

**T.C.**  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**OSTEOBLAST BENZERİ HÜCRELERDE ZOLEDRONİK ASİT,  
BEVASİZUMAB, DEKSAMETAZON VE SELENYUMUN KALSİYUM  
SİNYALİ, APOPTOZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Tayfun YAZICI**  
**DOKTORA TEZİ**

**I. DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Gülperi KOÇER**

**II. DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme  
Koordinasyon Birimi Destekleme Protokolünün ÖYP05259-DR-12 proje  
numarası ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Protokolünün  
4475-ÖYP-D2-15 proje numarası ile desteklendi.**

**Tez No: 162**

**ISPARTA-2017**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01/08/2017

- Tez Danışmanı : Doç.Dr. Gülperi KOÇER  
Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD
- Üye : Prof. Dr. Timuçin BAYKUL  
Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD
- Üye : Doç. Dr. Fethi ATIL  
Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD
- Üye : Doç. Dr. İsmail Doruk KOÇYİĞİT  
Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD
- Üye : Yrd.Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY  
Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD

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

Doç. Dr. Mustafa KAYAN

Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

### BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim. **“Osteoblast benzeri hücrelerde zoledronik asit, bevasizumab, deksametazon ve selenyumun kalsiyum sinyali, apoptoz ve oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırılması”** adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi Ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

TEZİ HAZIRLAYAN

**Tayfun YAZICI**

İmza

I. TEZ DANIŞMANI

**Doç.Dr.Gülperi KOÇER**

İmza

II. TEZ DANIŞMANI

**Prof.Dr.Mustafa NAZIROĞLU**

İmza

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında; çenelerde osteonekroz görülmesine sebebiyet veren birtakım ilaçların, kemik oluşumunda önemli görevi olan osteoblast hücrelerindeki kalsiyum sinyali, apoptoz ve oksidatif stres üzerine etkileri araştırılarak ve bu etkilere karşılık bir antioksidan olan selenyumun hücresel düzeyde ne gibi değişiklikler yarattığı in vitro model üzerinde incelenmek istenmiştir.

Gerek tez çalışmamda, gerek doktora eğitimim boyunca bilgilerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam; Doç. Dr. Gülperi KOÇER'e,

Doktora eğitimim boyunca başta Prof. Dr. Timuçin BAYKUL olmak üzere, yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan, eğitimimde büyük katkılarda bulunan değerli hocalarım; Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY'a, Yrd. Doç. Dr. Yavuz FINDIK'a ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fatih ŞENTÜRK'e,

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam; Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU 'na, analiz ve değerlendirme işlemlerindeki yardımlarından dolayı İ.Suat ÖVEY, Ahmi ÖZ ve Muhammet ŞAHİN'e,

Başta Mehmet Ali KOLDAŞ olmak üzere doktora eğitimim sürecinde yanımda olan tüm asistan arkadaşlarıma, klinik, ameliyathane ve hastane personeline,

Doktora tezimi destekleyen S.D.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (proje no: 4475-ÖYP-D2-15) ve Öğretim Üyesi Yetiştirme Koordinasyon Birimine (proje no: ÖYP05259-DR-12),

Tezimin ve hayatımın her aşamasında sabır ve anlayışıyla yanımda olan, bana her konuda destek olan ve mutluluk aşıl原因an Seçil Duygu SÜMENGEN'e,

Ve bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımın hiçbir döneminde desteklerini benden esirgemeyen AİLEME

Sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

**Tayfun YAZICI**

## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY SAYFASI</b> .....	<b>ii</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİ</b> .....	<b>2</b>
2.1. Kemik Dokusu.....	2
2.1.1. Kemiğin Yapısı .....	2
2.1.1.1. Kemik Matriksi .....	2
2.1.1.2. Kemik Zarları .....	2
2.1.2. Kemik Hücreleri .....	2
2.1.2.1. Osteoprogenitor Hücreler.....	2
2.1.2.2. Osteoblastlar.....	2
2.1.2.3. Osteositler .....	3
2.1.2.4. Osteoklastlar.....	3
2.1.3. Kemik Türleri .....	4
2.1.3.1. Makroskopik Özelliğe Göre.....	4
2.1.3.2. Mikroskopik Özelliğe Göre.....	4
2.1.4. Kemik Histogenezi .....	4
2.1.5. Kemik İyileşmesi .....	5
2.1.5.1. İnflamatuvar Dönem .....	5
2.1.5.2. Onarım Dönemi.....	5
2.1.5.3. Yeniden Şekillenme Dönemi .....	6
2.1.6. Diş Çekiminde Yara İyileşmesi .....	7
2.1.7. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler .....	7

2.1.7.1. Sistemik Faktörler .....	7
2.1.7.2. Lokal Düzenleyici Faktörler .....	8
2.2. İlaçlara Bağlı Gelişen Çenelerin Osteonekrozu .....	8
2.2.1. Çenelerde Osteonekroz Oluşumunda Risk Faktörü Olan İlaçlar.....	10
2.2.1.1. Antirezorptif İlaçlar.....	10
2.2.1.1.1. Bifosfonatlar .....	10
2.2.1.1.2. RANK Ligand İnhibitörleri (Denosumab) .....	12
2.2.1.1.3. Antianjiogenik İlaçlar .....	13
2.2.2. MRONJ için Risk Faktörleri.....	14
2.2.2.1. Sistemik Risk Faktörleri.....	14
2.2.2.2. Lokal Risk Faktörleri .....	14
2.2.3. MRONJ Tedavisi .....	15
2.2.4. Kortikosteroid Kullanımı .....	15
2.3. Hücre Haberleşmesi .....	17
2.3.1. Kalsiyum İyonu (Ca <sup>+2</sup> ) ve Apoptoz.....	17
2.3.1.1. Hücre İçerisine Ca <sup>+2</sup> Giriş Kanalları .....	19
2.3.1.1.1. Voltaja Duyarlı Ca <sup>+2</sup> Kanalları .....	20
2.3.1.1.2. Reseptöre Duyarlı Ca <sup>+2</sup> Kanalları.....	20
2.3.1.1.3. Depolanmış Ca <sup>+2</sup> Miktarına Duyarlı Ca <sup>+2</sup> Kanalları .....	20
2.3.1.2. Kalsiyum Salınımı.....	20
2.3.1.2.1. Hücre İçi Depolardan Ca <sup>+2</sup> Salınımı.....	20
2.3.1.2.2. Transient Reseptor Potential (TRP) Üst Ailesi .....	21
2.3.2. Oksidatif Stres .....	21
2.3.2.1. Serbest Radikaller .....	22
2.3.2.2. Antioksidanlar .....	23
2.3.2.3. Selenyum (Se) .....	24
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>25</b>
3.1. Gereç .....	25
3.2. Yöntemler .....	29
3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi .....	29
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması .....	30
3.2.3. Çalışmada kullanılacak ilaç dozu tespiti.....	30

2.2.4. Çalışma Grupları.....	34
3.2.5. Yapılan Analizler.....	36
3.2.5.1. Apoptoz Testi.....	36
3.2.5.2. Western-blot Analizleri.....	36
3.2.5.3. Hücre içi Serbest Ca <sup>+2</sup> Ölçülmesi .....	39
3.2.5.4. Hücre Canlılığı (MTT Analizi).....	39
3.2.5.5. Hücre İçi ROS Üretimi Tayini .....	41
3.2.5.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini.....	42
3.2.5.7. Kaspaz 3 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini.....	42
3.2.6. İstatistiksel Analiz .....	43
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>44</b>
4.1. Hücre Canlılığı Testi (MTT) Sonuçları.....	44
4.2. Hücre İçi Serbest Ca <sup>+2</sup> Sonuçları.....	45
4.3. Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis) Sonuçları.....	47
4.4. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktivitesi Sonuçları.....	48
4.5. Hücre İçi ROS üretim ve Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Analiz Sonuçları.....	50
4.6. Western-blot Analiz Sonuçları .....	52
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>55</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>68</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>71</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>72</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>73</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>90</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>HA</b>	: Hidroksiapatit
<b>PTH</b>	: Paratirioid hormon
<b>PTHrP</b>	: Paratirioid hormon ilişkili protein
<b>BMP</b>	: Kemik morfojenik proteini
<b>CSF-1</b>	: Koloni stimüle edici faktör 1
<b>ALP</b>	: Alkalın fosfataz
<b>RANK</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>M-CSF</b>	: Makrofaj koloni stimüle edici faktör
<b>RANKL</b>	: Nükleer faktör kappa B ligandı
<b>TNFR</b>	: Tümör nekrotizan faktör reseptör
<b>OPG</b>	: Osteoprotegerin
<b>Pm</b>	: Pikometre
<b>IL-1</b>	: İnterlökin-1
<b>IL-6</b>	: İnterlökin-6
<b>tgf-β</b>	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
<b>PDGF</b>	: Trombosit kökenli büyüme faktörüdür
<b>PMNL</b>	: Polimorfonükleer lökositler
<b>IGF-1</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü- tip 1
<b>FGF</b>	: Fibroblast kaynaklı büyüme faktörleri
<b>IV</b>	: İntravenöz
<b>AAOMS</b>	: Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi Derneği
<b>BRONJ</b>	: Bisfosfonata bağlı çene kemiği osteonekrozu
<b>MRONJ</b>	: İlaça bağlı çene kemiği osteonekrozu
<b>FDA</b>	: Yiyecek ve ilaç uygulamaları birliği
<b>GFR</b>	: Glomerular Filtration hızı
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>ANG</b>	: Anjiopietin
<b>5-FU</b>	: Standart 5-fluorourasil
<b>ONJ</b>	: Osteonekroz
<b>FBAVN</b>	: Femur başı avasküler nekrozu



<b>Mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>cm<sup>2</sup></b>	: Santimetrekaare
<b><math>\mu</math>M</b>	: Mikromolar
<b>nM</b>	: Nanomolar
<b><math>\mu</math>g</b>	: Mikrogram
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>sn</b>	: Saniye
<b>CAP</b>	: Kapsaisin
<b>CPZ</b>	: Kapzasepin
<b>Nm</b>	: Nanometre
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum İyonu
<b>[Ca<sup>+2</sup>]<sub>c</sub></b>	: Hücre içi Ca <sup>+2</sup> iyonu konsantrasyonu
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>SR</b>	: Sarkoplazmik retikulum
<b>PS</b>	: Osfatidilserin
<b>PE</b>	: Fosfatidiletanolamin
<b>PC</b>	: Fosfatidilkolin
<b>Apaf-1</b>	: Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1
<b>PM</b>	: Hücre zarı
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türlerinin
<b>ROS</b>	: Serbest oksijen radikalleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz enzimi
<b>LPO</b>	: Lipid peroksidasyonu
<b>Se</b>	: Selenyum

## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. MRONJ tedavi yaklaşımları .....	16
--	----



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Apoptotik bir hücrenin hücre zarı reaksiyon modellemesi. ....	38
Şekil 2. ZA, Bev ve Deks uygulanan osteoblastik hücre dizisinde (Saos-2) , Se'nin apoptoz, oksidatif stres ve TRPV1 kanalları vasıtasıyla kalsiyum birikimi üzerine olası moleküler yolları.....	70



## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Çalışmada Kullanılan ilaçlar.....	26
Resim 2. Işık mikroskobu, inkübatör .....	26
Resim 3. Laminar Flow Kabini.....	27
Resim 4. Saos-2 hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü .....	31
Resim 5. Hücre sayım cihazı.....	31
Resim 6. Western-blot aparatları.....	38
Resim 7. Florasan spektrofotometre cihazı.....	40
Resim 8. Plate Reader cihazı.....	41

## GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Saos-2 hücrelerinde ilaçların MTT (Hücre canlılığı) üzerine etkileri. ....	44
Grafik 2. Saos-2 hücrelerinde, ilaçların hücre içi serbest $Ca^{+2}$ iyonu konsantrasyonları ( $[Ca^{+2}]_c$ ) üzerine in vitro etkileri.....	45
Grafik 3. Saos-2 hücrelerinde ilaçların Apoptozis üzerine etkileri.....	47
Grafik 4. Saos-2 hücrelerinde ilaçların Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktiviteleri üzerine etkileri. ....	48
Grafik 5. Saos-2 hücrelerinde ilaçların hücre içi ROS üretimi üzerine etkileri. ....	50
Grafik 6. Saos-2 hücrelerinde ilaçların Prokaspaz 3 ve 9 üzerine etkileri. ....	52
Grafik 7. Saos-2 hücrelerinde ilaçların PARP üzerine etkileri. ....	54

## 1. GİRİŞ

Multiple myeloma, kemiğe metastaz yapan malignansiler, hiperkalsemi, Paget hastalığı ve osteoporöz tedavisinde bifosfonatlar ile diğer antirezorptif, antianjiyogenik ve steroid gibi ilaçların yaygın olarak kullanımıyla çene kemiklerinde osteonekroz vakalarının arttığı görülmektedir. Çenelerde ilaç kullanımına bağlı görülen osteonekroz vakaları 10 yılı aşkın bir süredir rapor edilmesine rağmen etki mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Klinisyenler ve araştırmacılar arasında, oluşma mekanizması hakkında farklı görüşler devam etmekte olup, çene kemiklerinde osteonekroz oluşmasıyla ilgili kabul görülen hipotezler; çene kemiklerinin remodelling kabiliyetinin değişmesi veya artmış kemik rezorpsiyonu, anjiyogenezisin inhibisyonu, devamlı mikrotravmalar, immün sistemin baskılanması, D vitamini eksiklikleri, inflamasyon, enfeksiyon ve yumuşak dokuda bifosfonat toksisitesi şeklindedir (32).

Bu hipotezler değerlendirildiğinde içeriğinde hücrel iyon değişimlerine bağlı gelişebilen oksidatif stres üzerinde durulmadığı görülmüştür. Hücrelerin işlevleri hücrel iyon değişimleri ile tetiklenmekte olup, canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda kalsiyum iyonları belirleyici rol oynamaktadır. Oksidatif stres ise serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermektedir ve bu dengesizlik doku hasarı ve hücre ölümü (apoptoz) ile sonuçlanmaktadır (112, 117).

Diğer yandan ilaca bağlı gelişen çenelerin osteonekrozunun etki mekanizması için, yumuşak dokular ve osteoklastlar üzerine etkileri ile ilgili birçok çalışma mevcut iken, osteoblastlar üzerine etkisi ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır (42-46).

Bu çalışmanın amacı; çeşitli yollarla çenelerde osteonekroz gelişmesine sebebiyet veren zoledronik asit, bevasizumab, deksametazon gibi ilaçların, kemik oluşumunda önemli görevi olan osteoblast hücrelerindeki kalsiyum sinyali, apoptoz ve oksidatif stres üzerine etkilerini araştırmak ve bu oluşturulan etkiye karşılık bir antioksidan olan selenyumun hücrel düzeyde ne gibi değişiklikler yarattığını in vitro model üzerinde incelemektir.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Kemik Dokusu

Erişkin iskeletinin ana bileşeni olan kemik dokusu, karakteristik hücreleri ve kalsifiye ekstraselüler matriksiyle birlikte bağ dokusunun özelleşmiş bir formudur. Vücuttaki diğer dokulardan farklı olarak bir yandan kemik formasyonunun, bir yandan da rezorbsiyonun olduğu eşsiz bir rejenerasyon kapasitesine sahip dinamik bir dokudur (1).

#### 2.1.1. Kemik Yapısı

##### 2.1.1.1. Kemik Matriksi

Kuru ağırlığının %65'ini oluşturan inorganik kısım; kalsiyum, fosfat, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyumdan meydana gelmektedir. Ana içeriği ise hidroksiapatit (HA) kristallerinden oluşmaktadır. Kuru ağırlığının %35'ini oluşturan organik kısmı esas olarak tip I kollajen oluşturmaktadır (1).

##### 2.1.1.2. Kemik Zarları

Kemikğin iç ve dış yüzeyleri; kemik yapan hücreler ve bağ dokusundan oluşan periost ve endosteum adı verilen 2 tabakayla örtülüdür. Periost ve endosteumun temel işlevi kemik dokusunun beslenmesi ve devamlı olarak yeni osteoblast sağlanarak, kemik büyüme ve onarımının gerçekleştirilmesidir(2).

### 2.1.2. Kemik Hücreleri

#### 2.1.2.1. Osteoprogenitor Hücreler

Mezenşimal hücrelerden köken aldıkları ve osteoblastlardan başka yağ hücreleri, kondroblastlar, kas hücreleri ve fibroblastlara da farklılaşma yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir. Osteoprogenitor hücreler büyüme-gelişme döneminde aktifken, erişkin hayatta ancak kırık iyileşmesinde veya farklı tipteki yaralanma durumlarında aktive olurlar (3).

#### 2.1.2.2. Osteoblastlar

Mezenşimal kök hücre kaynaklı olan osteoblastlar kemik yapıcı hücreler olup, osteoid dokuyu (kalsifiye olmamış kemik matriksi), kemik matriksini oluşturan tip I kollajeni, glikoproteinleri, proteoglikanları sentezlerler ve sonrasında da bu yapının kalsifiye olması için kalsiyum ve fosfat iyonlarının kemik içine ve dışına salınımlarını düzenlerler. Osteoblastlar; paratirioid hormon (PTH), paratiroid hormon

ilişkili protein (PTHrP), prostaglandinler, D vitamini metabolitleri, kemik morfojenik proteini (BMP), gonadal ve adrenal steroidler, bazı sitokinler, lenfokinler, koloni stimule edici faktör 1 (CSF-1) için reseptörler içerir. Bu reseptörler sayesinde düzenleyici faktörler osteoblastların aktivasyon, differensiasyon, proliferasyon ya da apoptozisini sağlarlar. Büyüme faktörlerinin kemik metabolizmasının düzenlenmesinde önemli görevleri vardır. Osteoblastlardan salgılanan büyüme faktörlerinin yeni kemik yapımını önemli derecede hızlandırdığı bilinmektedir. Osteoblastlar matris oluşumunu takip eden kalsifikasyon safhasında kalsifiye matris içine gömülerek osteositlere dönüşürler. Yapımdan çok rezorpsiyonun istenildiği fizyolojik durumlarda osteoblastlar; lenfokinler ve prostaglandinler tarafından osteoklastların aktivitesini arttırmak amacıyla uyarılabilirler. Osteoblastlar bu mediatörlerin yardımı ile osteoklastların ve çeşitli hemopoetik hücrelerin değişimini sağlarlar (1).

#### **2.1.2.3. Osteositler**

Osteositler, osteoblast kaynaklı lakünalar içindeki olgun kemik hücreleridir. Kemik dokusunda en çok bulunan hücre tipi olup tüm kemik hücrelerinin yaklaşık olarak %95'ini oluşturur. Kalsiyum homeostazında görev alan osteositler kemik matrisindeki kalsiyum ve diğer iyonlarını serbestleyerek osteoblastlara ve kemik yüzeyini döşeyen hücrelere transfer etmektedirler (1,4).

#### **2.1.2.4. Osteoklastlar**

İşlevleri kemiği rezorbe etmek olan, iri, çok çekirdekli hücrelerdir. Osteoklastların kemik yapan hücrelerle ilişkisi yoktur, kemik iliğinden köken alan mononükleer fagositer hücrelerin birleşmesiyle ortaya çıkarlar. Osteoklastların sahip oldukları hücre yüzey reseptörleri; CSF-1 reseptörü, kalsitonin reseptörü ve nükleer faktör kapp B (RANK)'dır. Osteoklastların differansiasyonu ve düzenlenmesi için osteoblastlar üç sinyal molekülü salgırlar. Bunlardan ilki olan makrofaj koloni stimule edici faktör (M-CSF), makrofaj üzerindeki reseptöre tutunarak osteoklast proliferasyonunu başlatır. Osteoblastların ikinci sinyal molekülü olan nükleer faktör kapp B ligandı (RANKL), aktive olan reseptöre yapışarak tek çekirdekli fagositlerin birleşerek çok çekirdekli hale dönüşmelerini sağlarlar. Osteoblastik hücrelerden salgılanan üçüncü sinyal molekülü ise tümör nekrotizan faktör reseptör (TNFR) ailesine ait osteoprotegerindir (OPG). RANKL sinyalinin makrofajlara bağlanmasını



inhibe ederek osteoklast differansiasyonunu sınırlandırır. Ayrıca OPG, osteoklastların diferansiyasyonunun yanı sıra rezorbsiyon kapasitelerini de düşürürler. Kemik metabolizması ve osteoklastik aktivite böylelikle düzenlenmiş olur. Hormonal osteoklastik aktiviteyi kalsitonin, PTH ve 1,25-dehidroksivitamin D3 kontrol etmektedir(1,3).

### **2.1.3. Kemik Türleri**

#### **2.1.3.1. Makroskopik Özelliğe Göre**

Kemik dokusu; korteks adını taşıyan, sıkı yapıda kortikal ( kompakt, lameller) kemik ile kemik iliği ve yağ dokusunu çevreleyen daha pöröz yapıdaki kansellöz (trabeküler, spongioz) kemikten oluşur (5).

#### **2.1.3.2. Mikroskopik Özelliğe Göre**

Kemiğin mikroskopik araştırması, primer ve sekonder olmak üzere 2 farklı tip kemik dokusu olduğunu göstermiştir. Primer kemik (olgunlaşmamış kemik dokusu, nonlameller kemik); intrauterin hayatta ve kemik iyileşmesi sürecinde oluşturulan genellikle geçici kemik oluşumlarıdır. Yaşam süresince yetişkinlerde primer kemik sekonder kemikle yer değiştirir, bu işleme remodeling (yeniden şekillenme) denmektedir. Sekonder kemiğe oranla daha az mineral ve daha fazla osteosit içerir. Sekonder kemik (olgunlaşmış kemik, lameller kemik) ise genellikle yetişkinlerde bulunur. Sekonder kemik dokusu primer kemik dokusundan daha kalsifiye ve daha güçlüdür (1,2).

#### **2.1.4. Kemik Histogenezi**

Kemik dokusu, intramembranöz kemikleşme ve endokondral kemikleşme olmak üzere 2 yolla oluşmaktadır. Yassı kemiklerin tamamı ile oksipital, mandibula, maksilla ve temporal gibi karmaşık yapıları kemikler intramembranöz kemikleşme şeklinde gelişir. Kemiğin gelişeceği yerde kemikleşme merkezi bulunur. Burada hücreler osteoblastlara dönüşmeye başlar. Yeni kemik matriksi oluşur ve kalsifikasyon ile devam eder. Birkaç bölgedeki kemikleşme merkezleri ile oluşan adacıklar ışınsal olarak büyür ve kaynaşır. Kemikleşme merkezleri çevresindeki zar periosta dönüşür. Uzun kemikler ve vertebralar gibi kemikler ise endokondral kemikleşme ile kemikleşir. Önceden oluşacak kemiğe benzeyen küçük bir model hyalin kıkırdaktan yapılı ve kemikleşme bu kıkırdak model içinden gelişir (2,3,6).

### **2.1.5. Kemik İyileşmesi**

Kemik iyileşmesi birbirini izleyen ve birbirleriyle iç içe geçmiş morfolojik dönemlerden oluşmaktadır (7).

1. İnflamatuar Dönem (1 - 4 gün)
2. Onarım Dönemi (2 - 40 gün)
3. Yeniden Şekillenme Dönemi (25 - 100 gün)

#### **2.1.5.1. İnflamatuar Dönem**

Kemik dokunun iyileşmesi, yara iyileşmesine benzer olarak birbiri içine geçmiş safhalardan oluşmaktadır. Yumuşak doku iyileşmesinde, yaralanan doku yerini fibröz skar dokuya bırakmaktadır. Ancak kemik doku iyileşmesi, yaralanan dokunun yerini, yeni kemik dokunun alması ile skarsız olarak sonlanmaktadır. Kemikte meydana gelen travma matrikste hasara, hücrelerde ölüme, periosteum ve endosteumda yırtıklara neden olur. Tüm doku travmalarında olduğu gibi kemik travmalarında da ilk verilen yanıt inflamasyondur. İnflamasyon 48 saatte pik seviyeye ulaşır ve travmadan sonraki bir hafta içerisinde tamamen sona erer. Travmayı takiben çevre yumuşak dokular ve periost yırtılarak, damarlar yaralanır. Kan, lenf ve doku sıvıları bölgede hematoma oluşturur (8,9). Hematom içerisindeki trombositlerden ve zarar görmüş kemik ve yumuşak dokulardan salgılanan inflammatuar mediatörler; kan damarlarının vazodilatasyonuna, plazma ekstravazyonuna ve travma bölgesinde ödem oluşumuna neden olurlar. Bölgeye inflammatuar hücrelerden polimorfonükleer lökositler (PMNL) ve takiben makrofaj ve lenfositler göç eder. Bu hücreler anjiogenezden sorumlu sitokinleri salgırlar. İnflamatuar cevap azalırken nekrotik doku ve eksüda rezorbe olur. Fibroblast ve kondrositler bölgede görülmeye başlar ve yeni matriks yapımıyla kallus oluşmaya başlar (11,12,13).

#### **2.1.5.2. Onarım Dönemi**

Onarım dönemi kemik iyileşmesinin en önemli kısmıdır. İnflamatuar hücreler nekrotik dokuları rezorbe ederken, fibroblastlar bölgeye gelerek tamir dönemini başlatırlar. İlk basamak hematomun organize olmasıdır. Tamir döneminde ilk 48 saat içinde periost, endosteum ve defekte yakın yerlerdeki Havers kanallarının tabakalarından hücre proliferasyonu başlar; defekt hattı boyunca rezorbsiyon devam eder. Hücre proliferasyonu sonucu defekt uçlarındaki boşluklar hücrelerle dolar.

Lokal aracılı mekanizmalarla öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, hücreler arası madde, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmaya başlarlar. Tamir için gerekli hücre çoğalmasının oluşumu, muhtemelen travma bölgesindeki elektriksel akımla başlamaktadır. Bu akım, kırık sonrası en yüksektir ve daha sonraki 2-3 hafta içinde yavaş yavaş azalır. Onarım evresi, kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7-12 gün sürer. Onarım olayında rol oynayan hücreler mezenşimal kökenli, çok yönlü gelişim gücüne sahip olan, pluripotent hücrelerdir. Bu hücreler çoğunlukla kırık bölgesindeki granülasyon dokusunun içinden, ayrıca periosteumun osteojenik tabakasından ve daha az oranda da endosteumdan köken alırlar. Bu hücreler farklılaşmaya başladığında, ilk değişikliğe uğrayan hücreler, kapillerle hematoma içine giren fibroblastlardır. Üçüncü günde karşı kırık uçlarında, yoğun olarak mezenşimal hücreler bulunur. Bu hücreler kırık parçaları arasında yumuşak bir granülasyon dokusu oluştururlar. Periosteal ve endosteal osteojenik hücrelerle, fibrin matriksteki fibroblastların çoğalıp farklılaşmasıyla, bir granülasyon dokusu gelişir. Fibroblastlar kollajen sentezlerken, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoidi salgırlar. Zamanla her iki kırık parçasının ucunda oluşan manşet tarzındaki kitle birleşerek, kırığa bütünlük sağlayan dış kallusu meydana getirir. Aynı şekilde ilik boşluğunda da benzer olaylar birbirini takip eder. İç kemik zarı ve iliğin kemik yapıcı hücresinden gelişen trabeküllerle, iliğin köprülenmesi oluşur ve iç kallus meydana gelir. İlk 7-12 günün sonrasında yumuşak kallus kitlesi, fibröz doku ve kırıkdaktan oluşmuştur. Kemik defekti uçları, iç ve dış kallus gelişimiyle çok sağlam bir yapıya kavuşur. Kallus oluşumu, yetişkinlerde çocuktan ve kompakt kemikte trabeküler kemikten daha yavaş meydana gelir. Yaralanmadan sonra kallus oluşması ve mineralizasyonu 4-16 hafta arasında zaman gerektirir. Kallus oluşumuyla beraber kaynamanın oluştuğu söylenebilir. Bununla beraber, kaynama henüz son noktasına ulaşmış değildir. Onarım evresinin ortasında, kallusun gereksiz ve etkisiz kısımlarının geri emilimi ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzanması ile yeniden şekillenme evresi başlar (14,15,16).

### **2.1.5.3. Yeniden Şekillenme Dönemi**

Kemiğin yeniden şekillenme dönemi en uzun evre olup, aylar hatta yıllar sürebilir. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın

güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümüdür. Onarım evresinin ortasında başlayan yeniden şekillenme evresinde 4 olay gerçekleşir:

1. Kalsifiye kırıldak, osteoid dokuyla yer değiştirir, böylece bir çeşit birincil trabeküler doku oluşur.
2. Lameller kemik bu dokunun yerini alır.
3. Kompakt kemik uçlarındaki kallus, lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşur.
4. İlik kanalı dereceli olarak yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus, osteoklastlar tarafından geri emilir ve boşluklar yeniden düzenlenir.

Kemik yüzeyinin eski haline döndüğü yeniden şekillenme evresi 1-2 yıl sürer. Fakat bu süre 6-9 yıla kadar uzayabilmektedir (17,18,19).

#### **2.1.6. Diş Çekiminde Yara İyileşmesi**

En yaygın oral yaralardan biri, diş çekimi sonrasındaki çekim soketidir. Çekim yaralarındaki iyileşme diğer yara iyileşmelerinden farklı değildir, fakat daha çok komplikasyon oluşturur. Çekim soketindeki yara iyileşmesi, kemik dokusunu da içeren, pıhtı oluşumu, reepitelizasyon, granülasyon dokusu formasyonu ve kemik formasyonu evrelerini içerir. Bu da çekim soketi yara iyileşmesinin, hem yumuşak doku iyileşmesini hem de kemik doku iyileşmesini kapsadığını göstermektedir.

Çoğu çekim soketi, çekimi takiben 8 hafta sonra kemikle dolar. Kemik remodelingi 6 ay süreyle kişiye özgü varyasyonları da içerecek şekilde kusursuzca devam eder (20,21).

#### **2.1.7. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler**

Kemik yapımı, yeniden şekillenmesi ve tamiri gibi hücresel işlevlerin uyumlu bir şekilde yürütülebilmesi için çeşitli sistemik ve lokal düzenleyici faktörlere ihtiyaç vardır. Sistemik hormonlar, tüm vücut değerleri üzerine etkili olurken, aynı zamanda hedef hücrelerden lokal düzenleyici faktörlerin salınımını da kontrol ederler. Lokal düzenleyici faktörler ise sınırlı alanlarda özellikli işlevlerin kontrolünü üstlenirler (22).

##### **2.1.7.1. Sistemik Faktörler**

Kemik metabolizmasının düzenlenmesinde, sistemik hormonların önemli etkileri vardır. PTH, kemik ve böbrekler üzerinde etkili olarak, kanda ve

ekstraselüler sıvıda kalsiyum düzeyinin yüksek tutulmasını, osteoblast reseptörlerini etkileyerek, yeni kemik yapımının durdurulmasını ve osteoklast uyarıcı faktörün salgılanmasını sağlayarak, kemik matriksinin rezorbe olması sayesinde kalsiyumun serbest kalmasını sağlar. Kalsitonin, PTH' nin antagonistidir. Hem kortikal, hem de kansellöz kemik yapımını artırır. Olgunlaşmış osteoklastlar üzerinde, osteoklastik aktivitelerini engelleyici bir etkisi vardır. Kortikosteroidler, anabolik ve katabolik etkisi olan PTH ve insülin benzeri büyüme faktörü- tip 1 (IGF-1) gibi hormonların etkinliğini arttırmaktadırlar. Kortikosteroidlerin aktif osteoblastlar üzerindeki etkilerinin çoğu engelleme yönündedir. Osteoblastların apoptozisine neden olarak, kemik yapımını engellerler. Östrojen ise kemik kütlelerinin korunmasında etkilidir. Östrojenlerin TGF- $\beta$  üretimini uyararak osteoklast ölümünde artışa yol açtığı düşünülmektedir (17,23,24).

#### **2.1.7.2. Lokal Düzenleyici Faktörler**

Kemik metabolizmasını etkileyen büyüme faktörleri, trombositler, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından salgılanmaktadır. Kemik iyileşme sürecinde damarlanmasını, sertliğini, mekanik olarak işlev görmesini sağlayan bu proteinler genel olarak, kemik iyileşmesini hızlandıran proteinler; BMP, IGF, TGF, PDGF ve fibroblast kaynaklı büyüme faktörleri (FGF)' dir. Bu proteinler monosit ve fibroblast gibi mezenşim kökenli hücrelerin göç etmesini, çoğalmasını ve kemik hücrelerine farklılaşmasını düzenlerler (25).

#### **2.2. İlaçlara Bağlı Gelişen Çenelerin Osteonekrozu**

Çenelerde görülen osteonekroz olgusu, nadir olarak görülen bir durum olup, çene kemiklerinin geçici veya daimi olarak kanlanması engellenmesine bağlı olarak kemik hücrelerinin ölümünü tanımlar. Bu hücreler arasında hematopoetik kök hücreleri, kemik iliği stromal hücreleri, preosteoblastlar, matur osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar yer alır. Osteonekroz kemiğin beslenmesindeki bozukluklardan kaynaklandığı için, endotelial hücreleri de etkiler. Bu nedenle osteonekroz tek başına bir hastalık olarak tanımlanmaz, kan akımının bazı faktörler tarafından kesilmesinin sonucu oluşan bir durum olarak değerlendirilir. Osteonekroz oluşumunda risk faktörü olarak sayılabilecek birçok neden bulunmaktadır. Bunlar arasında; alkolizm, yaygın steroid kullanımı, vaskülit-embolizm gibi vasküler problemler ve radyoterapi yer almaktadır (26).

Bisfosfonatlara bağlı çenelerde görülen osteonekroz olguları ise ilk kez 2003 yılında Marx (27) ve ardından da 2004 yılında Ruggiero ve ark. (28) tarafından bildirilmiştir. Bu olgular intravenöz (IV) bisfosfonatlarla tedavi edilen hastaların maksillofasiyal bölgelerinde iyileşmeyen, açığa çıkmış nekrotik kemik ile karakterize durumlardır. Bu ilk raporlardan beri olgu serileri bildirilmeye başlanmıştır. IV bisfosfonat pamidronate (Aredia®) ve zoledronik asit (Zometa®) reticisi Novartis Firması ilaç prospektüsüne ilacın çenelerde osteonekroza sebep olabileceği uyarısını koymuştur. Bunu 2005’de; oral preparatlarda dahil olmak üzere bütün bisfosfonatların komplikasyonlarına yönelik uyarıların ilaç prospektüsünde yer alması izlemiştir (29).

Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi Derneği (AAOMS), 2009 yılında yayınladıkları makalede, daha önce baş-boyun bölgesinden radyoterapi almamış, bisfosfonat kullanmış ya da kullanmakta olan hastaların çenelerinde 8 haftadan uzun süre mukozadan açığa çıkan kemik görüntüsünü ‘‘bisfosfonata bağlı çene kemiği osteonekrozu (BRONJ)’’ olarak tanımlamıştır (30). 2009’da yayınlanan makaleye göre hastalığın evreleri;

**Evre-0:** Klinik olarak nekrotik kemik yok, nonspesifik klinik bulgular ve semptomlar var.

**Evre-1:** Klinik olarak enfeksiyon bulgusu olmadan, asemptomatik hastalarda ekspoze ve nekrotik kemik var

**Evre-2:** Pürülan drenaj olmadan, ekspoze kemik bölgesinde eritem ve ağrı bulguları ile seyreden enfekte ekspoze nekrotik kemik var.

**Evre-3:** Ağrı olan hastalarda nekrotik ve açığa çıkmış kemik, aşağıdaki klinik bulgulardan birinin veya daha fazlasının varlığı;

- Alveolar kemik alanının dışında ekspoze ve nekrotik kemiğin genişlemesi (mandibulanın alt sınırı, ramus, maksillar sinüs ve maksillanın zigomatik çıkıntısı) sonucu patolojik fraktür oluşması;
- Ekstra-oral fistül; oroantral ve/veya oronazal bağlantı;
- Mandibulanın alt sınırı veya sinüs tabanında osteolizis alanının genişlemesi.

2014 yılında ise sadece bisfosfonatların değil aynı zamanda yeni çıkan kemoterapi ilaçlarının da aynı etkiyi göstermeleri nedeniyle durum güncellemesi

gerekmıştır. AAOMS, BRONJ terimi yerine; ilaca bağlı çene kemiği osteonekrozu (MRONJ) teriminin kullanılmasını önermiştir. Bu değişim; antirezorptif ve antianjiogenik ilaç tedavisiyle ilişkili maksilla ve mandibulayı içeren osteonekroz olgularının artan sayısı ile doğrulanmaktadır (31). 2014 MRONJ tanımına göre hastalar şu özelliklerin hepsine sahipse MRONJ olarak kabul edilebilirler:

- Antirezorptif veya antianjiogenik ajanlarla tedavi görmüş ya da görmekte olmaları,
- Maksillofasiyal bölgede 8 haftadan fazla süren intraoral veya ekstraoral sondalanabilir fistülü olan kemik veya ekspoze kemik durumu
- Çenede radyasyon terapi geçmişi ya da metastatik hastalık olmaması

İlk MRONJ olguları on yılı aşkın süre önce rapor edilmiş olsa da, hastalığın fizyopatolojisi tamamen açıklanamamıştır. MRONJ 'un özellikle çenelere özgün lokalizasyonunu açıklamaya çalışan mevcut hipotezler, bozulmuş kemik remodellingini veya kemik rezorpsiyonunun fazla baskılanması, anjiogenez inhibisyonu, sürekli mikrotravma, doğal veya kazanılmış bağışıklığın baskılanması, vitamin D eksikliği, yumuşak doku bifosfonat toksisitesi, enflamasyon veya enfeksiyonu içerir (32).

### **2.2.1. Çenelerde Osteonekroz Oluşumunda Risk Faktörü Olan İlaçlar**

#### **2.2.1.1. Antirezorptif İlaçlar**

##### **2.2.1.1.1. Bifosfonatlar**

Son on yılı aşkın bir süredir bisfosfonatlar, kemik mineralizasyonunun fizyolojik bir inhibitörü olmaları ve antianjiogenik özellikleri nedeniyle kemik metastazlarıyla seyreden meme, prostat, akciğer kanserleri, multiple myeloma gibi malignitelerin ve osteoporoz, osteopeni, Paget hastalığı, osteogenezis imperfekta gibi sistemik sağlık sorunlarının standart tedavisinde kullanılan pirofosfatların stabil karbon analoglarıdır (33). Bisfosfonatlar nitrojen içeriklerine göre alkilbisfosfonatlar (nitrojen içermeyen) ve aminobisfosfonatlar (nitrojen içeren) olmak üzere başlıca iki gruptan oluşmaktadır. Alkilbisfosfonatlar birinci kuşak bisfosfonatlar olup etidronat, tiludronat, klodronat; aminobisfosfonatlar ise ikinci ve üçüncü kuşak olup; ikinci kuşak bisfosfonatlar alendronat, pamidronat ve üçüncü kuşak bisfosfonatlar ise rizedronat, ibandronat ve zoledronik asit olarak kullanımdadır. Alkilbisfosfonatlar vücutta çok hızlı metabolize olan, gücü düşük olan bir grup iken,

aminobisfosfonatların gücü oldukça fazladır. Zoledronik asitin etkinlik gücü etidronata göre 10000 kat fazladır.(32,34).

Bisfosfonatların bilinen en önemli ve güçlü etkileri osteoklastik aktiviteyi inhibe etmeleridir. Bisfosfonatlar aynı zamanda osteoklastların diferansiasyonunu inhibe eder, ayrıca osteoblastik aktiviteyi de engeller (35). Ayrıca nitrojen içeren bifosfonatların ekstraselüler matriksteki tümör hücre tutulumunu, tümörün invazyonunu engelleme ve/veya tümör hücresinin apoptozunu sağlayarak metastazları kontrol etmek gibi antitümöral etkileri de bulunmaktadır (36,37,38). Bisfosfonatlar aynı zamanda vasküler obliterasyona neden olan anjiogenezisi engelleyecek aktiviteye sahiptir (37,38,39). Kan dolaşımında yarılanma ömürleri 30 dakikayla iki saat arasında değişmekle birlikte, kemikle birleşmiş metabolize olmayan bisfosfonatlar vücutta on yıl gibi uzun süreler yüksek konsantrasyonlarda varlığını sürdürür (40). IV bisfosfonatlar öncelikli olarak malignansiye bağlı hiperkalsemi, multiple myelomaya bağlı litik lezyonların tedavisi, meme kanseri, prostat kanseri ve akciğer kanseri gibi solid tümörlerde gelişen kemik metastazlarında iskelet sistemi ile ilişkili komplikasyonların engellenmesi için kullanılırlar. Bisfosfonatların kansere özgü sağkalımı artırma potansiyelleri tartışmalı olmasına rağmen, bu ilaçların kemik metastazı gelişmiş kanser hastalarında yaşam kalitesi üzerinde olumlu etkileri olmuştur. Yılda bir defa infüzyon yapılan zoledronik asit (Reclast®) ve 3 ayda bir uygulanan parenteral form olan ibandronate (Boniva®)'nın osteoporoz tedavisinde FDA onayları vardır. Bisfosfonatlar oral yolla sıklıkla menapoz sonrası gelişen osteoporöz ve aynı zamanda osteopeni tedavisinde kullanılmaktadır. Daha az sıklıkla Paget hastalığı ve çocuklukta görülen osteogenezis imperfektada kullanılmaktadır. En yaygın kullanımı osteopeni ve osteoporozistir (41).

Bifosfonatların hücresel düzeyde mekanizmasına bakıldığında; bifosfonatlar kemik iliğinden osteoklast farklılaşmasını inhibe ederler. Bunun yanısıra mekanizma içerisinde osteoklastların kemik yüzeyindeki aktivitesi de önemli bir yere sahiptir. Bunun nedeni hücre iskeletindeki ve dalgalı yüzeydeki değişiklikler ve membran karakteristiğindeki bozulmalar özetle hücre morfolojisindeki bozulmalardır. Osteoklastlardaki bir diğer etki ise hücrenin ömrünü kısaltması, sitotoksik etki ile sayısını azaltması ve apoptosisi indüklemesidir (35,42,43,44). Bifosfonatlar



osteoklast prekürsörlerini etkileme yoluyla da kemik rezorpsiyonunu inhibe etmektedir. Osteoklast prekürsör hücrelerinin transformasyonu, maturasyonu ve füzyonu bazı kemik matrix faktörlerinin tanınmasının engellenmesi yoluyla inhibe edilmektedir (35,44). Bifosfonatların osteoblastlara olan etkisi osteoklastlara olan etkisi kadar iyi açıklanamamıştır. Bifosfonatların osteoblast proliferasyonunda hem inhibisyon, hem de stimülasyon yarattığı öne sürülmektedir. Osteoblastlarla birlikte birçok bağ dokusu hücrelerinin de proliferasyonunda inhibisyon olduğu gösterilmiştir (45,46). Aminobifosfonatlar terapötik dozlarda osteoblast diferansiasyonunu ve kemik depozisyonunu stimüle ederler. Yüksek dozlarda ise osteoblastlara sitotoksik etki göstererek apoptozislerine neden olurlar (47). Osteoblastların osteoklast aktivitesi üzerindeki regülasyon etkisi ile osteoblastlardan salgılanan "osteoklast stimüle edici faktör"ün azalması yada "osteoklast inhibe edici faktör"ün artması nedeniyle bifosfonatların osteoblast yoluyla osteoklast formasyonunu inhibe ettiği de düşünülmektedir (45,48). Böylece osteoblastların fonksiyonu doğrudan ve dolaylı olarak bifosfonatlardan etkilenmiş olur.

#### **2.2.1.1.2. RANK Ligand İnhibitörleri (Denosumab)**

RANK ligandlarına karşı tamamen insanlaştırılmış antikör olarak var olan bir antiresorptif ajandır. RANKL osteoklast gelişimi için gerekli olduğu gösterilen ve kanser hücreleri tarafından salgılanan en kritik pro-osteoklastojenik faktördür. Denosumab osteoklast aktivitesini ve buna bağlı olarak kemik rezorpsiyonunu inhibe eder. Kemik metastazlı meme ve kastrasyona dirençli prostat kanseriyle yapılan son çalışmalarda iskelet ilişkili olayları önlemede ve geciktirmede zoledronik asitten biraz daha üstün olduğu olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, zoledronik asit gibi metastazla ilişkili kemik ağrılarını azalttığı gösterilmiştir (49). Denosumab kullanımının subkutanöz olması, renal monitörizasyon gerektirmemesi ve doz ayarlaması gerektirmemesi açısından zoledronik asitten daha üstün olduğu sonucu çıkarılmıştır (50). Denosumab ilişkili çene kemiklerinde osteonekroz halen tam olarak anlaşılammıştır. Kanser hastalarında renal komplikasyonu az oranda gerçekleşip iskelet ilişkili olayları önlemede oldukça etkin olsa da çene kemiklerinde osteonekroz görülme olasılığı zoledronik asite benzer (zoledronik asit %1,3, denosumab %1,8) veya istatistiksel olarak anlamlı olmasa da göreceli olarak yüksek (zoledronik asit %1,denosumab %2) bulunmuştur (51). Literatüre göre Denosumab

ilişkili çene kemiklerinde osteonekroz insidansı %0-%4,7 olarak belirtilmektedir (52,53,54). 52 vakalık Denosumab ilişkili çene kemiklerinde osteonekroz serisinde diş çekimine bağlı oluşu %59,6 iken, oral enfeksiyonla %50 oranında ilişkili olduğu belirtilmiştir (55). Lancet Onkoloji dergisinde yayınlanan denosumabla ilgili uluslararası klinik araştırma da histolojik olarak dev hücreli kemik kanseri olan 282 hasta üzerinde çalışmada; hastaların %1'inde çenede kemiklere kan akışının engellenmesi sonucu osteonekroz oluştuğu, %5'inde ise, kanda kalsiyum miktarının azaldığı (hipokalsemi) gözlenmiştir (56).

### **2.2.1.1.3. Antianjiogenik İlaçlar**

Anjiogenezis inhibitörleri yeni kan damarı oluşumuna müdahale ederek; gastrointestinal tümör, böbrek kanseri, endokrin tümörler ve diğerlerinin tedavisinde kendilerini göstermişlerdir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü(VEGF) ve anjiopietin(ANG) gibi pro-anjiogenik faktörler; endotelyal hücre büyümesi, migrasyon ve damar formasyonunu etkileyerek birçok dokuda olduğu gibi iskelette de damarsal büyümenin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (57,58). Bu faktörler osteoblastları ve osteositleri içeren kemik hücreleri tarafından üretilebilmektedirler (59,60). Salınımları kemik-türevi sitokinleri, hipoksiyi ve kemik dokusunun yaralanmasını içeren bir uyarıcı ile sağlanır (60). Ayrıca in vitro çalışmalarda VEGF molekülünün osteoblast sağ kalımının etkili bir düzenleyicisi olabileceği ileri sürülmüştür (58). Bevasizumab; VEGF molekülünün inhibisyonunu hedef alan, nüks etmiş veya metastatik kolorektal kanserli hastaların tedavisinde kullanımı onaylanmış monoklonal bir antikordur (61). Tümörün büyümesi için gerekli olan yeni damar oluşumunu ve tümörün büyümesini inhibe edebilir. Tümörlerde interstisyel basıncı düşürdüğü, tümörün oksijenlenmesini arttırdığı ve bu şekilde kemoterapi ajanlarının tümöre ulaşma ve onunla etkileşme sürecine katkıda bulunduğu ortaya konmuştur. Standart 5-fluorourasil (5-FU) temelli kemoterapi rejimlerine eklendiği zaman hastaların genel sağ kalımında artışa neden olduğu gösterilmiştir (62). Bevasizumab oldukça iyi tolere edilebilmesine rağmen hipertansiyon, proteinüri, tromboembolizm, bozulmuş yara iyileşmesi, kanama, özellikle anastomoz hattında perforasyon, reversible lökoensefalopati sendromu, döküntü, infüzyon ilişkili hipersensitivite reaksiyonları gibi yan etkilere neden olabilmektedir (63). Bir anti-anjiogenik ajan olan Bevasizumab da osteonekroz

riskini artıran bir ilaçtır (27,64,65,66). Bevasizumaba bağlı çenelerde osteonekroz (ONJ) görülme insidansı %0.2'dir (67). Bevasizumab kullanımına bağlı ilk osteonekroz vakası bildirimini 2008 de Estilo tarafından yapılmıştır (68).

Bevasizumabın dışında ilk olarak 2006'da Amerika'da kullanılmaya başlanmış ve uzun dönemdeki yan etkileri tam olarak bilinmeyen antianjiogenik bir ilaç olan Sunitinib(69,70) kullanan hastalarda ONJ olguları bildirilmemiştir. Ancak ONJ ile ilişkili ilaçlarla kombinasyon olarak reçetelenmesi, ileride ONJ ile ilişkisinin çıkabileceğinin beklenmesi mümkündür (31).

## **2.2.2. MRONJ için Risk Faktörleri**

### **2.2.2.1. Sistemik Risk Faktörleri**

Düzenli/ uzun süreli antirezortif/antianjiogenik ilaç kullanımı ve uygulama yolu, yaş, sigara kullanımı, diabetes mellitus, kortikosteroidler, immünsüpresifler, kemoteropötikler, pıhtılaşma bozukluğu hastalıkları, alkolizmve renal dializ sistemik risk faktörleri arasında görülmektedir. Multipl myelom hastalarında antineoplastik ilaçlar ve kortikosteroidlerin MRONJ riskini arttırdığı gösterilmiştir (71). Diğer sistemik risk faktörleri eritropoetin tedavisi, diyaliz, diabetes mellitustur (71,72). Hipoparatiroidizmin de MRONJ oluşmasıyla alakalı olduğu rapor edilmiştir (73). Bazı yayınlarda da MRONJ hastalarında en yaygın sistemik hastalıkların, hipertansiyon ve kardiyak rahatsızlıklar olduğu belirtilmektedir (74,75). Yaşamda geçirilen her bir sene MRONJ riskini artırmaktadır(71). Sigara kullanımı da risk faktörü olarak kabul edilmektedir (76). Cinsiyet bu durumu etkilememektedir (30).

### **2.2.2.2. Lokal Risk Faktörleri**

MRONJ oluşumu için diş çekimleri/ dental abseler, tüm dentoalveolar cerrahiler, periodontitis, kötü oral hijyen, protez travması, ince oral mukoza ve kemik ekzostozları/torusları gibi durumların lokal risk faktörleri olduğu bilinmektedir (77). Kanser hastalarında yapılan bir çalışmada; MRONJ risk oranının diş çekimine bağlı olarak 18 kat, protez irritasyonuna bağlı olarak ise 2 kat arttığı rapor edilmiştir (78). Diş çekimi sonrası pıhtı formasyonu yerini granülasyon dokusuna ve osseöz yapı oluşturmak için final mineralizasyona bırakır. Maksilla ve mandibula gibi yüksek kemik döngüsü bulunan iskelet bölgelerinde bifosfonatların daha fazla birikmesine bağlı olarak, bifosfonat bağlı kemik dokular daha yavaş rezorbe olur (79). Bakteriler tarafından kontamine olmuş bu kemik tamamen rezorbe olmaz ve bu iyileşmesi

gecikmiş açık yara bakteriyal invazyon riskini artırmaktadır. Bu durum da kronik osteomyelit oluşması için ortam sağlamış olur (80). Periodontal hastalıklar da MRONJ için potansiyel risklerden biridir (81). Mandibulanın MRONJ insidansı maksillaya nazaran belirgin oranda yüksektir ve oral mukozanın ince olduğu özellikle ekzostoz, keskin mylohyoid kenar ve mandibular torus gibi alanlarda daha yaygındır (82).

### **2.2.3. MRONJ Tedavisi**

2009 yılından günümüze güncelliğini koruyan evreye özgü MRONJ için tedavi gereksinimi AAOMS tarafından belirlenmiştir. Evre 0 ve 1 için konservatif tedavi, evre 2 için yüzeysel debridman ve evre 3 için debridmanı içeren konsept Tablo 1’de gösterilmiştir(30).

Genel olarak MRONJ tedavisi için iki tip tedavi yaklaşımı mevcuttur. Bunlardan ilki konservatif yaklaşım iken, diğeri ise ciddi olgularda nekrotik ve ekspozite kemiğin çıkarılmasından sonra mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için sıkıca dokunun kapatılması olan daha agresif bir yaklaşımı içerir (83).

Tedavi protokolünde bu temel yaklaşımın yanısıra destekleyici tedavi amacıyla, hiperbarik oksijen, cerrahi kemik greftleme, büyüme faktörü ile kemiğin stimüle edilmesi, doku mühendisliği uygulamaları ve düşük dozlu lazer terapisi (LLLT) uygulanmaktadır (84).

### **2.2.4. Kortikosteroid Kullanımı**

Kortikosteroidler uygun terapötik dozlarda immunsupressif ve antiinflamatuvar etki gösteren ilaçlardır. Kortikosteroid kullanımı sırasında birçok yan etki ile karşılaşmaktadır (85). Osteoporoz kemik metabolizması üzerine bilinen ve yaygın görülen bir yan etkisi iken, avasküler nekroz daha nadir bir yan etkisidir (86). Kortikosteroidlerin risk oluşturması doza ve alım süresine bağlıdır. Toplamda 2000–4000 mg üzerinde aralıksız steroid alımının osteonekroz gelişimi için eşik değer olduğu kabul edilmektedir. Ancak düşük doz kortikosteroid alımlarından sonra da femur başında osteonekroz geliştiği rapor edilmiştir (87). Osteoporoz, kortikosteroidlerin büyük oranda önlenebilen ve iyi bilinen bir yan etkisidir.

**Tablo 1. MRONJ tedavi yaklaşımları**

Evre	Tanım	Tedavi stratejisi
0	Klinik olarak nekrotik kemik bulgusu olmamasına karşın spesifik olmayan klinik bulgular ve semptomların varlığı	Ağrı medikasyonu ve antibiyotiği içeren sistemik tedavi
1	Enfeksiyon bulguları bulunmayan asemptomatik hastalarda ekspoze ve nekrotik kemik varlığı	Antibakteriyel ağız yıkama Klinik takip Hasta eğitimi ve devam eden bifosfonat tedavisi için doktoru ile konsültasyon
2	Pürulan drenaj görülen veya görülmeyen ekspoze kemik bölgesinde eritem veya ağrı bulguları gibi enfeksiyon belirtileri ile birlikte ekspoze ve nekrotik kemik varlığı	Oral antibiyotikler ile semptomatik tedavi Oral antibakteriyel ağız gargarası Ağrı kontrolü Yumuşak doku irritasyonunu azaltmak için yüzeysel debridman
3	Ağrı, enfeksiyon ve aşağıdaki bulgulardan bir veya daha fazlasına sahip hastalarda ekspoze ve nekrotik kemik varlığı: Alveolar kemik bölgesini aşan ekspoze ve nekrotik kemik varlığı, (mandibula alt sınırı ve ramusu, üst çenede ise maksiller sinüsü ve zigomayı içeren) patolojik fraktürler, ekstraoral fistüller, oroantral/oro nazal bağlantılar, mandibula alt sınırını veya sinüs tavanını aşan osteolizis görülmesi	Antibakteriyel ağız gargarası Antibiyotik tedavisi ve ağrı kontrolü Uzun dönem ağrı ve enfeksiyonu hafifletmek adına cerrahi debridman/ rezeksiyon

Sistemik kortikosteroidler kemik yıkımını hem direkt hem de indirekt yoldan etkiler, büyüme hormonu salınımını baskırlar, IGF-1 sentezini inhibe ederler. Büyüme faktörlerinin inhibisyonu sonucunda osteoblastların sayı ve aktivitelerinde azalma olur. Osteoklastlar direkt olarak aktive olur. Diğer yandan bağırsak mukoza hücrelerinden kalsiyum emilimi azalır. Böbreklerden kalsiyum ve fosfat atılımı artar. Böylece gelişen hipokalsemi, sekonder hiperparatiroidizme neden olur. Kemikğin yeniden yapılanma hızı artar, ancak osteoblastlar baskılandığı için yetersiz kemik yapımı söz konusudur. Sonuçta kemikte rezorpsiyonu ve osteoporoz gelişir. Bu etkiler doz ve süreye bağımlı olup, yüksek doz ve uzun süreli etki artar (88). Steroid kullanımına bağılı gelişen osteoporozun tedavisinde çeşitli antirezorptif ilaçlar, D vitamini ve kalsiyum kullanılmaktadır.

Femur başı avasküler nekrozu (FBAVN) vasküler desteğin kaybına bağılı bölgesel kemik dokusunun ölümü ya da nekrozu olarak tanımlanmaktadır. FBAVN oluşumuna yol açan birçok hastalık bildirilmiş ve çok sayıda teori üzerinde durulmuştur. Kortikosteroid kullanımı, alkol, hemoglobinopatiler, disbarizm, depo hastalıkları FBAVN 'ye yol açarlar. Bunların arasında steroid kullanımının neden

olduğu osteonekroz önemli bir grubu oluşturur. Kullanılan steroidin dozu ve kullanım süresinin avasküler nekroz gelişimindeki rolü halen tartışılmaktadır (89). Uzun süreli kullanılan kortikosteroidler kemikte, özellikle femur başında, radius, ulna ve vertebralarda aseptik nekrozlara yol açabilirler. Bu hastaların çoğunda nekrozlar ilacın kesilmesinden uzun süre sonra bile ortaya çıkabilmektedir. Çene kemiklerinde sadece kortikosteroid kullanımına bağlı bu tarz bir nekroz rapor edilmemiştir. Ancak bisfosfonatlarla kombine kullanılan kortikosteroidlerin osteonekroz riskini arttırdığını belirten çalışmalar mevcuttur (71).

### **2.3. Hücre Haberleşmesi**

#### **2.3.1. Kalsiyum İyonu ( $Ca^{+2}$ ) ve Apoptoz**

Programlı hücre ölümü olan apoptozisin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bu mekanizma hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olmasıyla başlamaktadır (90). Ayrıca apoptozis mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apoptozisi etkileyen uyarıların bazıları şu şekilde sıralanabilir (91):

1. Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi,
2. Hücre içi kalsiyum miktarındaki artış
3. DNA hasarı nedeniyle bir tümör supressör gen olan p53'ün aktive olması
4. Viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve kortikosteroidler
5. Tümör nekroz faktör (TNF)
6. Sitokinler

Hayatın ilk basamağı olan fertilizasyondan başlayarak gen transkripsiyonu, kas kasılması, hormon salınımı, hafıza, öğrenme, hücrelerin farklılaşması, gelişmesi, nekroz ve apoptozla tanımlanabilecek hücre ölümü gibi birçok olaydan sorumlu olan bir hücre içi ikincil haberci olan kalsiyumun evrenselliği, birçok hücreyel reaksiyonda üstlendiği görevden kaynaklanmaktadır. İstirahat halindeki bir hücrede hücre içi  $Ca^{+2}$  iyonu konsantrasyonu ( $[Ca^{+2}]_c$ ) yaklaşık olarak 100 nM civarındadır. Depolarizasyon, hormon aktivasyonu vb. olaylar hücredeki  $[Ca^{+2}]_c$  artış mekanizmalarını tetikler ve konsantrasyonu hücre tipine bağlı olarak 10-20 bin misli artarak 1-3  $\mu$ M seviyelerine yükselebilir. Bu yükselmenin tüm fizyolojik olayları kontrol edebilmesinin sırrı hızı, genliği, yer ve zamanla (spatio-temporal) ilgili

modelinden kaynaklanmaktadır. Hücre içi  $Ca^{+2}$  sinyali de  $[Ca^{+2}]_c$  geçici bir şekilde artışından oluşur.  $Ca^{+2}$  'un sinyal üretime yönelik fonksiyonu sitozolik miktarının artması ile doğru orantılıdır (92-95). Bu artış nükleustan sızma yolu ile olabileceği gibi sadece mitokondriden tek başına da olabilir (96).  $[Ca^{+2}]_c$  eş zamanlı birçok ters yönlü etkileşim neticesinde artabilmekte veya azalabilmektedir. Bu olayları artmaya ya da azaltmaya yönelik olarak açma-kapama şeklinde özetlemek de mümkündür.  $[Ca^{+2}]_c$  artış mekanizmaları hücre dışından hücre içerisine yönelik, hücre zarına yerleşik vaziyetteki iyon kanalları ile endoplazmik retikulum (ER) ve sarkoplazmik retikulum (SR) yüzeyindeki iyon kanalları vasıtası ile olmaktadır (97). Buna zıt olarak  $[Ca^{+2}]_c$  azalışı da hücre zarında ve ER/SR deki istihdam edilen  $Ca^{+2}$  ATPaz'larla, yoğunluk farklılığından kaynaklanan ve enerji harcanması ile neticelenen bir takım değiş-tokuş mekanizmaları ( $Na^+/Ca^{+2}$ ) tarafından sağlanır.  $[Ca^{+2}]_c$  seviyesinin düzenlenmesinde mitokondri önemli rol oynar. Mitokondri  $Ca^{+2}$ 'a karşı düşük afinite göstermesine karşılık, çok fazla oranda depolama kapasitesine sahiptir. Bu özelliği sayesinde  $[Ca^{+2}]_c$  miktarını azaltmada dolayısı ile de hücre sel cevap (azaltarak) oluşumunda etkin rol oynamaktadır.

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir (98). Apoptotik uyarım alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur; bu yapı "zeiozis" olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Hücre zarında iç yüzeyden dışarıya fosfatidilserin translokasyonu olur. Plazma ve çekirdek kondenzasyonunu takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir. Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde sitozolik  $Ca^{+2}$  düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. Kromatin kondenzasyonu, nükleozomlar arasındaki bağlantı bölgelerinin ayrılması ile karakterizedir. 180-200 baz çiftinden oluşan parçalar, elektroforezde ip merdiven (ladder) görüntüsü oluşturur (99). İternükleozomal DNA parçalanmasının kalsiyum artışına duyarlı endonükleazlar ile olduğu ileri sürülmektedir. Endonükleazlar timositler gibi bazı hücrelerde yapısal olarak bulunur, bazı hücrelerde ise apoptozis başlamasından önce transkripsiyon ile oluşturulur. Hücrenin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili

"apoptotik cisimcikler" oluşur. İki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi, hücre zarının bir özelliğidir. Fosfolipidler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) ve dış tabakada bulunan fosfatidilkolin (PC) asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptozis sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu PS'nin dış yüzey tabakaya yerleşmesi ile sonuçlanır. Bu durum, apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır (100). Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptozis 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır (98). Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir ve stabilizasyonu apoptozisi engellemektedir. Apoptotik hücrelerin dokudan uzaklaştırılması ve yerine yenilerinin konması ise günlük  $1 \times 10^{11}$  hücre olarak tahmin edilmektedir ve bu yetişkin bir bireyin total vücut ağırlığının her 18- 24 ayda bir değişimine eşittir (101). Reaktif oksijen türleri neticesinde oluşan iç hasarlar hücrenin içindeki özel bir sistem ile algılanır. Bu da mitokondrinin yüzeyinde bulunan B-cell lymphoma 2 (BCL-2) proteininin, BCL2-associated X (Bax) adlı bir başka protein ile etkileşime girmesine sebep olur. Bunun neticesinde ise mitokondrinin yüzeyinde delikler oluşur. Bu deliklerden ise sitokrom C adlı moleküller salınır. Sitokrom C molekülleri Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1 (Apaf-1) adlı başka proteinlerle etkileşir ve apoptozom adlı özel bir molekül meydana gelir. Apoptozom görevi ise Kaspaz-9 adlı inaktif molekülü aktif hale çevirmektir. Kaspaz-9'un aktif hale geçmesi ile zincirleme bir reaksiyon meydana gelir ve diğer başka bazı kaspazlar aktif olur ve hücrenin ölümü adım adım gerçekleşir (102).

#### **2.3.1.1. Hücre İçerisine $Ca^{+2}$ Giriş Kanalları**

Hücre içerisine  $Ca^{+2}$  'un girişi büyük bir elektrokimyasal konsantrasyon farklılığının olması durumunda gerçekleşir (103). Hücreler bu dış kaynağı farklı özellikteki kanallar vasıtasıyla kullanırlar. Hücreler  $Ca^{+2}$  'un hücre içerisine girmesine neden olabilecek aktivasyon mekanizmalarına göre gruplandırılmış farklı tipte kanallardan faydalanırlar. Bu kanallar;

1. Voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları (VOCCs)
2. Reseptöre duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları (ROCCs)



3. Mekanik olarak aktive olan  $Ca^{+2}$  kanalları
4. Depolanmış  $Ca^{+2}$  miktarına duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları (SOCCs) başlıkları altında sınıflandırılabilirler.

#### **2.3.1.1.1. Voltaja Duyarlı $Ca^{+2}$ Kanalları**

Kas ve sinir hücreleri gibi plazma membranının depolarizasyonu sonucu aktive olabilen, uyarılabilen hücre tiplerinde bulunurlar. Sinir uçlarında nörotransmitter salınımının tetikleyicisi, voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığıyla hücre içine giren kalsiyum iyonudur.

#### **2.3.1.1.2. Reseptöre Duyarlı $Ca^{+2}$ Kanalları**

Bu tip  $Ca^{+2}$  kanalları yapı ve fonksiyonu itibariyle farklılık arz eden ve salgı hücreleri ve sinir sonlarında sıkça rastlanan bir dizi kanaldan oluşmuşlardır. En iyi bilinen ROCCs'ler nikotinik asetilkolin ve N-methyl-D-aspartate reseptörlerini içerirler. ROCCs'ler hücre yüzeyinde bulunan özel alana, agonistin bağlanması ile aktive olurlar. Farklı tipteki ROCCs'ler çok geniş bir agonist yelpazesi içerisinde çeşitlilik gösterirler (Örn: ATP, Serotonin, glutamat ve asetilkolin).

#### **2.3.1.1.3. Depolanmış $Ca^{+2}$ Miktarına Duyarlı $Ca^{+2}$ Kanalları**

Hücre içi  $Ca^{+2}$  depolarının boşalmasına cevap olarak aktive olabilecekleri gibi farmakolojik bir ajan veya fizyolojik olarak  $Ca^{+2}$ 'u hareketlendirecek haberciler tarafından aktive olurlar (104) .

$Ca^{+2}$  depolarının patlatılmasından kaynaklanan  $Ca^{+2}$  girişi artmasının birçok hücre tipinde görülmesinden dolayı SOCCs'ler PM'deki en yaygın  $Ca^{+2}$  kanal alt tipi olabilirler (105). Bu kanalların elektrofizyolojik olarak deneyleri de yapılmış ve hücre tipine göre farklılıklar arz ettiği görülmüştür. Her bir hücre tipinin farklı tipte SOCCs kanalına sahip olduğunu belirtilmiştir. Günümüzde SOCCs'lerin en iyi örneği Drosophila türlerinde görev yapan transient reseptor potansiyel (TRP) olarak adlandırılan homolog yapıdaki proteinlerdir (106).

#### **2.3.1.2. Kalsiyum Salınımı**

##### **2.3.1.2.1. Hücre İçi Depolardan $Ca^{+2}$ Salınımı**

Herhangi bir zamanda intrasellüler kalsiyum miktarı artış mekanizmaları olarak bilinen ve sitoplazmaya  $Ca^{+2}$  girişini temin eden reaksiyonlar; bufferlar, pompalar ve değiş-tokuşcular ile  $Ca^{+2}$ 'un sitoplazmadan uzaklaşmasına yardımcı olan olayların denge halinde olması sonucu gerçekleşir. Hücre içerisinden kalsiyum

salınımı birçok çeşit haberci aracılığıyla aktive olan kanallar vasıtası ile ve mitokondriyal geçirgenliğin arttığı durumlarda gerçekleşir (107).

### **2.3.1.2.2. Transient Reseptor Potential (TRP) Üst Ailesi**

“Transient Receptor Potential (TRP)” katyon kanalları üst ailesi voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$ 'a geçirgen katyon kanallarıyla geniş bir yelpaze oluşturmaktadır. 28 adet memeliye ait TRP kanalları altı alt birime ayrılmıştır. Bunlar; TRP conancial (TRPC) yedi alt birimden, TRP vanilloid (TRPV) altı alt birimden, TRP melastatin (TRPM) sekiz alt birimden, TRP polycystein (TRPP) üç alt birimden, TRP mucolipin (TRPML) üç alt birimden ve TRP ankyrin (TRPA) bir alt birimden oluşmaktadır. Tüm bu TRP katyon kanalları henüz tam olarak karakterize edilememesine rağmen, birçok hastalık onlarla ilişkili olarak ortaya çıktığından bu tip iyon kanallarına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (110).

TRPV1 kanalları vanilloid grubu içerisinde yer almaktadır ve memelilerin birçok fizyolojik, patolojik ve hastalık durumlarında rol oynamaktadır. Bununla beraber, en önemli rolünün periferal ağrının oluşumunda olduğu gözlenmiştir. Kapsaisin, düşük pH ve ısı içeren uyarımların bir çoğu seçici olmayan katyon kanallarından (TRPV1)  $Ca^{+2}$  hücre içine girişine sebep olur. TRPV1 zararlı birçok uyarımdan sorumlulukta işaret verici olarak rol alabilir. TRPV1'in tekrar eden aktivasyonunda ölümcül hücre yaralanmaları; oksidatif stress ve sitozoldeki serbest kalsiyumun artışının sonucudur (109,110).

### **2.3.2. Oksidatif Stres**

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretilmesiyle biyolojik bir sistemin reaktif ara ürünleri kolayca detoksifiye etme (zehirsiz hale getirme) ya da oluşan hasarı onarma yeteneği arasındaki bir dengesizliği belirtir. Dokuların normal redoks (yükseltgenme indirgenme) safhasındaki bozukluklar, peroksitlerin ve serbest radikallerin üretilmesiyle toksik etkilere neden olabilir. Bunlar, proteinler, lipitler ve DNA gibi bütün hücre bileşenlerine zarar verir. Bazı reaktif oksidatif türler, redoks sinyali adı verilen bir olgu vasıtasıyla haberci görevi bile görebilir. İnsanlarda oksidatif stres, orak hücre anemisi, aterosklerosis (damar sertliği), Parkinson hastalığı, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, Alzheimer hastalığı, şizofreni, bipolar bozukluk, kırılğan X sendromu, kronik yorgunluk sendromu gibi birçok hastalıkla ilişkilidir.

### 2.3.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan, fizyolojik ve patolojik birçok süreçte üretilen oldukça aktif moleküllerdir. Kararsız bir yapıya sahip olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girerler ve son yörüngelerinde bulunan elektronlarını diğer moleküllerle paylaşırlar. En dış orbitalinde paylaşılmamış elektron bulunması, o serbest radikalın reaktivitesinin çok fazla olduğunu belirtir (111). İnsan vücudundaki tüm hücrelere kolaylıkla girebilen ve hücreler tarafından en çok kullanılma özelliğine sahip olan oksijen molekülü ( $O_2$ ), kimyasal yapısı gereği radikal olmaya çok uygundur. Bu yüzden serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri (ROS) ifade edilmektedir. Genel olarak reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinen bu moleküller normal şartlar altında organizmada sürekli olarak oluşmaktadır (112).

İnsan vücudunda serbest radikaller 3 yolla meydana gelir:

1. Kovalent bağların homolitik kırılması
2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi
3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla

Radikal olmayan türler, bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sırayla serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (113). Nitrojen ( $N_2$ ) ve Oksijen ( $O_2$ ) molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır.  $O_2$ 'in kısmi indirgenmesinden, ROS olan hidroksil ( $OH^\cdot$ ) radikali ve  $O_2^{\cdot-}$  oluşmaktadır.

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Endojen kaynaklı etmenler organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşur. Oksijen, nitrik oksit, aktive nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı, araşidonik asit metabolizması başlıca endojen kaynaklardır. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında; diyet faktörleri, stres, çevresel faktörler (hava kirliliği), ilaçlar, ksenobiyotikler, zararlı ışınlar (x-ray, U.V. vs.) yer alır (114-116).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızındaki artış ya da ortadan kaldırılma hızında ki bir düşüş dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermektedir (117). Antioksidan savunma mekanizması ve serbest radikaller arasındaki denge oksidanlar lehine bozulduğunda serbest radikaller; membran lipitleri, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır. Malignite, diabetes mellitus, ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalık gibi birçok patolojik olayla ilişkili olan serbest radikallerin en zararlı biyolojik etkisi; hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması ve lipid peroksidasyonu (LPO) olarak bilinen bir reaksiyon zincirini başlatarak, membran proteinlerine hasar verip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmasıdır (118,119,120).

### **2.3.2.2. Antioksidanlar**

Serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (121). Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Antioksidan süreçte rol oynayan maddelere 'antioksidanlar' denir (122). Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD) , Katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleridir. SOD'ın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Px'da ise selenyum maddesi bulunduğundan bu enzimler metalloenzim olarak da adlandırılırlar (121). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitaminleri, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, P-karoten sorumludurlar. SOD, GSH-Px ve KAT enzimlerinden ayrı olarak E ve C vitaminleri de hücre içi antioksidan özelliğe sahiptirler. Her ikisi de hücre membranlarındaki LPO zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlardır. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (122).

### 2.3.2.3. Selenyum (Se)

Selenyum, ilk kez 1817'de kimyacı Berzelius tarafından keşfedilmiştir. Birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen esansiyel bir eser elementtir. Diyet, selenyumun en büyük kaynağıdır ve alınan miktar, yiyeceklerdeki konsantrasyona ve tüketilen yiyecek miktarına bağlıdır. Başlıca karaciğer, kas, böbrek ve plazmada bulunmaktadır (123)

Selenyum, doğal olarak organik (selenometiyonin, selenosistein) ve inorganik (selenit, selenat, selenid) formlarda bulunur (124). Selenit ve selenat in vivo olarak selenosisteine çevrilir (125). Selenometiyonin, bağırsaktan absorpsiyonunda metiyonin ile yarışır, metiyonin içeren vücut proteinlerine katılır ve depolanır. Transsülfürasyon ile selenosisteine çevrilebilir (126). Tüm bu selenobileşikleri hidrojen selenide katabolize edilebilir ve dimetil selenid olarak solunum yoluyla veya trimetilselenonyum iyonu olarak idrarla atılır (124). Selenyum, insan organizmasında bir dizi biyolojik fonksiyonda rol oynamaktadır. Biyolojik etkilerini, yapısında selenosistein aminoasidi bulunan selenoproteinler yoluyla göstermektedir. Selenosistein biyolojik pH da anyonik halde bulunur ve bu özelliği, elektron alışverişi yoluyla biyolojik redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesini sağlar. Selenoproteinlerin enzimatik redoks aktiviteleriyle birlikte yapısal ve transport fonksiyonları da vardır (126).

Selenyum, selenosistein halinde GSH-Px, iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin yapısında bulunur. GSH-Px, E vitamini ile sinerjik çalışan antioksidan bir enzimdir. İndirgenmiş GSH ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve lipit hidroperoksitlerin yol açtığı oksidatif hasarı azaltmada ve önlemede rol oynar. Hücre büyümesinin ve tümör supresör protein p53'ün düzenlenmesinde etkilidir (127). Selenyumun, eser düzeylerde normal büyüme ve gelişme için gerekli olduğu, ılımlı düzeylerde depolanabileceği ve homeostatik fonksiyonların sürdürülmesinde gerekli olduğu, yüksek düzeylerde olması halinde ise toksik etkilerle sonuçlanabileceği bildirilmiştir (128). Selenyum yetersizliği, selenyum içeren enzimlerin suboptimal işlevleri sonucunda azalmış antioksidan savunma, redoks regülasyonu ve enerji üretimi ile ilişkilidir (129).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada yapılan hücre ekimi ve pasajlanma işlemleri ile uygulanan tüm testler; Süleyman Demirel Üniversitesi, Nörolojik Bilimler Araştırma ve Uygulama Merkezi (NÖROBAM) laboratuvarında çalışma izlem aşamalarının adım adım takip edilmesiyle gerçekleştirildi. Çalışmamız, Süleyman Demirel Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Koordinasyon Birimi Destekleme Protokolünün ÖYP05259-DR-12 proje numarası ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Protokolünün 4475-ÖYP-D2-15 proje numarası ile desteklendi.

#### 3.1. Gereç

Çalışmamızda Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hücre Bankası ve Hücre Kültürü Koleksiyonu (HÜKÜK) Laboratuvarında sıvı azot tankında % 90 serum ve % 10 Dimetil sülfoksit (DMSO) içeren tüpler içinde -196 °C donmuş halde saklanan osteoblastik fenotip gösteren insan osteosarkoma hücre serisi olan Saos-2 hücreleri (Pasaj numarası 13) kullanıldı. %10 luk Fetal bovin serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) solüsyonu ve Penisilin/streptomisin kullanılarak hücreler için kültür vasatı hazırlandı. Çalışmada hücrelerin ekilip pasajlanmasında ve analizlerinde 25cm<sup>2</sup> lik kültür flakları (CellStar Cell Culture Flask, Greiner - Avusturya) ve 96 kuyucuklu steril doku kültür kapları (Greiner Bio-one, Almanya) kullanıldı.

Hücre kültürlerine zoledronik asit (Bonedro 4mg/5ml flakon), bevasizumab (Altuzan 100mg/4ml flakon), deksametazon (Dexoject 8mg/2ml ampul) ve selenyum(Sodyum Selenit) preparatları çalışma dozları hesaplanıp uygulandı (Resim1).

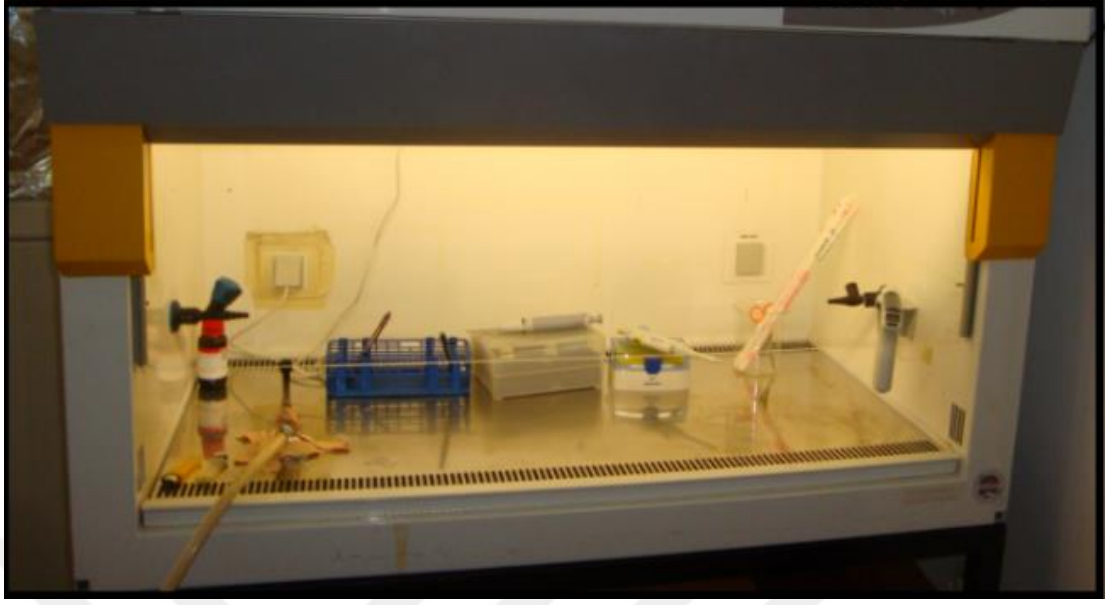
Hücrelerin inkübasyonu için %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatör (Heal Force, Smart Cell, Japonya), hücrelerin morfolojik değerlendirilmesi için ise ışık mikroskobu (Olympus Stereo Mikroskop SZ61,Japonya) kullanıldı (Resim 2).



Resim 1. Çalışmada Kullanılan ilaçlar



Resim 2. Işık mikroskobu, inkübatör



**Resim 3.** Laminar Flow Kabini

Diğer kullanılan gereçler ve kimyasal maddeler ise şunlardır:

- Soğutmalı santrifüj: Kubota (Japonya)
- LaminarFlow Kabini: Jouan B4I (Fransa) (Resim 3)
- Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
- Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)
- Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
- Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
- Hücre sayım cihazı (CASY Model TT System, Germany)
- Floresan spektrofotometre:(CaryEclipse, Varian Firması, Avustralya)
- Platereader: Tecan İnfinit M 200 Pro (96) (Avusturya)
- Termal Su Banyosu, Termallab (Türkiye)
- Ultrasonik Doku Homojenizatörü, Bandelin-Sonopuls, (Almanya)
- G:Box Chemi XRQ Jel Görüntüleme Cihazı, Syngene(İngiltere)
- Nitrocellulose Membrane 0,2µm, Biorad (Almanya)
- Western Blot Yürütme Tankı: Biorad (ABD)
- Amersham TE 90 PWR Semi Dr
- +y Transfer ECL Blotter Unit



- OrbitalShaker: Biosan PSU-10İ (Türkiye)
- DigitalDryBath: Labnet (ABD)
- AmmoniumPersulfate, Sigma (ABD)
- Western HRP Substrate, Millipore (ABD)
- Acrylamide, Sigma (ABD)
- Methylenebisacrylamide, Sigma (ABD)
- PonceauS, sigma (ABD)
- TrizmaBaze, Sigma (ABD)
- N,N,N',N'Tetramethylethylenediamine(TEMED),Fluka (Almanya)
- BromphenolblauSodium Salt, Merck (Almanya)
- Tween 20, Sihma (ABD)
- Triton X, Sigma (ABD)
- İsopropil Alkol, Emir Kimya (Türkiye)
- SodiumDodecylSulfate (SDS), Fluka (Almanya)
- Glycine, Sigma, (ABD)
- Glycerol, Sigma, (ABD)
- Non-fatdrymilk, Pınar (Türkiye)
- Methanol, Sigma (ABD)
- 2-Propanol, Sigma (ABD)
- SodiumChloride, Merck (Almanya)
- EGTA, Merck (Almanya)
- Hidrojen Peroksit, Sigma (Almanya)
- Metanol, Merck (Almanya)
- HydrochloricAcid, Merck (Almanya)
- Colleganase Type44188/47M9961,100mg,Worthington (ABD)
- Potassium Tartarat, Merck (Almanya)
- SodiumCarbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Merck (Almanya)
- Fura-2-AM, Invitrogen (ABD)
- DMSO ( Dimethylsulphoxide) Hybri-Max, Sigma (Almanya)
- Trypsin 1 X Solutions, Sigma (Almanya)
- Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Biochrom (Almanya)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biochrom (Almanya)
- Sodyum hidroksit (NaOH), Riedel-de H en (Almanya)
- Apopercantage Apopitoz Kiti, Biocolor (İngiltere)
- Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Sigma (Almanya)
- RPMI-1640 Medium (Almanya)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma (Almanya)
- Apopercantage Release Solution, Biocolor (İngiltere)
- 10X PBS Buffer Solutions, Sigma (Almanya)
- Dihydrorhodamine 123 (DHR 123), SantaCruz, (ABD)

### 3.2. Yöntemler

Çalışma izlem planına uygun olarak;

- Literatür taranması ve güncellenmesi
- Malzeme temini
- Hücrelerin üzülmesi ve pasajlanması
- Canlılık analizi ile uygun ilaç dozlarının tespiti
- Analizlerin yapılması ve sonuçların değerlendirilmesi aşamaları gerçekleştirildi.

#### 3.2.1. Hücrelerin üzülmesi

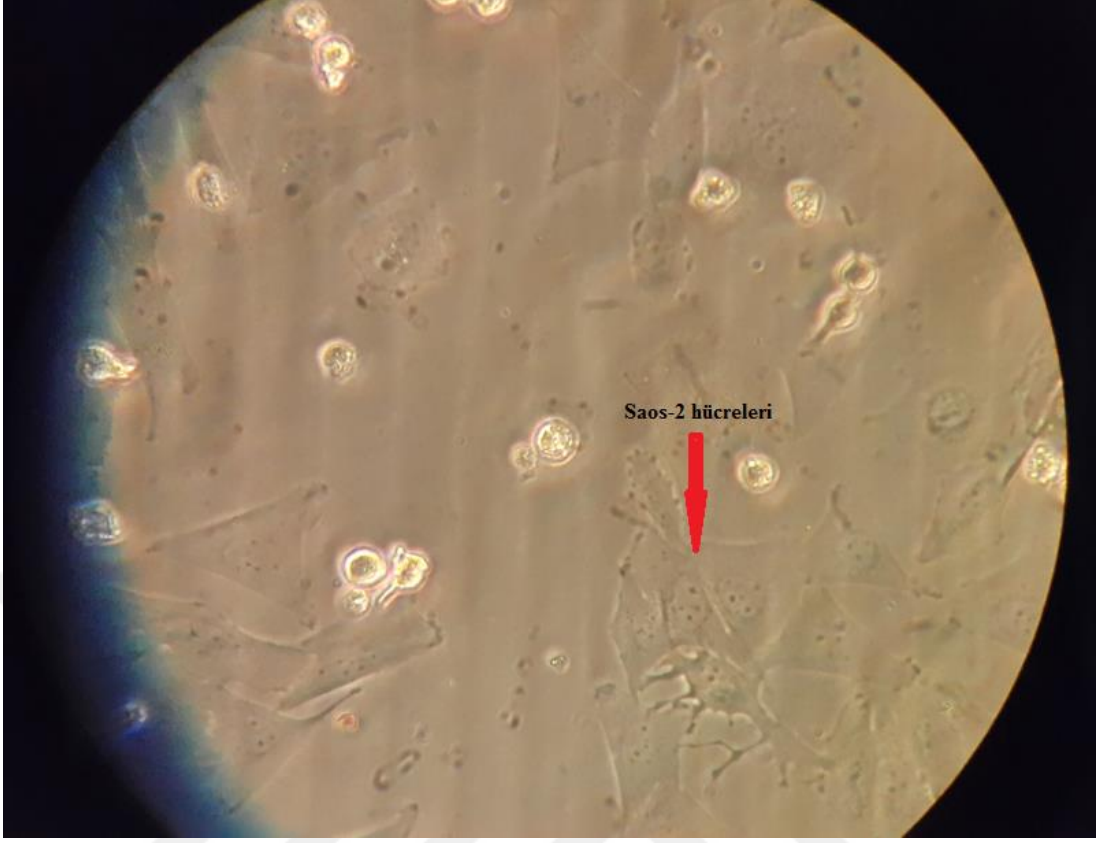
Hücreler şap Enstitüsünden ampul şeklinde temin edildikten sonra laboratuvara getirilene kadar kuru buz içinde muhafaza edilerek -70   C'de kalması sağlandı. Laboratuvara hücreler ulaştığında hücreleri üzmemek için oda ısısında yaklaşık 1 dakika, ardından da ampulün tamamını suya daldırmadan 37   C' lik su banyosunda 1-2 dakika erimesi için bekletildi. Sonrasında ampulü açmadan % 70 lik alkol ile silinerek ampul içeriği bir pipet ile önceden 37   C'ye ısıtılmış 10 ml vasat içeren steril santrfüj tüpüne yavaşca aktarıldı. 800-1000 rpm(100 g) de 5 dakika santrfüj edilip, hücrelerin süpernatantları atılarak 25 cm<sup>2</sup> lik kültür flasklarına uygun miktarda üretme vasatı ile homojenize edilip ekildi ve %5' lik CO<sub>2</sub> ve nemli ortam içeren 37   C inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

### 3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

Her gün mikroskop altında hücrelerin kültür flasklarındaki çoğalmaları ve kontaminasyon durumları kontrol edildi (Resim 4). Hücrelerin kabin tabanını tamamen kaplayıp tek tabaka oluşturdukları görüldüğünde, kültür vasatı boşaltıldı ve Tripsin/EDTA solüsyonu( 25 cm<sup>2</sup> yüzey için 1 ml) ilave edilerek hücre tabakası yüzeyden ayrılincaya kadar (ortalama 5-10 dakika) 37°C' de inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden kalktığı makroskobik(hücre kültür kabınının tabanından akmaya başlaması) ve mikroskobik olarak (hücreler yuvarlaklaşıp yüzeyde hareket etmeye başlamaları) gözlemlendi. Sonrasında toksik olan tripsin aynı orandaki vasat ile nötralize edilerek, pipet yardımıyla flaskın içindeki solüsyon ve hücre içeriği santrifüj tüpüne alınarak, 800-1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak hücreler 5 ml lik taze vasatla 25 cm<sup>2</sup>' lik 3 ayrı kültür flaskına bölünerek 37° C, %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatöre alındı, böylece pasajlama işlemi gerçekleştirilmiş oldu. Analizler için gerekli hücre sayısına ulaşmak için istenen hücre yoğunluğunun ortalama 3 günde elde edildiği hücre sayım cihazı (CASY Model TT System, Germany)(Resim 5) kullanılarak tespit edildi ve bu kültür flaskları üç günde bir değiştirilerek hücrelerin çoğalması sağlandı.

### 3.2.3. Çalışmada kullanılacak ilaç dozu tespiti

Yapılan literatür taraması sonucu daha önceki çalışmalarda Zoledronik asit, Bevasizumab, Deksametazon ve Selenyum için kullanılan konsantrasyonlar değerlendirilerek(130-140), belirli konsantrasyon değerlerinin Saos-2 hücreleri üzerine olan sitotoksiteleri 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi ile belirlendi ve çıkan sonuçlara göre çalışmada kullanılacak dozların tespiti yapıldı. Buna göre;



**Resim 4.** Saos-2 hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü



**Resim 5.** Hücre sayım cihazı

Zoledronik asit için 1,5,10 ile 20  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlar arasındaki ilaç dozlarının sitotoksisiteleri 24. saatte spektroskopik olarak yapılan MTT testi ile belirlendi. Bevazicumab için 0.1, 0.25, 1 ile 2,5  $\mu\text{g/ml}$  arasındaki ilaç dozlarının sitotoksisitelerinin 24. saatte spektroskopik olarak yapılan MTT testi ile belirlendi. Deksametazon için 50,100,250 ile 500 nM lik konsantrasyonlar arasındaki ilaç dozlarının sitotoksisiteleri 24. saatte spektroskopik olarak yapılan MTT testi ile belirlendi. Selenyum için 100,200,500 ile 1  $\mu\text{M}$  lik konsantrasyonlar arasındaki ilaç dozlarının sitotoksisiteleri 24. saatte spektroskopik olarak yapılan MTT testi ile belirlendi.

Doz tespit çalışmasının başlangıcında çalışılacak konsantrasyonlardaki ilaç dozları hazırlanarak, hücre sayımı yapılarak eşit miktarlarda Saos-2 hücre gruplarının bulunduğu 96 kuyucuklu steril doku kültür kaplarına yerleştirildi. İlaçların doz miktarlarının hazırlanması ise şu şekilde yapıldı:

**Zoledronik asit** için elimizde bulunan 3000  $\mu\text{M}$  stoktan;

- 5 $\mu\text{l}$  alınıp, izotonik NaCl solüsyonu ile 750  $\mu\text{l}$  ye tamamlanıp 20  $\mu\text{M}$  konsantrasyon elde edildi. 20  $\mu\text{M}$  luk çözeltiden ise 10  $\mu\text{l}$  alınıp kuyucukta Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile 200  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanıp 1  $\mu\text{M}$  luk doz elde edildi.
- 25 $\mu\text{l}$  alınıp, izotonik NaCl solüsyonu ile 750  $\mu\text{l}$  ye tamamlanıp 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon elde edildi. 100  $\mu\text{M}$  luk çözeltiden ise 10  $\mu\text{l}$  alınıp kuyucukta Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile 200  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanıp 5  $\mu\text{M}$  luk doz elde edildi.
- 50 $\mu\text{l}$  alınıp, izotonik NaCl solüsyonu ile 750  $\mu\text{l}$  ye tamamlanıp 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyon elde edildi. 200  $\mu\text{M}$  luk çözeltiden ise 10  $\mu\text{l}$  alınıp kuyucukta Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile 200  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanıp 10  $\mu\text{M}$  luk doz elde edildi.
- 100 $\mu\text{l}$  alınıp, izotonik NaCl solüsyonu ile 750  $\mu\text{l}$  ye tamamlanıp 400  $\mu\text{M}$  konsantrasyon elde edildi. 400  $\mu\text{M}$  luk çözeltiden ise 10  $\mu\text{l}$  alınıp kuyucukta Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile 200  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlanıp 20  $\mu\text{M}$  luk doz elde edildi.

**Deksametazon** için 10000 µM stoktan;

- 5µl alınıp, izotonik NaCl solüsyonu ile 50 ml ye tamamlanıp 1 µM konsantrasyon elde edildi. 1 µM luk çözeltiden ise 10 µl alınıp kuyucukta Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile 200 µl'ye tamamlanıp 50 nM'lık doz elde edildi.
- 5µl alınıp, izotonik NaCl solüsyonu ile 25 ml ye tamamlanıp 2 µM konsantrasyon elde edildi. 2 µM luk çözeltiden ise 10 µl alınıp kuyucukta Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile 200 µl'ye tamamlanıp 100 nM'lık doz elde edildi.
- 5µl alınıp, izotonik NaCl solüsyonu ile 10 ml ye tamamlanıp 5 µM konsantrasyon elde edildi. 5 µM luk çözeltiden ise 10 µl alınıp kuyucukta Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile 200 µl'ye tamamlanıp 250 nM'lık doz elde edildi..
- 5µl alınıp, izotonik NaCl solüsyonu ile 5 ml ye tamamlanıp 10 µM konsantrasyon elde edildi. 10 µM luk çözeltiden ise 10 µl alınıp kuyucukta Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile 200 µl'ye tamamlanıp 500 nM'lık doz elde edildi.

**Bevazicumab** için her 1 ml sinde 25 mg bulunan stoktan;

- 20 µl(0,5mg) alınıp kuyucukta 200 µl lik Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile tamamlanarak(0.5mg/200 µl) 2.5 mg/ml lik doz elde edildi
- 8 µl(0,2 mg) alınıp kuyucukta 200 µl lik Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile tamamlanarak(0.2mg/200 µl) 1 mg/ml lik doz elde edildi.
- 2 µl(0,05mg) alınıp kuyucukta 200 µl lik Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile tamamlanarak(0.05mg/200 µl) 0.25 mg/ml lik doz elde edildi.
- 0,8 µl(0,02mg) alınıp kuyucukta 200 µl lik Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile tamamlanarak(0.02mg/200 µl) 0.1 mg/ml lik doz elde edildi.

**Selenyum (sodyum selenit)** için 10 milimolar(mM) bulunan stoktan;

- 10 µl alınıp, 5 ml ye tamamlanıp 20 µM luk konsantrasyon elde edildi. Bu 20 µM luk çözülden 10 µl alınıp 200 µl lik Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile tamamlanarak 1 µM luk doz elde edildi.
- 5 µl alınıp, 5 ml ye tamamlanıp 10 µM luk konsantrasyon elde edildi. Bu 10 µM luk çözülden 10 µl alınıp 200 µl lik Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile tamamlanarak 500nM lık doz elde edildi.
- 2 µl alınıp, 5 ml ye tamamlanıp 4 µM luk konsantrasyon elde edildi. Bu 10 µM luk çözülden 10 µl alınıp 200 µl lik Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile tamamlanarak 200nM lık doz elde edildi.
- 1 µl alınıp, 5 ml ye tamamlanıp 2 µM luk konsantrasyon elde edildi. Bu 10 µM luk çözülden 10 µl alınıp 200 µl lik Saos-2 hücrelerinin yer aldığı medium ile tamamlanarak 100nM lık doz elde edildi.

Çalışmada kullanılacak ilaç dozlarının tespiti amacıyla yapılan MTT testleri sonucunda; zoledronik asit için 5 µM değeri, deksametazon için 250 nM değeri, bevasizumab için 1 µg/ml değeri ve Selenyum için 1 µM değeri çalışma dozu olarak tespit edildi.

#### **2.2.4. Çalışma Grupları**

**a. Kontrol Grubu:** Bu gruptaki hücelere herhangi bir ilaç uygulanmadan, hüceler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

**b. Zoledronik asit grubu(ZA):** Bu gruptaki hücelere 5 µM zoledronik asit verilerek, hüceler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

**c. Bevasizumab grubu(Bev):** Bu gruptaki hücelere 1 µg/ml bevasizumab verilerek, hüceler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutulmuştur.

**d. Deksametazon grubu(Deks):** Bu gruptaki hücelere 250 nM deksametazon verilerek, hüceler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

**e. Selenyum grubu(Se):** Bu gruptaki hücrelere 1  $\mu\text{M}$  selenyum verilerek, hücreler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

**f. Zoledronik asit-Selenyum grubu(ZA+Se):** Bu gruptaki hücrelere 5  $\mu\text{M}$  zoledronik asit ve 1  $\mu\text{M}$  selenyum verilerek, hücreler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

**g. Bevasizumab-Selenyum grubu(Bev+Se):** Bu gruptaki hücrelere 1  $\mu\text{g/ml}$  bevasizumab ve 1  $\mu\text{M}$  selenyum verilerek, hücreler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutulmuştur.

**h. Deksametazon-Selenyum grubu(Deks+Se):** Bu gruptaki hücrelere 250 nM deksametazon ve 1  $\mu\text{M}$  selenyum verilerek, hücreler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

**ı. Zoledronik asit-Deksametazon grubu(ZA+Deks):** Bu gruptaki hücrelere 5  $\mu\text{M}$  zoledronik asit ve 250 nM deksametazon verilerek, hücreler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

**j. Zoledronik asit-Deksametazon-Selenyum grubu(ZA+Deks+Se):** Bu gruptaki hücrelere 5  $\mu\text{M}$  zoledronik asit, 250 nM deksametazon ve 1  $\mu\text{M}$  selenyum verilerek, hücreler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

**k. Zoledronik asit-Bevasizumab grubu(ZA+Bev):** Bu gruptaki hücrelere 5  $\mu\text{M}$  zoledronik asit ve 1  $\mu\text{g/ml}$  bevasizumab verilerek, hücreler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

**l. Zoledronik asit-Bevasizumab-Selenyum grubu(ZA+Bev+Se):** Bu gruptaki hücrelere 5  $\mu\text{M}$  zoledronik asit, 1  $\mu\text{g/ml}$  bevasizumab ve 1  $\mu\text{M}$  selenyum verilerek, hücreler 24 saat inkübasyon işlemine tabii tutuldu.

Bu çalışma gruplarında 5ml medium içeren 25cm<sup>2</sup> 'lik kültür flaskları kullanılacağından, gruplara verilecek ilaçların dozları 5 ml' lik mediumlara göre hesaplanarak yapıldı. Buna göre;



- Zoledronik asitten 5  $\mu$ M elde edebilmek için 180  $\mu$ M lik stoktan her aşamada 145  $\mu$ l alınarak 5 ml mediuma eklendi.
- Deksametazondan 250 nm elde etmek için 25  $\mu$ M lik stoktan her aşamada 50  $\mu$ l alınarak 5 ml mediuma aktarıldı.
- Bevasizumabtan 1 mg/ml elde etmek için 25mg/ml olan stoktan her aşamada 200  $\mu$ l alınarak 5ml mediuma aktarıldı.
- Selenyumdan 1  $\mu$ M elde etmek için 1mM' lık stoktan her aşamada 5  $\mu$ l alınarak 5 ml mediuma aktarıldı.

### **3.2.5. Yapılan Analizler**

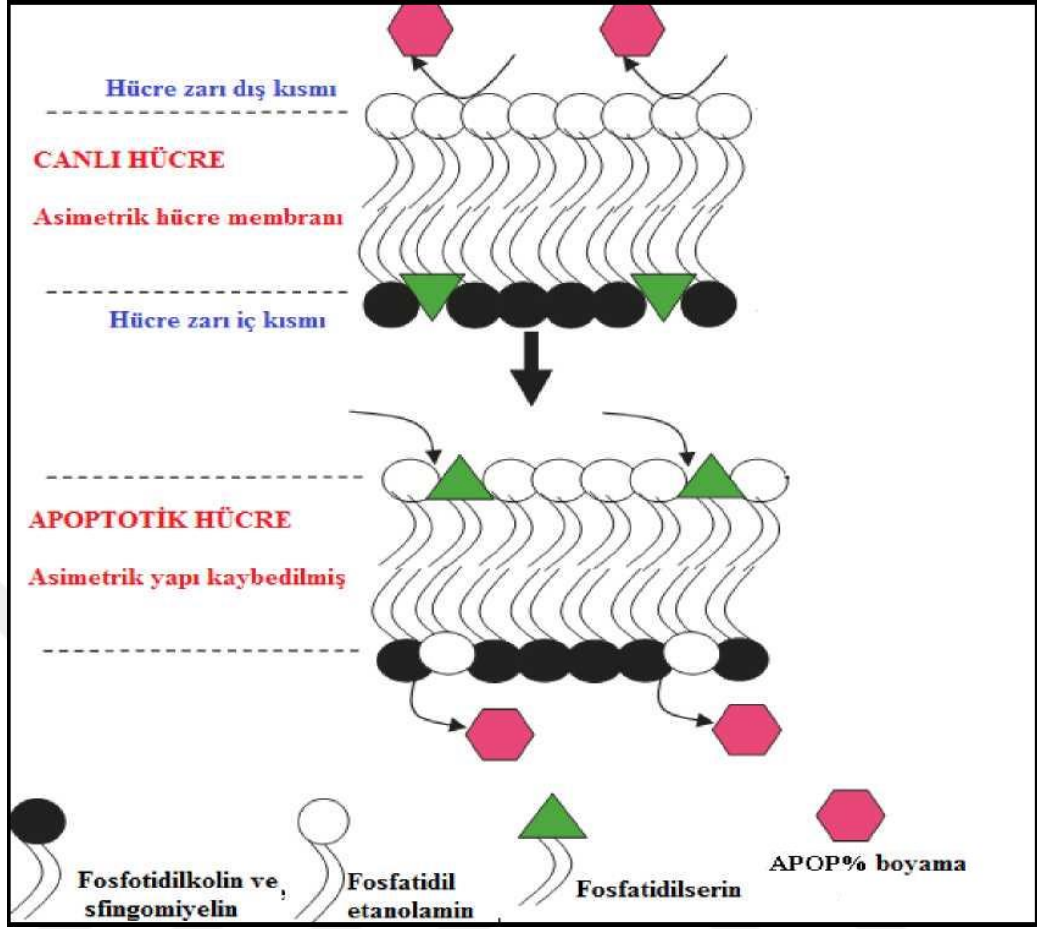
#### **3.2.5.1. Apoptoz Testi**

Bu test apoptoz sürecine giden hücreler tarafından oluşturulacak renk değişiminin değerlendirilmesi prensibine dayanmaktadır. Apoptotik sürece başlamamış hücrelerin hücre zarından boya geçemez iken, apoptotik sürecin başladığı hücrelerin zarlarındaki bozulmaya bağlı olarak boyalar rahatlıkla geçebilmektedir (Şekil 1). Bu çalışmaya geçecek olursak; kültür flasklarından kaldırılan Saos-2 hücre grupları 150  $\mu$ l 1x fosfat tamponlu salin (PBS) ile sulandırıldı. Sonra her bir ependorfıta 50  $\mu$ l olacak şekilde hücreler 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950  $\mu$ l 1 x PBS konuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 3-5 $\mu$ l apoptozis boyasından(Apopercantage dye 10 ml) ilave edildi ve 30 dk süreyle çalkalama banyosu cihazına konuldu. Çalkalama sonrası 3500 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve üstte oluşan süpernatant (üstte oluşan hücresiz sıvı kısım) döküldü. Üzerine tekrar 1x PBS eklendi ve 200 $\mu$ l Apopercantage Release'den ilave edildi. Pipetaj ve santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant alındı ve plate kuyucuklarımıza yerleştirerek 550 nm de Platereader İnfinite 200 Pro(Avusturya) cihazında okundu (141).

#### **3.2.5.2. Western-blot Analizleri**

Saos-2 hücre gruplarında Western Blot deneyi için takip edilen bütün işlemler western blot aparatları kullanılarak standart prosedürlere uygun olarak yapıldı (Resim 5).  $\beta$ -actin, PARP, Caspase-3 and Caspase 9 protein ekspresyonları için örnekler enzim inhibitörleri kullanılarak hazırlanmış lysisbuffer içerisinde mekanik parçalama ve sonikasyon işlemleri uygulanarak homojenize edildi, -4°C de 16000

g'de 20 dakika süre ile santrfüj edildi. Santrfüj sonrası süpernatant alındı ve Bradford yöntemi ile 595 nm'de protein değerleri okundu. İmmüno blotting için eşit miktardaki protein örnekleri (herbir örnek için 30 µg) %12'lik sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide jel'deki kuyucuklara yükleme yapıldı. Elektroforez işlemi sonrası proteinler nitroselülöz membrana transfer edildi. İşlem sonrası membran oda ısısında Tris Buffered Saline-Tween 20 (TBST) (0.1% Tween 20)'li 5 %5'lik süt tozu ile 1 saat süreyle bloklandı. Daha sonra membran primer antikolar ile (PARP, Rabbit mAb Caspase 3, 1:1000; Mouse mAb Caspase-9, 1:1000; mouse monoclonal β-actin, 1:1000, Cell Signaling Technology, USA) akşamdan sabaha kadar (overnight) inkübe edilerek ve sabahında 3 kez 5'er dakikalık TBST Buffer ile yıkama işlemi sonrası sekonder antikolar ile (Anti-mouse IgG and Anti-rabbit IgG antibodies conjugated with horse radish peroxidase, 1:5000, GE Healthcare, Amersham, UK) 1 saat süreyle oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra mevcut istenilen proteinlere ait bantların görüntülenebilmesi için ECL Western HRP Substrate (Millipore Luminata Forte, USA) kullanılarak karanlık odada X-ray filmi aracılığıyla proteinlerin görüntülenmesi işlemi yapıldı (GE Healthcare, Amersham Hyperfilm ECL, UK). NÖROBAM da mevcut kemiluminesans jel dokümantasyon sistemi de görüntüleme amaçlı kullanıldı.



Şekil 1. Apoptotik bir hücrenin hücre zarı reaksiyon modellemesi.



Resim 6. Western-blot aparatları

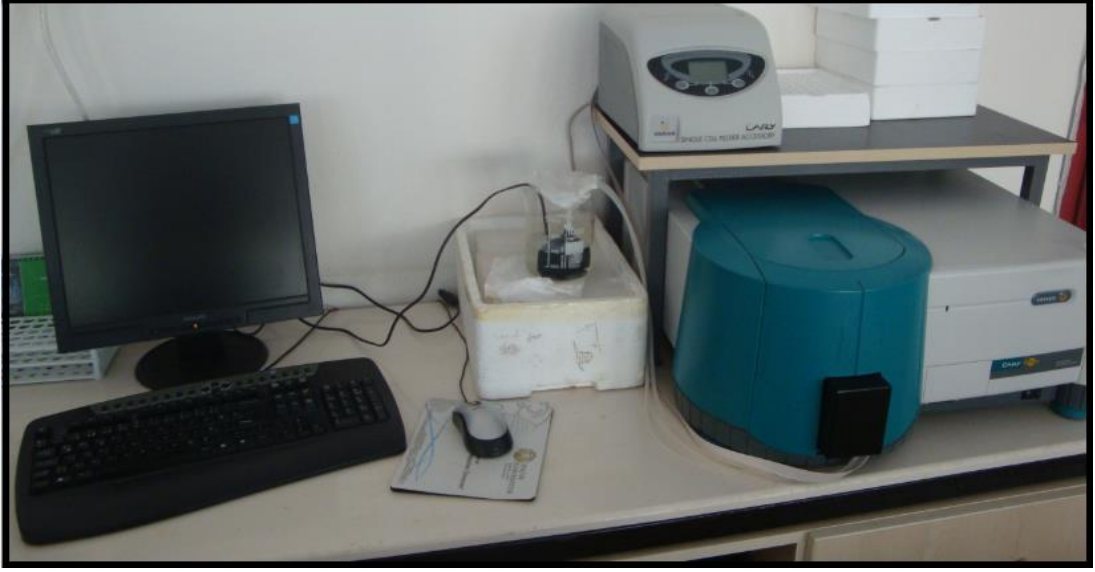
### 3.2.5.3. Hücre içi Serbest Ca<sup>+2</sup> Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için Saos-2 hücre grupları oda ısısında 45 dakika boyunca 4µM fura-2 AM florasan boyası ile boyandı. Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücre grupları manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2x10<sup>6</sup> olacak şekilde Ca<sup>+2</sup> Buffer [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl<sub>2</sub>, 1,2; MgCl<sub>2</sub>, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7.4)] solusyonu içerisinde florasan spektrofotometrede (VarianCaryEclipse, Australia) haznesine yerleştirildi (Resim 6). Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında florasan ışık ile uyarılarak kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca<sup>+2</sup> iyon düzeyi [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedilip (141), Grynkiewicz ve ark. metoduna göre hesaplandı (142). Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun TRPV1 kanalının uyarıcısı kapsaisinin(CAP) ilavesi ile 100 sn lik değerlendirmesi yapılırken, ayrıca TRPV1 kanal blokörü olan kapzasepin (CPZ) ile bloke edilmesi de değerlendirildi.

### 3.2.5.4. Hücre Canlılığı (MTT Analizi)

Aşırı düzeyde oksidatif stressin (hidrojen peroksit) hücreye zararı olduğu bilinmektedir. Saos-2 hücreleri için optimum oksidatif stres miktarını belirleyebilmek için hücre canlılığı esasına göre çalışan MTT deneyi uygulandı. Bu deneyde sarı renkte olan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide maddesi canlı hücreler tarafından mitokondriyal solunum yolu ile mor renkli formozan kristaline dönüştürülmektedir. Eğer hücreler canlı değilse bu reaksiyon gerçekleşmez. Renk oluşumu da spektrofotometrik yöntemle değerlendirildi ve sonuçlara göre oksidatif stres için apoptozise götürmeyen fakat Ca<sup>+2</sup> akışını sağlayan en uygun doz miktarı belirlendi. Saos-2 hücre grupları 150 µl 1xPBS ile sulandırıldı. Sonra her bir ependorfta 50 µl olacak şekilde hücreler 3'e bölündü. Her bir ependorfta 15 µl MTT kimyasalı ilave edildi. MTT kimyasalı ilavesinden sonra bütün ependorflar 5-10 defa yavaşça çalkalanıp, 37 °C de çalkalamalı su banyosunda 90 dakika boyunca yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Çalkalama sonrasında bütün ependorflar 500 g de 10 dakika boyunca santrfüj edildi. Santrfüj sonrası süpernatant atıldı. Her bir ependorfta 400'er µl DMSO ilave edildi.

Pelet DMSO içerisinde resuspense edildi. Sonra her bir kuyucuğa 200 µl bu örnekten konuldu. Plate Readerda (Infinite pro200; Tecan Austria GmbH, Groedig, Austria) 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirinden çıkarıldı (Abs490 nm –Abs650 nm: x)(Resim 7) (141).



**Resim 7.** Florasan spektrofotometre cihazı



**Resim 8.** Plate Reader cihazı

### 3.2.5.5. Hücre İçi ROS Üretimi Tayini

Saos-2 hücrelerinde hücre içi ROS üretim tayini mevcut tabak okuyucu olan Pleatereader (Infinite pro200; Tecan Austria GmbH, Groedig, Austria) ile yapıldı. Rhodamine 123(Rh 123), DHR 123 hücreye kolayca nüfuz edebilen, florasan olmayan yüksüz bir moleküldür. 2'-DHR-123'ün RH123'e oksidasyonu vasıtasıyla Hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ) miktarı bu yöntemle tayin edilmektedir. Bu oksidasyon sırasında yağların oksidasyonu ile oluşmuş hücre içerisinde serbest oksijen radikalleri miktarı ölçülebilmektedir. DHR-123'ün RH123'e oksidasyonu çok yüksek düzeyde florasan yayıcı bir olaydır. Ne kadar çok florasan yayılırsa o kadar serbest oksijen radikali varlığını göstermektedir. Saos-2 hücre grupları 150  $\mu$ l 1xPBS ile sulandırıldı. Sonrasında her bir ependorfta 50  $\mu$ l olacak şekilde hücreler 3'e bölündü. Daha sonra üzerlerine 950  $\mu$ l RPMI konuldu. Pipetaj yaptıktan sonra üzerine 1 $\mu$ l DHR123 ROS boyasından konuldu ve güzelce pipetaj yapıldı. Ependorflar 30 dk süreyle inkübatöre konuldu. Süre bitimini takiben 4x100 G devirde 5 dakika santrfüj edildi. Sonrasında oluşan süpernatant dökülerek üzerlerine

300 µl 1xPBS koyup güzelce pipetaj yapıldıktan sonra plate kuyucuklarına (infinite 200 marka, Avusturya) her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde hücreler bölündü. Plate readerda florasanlar 498 nm emisyon ve 522 nm eksitasyon(uyarım) dalga boylarında okundu ve aradaki fark değer olarak belirlenmiştir (143,144). Değerler, 'kontrolle kıyasla misli artış' olarak verildi.

### **3.2.5.6. Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Tayini**

Hücre içersine  $Ca^{+2}$  iyon akışı, mitokondride depolarizasyon artışı yoluyla ROS üretimini artırmakta, artan hücre içi ROS miktarı, gerek hücre içi organale kapılarını açarak ve gerekse katyon kanallarına zarar vererek sitozolde  $Ca^{+2}$  miktarını artırmaktadır. Mitokondriye daha fazla  $Ca^{+2}$  girişi depolarizasyonu artırmakta ya hücre çalışması bozulmakta veya hücre apoptozise gitmektedir. Bu nedenle, mitokondriyal zar depolarizasyonu tayininin yapılması bu halkadaki zinciri tamamlayarak moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Hücreler 0.001 mM JC-1 ile 37 °C de 15 dakika inkübe edildi (143,144). JC-1 boyası mitokondride depolarizasyon artışına paralel girişi artmaktadır. JC-1 inkübasyon sonrası kırmızıdan yeşile doğru florasan artışı mitokondriyal depolarizasyonu göstermekte ve bu durum platereader tarafından değişik dalga boylarında hemen beşi sıra cihaz tarafında otomatik olarak belirlenebilmektedir. Yeşil dalga boyları eksitasyon 485 nm ve emisyon 535 nm dalga boylarında belirlenecektir. Kırmızı dalga boyu değişimleri ise 540 nm (Eksitasyon) ile 590 nm (Emisyon) de belirlenecektir. Emisyon oranları (590/535) değer olarak alınacaktır. Bu şekilde tüm gruptaki Saos-2 hücrelerine mitokondriyal zar depolarizasyon tayinleri platereader kullanılarak yapıldı.

### **3.2.5.7. Kaspaz 3 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini**

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarının hazırlanması için 2,5 ml kaspaz 3 ve kaspaz 9 un buffer ham solüsyonlarından 15 ml lik falkon tüplerine konuldu. Her 2 tampona da 2,5µl NP-40 (+23 °C) kimyasalından ilave edildi, sonrasında vortekste karıştırıp floresan kaspaz DTT boyasından kaspaz 3 ve kaspaz 9 bufferlarının üzerine 10µl ve 2,5µl konulup güzelce vortekste karıştırıldı. Saos-2 hücre grupları 150 µl 1xPBS solüsyonuyla sulandırıldıktan sonra her bir plate kuyucuğuna 15 µl olacak şekilde 10 kuyucuğa eşit bir şekilde konuldu. Üzerine de öncesinde hazırlanmış

olduğumuz kaspaz 3 ve kaspaz 9 tamponlarından 50µl konuldu ve sonrasında açığa çıkan enzimler (infinite 200 marka, Avusturya) cihazında 360 nm uyarılma ve 460 nm emilme dalga boylarında okunarak kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri değerlendirildi (141). Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi.

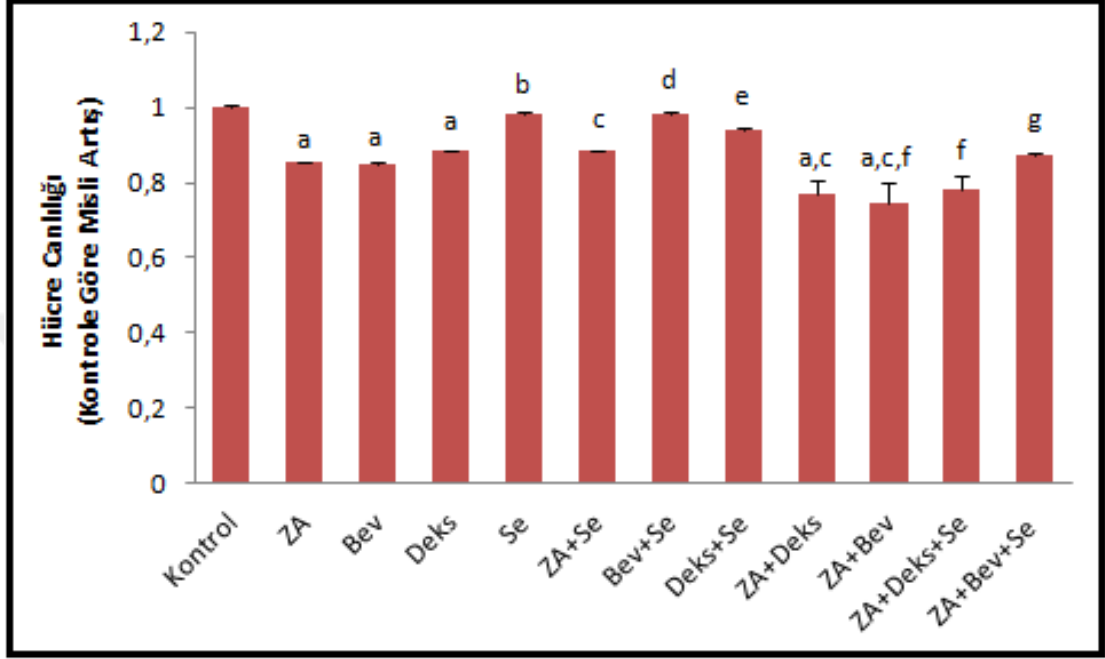
### **3.2.6. İstatistiksel Analiz**

Hücrelerde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 17.0 lisanslı paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplarda istatistiksel önem varlığı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi  $p<0,001$ ,  $p<0,01$  ve  $p<0.05$  olarak kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Canlılığı Testi (MTT) Sonuçları

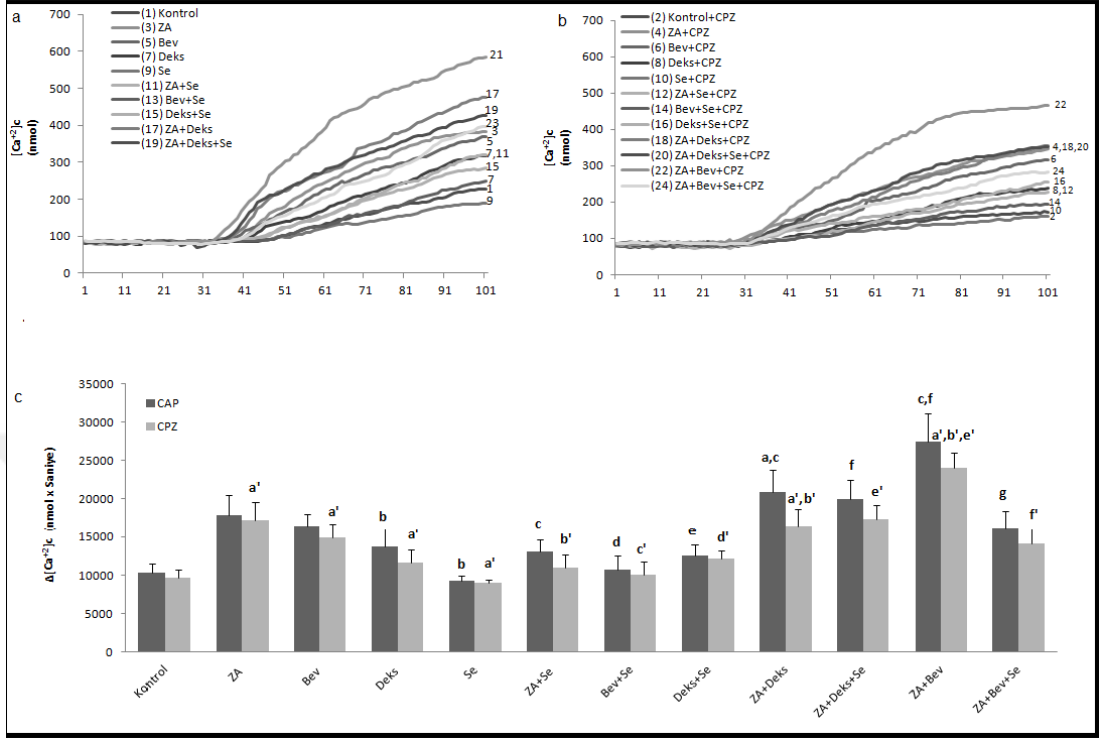


**Grafik 1.** Saos-2 hücrelerinde ilaçların MTT (Hücre canlılığı) üzerine etkileri. <sup>a</sup>p<0.001 ve <sup>b</sup>p <0.01 kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.001 ZA'ya kıyasla, <sup>d</sup>p<0.001 Bev'e kıyasla, <sup>e</sup>p<0.001 Deks'e kıyasla, <sup>f</sup>p<0.001 ZA+Deks'e kıyasla, <sup>g</sup>p<0.001 ZA+Bev'e kıyasla.

MTT analiz sonuçlarını içeren grafik 1 incelendiğinde;

- ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülürken(p<0.001);
- Selenyum içeren ve içermeyen grupların kıyaslanmasında (ZA ile ZA+Se, Bev ile Bev+Se, Deks ile Deks+Se, ZA+Deks ile ZA+Deks+Se ve ZA+Bev ile ZA+Bev+Se); selenyumun hücre canlılığının azalmasına anlamlı olarak engel olduğu tespit edildi (p<0.001).
- Ayrıca Zoledronik asidin Bevasizumab ya da Deksametazon ile kombine uygulamalarında (ZA+Deks ya da ZA+Bev) hücre canlılığında azalmanın ZA grubundan daha fazla olduğu ve Bevasizumabın etkisinin de Deksametazondan daha fazla olduğu görüldü(p<0.001).

## 4.2. Hücre İçi Serbest Ca<sup>2+</sup> Sonuçları



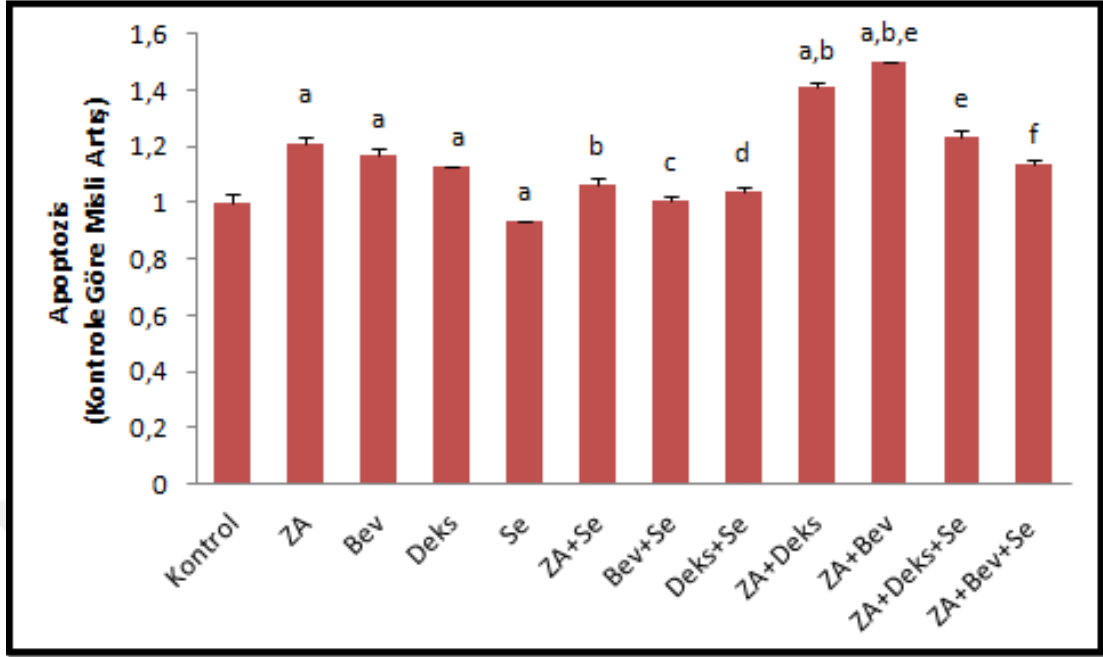
**Grafik 2.** Saos-2 hücrelerinde, ilaçların hücre içi serbest Ca<sup>2+</sup> iyonu konsantrasyonları ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>) üzerine in vitro etkileri. **(a)** Hücre grupları capsaisin (CAP)(0.01mM) ile uyarıldı. **(b)** Hücre grupları capsazepin (CPZ) (0.01mM) ile bloke edildi. **(c)** İlaçların CAP ve CPZ ile birlikte toplam [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> üzerine etkileri. CAP ile uyarılma; <sup>a</sup>p<0.001 ve <sup>b</sup>p <0.05 kontrol grubuna kıyasla, <sup>c</sup>p<0.001 ZA ‘ya kıyasla, <sup>d</sup>p<0.001 Bev ‘e kıyasla, <sup>e</sup>p<0.05 Deks’e kıyasla, <sup>f</sup>p<0.001 ZA+Deks’ e kıyasla, <sup>g</sup>p<0.001 ZA+Bev’ e kıyasla. CPZ ile bloke; <sup>a'</sup>p<0.001 kontrole kıyasla, <sup>b'</sup>p <0.001 ZA‘ya kıyasla, <sup>c'</sup>p<0.001 Bev’e kıyasla, <sup>d'</sup>p<0.001 Deks’ e kıyasla, <sup>e'</sup>p<0.001 ZA+Deks ‘e kıyasla, <sup>f'</sup>p<0.001 ZA+Bev’ e kıyasla.

TRPV1 kanallarının Kapsaisin (CAP) ile stimüle edilmesi ve kapsazepin (CPZ) ile bloke edilmesi sonucu grupların hücre içi Ca<sup>2+</sup> iyon düzeyleri Grafik 2 de gösterildi. Bunlar incelendiğinde;

- Hücre içi Ca<sup>2+</sup> miktarlarının ZA, Bev, Deks, ZA+Bev ve ZA+Deks grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, Se grubunda azaldığı gözlemlendi(p<0.001 ve p<0.05).

- Selenyum beraberinde içeren gruplarda(ZA-Se,Bev+Se,Deks+Se,ZA+Deks+Se ve ZA+Bev+Se) ise olmayan gruplara(ZA,Bev,Deks,ZA+Deks ve ZA+Bev) göre anlamlı olarak hücre içi  $Ca^{+2}$  değerlerinde azalma tespit edildi( $p<0.001$  ve  $p<0.05$ ).
- Ayrıca Zoledronik asidin Bevasizumab ya da Deksametazon ile kombine uygulamalarında(ZA-Deks ya da ZA-Bev) hücre-içi  $Ca^{+2}$  değerinde Zoledronik asid grubuna göre artış olduğu, Bevasizumabın etkisinin ise Deksametazondan daha fazla olduğu görüldü( $p<0.001$ ).
- CPZ 'nin TRPV1 kanalları bloke etmesi nedeniyle, hücre içi  $Ca^{+2}$  değerlerinin azaldığı tespit edildi.

### 4.3. Programlı Hücre Ölümü (Apopitozis) Sonuçları

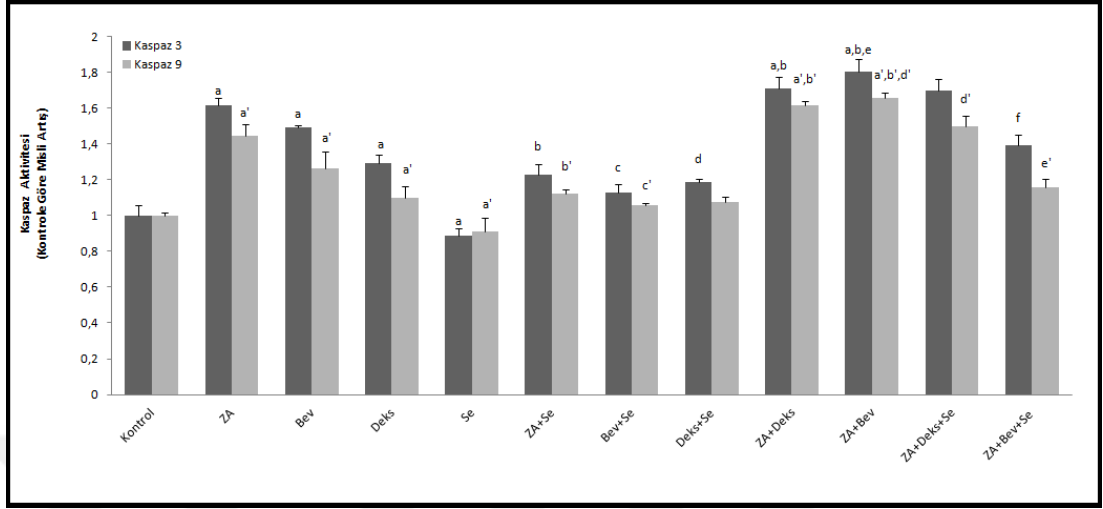


**Grafik 3.** Saos-2 hücrelerinde ilaçların Apoptozis üzerine etkileri. <sup>a</sup>p<0.001 kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.001 ZA'ya kıyasla, <sup>c</sup>p<0.001 Bev'e kıyasla, <sup>d</sup>p<0.001 Deks'e kıyasla, <sup>e</sup>p<0.001 ZA+Deks' ekıyasla, <sup>f</sup>p<0.001 ZA+Bev' e kıyasla.

Apoptozis analiz sonuçlarını içeren grafik 3 incelendiğinde;

- ZA, Bev, Deks, ZA+Bev ve ZA+Deks'in apoptozisi arttırdığı görüldü (p<0.001).
- Selenyum içeren ve içermeyen grupların kıyaslanmasında (ZA ile ZA+Se, Bev ile Bev+Se, Deks ile Deks+Se, ZA+Deks ile ZA+Deks+Se ve ZA+Bev ile ZA+Bev+Se) selenyumun apoptozisi azalttığı tespit edildi (p<0.001).
- Zoledronik asidin Bevasizumab ya da Deksametazon ile kombine uygulamalarında (ZA+Deks ya da ZA+Bev) hücre apoptozisindeki artışın daha fazla olduğu ve Bevasizumabın, deksametazona göre apoptoza daha fazla neden olduğu görüldü (p<0.001).
- Kontrole göre sadece Selenyum içeren hücre grubunda apoptozisin daha az meydana gelmesi de dikkat çekti (p<0.001).

#### 4.4. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Aktivitesi Sonuçları



**Grafik 4.** Saos-2 hücrelerinde ilaçların Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktiviteleri üzerine etkileri.

Kaspaz 3 için; <sup>a</sup>p<0.001 kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.001 ZA'ya kıyasla, <sup>c</sup>p<0.001 Bev'e kıyasla, <sup>d</sup>p<0.001 Deks'e kıyasla, <sup>e</sup>p<0.001 ZA+Deks'e kıyasla, <sup>f</sup>p<0.001 ZA+Bev'e kıyasla.

Kaspaz 9 için; <sup>a'</sup>p<0.001 kontrol grubuna kıyasla, <sup>b'</sup>p<0.001 ZA'ya kıyasla, <sup>c'</sup>p<0.001 Bev'e kıyasla, <sup>d'</sup>p<0.001 ZA+Deks'e kıyasla, <sup>e'</sup>p<0.001 ZA+Bev'e kıyasla.

Kaspaz 3 aktivitesi sonuçları incelendiğinde(Grafik 4);

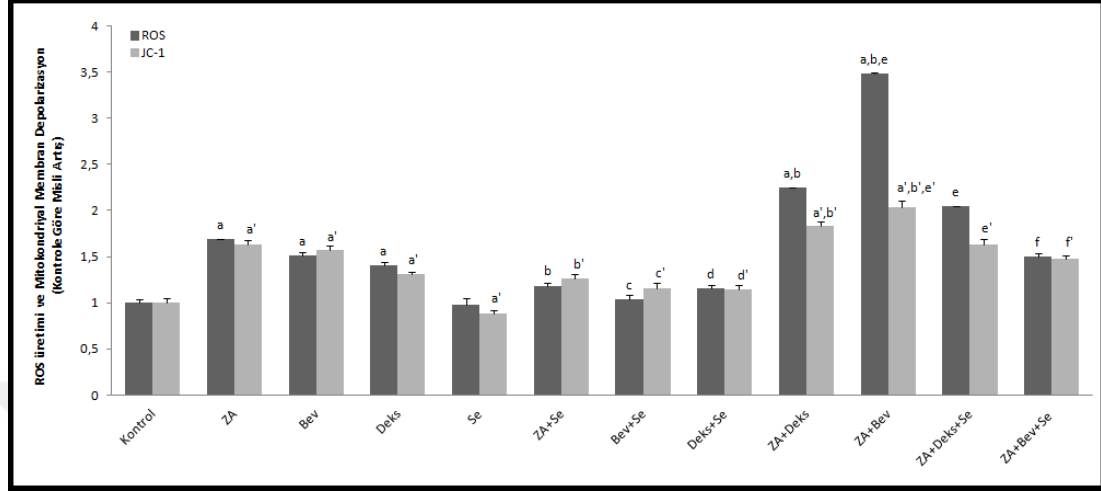
- Kontrol grubuna kıyasla ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında kaspaz 3 aktivitelerinin önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. (p<0.001)
- Selenyum içeren ve içermeyen grupların kıyaslanmasında ZA+Deks ile ZA+Deks+Se kıyaslaması haricindekilerde (ZA ile ZA+Se, Bev ile Bev+Se, Deks ile Deks+Se ve ZA+Bev ile ZA+Bev+Se) selenyumun kaspaz 3 aktiviteleri azalttığı tespit edilirken(p<0.001) , ZA+Deks ile ZA+Deks+Se arasında anlamlı fark bulunmadı(p>0.05).

- Ayrıca Zoledronik asidin Bevasizumab ya da Deksametazon ile kombine uygulamalarında(ZA+Deks ya da ZA+Bev) kaspaz 3 aktivitelerindeki artışın daha fazla olduğu ve bevasizumabın, deksametazona göre aktiviteyi daha fazla arttırdığı görüldü( $p<0.001$ ).

Kaspaz 9 aktivitesi sonuçları incelendiğinde(Grafik 4);

- Kontrol grubuna kıyasla ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında kaspaz 9 aktivitelerinin önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. ( $p<0.001$ )
- Selenyum içeren ve içermeyen grupların kıyaslanmasında Deks ile Deks+Se kıyaslaması haricindekilerde (ZA ile ZA+Se, Bev ile Bev+Se, ZA+Deks ile ZA+Deks+Se ve ZA+Bev ile ZA+Bev+Se) selenyumun kaspaz 9 aktiviteleri azalttığı tespit edilirken( $p<0.001$ ) , Deks ile Deks+Se arasında anlamlı fark bulunmadı( $p>0.05$ ).
- Ayrıca Zoledronik asidin Bevasizumab ya da Deksametazon ile kombine uygulamalarında (ZA+Deks ya da ZA+Bev) kaspaz 9 aktivitelerindeki artışın daha fazla olduğu ( $p<0.001$ ) ve bevasizumabın, deksametazona göre aktiviteyi daha fazla arttırdığı görüldü ( $p<0.05$ ).

#### 4.5. Hücre İçi ROS üretim ve Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Analiz Sonuçları



**Grafik 5.** Saos-2 hücrelerinde ilaçların hücre içi ROS üretimi üzerine etkileri.

ROS; <sup>a</sup>p<0.001 kontrol grubuna kıyasla, <sup>b</sup>p<0.001 ZA'ya kıyasla, <sup>c</sup>p<0.001 Bev'e kıyasla, <sup>d</sup>p<0.001 Deks'e kıyasla, <sup>e</sup>p<0.001 ZA+Deks'e kıyasla, <sup>f</sup>p<0.001 ZA+Bev'e kıyasla.

JC-1; <sup>a'</sup>p<0.001 kontrol grubuna kıyasla, <sup>b'</sup>p<0.001 ZA'ya kıyasla, <sup>c'</sup>p<0.001 Bev'e kıyasla, <sup>d'</sup>p<0.001 Deks'e kıyasla, <sup>e'</sup>p<0.001 ZA+Deks'e kıyasla, <sup>f'</sup>p<0.001 ZA+Bev'e kıyasla

Grafik 5 incelendiğinde, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretimi için;

- Kontrol grubuna kıyasla ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında ROS düzeyinin önemli ölçüde arttığı gözlemlendi (p<0.001).
- Sadece Selenyumun yer aldığı grubun kontrol grubu ile kıyaslanmasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).
- Selenyum içeren ve içermeyen grupların kıyaslanmasında (ZA ile ZA+Se, Bev ile Bev+Se, Deks ile Deks+Se, ZA+Deks ile ZA+Deks+Se ve ZA+Bev ile ZA+Bev+Se) ise selenyumun ROS'u azalttığı tespit edilmiştir (p<0.001).

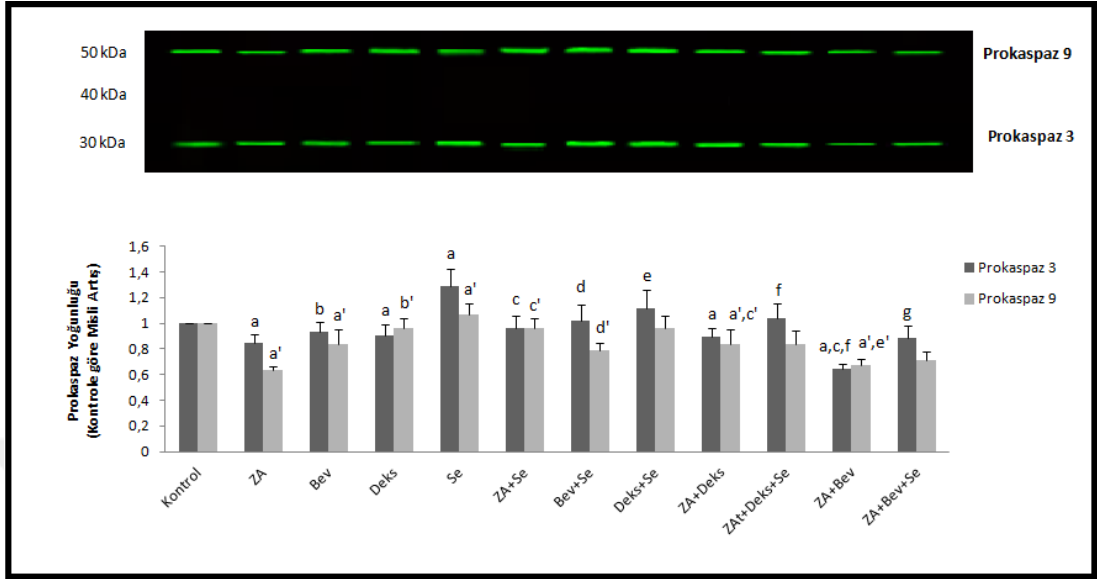
- Ayrıca Zoledronik asidin özellikle Bevasizumab olmak üzere kombine uygulamalarında (ZA+Deks ya da ZA+Bev) ROS'un önemli düzeyde arttığı, bevasizumabın, deksametazona göre üretimi daha fazla arttırdığı görüldü( $p<0.001$ ).

Hücrelerin 0.001 mM JC-1 ile 37 °C de 15 dakika inkübasyonu sonucu JC-1 boyasının mitokondride depolarizasyon artışına paralel olarak girişi artmaktadır. Buna göre;

- Kontrol grubuna kıyasla ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında Mitokondriyal Membran Depolarizasyon düzeyinin önemli ölçüde yükseldiği gözlemlenmiştir( $p<0.001$ ).
- Selenyum içeren ve içermeyen grupların kıyaslanmasında (ZA ile ZA+Se, Bev ile Bev+Se, Deks ile Deks+Se, ZA+Deks ile ZA+Deks+Se ve ZA+Bev ile ZA+Bev+Se) ise selenyumlu gruplarda Mitokondriyal Membran Depolarizasyonun düştüğü tespit edilmiştir( $p<0.001$ ).
- Ayrıca Zoledronik asidin Bevasizumab ve Deksametazon ile kombine uygulamalarında (ZA+Deks ya da ZA+Bev) Mitokondriyal Membran Depolarizasyonunu önemli düzeyde yükselttiği; bevasizumabın da deksametazona göre Mitokondriyal Membran Depolarizasyon düzeyini daha fazla yükselttiği görüldü( $p<0.001$ ) (Grafik 5).



#### 4.6. Western-blot Analiz Sonuçları



**Grafik 6.** Saos-2 hücrelerinde ilaçların Prokaspaz 3 ve 9 üzerine etkileri.

Prokaspaz 3 için; <sup>a</sup>p<0.001 ve <sup>b</sup>p <0.05 kontrole kıyasla, <sup>c</sup>p<0.001 ZA' ya kıyasla, <sup>d</sup>p<0.001 Bev' e kıyasla, <sup>e</sup>p<0.001 Deks' e kıyasla, <sup>f</sup>p<0.001 ZA+Deks'e kıyasla, <sup>g</sup>p<0.001 Zol+Bev'e kıyasla.

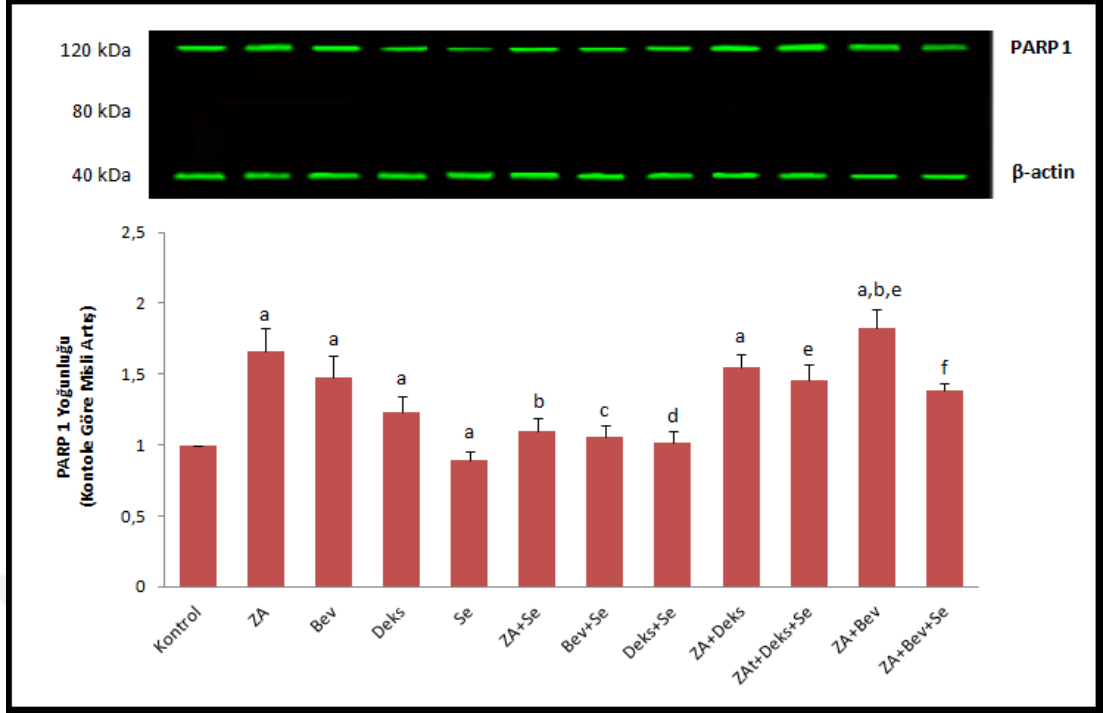
Prokaspaz 9 için; <sup>a</sup>p<0.001 ve <sup>b</sup>p <0.05 kontrole kıyasla, <sup>c</sup>p<0.001 ZA' ya kıyasla, <sup>d</sup>p<0.01 Bev'e kıyasla, <sup>e</sup>p<0.001 versus ZA+Deks'e kıyasla.

Apoptotik uyarılım sonucu mitokondriden sitokrom c salınımı ve prokaspaz 9 ve 3 ün uyarılımı sonucu apoptotik süreç oluşur. Apoptotik süreçte prokaspazların kaspazlara dönüşümü dolayısıyla prokaspaz 3 ve 9 da azalma meydana gelir. Grafik 6 da apoptoz göstergesi olan prokaspaz 3 ve 9 un yoğunluğu analiz sonuçları gösterildi. Buna göre;

- Prokaspaz 3 ve 9 yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla ZA, Bev, Deks,ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.
- Se grubunda ise apoptotik sürecin yavaşlaması sonucu Prokaspaz 3 ve 9 yoğunluğunda yükselme izlendi.

- Selenyum içeren ve içermeyen grupların kıyaslanmasında (ZA ile ZA+Se, Bev ile Bev+Se, Deks ile Deks+Se, ZA+Deks ile ZA+Deks+Se ve ZA+Bev ile ZA+Bev+Se) selenyum içermeyen gruplarda Prokaspaz 3 yoğunluğunun düştüğü tespit edildi. Benzer sonuçlar prokaspaz 9 yoğunluğunda da (Deks ile Deks+Se ve ZA+Bev ile ZA+Bev+Se dışındakilerde) görüldü.
- Ayrıca Zoledronik asidin Bevasizumab ve Deksametazon ile kombine uygulamalarında (ZA+Deks ya da ZA+Bev) Prokaspaz 3 ve 9 yoğunluğunun önemli düzeyde düştüğü görülmüştür.





**Grafik 7.** Saos-2 hücrelerinde ilaçların PARP üzerine etkileri. <sup>a</sup>p<0.001 kontrole kıyasla, <sup>b</sup>p <0.001 ZA'ya kıyasla, <sup>c</sup>p<0.001 Bev' e kıyasla, <sup>d</sup>p<0.001 Deks'e kıyasla, <sup>e</sup>p<0.001 ZA+Deks' e kıyasla, <sup>f</sup>p<0.001 ZA+Bev' e kıyasla.

Poli+adp riboz polimeraz 1 (PARP 1) hasar anında hücrelerin içinde DNA tamir mekanizmasını uyaran bir enzim olup, DNA zincir kırıklarıyla aktive olarak yoğunluğu artmaktadır. Grafik 7 incelendiğinde;

- Kontrol grubuna kıyasla ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında PARP 1 yoğunluğunun yükseldiği gözlemlenmiştir.
- Selenyum içeren ve içermeyen grupların kıyaslanmasında (ZA ile ZA+Se, Bev ile Bev+Se, Deks ile Deks+Se, ZA+Deks ile ZA+Deks+Se ve ZA+Bev ile ZA+Bev+Se) ise selenyumun PARP 1 yoğunluğunu azalttığı tespit edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Bisfosfonata bağlı çene osteonekrozu 2003 yılından beri rapor edilen bir olgu iken, çene kemiklerinde antirezorptif, antianjiyogenik ilaçların da etken olduğu osteonekroz vakalarının artması nedeniyle 2014 yılında AAOMS' un yayınladığı bildiri ile birtakım ilaçların (denosumab, bevasizumab, vb.) da osteonekroza sebebiyet verebildikleri bildirilmiştir (31). Woo ve ark. bisfosfonata bağlı olarak çene kemiklerinde gelişen osteonekroz olgularının neredeyse tümünden (%94) onkolojik nedenlerle yüksek dozda uygulanan intravenöz bisfosfonat (başta zoledronik asit) tedavisinin sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir (145). Zoledronik aside maruz kalmış kanser hastalarında, MRONJ'un toplam insidansı 0.7%-6.7% aralığındadır (146-148). Yine başka bir çalışmada zoledronik aside maruz kalan kanser hastaları arasında MRONJ riski, plasebo ile tedavi edilen kanser hastalarından 50 ile 100 kat arasında daha yüksektir (31). Osteoporotik hastalarda ise 3 yıl boyunca yıllık olarak zoledronik asit tedavisi gören hastalarda yapılan çalışmalarda; MRONJ Riski %0.017 (17 olgu her 10.000 olguda) olarak bildirilmiştir (149). Bisfosfonat tedavisi gören hastaların çenelerinde osteonekroz gelişme riskini değerlendiren bir başka çalışmada, tedaviyi 12 ay alanlarda %1, 4yıl tedavi alanlarda osteonekroz gelişme sıklığının %11'den fazla olduğu rapor edilmiş ve bu çalışmada zoledronik asit kullananlarda bu oranın arttığını bulmuşlardır (150). Bir antianjiyogenetik ajan olan bevasizumaba maruz kalan kanser hastalarında MRONJ riski %0.2 dir (10 bin hastada 20 olgu). Hem bevasizumaba hem de zoledronik aside maruz kalan hastalarda riskin daha da yüksek olduğu görülmüştür (%0.9) (10 bin hastada 90 olgu) (151). Chiu ve ark. bifosfonatla beraber steroid kullanımının osteonekrozu daha erken indüklediğini ve daha şiddetli olabilme durumundan bahsetmiş ayrıca ilacın kesilmesine çok daha yavaş cevap verildiğini ve iyileşmenin daha az olduğunu belirtmişlerdir(152). Bu verilere rağmen bu tür ilaçların hasta üzerindeki faydalarından ötürü, komplikasyonlarına rağmen kullanımı yaygınlaşarak artmaktadır.

Bu sebeple osteonekroza yol açan ilaçları kullanan hastaların dental tedavi ihtiyacı duydukları zaman diş hekimlerinin oluşabilecek komplikasyonlar karşısında hazırlıklı olmaları gerekmektedir. Böyle bir duruma karşın, MRONJ

patofizyolojisinin henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasından ötürü, klinikte hastalara yönelik bir koruma ve tedavi yaklaşımı protokolü geliştirilmesi gerekliliği bir sorun olarak üzerinde çalışılan konu olmaya devam etmektedir.

Kemiğin yeniden şekillenmesi için osteoklastlar ve osteoblastlar arasındaki etkileşim esastır. Çenelerde görülen osteonekroz olguları osteoklastların etkilerini ve antianjiogenik özelliklerini temel alan teorilere dayandırılmakla beraber (28,153), bifosfonatlar osteoklastların fonksiyonlarını etkilediği gibi benzer şekilde osteoblastların fonksiyonunu da etkilemektedir (154,155). Naidu ve ark. nın zaman ve doza bağlı osteoblastlara bifosfonat uyguladıkları in vitro çalışmasında anjiogenezin ve hücre canlılığının etkilendiği rapor edilmiştir (47). Osteoblastların farklılaşmasının nitrojen içeren bifosfonatlar tarafından stimule edildiği de in vitro olarak belirtilmiştir (130,156-158). Ayrıca birtakım bifosfonatın ratlardaki calvarial osteoblastlarda düşük konsantrasyonlarda proliferasyona neden olduğu rapor edilmiştir (159). Buna karşın yüksek konsantrasyonlarda bifosfonatlar osteoblastların proliferasyonunu, adhezyonunu ve migrasyonunu inhibe etmektedir (156,160). Bifosfonatların neden olduğu osteoklastik kemik rezorbisyonunun inhibisyonunda osteoblastların da rolü olduğu gösterilmiştir (161).

Bevasizumab bir antianjiogenik ilaç olup, osteoblastlar ve osteositleri içeren kemik hücrelerinden salınan başta VEGF olmak üzere bir takım moleküllere bağlanarak anjiogenezin basamaklarını bozmakta ve yeni kan damarı oluşumunu engellemektedir (162). Ayrıca in vitro çalışmalarda VEGF molekülünün osteoblast sağ kalımının etkili bir düzenleyicisi olabileceği ileri sürülmüştür(58). Yapılan çalışmalarda bevasizumabın VEGF molekülünü inhibe etmesiyle anjiogenezi engellediği bildirilirken (163), osteoblastların apoptozuna sebebiyet verip vermediğine yönelik bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Uygun terapötik dozlarda immunsupressif ve antiinflamatuvar etki gösteren kortikosteroidlerin kullanımı sırasında birçok yan etki ile karşılaşmaktadır. Osteoporoz kemik metabolizması üzerine bilinen ve yaygın görülen bir yan etkisi iken, avasküler nekroz daha nadir bir yan etkisidir. Osteoporoz tedavisinde yaygın olarak bifosfonatlar ile kortikosteroid ilaçlar beraber kullanılmaktadır (152,164). Sistemik kortikosteroidler kemik yıkımını hem direkt hem de indirekt yoldan etkiler,

büyüme hormonu salınımını baskırlar, İnsülin Like Growth Faktör I (ILGF I) sentezini inhibe ederler. Büyüme faktörlerinin inhibisyonu sonucunda osteoblastların sayı ve aktivitelerinde azalma olur (165). Tüm bu durumlardan ötürü osteonekrozun oluş mekanizması ve tedavisi için osteoklastlar kadar osteoblastların da etkilerinin araştırılması da önemlidir.

Vücudumuzun olmazsa olmaz komponentlerinden birisi olan  $Ca^{+2}$  iyonu, kemik gelişimine katılmasından ziyade daha mikro düzeyde incelendiğinde hücrelerdeki yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için de belli bir denge denkleminde hücre içi ve hücre dışı olarak hücre zarı üzerindeki bir takım iyon kanalları vasıtasıyla iki yönlü hareket halindedir. Hücre içine kıyasla hücreler arası boşlukta yaklaşık 20.000 kat daha fazla  $Ca^{+2}$  iyonu bulunmaktadır. Çevresel etmenler, sıcaklık, beslenme, ilaç kullanımı, hastalık (kanser v.s) durumunda hücrel hasar meydana gelmekte ve bunun sonucunda hasarlı hücre içerisine normalden fazla miktarda  $Ca^{+2}$  iyonu girmektedir. Bu da 'Apopitozis' diye tanımlanan programlı hücre ölümünü tetiklemektedir. Bilindiği gibi mitokondri protein, karbonhidrat ve yağların değerlendirilmesinde önemli bir hücre içi organelidir.

Bu fizyolojik aktiviteler sırasında artık ürün olarak ROS oluşmaktadır. Kas hücrelerinde sarkoplazmik retikulum, sinir hücreleri gibi diğer hücrelerde endoplazmik retikulum, katyon kanalları aktivasyonu yoluyla sitozole akan  $Ca^{+2}$  iyonları mitokondride porların açılarak depolarizasyonuna neden olarak ROS üretiminin daha da artmasına neden olmaktadır. Bu artan ROS  $Ca^{+2}$  iyon kanallarını daha fazla açarak hücre dışından içine  $Ca^{+2}$  akışına neden olmaktadır. Bu zincirleme olaylar ya hücrelerin çalışmasını zorlaştırmakta ya da hücreleri apopitozise götürmektedir. Bütün bu patofizyolojik olaylarda oksidatif stres, kaspaz aktiviteleri, apopitozis, mitokondriyal depolarizasyon oranlarında bir takım değişiklikler gözlenmektedir (103, 166).

Selenyum, besin değeri açısından önemli bir besindir ve insanlarda önemli fonksiyonları gerçekleştirmektedir. Selenyum DNA onarımı, endokrin ve bağışıklık sistemi ve diğer mekanizmaları üzerinde etki gösterir; antioksidan özellikleri dahil, hücre zarını korumak ve güçlü serbest radikal süpürücü yeteneği sayesinde malign

transformasyon hücrelerini önlemek gibi etkileri vardır. Ayrıca, önemli ölçüde reaktif oksijen türleri ve mitokondriyal disfonksiyon tarafından uyarılan apoptozu inhibe etmektedir (167).

Biz de bu çalışmayla; çeşitli yollarla çenelerde osteonekroz gelişmesine sebebiyet veren zoledronik asit, bevasizumab, deksametazon gibi ilaçların, kemik oluşumunda önemli görevi olan osteoblast hücrelerindeki kalsiyum sinyali, apoptoz ve oksidatif stres üzerine etkilerini araştırarak ve bu oluşturulan etkiye karşılık bir antioksidan olan selenyumun hücresel düzeyde ne gibi değişiklikler yarattığını in vitro model üzerinde incelemeyi amaçladık.

AAOMS tarafından osteonekroz riskine karşın hastalar için multidisipliner bir yaklaşım gerekliliğini desteklemektedir. Erken görüntüleme ve uygun dental tedavilere başlamanın faydası hayli fazladır. ONJ insidansını düşürmekle kalmayıp ayrıca bütün hastaların optimal ağız sağlığı sağlanmış olur. Antiresorptif ve anti-anjiyogenik tedaviye başlamadan önce uygulanan dental görüntüleme ve uygun dental tedavilerin yapılmasının ONJ riskini azalttığı gözlenmiştir (168-170). MRONJ' un tedavisi zordur ve halen optimal tedavi stratejisi belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu yüzden osteonekrozun oluşmasını önlemek çok önemlidir. Çoğu araştırmacı diş çekimi ya da diğer invaziv işlemlerden önce ilaç tatilini önermektedir. Osteoporoz tedavisi için antiresorptif ilaç alan hastalarda ilaç tatili uygulamasının yararının olup olmamasına yönelik çürütecek yeterli bilgi ve kaynak bulunmamaktadır. Ancak AAOMS komitesi Damm ve Jones tarafından tanımlanan ihtiyatlı, modifiye ilaç tatili yaklaşımını risk altındaki hastalar için göz önüne almış ve uzun süre (>4 yıl ) ilaca maruz kalmış hastalar için faydalı olabileceğini uygun görmüşlerdir (171). Kanser hastalarında cerrahi işlemler öncesi IV bisfosfonat tedavisinin kesilmesi hakkında bilgiler yetersizdir. Ancak ONJ gelişirse, onkolog hastalığın durumuna bağlı olarak yumuşak doku iyileşmesi tamamlanana kadar ilaç tedavisinin durdurulmasına karar verebilir. MRONJ'u önlemek ya da tedavi etmek amacıyla antianjiyogenik ilaç tedavisini durdurma konusunda destekleyecek veya çürütecek bir bilgi bulunmamakta ve bu konu hakkında araştırmalar sürmektedir.

Kesin tanısı konulmuş MRONJ hastalarında tedavi hedefleri; ağrıyı elimine etmek, yumuşak ve sert dokulardaki enfeksiyonu kontrol altına almak ve ilerleyişi

veya meydana gelen kemik nekrozunu minimize etmektir. MRONJ'lu hastalarda, elektif dentoalveolar cerrahi prosedürlerden kaçınılmalıdır çünkü sonrasında bu cerrahi alanla nekroza maruz kalmış ek alanlara neden olabilir. 2009 ilkeleri yayımlandığından beri, MRONJ'un tüm dereceleriyle ilgili operatif ya da non-operatif tedaviyi takiben yapılan başarılı tedavilerin sonuçlarını içeren birçok yayın ortaya çıkmıştır. AAOMS öncelikli olarak konservatif tedaviyi önermesine rağmen, Ristow O ve ark. çalışmasında konservatif tedavi tercih edilen vakalarda başarı oranı %20 olurken, cerrahi tedaviye karar verilen olgularda ise başarının %85 in üzerinde olduğunu rapor etmiştir (172). Bu durum göstermektedir ki, üçüncü derece olguları ya da iyi tanımlanmış sekestrum görülen olgular bir kenara bırakılırsa; non operatif tedavi başarısızlıkla sonuçlandığında daha tedbirli bir yaklaşım olan operatif tedavi düşünülmelidir. Osteonekroz olgularının 1. evresindeki semptomsuz vakalarda konservatif tedavi önerilmektedir. Konservatif tedavi oral hijyeni, periyodik dental kontrolleri, klorheksidinle yapılan gargarayı ve antibiyotik tedavisini içermektedir (31). Çalışmaların büyük kısmında konservatif yaklaşımın semptomları iyileştirdiği ve osteonekrozu stabil hale getirdiği rapor edilmiştir (173,174). Ayrıca konservatif yaklaşımla beraber ozon terapisi, hiperbarik oksijen (HBO) ve düşük dozlu lazer ışın uygulamalarının başarı oranını arttırdığı rapor edilmiştir (175). Ozon terapisi evre 1 ve 2 deki klinik çalışmalarda hücre proliferasyonunu ve yumuşak doku iyileşmesini uyarmakta ve ağrıyı azaltmaktadır (176). Hiperbarik oksijen uygulaması tartışmalı sonuçlarla beraber zaman zaman MRONJ tedavisinde kullanılmaktadır. Birtakım araştırmacı HBO nun yara iyileşmesini sağladığını, ödemi ve şişliği azalttığını, kök hücre mobilizasyonunu uyardığını ve bifosfonatın sebep olduğu kemik yenilenmesinin baskılanmasını hafiflettiğini rapor etmişlerdir (175,177). Düşük dozlu lazer terapisinin ağrıyı azaltmak, yara iyileşmesini artırmak ve sinir rejenerasyonunu kolaylaştırmak gibi etkileri bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda düşük dozlu lazer terapisinin MRONJ lezyonlarında biyostimulan etkisinin temel alınarak kullanıldığı rapor edilmiştir (175,178). Ayrıca bunların dışında Pentoksifilin ve  $\alpha$ -tokoferol'un MRONJ 'un ilk evrelerindeki antimikrobiyal terapiye yardımcı olduğu belirtilmiş ve bunların kullanıldığı vakalarda kemiğin ekspoze alanında ve semptomlarda %74 oranında azalma bulunmuştur (175,179).



Hastalığın derecesinden bağımsız olarak, yumuşak dokuları sürekli olarak irrite eden ve gevşek kalıntılar halinde bulunan nekrotik kemik bölgeleri; yumuşak doku iyileşmesinin düzene sokulması için uzaklaştırılmalı ya da yeniden biçimlendirilmelidir. Etkilenmiş kemik bölgesindeki semptomatik dişlerin çekimi ve nekrotik kemiğin çıkarılması, nekrotik süreci şiddetlendirme ihtimalinin düşük olması sebebiyle düşünülmelidir. Kronik ekspoze kemik alanları, yara iyileşmesindeki eksiklik ve enfeksiyonla karakterize durumlarda cerrahi yaklaşım olarak konservatif debridman ya da radikal olarak segmental rezeksiyon gerekebilmektedir. Evre II/III de cerrahi olmayan yaklaşımların başarısız olduğu belirtilmiştir (180). Küçük çaplı olgu raporları; trombositten zengin plazma (181), kök hücre (182), lökosit ve trombositten zengin fibrin mesh (183) ile paratiroid hormonu (184,185) gibi tedavi stratejilerini de belgelemiştir. Bu tedavi yöntemleri ve daha fazlasının, ek araştırma ve kontrollü çalışmalar vasıtasıyla etkilerinin saptanma ihtiyacı halen devam etmektedir.

Sağlıklı hücreler daimi olarak düşük düzeylerde ROS üretmekte ve bu ürünler birçok farklı sistem ile tamponlanmaktadır. ROS ile tamponlama sistemi arasındaki dengenin bozulması genetik hasar, yaşlanma, birçok çeşit hastalık ve hücre ölümünün kaynaklarından birisi olarak bilinen oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (186). Oksidatif stres ve ROS üretiminin artışı birçok hastalığın etiolojisinde rol oynamaktadır (187). Serbest radikallerin tetiklediği oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bu savunma sürecinde rol oynayan maddelere 'antioksidanlar' denir. Önemli bir antioksidan olan selenyumun ROS'un neden olduğu hücre içi tahribatı önlemede önemli rolü var olduğu gibi hücre büyümesi, yaşamının idamesi, sitotoksitenin önlenmesi, genetik faktörlerin ve enzimlerin düzenlenmesi yolaklarında da önemli rolleri bulunmaktadır (186,187,188). Selenyum mitokondride protein thiol gruplarında değişikliklere neden olarak sitokrom C serbestlenmesini ve bunun sonucunda da mitokondriyal zar potansiyelinin kaybolmasına neden olarak serbest radikal üretimini baskırlar. Selenyumun oksidatif stres ve apoptoz üzerine etkilerini osteoblastik hücre ortamında değerlendiren yeterli çalışma bulunmamaktadır. Ren ve ark. farklı konsantrasyonlardaki (10 nM, 100 nM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM) selenyumun rat osteoblastları üzerindeki ILGF-1 ekspresyonu ve apoptozun regülasyonundaki

rolünün incelendiği çalışmada Selenyumun 10 ve 100 nM değerlerinde hücre canlılığını (MTT) arttırdığı, 5 ve 10 µM değerlerinde azalttığı bildirilmiştir. (131). Diğer hücreler üzerine olan çalışmalarına bakıldığında da oksidatif stres sonucu oluşabilecek apoptotik yolları baskıladığı rapor edilmiştir. Sakallı Çetin ve ark nın çalışmasında meme kanseri hücrelerinde selenyumun hücre içi Ca<sup>2+</sup> iyon girişini azaltarak, ROS üretimini baskıladığı ve sonuç olarak apoptozun indüklenmesine engel olabildiği rapor edilmiştir (132).

Öte yandan Selenyumla ilgili osteonekroza yönelik çalışma mevcut olmayıp, sınırlı sayıdaki diğer antioksidanlarla ilgili çalışmalara bakıldığında; Rodríguez-Lozano ve ark. melatoninin zoledronik asit uygulanan mezanşimal kök hücreler üzerindeki sitoprotektif etkilerinin incelendiği in vitro çalışmasında melatoninin hücre proliferasyonunu arttırdığı ve BRONJ un önlenmesinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (189). Magremanne ve Reychler adlı araştırmacıların zoledronik aside bağlı çenelerde osteonekroz gelişen vakaya pentoksifilin(PENTO) uygulamasına yönelik vaka raporunda PENTO nun BRONJ tedavisi için etkili bir yöntem olabileceği bildirilmiştir (179). Lei Tian ve ark. tavşanlardaki steroide bağlı femur başı nekrozuna yönelik sodyum ferulat(SF) uygulamalarını içeren çalışmasında SF nin kaspaz-3 aktivitesi ve apoptozu azalttığı rapor edilmiştir (190).

İnsan kemiğinden osteoblast hücrelerinin ilk izolasyonu ve in vitro kültür ortamı girişimi Bard ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (191). Osteoblastik hücre serileri; hücre farklılaşmasının düzenlenmesinin, hormonal düzenlemenin, matriks proteininin sentez ve salgılanmasının, kemik hastalıklarının moleküler mekanizmasının ve ilaç farmakinetiğinin in vitro araştırılması için model olarak geliştirilmiştir. Osteoblastik hücre biyolojisi çalışmalarında; farklı dokulardan alınan primer hücreler, pluripotent kök hücrelerden indüklenen osteoblastlar ve malign hücre serilerini içeren birçok hücre kültür modelleri kullanılmaktadır.

Osteosarkom hücre serilerinin daha güvenilir tekrarlanabilirlik avantajıyla beraber izolasyon sürecinin zaman almaması ve etik onayına ihtiyaç duyulmadan sınırsız sayıda mevcut olması gibi primer hücre serilerine göre avantajları bulunmaktadır. Rodan ve ark. 11 yaşındaki kafkas bir kız çocuğundan izole edilen, insan osteosarkom hücre serisi olan Saos-2 hücrelerinin osteoblastik özelliklerini

tanımlamışlardır. Bu hücreler, kemik mineralizasyonunda önemi olan yüksek seviyede alkalen fosfataz(ALP) aktivitesine sahip olgun osteoblast fenotipleridir. Mineralize matriks formu ve kollajen sentezi açısından primer insan osteoblast hücrelerine benzerliği mevcuttur (192). Ayrıca sitokin ve büyüme faktör salınımı da primer insan osteoblast hücrelerine benzerdir (193).ALP aktivitesi yönünden Saos-2 hücre serisi diğer osteosarkom hücre serilerinden(MG-63,Saos-1) daha yüksek olup (194), primer osteoblast hücre serisi ile de benzer aktiviteye sahiptir (195).

Bayram ve ark. zoledronik asit ile inkübe edilen Saos-2 hücrelerine düşük dozlu lazer uygulamasını içeren çalışmada; hücre proliferasyonu ve alkalen fosfataz aktivitesi incelenmiş ve zoledronik asidin hücre proliferasyonu ve ALP aktivitesini azalttığını, lazerin ise arttırdığını rapor etmişlerdir (133). Al Hadi ve ark. hiperbarik oksijen uygulamasının Saos-2 hücreleri üzerine olan etkisinin incelendiği çalışmada; HBO nun ALP aktivitesini arttırdığı görülmüştür (196).

Bizde çalışmamızda; osteoblastik ürünlerin değerlendirildiği deneysel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen, hücre kültürü için mineralize matriks üretmesi ile osteoblastik hücrelerin esas fenotipik karakteristiğini gösteren Saos-2 hücre serisinin kullanılmasını tercih ettik.

Çalışmamızda kullanılacak dozların tespiti için ön çalışma yapılmadan önce in vitro çalışmalarda zoledronik asit, bevasizumab, deksametazon ve selenyum için kullanılan konsantrasyonlar araştırıldı. Zoledronik asidin osteoblastlar üzerindeki in vitro çalışmalarına bakıldığında; Pan ve ark osteoartritli hastalardan biyopsi ile aldıkları trabeküler kemik örneklerinden elde edilen hücreler ile oluşturdukları osteoblast kültürlerine çeşitli konsantrasyonlarda (0.05  $\mu\text{M}$  ,0.5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ ) zoledronik asit ilave ederek, ZA nın osteoblast hücrelerinde oluşturduğu proliferasyonu ve apoptozisi değerlendirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada ZA konsantrasyonu arttıkça doza bağlı olarak apoptozun indüklenmesi ve proliferasyonun inhibe edilmesi sonucu hücre sayısında azalma olduğu ve bu azalmanın 0.5  $\mu\text{M}$ ' dan büyük konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu rapor edilmişti (130). Bayram ve ark nın çalışmasında Saos-2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) zoledronik asit uygulanarak düşük dozlu lazer terapisi altında hücre canlılığı değerlendirilmiştir. 10  $\mu\text{M}$  lık dozdan

itibaren hücre canlılığında anlamlı azalış rapor edilmiştir (133). Osteoblast hücreleri dışında zoledronik asit kullanılan çalışmalara bakıldığında; Moreau ve ark nın in vitro bir çalışmasında 5 farklı bifosfonat (alendronik asit, etidronik asit, risedronik asit, zoledronik asit, pamidronik asit) farklı konsantrasyonlarda (1-5-10-50-100  $\mu\text{M}$  ) osteoklast öncülü olan makrofaj hücrelerine uygulanmış ve zoledronik asit açısından bakıldığında 10  $\mu\text{M}$  dan itibaren anlamlı olarak hücrelerde apoptoz gerçekleştiği, 100  $\mu\text{M}$  dan itibaren ortamda hiç canlı hücre bulunmadığı rapor edilmiştir (134). Lang ve ark. çalışmasında ECV-304 adlı insan endotelyal hücre serisine uygulanan çeşitli konsantrasyonlardaki ( 0, 15, 50, 150  $\mu\text{M}$ ) zoledronik asidin hücrelerde yarattığı proliferatif ve apoptotik etki incelenmiş, kontrole göre bu konsantrasyonların apoptozisi arttırdığı bildirilmiştir (135). Biz de çalışmamızda önceki çalışmaları da dikkate alarak bir ön çalışma gerçekleştirdik. Bu amaçla Zoledronik asidi Saos-2 hücrelerine 1,5,10 ile 20  $\mu\text{M}$  luk konsantrasyonlarda inkübe ettik ve sitotoksitelerini 24. saatte spektroskopik olarak yapılan MTT testi ile ölçerek optimal dozun 5  $\mu\text{M}$  olduğuna karar verdik.

Bevasizumabın osteoblastlar üzerine in vitro çalışması bulunmamakta olup literatürde retinal ganglion hücre serisi ve kanser hücreleri üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Retinal ganglion hücre serisi üzerine yapılan çalışmada 0.1 mg/ml, 1 mg/ml ve 2 mg/ml' lik dozlar 24 saat boyunca uygulanmış, bu dozların toksik olmadığı görülmüştür. 30 insan kanser hücre serisi üzerine yapılan bevasizumab uygulamasını içeren çalışmada ise 0.25 mg/ml' lik doz uygulanarak VEGF üzerine etkilerine bakılmıştır (136,137). Bevasizumabın glioblastoma hücre serisi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada 1 mg/ml' lik çalışma dozu kullanılmıştır (138). Çalışmamızda ön çalışma dozlarının ışığında uygulanacak optimal dozun tespitini gerçekleştirdik. Bu amaçla bevasizumabı Saos-2 hücrelerine 0.1, 0.25, 1 ile 2,5  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonları sağlayacak şekilde inkübe ettik ve sitotoksitelerini 24. saatte spektroskopik olarak yapılan MTT testi ile ölçerek optimal dozun 1  $\mu\text{g/ml}$  olduğuna karar kıldık.

Deksametazon içeren in vitro çalışmalara bakıldığında Coelho ve Fernandes in insan kemik iliğinden elde edilen primer hücre kültüründe osteoblast farklılaşması üzerine yaptıkları in vitro çalışmada 10 nM luk deksametazon doz uygulamasının ALP aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (139). Shiguang ve ark. fare kafa tasına ait

MC3T3-E1 osteoblast benzeri hücreler üzerinde yaptıkları deksametazonu içeren çalışmalarında 1 µM luk konsantrasyon çalışma dozu olarak kullanılmıştır (140). Çalışmamızda Saos-2 hücrelerine 50,100,250 ile 500 nM konsantrasyonlarda deksametazon inkübasyonu yaptık ve sitotoksitelerini 24. saatte spektroskopik olarak yapılan MTT testi ile ölçerek optimal dozun 250 nM olduğuna karar kıldık.

Selenyum içeren in vitro çalışmalara bakıldığında ise; Sakallı Çetin ve ark meme kanseri hücreleri üzerindeki oksidatif stresin incelendiği çalışmalarında çalışma dozu olarak 200 nM uygulanmıştır (132). Gaixian ve ark fare osteoblastları üzerindeki çalışmalarında, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 5 µM ve 10 µM' luk Selenyum dozları kullanılmış, 10 nM, 100 nM ve 1 µM değerlerinde hücre canlılığında artış rapor edilmiştir (131). Biz de ön çalışma olarak Saos-2 hücrelerine 100,200,500 ile 1 µM konsantrasyonlarda selenyum inkübasyonu yaptık ve sitotoksitelerini 24. saatte spektroskopik olarak yapılan MTT testi ile ölçerek optimal dozun 1 µM olduğuna karar kıldık.

Çalışmamızda Saos-2 hücreleri 24 saat süreyle belirlenen dozlarda ve kombinasyonlarda zoledronik asit, bevasizumab, deksametazon ve selenyum ile inkübe edilerek, kalsiyum sinyali, apoptozis, kaspaz-3, kaspaz-9, MTT, hücre içi ROS tayini, mitokondri membran depolarizasyonu ve western-blot analizleri yapıldı. Saos-2 hücreleri temin edilip, çalışmaya ait analizler yapılincaya kadar geçen süreçte uygulanan hücre ekimleri, pasajlama işlemleri, proliferasyon durumlarının takibi sonucunda yapılan değerlendirmelerde; hücrelerin ortalama 24-36 saat arasında bölünerek çoğaldığı, 72 saat içinde ise besi yerlerini kaplayacak şekilde yoğun bir hücre sayısına eriştiği görüldü. 72 saatin sonrasında ise besi yerlerinde hem kontaminasyon riskinin artmasından hem de hücre yoğunluğunun fazlalığına bağlı olarak gelişebilecek hücre ölümlerinin çalışmayı etkilememesi amacıyla çalışmamızda hücreler gruplara ayrılıp hücre ekim işlemleri yapıldıktan sonra 48. saatte ilaçlarla inkübe edilip 72. saatte ise analizler yapıldı. Yapılan diğer çalışmalardaki inkübasyon sürelerine bakıldığında; Bayram ve ark çalışmasında Saos- 2 hücrelerine yapılan zoledronik asit inkübasyonu 24, 48, 72 ve 96. saatte değerlendirilmiş, süre arttıkça hücre canlılığında azalma rapor edilmiştir (133). Lang' ın vasküler endotelial hücrelere farklı konsantrasyonlarda zoledronik asit

uyguladıkları çalışmada ise apoptoza ait analizler 24. saatin sonunda yapılmıştır (135).

$Ca^{+2}$  iyon homestazı, hücrelerin çok önemli fonksiyonlarından biridir. Hücrelerin çoğalması, apoptozise uğraması, oksidatif stresin indüksiyonu ve fizyolojik sinyal iletimi gibi çeşitli fonksiyonlar  $Ca^{+2}$  iyon homestazının bir parçasıdır. Osteoblastlar üzerinde osteonekroza sebebiyet veren ilaçların kalsiyum sinyali üzerine literatürde çalışma mevcut olmamakla beraber, Yu-Guang ve ark. çalışmasında meme kanseri hücrelerinde zoledronik asid uygulamasıyla hücre içi  $Ca^{+2}$  iyonlarında artışla beraber proliferasyonun azaldığı ve apoptozisin indüklendiği rapor edilmiştir (197). Sakallı Çetin ve ark nın çalışmasında selenyumun, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre içi  $Ca^{+2}$  iyonunda azalışa sebebiyet verdiği görülmüştür (132). Çalışmamızda Selenyum dışında uyguladığımız ilaçların hücre içi  $Ca^{+2}$  iyonu miktarında önemli derecede artışa sebebiyet verdiği görüldü. Ayrıca ZA+Bev ve ZA+Deks uygulamalarının ZA nın tek başına uygulanmasına göre hücre içi  $Ca^{+2}$  iyonunda anlamlı olarak artış sağladığı gözlemlendi. Buna karşın bir antioksidan olan Selenyumun hücre içi  $Ca^{+2}$  iyonunu azalttığı tespit edildi.

MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir. Hücre canlılığı ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay ve hızlı olması, radyoaktif izotop kullanmaya gerek olmaması avantaj olarak kabul edilir (198). Xin Huang ve ark nın osteoblastlara zoledronik asit uyguladıkları in vitro çalışmalarında farklı konsantrasyonlarda zoledronik asit fareye ait preosteoblastik hücre serisine (MC3T3-E1) uygulanmış ve hücre canlılığı ile apoptozu değerlendirilmiştir. 10 $\mu$ M nın üzerinde hücre canlılığında belirgin olarak azalma ve apoptozisin indüklendiği görülmüştür. 1 $\mu$ M altındaki konsantrasyonlarda ise hücre canlılığını ve apoptozisi etkilemediği rapor edilmiştir (199). Zafar ve arkadaşlarının primer insan alveolar osteoblastlar üzerinde zoledronik asit uygulayarak yaptıkları bir başka çalışma da ise 1- 50  $\mu$ M arasında uygulanan dozlarda 30 ve 50  $\mu$ M değerlerinde anlamlı olarak hücre canlılığında azalma ve apoptozisde indüklenme görülmüştür (200). Bayram ve ark Saos-2 hücrelerini zoledronik asit ile inkübe edip, düşük dozlu lazer uygulamasıyla hücre canlılığını değerlendirdikleri çalışmada zoledronik asidin hücre canlılığını azalttığı lazer

uygulamasının hücre canlılığındaki azalmaya engel olduğu rapor edilmiştir (133). Bizim çalışmamızda ise osteonekroza sebebiyet verici ilaçların yarattığı oksidatif stresin neden olduğu apoptozisi önlemede ve hücre canlılığını devam ettirmede selenyumun koruyucu etkileri araştırıldı. Başta zoledronik asid olmak üzere deksametazon ve bevasizumabın apoptozisi indükleyerek hücre canlılığını azalttığı, selenyumun ise hücre canlılığındaki azalmaya engel olduğu anlamlı olarak tespit edildi. Ayrıca zoledronik asidin bevasizumab ve deksametazon ile uygulamalarında apoptozisin daha fazla indüklendiği görüldü.

Kaspazlar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunur. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon zinciri başlar. Oksidatif stres sonucu membran geçirgenliği bozulmuş olan mitokondrilerden sitokrom c'ler salınarak Apaf 1 ve başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9 ile birleşerek apoptozom oluşmaktadır. Apoptozom başlangıçta inaktif halde bulunan sonlandırıcı kaspazlardan olan prokaspaz 3 ile birleştikten sonra prokaspaz 3, kaspaz 3 formuna dönüşerek aktifleşmekte ve sonuç olarak apoptoz gerçekleştirilmektedir (201). Osteonekroza sebebiyet veren ilaçların osteoblastlar üzerindeki kaspaz aktivitelerini inceleyen bir çalışma mevcut olmamakla beraber, osteoklastlar üzerine etkilerini inceleyen Benford ve ark. çalışmasında; zoledronik asit, alendronik asit ve clodronik asitin osteoklastlar üzerindeki etkisi incelenmiş ve zoledronik asitin kaspaz 3 aktivitesinde en fazla artışa sebebiyet veren bifosfonat olduğu rapor edilmiştir (202). Bizim çalışmamızda da Selenyum haricindeki ilaçların kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktiviteleri arttırdığı ve sonuç olarak apoptozisi indüklediği görüldü. Bir antioksidan olan Selenyumun ise koruyucu olarak kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesini azalttığı görüldü.

ROS ile tamponlama sistemi arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşan oksidatif strese bağlı aşırı serbest radikal üretimi başta voltaja duyarlı kalsiyum kanalları olmak üzere birçok kanalı uyararak sitozole kalsiyum akışını daha da uyarmaktadır (203). Bunun sonucunda, mitokondrinin daha fazla depolarize olması sonucu serbest radikallerin üretimi daha da artmaktadır. Bu olay apoptozise kadar gitmektedir (204). Selenyum mitokondride protein thiol gruplarında değişikliklere neden olarak sitokrom C serbestlenmesini ve bunun sonucunda da mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolmasına neden olarak serbest radikal üretimini

baskılar. Bu durumu destekleyen çalışmamızda apoptozisi indükleyen başta zoledronik asit olmak üzere bevasizumab ve deksametazonun ROS üretimini önemli ölçüde arttırdığı, selenyumun ise azalttığı görüldü. Daha önce belirtildiği gibi hücrede oksidatif stresin artmasıyla sitozole  $Ca^{+2}$  akışı artırmakta ve mitokondriyal membran depolarizasyon artışı ve mitokondriyal porların açılması ile serbest radikaller daha çok üretilmekte ve apoptozis indüklenmektedir(205). Çalışmamızda da apoptozise sebebiyet veren ilaçların mitokondriyal membran depolarizasyon değerlerini önemli ölçüde yükselttiği, selenyumun ise mitokondrideki membran depolarizasyon değerlerini düşürdüğü tespit edildi.

Yaptığımız Western blot analizleri incelendiğinde; PARP düzeyindeki değişimin diğer analiz sonuçlarıyla örtüştüğü görülmektedir. Bilindiği gibi PARP, hasar anında DNA zincirinde meydana gelen kırıklarla aktive olarak ekspresyonu artmaktadır. Çalışmamızda Selenyumun PARP aktivitesini azalttığı, osteonekroza sebebiyet veren ilaçların ise PARP aktivitesini arttırdığı tespit edildi. Yine bu analizde apoptotik süreçte kaspazlara dönüşen prokaspazların incelenmesine bakıldığında; diğer analizlerde apoptozu indüklediği tespit edilen zoledronik asit, bevasizumab ve deksametazonun prokaspaz 3 ve 9 un aktivitesini azalttığı, selenyumun ise prokaspazların kaspazlara dönüşümüne engel olduğu görüldü. Osteoblastlar üzerine osteonekroza sebebiyet veren ilaçlar ve antioksidanların etkilerini western blot analizi ile inceleyen çalışma mevcut olmayıp, Sakallı Çetin ve ark nın MCF-7 meme kanseri üzerine yaptıkları in vitro bir çalışmada Selenyumun western blot analizleri ile etkilerine bakılmış, bizim çalışmaya benzer olarak Selenyumun prokaspaz 3 ve 9 aktivitelerini azalttığı, PARP aktivitesi yönünden ise anlamlı fark gözlemlenmediği belirtilmiştir (132).

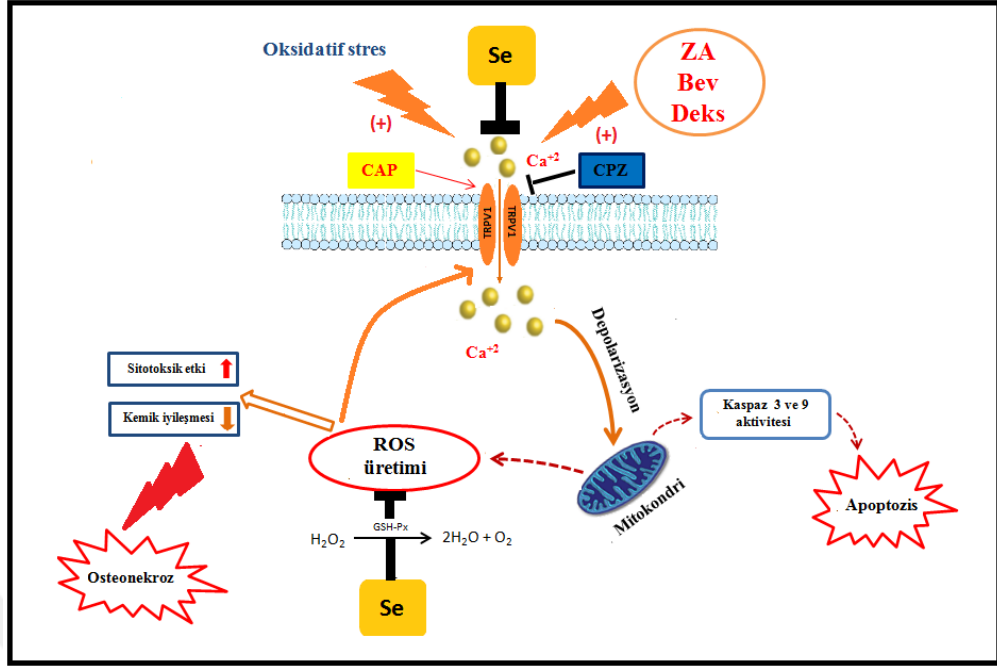


## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bir antioksidan olan selenyum ile osteonekroza sebebiyet veren birtakım ilaçların (antirezorptif etki gösteren Zoledronik asit, antianjiyotik olan Bevasizumab, kortikosteroid olan Deksametazon) osteoblastik fenotip gösteren Saos-2 hücrelerine uygulanması ile hücresel düzeydeki değişiklikleri incelendi.

1. ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev ilaç gruplarının hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı görüldü. Selenyum ise hücre canlılığının azalmasına anlamlı olarak engel olmaktadır.
2. Kalsiyum kanallarının TRPV 1 kanalı habercileri olan Kapsaisin ile uyarıldığı, Kapzasepin ile de bloke olduğu çalışmada görüldüğünden dolayı, osteoblastik hücrelerde TRPV 1 kanalının varlığı tespit edildi.
3. Hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarlarının ZA, Bev, Deks, ZA+Bev ve ZA+Deks grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, Se grubunda ise azaldığı görüldü.
4. ZA, Bev, Deks, ZA+Bev ve ZA+Deks'in apoptozisi arttırdığı görüldü. Selenyum içeren ve içermeyen grupların kıyaslanmasında selenyum apoptozisi azaltmaktadır. Ancak kontrole göre sadece Selenyum içeren hücre grubunda apoptozis daha az meydana gelmektedir.
5. Apoptozisi indükleyen kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitelerinin artması ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında anlamlı olarak gözlemlendi. Selenyumun kaspaz aktivitesi azaltması yönünden diğer ilaçlara göre değerlendirildiğinde anlamlı etkisi varken, deksametazon üzerindeki etkisi anlamlı bulunmadı. Buna karşın kaspaz öncüsü prokaspazlarda ise kaspaz aktivitelerinin tersi görülerek Se grubunda apoptotik sürecin yavaşlaması sonucu Prokaspaz 3 ve 9 yoğunluğunda yükselme izlendi.
6. ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında ROS ve Mitokondriyal Membran Depolarizasyon düzeyinin önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Selenyumun ROS üretimini azaltmakta, sadece kontrol grubu ile kıyaslanmasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

7. DNA tamir mekanizmasını uyararak bir enzim olan PARP 1 ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarında aktive olarak yoğunluğu artmaktadır. Selenyumun ise PARP 1 yoğunluğunu azalttığı tespit edildi.
8. Zoledronik asidin hücreler üzerindeki olumsuz etkisinin bevasizumab ve tüm analizlerde görölmekte olup, ayrıca kombine uygulamalar(ZA+Deks ve ZA+Bev), zoledronik asidin hücre üzerindeki etkisini arttırmaktadır. Bunun dışında bevasizumabın deksametazona kıyasla hücreler üzerindeki olumsuz etkisi daha fazla olmaktadır.
9. Zoledronik asit, bevasizumab ve deksametazonun kemik iyileşmesinde önemli bir role sahip olan osteoblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri görölmekte olup, bir antioksidan olan selenyumun hücrelerde meydana gelen apoptotik sürece engel olduğu ve hücre canlılığının devam etmesine katkı sağladığı göröldü(Şekil 2).
10. Klinik çalışmalarda MRONJ un medikal ve cerrahi tedavisinin dışında uygulanabilecek Selenyum gibi bir antioksidan terapinin olumlu etkisi hücresel düzeyde açıklayıcı nitelikte olmakla beraber, daha kapsamlı deneysel çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.



**Şekil 2.** ZA, Bev ve Deks uygulanan osteoblastik hücre dizisinde (Saos-2) , Se'nin apoptoz, oksidatif stres ve TRPV1 kanalları vasıtasıyla kalsiyum birikimi üzerine olası moleküler yolları. TRPV1 kanalı ZA, Bev, Deks, oksidatif stres ve kapsaisin tarafından aktive edilir, ve kapsazepin tarafından bloke edilir. Saos-2 hücrelerindeki yaralanma, artmış ROS salınımı ile sonuçlanarak TRPV1 kanalları yoluyla Ca<sup>2+</sup> alınma neden olabilir. Mitokondrinin hücre içi Ca<sup>2+</sup> yükselmeleri sağlayarak Ca<sup>2+</sup> biriktirdiği ve bu şekilde mitokondriyal membranların depolarizasyonuna ve kaspaz 3 ve kaspaz 9 gibi apoptozu indükleyen faktörlerin salınmasına yol açtığı bildirilmiştir. Moleküler yol, sitotoksik bir etkiye bağlı olarak kemik döngüsünde azalmaya ve ZA, Bev ve Deks ile indüklenen osteonekroza neden olabilir ve bu durum mutlaka araştırılmalıdır.

## ÖZET

### **Osteoblast Benzeri Hücrelerde Zoledronik Asit, Bevasizumab, Deksametazon Ve Selenyumun Kalsiyum Sinyali, Apoptoz ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

Osteoblastlar kemik yapımından sorumlu hücrelerdir.  $Ca^{+2}$  iyonu hücre içi ikincil haberci sisteminin önemli bir parçası olup fizyolojik birçok fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli bir rol üstlenmektedir.  $[Ca^{+2}]_c$  miktarındaki artış, apoptozis ve serbest radikal düzeylerini de artırmaktadır. Fakat bu konu; osteonekroz gelişmesine sebebiyet veren zoledronik asit (ZA), bevasizumab (Bev), deksametazon (Deks) gibi ilaçların etki ettiği osteoblast hücrelerinde yeterince bilinmemektedir. Bu çalışmada ZA, Bev, Deks gibi ilaçların, kemik oluşumunda önemli görevi olan osteoblast hücrelerindeki kalsiyum sinyali, apoptoz ve oksidatif stres üzerine etkileri araştırılarak ve bu oluşturulan etkiye karşılık bir antioksidan olan selenyumun (Se) hücresel düzeyde oluşturduğu değişiklikler in vitro model üzerinde incelendi.

Bu çalışmada insan osteoblast benzeri hücre serisi olan Saos-2 hücrelerini kullandık ve hücreleri pasajlanıp çoğaltılmalarının ardından; Kontrol, ZA, Bev, Deks, Se, ZA + Se, Bev + Se, Deks + Se, ZA + Deks, ZA + Bev, ZA + Deks + Se, ZA + Bev+ Se grupları olmak üzere 12 gruba ayırarak ilaçlar ile (ZA, Bev, Deks ve Se) 24 saat inkübe ettik. Sonuçlara bakıldığında; ZA, Bev, Deks, ZA+Deks ve ZA+Bev gruplarının  $[Ca^{+2}]_c$  'yi anlamlı olarak artırdığı görülürken, Se uygulamasının ise azalttığı tespit edildi. Benzer şekilde hücrelerdeki apoptoz, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9, PARP-1 ve ROS üretim değerlerindeki ZA, Bev ve Deks kaynaklı artışların Se uygulaması ile azaltıldığı görüldü.

Sonuç olarak, Selenyum tedavisi ile Zoledronik asit, bevasizumab ve deksametazondan etkilenmiş hücrelerde  $Ca^{+2}$  girişi, oksidatif stres ve apoptoz artışı azalmaktadır. Bu yüzden Zol, Bev ve Deks kaynaklı osteonekrozun etyolojisi ve tedavisinde Se tedavisinin etkinliğinin araştırılması gereken bir konu olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Osteonekroz; Osteoblast; Apoptoz; Oksidatif stres; Selenyum

## SUMMARY

### **In The Osteoblast-Like Cells, The Investigation of Effects of Zoledronic Acid, Bevacizumab, Dexamethasone and Selenium on Calcium Signal, Apoptosis and Oxidative Stress**

Osteoblasts are the cells responsible for bone formation.  $Ca^{2+}$  is well known for its role as crucial second messenger in modulating many cellular physiological functions,  $Ca^{2+}$  overload is detrimental to cellular function and may present as an important cause of cellular ROS generation and apoptosis. But this topic is not well known in the osteoblast cells that have the effect of drugs such as zoledronic acid(ZA), bevacizumab(Bev), dexamethasone(Dex). In this study, effects of drugs such as zoledronic acid, bevacizumab, dexamethasone in the important task of osteoblast cells in bone formation on calcium signal, apoptosis and oxidative stress will be investigated and this corresponds to the effect generated selenium, an antioxidant formed at the cellular level changes will be examined in vitro models.

In this study, we used the human osteoblast-like cell line as Saos-2 and after cells were passaged and multiplied, they were divided into 12 groups as Control, ZA, Bev, Dex, Se, ZA + Se, Bev + Se, Dex+ Se, ZA+ Dex, ZA + Bev, ZA + Bev +Se, ZA+Dex+ Se which were incubated with drugs(ZA, Bev, Dex and Se) for 24 h. According to the results; ZA, Bev, Dex, ZA + Dex and ZA + Bev groups significantly increased  $[Ca^{2+}]_c$  while Se application was found to decrease. However, ZA, Bev and Dex-induced increase in apoptosis, caspase 3, caspase 9, poly (ADP-ribose) Polymerase 1 and intracellular reactive oxygen species production values in the cells were decreased by Se treatments.

In conclusion, increase of oxidative stress, apoptosis and  $Ca^{2+}$  entry in the ZA, Bev and Dex-induced cells were decreased by Se treatment. Therefore, the efficacy of Se treatment in ZA, Bev and Dex-induced osteonecrosis etiology and treatment is thought to be a subject to be investigated.

**Keywords:** Osteonecrosis; Osteoblast; Apoptosis; Oxidative stress; Selenium.

## KAYNAKLAR

1. Gartner Lp, Hiatt JI, StrumO Jm. Cell Biology And Histology. 6th Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011, p. 92-105.
2. Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji, İstanbul: Nobel Kitabevi, 2009,11. Baskı s. 135-141
3. Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. 5th Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006, p. 202-237
4. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. Crit Rev Oral Biol Med 1999;10(2):165-181.
5. Schwartz Z, Goultshin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontology 2000 1997;14:158-172
6. Sağlam M, Aştı R, Özer A. Genel Histoloji. İstanbul: Yorum Matbaacılık, 1997,5.Baskı s. 194-204.
7. Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament: Fractures. 2nd Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1984 p.142.
8. Kılıçoğlu S. Mikroskopi Düzeyinde Kırık iyileşmesi. Ankara Üniv. Tıp. Fak. Mecm 2002;55(2):143.
9. Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH. Netter's essential histology. 1st Ed., Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008 p. 166.
10. Altunatmaz K. Kırık iyileşmesinin biyolojisi ve biyolojik osteosentez. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 2004;30:141-147.
11. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Rel Res 1998;supp(355):7-21.
12. Lavine LS, Grodzinsky AJ. Electrical stimulation of repair of bone. J Bone Joint Surg Am 1987;69(4):626-630.
13. Perez RA, Mestres G. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016;61:922-39.
14. Miller MD. Bone. In: Miller MD, Thomson SR, Hart JA, editors. Review of Orthopaedics. 6th Ed., Philadelphia: Saunders; 1996, p. 1- 2.
15. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. Annu Rev Biomed Eng. 2006;8:455-98.
16. Li G, White G, Connolly C, D M. Cell Proliferation and Apoptosis During Fracture Healing. J Bone Miner Res 2002;17(5):791-799.
17. Aksoy C. Kırık İyileşmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi Dergisi 2004;43(3):1-4.

18. Brand RA, Rubin CT. Fracture Healing. In: Albright JA, Brand RA, editors. The scientific basis of orthopaedics. 2nd Ed., Norwalk/Connecticut: Appleton & Lange; 1987, p. 325-340.
19. Heinrich SD. Fractures of the Shaft of the Tibia. Chapt. 24 in: Fractures in Children, Vol. III, 5th Ed., Rockwood, Wilkins and Beaty eds. Lippincott, Williams and Wilkins. Philadelphia, 2001; p. 1077-1119.
20. Çöloğlu AS. Ağız yaralarının iyileşmesi. İ.Ü.Dişhekimliği Fakültesi Dergisi 1970 :4(2):112-120.
21. Özkan S. Tam Gömük 20 yaş dişlerinin ekstraksiyon yaralarının postoperatif 3. Ve 7. Günde değerlendirilmesi. Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Bitirme Tezi, İzmir, (Prof. Dr. Selda ERTÜRK), 2000.
22. Petrovich YA, Podorozhnaya RP, Kichenko SM, Kozlova MV. Effects of selenium-containing compounds and their metabolism in intact rats and in animals with bone fractures. Bull Exp Biol Med 2004;137(1):74-77.
23. Seeman E. Bone modeling and remodeling. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2009;19(3):219-33.
24. Kream BE, Petersen DN, Raisz LG. Cortisol enhances the anabolic effects of insulin-like growth factor I on collagen synthesis and procollagen messenger ribonucleic acid levels in cultured 21-day fetal rat calvariae. Endocrinology 1990;126(3):1576-1583.
25. Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2008;22(5):701-22.
26. Sarin J., DeRossi SS., Akintoye SO. Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. Oral Dis 2008;14 (3):277-285.
27. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg 2003; 61(9): 1115-1117.
28. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62(5): 527-534.
29. Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. J Oral Maxillofac Surg 2007; 65(3): 369-376.
30. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B; Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. Aust Endod J 2009;35(3):119-130.

31. Ruggiero SL, Dodson TB, Mehrotra B; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72(10):1938-1956.
32. Soydan SS, Veziroğlu Şenel F, Araz K. Bisfosfonata bağlı olarak çene kemiklerinde gelişen osteonekrozun patogenezi ve tedavisi. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi dergisi* 2009;33(3):61-68.
33. Marx RE. Oral & Intravenous Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws. History, Etiology, Prevention, and Treatment. Illinois: Quintessence Publishing Co Inc 2009;91(5):466.
34. Crepin S, et al. Osteonecrosis of the jaws induced by clodronate, an alkylbisphosphonate: case report and literature review. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66(6):547-554.
35. Rogers MJ, Watts DJ, Russell RG. Overview of Bisphosphonates. *Cancer Supplement* 1997;80(8):1652-1660.
36. Sparidans RW, Twiss IM, Talbot S. Bisphosphonates in bone diseases. *Pharm World Sci* 1998;20(5):206-213.
37. Santini D, Gentilucci UV, Vincenzi B, Picardi A, Vasaturo F, La Cesa A. The antineoplastic role of bisphosphonates: from basic research to clinical evidence. *Annals of Oncology* 2003;14(10):1468–1476.
38. Green JR. Antitumor Effects of Bisphosphonates. *Cancer* 2003;97(3): 840-847.
39. Maurer P, Sandulescu T, Kriwalsky MS, Rashad A, Hollstein S, Stricker I, Hölzle F, Kunkel M. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the maxilla and sinusitis maxillaris. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;40(3):285-291.
40. Diel IJ, Bergner R, Grötz KA. Adverse effects of bisphosphonates: current issues. *J Support Oncol* 2007;5(10):475-548.
41. Delmas PD. The use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17(4):462-466.
42. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates: Current Status. *Clin Cancer Res* 2006;12(20): 6222-6230.
43. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: Mechanism of Action. *J. Clin Invest* 1996;97 (12); 2692-2696.
44. Tai TW, Chen CY, Su FC, Tu YK, Tsai TT, Lin CF, Jou IM. Reactive oxygen species are required for zoledronic acid-induced apoptosis in osteoclast precursors and mature osteoclast-like cells. *Sci Rep* 2017;7: 44245.
45. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. *Cancer Supplement* 2000;88 (12): 2961-2978.
46. Shipman CM, Croucher PI, Russell RG, Helfrich MH, Rogers MJ. The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 1998;58 (23):5294-5297.



47. 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.
48. Russell RG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008;19(6): 733-759.
49. Van Poznak CH, Temin S, Yee GC, Janjan NA, Barlow WE, Biermann JS, Bosserman LD, Geoghegan C, Hillner BE, Theriault RL, Zuckerman DS, Von Roenn JH. American Society of Clinical Oncology executive summary of the clinical practice guideline update on the role of bone-modifying agents in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(9):1221-1227.
50. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, Scagliotti GV, Sleeboom H, Spencer A, Vadhan-Raj S, Von Moos R, Willenbacher W, Woll PJ, Wang J, Jiang Q, Jun S, Dansey R, Yeh H. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011;29(9):1125-1132.
51. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damiao R, Brown J, Karsh L. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* 2011;377(9768):813–822.
52. Fizazi K, Lipton A, Mariette X, Body JJ, Rahim Y, Gralow JR. Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. *J Clin Oncol* 2009;27(10):1564–1571.
53. Lipton A, Steger GG, Figueroa J, Alvarado C, Solal-Celigny P, Body JJ. Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. *J Clin Oncol* 2007;25(28):4431–4437.
54. Smith MR, Egerdie B, Hernandez Toriz N, Feldman R, Tammela TL, Saad F. Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N Engl J Med* 2009;361(8):745–755.
55. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol* 2012;23(5):1341–1347.
56. Chawla S, Henshaw R, Seeger L, Choy E, Blay JY, Ferrari S, Kroep J, Grimer R, Reichardt P, Rutkowski P, Schuetze S, Skubitz K, Staddon A, Thomas D, Qian Y, Jacobs I. Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013;14(9):901-908.
57. Portal-Nunez S, Lozano D, Esbrit P. Role of angiogenesis on bone formation. *Histol Histopathol* 2012;27(5):559–566.

58. Street J, Lenehan B. Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival – evidence for an autocrine feedback mechanism. *J Orthop Surg Res* 2009;4:19.
59. Horner A, Bord S, Kellsall AW, Coleman N, Compston JE. Tie2 ligands angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are coexpressed with vascular endothelial cell growth factor in growing human bone. *Bone* 2001;28(1):65–71.
60. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, et al. Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* 1999;277(4):628–637.
61. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* 2006;28(11):1779-1802.
62. Bernold DM, Sinicrope FA. Advances in chemotherapy for colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4(7):808-821.
63. Shord SS, Bressler LR, Tierney LA, Cuellar S, George A. Understanding and managing the possible adverse effects associated with bevacizumab. *Am J Health Syst Pharm* 2009;66(11):999-1013.
64. Hernandez M, Phulpin B, Mansuy L, Droz D. Use of new targeted cancer therapies in children: effects on dental development and risk of jaw osteonecrosis: a review. *J Oral Pathol Med* 2017; 46(5):321-326.
65. Aragon-Ching JB, Ning YM, Chen CC, Latham L, Guadagnini JP, Gulley JL, Arlen PM, Wright JJ, Parnes H, Figg WD, Dahut WL. Higher incidence of osteonecrosis of the jaw (ONJ) in patients with metastatic castration resistant prostate cancer treated with anti-angiogenic agents. *Cancer Invest* 2009; 27(2): 221–226.
66. Disel U, Beşen AA, Özyilkan Ö, Er E, Canpolat T. A case report of bevacizumab-related osteonecrosis of the jaw: old problem, new culprit. *Oral Oncol* 2012;48(2):2–3.
67. Guarneri V, Miles D, Robert N, et al: Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;122(1):181-188.
68. Estilo CL, Fornier M, Farooki A, Carlson D, Bohle G, Huryn JM. Osteonecrosis of the jaw related to bevacizumab. *J Clin Oncol* 2008;26(24):4037–4038.
69. Ayllon J, Launay-Vacher V, Medioni J, Cros C, Spano JP, Oudard S. Osteonecrosis of the jaw under bisphosphonate and antiangiogenic therapies: cumulative toxicity profile? *Ann Oncol* 2009; 20(3): 600-601.
70. Troeltzsch M, Woodlock T, Kriegelstein S, Steiner T, Messlinger K, Troeltzsch M. Physiology and pharmacology of nonbisphosphonate drugs implicated in osteonecrosis of the jaw. *J Can Dent Assoc* 2012;78:85.

71. Jadu F, Lee L, Pharaoh M, Recce D, Wang L. A retrospective study assessing the incidence, risk factors and comorbidities of pamidronate-related necrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Ann Oncol* 2007;18(12):2015-2019.
72. Khamaisi M, Regev E, Yarom N, Avni B, Leitersdorf E, Raz I, et al. Possible association between diabetes and bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(3): 1172-1175.
73. Thumbigere-Math V, Tu L, Huckabay S, Dudek AZ, Lunos S, Basi DL, et al. A retrospective study evaluating frequency and risk factors of osteonecrosis of the jaw in 576 cancer patients receiving intravenous bisphosphonates. *Am J Clin Oncol* 2012; 35(4): 386-392.
74. Malden N, Lopes V. An epidemiological study of alendronate-related osteonecrosis of the jaws. A case series from the south-east of Scotland with attention given to case definition and prevalence. *J Bone Miner Metab* 2012;30(2):171–182.
75. Diniz-Freitas M, Lopez-Cedrun JL, Fernandez-Sanroman J, Garcia-Garcia A, Fernandez-Feijoo J, Diz-Dios P. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: clinical characteristics of a series of 20 cases in Spain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17(5):751–758.
76. Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, Hodges JS, Tsai ML, Swenson KK, Rockwell L, et al. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Periodontol* 2013;85(2):226–233.
77. Durie BG, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med* 2005;353(1):99–102.
78. Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, Katodritou E, Triaridis S, Andreadis CG, et al. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol* 2009;27(32):5356–5362.
79. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(5 Suppl):61–70.
80. Bertoldo F, Santini D, Lo Cascio V. Bisphosphonates and osteomyelitis of the jaw: a pathogenic puzzle. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4(12):711–721.
81. Tsao C, Darby I, Ebeling PR, Walsh K, O'Brien-Simpson N, Reynolds E, et al. Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg* 2013;71(8):1360–1366.
82. Pozzi S, Marcheselli R, Sacchi S, Baldini L, Angrilli F, Pennese E, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients. *Leuk Lymphoma* 2007;48(1):56–64.
83. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines Daniele Rosella, Piero Papi, Rita Giardino, Emauele Cicalini, Luca Piccoli, Giorgio Pompa *J Int Soc Prev Community Dent* 2016; 6(2): 97–104.

84. Carey JJ, Palomo L. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: innocent association or significant risk? *Cleve Clin J Med* 2008;75 (12): 871-879.
85. Fardet L, Kassar A, Cabane J, Flahault A. Corticosteroid-induced adverse events in adults: frequency, screening and prevention. *Drug Saf* 2007; 30(10):861-881.
86. Canalis E, Mazziotti G, Guistina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporosis Int* 2007; 18(10):1319-1328.
87. Bekler H, Uygur AM, Gökçe A, Beyzadeoğlu T. Steroid kullanımının femur başı avasküler nekrozu patogenezindeki yeri: Deneysel hayvan modeli. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007; 41(1):58-63.
88. Deogelaer JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: mechanisms and therapeutic approach. *Rheum Dis Clin North Am* 2006; 32(4):733-757.
89. Michael D. McKee, James P. Waddell, Patricia A. Kudo, Emil H. Schemitsch, Robin R. Richards. Osteonecrosis of the femoral head in men following short-course corticosteroid therapy: a report of 15 cases. *CMAJ* 2001;164(2):205-206.
90. Nazıroğlu M, Yüksel M, Köse SA, Özkaya MO. Recent reports of Wi-Fi and mobile phone-induced radiation on oxidative stress and reproductive signaling pathways in females and males. *JMembr Biol* 2013; 246(12): 869-875.
91. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76(5): 777-779.
92. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993;361(6410):315-325.
93. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature* 1998;395(6703):645-648.
94. Petersen OH, Petersen CC, Kasai H. Calcium and hormone action. *Annu Rev Physiol* 1994;56:297-319.
95. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* 2000;287(5458):1604-1605.
96. Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García AG, García-Sancho J, Alvarez J. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2000;2(2):57-61.
97. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(1): 11-21.
98. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994; 30(14): 2068-2073.
99. Malagoli C, Fabbi S, Teggi S, Calzari M, Poli M, Ballotti E, Notari B, Bruni M, Palazzi G, Paolucci P, Vinceti M. Risk of hematological malignancies associated with magnetic fields exposure from power lines: a case-control study in two municipalities of northern Italy. *Environ Health* 2010; 9: 16.

100. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
101. Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y. Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium* 2011; 50(3): 279–287.
102. Hay BA, Huh JR, and Guo M. The genetics of cell death: Approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. *Nat Rev Genet* 2004;5(12): 911-922.
103. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(7): 517-529.
104. Trepakova ES, Csutora P, Hunton DL, Marchase RB, Cohen RA, Bolotina VM. Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275(34): 26158-26163.
105. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12(1): 3-10.
106. Katz B, Minke B. *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. *Front Cell Neurosci* 2009; 3-2.
107. Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol* 2002; 12(16): 563-565.
108. Clapham DE. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; 426(6966): 517-524.
109. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP Channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Therap* 2008; 118(3): 337-351.
110. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 165-217.
111. Knight, J.A. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30(2): 145-158.
112. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007; 18(9): 567- 579.
113. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr* 2004; 134(11): 3143-3163.
114. Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J Biochem Biophys* 2009;46(1):9-15.
115. Çete S, Arslan F, Yaşar A. Aloe Vera ve Nerium Olfander'in Bazı Mikroorganizmalara Karşı Antiyomikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması ve bu Bitkilerin Siklosporinli Karaciğer Dokusundaki Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesine Etkilerinin İncelenmesi. *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi* 2005; 18(3): 375-380.

116. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266(1-2): 37-56.
117. Derin D, Yazıcı A, Erkoç Ş. Şizofrenik Bozukluğu Olan Hastalarda Serbest Radikal Metabolizması ve Nonenzimatik Antioksidan Savunma Sistemi Elemanlarının incelenmesi. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2001;11:174-182.
118. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41(12):1819-1828
119. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119(6):598-620.
120. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.
121. Nazıroğlu M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res* 2009;34(12):2181-2191.
122. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003;91:179-194.
123. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7):775-806.
124. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. baskı, Konya: Mimoza yayınları 1995:1-132.
125. Dolder C, Nelson M, Deyo Z. Paliperidone for schizophrenia. *Am J Health-Syst Pharm* 2008; 65(5):403-413.
126. Kane J, Canas F, Kramer M, Ford L, Gassmann-Mayer C, Lim P, et al. Treatment of schizophrenia with paliperidone extended-release tablets: a 6-week placebo-controlled trial. *Schizophr Res* 2007; 90(1-3):147-161.
127. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, et al. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364(6438): 626-632.
128. Erden M, Bor NM. Changes of reduced glutathione, glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochemical Med* 1984; 31(2): 217-227.
129. Erden M. Changes of hexose monophosphate pathway and methemoglobin reductase enzyme activity after radiation guinea pigs. *Comp Biochem Physiol* 1987; 86(4): 629- 633.
130. Pan B, To LB, Farrugia AN, Findlay DM, Green J, Gronthos S, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralization of human bone-derived cells in vitro. *Bone* 2004;34(1):112-123.
131. Ren G, Ali T, Chen W, Han D, Zhang L, Gu X, Zhang S, Ding L, Fanning S, Han B. The role of selenium in insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) expression and regulation of apoptosis in mouse osteoblasts. *Chemosphere* 2016;144:2158-2164.

132. Esin Sakallı Çetin, Mustafa Nazıroğlu, Bilal Çiğ, İshak Suat Övey ve Pınar Aslan Koşar Selenium potentiates the anticancer effect of cisplatin against oxidative stress and calcium ion signaling-induced intracellular toxicity in MCF-7 breast cancer cells: involvement of the TRPV1 channel *J Recept Signal Transduct Res* 2017;37(1):84-93.
133. Bayram H, Kenar H, Taşar F, Hasırcı V. Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013;42(1):140-146.
134. Moreau MF, Guillet C, Massin P, Chevalier S, Gascan H, Basle MF. Comparative effects of five bisphosphonates on apoptosis of macrophage cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 2007;73 (5): 718-723.
135. Lang M, Zhou Z, Shi L, Niu J, Xu S, Lin W, Chen Z, Wang Y. Influence of zoledronic acid on proliferation, migration, and apoptosis of vascular endothelial cells. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2016;54(8):889-893.
136. Sharma RK, Chalam KV. In vitro evaluation of bevasizumab toxicity on a retinal ganglion cell line. *Acta Ophthalmol* 2009;87(6):618-622.
137. Hein M, Graver S. Tumor cell response to bevasizumab single agent therapy in vitro. *Cancer Cell Int* 2013;13(1):94.
138. Simon T, Coquerel B, Petit A, Kassim Y, Demange E, Le Cerf D, Perrot V, Vannier JP. Direct effect of bevasizumab on glioblastoma cell lines in vitro. *Neuromolecular Med* 2014;16(4):752-771.
139. MJ Coelho, MH Fernandes. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2000;21(11):1095-1102.
140. Guo S, Mao L, Ji F, Wang S, Xie Y, Fei H, Wang XD. Activating AMP-activated protein kinase by an  $\alpha 1$  selective activator compound 13 attenuates dexamethasone-induced osteoblast cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;471(4):545-552.
141. Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol* 2009;232(1-3):15-23.
142. Grynkiewicz C, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260(6):3440-3450.
143. Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodríguez AB, Pariente JA. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res* 2012;53(1):91-98.
144. Ghazizadeh V, Nazıroğlu M. Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metab Brain Dis* 2014;29(3):787-799.

145. Woo S, Hellentein JW, Kalmar JR. Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Annals of International Medicine* 2006;144(10):753-761.
146. Coleman R, Woodward E, Brown J. Safety of zoledronic acid and incidence of osteonecrosis of the jaw (ONJ) during adjuvant therapy in a randomised phase III trial (AZURE: BIG 01-04) for women with stage II/III breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127(2):429-438.
147. Mauri D, Valachis A, Polyzos IP. Osteonecrosis of the jaw and use of bisphosphonates in adjuvant breast cancer treatment: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116(3):433-439.
148. Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol* 2009;27(32):5356-5362.
149. Grbic JT, Black DM, Lyles KW. The incidence of osteonecrosis of the jaw in patients receiving 5 milligrams of zoledronic acid: data from the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly clinical trials program. *J Am Dent Assoc* 2010;141(11):1365-1370.
150. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 2005; 23(34):8580-8587.
151. Guarneri V, Miles D, Robert N. Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;122(1):181.
152. Chiu CT, Chiang WF, Chuang CY, Chang SW. Resolution of oral bisphosphonates and steroid-related osteonecrosis of the jaw—a serial case analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68(5): 1055–1063.
153. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63(11):1567-75.
154. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocrinol Rev* 1986;7(4):379-408.
155. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999;45(8):1353-1358.
156. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000;60(21):6001-6007.
157. Frediani B, Spreafico A, Capperucci C, Chellini F, Gambera D, Ferrata P. Long term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures. *Bone* 2004;35(4):859-869.



158. Im G-I, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25(18):4105-4115.
159. Mathov I, Plotkin LI, Sgarlata CL, Leoni J, Bellido T. Extracellular signal-regulated kinases and calcium channels are involved in the proliferative effect of bisphosphonates on osteoblastic cells in vitro. *J Bone Miner Res* 2001;16(11):2050-2056.
160. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grundker C. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(3):680-686.
161. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993;91(5):2004-2011.
162. United States Food and Drug Administration(USFDA). Avastin (bevacizumab)SafetyInformation.<http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/ucm287610.htm> Accessed 2016.
163. Daria Pakosch, Dimitrios Papadimas, Johanna Munding, Darafsch Kawa, Marcus Stephan Kriwalsky. Osteonecrosis of the mandible due to anti-angiogenic agent, bevacizumab. *Oral Maxillofac Surg* 2013;17(4):303–306.
164. Chen PQ. The current strategy on the prevention and treatment of osteoporosis in Taiwan. *J Bone Miner Metab* 2002;20(3):131-135.
165. Fardet L, Kassas A, Cabane J, Flahault A. Corticosteroid-induced adverse events in adults: frequency, screening and prevention. *Drug Saf* 2007; 30(10):861-881.
166. Nazıroğlu M, Dikici DM, Dursun S. Role of Oxidative Stress and Ca<sup>2+</sup> Signaling on Molecular Pathways of Neuropathic Pain in Diabetes: Focus on TRP Channels. *Neurochem Res* 2012;37(10):2065-2075.
167. Yu Z, Wang F, Liang N, Wang C, Peng X, Fang J, Cui H, Jameel Mughal M, Lai W. Effect of Selenium Supplementation on Apoptosis and Cell Cycle Blockage of Renal Cells in Broilers Fed a Diet Containing Aflatoxin B1. *Biol Trace Elem Res* 2015;168(1):242-251.
168. Ripamonti CI, Maniezzo M, Campa T, Fagnoni E, Brunelli C, Saibene G, et al. Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumour patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan. *Ann Oncol* 2009;20(1):137-145.
169. Dimopoulos MA, Kastiris E, Bamia C, Melakopoulos I, Gika D, Roussou M, et al. Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Ann Oncol* 2009;20(1):117-120.
- 170.

171. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Hernandez S, Poveda R, Sanchis JM, et al. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol* 2006; 42(3):327-329.
172. Damm DD, Jones DM: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a potential alternative to drug holidays. *Gen Dent* 2013;61(5):33-38.
173. Ristow O, Otto S, Troeltzsch M, Hohlweg-Majert B, Pautke C. Treatment perspectives for medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *J Craniomaxillofac Surg* 2015;43(2):290-293.
174. Lerman MA, Xie W, Treister NS, Richardson PG, Weller EA, Woo SB. Conservative management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: staging and treatment outcomes. *Oral Oncol* 2013;49(9):977-983.
175. Melea PI, Melakopoulos I, Kastritis E, Tesseromatis C, Margaritis V, Dimopoulos MA. Conservative treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients. *Int J Dent* 2014;2014:427273.
176. Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Fornaini C, Nammour S. Conservative surgical management of stage I bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Dent* 2014; 2014:107690.
177. Ripamonti CI, Cislighi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O<sub>3</sub>) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol* 2011;47(3):185-190.
178. Freiburger JJ, Padilla-Burgos R, McGraw T, Suliman HB, Kraft KH, Stolp BW. What is the role of hyperbaric oxygen in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a randomized controlled trial of hyperbaric oxygen as an adjunct to surgery and antibiotics. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70(7):1573-1583.
179. Atalay B, Yalcin S, Emes Y, Aktas I, Aybar B, Issever H. Bisphosphonate-related osteonecrosis: laser-assisted surgical treatment or conventional surgery? *Lasers Med Sci* 2011;26(6):815-823.
180. Magremanne M, Reychler H. Pentoxifylline and tocopherol in the treatment of yearly zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaw in a corticosteroid-induced osteoporosis. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72(2):334-337.
181. Rugani P, Acham S, Kirnbauer B, Truschnegg A, Obermayer-Pietsch B, Jakse N. Stage-related treatment concept of medication-related osteonecrosis of the jaw-a case series. *Clin Oral Investig* 2015;19(6):1329-1338.
182. Curi MM, Cossolin GS, Koga DH, Zardetto C, Christianini S, Feher O. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws an initial case series report of treatment combining partial bone resection and autologous platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69(9):2465-2472.

183. Cella L, Oppici A, Arbasi M, Moretto M, Piepoli M, Vallisa D. Autologous bone marrow stem cell intraliesional transplantation repairing bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw. *Head Face Med* 2011;7:16.
184. 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;52(9):854-859.
185. Cheung A, Seeman E. Teriparatide therapy for alendronate-associated osteonecrosis of the jaw. *N Engl J Med* 2010;363(25):2473-2474.
186. Neuprez A, Rompen E, Crielaard JM, Reginster JY. Teriparatide therapy for denosumab-induced osteonecrosis of the jaw in a male osteoporotic patient. *Calcif Tissue Int* 2014;95(1):94-96.
187. Arbogast S, Ferreiro A. Selenoproteins and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 2010;12(7):893-904.
188. Halliwell B Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97(6):1634–1658
189. Lee HC. Calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. A decade of exploration. *Cell Biochem Biophys* 1998;28(1):1-17.
190. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Ros-Roca Mde L, Alguero Mdel C, Oñate-Sánchez RE, Camacho-Alonso F, Moraleda JM: Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human mesenchymal stem cells in vitro. *J Craniomaxillofac Surg* 2015 ;43(6):855-862.
191. Tian L, Dang XQ, Wang CS, Yang P, Zhang C, Wang KZ. Effects of sodium ferulate on preventing steroid-induced femoral head osteonecrosis in rabbits. *J Zhejiang Univ Sci B* 2013;14(5):426-437.
192. Bard DR, Dickens MJ, Smith AU, Zarek JM. Isolation of living cells from mature mammalian bone. *Nature* 1972;236(5345): 314-315.
193. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 1987;47(18): 4961-4966.
194. Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB. PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone* 1996;19(5): 437-445.
195. Murray E, Provvedini D, Curran D, Catherwood B, Sussman H, Manolagas S. Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *J Bone Miner Res* 1987;2(3): 231-231.
196. Saldana L, Bensiamar F, Bore A, Vilaboa N. In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomater* 2011;7(12): 4210- 4221.
197. Al Hadi H, Smerdon GR, Fox SW. Hyperbaric oxygen therapy accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation. *J Dent* 2015 ;43(3):382-388.

198. Yu-Guang Ma, Wen-Chao Liu, Shuo Dong, Cheng Du, Xiao-Jun Wang, Jin-Sheng Li, Xiao-Ping Xie, Li Wu, Da-Chang Ma, Zhi-Bin Yu, and Man-Jiang Xie. Activation of BKCa Channels in Zoledronic Acid-Induced Apoptosis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *PLoS One* 2012; 7(5): 37451.
199. Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(11):1957-1962.
200. Huang X, Huang S, Guo F, Xu F, Cheng P, Ye Y, Dong Y, Xiang W, Chen A. Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep* 2016;13(1):613-622.
201. Zafar S, Coates DE, Cullinan MP, Drummond BK, Milne T, Seymour GJ. Effects of zoledronic acid and geranylgeraniol on the cellular behaviour and gene expression of primary human alveolar osteoblasts. *Clin Oral Investig* 2016 ;20(8):2023-2035.
202. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Cell Injury and Cell Death. In: Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: WB Saunders 1999; 1-29.
203. H.L Benford, N.W.A McGowan, M.H Helfrich, M.E Nuttall, M.J Rogers. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone* 2001;28(5):465-473.
204. Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 1999;11(2):77-85.
205. Crompton M. Mitochondria and aging: a role for the permeability transition? *Aging Cell* 2004;3(1):3-6.
206. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, Kinet JP, Scharenberg AM. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001;411(6837): 595-599.

## EKLER



T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

Sayı : 46422692-604.2-754  
Konu : 4475-ÖYP-D2-15 Numaralı Proje Protokolü

30-09-2015

Sayın : Doç. Dr. Gülperi KOÇER  
Diş Hekimliği Fakültesi

Üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Komisyonunun 15.09.2015 tarihli ve 2015/04 sayılı toplantısında 4475-ÖYP-D2-15 numaralı Doktora Tezi projenizin desteklenmesine karar verilmiştir.

Ekteki protokolden çıktı olarak yürütücü ve öğrenciniz tarafından imzalanarak 02.10.2015 tarihine kadar Bilimsel Araştırmaları Koordinasyon Birimine teslim edilmesini rica eder çalışmalarınızda başarılar dilerim.

  
Prof. Dr. Mehmet SALTAN  
-Rektör Yardımcısı  
BAP Komisyon Başkanı

Ek :  
Proje Protokolü (4 Sayfa)

ff

Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Batı Yerleşkesi Rektörlük Binası  
Telefon No :+90 246 211 1044 Faks No :+90 246 211 18 68  
e-Posta : bap@sdu.edu.tr  
internet Adresi : http://bap.sdu.edu.tr

Bilgi için : Bap Koordinatörlüğü  
Telefon No : +90 246 211 10 44

T.C.  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**ÖĞRETİM ÜYESİ YETİŞTİRME KOORDİNASYON BİRİMİ**  
**DESTEKLEME PROTOKOLÜ**

Toplantı Tarihi : 23.06.2015

Toplantı No: 2015/3

Proje No : ÖYP05259-DR-12  
Proje Yöneticisi : Doç.Dr. Gülperi KOÇER  
Yöneticinin Adresi : Diş Hekimliği Fakültesi , Ağız-Diş-Çene Hastalıkları Cerrahisi  
Proje Başlığı : Osteoblast benzeri hücrelerde zoledronik asit, bevasizumab deksametazon ve selenyum kalsiyum sinyali, apoptoz ve oksidatif stres üzerine etkilinin araştırılması  
Proje Bütçesi (TL) : 10.000,00  
Proje süresi : Başlangıç Tarihi : 30.06.2015 Bitiş Tarihi: 30.06.2017 - 24 ay

İMZA

Prof.Dr.Mehmet SALTAN  
Rektör Yardımcısı  
ÖYP Komisyon Başkanı

İMZA

Doç.Dr.S.Zeynep ALPARSLAN GÖK  
ÖYP Koordinatörü  
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.,Dr.Yasin TUNCER  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.Dr.Mustafa KAYAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Komisyon Üyesi

İMZA

Prof.Dr. Hüseyin GÜL  
Sosyal Bilimler Enstitüsü Müdürü  
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.Dr.Abdullah Şevki DUYMAZ  
Güzel Sanatlar Enstitüsü Müdürü  
Komisyon Üyesi

İMZA

Doç.Dr. Mehmet BEYHAN  
Su Enstitüsü Müdürü  
Komisyon Üyesi

İMZA

Prof.Dr. Seyfettin ÇAKMAK  
Eğitim Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Komisyon Üyesi

İMZA

Mehmet YILMAZTÜRK  
Bilgisayar İşletmeni  
Komisyon Üyesi

İMZA

Bahriye YILDIZ  
Bilgisayar İşletmeni  
Komisyon Üyesi

PROJE YÖNETİCİSİNE TEBLİGAT

Sayın: **Doç.Dr. Gülperi KOÇER**

Süleyman Demirel Üniversitesi

**Diş Hekimliği Fakültesi**

Süleyman Demirel Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Projesi Koordinasyon Birimi yukarıdaki kararı uyarınca sunduğumuz projenin belirtilen şartlarda desteklenmesine karar verilmiştir.

Proje protokolünü imzalamak üzere aşağıda belirtilen tarih ve saatte Öğretim Üyesi Yetiştirme Projesi Koordinasyon Birimi'nde hazır bulunmanızı rica eder, başarılarınızın devamını dilerim.

Tarih ve Saat :



Prof.Dr.Mehmet SALTAN  
Rektör Yardımcısı  
ÖYP Komisyon Başkanı

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler:

<b>Adı:</b>	TAYFUN	<b>Soyadı:</b>	YAZICI
<b>Doğum Yeri:</b>	KULU	<b>Doğum Tarihi:</b>	22.07.1986
<b>Uyruğu:</b>	TC	<b>Tel:</b>	05056653963
<b>E-posta:</b>	tayfunyazici@sdu.edu.tr tayfun2106@hotmail.com		

### Eğitim Düzeyi:

	<b>Kurum</b>	<b>Dönem(Yıl-Yıl)</b>
<b>Doktora</b>	SDÜ Sağlık bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD	2011-....
<b>Lisans</b>	Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2003-2008
<b>Lise</b>	Cumhuriyet Anadolu Lisesi	1996-2003
<b>İlkokul</b>	Danışment İlkokulu	1991-1996

### İş ve Askerlik Deneyimi:

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Dönem</b>
Diş hekimi	Özel Nevindent Ağız Diş Sağlığı Polikliniği	2008-2009
Asteğmen (Diş hekimi)	Mevki Asker Hastanesi	2009-2010

### Yabancı Dil:

<b>Yabancı Dil</b>	<b>KPDS/ÜDS Puanı</b>
İngilizce	72,5

### **Hakemli dergilerde basılan yayınlar:**

1. Şentürk Mehmet Fatih, Yazıcı Tayfun, Gülşen Uğur (2017). Techniques And Modifications For Tmj Arthrocentesis: A Literature Review. Cranio® The Journal Of Craniomandibular & Sleep Practice, Doi: [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/08869634.2017.1340226](http://dx.doi.org/10.1080/08869634.2017.1340226) (Uluslararası) (SCI - expanded)
2. Yazıcı Tayfun, Şentürk Mehmet Fatih, Koçer Gülperi (2017). İlaça Bağlı Olarak Çene Kemiklerinde Görülen Osteonekroz (Mronj): Derleme. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Uluslararası) (Hakemli)
3. Kömerik Nurgül, Yazıcı Tayfun (2013). Paresthesia Of The Lower Lip: Delayed Complication Of Radiotherapy To Nasopharynx. International Journal Of Medical And Dental Sciences (Uluslararası) (Hakemli)

### **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:**

1. Yazıcı Tayfun, Şentürk Mehmet Fatih (2017). Conventional Arthrocentesis Technique Using İntravenous Catheter: A New Method. 11.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
2. Fındık Yavuz, Yazıcı Tayfun, Koçer Gülperi, Baykul Timuçin (2017). Intraoperative Analgesia Assessment İn Orthognathic Surgery: A Pilot Study. 11. Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
3. Fındık Yavuz, Yazıcı Tayfun, Akpınar Hatice, Baykul Timuçin (2017). 3d Approach To Evaluate Facial Profile Changes Following Lefort I Osteotomy: A Case Report. 11.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
4. Yazıcı Tayfun, Fındık Yavuz, Şentürk Mehmet Fatih, Türkaslan Serhat Süha, Baykul Timuçin (2017). Rehabilitation Of The Atrophied Maxilla With Zygomatic İmplants. 11.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)



5. Yazıcı Tayfun, Koçer Gülperi, Güzel Tufan (2017). Ossifying Fibroma With An Impacted Tooth In The Posterior Maxilla: A Case Report. 11. Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
6. Koçer Gülperi, Koldaş Mehmet Ali, Yazıcı Tayfun, Baykul Timuçin (2017). Mandibular Aggressive-Ossifying Fibroma: A Case Report. 11.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
7. Fındık Yavuz, Yazıcı Tayfun, Aydın Mustafa Asım, Baykul Timuçin (2017). Osteosarcoma Of The Mandible: Two Years Follow Up. 11.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
8. Yazıcı Tayfun, Fındık Yavuz, Şentürk Mehmet Fatih, Baykul Timuçin (2017). Intraoperative Analgesia Assessment In Surgically-Assisted Rapid Palatal Expansion: A Pilot Study. 11.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
9. Baykul Timuçin, Fındık Yavuz, Yazıcı Tayfun, Akpınar Hatice (2017). 3d Approach To Evaluate Facial Profile Changes Following Bimaxillary Surgery: A Case Report. 11.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
10. Sönmez Samed, Koçer Gülperi, Fındık Yavuz, Alkış Hüseyin, Günaydın Arzu, Yazıcı Tayfun (2016). Effects Of Low Laser Theraphy In Terms Of Pain, Trismus And Edema With Comparision Of Stereophotogrammetry And Linear Measuring Method After Surgical Assisted Rapid Maxillary Expansion. 10. Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
11. Yazıcı Tayfun, Koçer Gülperi, Nazıroğlu Mustafa, Övey İshak Suat, Öz Ahmi, Sönmez Samed (2016). In The Osteoblast-Like Cells, The Investigation Of Effects Of Zoledronic Acid, Bevacizumab, Dexamethasone And Selenium On Calcium Signal And Apoptosis. 10. Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
12. Koçer Gülperi, Sönmez Samed, Yazıcı Tayfun, Şenişik Neslihan Ebru, Çavdar Koldaş Ece (2015). Treatment Of Anterior Open Bite With Anterior Segmental Osteotomy And Distraction Osteogenesis. 9. Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

13. Fındık Yavuz, Şentürk Mehmet Fatih, Yazıcı Tayfun (2015). Alveolar Cleft Repair With Mandibular Sympheseal Bone Graft: Two Case Report. 22.Taoms Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
14. Yazıcı Tayfun, Fındık Yavuz, Şentürk Mehmet Fatih (2015). Rehabilitation İn A Facial Scar Patient Combining Preprosthetic Technique: A Case Report. 22. Taoms Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
15. Şentürk Mehmet Fatih, Koçer Gülperi, Yazıcı Tayfun (2014). Single Puncture Arthrocentesis: A Case Report. 8.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
16. Çına Aksoy Müge, Topal Olgun, Yazıcı Tayfun, Baykul Timuçin (2014). An Unusual Fracture Of The Mandibular Ramus. 8.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
17. Yazıcı Tayfun, Koldaş Mehmet Ali, Koçer Gülperi, Şentürk Mehmet Fatih (2014). Biphosphonates İnduced Osteonecrosis Of The Jaw Treatment With Platelet Rich Fibrin: A Case Report. 21. Taoms Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
18. Baykul Timuçin, Aydın Mustafa Asım, Fındık Yavuz, Yazıcı Tayfun (2013). Mandibular Resection And Reconstruction Of Huge Ameloblastoma With İliac Bone Graft. 7.Acbid Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
19. Yazıcı Tayfun, Kömerik Nurgül (2013). Numbness Of Lower Lip As An Adverse Affect Of Radiation Therapy. 20. Taoms Uluslararası Kongresi (Özet Bildiri/Poster)