ÖZGÜN ARAŞTIRMA

İlaca Bağlı Çene Kemiği Osteonekrozu Modelinde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Ekspresyonunun İmmünhistokimyasal Olarak İncelenmesi

Immunohistochemical Investigation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw

Dr. Öğr. Üyesi Gül Merve Yalçın Ülker
İstanbul Okan Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0002-7438-5834

Dr. Öğr. Üyesi Alev Cumbul
Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji Ve Embriyoloji A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0002-9491-8220

Doç. Dr. Gonca Duygu
Namık Kemal Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D., Tekirdağ
Orcid ID: 0000-0002-5564-5776

Prof. Dr. Ünal Uslu
İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji Ve Embriyoloji A.D., İstanbul
Orcid ID: 0000-0003-3953-7131

Geliş tarihi: 27 Temmuz 2022
Kabul tarihi: 9 Kasım 2022
doi: 10.5505/yeditepe.2023.48991

Yazışma adresi:
Dr. Öğr. Üyesi Gül Merve Yalçın Ülker
İstanbul Okan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
Aydıntepe 34947 Tuzla/İSTANBUL
Tel: +90 533 257 71 70
E-posta: gmerveyalcin@gmail.com
E-posta: merve.yalcin@okan.edu.tr

ÖZET

Amaç: Bifosfonatlar (BP) kemikte anjiogenezis ve neovaskülarizasyon olaylarında değişiklilere neden olarak, ilaca bağlı çene kemiği osteonekrozunda (İÇKON) bu durumun etkili olduğu düşünülmektedir. Pamidronat ve zoledronat (ZA) tedavilerinin kan serumunda vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) seviyelerinde azalmaya sebep olduğu bilinmektedir. Bu deneysel çalışmanın amacı BP uygunlanmış sıçanlarda oluşturulan osteonekroz modelinde kemikte VEGF ekspresyonu seviyesinin immünhistokimyasal yöntemler ile incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda osteonekroz modeli oluşturmak amacı ile dişi Sprague-Dawley sıçanlara (n = 14) 8 hafta boyunca ZA enjeksiyonu yapılmıştır. Bu sürenin sonunda sıçanların sol alt ikinci molarları çekilmiş ve sakrifikasyon öncesinde 8 hafta daha beklenmiştir.. İmmünhistokimyasal boyama sonrasında VEGF ekspresyonu, dağılım ve yoğunluk açısından değerlendirilmiştir. Enflamasyonun değerlendirilmesi planlanan dokular da Hematokisilin&Eozin ile boyanmıştır.

Bulgular ve Sonuç: Kontrol grubu ile deney grubu (ZA) VEGF ekspresyonu açısından karşılaştırıldıklarında ZA grubunda dağılım ve yoğunluk kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir (49,73 ± 1,222/13,27 ± 0,279; P < 0.001). Deney grubunda gözlenen enflamatuvar reaksiyon kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (0/2,5 ± 0,58; p=0,003). ZA'nın kemik iyileşmesi ve enflamasyon gibi parametrelere etkisini gösteren birçok deneysel ve klinik çalışma mevcuttur; fakat yazarların bilgisi dahilinde bu çalışma ZA'nın kemikte VEGF ekspresyonuna etkisinin incelendiği ilk deneysel çalışmadır. ZA sebebi ile kemik dokusunda meydana gelen aşırı enflamatuvar reaksiyon sebebi ile kan serumdaki seviyelerinin aksine kemik dokusunda VEGF ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ZA'nın kemikte VEGF ekspresyonunu aşırı artırarak kemik iyileşmesi üzerinde negatif bir etkisi olabileceğini göstermiştir. Bu yolağın anlaşılabilmesi için daha detaylı moleküler çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İÇKON, İmmünhistokimya, Osteonekroz, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü, Zoledronat

SUMMARY

Aim: Bisphosphonates (BPs) root changes in angiogenesis and neovascularisation on bone and it might be one of the features triggering medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). It was claimed that pamidronate and zoledronic acid (ZA) therapy decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in serum. The purpose of this experimental study is to examine VEGF expression levels in the bone of ZA-affected rats with immunohistochemical techniques.

Materials and Methods: Female Sprague-Dawley rats (n = 14) received ZA for 8 weeks to generate an osteonecrosis model. The left mandibular second molars were extracted. After extraction, it has been waited for scarification for 8 weeks. VEGF immunoreactivities incorporated both intensity and distribution of staining (H Score). Tissues that were planned to be evaluated for inflammation were also stained with Hematoxylin & Eosin.

Results and Conclusion: The VEGF expression was significantly higher in the bone of ZA group compared to control (49,73 ± 1,222 versus 13,27 ± 0,279, respectively; P < 0.001). The inflammatory reaction observed in the experimental group was found to be significantly higher than the control group (0 versus 2,5 ± 0,58, respectively; p=0,003). There are many studies investigating the effect of ZA on bone formation and inflammation, but this is the first experimental study presenting VEGF levels in the BP-affected bone. Due to the excessive inflammatory reaction in the bone tissue due to ZA, it was observed that the expression of VEGF in the bone tissue increased in contrast to the levels in the blood serum. The results showed ZA may have an over-expressing effect on VEGF in the bone and this may have a negative effect on bone healing. More detailed molecular studies are needed to understand this pathway.

Key Words: Immunhistochemistry, MRONJ, Osteonecrosis, Vascular Endothelial Growth Factor, Zoledronate

GİRİŞ

İlaca bağlı çene kemiği osteonekrozu (İÇKON), kemik metastazlarının ve osteoporozun tedavisinde kullanılan antirezorptif ve antianjiyojenik tedavilerin bir yan etkisidir [1]. Hastalar malign hastalıklarda yüksek doz antirezorptif kullanırken osteoporoz tedavisinde daha düşük dozda antirezorptif kullanarak İÇKON için risk oluşturmaktadır[2]. Bunlar arasında, azot içeren bisfosfonatlar (NBP'ler), osteoklastların alımını ve aktivitesini baskılayarak en güçlü etkiye sahip olanlardır[3]. NBP tedavisi ile ilişkili İÇKON, ilk olarak 2003 yılında Marx tarafından bildirilmiştir[4,5]. Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahlar Birliği'ne göre (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons – AAOMS), Çenelerin Bifosfonata Bağlı Osteonekrozu (ÇBON) – Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ), daha önce BP grubu ilaç kullanmış veya hala kullanmakta olan; baş-boyun bölgesine radyoterapi almamış hastalarda, maksillofasiyal bölgede ekspoze kemik alanlarının oluşması ve bu durumun sekiz hafta veya daha fazla süre ile mevcut olması ile karakterize klinik bir tablodur[5]. Daha sonraki yıllarda bu klinik lezyonlara denosumab ve sunitinib gibi antirezorptif; bevacizumab gibi antianjiogenetik ilaçların da neden olabileceği görüldüğünden AAOMS bu durumu İÇKON – Medication Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) adı altında toplamıştır[6]. AAOMS 2022 yılında yayınlanan son görüş bildirgesinde ise füzyon proteinlerini (aflibercept) , mTOR inhibitörlerini (everolimus), radyofarmasötik ilaçları (radium 223), seçici östrojen reseptörü modülatörlerini (raloxifene) ve bazı immün baskılayıcı ilaçları da (metotreksat ve kortikosteroidler) İÇKON'a sebep olabilecek ilaçlar arasına almıştır[1].

Kanser hastalarına intravenöz olarak uygulanan, tekrarlayan yüksek dozda NBP'ler, İÇKON ile daha sık ilişkilidir[7,8]. Genel olarak, bu olumsuz etkinin diğer anatomik bölgelere kıyasla çeneleri hedeflemesinin sebebi, yüksek kemik turnoveri nedeniyle NBP'lerin bu bölgede konsantre olması ve özellikle BP'lerin osteoklastlar üzerine inhibe edici bir takım etkilerinden kaynaklandığı kabul edilse de BP'lerin ve diğer ilaçların özellikle çenelerde osteonekroza sebep olmasının patofizyolojisine dair kesin bir sonuca ulaşılamamıştır[9].

Literatür incelendiğinde, İÇKON'un patofizyolojik mekanizmasına dair bazı fikirler ve faktörler ortaya atılmıştır. Bu faktörler arasında kemik rezorpsiyonunun aşırı baskılanması, özellikle BP grubu ilaçların ve antianjiogenetik ilaçların anjiogenez üzerindeki inhibe edici etkisi, ağız ortamında çene kemiklerinin sürekli mikrotravmaya maruz kalması sonucu oluşan mikro kırık bölgeleri ve dişleri çevreleyen periodonsiyum ve özellikle periodontal hastalığı olan bireylerde bu boşluktan direk çene kemiklerine hastalık yapıcı bakterilerin invaze olması sıralanabilmektedir. Özellikle bölgede oluşan direk ve indirekt enfeksiyon ve dolayısıyla oluşan enflamasyon hastalığın oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bunların yanı sıra doğuştan gelen veya edinilmiş bağışıklığın baskılanması, D vitamini yetersizliği, özellikle BP'lerin yumuşak dokularda sebep olduğu toksisite gibi faktörlerden de bahsedilmektedir[1, 10]. Bahsedildiği üzere, literatür incelendiğinde dolaylı olarak anjiogenezin inhibe olmasının İÇKON'un patofizyolojisi ile alakalı olabileceğinin öne sürüldüğü çalışmalar mevcuttur[11,12]. BP'lerin ayrıca 'Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü' (VEGF) üzerinde inhibe edici bir etkisi olduğu da yapılmış olan deneysel çalışmalarda ortaya konmuştur[13, 14]. Bilinen antirezorptif, immünomodülatör ve doğrudan antitümör etkilerinin ötesinde, BP'ler antianjiyojenik ilaçlar olarak da kabul edilmektedir. Özellikle, ZA'nın metastatik kemik kanserli hastalarda serum VEGF seviyelerini azalttığı bildirilmiştir[13,15].

Bahsedilen çalışmaların hepsi BP'lerin VEGF'in kan serum seviyesine olan etkisinin incelendiği çalışmalardır. Bu deneysel çalışmanın amacı ise BP uygunlanarak oluşturulan deneysel osteonekroz modelinde kemikte VEGF ekspresyonunun immünhistokimyasal yöntemler ile incelenmesi ve bu bulguların enflamasyon bulguları ile karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 28.04.2022 tarihinde alınan 2022-023 etik kurul karar numarası onayı ile Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde (YÜDETAM) yürütülmüştür. Çalışmada 12 hafta yaşında, ortalama 225 gram ağırlığında Spraque-Dawley cinsi dişi sıçanlar (n = 14) kullanılmıştır. Örnekler rastgele iki gruba ayrılmıştır. Tüm sıçanlar, 21 C° sıcaklıkta %40 ile %60 nem oranında, sürekli ılık ve temiz hava olan, 12:12 saat aydınlık/karanlık siklusunda üçerli veya dörderli olarak kafeslerde barındırıldı. Tüm deney boyunca sıçanların besin ve içme suyuna ulaşımlarında herhangi bir kısıtlama yapılmamıştır (ad libitum).

Deney Prosedürü

Grup 1'deki (Kontrol) sıçanlara, 8 hafta boyunca haftada 3 kez intraperitoneal serum fizyolojik (0,1 mg/ml) verilirken, Grup 2'deki (Deney) sıçanlara 8 hafta boyunca haftada 3 kez serum fizyolojik ile seyreltilerek ZA (0.1 mg/kg) (Zometa® 4mg/5 ml, Novartis, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulanmıştır[16].

8. haftanın sonunda, sıçanlara intramüsküler olarak 80-100 mg/kg Ketamin hidroklorid (Ketasol®, Richterpharma, Avusturya) ve %2'lik 10 mg/kg Ksilazin hidroklorid (Rompun®, Bayer) uygulanmış ve genel anestezi sağlanmıştır. Genel anesteziyi takiben, cerrahi işleme hazır hale getirilen sıçanların, sol alt 2. molarları çekilmiştir. Herhangi bir kanama durdurucu ajan kullanılmadı, steril gaz tampon ile bası yapılarak kanama kontrolü sağlanmıştır. Sıçanlara uygulanan prosedürlerin detayları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Hafta	SF (0,1 mg/kg, Haftada 3 kere IP)	ZA (0,1 mg/kg, Haftada 3 kere IP)
1	Kontrol Grubu	Deney Grubu - ZA
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9	Mandibular 2. Molar Çekimi	
16	Sakrifikasyon	

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarındaki sıçanlara haftalık olarak uygulanan işlemler. Kısaltmalar: SF: Serum Fizyolojik; IP: İntraperitoneal.

Dokuların Elde Edilmesi ve Histolojik Çalışma

Diş çekimlerini takiben 8. haftada (çalışmanın başlangıcından 16 hafta sonra), her iki gruptaki denekler dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyonu takiben diş çekimlerinin gerçekleştirildiği sıçan mandibulaları diseke edildi ve +4°C'de, %10'luk fosfat tamponlu nötral formaldehite (pH=7.4) konulmuştur. Alınan örnekler fiksasyon amacı ile iki hafta kadar nötral formaldehitte bekletilmiştir.

Dekalsifikasyon ve Histolojik Doku Takibi

Örneklerin fiksasyonunu takiben, dekalsifikasyon aşamasına geçilmiştir. Dekalsifikasyon için Morse solüsyonu (%10'luk sodyum sitrat ve %22,5'lik formik asit) kullanılmış ve dokular 4 hafta süre ile dekalsifiye edilmiştir. Bu süreci takiben dekalsifikasyon solüsyonundan çıkarılan dokular 8 saat boyunca akan çeşme altında suyla yıkanmıştır. Yıkama sonrasında dehidratasyon amacı ile alkol serisinden (sırasıyla %70, %80, %90, %96 ve %100'lük) geçirilmiştir. Dokular ksilen solüsyonuna aktarılmış ve sıvı parafine daldırılmıştır. Doku takibinin devamında, tüm dokular sıcak parafine gömülerek, parafin bloklar elde edilmiştir. Parafin bloklar, 10 µm kalınlığında sagittal (bukkalden linguale doğru dişlerin dik eksenine paralel) olarak kesilmiştir. Alınan kesitler poly-L-lysin kaplı lamlara aktarılmıştır.

Histopatolojik olarak incelenecek dokular hematoksilen eozin ile boyanarak kapatılmıştır. Değerlendirme için hazırlanan dokular ışık mikroskobunda enflamasyon dereceleri gruplara kör bir histolog (A.C.) tarafından değerlendirilmiştir. Değerlendirmede Karakoyun ve ark.'nın skorlama kriterleri kullanılmıştır[17] (0 yok; 1 çok az; 2 orta; 3 şiddetli).

VEGF ile Boyama

Alınan parafin kesitler, deparafinizasyon için 67 0 C'lik etüvde 10 dakika ve ksilende ise 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kesitler, sırasıyla %100, %96, %90, %80 ve %70'lik alkol serilerinde 2 dakika bekletilerek tampon çözelti solüsyonuna PBS (Phosphate Buffer Saline – PBS) daldırılmıştır. 5 dakika solüsyon içinde kalan kesitler, sitrat tamponu solüsyonuna alınmış ve 750 Watt'lık mikrodalgada bir dakika boyunca tutulmuştur. Süre bitiminden sonra kesitler, buz içinde bekletilmiş PBS'e aktarılarak 5 dakika bekletilmiştir. Sonrasında %3'lük H2O2 (Peroksidaz) solüsyonunda 30 dakika bekletilmiş ve tekrar PBS ile 5 dakika kadar yıkanmıştır. Bu işlemden sonra kesitler, bloking (Normal Horse Serum %2,5) solüsyonunda 30 dakika bekletilmiştir ve PBS ile yıkanmıştır. Kesitlere uygulanacak olan primer antikor (VEGF Receptor 2 (D5B1) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD) 1:500 oranında (1 µl antikor+499 µl PBS) hazırlanmış ve doku yüzeyine damlatılarak +4 0C'de bir gece boyunca bekletilmiştir. Bekleme süresinden sonra kesitler, PBS ile yıkanmıştır. Devamında kesitlere bu sefer sekonder antikor (RTU Botinylated Universal Antibody, Anti-Rabbit/Mouse IgG (H+L) made in horse =mavi renkli) Kaliforniya, ABD) damlatılmış ve 30 dakika beklenmişitr. Bekleme sü-

resinden sonra kesitlere, PBS uygulanmış, ABC Reagent damlatılmış ve yine 30 dakika beklenmişitr. Boyama için DAB + Subsrat, zıt boyama için Mayer Hematoksilen kullanılmıştır. En son olarak kesitlerin dehidrasyonu sağlanarak, ksilende şeffaflandırılmış ve entellan ile kapatılmıştır.

İmmunohistokimyasal Analiz

VEGF immünohistokimyasal değerlendirmede, spesifik boyamanın hem yoğunluğu hem de dağılımı dikkate alınarak H-Skoru denilen puan sistemine göre değerlendirilmiştir. H-Skor, analizin hesaplanmasında 0-300 aralığında bir değer vermektedir. Formülasyondaki 300 değeri, güçlü bir şekilde boyanmış VEGF pozitif alanların %100'üne eşittir (3+): H-skoru = yoğunluk kategorisi 1 × 1'de boyanan hücrelerin yüzdesi + (yoğunluk kategorisi 2 × 2)'de boyanan hücrelerin yüzdesi + (yoğunluk kategorisi 3 × 3'te boyanan hücrelerin yüzdesi)'dir. Preparatların immünohistokimyasal analizleri çalışma gruplarına kör olan iki gözlemci tarafından (A.C. ve G.M.Y.Ü) ışık mikroskobunda (Leica DM6000B mikroskobu, Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) yapılmıştır[17].

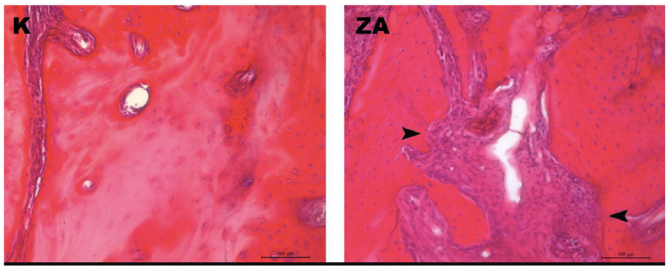
İstatistiksel Değerlendirme

Veriler IBM SPSS V25 (SPSS V25; IBM® Corporation, Armonk, New York, Amerika Birleşik Devletleri) ile analiz edilmiştir.. Tüm gruplar için her bir parametrenin tanımlayıcı (ortalama, medyan, standart sapma, standart hata) istatistikleri hesaplanmıştır. Bağımsız örneklem T testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri p<0,05 olarak alınmıştır.

BULGULAR

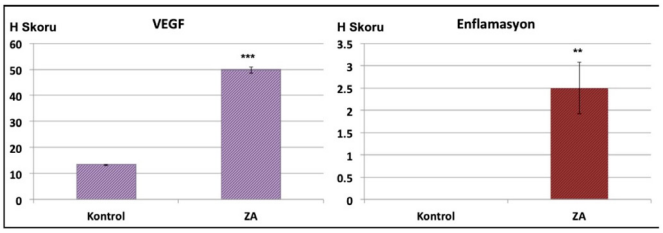
Histopatolojik Değerlendirme

Kontrol ve deney gruplarının H&E boyaması H-Skoru ile hesaplanarak değerlendirilmiştir. Dokular enflamatuvar reaksiyon açısından değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda yapılan semikantitatif incelemede enflamatuvar reaksiyon normal sınırlarda gözlenirken; deney grubunda aşırı enflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrol (K) ve Zoledronik Asit (ZA) gruplarının enflamasyon açısından incelendiği histopatolojik görüntüler. K grubunda herhangi bir enflamatuvar durum gözlenmezken; ZA grubunda istihabi hücre infiltrasyonu gözlenmiştir (Siyah oklar). Hemaotoksilin&Eozin ile boyanmıştır. Skala: 100 µm'dir.

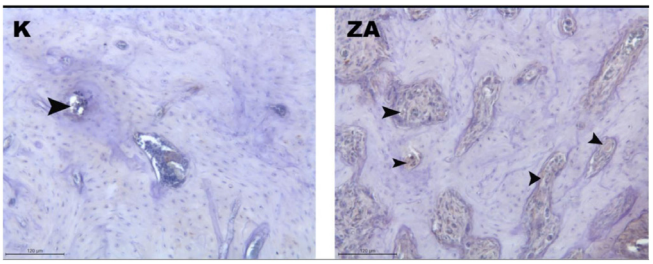
Yapılan değerlendirmede deney grubunda gözlenen enflamatuvar reaksiyon kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (0 ve 2,5 ± 0,58; p=0,003; Şekil 2).



Şekil 2. Grafiklerde, Kontrol (K) ve Zoledronik Asit (ZA) gruplarındaki VEGF yoğunluğunun ve enlamatuvar hücre infiltrasyonu yoğunluğunun H-skor değerleri görülmektedir (*** p< 0.001; ** p< 0.01)

İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Kontrol ve deney gruplarının VEGF boyanması H-Skoru ile hesaplanarak değerlendirilmiştir. Kemik dokusundaki VEGF ekspresyonu, kemik doku içindeki bağ doku alanlarında damar yapılarında tespit edildi. Kemik dokusundaki bağ doku içinde damarlar, çok sayıda gözlemlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Kemik dokularının VEGF ile boyanmış yapıların immünohistokimyasal analiz görüntüleri Kontrol (K) ve Zoledronik Asit (ZA) gruplarında gösterilmiştir. Kemik dokusu bağ dokularındaki yeni damarlar siyah ok ucuyla gösterildi. VEGF immünohistokimyasal olarak boyanmış kesitler, x20 büyütmelerde gösterilmektedir. Skala: 120 µm'dir.

Deney grubundaki VEGF ekspresyonu, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (49,73 ± 4,53 ve 13,27 ± 1,40; p <0.001; Şekil 2).

TARTIŞMA

ZA osteoporoz, Paget hastalığı, multiple myeloma, hiperkalsemi ve metastatik kemik lezyonlarının tedavisinde iskeletsel komplikasyonları azaltmak amacı ile kullanılan potensi yüksek ve uzun etkili bir BP molekülüdür[18]. Patofizyolojisi tam olarak bilinmemesine rağmen, BP'lerin antianjiojenik özelliklerinin olduğu ve apoptozu indükledikleri, kapiller tüp oluşumunda etkili VEGF'yi baskıladıkları bilinmektedir[1,11-13]. İÇKON hayvan modellerinde; uzun dönem BP kullanımının çekim soketi vaskülarizasyonunu azalttığı gösterilmektedir[1,14]. Klinik olarak, uzun dönem bir VEGF inhibitörü olan bevakizumab ile tedavi gören hastalarda İÇKON'un izlenebildiği belirtilmektedir. Kısacası, İÇKON gelişiminin lezyon alanındaki mikrosirkülasyon bozukluğundan geliştiğinin savunan çalışmalar mevcuttur [1;15,16]. VEGF endotel hücrelerine özgül olup, vücutta hem fizyolojik (vaskülogenez, anjiogenez veya kemotaksis gibi) hemde patolojik olaylarda (kanser, neovasküler hastalıklar veya kronik enflamatuvar hastalıklar gibi) rol oynar [19]. Ayrıca tümor hücreleri, makrofajlar, plateletler, keratinositler ve renal mezenkimal hücreler gibi birçok hücre tipi tarafından üretilmektedir. VEGF fonksiyonları arasında vasküler olaylar, kemik oluşumu, hematopoez, yara iyileş-

mesi gibi bir çok fizyolojik olaylar yer alır[20,21].

Literatürde kemikte VEGF proteinin ekspresyonunun incelendiği çalışmalara bakıldığında bir takım patolojik durumlarda bu proteinin seviyelerinde değişiklik olduğu görülmüştür. Wood ve ark. ZA kullanmakta olan kanser hastalarında serum VEGF seviyelerinde düşüş olduğunu bildirmişlerdir[15]. Bellone ve ark. ise ZA kullanan osteoporoz hastalarında da serum VEGF seviyesinin düştüğünü bildirmişlerdir[22]. Özellikle, ZA'nın metastatik kemik kanserli hastalarda VEGF konsantrasyonlarını azalttığı kanıtlanmıştır ve intravenöz BP'lerden sonra serum VEGF seviyelerindeki azalma, kanser hastalarında BRONJ'un olası bir erken prediktif belirteci olarak önerilmiştir[12,13].

Bu gibi çalışmalardan yola çıkarak serumda düşük VEGF seviyelerinin İÇKON riski ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir[23]. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma, ZA verilen sıçanlarda kemik dokudaki VEGF düzeylerinin değerlendirildiği ilk deneysel çalışmadır. Bu çalışmada çene kemiklerinde ZA'nın osteonekroz etkisinin gösterilebileceği deneysel bir model oluşturulmuş ve bu modelde ZA tarafından etkilenmiş çene kemiklerindeki VEGF proteini ekspresyonu seviyeleri ölçülerek VEGF'nin olası patogenezdeki rolü değerlendirilmiştir.

BP'lerin etki mekanizması temelde osteoklastik aktivitede yaptığı değişikliklere dayanmaktadır. BP'ler ve diğer antirezorptif ilaçlar osteoklastların fonksiyonlarında değişikliklere, osteoklast apoptozunun indüklenmesine sebep olarak kemik rezorpsiyonunu azaltmaktadırlar. Bu hücreler, tüm kemiklerin iyileşmesinde ve remodelinginde önemli bir role sahiptirler. Osteoklastlar çok çekirdekli birincil görevi kemiği rezorbe etmek olan hücrelerdir. Romatoid artrit ve periodontal hastalık gibi enflamatuar koşullar altında, osteoklastların daha büyük olduğu ve normal durumlara kıyasla daha fazla çekirdek içerdikleri gözlenmiştir[24,25].

Trebec ve ark. büyük osteoklastlarda (10+ çekirdek), matriksmetalloproteaz-9 (MMP-9) ve katepsin K gibi proteazların ekspresyonunun; ve RANKL, IL-1RI ve TNF-R1 gibi aktive edici reseptörlerin ekspresyonunun küçük osteoklastlara göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (26). Ayrıca, büyük osteoklastlarda IL-1b'ye cevapta rezorptif aktivitenin küçüklere oranla artmış olduğu bilinmektedir. Bu artışında özellikle büyük olan osteoklastlarda VEGF-A faktörünün artışı ile ilişkilendirilmiştir[26]. VEGF-A ekspresyonu için en önemli faktor hipoksidir.

VEGF anjiogeneziste etkileri bilinen büyüme faktörlerindendir. Kemikte osteoblastlar, osteoklastlar, kondrositler ve endotelyal hücreler tarafından salınarak normal kemik gelişiminde ve kemik onarımda etkileri vardır[27,29]. Osteoklastlardan VEGF-A ve VEGF-C salındığı ve VEGF-R1 ve VEGF-R2 gibi VEGF reseptörlerinin ekspresyonunu sağladığı gösterilmiştir[29,30]. Tercihen büyük osteoklastlar tarafından VEGF ekspresyonu gerçekleştirilir ve bu ekspresyonun HIF-1α'nın NF-κB aktivasyonu yoluyla hipoksik olmayan bir yolla indüklendiği gösterilmektedir (31). HIF-1 hipoksi ile indüklenebilir bir faktör olup, enflamatuvar sitokinlerden olan TNF-α ve IL-1β gibi diğer faktörlerden de etkilenebilir[32-34].

Ayrıca, TNF ailesinden olan RANKL'ın da NF-κB aktivasyonu yoluyla HIF-1α'yı indükleyebildiği bildirilmiştir[31]. İnflamatuar koşullar altında, osteoklastların çoğunluğunun büyük olduğu ve TNF-α ve IL-1β gibi sitokinlerin VEGF-A salgısını arttırdığı ve bu yüzden osteoklastik rezorptif aktivitenin ve sağkalımın da giderek arttığı romatoit artritte gözlenen kısır döngüye neden olduğu belirtilmektedir. VEGF-A değerinin romatoit artritte yüksekmiş olan seviyesi bu hipotezi desteklemektedir[35,36].

Bu çalışmada da; özellikle deney grubunda VEGF seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek olması ve buna paralel olarak yine deney grubunda aşırı enflamatuvar hücre infiltrasyonunun gözlenmesi, literatürle benzer olarak İÇKON'un etki mekanizmasında yer alan enflamatuvar cevap ile ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmanın bir takım limitasyonları bulunmaktadır. Bunlardan biri VEGF ekspresyonu ile ilişkilendirilmeye çabalanan enflamatuvar reaksiyonun semikantitatif bir yöntem ile, NF-κB gibi bir enflamatuvar yolak proteinin seviyesine bakılarak ölçülmemiş olmasıdır. VEGF/NF-κB ilişkisinin daha derinleme anlaşılabilmesi açısından daha detaylı immünhistokimyasal çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Diğer bir limitasyon ise, örneklerin sakrifikasyonunun diş çekiminden 8 hafta sonra gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bilindiği üzere yara iyileşmesinin ilk basamağını enflamasyon süreci ihtiva etmektedir. Özellikle aşırı enflamatuvar reaksiyonunun VEGF ekspresyonu ile ilişkilendiği bir hipotezin desteklenmesi için erken dönem iyileşmenin de yapılacak başka çalışmalarda incelenmesi faydalı olacaktır.

SONUÇ

Tüm limitasyonları ile birlikte, ZA sebebi ile kemik dokusunda meydana gelen aşırı enflamatuvar reaksiyon sebebi ile kan serumdaki seviyelerinin aksine kemik dokusunda VEGF ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. ZA'nın ve/veya diğer benzer etkili ilaçların bu tip etkilerinin anlaşılabilmesi için daha fazla örnekli ve NF-κB/HIF-1α/VEGF yolağının patolojik ve enflamatuvar kemik kaybı, ve İÇKON üzerindeki etkisinin de incelendiği daha moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Çıkar Çatışması

Bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ruggiero SL, Dodson TB, Aghaloo T, Carlson ER, Ward BB, Kademani D. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related

Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. J Oral Maxillofac Surg. 2022;80(5):920-943.
2. Miksad RA, Lai KC, Dodson TB, Woo SB, Treister NS, Akinyemi O et al. Quality of life implications of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. Oncologist. 2011;16(1):121-32.
3. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Cancer. 2000 Jun 15;88(12 Suppl):2961-78.
4. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg. 2003 Sep;61(9):1115-7.
5. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. J Oral Maxillofac Surg. 2009 May;67(5 Suppl):2-12.
6. Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B., O'Ryan, F., & American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (2014). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 72(10), 1938–1956.
7. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. J Clin Oncol. 2005 Dec 1;23(34):8580-7.
8. Hoff AO, Toth B, Hu M, Hortobagyi GN, Gagel RF. Epidemiology and risk factors for osteonecrosis of the jaw in cancer patients. Ann N Y Acad Sci. 2011 Feb;1218:47-54.
9. Russell RG, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Croucher PI, Shipman C, Fleisch HA. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. J Bone Miner Res. 1999 Oct;14 Suppl 2:53-65.
10. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. J Oral Maxillofac Surg. 2009 May;67(5 Suppl):61-70. doi: 10.1016/j.joms.2009.01.007.Reid IR, Cornish J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. Nat Rev Rheumatol. (2012) 8:90–6.
11. Estilo CL, Fornier M, Farooki A, Carlson D, Bohle G 3rd, Huryn JM. Osteonecrosis of the jaw related to bevacizumab. J Clin Oncol. 2008 Aug 20;26(24):4037-8.
12. Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. Clin Cancer Res. 2003 Aug 1;9(8):2893-7.
13. Vincenzi B, Napolitano A, Zoccoli A, Iuliani M, Pantano F, Papapietro N et al. Serum VEGF levels as predictive marker of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. J Hematol Oncol. 2012 Sep 17;5:56.
14. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Sep;302(3):1055-61.
15. Dayisoylu EH, Üngör C, Tosun E, Ersöz S, Kadioglu Duman M, Taskesen F et al. Does an alkaline environment prevent the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw? An experimental study in rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2014 Mar;117(3):329-34.
16. Kohen MC, Tatlipinar S, Cumbul A, Uslu Ü. The effects of bevacizumab treatment in a rat model of retinal ischemia and perfusion injury. Mol Vis. 2018 Mar 23;24:239-250.
17. Karakoyun B, Uslu U, Ercan F, Aydin MS, Yuksel M, Ogunc AV, Alican I. The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. Life Sci. 2011 Sep 12;89(11-12):402-7.
18. Reid IR, Green JR, Lyles KW, Reid DM, Trechsel U, Hosking DJ et al. Zoledronate. Bone. 2020 Aug;137:115390.
19. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature. 2000 Sep 14;407(6801):242-8.
20. Chintalgattu V, Nair DM, Katwa LC. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. J Mol Cell Cardiol. 2003 Mar;35(3):277-86.
21. Itakura J, Ishiwata T, Shen B, Kornmann M, Korc M. Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. Int J Cancer. 2000 Jan 1;85(1):27-34.
22. Bellone F, Catalano A, Sottile AR, Gaudio A, Loddo S, Corica F, Morabito N. Early Changes of VEGF Levels After Zoledronic Acid in Women With Postmenopausal Osteoporosis: A Potential Role of Vitamin D. Front Med (Lausanne). 2021 Nov 18;8:748438.
23. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Sep;302(3):1055-61.
24. Makris GP, Saffar JL. Quantitative relationship between osteoclasts, osteoclast nuclei and the extent of the resorbing surface in hamster periodontal disease. Arch Oral Biol. 1982;27(11):965-9.
25. Takano H, Tomita T, Toyosaki-Maeda T, Maeda-Tanimura M, Tsuboi H, Takeuchi E et al. Comparison of the activities of multinucleated bone-resorbing giant cells

derived from CD14-positive cells in the synovial fluids of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. Rheumatology (Oxford). 2004 Apr;43(4):435-41.

26. Trebec DP, Chandra D, Gramoun A, Li K, Heersche JN, Manolson MF. Increased expression of activating factors in large osteoclasts could explain their excessive activity in osteolytic diseases. J Cell Biochem. 2007 May 1;101(1):205-20.

27. Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. Endocrinology. 1997 Jul;138(7):2953-62.

28. Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. J Exp Med. 1999 Jul 19;190(2):293-8.

29. Tombran-Tink J, Barnstable CJ. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 2;316(2):573-9.

30. Yang Q, McHugh KP, Patntirapong S, Gu X, Wunderlich L, Hauschka PV. VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin. Matrix Biol. 2008 Sep;27(7):589-99.

31. Trebec-Reynolds DP, Voronov I, Heersche JN, Manolson MF. VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF-kappaB induction of HIF-1alpha. J Cell Biochem. 2010 May 15;110(2):343-51.

32. Haddad JJ, Land SC. A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha. FEBS Lett. 2001 Sep 14;505(2):269-74.

33. van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. Biochem J. 2008 Jun 15;412(3):477-84.

34. Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J. The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. Cancer Res. 2005 Jun 1;65(11):4690-7.

35. Malemud CJ. Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis. Clin Chim Acta. 2007 Jan;375(1-2):10-9.

36. Yoo SA, Kwok SK, Kim WU. Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention. Mediators Inflamm. 2008;2008:129873.