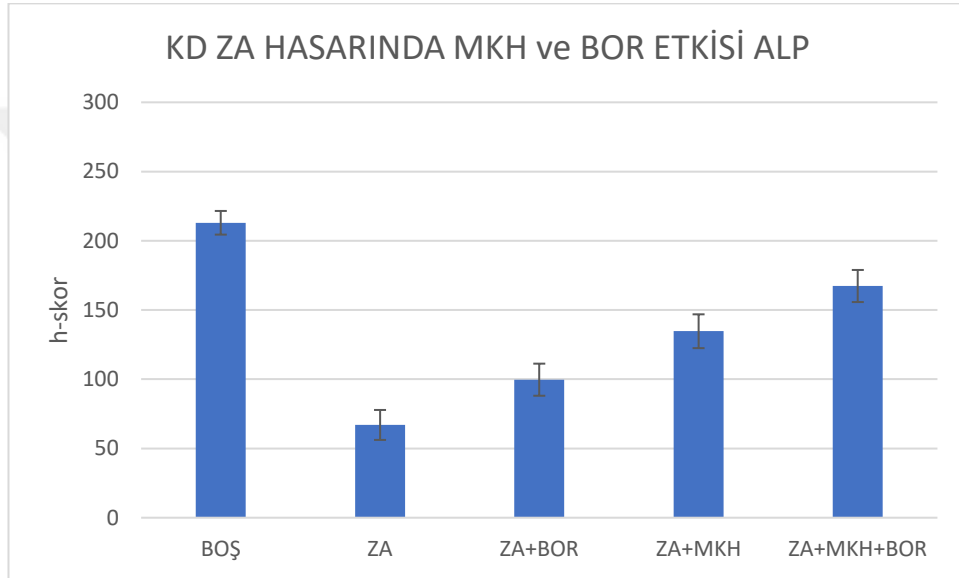
Dördüncü hafta sonunda hücrelerinin farklılaşma yönünde boyandıkları ancak bunun homojen olmayıp ve bazı hücrelerde olduğu izlendi. ZA ile azalan bu farklılaşmanın BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında arttığı gözlemlendi (Resim 13).



Resim 13 ALP immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

Tablo 12 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı.

Gruplar	Nokta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	Medyan
KONTROL	3	213.00	8.544	4.933	212.00
ZA	3	67.000	10.817	6.245	64.000
ZA+BOR	3	99.667	11.590	6.692	98.000
ZA+MKH	3	134.67	12.220	7.055	132.00
ZA+MKH+BOR	3	167.33	11.590	6.692	169.00



Şekil 23 ALP immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı (Tablo 13). KONTROL grup ile ZA grubu, KONTROL grup ile ZA+BOR grubu , KONTROL grup ile ZA+MKH grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında KONTROL grupta her üçünde de daha fazla boyanma olduğu görüldü bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). KONTROL grup ile ZA+BOR+MKH grubu karşılaştırıldığında KONTROL grubun daha fazla boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$). ZA ile ZA+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA ile ZA+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu

fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$) ZA ile ZA+BOR+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA+BOR ile ZA+MKH grupları birbiriyle karşılaştırıldığında ZA+BOR grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+BOR grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+MKH grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$).

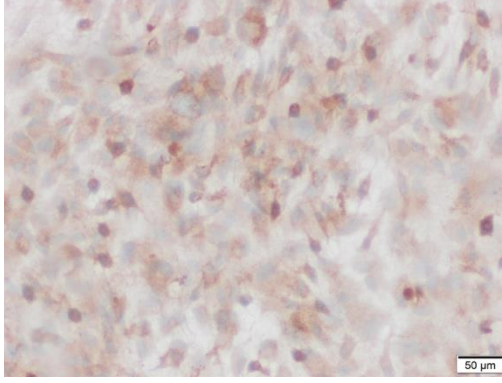
Tablo 13 ALP immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KONTROL ile ZA	146.00	22.932 ***	$P<0.001$
KONTROL ile ZA+BOR	113.33	17.801 ***	$P<0.001$
KONTROL ile ZA+MKH	78.333	12.304 ***	$P<0.001$
KONTROL ile ZA+MKH+BOR	45.667	7.173 **	$P<0.01$
ZA ile ZA+BOR	-32.667	5.131 *	$P<0.05$
ZA ile ZA+MKH	-67.667	10.628 ***	$P<0.001$
ZA ile ZA+MKH+BOR	-100.33	15.759 ***	$P<0.001$
ZA+BOR ile ZA+MKH	-35.000	5.497 *	$P<0.05$
ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR	-67.667	10.628 ***	$P<0.001$
ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR	-32.667	5.131 *	$P<0.05$

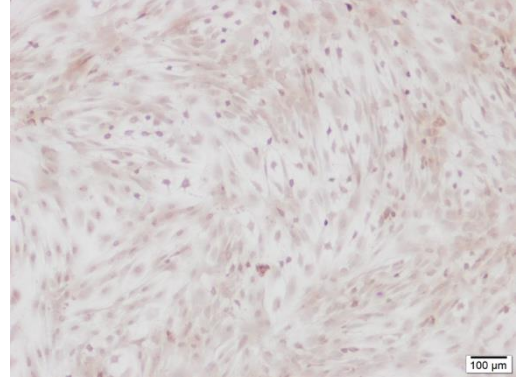
4.5.4 Osteoprotegerin (OPG) İmmunohistokimyası

Dördüncü hafta sonunda hücrelerinin farklılaşma yönünde boyandıkları ancak bunun homejen olmayıp ve bazı hücrelerde olduğu izlendi. ZA ile azalan bu farklılaşmanın BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında arttığı gözlemlendi (Resim 14).

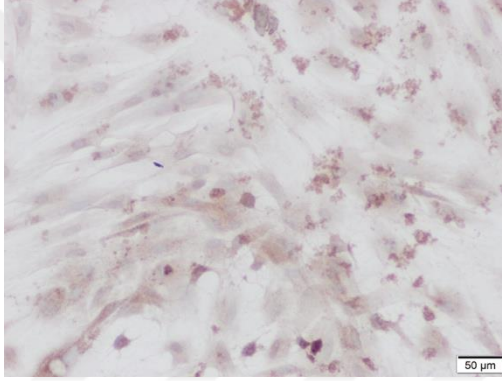
KONTROL



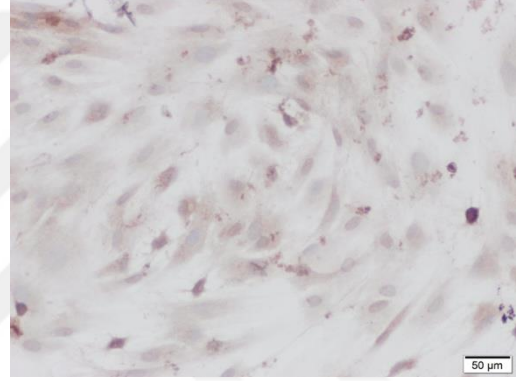
ZA



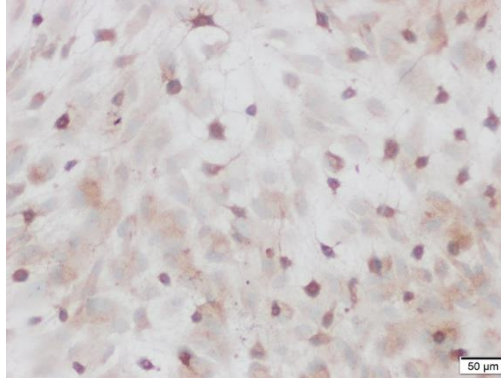
ZA+BOR



ZA+MKH



ZA+MKH+BOR



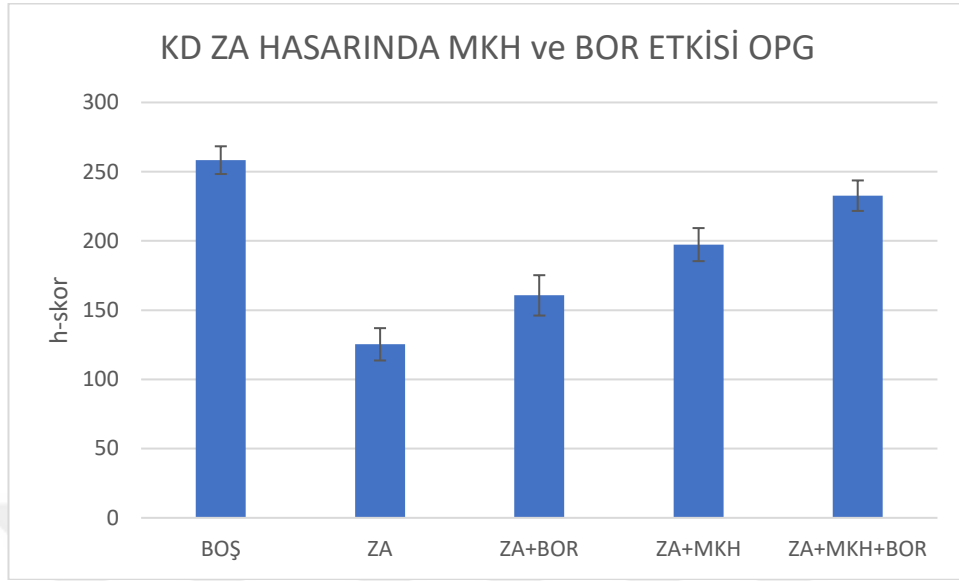
Resim 14 OPG immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı (Tablo 15). KONTROL grup ile ZA grubu, KONTROL grup ile ZA+BOR grubu , KONTROL grup ile ZA+MKH grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında KONTROL grupta her

üçünde de daha fazla boyanma olduğu görüldü bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). KONTROL grup ile ZA+BOR+MKH grubu karşılaştırıldığında boyanma açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$). ZA ile ZA+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA ile ZA+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$) ZA ile ZA+BOR+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$).) ZA+BOR ile ZA+MKH grupları birbiriyle karşılaştırıldığında ZA+BOR grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+BOR grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA+MKH grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$).

Tablo 14 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı.

Gruplar	Nokta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	Medyan
KONTROL	3	258.33	10.017	5.783	259.00
ZA	3	125.33	11.676	6.741	123.00
ZA+BOR	3	160.67	14.572	8.413	156.00
ZA+MKH	3	197.33	11.930	6.888	192.00
ZA+MKH+BOR	3	232.67	11.015	6.360	232.00



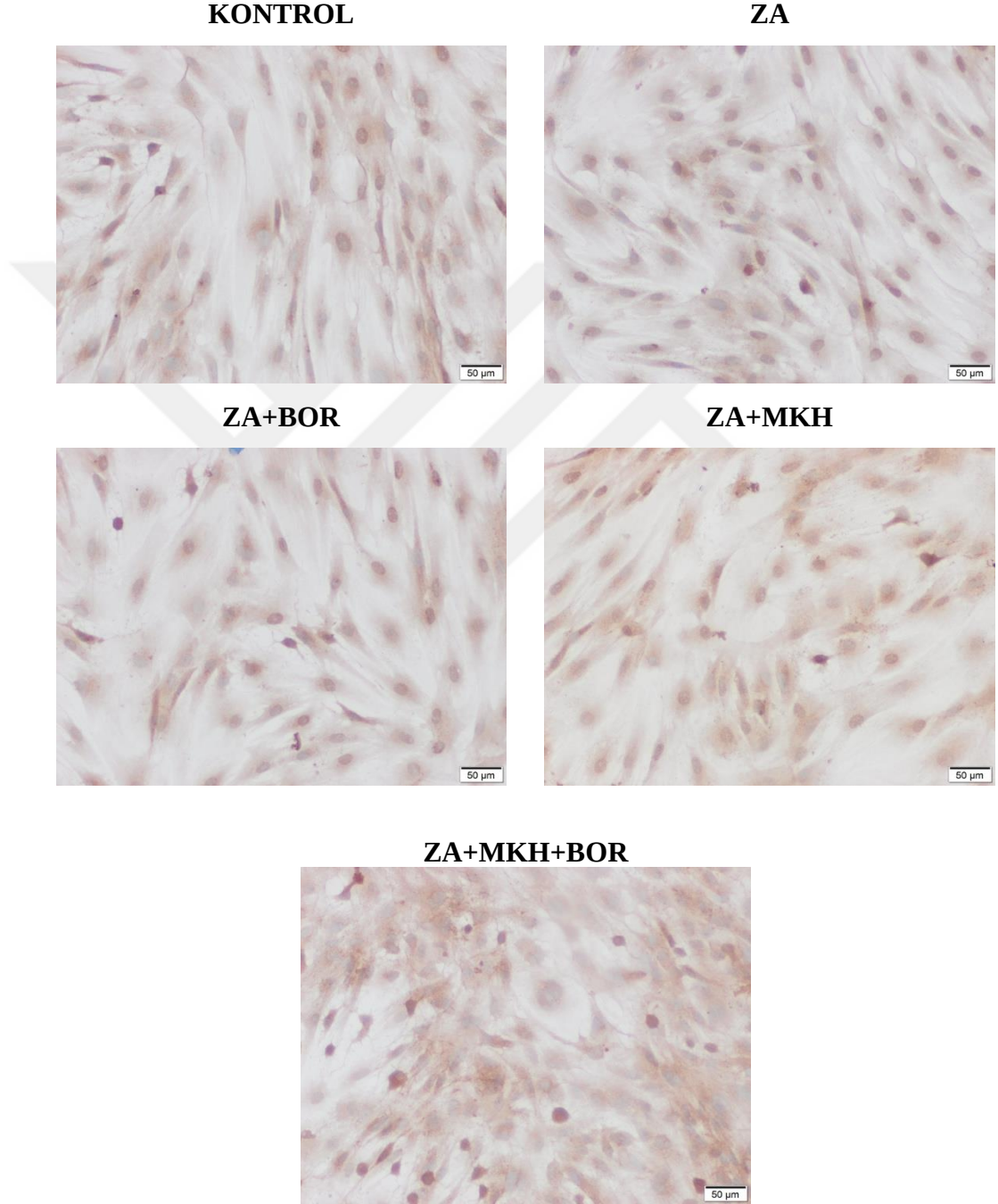
Şekil 24 OPG immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

Tablo 15 OPG immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KONTROL ile ZA	133.00	19.295 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+BOR	97.667	14.169 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+MKH	61.000	8.850 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+MKH+BOR	25.667	3.724 ns	P>0.05
ZA ile ZA+BOR	-35.333	5.126 *	P<0.05
ZA ile ZA+MKH	-72.000	10.446 ***	P<0.001
ZA ile ZA+MKH+BOR	-107.33	15.572 ***	P<0.001
ZA+BOR ile ZA+MKH	-36.667	5.320 *	P<0.05
ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR	-72.000	10.446 ***	P<0.001
ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR	-35.333	5.126 *	P<0.05

4.5.5 *RANKL* İmmunohistokimyası:

Dördüncü hafta sonunda hücrelerinin farklılaşma yönünde boyandıkları ancak bunun homojen olmayıp ve bazı hücrelerde olduğu izlendi. ZA ile azalan bu farklılaşmanın BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında arttığı gözlemlendi (Resim 15).

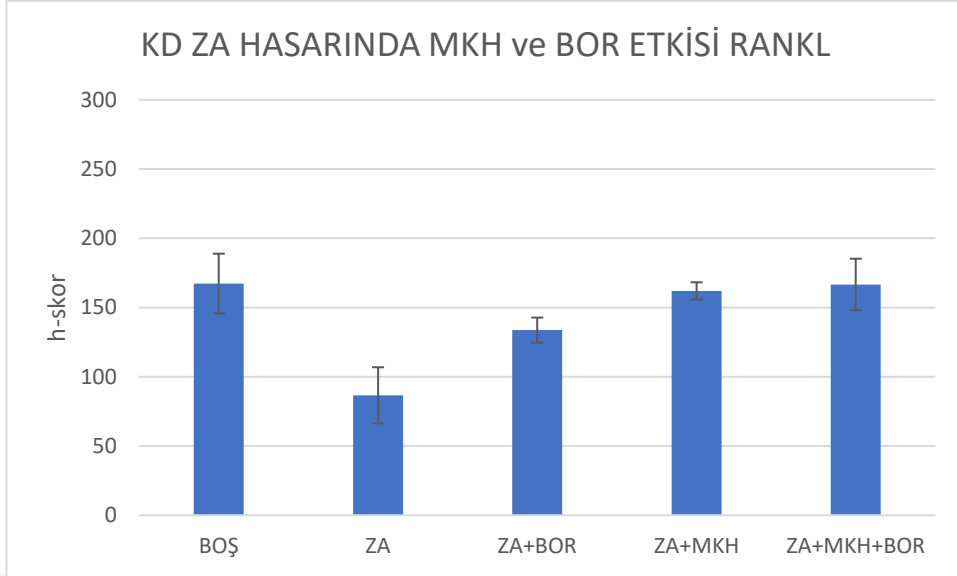


Resim 15 RANKL immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı (Tablo 17). KONTROL grup ile ZA grubu karşılaştırıldığında KONTROL grupta daha fazla boyanma olduğu görüldü bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). KONTROL grup ile ZA+BOR, ZA+MKH, ZA+BOR+MKH grupları karşılaştırıldığında boyanma açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$). ZA ile ZA+BOR grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$). ZA ile ZA+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.01$) ZA ile ZA+BOR+MKH grupları karşılaştırıldığında ZA grubunun daha az boyandığı görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$).) ZA+BOR ile ZA+ MKH grupları, ZA+BOR ile ZA+BOR+MKH grupları, ZA+MKH ile ZA+BOR+MKH grupları birbiriyle karşılaştırıldığında boyanma açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($P>0.05$).

Tablo 16 H-skor ile yapılan analizlerde en az boyanma ZA ile saptanırken BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha fazla ve koyu boyanma saptandı.

Gruplar	Nokta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	Medyan
KONTROL	3	167.33	21.548	12.441	169.00
ZA	3	86.667	20.207	11.667	90.000
ZA+BOR	3	133.67	9.074	5.239	130.00
ZA+MKH	3	162.00	6.245	3.606	160.00
ZA+MKH+BOR	3	166.67	18.583	10.729	172.00



Şekil 25 RANKL immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

Tablo 17 RANKL immunohistokimyasında BOR, MKH ve birlikte uygulamalarında daha belirgin boyanma olduğu izlenmiştir.

Karşılaştırma	Fark	q	P değeri
KONTROL ile ZA	80.667	8.537 ***	P<0.001
KONTROL ile ZA+BOR	33.667	3.563 ns	P>0.05
KONTROL ile ZA+MKH	5.333	0.5644 ns	P>0.05
KONTROL ile ZA+MKH+BOR	0.6667	0.07055 ns	P>0.05
ZA ile ZA+BOR	-47.000	4.974 *	P<0.05
ZA ile ZA+MKH	-75.333	7.972 **	P<0.01
ZA ile ZA+MKH+BOR	-80.000	8.466 ***	P<0.001
ZA+BOR ile ZA+MKH	-28.333	2.998 ns	P>0.05
ZA+BOR ile ZA+MKH+BOR	-33.000	3.492 ns	P>0.05
ZA+MKH ile ZA+MKH+BOR	-4.667	0.4939 ns	P>0.05

5 TARTIŞMA

Kemikteki rezorptif aktiviteyi inhibe etme özelliklerinden faydalanmak için kullanılan bifosfonatlarla ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen; osteonekrozun kesin patogenezi ve etkili tedavi yöntemi hala tam olarak belirlenememiştir. İlk kez 2003 yılında tanımlandığından beri MRONJ'nin etiyolojisi hala açıklığa kavuşturulmamıştır.⁴ Birçok vaka raporu ve çeşitli literatür incelemeleri, MRONJ'nin klinik görünümünü ve nedensel ajanlarını özetlemektedir, ancak patogenezinin kesin moleküler yolunu deşifre edememektedir. Bununla birlikte, MRONJ gelişiminin hücresel mekanizmalarını belirlemek amacıyla çeşitli in vivo ve in vitro çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalara dayanarak, iki senaryo olası görünmektedir. İlk (ve şu anda tercih edilen) senaryoda, birincil kemik enfeksiyonu, üstteki yumuşak dokulara ikincil yayılma ile patojenitenin kaynağıdır (içten dışa teori). İkinci (ve daha az olası) senaryoda, MRONJ sekonder kemik tutulumu ile birlikte yumuşak doku nekrozundan (teori dışından) kaynaklanmaktadır.

MRONJ alanındaki bilimsel araştırmalar hala ortak bir çizgiyi takip edememektedir. Henrik Holtmann ve ark.¹⁵⁵ 2018 yılında bir derleme yayınladılar, bu derlemenin amacı 2003 yılından 2017 yılına kadar MRONJ patogeneziye yönelik deneysel yaklaşımları içeren in vivo ve in vitro çalışmaların sonuçlarının, ilaçla ilişkili çene osteonekrozunun (MRONJ) araştırılması için güvenilir bir model sunup sunmadığını belirlemek içindi. Kriterlerine uyan 139 çalışmanın 87 tanesi in vivo, 46 tanesi in vitro, 6 tanesi ise hem in vivo hem de in vitro deneyler içermekteydi. Tercih edilen hayvan modellerinde sıçanlar ile ilgili çalışmalar 46 , fareler ile ilgili çalışmalar 30 , köpekler ile ilgili çalışmalar 6, domuzlar ile ilgili çalışmalar 3, koyunlar ve tavşanlar ile ilgili çalışmalar 1'er taneydi. Hücre tipini araştıran çalışmalarda, 47 adet çalışma sadece 1 hücre tipine odaklanmışken 10 adet çalışma ise birkaç hücre tipine odaklanmaktaydı . Osteoblastlar 15 çalışmada, makrofajlar 4 çalışmada, osteoklastlar 4 çalışmada, keratinositler 8 çalışmada, fibroblastlar 11 çalışmada ve insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC'ler) 5 çalışmada kendilerine yer bulmuşlardır. 4 çalışmada keratinositler ve fibroblastlar, 2 çalışmada osteoblastlar, fibroblastlar ve HUVEC'ler, 1 çalışmada osteoblastlar ve fibroblastlar, 1 çalışmada osteoblastlar ve keratinositler, 1 çalışmada osteoblastlar, keratinositler, fibroblastlar ve HUVEC'ler

son olarak 1 çalışma ise osteoblastlar ve osteoklastlar birlikte araştırılmıştır. Sadece 2 çalışmada azot içermeyen etidronat analiz edilmiştir, 44 çalışmada azot içeren bifosfonatlar kullanılmıştır, en sık kullanılan zoledronat (0.01-0.6 mg/kg) 30 çalışmada, alendronat (0.01-1 mg/kg) 14 çalışmada, pamidronat (0,01-3 mg/kg) 5 çalışmada, ibandronat (0,03-0,3 mg/kg) ve risedronat (0,1-1 mg/kg) her biri 1 çalışmada kullanılmıştır.

Biz de çalışmamızda, diş hekimliğinde yönlendirilmiş kemik yeniden yapılandırılması uygulamaları için sıçanların kafatasından alındıktan sonra kültür ortamında bulunan kemik modeline Zoledronik Asit (ZA) verip optimum kemik zayıflamasını bekledikten sonra, Mezenkimal Kök Hücre (MKH) ve Borik asit (BA) eklenmesinin hayvan ve insan uygulamaları için olası yararlarının anlaşılması amaçladık. Bu amaçla sıçan kafatası kemiğinden elde edilen halka şeklindeki kemik örnekleri kültür ortamına alınarak sonrasında ZA verilip optimum kemik zayıflamasını bekledikten sonra, kemik boşluğunun dolması şeklinde gerçekleşecek iyileşmeye MKH ve BA uygulamasının explant olarak kullanılacak kemik halkanın etkileri morfolojik, histolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle inceledik. Doğrudan deney hayvanı (in vivo) aşamasına geçmeden önce daha etik, daha az maliyetli, daha öngörülebilir uygulamalar yapabilmek ve etkilerini inceleyebilmek için kültür ortamında kemik eksplantları (halkaları) ile taklit edildi. Kemik dokusu faktörü olmadan yapılmış çok fazla çalışma mevcut olmasına rağmen kültür ortamında in vivo durumu daha iyi temsil edebilmesi amacıyla kemik dokusu ve bifosfonat grubu bir ilacın birlikte kullanımı daha önce yapılmamış, özgün bir deneysel çalışmadır.

Osteoblastik farklılaşma, OK, ON, ALP, OPG ve RANKL antikorları ile mineralize kemiksi adacık oluşumu ise AK ve VK boyamaları ile gösterilmiştir.

Kemik dokusu faktörü olmadan yapılmış çok fazla in vitro çalışma mevcut olmasına rağmen kültür ortamında in vivo durumu daha iyi temsil edebilmek amacıyla sıçanların kafatasından alınan kemik dokusu kullanımını tercih ettik. Kemik halkasının kültür ortamında eksplanttan biraz daha farklı olacak şekilde kullanılması bildiğimiz kadarıyla literatürdeki ilk deneysel modeldir. İki haftalık bir zaman aralığından sonra kemikten gelen progenitör hücrelerin kontrol grubu olarak kullandığımız kemik

halkası deneysel modelinde osteojenik farklılaşmaya gitmesi ve kemiksi adacık yapması önemli bir veri olarak düşünüldü. ZA ile oluşturulan kemik halka hasarı nedeniyle iki hafta sonunda hücrelerde çoğalma, farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunun azaldığı izlendi. Dördüncü haftada ise sadece ZA uygulanan grupta az miktarda osteoblastik farklılaşma ve kemiksi adacık yapımı izlendi. Bu durumunu karşısında ise KONTROL, BOR, MKH ve BOR+MKH gruplarında hücrelerde çoğalma, farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumu daha belirgin bir biçimde gerçekleşti. ZA hasarında BOR, MKH ve birlikte kullanımlarının osteojenik farklılaşma ile ilgili parametreler olan OK, ON, OPG ve ALP oldukça anlamlı bir şekilde artarken RANKL için bu kadar anlamlı olmadı. BOR ile ZA hasarının tüm parametrelerde anlamlı etki sağladığı ortaya kondu. MKH ile ZA hasarının tüm parametrelerde daha anlamlı etki sağladığı saptandı. ZA hasarında birlikte kullanımları açısından BOR ve MKH hem yararı hem fonksiyonunu tüm parametrelerde oldukça anlamlı olarak arttırdığı bulundu.

Bifosfonatların kandaki ortalama ömürleri kısa olmasına rağmen (30dakika - 2saat) kemikle bir kez birleştikleri takdirde ortalama 10 yıl bozulmadan kalabilirler.⁸¹ Bifosfonatlar özellikle aktif remodelasyon olan alanlarda hidroksiapatit kristallerine çok kolay bağlanırlar. Kemik yüzeyinde bağlı oldukları bu alanlardan dış ortama salınırlar ve osteoklastlar tarafından absorbe edilirler. Osteoklastın hücre içinde kolesterol üreten mevalonat yolunun anahtar enzimlerinden biri olan farnesildifosfatın sentezini inhibe ederler. Bunun sonucunda da osteoklastın kemik rezorpsiyonunu oluşturabilmesi için gereken yüzey özellikleri oluşamaz ve osteoklastik aktivite baskılanmış olur . Bifosfonatlar olgunlaşmış osteoklastlara olduğu gibi olgunlaşmamış ve öncü osteoklast hücrelerine de etki gösterebilirler. Bu sayede kemikte rezorptif aktivite ve buna bağlı olarak yenilenme miktarında azalmaya neden olurlar. Bifosfonatların osteoblastlara olan etkisi osteoklastlara olan etkisi kadar iyi açıklanamamıştır. Aminobifosfonatlar terapatik dozlarda osteoblast diferansiasyonunu ve kemik depozisyonunu stimule ederler. Yüksek dozlarda ise bifosfonatlar, osteoblastlara sitotoksik etki göstererek apoptozislerine neden olurlar. ⁶⁷ Biz de çalışmamızda osteoblastlar üzerinde yoğunlaştık ve ZA verilen kemik modellerinde osteoblastik hücre çoğalmasının ve farklılaşmanın azaldığını tespit ettik.

Osteonekrozun nasıl başladığı araştırıldığında; kullanılan ilacın etkinliği, kullanım sıklığı ve süresi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Çünkü serum ölçümleri osteonekroz riskini belirlemede önemli olabilmektedir. Örneğin; zoledronik asit aylık 4 mg'lık dozlar halinde alındığında 3 ila 12 ay içinde kemik ekspozu oluşturabilmektedir. Fakat pamidronik asidin aynı etkiye sahip dozunun kemiği ekspoze etmesi için 10 ay gibi bir süre gerekmektedir. Alendronik asitte ise kemik ekspozu için 2 yıl gibi bir süre gerekli olabilmektedir.¹⁵⁶ Onkoloji hastalarında görülen MRONJ vakalarının çoğunluğu (%94) yüksek dozlarda intravenöz bifosfonat kullanımına bağlı (primer olarak zoledronik asit ve pamidronat) görüldüğü bildirilmiştir.¹⁵⁷ Biz de çalışmamızda potansi en yüksek bifosfonat grubu ilaç olduğu için zoledronik asiti tercih ettik.

Bifosfonat grubu ilaçların osteoblastlar üzerindeki etkileri tartışmalıdır; çok düşük konsantrasyonlarının in vitro olarak osteoblastları indüklediği görülürken¹⁵⁸ daha yüksek konsantrasyonlarının osteoblastların hareket etme yeteneğini ve hücre canlılığını azalttığı görülmüştür.¹⁵⁹

Naidu ve ark.⁶⁷ yaptıkları hücre kültürü çalışmasında sıçan kalvaryasından elde ettikleri osteoblastlara, zoledronik asit ve alendronatın farklı konsantrasyonlarını uygulayarak hücre canlılığı ve fonksiyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışma neticesinde bifosfonat grubu ilaçların konsantrasyonları arttıkça hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı ve bifosfonatların yüksek konsantrasyonlarında osteoblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin varlığı kanıtlanmıştır. Biz de yaptığımız çalışmada zoledronik asitin osteoblastlar üzerindeki hücre canlılığını ve fonksiyonunu azalttığını gözlemledik.

Monero ve ark.¹⁶⁰ yaptıkları bir çalışmada insan osteoblastlar hücreleri kullanarak, alendronatın teapotik dozlarda hücreler üzerine canlılık, çoğalma, kollajen sentezi ve mineral depolama kapasitesi açısından değerlendirmişlerdir. Çalışmada 10^4 mol/L konsantrasyonun üzerindeki alendronat uygulamalarında hiç canlı hücreye rastlanmadığı ve dozdan bağımsız olarak tip 1 kollajen sentezinin azaldığı gösterilmiştir.

Huang ve ark.¹⁶¹ yaptıkları bir çalışmada zoledronik asitin farklı konsantrasyonlarda preosteoblastik hücrelerin canlılığını ve apoptozunu incelemişlerdir. Çalışmanın neticesinde 10 μM ' nin üzerindeki dozların, hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını ayrıca apoptoza neden olduğunu göstermişlerdir.

Di Vito ve ark.¹⁶² yaptıkları bir çalışmada in vivo koşullara benzeyen deneysel bir ortam hazırlayarak periodontal ligament kök hücrelerinin (PDLSC'ler) in vitro bir modelde zoledronik asidin (ZA) biyolojik etkilerini değerlendirmişlerdir. PDLSC'ler, 0.1 ila 5 μM arasında değişen farklı ZA konsantrasyonları ile etkileşimlerini ölçmüşlerdir. ZA maruziyetinin etkileri, 3-[4,5-Dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), hücre döngüsü analizi, apoptoz tespiti ve immünofloresan yoluyla hücre canlılığı değerlendirilmiştir. ZA' e maruz kalan PDLSC'lerin osteojenik potansiyelini araştırmak için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), alkalın fosfataz aktivitesinin kolorimetrik tespiti ve Alizarin Red S boyaması yapılmıştır. MTT analizi, 3 ve 6 gün boyunca ≥ 1.5 μM ZA konsantrasyonuna maruz kalan PDLSC'lerin canlılığının, kontrol grubuna önemli ölçüde düşük ($P < 0.001$) olduğunu gösterilmiştir. Apoptotik hücre yüzdesi, 4 gün boyunca 2 μM ($P < 0.01$) ve 5 μM 'de ($P < 0.001$) ZA' e maruz kalan PDLSC' lerin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek bulmuşlardır. Ayrıca, ZA tedavisi (3 gün), G0/G1 fazındaki hücrelerin oranında bir artış ve S fazındaki hücrelerin oranında bir azalma ile hücre döngüsü dağılımındaki değişiklikleri açıklamıştır. PDLSC'lerin ZA'e kronik olarak maruz kalması (7 günden uzun) ALP, RUNX2 ve COL1 (Kollajen tip 1) genlerinin test edilen tüm konsantrasyonlarda azaldığı ve 7 ve 14 günlük tedaviden sonra bildirilen ALP seviyesinin de azalmış aktivitesi gösterilmiştir. 14 günlük tedaviden sonra hücre dışı matriste azalmış Col1 birikimi rapor edilmiştir. Sonuç olarak, 1 μM ZA'e kronik maruz kalan kültür ortamındaki PDSCL' lerde osteojenik farklılaşmada önemli bir azalmaya neden olurken, PDLSC'lerin canlılığını bozmak ve apoptozu indüklemek için ≥ 1.5 μM ZA konsantrasyonları olması gerektiği bildirilmiştir.

Huang ve ark.¹⁶³ yaptığı bir çalışmada farklı ZA konsantrasyonlarının MC3T3-E1 fare preosteoblast hücre hattı hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. ZA' nın MC3T3-E1 hücrelerinin canlılığı, apoptozu, farklılaşması ve

olgunlaşması üzerindeki etkisini ve bununla ilgili moleküler mekanizması incelenmişlerdir. ZA'nın >10 uM konsantrasyonlarda hücre canlılığında ileri derecede inhibisyona neden olduğu ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. ZA'nın <1 uM konsantrasyonlarda kemik nodül oluşumunu inhibe ettiği ve alkalik fosfataz aktivitesini azalttığını bulmuşlardır. Western blot analizlerinin sonuçlarına göre, ZA'nın osteojenik farklılaşma ile bağlantılı genlerin ve proteinlerin ekspresyon seviyelerini aşağı regüle ettiğini göstermişlerdir. Kemik morfojenetik proteini-2'nin (BMP-2) ekspresyonunda, hücre dışı sinyalleri düzenlenmesinde rol alan kinaz 1/2 ve p38 ekspresyonunda ve fosforilasyon seviyelerinin aşağı regülasyonuna neden olduğunu ortaya koymuşlardır. ZA'nın bu olumsuz etkilerinin konsantrasyonla doğru orantılı olarak ilerlediği gözlenmiştir. Özetle, daha yüksek konsantrasyonlarda ZA'nın osteoblastlara karşı sitotoksiteyi indüklediğini ve daha düşük konsantrasyonlarda ZA'nın BMP-2 ekspresyonu azalttığı, böylece osteoblast farklılaşmasını baskıladığını ileri sürmüşlerdir.

Lindtner ve ark.¹⁶⁴ yaptığı bir çalışmada yaşlı, kadın ve osteoporotik hastalardan izole edilen insan kemik iliği stromal hücrelerin (hBMSC'ler) kemik oluşturan osteoblastlara gelişimi için aminobisfosfonatların potansiyelini değerlendirmişlerdir. Zoledronat ile desteklenmiş osteojenik ortam ile tedavi edilen hBMSC kültürleri, tek başına osteojenik ortamda kültürlenmiş hücrelere kıyasla 3 hafta sonra Alizarin kırmızı boyamasında önemli bir artış gösterdiği sonucuna varmışlardır. Sunulan sonuçlar ilk kez osteoporotik hBMSC'lerin aminobisfosfonat tedavisinin osteoblast oluşumu ve ardından mineral birikimi için kapasitelerini arttırdığını ve böylece aminobisfosfonatların osteoporozda bir osteoanabolik etkiye sahip olduğu kavramını desteklediğini savunulmuştur.

Jin ve ark.¹⁶⁵ yaptığı bir çalışmada H_2O_2 ile indüklenen BMSC'lerde ZA tedavisi sırasında, ALP, RUNX2 ve Bglap düzeylerini önemli ölçüde arttırdığını göstermişlerdir. H_2O_2 ile indüklenen BMSC'lerde doza bağlı olarak ALP aktivitesini ve mineralizasyon kapasitesini arttırdığını da sonuçlara eklemişlerdir. H_2O_2 indüksiyonu, zoledronik asit tedavisi ile tersine çevrilen BMSC'lerde canlılığı ve artırılmış ROS seviyesini belirgin şekilde bastırdığını bulmuşlardır. ZA osteoporozun ilerlemesini hafiflettiğini, SIRT3/SOD2 yolu aracılığıyla oksidatif stresi engelleyerek

BMSC'lerin osteogenezini hızlandığını göstermişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmayla kıyaslandığında ZA etkisi bakımından çelişen sonuçlar bulunmuştur. Deneyde uygulanan ZA dozu ve süresi çelişkili sonuç bulunmasında farkı yaratan unsur olabilir, düşük dozlarda ve kısa süreli ZA uygulanması sonucunda bu sonuç çıkmış olabilir.

MRONJ' un altta yatan patogenezi net olmasa da, bazı çalışmalarda ZA tedavisinin osteoblast sayısını azaltarak, osteoblast fonksiyonunu ve kemiğin yeniden şekillenmesini engelleyerek in vivo kemik oluşumunun azalmasına yol açtığını göstermiştir.^{166,167} Bu nedenle, ZA'nın osteogenezdeki inhibe edici etkisinin, MRONJ patogenezi içinde önemli ölçüde katkıda bulunması muhtemeldir. Bununla birlikte, kemik oluşumunun ZA aracılı baskılanmasının kesin mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir. ZA'nın osteoblast gelişimi üzerindeki inhibitör etkisi ile osteogenezin inhibe etmesi böylelikle kemik oluşumunu baskılaması mümkündür.

Patntirapong ve ark.¹⁵³ yaptığı bir çalışmada osteoblast gelişiminin in vitro bir modeli olarak bir osteoblastik hücre dizisi MC3T3-E1 (MC3T3) ve mezenkimal kök hücre kullanılarak bir dizi ZA konsantrasyonunun biyomineralizasyon üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Zoledronik asidin, MC3T3 ve mezenkimal kök hücre ile matris mineralizasyonu üzerindeki etkilerini görebilmek için 0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 ve 100 uM 'de ZA ilave edilerek kültürlenmiştir. MTT tahlili ile MC3T3 ve mezenkimal kök hücre canlılığının ve proliferasyonunun değerlendirmişlerdir. Hücreler 96 oyuklu kültür plakalarında kültürlenip ve 1, 3 ve 7 gün boyunca Zoledronik asit ile muamele edilmiştir. Sonuçta, MC3T3 için 0.01'den 100 uM'ye ve MKH için 10'dan 100 uM'ye ZA maruziyeti ile hücre canlılığında doza bağlı bir düşüş gösterdiği belirtilmiştir. MC3T3 ve MKH' de ZA ile indüklenen mineralizasyon inhibisyonunun doğrudan sitotoksositeye bağlanıp bağlanmadığını test etmek için ZA ile muamele edilmiş hücrelerin morfolojik analizi yapılmıştır. MC3T3 ve MKH, sırasıyla poligonal ve fibroblast benzeri hücreler olarak gösterilmiştir. Düşük ZA konsantrasyonları hücrelerin sayılarında farklılık olmadığı gösterilmiştir. 5-10 uM'de ZA ilavesi altında, hücreler olağan morfolojilerini değiştirmiş, hücre uzantılarını kaybetmiş ve küresel bir görünüme sahip olduğu gösterilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (50 ve 100 uM), hem MC3T3 hem de MKH buruşmuş olarak

tasvir edilmiştir ve normal formlarını tamamen kaybetmiştir dolayısıyla hücre sayısı büyük ölçüde azalmıştır. 50 ve 100 uM konsantrasyonlar sitotoksik etki için birbiriyle karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmamıştır. Biz de in vitro çalışmamızda ZA'nın kemik diski üzerindeki sitotoksik etkilerini izlemek istediğimizden 50 uM konsantrasyon dozunu kullanmaya karar verdik.

Ebert ve ark.¹⁶⁸ yaptığı bir çalışmada zoledronik asitin doğrudan sitotoksikite ve osteoblast farklılaşmasını inhibe ederek mineralizasyonun baskılandığını doza bağımlı olarak göstermişlerdir. ZA'ın 24 saatten fazla 20 ve 50 µM konsantrasyonlarda uygulandığında kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunun inhibisyonuna ve apoptozun indüklenmesine neden olduğunu göstermişlerdir.

Gelenekselleşmiş tedavi yöntemlerinin yanı sıra günümüzde MRONJ tedavisinde pek çok yeni stratejiler literatüre kazandırılmaya başlanmış ve tedavi seçeneklerinde yeni ufuklar açmaya başlamıştır. Örneğin; canlı ve nekrotik kemiği ayırt etmek için kemik floresanı kullanılabilir. ^{169,170} Operasyon sırasında kullanılan tetrasiklinle indüklenmiş kemik floresansı yöntemi, MRONJ'da etkin bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle VELscope Vx floresan lamba (yaklaşık 400-460 nm dalga boylu mavi ışık) kullanılıp canlı kemiğin nekrotik kemikten ayrımı yapıldığı ve nekrotik kemiğin daha farklı bir oto-floresan özellik gösterdiği belirtilmiştir. ¹⁶⁹⁻¹⁷¹

Trombositten zengin plazma (TZP), trombosit zengin fibrin (TZF) günümüzde MRONJ tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmaya başlandığı birçok çalışma mevcuttur. Bu maddeler içerdikleri büyüme faktörleri ve iyileşmeyi stimüle etmeleriyle ön plana çıkmaktadırlar. Lökosit zengin TZF ağız içi bakterileri de inhibe etmekte (özellikle aktinomiçes ve türlerini) bu sayede prognozu belirgin ölçüde geliştirdiği söylenmektedir. Ancak yine de osteonekrotik dokudaki iyileştirme özellikleri MRONJ evreleriyle ilişkilidir. ¹⁷²⁻¹⁷⁴

Marco ve ark.¹⁷⁵ yaptıkları bir çalışmada cerrahi olarak nekrotik kemiği çıkarılan hastalara rekombinant insan kemiği morfogenetik protein tip 2 (rhBMP-2)

uygulamasının klinik etkisini analiz etmeyi amaçlamıştır. rhBMP-2 uygulanan nekrotik alanlarda iyileşmeyi teşvik etmede faydalı olduğunu göstermişlerdir.

Freiberger ve ark.¹⁷⁶ cerrahiye ve antibiyotiklere yardımcı olarak Hiperbarik oksijen (HBO) ve ozon terapisinin MRONJ vakalarında kullanılmışlardır. HBO ve ozon terapisi, MRONJ tedavisinde yararlı olabileceğini, çünkü kemik remodelinginde yer alan redoks duyarlı hücre içi sinyal moleküllerini pozitif olarak modüle eden reaktif oksijen ve azot türleri üretebileceğinden yola çıkmışlardır. Toplam 16 hastada yapılan vaka serisi çalışmasında HBO terapisiyle lezyonların büyük çoğunluğunun mukozal örtülmeye eğilimi olduğu göstermişlerdir.

Agrillo ve ark.¹⁷⁷ Yaptığı bir vaka serisi çalışmasında cerrahi müdahalenin ardından toplam 8 seans 3 dakikayı geçmeyecek şekilde ozon terapisi ve antibiyotik uygulanan hastaların büyük çoğunluğunda belirgin histolojik ve klinik iyileşme görüldüğünü belirtmiştir.

Teriparatid, rekombinant insan paratiroid hormonunun 1-34 amino asit fragmanını içeren sentetik bir polipeptit hormonudur ve kemik oluşumunu uyaran tek osteoporoz tedavisidir. Kwon ve ark.¹⁷⁸ yaptığı bir çalışmada MRONJ hastalarında, teriparatidin doğrudan kemik oluşumunu stimüle ettiği, kemik kuvvetinin üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu ve MRONJ hastalarında iyileşmeye sebep olduğunun göstermişlerdir.

Pentoksifilin periferik ve beyin damarlarının hastalıklarında kullanılan vazodilatör bir ajandır. Tokoferol ise E vitamini türevidir. Bu iki maddenin MRONJ tedavisinde kombine kullanılmasının araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Owosho ve ark.¹⁷⁹ yaptığı çalışmada multipl miyeloma veya metastatik kemik hastalığı bulunan hastaların MRONJ'ların tedavisinde belirgin şekilde kemiğin mukoza ile örtülmesi, kemik iyileşmesinin düzelmesi ve semptomlarda düzelme görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Hokugo ve ark.⁸⁴ yaptığı hayvan deneyi çalışmasında vitamin D eksikliğinin MRONJ şiddetini ve görülme sıklığını artırdığı da bildirilmektedir .

Asidik ortamın MRONJ oluşumu için belirgin risk oluşturduğu bu yüzden de alkali ortamın MRONJ’u engelleyebileceğinin araştırıldığı Dayısoylu. ark.¹⁸⁰ yaptığı bir hayvan deneyi çalışmasında farelerin dişleri çekilip sodyum bikarbonat çekim soketlerine yerleştirilmiştir. Soketlerde MRONJ oluşmadığını bildirmişlerdir

Yukarıda bahsedildiği gibi farklı farklı tedaviler çeşitli deneylerde MRONJ’ un önlenmesi için veya tedavisi için kullanılmıştır fakat hala kesin bir çözüm bulunamamıştır. MRONJ’un tedavisi hem hastalar hem de hekimler için zorluklar içermektedir. Günümüzde ideal tedavi yöntemi bulunmaya gayret edilmektedir. Bu nedenle MRONJ’un başlamadan önlenmesi yüksek derecede öneme sahiptir. Birçok araştırmacı diş çekimi ya da diğer oral cerrahi işlemlerden önce ilacın kesilmesini önermektedir. Ancak osteoporöz tedavisi için antirezorptif ilaç alan hastalarda ilacın bırakılmasının yararlı olabileceğine dair kesinleşmiş bir kanıt bulunmamaktadır ¹⁸¹. Biz de çalışmamızda daha önceden kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri literatürde gösterilen borik asit ve mezenkimal kök hücrenin, MRONJ yapma potansiyeli en yüksek bifosfonat grubu ilaç olan Zoledronik asit ile kemik üzerinde etkilerini in vitro olarak inceledik.

Bor doğada yaygın olarak bulunan hem ametal hem metal gibi karakteristik özellik gösterebilen periyodik tabloda 3 A grubunda yer bir alan elementtir. Doğada oksijenle birleşip borat olarak hem de borik asit olarak bulunur ve vasküler bitkilerin canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan mikro besin maddesidir. Diyetle meyve, sebze ve baklagillerde bulunur .Kemik, tırnak ve saç gibi keratinizasyonu diğer dokulara kıyasla yüksek olan dokularda daha fazla bor bulunmaktadır.¹¹⁴

Borun canlı vücudunda birden fazla metabolik faaliyet üzerine etki ettiği bilinmektedir. Bor vücuda diyetle alındıktan sonra D vitamini, kalsiyum, magnezyum gibi kemik metabolizması için elzem olan bileşiklerle etkileşime girer ve miktara bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda kemikte birikir.¹²

Borun kalsiyum metabolizması ve doğal olarak da kemik metabolizması için optimum derecede faydalı olabileceği bildirilmiştir. Borun bir diğer özelliği ise antioksidan olmasıdır bu da aterosklerozun önlenmesinde yararlı olabilir.¹⁰⁰

Hayvanlardaki bor eksikliği, büyüme ve gelişmenin bozulmasına ve sağlıklı olmayan kemik gelişimine neden olur. Farelerde yapılan çalışmalarda bor eksikliğinin alveolar kemik yüzeyi ve osteoblastların aktivitesini azalmasına ek olarak borun kemik kalsiyum konsantrasyonu üzerindeki etkisiyle değil, osteoblastlar ve / veya osteoklastların varlığı veya aktivitesi üzerindeki etkisiyle kemik metabolizmasına faydalı olduğu çalışmalar sonucunda belirtilmektedir.¹²⁰

Bordan yoksun diyetle (0.1 mg/kg diyet) beslenen erkek sıçanlarla bor destekli diyetle (3mg/ kg diyet) beslenen sıçanlar bilgisayarlı mikro tomografi (Mikro-CT) ile karşılaştırıldığında bor yoksunluğunun kemik hacmi fraksiyonunu, trabeküler kalınlığı azalttığı ve trabeküler boşlukları arttırdığı görülmüştür. Mikro-CT bulguları borun kemik dayanıklılığını düzenleyen trabeküler mikroyapısı için gerekli olmasa da, bu yapı için faydalı olduğunu göstermiştir . Bor yoksunluğunun aynı zamanda diş çekimi sonrası hemen başlayan alveolar kemik tamirini de bozduğu bulunmuştur. Bor içeren diyetle beslenen fareler (3mg/kg) daha az bor içeren diyetle beslenen farelerle (0.07mg/kg) karşılaştırıldığında, diş çekildikten 14 gün sonra kemik oluşumundaki fark edilir azalmadan dolayı alveolar kemik iyileşmesinde bozulma görülmüştür.¹¹⁸

Borun, enflamatuvar cevap üzerindeki faydalı etkisini araştıran bir çalışmada, osteoartrit olduğu radyografik olarak kabul edilen 20 hastaya, 8 hafta boyunca günde 6 mg bor ya da plasebo verilmiştir. Bor desteği alan artritli bireylerde subjektif olarak eklemlerde şişliğin azaldığı, sınırlı hareketlerde gelişme olduğu ve ağrı için daha az analjezik ihtiyacı olduğu rapor edilmiştir.¹⁸²

Bor eksikliğinin, kemikteki kalsiyum ve fosfor konsantrasyonlarını belirgin şekilde etkilemediği; ancak osteoblast ve osteoklast aktivitesini, farklılaşma ve kemik formasyonu ile ilişkili minerallerin (magnezyum, potasyum, bakır ve çinko vb.) konsantrasyonunu etkilediği bildirilmiştir.¹⁰²

Dokuz hafta boyunca bordan yoksun (0.07 mg/kg) diyetle beslenen fareler, bor eklenmiş (3 mg/kg) diyetle beslenen farelerle kıyaslandığında, osteoblast yüzeyinin azaldığı ve alveolar kemiğin hem lingual, hem de bukkal yüzeyinde pasif kemik oluşum yüzeyinin arttığı rapor edilmiştir.¹⁸³

Sağlam ve ark.¹⁸⁴ kronik periodontitis hastalarında cerrahi olmayan periodontal tedaviye ek olarak subgingival borik asit irrigasyonunun, klinik parametreler olan klinik ataçman seviyesi, plak indeksi, gingival indeks ve sondlamada kanamada ve dişeti oluğu sıvısındaki MMP-8 miktarında, serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla azalma sağladığını rapor etmiştir.

Borun kemik oluşumu ve tamirindeki bilinen faydalı etkileri, bor içerikli bir biyoaktif camın geliştirilmesine öncülük etmiştir. Biyoaktif cam, kemik doku mühendisliği ve doğal kemik rejenerasyonu için bir doku iskelesi olarak kullanılır. 45S5 biyocam, bor eklenerek modifiye edildiğinde kemik oluşumu artırdığı görülmüştür.¹⁸⁵

Demirer ve ark.¹⁸⁶ ligatür bağlanarak deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlara, ağız yoluyla 11 gün boyunca günlük 3mg sistemik borik asit vermişlerdir. Sıçanları 11 gün sonra sakrifiye edip, alveoler kemikteki değişiklikleri histomorfometrik olarak, doku örneklerini ise histopatolojik olarak incelemişlerdir. Enflamatuvar hücre infiltrasyonu, osteoklast sayısı ve alveoler kemik kaybının borik asit verilen sıçanlarda, borik asit verilmeyen kontrol grubuna göre daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak sistemik borik asit uygulamasının, periodontal hastalıklı sıçanlarda periodontal enflamasyonu ve alveoler kemik kaybını azalttığını rapor etmişlerdir.

Borik asit içerikli AN0128'in periodontal hastalığın tedavisindeki etkinliğini test etmek amacıyla yapılan bir çalışmada, ligatür bağlanarak deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlarda AN0128 topikal olarak uygulanmıştır. AN0128 bor içerikli bileşiklerle tedavi edilen sıçanlarda, topikal olarak taşıyıcı ile tedavi edilen ve tedavi edilmeyen sıçanlara göre önemli derecede daha az kemik kaybı ve daha az enflamatuvar infiltrat rapor edilmiştir. Sıçanlardaki azı dişleri arasındaki alveoler kemik alanı histolojik olarak incelendiğinde, AN0128 grubunda alveoler kemik alanında % 50 kemik oluşumu gözlenmiş olup, bu sonuç alveoler kemik alanında sırasıyla % 33 kemik oluşumu gözlenen tetrasiklin ve % 40 kemik oluşumu gözlenen klorheksidin ile kıyaslanabilir bulunmuştur. Ayrıca AN0128 bor içerikli bileşiğin,

taşıyıcı ile tedavi edilen gruba göre enflamatuvar infiltratı % 42 oranında azalttığı rapor edilmiştir.¹⁸⁷

Demirci ve ark.¹⁰⁷ yaptığı bir çalışmada bazı aktif biyolojik polimerler ile sodyum pentaborat penhidrat birleştirilerek bir jel oluşturulmuş ve bu jelin sıçanlarda ikinci derece yanık yaralarının iyileşmesini sağladığını belirtmişlerdir. Bakteri, maya ve mantarlara karşı antimikrobiyal bir aktivite gösterdiği de göstermişlerdir. Kollajen, α -düz kas aktin, dönüştürücü büyüme faktörü- β 1, vimentin ve vasküler endotelial büyüme faktörü dahil olmak üzere göç, anjiyogenez ve kasılma ile ilgili protein ifadeleri jel ile tedavi edilen gruplarda önemli ölçüde arttığını da çalışmalarında göstermişlerdir. Makrofaj-spesifik antijen, yanık yaralarında yara bölgesine başlangıç makrofaj göçünün ve inflamasyon fazının azalmasının rolünü gösteren salınımlı bir ifade gösterdiğini yine aynı çalışmada belirtmişlerdir.

Chappin ve ark.¹⁸⁸ sıçanlar üzerinde yaptığı bir çalışmada diyetle alınan borun kemiğin hem içeriğine hem de fonksiyonel özelliklerine pozitif etkilerinin olduğunu sıkışma kuvvetine karşı vertebral direncin arttırdığını göstermişlerdir.

Doğan ve ark.¹⁰⁶ yaptıkları bir çalışmada toksik olmayan dozlarda bor bileşiklerinin kemik doku mühendisliğinde kalsiyum mineralizasyonunu sağlamaya yönelik klinik uygulamalar için temel öneme sahip olacağını belirtmişlerdir. Bor içeren PLGA (Poli Laktid Ko-glikolik Asit) doku iskelelerinin kemik oluşumuna etkisi incelenmiştir. Borun sıçan adipoz kaynaklı kök hücrelerinin adezyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırdığı belirlenmiştir. Biz de çalışmamızda bor ile birlikte kullandığımız adipoz kaynaklı kök hücrelerinin etkinliğinin kemik iyileşmesinde, tek tek kullanmaya nazaran daha iyi olduğunu gösterdik.

Hakkı ve ark.¹¹⁶ yaptıkları bir çalışmada borun BMP-4, BMP-6 ve BMP-7 seviyelerini düzenleyerek kemik oluşumunda önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Borun aynı zamanda osteoblastik transkripsiyon faktör olan RunX2 seviyesini de düzenlediğini belirtmişlerdir. Bor hem BMP'leri hem de RunX2 seviyelerini düzenleyen ve bu sayede osteogenezi indükleyen önemli bir elementtir. Bor içeren bileşiklerin tüketiminin aynı zamanda inflamatuvar yanıtı azalttığı, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özellikleri ile de kemik kaybını önemli ölçüde sınırlandığını

belirtmişlerdir. Borun doku mineralizasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunu ve kemik metabolizmasında yer alan önemli hormonlardan 17β -estradiol, testosteron ve D vitamininin etkilerini regüle ederek osteoblastların mineralizasyonunu indüklediğini belirtmişlerdir. Borun doku mineralizasyondaki rolü, yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinin de temelini oluşturmaktadır. Aynı çalışmada borun kollajen tip 1 (COL1), osteopontin (OPN), kemik sialoprotein (BSP) ve osteokalsin (OK) gibi çeşitli hücre dışı matriks proteinlerinin mRNA ekspresyonunu düzenlediğini de belirtmişlerdir. Bu proteinlerin toplam etkilerinin kemik hücrelerinin mineralizasyonunu, osteoblast hücrelerinin canlılığını, proliferasyonunu ve morfolojisini de arttırdığı belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da zoledronik asit eklenmiş kemik üzerine borun benzer şekilde anlamlı ve olumlu etkisi gösterilmiştir.

Gorustovich ve ark.¹⁸⁹ sıçanlarda yaptığı bir çalışmada diyetle alınan borun yetersiz olmasının, alveoler kemiğin iyileşmesinin tam olarak sağlanmadığı bildirilmiştir .Diyetle yeterli bor alan sıçanların (diyetle 3 mg/kg/gün bor), diyetle yetersiz bor olan sıçanlarla (diyetle 0.07 mg/kg/gün bor) karşılaştırıldığında, osteoblastlar sayılarında artış (sırasıyla 7. gün ve 14. gün'de %120 ve %126) meydana geldiği görülmüştür, bu da bor eksikliğinin kemik iyileşmesinde bozulmaya neden olabileceğini göstermektedir.

Pan ve ark.¹⁹⁰ tarafından yapılan bir çalışmada stronsiyum borat camının kemik rejenerasyonunda yeni nesil bir biyomateryal olarak kullanılabileceğini öne sürmektedir.

Literatürde borun, kemik ve yumuşak doku üzerine iyileştirici etkisi üzerine yapılan birçok çalışma olmasına rağmen MRONJ üzerine daha önceden yapılan in vitro ve in vivo çalışma literatürde bulunamamıştır. Bu durum bizim yaptığımız çalışmanın öncü olabileceğini göstermektedir.

MRONJ'un patafizyolojisi hala kesinliğe kavuşmamıştır, kemik remodelinginin baskılanması, antianjiogenik etki, immün yetersizlik, enfeksiyon gibi çeşitli sebepler öne sürülmektedir.¹⁹¹ MRONJ'un önlenmesine yönelik yeni ve birçok farklı tedavi alternatifi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Kök hücre uygulamaları da yeni tedavi stratejileri açısından umut verici görülmektedir.¹⁹² Son zamanlarda kök

hücreler üzerinde yapılan çalışmalar yoğunlaşmış ve kök hücre olabilme kriterleri olarak yeni kriterler ortaya konmuştur. Bu kriterlerden ilki kök hücrelerin in vitro ortamda uygun uyaranlarla uyarıldıklarında sadece kan sistemini oluşturan hücrelere değil tamamen farklı kemik, kıkırdak, kas, sinir, deri hücresi gibi farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğidir. Kök hücrelerin bu özellikleri plastisite veya transdiferansiyasyon olarak adlandırılmaktadır. İkinci kriter olarak kök hücreler canlıların vücudunda bulunan diğer hücrelerden farklı olarak kendini yenileme amacıyla bölünebilme yeteneğine sahip olmasıdır. Kök hücrelerinin sahip olduğu bu yetenekler doku rejenerasyonu konusunda araştırmacıları yeni araştırmalar yapmaya sevk etmektedir. Biz de çalışmamızda kök hücrelerin bu yeteneklerini kullanarak zoledronik asit ile uyarılmış kemik halkası deney modelinde iyileştirmeyi artırıcı etkisini inceledik.¹⁹³

Hücre-hücre , hücre-matriks, dentin-pulpa arasındaki etkileşim kök hücrelerin farklılaşması ve doku rejenerasyonu kritik öneme sahiptir. Aksel ve ark.¹⁹⁴ VEGF ve BMP-2'yi üç boyutlu bir kültür sistemi içinde kullanarak insan pulpa kök hücrelerinin farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışma fibrin jel ile entegre edilmiş mineralize olmayan dentin matriksinin, insan pulpa kök hücrelerinin anjiyogenik ve odontojenik potansiyeli arttırmak amacıyla VEGF ve BMP-2'yi serbest bırakarak insan pulpa kök hücrelerinin etkileşimine ve farklılaşmasına izin verdiğini ortaya koymuştur. Dentin türevi sinyallerin, insan pulpa kök hücrelerinin odontoblastik kökene farklılaşmasını indüklemek için gerekli olduğu belirtmişlerdir. İnsan pulpa kök hücrelerinin farklılaşması için yapılan deneysel modeller arasındaki karşılaştırmalar, dentin içeren modellerin diğer modellere kıyasla daha yüksek odontojenik belirteç ekspresyonu içerdiğini göstermiştir.

2020 yılında kültür ortamında yapılan bir çalışmada dentin diskinin bizim çalışmamızdaki kemik diskinin benzer kullanımı ile MKH üzerinde oldukça anlamlı etki yaptığı ve VEGF, TGF- β , BMP-2 ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) salınımını onlarca kat arttırdığı gösterilmiştir.¹⁹⁵

Zhu ve ark.¹⁹⁶ yaptıkları bir çalışmada küçük kemik parçalarını eksplant şeklinde kullanarak bir model geliştirmiş, MKH'lerin kültür ortamında kondrositler ve

fibroblastlarla olan etkileşimlerinden yola çıkarak kemik dokusunda da etkili olur mu sorusuna cevap aramıştır. Bu amaçla kemik iliği kaynaklı MKH'ler eksplantlarla birlikte kültüre edilmiştir. Osteojenik farklılaşmanın TGF- β 1 ve BMP- 2'nin ekspresyonuna olan etkisini araştırılmıştır. Kemik eksplantlarının, MKH çoğalması ve farklılaşmasını arttırdığı ve çoğaltılan bu hücrelerin in vivo olarak kemik iyileşmesinde tek başlarına kültür ortamında bulunan kemik iliği MKH'lerinden daha verimli olduğu göstermiştir. Kemik ve kemik iliği MKH'lerinin birlikte kültür ortamının bulunmasının kemik dokusu onarımı için kullanılacak hücrelerinin elde edilmesinde daha etkili bir yöntem olabileceğini göstermişlerdir. Kemik eksplantıyla birlikte kültürlen kemik iliği MKH'leri için TGF- β 1 ve BMP-2 ekspresyonunun, kültür ortamında tek başına kültüre edilen kemik iliği kaynaklı MKH'lerden anlamlı olarak fazla olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle kemik eksplantının bu iki büyüme faktörünü arttırdığı gösterilmiştir. Bu bulguların bize gösterdiği bizim hipotezimizdeki kemik halkası kullanımının amacını ve potansiyelini destekler niteliktedir.

Ying ve ark.¹⁹⁷ yaptıkları çalışmada borik asitin insan kemik iliği mezenkimal kök hücre (iKMKH)'lerinin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir, ve buldukları sonuç ışığında borik asitin iKMKH'lerin in vitro osteojenik farklılaşmasında etkili bir regülatör olarak düşünülmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada borik asit 1, 10 ve 100 ng/ml konsantrasyonda eklendiğinde iKMKH'lerin çoğalmasının kontrol grubu ile farklı olmadığını bulmuşlardır. Ancak 1,000 ng/ml borik asit 4, 7 ve 14. günlerde iKMKH'lerin çoğalmasını engellemiştir. Osteoblast farklılaşması sırasında erken safhada ortaya çıkan, hücre zarı ile ilişkili bir enzim olan ALP, en çok tanınan belirteçtir. 10 ve 100 ng/ml borik asit ile muamele edilen iKMKH'lerin, kontrole grubuna kıyasla daha yüksek bir ALP aktivitesine sahip olduğunu keşfetmişlerdir. Gerçek zamanlı PCR analizi ile yaptıkları değerlendirmede ALP, OK ve COL-I'in mRNA ekspresyonunun da 10 ve 100 ng/ml borik asit eklenen gruplarda arttığını göstermişlerdir. 1 ve 10 ng/ml borik asit eklenen gruplarında kalsiyum birikimleri artmış, 100 ve 1.000 ng/ml borik asit tedavi gruplarında ise kalsiyum konsantrasyonu azalmıştır.

Movahedi ve ark.¹⁹⁸ yaptıkları bir çalışmada 6 ng ve 6 μ g/ml gibi düşük dozlardaki borik asitin sıçanlardan elde edilen KMKH (Kemik İliği Mezenkimal Kök

Hücre)'lerinin osteoblastlara farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmış ve farklılaşmış KMKH'lerin hücrel ve moleküler yapısını karakterize etmeye çalışmışlardır. Çalışmada, 6 ng/ml borik asit ilave edildiğinde, farklılaştırılmış KMKH'lerin hücre vitalitesinin kontrol grubundan farklı olmadığını, 6 µg/ml borik asitin 10, 15 ve 21. günlerde hücre vitalitesini önlediğini bulmuşlardır. Bu çalışmadan çıkan sonuç, farklılaştırılmış KMKH'lerin canlılığı üzerinde 6 ng/ml borik asit hiçbir etki göstermediğinden, osteoblastların borik asite KMKH'lerden daha dirençli olduğu fikrine varılabilir.

Akdere ve ark.¹⁹⁹ borik asitin, adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (YKH) osteojenik potansiyeli üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Deneyde farklı borik asit konsantrasyonları (1, 10 ve 20 µg/ml) karşılaştırılmıştır. Borik asitin farklı konsantrasyonlarında YKH'ler üzerinde toksik etkisi görülmemiştir. Her grupta hücre sayısının zamanla arttığı deney sonucunda ortaya çıkmıştır. 1. günde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1 µg/ml borik asit proliferasyonu indüklemiştir. 7. güne kadar kontrol ve borik asit grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. 7. günde ise tüm borik asit grupları canlı hücre sayısı bakımından kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ve 1 µg/ml borik asit grubu diğer gruplara göre daha etkili bulunmuştur. Osteojenik hücrelerin Col1A1 (Kollajen Tip1 Alfa 1), RunX2 ve ON gen ekspresyonları RT-PCR ile görüntülenmiştir. 20 µg/ml borik asit konsantrasyonu 7. günde Col1A1 ekspresyonunu hızlandırmıştır. Col1A1'in ekspresyonu, 14. günde 20 µg/ml borik asit grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazladır. 21. gün, Col1A1 ekspresyonu, 10 µg/ml borik asit grubunda, kontrol grubuna ve 1 µg/ml borik asit grubuna göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. RUNX2 ekspresyonunun 7, 14 ve 21. günlerde 20 µg/ml borik asit grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu belirtmiştir. 7. günde, RUNX2 ekspresyonu, 1 µg/ml borik asit grubuna kıyasla 20 µg/ml borik asit grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. 21. günde, 10 ve 20 µg/ml borik asit uygulanan gruplarda, kontrol grubundan ve 1 µg/ml borik asit grubundan daha fazladır. ON ekspresyon seviyeleri tüm gruplar için 7 ve 14. günde istatistiksel olarak anlamlı değildir. 21. günde ise 10 µg/mL borik asit grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksektir. Ayrıca 10 µg/ml borik asit grubu, 1 µg/ml borik asit grubuna kıyasla da daha yüksek sonuç vermektedir.

Deneyin sonuç kısmında araştırmacılar, kültür ortamında YKH'lerin osteojenik farklılaşması ve proliferasyonu için borik asitin en etkili konsantrasyonunun belirlenmesinin henüz mümkün olmadığına karar vermişlerdir. Ayrıca, borik asitin YKH'lerin osteojenik farklılaşmasını teşvik ettiğini net bir şekilde göstermişlerdir. Yüksek konsantrasyonlarda bile, borik asitin hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada 6 µg/ml mikrogram düzeyi borik asit kullanıldı ve borik asitin, hem zoledronik asit ile muamele edilmiş kemik üzerine hem adipoz kaynaklı kök hücre üzerine olumlu etkisi ve de toksik etkisi açısından benzer sonuçlar görüldü. Bizim çalışmamızda borik asitin kültür ortamında toksik etkisi görülmedi. Birçok yayında, borik asitin kullandığımız dozlarda MKH'ler ve kemik için toksik olmayan olumlu etkileri gösterilmiştir, bizim çalışmamızda zoledronik asit ile muamele edilmiş kemik yüzeyi için de aynı şekilde destekler niteliktedir.

MRONJ' un tedavisinde klasik yöntemler bazı durumlarda yetersiz ve başarısız kalmaktadır. MRONJ daha oluşmadan yapılan koruyucu tedaviler bu yüzden çok anlamlıdır. Bu nedenle osteonekroz daha oluşmadan vaskülogenez ve osteogenezin artırılması önem taşımaktadır. MRONJ lezyonlarının patafizyolojisinde osteojenik öncü hücrelerin ve endotelial progenitör hcrelerinin yetersizliği buna bağlı olarak da vasküler desteğin azlığı yapılan çalışmada ortaya konmuştur.²⁰⁰ MKH'ler osteojenik ve kondrojenik potansiyellerinin yanı sıra endotelial kök hücre ile birlikte anjiyogenez ve vaskülogeneze de katkıda bulunurlar.²⁰¹ Ayrıca MKH'lerin in vitro ortamda salgıladıkları vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) de vaskülogeneze yardımcı olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir.²⁰²

Kemik iliği kaynaklı MKH' lerin osteojenik potansiyellerinin rekonstrüktif kemik cerrahisinde çok faydalı ve anlamlı olduğu yapılan çalışmalarda bahsedilmiştir.^{203,204}

MKH'lerin MRONJ tedavisinde ilk olarak lezyon içerisine tedavi edebilme amacıyla konulmaları Cella ve ark.²⁰⁵ tarafından 2011 yılında gerçekleştirilmiştir. Konservatif tedavinin yetersiz olduğu ve nekroz alanının giderek yayıldığı bir hastada

kemik iliği kaynaklı MKH intralezyonel olarak enjekte edilmiş ve hastanın takibinde iyileşme görüldüğü rapor edilmiştir.

Kikuri ve ark.²⁰⁶ yaptıkları bir deneyde, MRONJ oluşturulan farelerde MKH'lerin infüzyon yoluyla etkilerini değerlendirmişlerdir. Değerlendirme notunda MKH'lerin osteonekrozu engelleyip MRONJ oluşturulan farelerin iyileştiğini söylemişlerdir. Bu iyileşmenin olası sebebinin MKH'lerin interlökin 17 üreten T helper hücrelerinin inhibisyonu ve T regülatör hücrelerin artışı yoluyla gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir.

Ogata ve ark.¹⁹² yaptıkları bir çalışmada, ratlara bifosfonat verip sonrasında diş çekimi yapmışlardır. Deney grubuna MKH sekretomu (MKH-CM) intravenöz olarak vermişlerdir. Yara iyileşmesini klinik, histolojik ve radyografik açıdan değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucunda diş çekimi bölgesinde iyileşme açısından olumlu sonuçlar bildirmişlerdir. Bu durum sonucunda MKH-CM' nin antiapoptatik ve antiinflamatuvar etkisinin kemik remodelingini düzenlediği ve MRONJ' un tedavisinde teröpatik etkisinin olduğunu düşünmüşlerdir.

Biyomühendislik ve doku rejenerasyonu alanındaki teknolojik gelişmeler borik asit kullanımını daha yaygın bir hale getirmiştir. Borik asit emdirilmiş nanotüplerin MKH'lerin osteojenik olarak farklılaşmasında, hücrelerin tutunmasında ve migrasyonu tetiklemede ideale yakın bir matriks oluşturduğu ve hücrelerin oldukça yüksek miktarda protein salgısı yaptığı saptanmıştır. Borik asit içerikli nanotüp kullanımı MKH'lerin erken safhalarda bir osteoblast belirteci olan ALP'yi ve geç safhalarda bir osteoblast belirteci olan OK'yı kontrol gruplarına kıyasla daha fazla eksprese etmesini sağlamıştır.²⁰⁷

Kalsiyum vücutta depolanırken özellikle kemik dokularını seçer. Alirazin Kırmızısı ve Von Kossa boyası , hücre içindeki kalsiyum, kalsiyum bonding proteinler ve proteoglikanları belirlemek için kullanılır. Osteoblast hücrelerinin görevleri arasında kalsiyum fosfat tuzlarının oluşumu ve mineral birikimi de bulunmaktadır. Movahedi ve ark.¹⁹⁸ yaptıkları bir çalışmada borik asitin sıçan KMKH'lerinin osteoblastlara farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Farklı borik asit konsantrasyonlarında KMKH'lerin mineralizasyonu 5. günde başladığını

göstermişlerdir, deneyde ölçüm için kullandıkları AK ve kalsiyum konsantrasyonlarının kantitatif analizi, kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Kontrol grubunda ise mineralizasyonun 10. günde başladığını bildirmişlerdir.. Borik asit varlığı, kontrol grubuna kıyasla başlangıç günlerinde ve 10. günde istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmış, ancak 15. günde mineralizasyon aynı seviyelere ulaşmıştır.

Taşlı ve ark.²⁰⁸ yaptıkları bir çalışmada iDGKH (insan diş germi kök hücre)'lerin osteojenik farklılaşmasını bekledikten sonra mineralizasyon sentezini göstermek için, NaB ile indüklenen hücreler ile 2 haftalık kültür sonrası VK boyaması yapmışlardır. Mineralleşmenin NaB ile indüklenen hücreler üzerinde kontrol grubuna kıyasla daha istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu göstermişlerdir.

Hakkı ve ark.¹¹⁶ yaptıkları bir çalışmada pre-osteoblastik hücrelere borik asit uygulayarak mineralizasyona etkisini incelemişler ve VK boyaması ile mineralizasyonu ölçmüşlerdir; kontrol grubu ile kıyaslandığında, borik asit uygulanan gruplarda artan mineralleşmiş nodüller gözlenmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır.

Ying ve ark.¹⁹⁷ yaptıkları bir çalışmada borik asitin iKMKH üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir ve VK boyaması ile 21. günde mineral birikimini ölçmüşlerdir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 1 ve 10 ng/ml borik asit ile muamele edilen gruplarda kalsiyum birikiminin daha fazla gösterdiğini bildirmişlerdir. 100 ve 1,000 ng/ml borik asit uygulanan gruplarda ise kalsiyum birikiminin daha az olduğunu bildirmişlerdir.

Li ve ark.²⁰⁷ yaptıkları bir çalışmada iSDKH (İnsan Süt Dişi Kök Hücreleri)'den osteoblastik farklılaşmayı değerlendirmişlerdir. Zn borat, Mg borat veya borik asit içeren ve içermeyen çeşitli kitosan yapı iskelelerinde kültürden sonra AK boyaması yapmışlardır. Kalsiyum biriken bölgeler farklılaşma süresince tüm gruplarda kontrol grubuna göre sürekli artış göstermiştir. Zn borat, Mg borat ve borik asit içeren gruplarda kalsiyum birikimleri saf kitosan iskelesine göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha fazla bulmuşlardır.

Zhang ve ark.²⁰⁹ yaptıkları bir çalışmada vasküler endotel hücrelerinin osteojenik farklılaşmadaki rolünü değerlendirmişler, osteojenik ve vasküler endotel hücre tabakalarından, çift tabakalı hücre kompleksleri geliştirmişlerdir. Endotelyal hücre tabakasını kaplayan osteojenik kültür ortamının, daha mineralize bir kemiksi dokuya sahip olduğu AK ve VK boyaması sonucu göstermişlerdir.

Berberi ve ark.²¹⁰ yaptıkları bir çalışmada AK ve VK histokimya boyamaları ile belirlenmiş kemiksi dokunun immünohistokimyasal belirteçler ile doğru orantılı bir şekilde ilerliyor olması sinüs membranını ilgilendiren durumlarda da kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada kullandığımız AK ve VK histokimyasal boyamalar hem kullandığımız immünohistokimyasal belirteçlerle hem de literatürdeki bulgularlar uyumlu bulundu.

Osteoblastik farklılaşmada MKH için kullanılan önemli belirteçlerden bazıları OK, ON,ALP, OPG, RANKL çeşitli yayınlarda hücre davranışını etkileyen yönleriyle incelenmiştir.^{199,211} Kemikleşmede MKH'lerin agregasyonunun ardından sırasıyla kondrosit ve osteoblastlara farklılaşırsa endokonral kemikleşme şeklinde meydana gelir. Eğer kemikleşme MKH agregasyonu sonrası MKH direkt olarak osteoblasta farklılaşırsa membranöz kemikleşme şeklinde meydana gelir. MKH'nin osteoblastik farklılaşmasındaki esansiyel transkripsiyon faktörleri RUNX2 ve SOX9 dur. Kemikğin remodeling esnasında dinamik bir süreç geçirir, MKH'dan farklılaştırılmış osteoblast hücreleri ile kemik formasyonunun ve osteoklast hücrelerinin indüklenmesi buna ek olarak CD34 pozitif hematopoetik progenitor esanslı osteoblastların kemik rezorpsiyonunu da indüklemesi sağlanır. MKH'nin önemli bir başka etkisi de immünomodulator etkisidir. Bu etki enflamasyonun önüne geçerek kemikğin sağlıklı kalması açısından önemli bir fonksiyondur. Kemik apozisyon ve rezorpsiyonunda MKH' nin hem osteoblast gibi hem de kök hücre gibi davranması günümüzde klinik olarak kök hücre kullanımının en önemli nedenlerinden biridir. MKH' nin hücre içi ve hücre dışı davranışındaki altta yatan moleküler mekanizmaların daha iyi kavranması klinik kullanımlarındaki sürdürülebilirliğini ve tesirini daha da arttıracaktır.²¹²

Kemik remodeling sürecinde çok farklı sitokinler yer alır. Bu süreçte rol oynayan önemli mekanizmalardan biri OPG ve RANKL ilişkisidir. Osteoblastlar da dahil olmak üzere birçok hücre tipi OPG salgılar. OPG, RANKL için bir tuzak reseptörü olarak görev alır ve pre-osteoklastın olgunlaşmasını inhibe eder. Olgunlaşmış osteoblast kemik hücreleri, osteoklast farklılaşması için kritik önem arz eden RANKL üretirler. Osteoblastlardaki meydana gelen RANKL/OPG oranı, osteoklast döngüsünü ve böylece iskelet sisteminin homeostazını devam ettirmek için önemlidir. OPG ve RANKL oranı ve döngüsü kemik yara iyileşmesi ve yeni kemik oluşumu için önemlidir. Kemik oluşumunu immunohistokimyasal olarak inceleyebilmek için OPG ve RANKL değerli belirteçlerdir.²¹³ Biz de çalışmamızda OPG ve RANKL belirteçlerinden immunohistokimyasal kit kullanarak yararlandık.

Sumida ve ark.²¹⁴ yaptıkları bir çalışmada, deneyde kullanılacak farelerin osteoblast hücrelerinin kültüre edildiği kemik defekti modelinde, yeni kemik oluşumunda TZP'nin rolü değerlendirilmiştir. Kemik hücrelerinin TZP ile muamele edilmesinden sonra 12. günde OPG oluşumunu artırdığı, fakat RANKL oluşumu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı dolayısıyla OPG/RANKL oranını artırdığını gözlenmişlerdir. TZP uygulanan grup, uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla OPG yoğunluğunu artırmıştır. Biz de yaptığımız çalışmada OPG oluşumunun RANKL'a kıyasla daha fazla arttığını böylece OPG/RANKL oranının da arttığını gözlemledik.

Alkalen fosfataz (ALP), osteojenik farklılaşmanın erken dönem belirtecidir ve ALP'nin ekspresyonu, osteoblastların temel biricik özelliklerinden biridir. Osteoprogenitör hücreler yeni kemik oluşumunu indüklerken, ALP aktivitesi yukarı çıkar. Osteoblastlar olgunlaşıp osteositlere farklılaşırken ALP seviyesi stabilize olur.²¹¹

Ying ve ark.¹⁹⁷ yaptıkları bir çalışmada ALP seviyesini incelemişlerdir, 10 ve 100 ng/ml borik asit eklenen iKMKH'lerin, kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede ALP aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir. Gerçek zamanlı PCR kullanarak ALP ekspresyonunun 10 ve 100 ng/ml borik asit gruplarında kontrol grubuna kıyasla arttığını göstermişlerdir.

Taşlı ve ark.²⁰⁸ yaptıkları bir çalışmada iDGKHlerin NaB'li ve NaB'siz ortamdaki osteojenik farklılaşmalarını incelemişlerdir ve 14 günün sonunda NaB ile tedavi edilen grubun daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiğini keşfetmişlerdir.

ALP ekspresyonuna eksozomların etkisini araştıran bir başka makalede kemik iliği ile çene kemiği MKH'leri kıyaslanıp AK boyaması, ALP ve osteojenik gen ekspresyonları incelendiğinde, çene kemiği MKH'lerinin daha etkin ve verimli bir şekilde osteogenezi sağladığı in vitro ve in vivo örneklerle gösterilmiştir.²¹⁵

Osteokalsin kemik matriksinin kollajen olmayan, sentezi osteoblast, odontoblast ve kondroblastlar tarafından yapılan kemik dokusuna spesifik bir proteindir. Kemikte ekstraselüler matriksin içinde bulunur ve osteoblastik aktivitenin spesifik bir belirteçidir.²¹⁶ Serum osteokalsin seviyesinin Paget, hipertiroidi ve hiperparatiroidi gibi kemiğin yeniden yapılanmasının arttığı hastalıklarda yükseldiği; steroid tedavisi, hipoparatiroidi ve hiperkalsemi gibi kemik yeniden yapılanmasının azaldığı durumlarda ise düştüğü bildirilmiştir.²¹⁷ Osteokalsin kemik matriks mineralizasyonunda katılarak remodeling safhasında rol alır. Literatürdeki bilgilerin bize söylediğinden yola çıkarak osteokalsin değerlerinin artmasının yeni kemik yapımı ile doğru orantılı olduğu ve yeni kemik yapımı gerçekleşen bölgelerde osteokalsin seviyelerinin yükselmesi gerektiği beklenmektedir. MRONJ gelişim basamaklarını anlamak ve değerlendirmek adına bifosfonatların osteoblastlar ve buna bağlı olarak yeni kemik oluşumu üzerindeki etkilerini belirlemek kritik önem arz etmektedir. MRONJ üzerine yapılan çalışmalar ışığında bifosfonatların osteoblastların canlılığını, proliferasyonunu, migrasyonunu, fonksiyonunu ve mineral depolama kapasitesini azalttığı görülmüştür. Bifosfonatlar osteoblastların apoptozuna neden olur ve sitotoksik etki gösterirler. Bu etkilerin sonucunda yeni kemik oluşumu ve kemik iyileşmesi olumsuz yönde etkilemektedir.

Bifosfonat grubu ilaçlar osteoblastlarca üretilen kemik proteinlerini de inhibe etmektedirler. Bolland ve ark.²¹⁸ yaptıkları bir çalışmada zoledronik asit kullanan 43 hastanın 3 yıl boyunca serum osteokalsin seviyelerini incelemişlerdir. İntravenöz olarak sadece 2 doz uygulanan zoledronik asitin, serum osteokalsin seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşürdüğünü göstermişlerdir.

Gasser ve ark.²¹⁹ yaptıkları bir çalışmada overektomili ratlarda, zoledronik asidin kortikal ve spongiyöz kemikteki uzun dönem etkilerini incelemişler ve serum osteokalsin seviyesinin belirgin derecede düşme eğilimli olduğunu gözlemlemişlerdir

Basso ve ark.²²⁰ yaptıkları bir çalışmada bifosfonat grubu ilaçların osteoblast kemik hücresi üzerindeki sitotoksik etkisinin osteonekroz gelişmesinde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Osteoblastlar üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada ise zoledronik asitin osteoblast tarafından salgılanan alkalen fosfataz ve osteokalsinden sorumlu genlerin ekspresyonunu inhibe ederek osteoblast farklılaşmasını azalttığını gözlemlemişlerdir. Biz de yaptığımız çalışmada benzer sonuçlara ulaştık.

Liu ve ark.²²¹ yaptığı bir çalışmada iSDKH'den en fazla OK ekspresyonunu 21 günlük kültürden sonra Zn borat örneklerinde belirlemişlerdir. Bununla birlikte borik asit tüm deney gruplarında en düşük dozunda bile osteoblastik farklılaşmayı indüklemiştir.

Hakkı ve ark.¹¹⁶ yaptığı bir çalışmada tüm zaman aralıklarında 10, 100 ve 1000 ng/ml borik asit konsantrasyonunun kültür ortamında OK ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttırdığını göstermişlerdir.

Ying ve ark.¹⁹⁷ yaptığı bir çalışmada gerçek zamanlı PCR kullanarak OK ekspresyonunun 10 ve 100 ng/ml borik asit gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığını göstermişlerdir.

Li ve ark.²¹¹ yaptıkları bir çalışmada Boron nitride nanotubes (BNNT) katmanları ile MKH'ler arasındaki etkileşimi ölçmüşlerdir. 2 haftalık kültürden sonra BNNT katmanlarındaki MKH'ler, kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artmış OK protein konsantrasyonu saptanmıştır.

Aslan ve ark.²²² yaptıkları bir çalışmada osteojenik aktiviteyi arttırmak için PBAT (Poli butilen adipat-ko-tereftalat)iskeleler yapmışlardır. Yapı iskelelerindeki iKMKH'lerin daha yüksek OK seviyesi gösterdiğini ve borik asit ilavesinin mineralizasyonu anlamlı şekilde arttırdığı sonucunu bulmuşlardır. Çalışmamızda zoledronik asit eklenen kemik halkasında osteoblastik aktiviteyi azaltarak OK

ekspresyon seviyesinin azaldığı, MKH ve borik asit eklenmesinin ardından ise OK ekspresyon seviyesinin arttığı bulunmuştur, bu durum literatürdeki diğer çalışmalarla da uyumludur.

Osteonektin kalsiyum bağlama kapasitesine sahip bir proteindir. ON, kemik yapımı esnasında osteoblastlar tarafından salgılanır. Henüz daha olgunlaşmasını tamamlamayan kemiklerde yüksektir ve kollajenin mineralizasyonu ile ilişkilidir. Olgunlaşma safhasını tamamlamış kemiklerde ON salgısı da azalma eğilimindedir. Turnover hızı yüksek kemiklerde, kemik iliği progenitör hücrelerinde ve kemik yapımında aktif rol alan osteoblastlarda yüksek seviyede ON salgılanır.²²³

Akdere ve ark.²²⁴ yaptığı bir deneyde borik asitin çeşitli konsantrasyonlarda YKH'lerin osteojenik farklılaşma eğilimleri üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. ON ekspresyon ölçümleri değerlendirildiğinde her grup için 7 ve 14. günlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır. ON değeri 21. günde, 10 µg/ml borik asit grubunda diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek bulmuşlardır.

HAp- kitosan-jelatin birleşiminin hücrenin tutunması, proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması anlamında ve özellikle salgıladığı maktriks proteinleri açısından 3 boyutlu biyomimetik iskele açısından ideale yakın olduğu firki ortaya atılmıştır. Klinik kullanımları gittikçe popülerleşen 3 boyutlu biyomimetik iskelelerden *Wharton's Jelly* MKH'lerin osteojenik farklılaşmasında ON de dahil olmak üzere diğer osteojenik belirteçlerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde gösterilmiştir.²²⁵

Üç boyutlu kültür ortamları kullanılarak yapılan çalışmalarda iki boyutlu kültür ortamlarına göre osteoblastlardaki ON ekspresyonunu ve diğer osteojenik belirteçlerin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği de belirtilmiştir.²²⁶ Bizim yaptığımız çalışmada immünohistokimya sonuçlarına göre ON, zoledronik asit eklenmiş kemik halkası deneysel modelinde, MKH ve borik asit etkisi altında literatüre uyumlu olarak anlamlı bir osteoblastik farklılaşmanın olduğunu gösterdi. Üç boyutlu kültür ortamı yapılarak incelenmesinin deneysel tıp anlamında daha anlamlı ve verimli veriler sunacağı fikrine varıldı.

Sıçanların kafataslarından alınıp kültür ortamına konulan kemik halkası deney modeli üzerine ZA eklenmesi, ZA' nın osteoblastlar üzerine sitotoksik etkisi ve kemik remodelingini bozmasını bekledikten sonra MKH'ler ve borik asitin eklenmesi, eklenen MKH' ler ve borik asitin osteoblastlardaki proliferasyonu ve kemik remodelingini arttırması ve bunun sonucunda ortaya çıkan sonuçlar MRONJ'un klinik uygulamalarında kullanılabilecek önemli veriler elde edilmesini sağlamıştır. Çalışmamızın önemli katkılarında biri de kemik halkasının sağladığı sinyallerin ve progenitör hücrelerin in vivo ortam için ön görülen sonuçlarıdır. Klinik ortamında rutin olarak kullanılabilecek olan borik asit in vivo şartlarda kemikten gelen progenitör hücreler ve sinyallerle karşılaşp kemik remodelingini ve osteoblastların aktifleşmesine katkıda bulunabilir. Borik asitin MKH üzerindeki anlamlı olacak şekildeki olumlu etkileri bu çalışma ile teyit edilmiştir. ZA ile muamele edilmiş kemik halkasının bu duruma katkısı sonucu açığa çıkardığımız veriler, kemik iyileşmesinde ve rejenerasyon işlemlerinde istenilen ideal tedavinin yapılabileceğini düşündürmüştür. Osteojenik farklılaşma ve kemiksi adacık oluşumunda kemik halkası ve borik asit kullanımının bizim kullandığımız proteinlerin ekspresyonları dışındaki farklı proteinlerin, Western Blot ve PCR analizleri ile değişen genlerin belirlenmesi ve değerlendirilmesi daha sağlıklı ve etkinliği yüksek tedaviler için önemli bir yol gösterici olacaktır.

6 SONUÇ

- Kemik halkasının kültür ortamında eksplanttan biraz daha farklı olacak şekilde kullanılması bildiğimiz kadarıyla literatürdeki ilk deneysel modeldir. İki haftalık bir zaman aralığından sonra kemikten gelen progenitör hücrelerin kontrol grubu olarak kullandığımız şartlarda osteojenik farklılaşmaya gitmesi ve kemiksi adacık yapması önemli bir veri olarak düşünülmüştür.
- ZA ile oluşan Kemik halka hasarında iki haftalık bir zaman aralığından sonra kemikten gelen progenitör hücrelerin kontrol grubu olarak kullandığımız şartlarda osteojenik farklılaşmaya gitmesi ve kemiksi adacık yapması önemli bir veri olarak düşünülmüştür.
- ZA hasarında BOR, MKH ve birlikte kullanımlarının osteojenik farklanma ile ilgili parametreler olan OK, ON, OPG ve ALP anlamlı bir şekilde arttırırken RANKL için daha az anlamlı olmuştur.
- BOR ile ZA hasarının tüm parametrelerde anlamlı etki sağladığı ortaya konmuştur.
- MKH ile ZA hasarının tüm parametrelerde anlamlı etki sağladığı saptanmıştır.
- ZA hasarında birlikte kullanımları açısından BOR için MKH yararı ve fonksiyonunu tüm parametrelerde anlamlı olarak arttırdığı bulundu. ($P<0.001$)
- İn vivo aşamalara geçilmeden önce, biyomateryallerin, ilaçların vb. faktörlerin etkilerinin incelenebileceği ve sonuçların öngörülebileceği, anlamlı verilere neden olabilecek bir model olduğu düşünüldü.
- Bu modelin özellikle yara iyileşmesi kısmı göz önüne alındığında diş hekimliği ve tıp uygulamalarında model olarak kullanılıp deney hayvanı bireyselliğine bağlı değişebilecek etkilerin önlenmesi ve incelenen ajanlar, ilaçlar gibi faktörlerin daha anlamlı verileri sağlayabileceği düşünüldü.

7 ÖZET

Kültür Ortamında Bifosfonat Eklenmiş Kemik Rejenerasyon Deneysel Modeline Mezenkimal Kök Hücre ve Borik Asit Tedavilerinin Kemik Dokusuna Etkisi

Giriş ve Amaç: Bifosfonat ilaç grubu kemik metastazı gösteren meme, prostat, akciğer kanserleri, multipl miyeloma gibi malignitelerin ve osteoporoz, paget hastalığı gibi sistemik sorunlarının tedavisinde osteoklastik aktiviteyi inhibe etmeleri ve antianjiogenik özelliğe sahip oldukları için rutin olarak kullanılmaktadır. Bifosfonatlar çene kemiklerinde önemli bir yan etki olan ilaca bağlı çene kemiği osteonekrozuna (MRONJ) sebep olmaktadır. Hücre kültürü kullanılarak bifosfonat grubu ilaçların kemik hücrelerine olumsuz etkileri gösterilmekte ve tedavi yöntemleri araştırılabilmektedir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 40 adet Wistar-albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların kafatasından dış çapı 8 mm, iç çapı 4 mm olan iki kemik halkası çıkarıldı. Toplam 80 adet kemik halkası; 1. Grup (n=16): kontrol grubu, 2. Grup (n=16): zoledronik asit içeren ortam, 3. Grup (n=16): zoledronik asit ile borik asit içeren ortam, 4. Grup (n=16): zoledronik asit ile mezenkimal kök hücre içeren ortam, 5. Grup (n=16): zoledronik asit, borik asit ve mezenkimal kök hücre içeren ortam olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Kültür ortamına yerleştirilen kemik halkaları 4 hafta süre boyunca incelendi. Mezenkimal kök hücre ve borik asit kombinasyonunun zoledronik asit eklenmiş kemik deneysel modeli üzerinde kemik rejenerasyonu ve hücre farklılaşması etkileri araştırıldı. Osteokalsin, Osteonektin, Alkalen fosfataz, Osteoprotegerin ve RANKL antikoru osteojenik farklılaşmanın belirteçleri olarak kullanıldı ve örnekler immunohistokimyasal olarak incelendi. Kemiksi adacık oluşumu için ise Alizarin Kırmızısı ve Von Kossa histokimyası kullanıldı.

Bulgular ve Sonuç: Zoledronik asit hasarı sonrası kemik deneysel modelinde, mezenkimal kök hücre ve borik asitin kemik rejenerasyonu, hücre farklılaşması ve kemiksi adacık oluşumuna anlamlı etkileri olduğu, birlikte kullanımlarının ise olumlu etkiyi daha da arttırdıkları bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Zoledronik Asit, Mezenkimal kök hücre, Borik asit, Kültür, Kemik halkası

8 SUMMARY

Effect of Mesenchymal Stem Cell and Boric Acid Treatments on Bone Tissue in an Experimental Model of Bisphosphonate-Assisted Bone Regeneration in Culture Media

Introduction and Aim: Bisphosphonate group drugs are routinely used in the treatment of systemic problems such as osteoporosis, Paget's disease and breast, prostate, lung cancers, multiple myeloma showing bone metastasis, because they inhibit osteoclastic activity and have antiangiogenic properties. Bisphosphonates cause medication related osteonecrosis of jaw (MRONJ), which is an important side effect seen in the jawbones. By using cell culture, the negative effects of bisphosphonate group drugs on bone cells are shown and treatment methods can be investigated.

Materials and Methods: Forty Wistar-albino male rats were used in the study. Two bone rings with an outer diameter of 8 mm and an inner diameter of 4 mm were removed from the skull of rats. A total of 80 bone rings were divided into 5 groups as Group 1 (n=16): control group, Group 2 (n=16): medium including zoledronic acid, Group 3 (n=16): medium including zoledronic acid and boric acid, Group 4 (n=16): medium including zoledronic acid and mesenchymal stem cells, Group 5 (n=16): medium including zoledronic acid, boric acid and mesenchymal stem cells. Bone rings placed in culture medium were examined for 4 weeks. The effects of mesenchymal stem cell and boric acid combination on bone regeneration and cell differentiation were investigated in an experimental bone model with zoledronic acid. Osteocalcin, Osteonectin, Alkaline phosphatase, Osteoprotegerin and RANKL antibodies were employed as markers of osteogenic differentiation and samples were examined immunohistochemically. Alizarin Red and Von Kossa histochemistry were used as markers of osseogenic differentiation.

Results and Conclusion: In the experimental bone model performed after zoledronic acid injury, it was found that mesenchymal stem cells and boric acid have significant effects on bone regeneration, cell differentiation and bone formation, and their combined use further increases the positive effect.

Keywords: Zoledronic acid, Mesenchymal stem cell, Boric acid, Culture, Bone ring

9 KAYNAKLAR

1. Scoletta M, Arduino PG, Reggio L, Dalmaso P, Mozzati M. Effect of Low-Level Laser Irradiation on Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws: Preliminary Results of a Prospective Study.
2. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-Containing Bisphosphonates Inhibit the Mevalonate Pathway and Prevent Post-Translational Prenylation of GTP-Binding Proteins, Including Ras. 1998.
3. Maurer P, Sandulescu T, Kriwalsky MS, Rashad A, Hollstein S, Stricker I, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the maxilla and sinusitis maxillaris. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2011 Mar;40(3):285–91.
4. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic [1]. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2003 Sep 1;61(9):1115–7.
5. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2006 Oct;102(4):433–41.
6. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Aug;8(4):315–7.
7. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S. Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *International Journal of Experimental Pathology*. 2013 Feb;94(1):65–73.
8. Jin YZ, Lee JH. Mesenchymal stem cell therapy for bone regeneration. Vol. 10, *CiOs Clinics in Orthopedic Surgery*. Korean Orthopaedic Association; 2018. p. 271–8.
9. Author F, Khojasteh A, Order of Authors M, Baghaban Eslaminejad M, Nazarian H, Morad G, et al. Editorial Manager(tm) for *Journal of Oral Implantology*.
10. Jin IG, Kim JH, Wu HG, Kim SK, Park Y, Hwang SJ. Effect of bone marrow-derived stem cells and bone morphogenetic protein-2 on treatment of osteoradionecrosis in a rat model. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2015 Oct 1;43(8):1478–86.
11. Sutherland B, Strong P, King JC. Determining Human Dietary Requirements for Boron. Vol. 66, *Biological Trace Element Research*. 1998.
12. Chapin RE, Ku WW, Kenney MA, McCoy H. The Effects of Dietary Boric Acid on Bone Strength in Rats. 1998.
13. Ulu M, Kütük N, Cıçık MF, Bilge S, Akçay H, Saygılı S, et al. Effects of boric acid on bone formation after maxillary sinus floor augmentation in rabbits. *Oral and Maxillofacial Surgery*. 2018 Dec 1;22(4):443–50.
14. Gölge UH, Kaymaz B, Arpacı R, Kömürcü E, Göksel F, Güven M, et al. Effects of Boric Acid on Fracture Healing: An Experimental Study. *Biological Trace Element Research*. 2015 Oct 10;167(2):264–71.

15. Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. Vol. 14 Suppl 3, Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2003.
16. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. In: Annals of the New York Academy of Sciences. Blackwell Publishing Inc.; 2007. p. 281–90.
17. Nango N, Kubota S, Hasegawa T, Yashiro W, Momose A, Matsuo K. Osteocyte-directed bone demineralization along canaliculi. Bone. 2016 Mar 1;84:279–88.
18. Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: Biology and applications in craniofacial bone regeneration. Vol. 93, Journal of Dental Research. 2014. p. 109–16.
19. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. Vol. 61, Journal of Clinical Pathology. 2008. p. 577–87.
20. Kalfas IH. Principles of bone healing. Neurosurg Focus. 2001 Apr 15;10(4):E1. doi: 10.3171/foc.2001.10.4.2. PMID: 16732625.
21. Väänänen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. Vol. 473, Archives of Biochemistry and Biophysics. 2008. p. 132–8.
22. Kincaid SA VSDC. Bone morphology and postnatal osteogenesis. Potential for disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1983 Feb;13(1):3-17. doi: 10.1016/s0195-5616(83)50001-6. PMID: 6346653.
23. Rodan GA, Martin TJ. Calcified Tissue International Editorial Role of Osteoblasts in Hormonal Control of Bone Resorption-A Hypothesis. Vol. 33, Calcif. Tissue Int. 1981.
24. Sedghizadeh PP, Sun S, Jones AC, Sodagar E, Cherian P, Chen C, et al. Bisphosphonates in dentistry: Historical perspectives, adverse effects, and novel applications. Bone. 2021 Jun 1;147.
25. Adli Antropoloji [Internet]2017. 2017.
26. Buckwalter JA GMCR. Buckwalter JA G Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization J A Buckwalter 1, M J Glimcher, R R Cooper, R Recker. Bone biology I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization J A Buckwalter 1, M J Glimcher, R R Cooper, R Recker.
27. M J Glimcher. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification.
28. L G Raisz BEK. Regulation of bone formation.
29. Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: Biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. Vol. 35, Bone. 2004. p. 1003–12.
30. Eşrefoğlu M. Genel Histoloji. 1st ed. Malatya: Medipress Matbaacılık Yayıncılık Ltd.; 2009. 169–88 p.
31. Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. Clin Orthop Relat Res. 1998;(346):95-103.
32. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. Clin Orthop Relat Res. 1992;(275):280-286.
33. Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. Toxicol Pathol. 2006;34(5):548-565. doi:10.1080/01926230600939856.

34. Eaves CJ. Review Series Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. 2015; Available from: www.bloodjournal.org
35. Özer T. Deneysel Kemik Defektlerinde Lokal Olarak Uygulanan Alendronatın İyileşme Üzerine Etkilerinin Histomorfometrik ve Radyolojik Yöntemler İle İncelenmesi. . [Ankara:]; 2017.
36. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater.* 2008;15:100-114. Published 2008 May 2. doi:10.22203/ecm.v015a08.
37. Hermey DC, Popoff SN, Marks SC Jr. Reduced bone resorption in toothless (osteopetrotic) rats--an abnormality of osteoblasts related to their inability to activate osteoclast activity in vitro. *Connect Tissue Res.* 1996;35(1-4):273-278. doi:10.3109/03008209609029201.
38. Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn.* 2013;242(8):909-922. doi:10.1002/dvdy.23992.
39. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone.* 2015;80:14-18. doi:10.1016/j.bone.2015.04.035.
40. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999;5(6):623-628. doi:10.1038/9467.
41. Burr DB, Martin RB, Schaffler MB, Radin EL. Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage. *J Biomech.* 1985;18(3):189-200. doi:10.1016/0021-9290(85)90204-0.
42. Hadjidakis DJ, Androulakis IL. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-396. doi:10.1196/annals.1365.035.
43. Schepetkin I. Osteoclastic bone resorption: normal and pathological. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;832:170-193. doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb46246.x.
44. 94. Lindhe J, & ILNP. Clinical periodontology and implant dentistry.
45. Bonewald LF. Osteocytes: a proposed multifunctional bone cell. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2(3):239-241.
46. Harkness LS, Bonny AE. Calcium and vitamin D status in the adolescent: key roles for bone, body weight, glucose tolerance, and estrogen biosynthesis. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2005;18(5):305-311. doi:10.1016/j.jpog.2005.06.002.
47. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-281. doi:10.1056/NEJMra070553.
48. Quinn JM, McGee JO, Athanasou NA. Cellular and hormonal factors influencing monocyte differentiation to osteoclastic bone-resorbing cells. *Endocrinology.* 1994;134(6):2416-2423. doi:10.1210/endo.134.6.8194468.
49. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol.* 2002;73(11):1377-1391. doi:10.1902/jop.2002.73.11.1377.
50. Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int.* 2011;22(6):2003-2006. doi:10.1007/s00198-011-1611-4.
51. Francis MD, Russell RG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science.* 1969;165(3899):1264-1266. doi:10.1126/science.165.3899.1264.

52. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011;49(1):2-19. doi:10.1016/j.bone.2011.04.022.
53. Russell RG, Xia Z, Dunford JE, et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1117:209-257. doi:10.1196/annals.1402.089.
54. Minaire P, Depassio J, Berard E, et al. Effects of clodronate on immobilization bone loss. *Bone*. 1987;8 Suppl 1:S63-S68.
55. Bartl R FB. Bisphosphonates for Bones – Guidelines for Treatment in all Medical Disciplines. berlin: Blackwell Science; 2002. 51–75 p.
56. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest*. 1996;97(12):2692-2696. doi:10.1172/JCI118722.
57. Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S, Mühlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest*. 1970;1(1):12-18. doi:10.1111/j.1365-2362.1970.tb00591.x.
58. Body JJ, Bartl R, Burckhardt P, et al. Current use of bisphosphonates in oncology. International Bone and Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1998;16(12):3890-3899. doi:10.1200/JCO.1998.16.12.3890.
59. Cooper A. Compliance with treatment for osteoporosis. *Lancet*. 2006;368(9548):1648. doi:10.1016/S0140-6736(06)69691-8.
60. Russell RGG, Rogers MJ. Bisphosphonates: From the Laboratory to the Clinic and Back Again. 1999.
61. Widler L. Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). *J Med Chem*. 2002 Aug 15;45(17):3721-38. doi: 10.1021/jm020819i. PMID: 12166945.
62. Papapoulos SE. Bisphosphonate actions: physical chemistry revisited. *Bone*. 2006;38(5):613-616. doi:10.1016/j.bone.2006.01.141.
63. Widler L, Jahnke W, Green JR. The chemistry of bisphosphonates: from antiscaling agents to clinical therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(2):95-101. doi:10.2174/187152012799014959.
64. De Rosa G, Misso G, Salzano G, Caraglia M. Bisphosphonates and cancer: what opportunities from nanotechnology?. *J Drug Deliv*. 2013;2013:637976. doi:10.1155/2013/637976.
65. Soydan Sıdıka Sinem. Bifosfonata Bağlı Olarak Çene Kemiklerinde Gelişen Osteonekrozun Patogenezi ve Tedavisi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 2009;61–8.
66. Mönkkönen H, Kuokkanen J, Holen I, et al. Bisphosphonate-induced ATP analog formation and its effect on inhibition of cancer cell growth. *Anticancer Drugs*. 2008;19(4):391-399. doi:10.1097/CAD.0b013e3282f632bf.
67. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(1):5-13. doi:10.1016/j.tripleo.2008.03.036.
68. Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem*. 2005;280(8):7317-7325. doi:10.1074/jbc.M412817200.

69. Otto S, Pautke C, Van den Wyngaert T, Niepel D, Schiødt M. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Prevention, diagnosis and management in patients with cancer and bone metastases. *Cancer Treat Rev.* 2018;69:177-187. doi:10.1016/j.ctrv.2018.06.007.
70. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(5):839-847. doi:10.1016/j.joms.2008.01.026.
71. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20 Pt 2):6222s-6230s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0843.
72. Senaratne SG, Colston KW. Direct effects of bisphosphonates on breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2002;4(1):18-23. doi:10.1186/bcr412.
73. Edouard T, Chabot G, Miro J, et al. Efficacy and safety of 2-year etidronate treatment in a child with generalized arterial calcification of infancy. *Eur J Pediatr.* 2011;170(12):1585-1590. doi:10.1007/s00431-011-1572-9.
74. Epperla N, Pathak R. Hypocalcemia Secondary to Zoledronate Therapy in a Patient With Low Vitamin D Level. *WMJ.* 2015;114(4):163-167.
75. Kreutle V, Blum C, Meier C, et al. Bisphosphonate induced hypocalcaemia - report of six cases and review of the literature. *Swiss Med Wkly.* 2014;144:w13979. Published 2014 Jun 25. doi:10.4414/sm.w.2014.13979.
76. Pazianas M, Cooper C, Ebetino FH, Russell RG. Long-term treatment with bisphosphonates and their safety in postmenopausal osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2010;6:325-343. Published 2010 Jul 21. doi:10.2147/tcrm.s8054.
77. Miller PD, Pannacciulli N, Brown JP, et al. Denosumab or Zoledronic Acid in Postmenopausal Women With Osteoporosis Previously Treated With Oral Bisphosphonates. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(8):3163-3170. doi:10.1210/jc.2016-1801.
78. Bock O, Felsenberg D. Bisphosphonates in the management of postmenopausal osteoporosis--optimizing efficacy in clinical practice. *Clin Interv Aging.* 2008;3(2):279-297. doi:10.2147/cia.s2134.
79. Doğan Onur ' Ö, Kurtuluş ' B, Çevik P. Bifosfonat kullanan hastalarda oral cerrahi uygulamalarda karşılaşılabilecek sorunlar ve tedavisi oral complications and treatments in patients receiving bisphosphonates. *dfrlemf;* 2009.
80. Migliorati CA WSHI et al. A systematic review of bisphosphonate osteonecrosis (BON) in cancer. *Support Care Cancer.* 2010;18(8):1099-1106. doi:10.1007/s00520-010-0882-1.
81. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, et al. 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):2-12. doi:10.1016/j.joms.2009.01.009.
82. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw - 2014 update. Vol. 72, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* W.B. Saunders; 2014. p. 1938–56.
83. Allen M. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5 Suppl):61-70. doi:10.1016/j.joms.2009.01.007.

84. Hokugo A. Hokugo A, Christensen R, Chung EM, Sung EC, Felsenfeld AL, Sayre JW, Garrett N, Adams JS, Nishimura I. Increased prevalence of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with vitamin D deficiency in rats. *J Bone Miner Res.* 2010 Jun;25(6):1337-49. doi: 10.1002/jbmr.23. PMID: 20200938; PMCID: PMC3153137.
85. Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, Pessin-Minsley M, Pfail J, Stock RG, et al. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws, Bone Markers, and a Hypothesized Candidate Gene. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2009 Jan;67(1):159–61.
86. Mücke Y MAD. Local and microvascular free flaps in patients with medication-related osteonecrosis of the jaw. In: Otto S (ed.) *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws: Bisphosphonates, Denosumab, and New Agents.* Berlin; 2015. 93–103 p.
87. Vescovi P . Adjuvant treatment options in the management of medication-related osteonecrosis of the jaw. In: Otto S (ed.) *Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws: Bisphosphonates, Denosumab, and New Agents.* Berlin; 2015. 103–111 p.
88. Agrillo A et al. New therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaws. *J Craniofac Surg.* 2006;17(6):1080-1083. doi:10.1097/01.scs.0000249350.59096.d0.
89. Vescovi P. Bisphosphonate-associated osteonecrosis (BON) of the jaws: a possible treatment?. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64(9):1460-1462. doi:10.1016/j.joms.2006.05.042.
90. Albanese A. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing.* 2013;10(1):23. Published 2013 Jun 13. doi:10.1186/1742-4933-10-23.
91. Song K et al. A probable case of oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw and recovery with parathyroid hormone treatment. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2008;69(4):356-362. doi:10.1016/j.curtheres.2008.08.003.
92. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2008;106(1):5–13.
93. Integrated Risk Information System U. Toxicological Review of Boron and Compounds (CAS No. 7440-42-8) (PDF) [Internet]. 2004. Available from: www.epa.gov/iris
94. Murray F. Data-derived uncertainty factors: Boric acid (BA) as a case study. *Human and Ecological Risk Assessment:* 2001;125–38.
95. Boncukçuoğlu R. Bor elementinin çevresel açıdan değerlendirilmesi. Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü; 2003.
96. Kuru R, Yarat A. Boron and a Current Overview of its Effects On Health. *Clinical and Experimental Health Sciences.* 2017 Sep 19;7(3):107–14.
97. Organization WH. Boron. . 1998;
98. Kuru R . Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış. 2017: DOI: 10.5152/clinexphealthsci7. *Clin Exp Health Sci.* 2017 Jul;107–14.
99. Uçkun Z. Esansiyel bir komponent: bor-boron günlük alımı ve fizyolojik etkileri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi.* 2013;119–23.

100. Devirian T. The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43(2):219-231. doi:10.1080/10408690390826491.
101. Naghii M. The role of boron in nutrition and metabolism. *Prog Food Nutr Sci*. 1993;17(4):331-349.
102. Nielsen F. Studies of the interaction between boron and calcium, and its modification by magnesium and potassium, in rats. Effects on growth, blood variables, and bone mineral composition. *Biol Trace Elem Res*. 1992;35(3):225-237. doi:10.1007/BF02783768.
103. Ince S. The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol*. 2010;24(3):161-164. doi:10.1016/j.jtemb.2010.01.003.
104. Kuru R, Yarat A. Boron and a Current Overview of its Effects On Health. *Clinical and Experimental Health Sciences*. 2017 Sep 19;7(3):107–14.
105. Pizzorno L. Nothing Boring About Boron. *Integr Med (Encinitas)*. 2015;14(4):35-48.
106. Doğan A et al. Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;44:246-253. doi:10.1016/j.msec.2014.08.035.
107. Demirci S et al. Boron and Poloxamer (F68 and F127) Containing Hydrogel Formulation for Burn Wound Healing. *Biol Trace Elem Res*. 2015;168(1):169-180. doi:10.1007/s12011-015-0338-z.
108. Briggs M. Boron oxides, boric acid, and borates. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2000;
109. Kuskay B. Design parameters of boric acid production process from colemanite ore in the presence of propionic acid. *Chemical engineering and processing: Process intensification*. 2011;377–83.
110. Türkez H. Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2007;62(11-12):889-896. doi:10.1515/znc-2007-11-1218.
111. Gallardo-Williams MT, Chapin RE, King PE, et al. Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicol Pathol*. 2004;32(1):73-78. doi:10.1080/01926230490260899.
112. Barranco W, Eckhert C. Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*, 2006, 94: 884.
113. Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Archives of Oral Biology*, 2012, 57: 60-65.
114. Gallardo-Williams et al. Effects of boric acid supplementation on bone histomorphometry, metabolism, and biomechanical properties in aged female F-344 rats. *Biol Trace Elem Res* 2003;93(1-3):155- 170.
115. Nielsen F. Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats. *Biofactors* 2004;20(3):161-171.
116. Hakki S. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2010;24(4):243-250.
117. Hunt CD. The biochemical effects of physiologic amounts of dietary boron in animal nutrition models. *Environ Health Perspect*. 1994;102 Suppl 7(Suppl 7):35-43.

118. Gorustovich A. Histomorphometric Study of Alveolar Bone Healing in Rats Fed a Boron-Deficient Diet. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 2008;291(4):441-447.
119. Nielsen F. Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone. *J Trace Elem Med Biol* 2009;23(3):195-203.
120. Gorustovich A. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anat Rec (Hoboken)* 2008;291(4):441-447.
121. 14. Dzondo-Gadet. Action of boron at the molecular level: effects on transcription and translation in an acellular system. *Biol Trace Elem Res* 2002;85(1):23-33.
122. Lavery K. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow- derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 2008;283(30):20948-20958.
123. Hakki S. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *J Trace Elem Med Biol* 2010;24(4):243-250.
124. Benderdour M. In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *J Trace Elem Med Biol* 1998;12(1):2-7.
125. Luan Q, Desta T, Chehab L, Sanders VJ, Plattner J, Graves DT. Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial. *J Dent Res*. 2008;87(2):148-152.
126. Wang X. Stem cells in tissues, organoids, and cancers. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(20):4043-4070.
127. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran*. 2017;55(1):6-23.
128. Hassani S. Transition of inner cell mass to embryonic stem cells: mechanisms, facts, and hypotheses. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(5):873-892.
129. Delaney M. The role of HLA in umbilical cord blood transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(2):179-187.
130. Nawab K. Stem Cell Therapies: A Way to Promising Cures. *Cureus*. 2019;11(9):e5712. Published 2019 Sep 20. doi:10.7759/cureus.5712.
131. Brown C MCBS et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(9):1738-1755. doi:10.1002/term.2914.
132. Bacakova L et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv*. 2018;36(4):1111-1126.
133. Louwen F. Insight into the development of obesity: functional alterations of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Obes Rev*. 2018;19(7):888-904.
134. Palumbo P. Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1897. Published 2018 Jun 28.
135. Barbatelli G et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(6):E1244-E1253.
136. Raposio E BN. Isolation of Ready-to-Use Adipose-Derived Stem Cell (ASC) Pellet for Clinical Applications and a Comparative Overview of Alternate

- Methods for ASC Isolation. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2017;41:1F.17.1-1F.17.12. Published 2017 May 16.
137. Zuk P et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.
 138. Almalki S. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 2016;92(1-2):41-51.
 139. Yun I et al. Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study. *Dermatol Surg.* 2012;38(10):1678-1688.
 140. Rigotti G et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(5):1409-1422.
 141. da Silva RA et al. The role of triiodothyronine hormone and mechanically-stressed endothelial cell paracrine signalling synergism in gene reprogramming during hBMSC-stimulated osteogenic phenotype in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;478:151-167.
 142. Bertolini F. Adipose tissue cells, lipotransfer and cancer: a challenge for scientists, oncologists and surgeons. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(1):209-214.
 143. Chulpanova D. Application of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Agent Delivery in Anti-tumor Treatment. *Front Pharmacol.* 2018;9:259. Published 2018 Mar 20.
 144. Colwell A. Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(1):701-702.
 145. Zimmerlin L. Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(1-2):93-106.
 146. Matsumoto D et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3375-3382.
 147. Mesimäki K et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009;38(3):201-209.
 148. Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004;32(6):370-373.
 149. Zhang H. Uninduced adipose-derived stem cells repair the defect of full-thickness hyaline cartilage. *Chin J Traumatol.* 2009;12(2):92-97.
 150. Kingham P. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev.* 2014;23(7):741-754.
 151. Kara A. *Kültür Ortamında Kemik Rejenerasyonu Deneysel Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Tedavisine Borik Asitin Etkisi ve Kemik Dokusunun Katkısı [Doktora Tezi (Tez danışmanı Prof. Dr. Gülten KAVAK)]. [İzmir]: İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,; 2020.*
 152. Özdal-Kurt F. The effect of different implant biomaterials on the behavior of canine bone marrow stromal cells during their differentiation into osteoblasts. *Biotech Histochem.* 2016 Aug;91(6):412-22. doi: 10.1080/10520295.2016.1183819. Epub 2016 May 16. PMID: 27182756.

153. Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanakul K, Satravaha Y. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2012 Oct;41(9):713–20.
154. The effect of osteogenic medium on the adhesion of rat bone marrow stromal cell to the hydroxyapatite. *Saudi Med J*. 2006 Mar;27(3):305-11. PMID: 16532088.
155. Pathogenesis of medication-related osteonecrosis of the jaw: a comparative study of in vivo and in vitro trials. *J Int Med Res*. 2018 Oct;46(10):4277-4296. doi: 10.1177/0300060518788987. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30091399; PMCID: PMC6166332.
156. Sharma D. Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ): diagnostic criteria and possible pathogenic mechanisms of an unexpected anti-angiogenic side effect. *Vasc Cell*. 2013 Jan 14;5(1):1. doi: 10.1186/2045-824X-5-1. PMID: 23316704; PMCID: PMC3606312.
157. Bagan J. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with intravenous bisphosphonates (BRONJ): A concise update. *Oral Oncol*. 2009 Jul;45(7):551-4. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.01.002. Epub 2009 Feb 28. PMID: 19251474.
158. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des*. 2003;9(32):2643-58. doi: 10.2174/1381612033453640. PMID: 14529538.
159. Walter C. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis*. 2011 Mar;17(2):194-9. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01720.x. Epub 2010 Aug 27. PMID: 20796232.
160. García-Moreno C. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone*. 1998 Mar;22(3):233-9. doi: 10.1016/s8756-3282(97)00270-6. PMID: 9580147.
161. Huang X. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep*. 2016 Jan;13(1):613-22. doi: 10.3892/mmr.2015.4627. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26648136; PMCID: PMC4686069.
162. di Vito A. Dose-Dependent Effects of Zoledronic Acid on Human Periodontal Ligament Stem Cells: An In Vitro Pilot Study. *Cell Transplant*. 2020 Jan-Dec;29:963689720948497. doi: 10.1177/0963689720948497. PMID: 33086890; PMCID: PMC7784504.
163. Huang X. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep*. 2016 Jan;13(1):613-22. doi: 10.3892/mmr.2015.4627. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26648136; PMCID: PMC4686069.
164. Lindtner von. Osteoanabolic effect of alendronate and zoledronate on bone marrow stromal cells (BMSCs) isolated from aged female osteoporotic patients and its implications for their mode of action in the treatment of age-related bone loss. *Osteoporos Int*. 2014 Mar;25(3):1151-61. doi: 10.1007/s00198-013-2494-3. Epub 2013 Aug 22. PMID: 23974861.
165. Zoledronic acid accelerates osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells by attenuating oxidative stress via the SIRT3/SOD2 pathway and thus

- alleviates osteoporosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Feb;24(4):2095-2101. doi: 10.26355/eurrev_202002_20389. PMID: 32141579.
166. Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, et al. High-Dose Zoledronic Acid Impacts Bone Remodeling with Effects on Osteoblastic Lineage and Bone Mechanical Properties. *Clinical Cancer Research*. 2009 Sep 15;15(18):5829–39.
 167. Huja SS, Fernandez SA, Phillips C, Li Y. Zoledronic acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Archives of Oral Biology*. 2009 Sep;54(9):851–6.
 168. Ebert R, Zeck S, Krug R, Meissner-Weigl J, Schneider D, Seefried L, et al. Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation. *Bone*. 2009 May;44(5):858–64.
 169. Fleisher K. Tetracycline-guided debridement and cone beam computed tomography for the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a technical note. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Dec;66(12):2646-53. doi: 10.1016/j.joms.2008.07.021. PMID: 19022151.
 170. Ristow O PC. Auto-fluorescence of the bone and its use for delineation of bone necrosis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Nov;43(11):1391-3. doi: 10.1016/j.ijom.2014.07.017. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25128260.
 171. Pautke C. Fluorescence-guided bone resection in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Mar;67(3):471-6. doi: 10.1016/j.joms.2008.09.037. PMID: 19231768.
 172. Kim J, Kim JW, Kim SJ, Kim MR. Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin for the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a prospective feasibility study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Nov;52(9):854-9. doi: 10.1016/j.bjoms.2014.07.256. Epub 2014 Aug 16. PMID: 25138613.
 173. Cano-Durán J. The role of Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) in the treatment of the medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). *J Clin Exp Dent*. 2017 Aug 1;9(8):e1051-e1059. doi: 10.4317/jced.54154. PMID: 28936298; PMCID: PMC5601107.
 174. Sarkarat F. Platelet-Rich Plasma in Treatment of Zoledronic Acid-Induced Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws. *Trauma Mon*. 2014 Apr;19(2):e17196. doi: 10.5812/traumamon.17196. Epub 2014 Mar 18. PMID: 25032151; PMCID: PMC4080617.
 175. Cicciù M, Herford AS, Juodžbalys G, Stoffella E. Recombinant human bone morphogenetic protein type 2 application for a possible treatment of bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw. In: *Journal of Craniofacial Surgery*. 2012. p. 784–8.
 176. Freiburger J, Freiburger JJ, Padilla-Burgos R, Chhoeu AH, Kraft KH, Boneta O, Moon RE, Piantadosi CA. Hyperbaric oxygen treatment and bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a case series. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Jul;65(7):1321-7. doi: 10.1016/j.joms.2007.03.019. PMID: 17577496.
 177. Agrillo A. Ozone therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Craniofac Surg*. 2007 Sep;18(5):1071-5. doi: 10.1097/scs.0b013e31857261f. PMID: 17912085.

178. Kwon Y. Short-term teriparatide therapy as an adjunctive modality for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Osteoporos Int.* 2012 Nov;23(11):2721-5. doi: 10.1007/s00198-011-1882-9. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22218418.
179. Owosho A. Pentoxifylline and tocopherol in the management of cancer patients with medication-related osteonecrosis of the jaw: an observational retrospective study of initial case series. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 2016; 122(4):455-459.
180. Dayisoğlu E. Does an alkaline environment prevent the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw? An experimental study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014 Mar;117(3):329-34. doi: 10.1016/j.oooo.2013.11.490. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24368141.
181. Marx R. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Dec;65(12):2397-410. doi: 10.1016/j.joms.2007.08.003. PMID: 18022461.
182. Nielsen FH. Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. *Environmental Health Perspectives.* 1994 Nov;102(suppl 7):59–63.
183. Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Archives of Oral Biology.* 2008 Jul;53(7):677–82.
184. Sağlam M, Arslan U, Buket Bozkurt Ş, Hakkı SS. Boric Acid Irrigation as an Adjunct to Mechanical Periodontal Therapy in Patients With Chronic Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Periodontology.* 2013 Sep;84(9):1297–308.
185. Gorustovich AA, López JMP, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow. *Biomedical Materials.* 2006 Sep;1(3):100–5.
186. Demirer S, Kara MI, Erciyas K, Özdemir H, Ozer H, Ay S. Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Archives of Oral Biology.* 2012 Jan;57(1):60–5.
187. Luan Q, Desta T, Chehab L, Sanders VJ, Plattner J, Graves DT. Inhibition of Experimental Periodontitis by a Topical Boron-based Antimicrobial. *Journal of Dental Research.* 2008 Feb 1;87(2):148–52.
188. Chapin RE, Ku WW, Kenney MA, McCoy H, Gladen B, Wine RN, et al. The Effects of Dietary Boron on Bone Strength in Rats. Vol. 35, *fundamental and applied toxicology.* 1997.
189. Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Archives of Oral Biology.* 2008 Jul;53(7):677–82.
190. Pan H et al. Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration. *J R Soc Interface.* 2010;7(48):1025-1031. doi:10.1098/rsif.2009.0504.
191. Yamashita J MLVPC. Updates on osteonecrosis of the jaw. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2010 Sep;4(3):200-6. doi: 10.1097/SPC.0b013e32833d303b. PMID: 20657284; PMCID: PMC2962852.

192. Ogata K. Evaluation of the therapeutic effects of conditioned media from mesenchymal stem cells in a rat bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like model. *Bone*. 2015 May;74:95-105. doi: 10.1016/j.bone.2015.01.011. Epub 2015 Jan 19. PMID: 25613174.
193. Brunskill S. Route of delivery and baseline left ventricular ejection fraction, key factors of bone-marrow-derived cell therapy for ischaemic heart disease. *Eur J Heart Fail*. 2009 Sep;11(9):887-96. doi: 10.1093/eurjhf/hfp101. Epub 2009 Aug 4. PMID: 19654139.
194. Aksel H. VEGF/BMP-2 loaded three-dimensional model for enhanced angiogenic and odontogenic potential of dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2018 Apr;51(4):420-430. doi: 10.1111/iej.12869. Epub 2017 Nov 14. PMID: 29080346.
195. Atesci A. Effect of Different Dentin Conditioning Agents on Growth Factor Release, Mesenchymal Stem Cell Attachment and Morphology. *J Endod*. 2020 Feb;46(2):200-208. doi: 10.1016/j.joen.2019.10.033. Epub 2019 Dec 4. PMID: 31812361.
196. Zhu C. Co-culture of the bone and bone marrow: a novel way to obtain mesenchymal stem cells with enhanced osteogenic ability for fracture healing in SD rats. *J Orthop Surg Res*. 2019 Sep 3;14(1):293. doi: 10.1186/s13018-019-1346-z. PMID: 31481070; PMCID: PMC6724266.
197. Ying X, Cheng S, Wang W, Lin Z, Chen Q, Zhang W, et al. Effect of Boron on Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Biological Trace Element Research* [Internet]. 2011;144(1):306–15. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9094-x>
198. Movahedi Najafabadi B al hoda, Hussein Abnosi M. Boron Induces Early Matrix Mineralization via Calcium Deposition and Elevation of Alkaline Phosphatase Activity in Differentiated Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Citation: Movahedi Najafabadi B, Abnosi MH. Boron induces early matrix mineralization via calcium deposition and elevation of alkaline phosphatase activity in differentiated rat bone marrow mesenchymal stem cells. Vol. 18, CELL JOURNAL(Yakhteh).
199. Akdere Ö. Boron mediated 2D and 3D cultures of adipose derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. 2019 Apr;71(2):611-622. doi: 10.1007/s10616-019-00310-9. Epub 2019 Mar 23. PMID: 30905012; PMCID: PMC6465390.
200. Fournier P. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6538-44. PMID: 12438248.
201. Leventhal A CGNABM. The benefits and risks of stem cell technology. *Oral Dis*. 2012 Apr;18(3):217-22. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01870.x. Epub 2011 Nov 18. PMID: 22093062; PMCID: PMC3752464.
202. Nakagami H. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Dec;25(12):2542-7. doi: 10.1161/01.ATV.0000190701.92007.6d. Epub 2005 Oct 13. PMID: 16224047.

203. Rodríguez-Lozano F. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Nov 1;17(6):e1062-7. doi: 10.4317/medoral.17925. PMID: 22926467;
204. Miura M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine in craniofacial region. *Oral Dis*. 2006 Nov;12(6):514-22. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01300.x. PMID: 17054762.
205. Cella L, Oppici A, Arbasi M, Moretto M, Piepoli M, Vallisa D, et al. Autologous bone marrow stem cell intralesional transplantation repairing bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw [Internet]. 2011. Available from: <http://www.head-face-med.com/content/7/1/16>
206. Kikui T. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1668-79. doi: 10.1002/jbmr.37. PMID: 20200952; PMCID: PMC3154005.
207. Boron nitride nanotube-enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Feb;104(2):323-9. doi: 10.1002/jbm.b.33391. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25766516.
208. Taşlı P. Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro. *Biol Trace Elem Res*. 2013 Jun;153(1-3):419-27. doi: 10.1007/s12011-013-9657-0. Epub 2013 Apr 12. PMID: 23575901.
209. Zhang H. Construction of vascularized tissue-engineered bone with polylysine-modified coral hydroxyapatite and a double cell-sheet complex to repair a large radius bone defect in rabbits. *Acta Biomater*. 2019 Jun;91:82-98. doi: 10.1016/j.actbio.2019.04.024. Epub 2019 Apr 12. PMID: 30986527.
210. Berbéri A. Mesenchymal stem cells with osteogenic potential in human maxillary sinus membrane: an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1599-1609. doi: 10.1007/s00784-016-1945-6. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27585588.
211. Li X. Boron nitride nanotube-enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Feb;104(2):323-9. doi: 10.1002/jbm.b.33391. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25766516.
212. Lombard T. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: New Insights into Molecular Mechanisms and Cellular Therapeutic Approaches. *Stem Cells Int*. 2016;2016:8768162. doi: 10.1155/2016/8768162. Epub 2016 Sep 18. PMID: 27721837; PMCID: PMC5046039.
213. Esteves JC . Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling - histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Transl Med*. 2013 Sep 23;11:221. doi: 10.1186/1479-5876-11-221. PMID: 24053147; PMCID: PMC3868312.
214. Sumida R. Platelet-rich fibrin increases the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand ratio in osteoblasts. *Exp Ther Med*. 2019 Jul;18(1):358-365. doi: 10.3892/etm.2019.7560. Epub 2019 May 8. PMID: 31258673; PMCID: PMC6566034.
215. Li X. Exosomes derived from maxillary BMSCs enhanced the osteogenesis in iliac BMSCs. *Oral Dis*. 2020 Jan;26(1):131-144. doi: 10.1111/odi.13202. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31541596.

216. Eastell R BA. The value of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *J Rheumatol.* 1997 Jun;24(6):1215-7. PMID: 9195539.
217. Takami H SJ. Serum bone Gla protein as an indicator of parathyroidectomy in patients with secondary hyperparathyroidism. *World J Surg.* 1990 May-Jun;14(3):431-5; discussion 435-6. doi: 10.1007/BF01658548. PMID: 2368448.
218. Bolland MJ. Effects of intravenous zoledronate on bone turnover and BMD persist for at least 24 months. *J Bone Miner Res.* 2008 Aug;23(8):1304-8. doi: 10.1359/jbmr.080312. PMID: 18627266.
219. Gasser JA. Long-term protective effects of zoledronic acid on cancellous and cortical bone in the ovariectomized rat. *J Bone Miner Res.* 2008 Apr;23(4):544-51. doi: 10.1359/jbmr.071207. PMID: 18072878.
220. Basso FG. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology.* 2013;59(6):534-41. doi: 10.1159/000351194. Epub 2013 Jul 18. PMID: 23867757.
221. Liu YJ. Magnesium and zinc borate enhance osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro. *J Biomater Appl.* 2018 Jan;32(6):765-774. doi: 10.1177/0885328217740730. Epub 2017 Nov 9. PMID: 29119879.
222. Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly(butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup2):790-799. doi: 10.1080/21691401.2018.1470522. Epub 2018 May 11. PMID: 29749273.
223. Rosset E. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biol.* 2016 May-Jul;52-54:78-87. doi: 10.1016/j.matbio.2016.02.001. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26851678; PMCID: PMC5327628.
224. Akdere Ö. Boron mediated 2D and 3D cultures of adipose derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology.* 2019 Apr;71(2):611-622. doi: 10.1007/s10616-019-00310-9. Epub 2019 Mar 23. PMID: 30905012; PMCID: PMC6465390.
225. Jamalpoor Z . In vitro interaction of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells with biomimetic 3D scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2019 Jun;107(6):1166-1175. doi: 10.1002/jbm.a.36608. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30636089.
226. Rumiński S. Three-dimensional printed polycaprolactone-based scaffolds provide an advantageous environment for osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Jan;12(1):e473-e485. doi: 10.1002/term.2310. Epub 2017 Apr 11. PMID: 27599449.

EKLER

EK 1

T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu				
KARAR TARİH / NO	27/04 / 2021 / 77.637.435 / 188			
ARAŞTIRMANIN ADI	Kültür Ortamında Bifosfonat Eklenmiş Kemik Rejenrasyon Deneysel Modeline Mezenkirin Kök Hücre ve Borik Asit Tedavilerinin Kemik Dokusuna Etkisi			
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Dr. Öğr. Üyesi Onur ŞAHİN - I. K.Ç. Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı			
ARAŞTIRMA EKİBİ	Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU,- Arş. Gör. Dt. Gökcan ŞAHİN,- Uzm. Tuna ÖNAL,- Arş. Gör. Mustafa ÖZTATLICI			
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☒	YÜKSEK LİSANS--DOKTORA TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐	Eğitim ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	09/04 / 2021 / Tarih ve 57108 sayılı; dilekçe			
KARAR BİLGİLERİ	Düzeltilme dilekçeniz incelenmiş, çalışmanın bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı Gökcan ŞAHİN
**Anabilim Dalı /
Bilim Dalı** Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı / Diş Hekimliği

Yabancı Dil İngilizce

Eğitim

Lise	Yavuz Sultan Selim Anadolu Lisesi	2004-2008
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2009-2014
Uzmanlık	İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim dalı	2017-2022