

Nitrojen İçeriği, Bifosfonata Bağlı Çene kemiği Osteonekrozunun Nedeni mi? Fareler Üzerinde Deneysel Çalışma

Is Nitrogen Containing the Reason of Bisphosphonated Induced Osteonecrosis of Jaws? An Experimental Study on Rats

 Sabit DEMİRCAN^{a,b}

^aBeykent Üniversitesi Meslek Yüksekokulu, Ağız Sağlığı Bölümü, İstanbul, TÜRKİYE

^bİstanbul Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Hastalıkları ve Cerrahisi ABD, İstanbul, TÜRKİYE

ÖZET Amaç: Bifosfonatlar kemik rezorpsiyonu üzerine inhibe edici etkileri nedeni ile iskelet sistemiyle ilgili rahatsızlıklarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bifosfonatların ciddi bir yan etkisi, bifosfonata bağlı gelişen çene kemiği osteonekrozudur. Bu yan etki çoğunlukla nitrojen içeren bifosfonatlar ile görüldüğü de nitrojen içermeyen bifosfonatlarla bildirilen olgular vardır. Çalışmamızda, nitrojen içeren (NBP) ve içermeyen (non-NBPs) bifosfonat kullanımının sıçan çekim yarası ve yumuşak doku iyileşmesine etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesini amaçladık. **Gereç ve Yöntemler:** Bu amaçla 48 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan 3 gruba ayrılarak çalışma yapılmıştır. Birinci gruba nitrojen içeren bifosfonat (zoledronik asit), ikinci gruba ise nitrojen içermeyen bifosfonat (etidronik asit) 7, 14 ve 21. günlerde subkutan olarak enjekte edilmiştir. Üçüncü grup ise kontrol grubu olarak tayin edilmiştir. Dördüncü haftanın sonunda tüm sıçanların sağ birinci mandibular molar dişi çekilmiş, palatinal diş etinde 5 mm uzunluğunda, 1 mm derinliğinde kesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen tüm denekler 6 hafta sonunda sakrifiye edilmiş ve elde edilen örnekler histopatolojik incelemeye tabi tutulmuştur. **Bulgular:** Sonuçlarımız, NBP kullanımının çekim soketi ve çevresinde mikroorganizma kolonizasyonunu arttırdığını, osteoklast sayısını ve damarlanmayı baskıladığını, çekim soketi iyileşmesini geciktirdiğini göstermiştir. Çalışmamızda 6 hafta sonunda NBP ile açığa çıkmış nekroze kemik dokusu izlenmiş, ancak non-NBP ile açığa çıkmış kemik veya ülserasyon görülmemiştir. **Sonuç:** Bu sonuçlar, nitrojen içeren bifosfonatların içermeyenlere kıyasla daha yüksek oranda osteonekroz ve gecikmiş yara iyileşmesine neden olduklarını göstermektedir.

ABSTRACT Objective: Bisphosphonates that inhibit bone resorption are frequently used to treat skeletal-related events. A severe adverse effect caused by such drugs is bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws mostly reported with nitrogen containing bisphosphonates, but there is reports with non-nitrogen containing bisphosphonates induced osteonecrosis. In this study, our aim is to examine the effects of systemic use of both nitrogen containing (NBP) and non-nitrogen containing bisphosphonates (non-NBPs) on healing of rats extraction sockets and soft tissue wounds histo-pathologically. **Material and Methods:** Therefore 48 Sprague-Dawley rats are separated into 3 groups. Animals in Group 1 injected with a NBP (zoledronic acid) and animals in Group 2 injected with a non-NBP (etidronic acid) on day 7, 14 and 21. Group 3 assigned as a control group. After 28 days, palatinal gingiva incised 5 mm long, 1 mm depth and left mandibular first molar tooth of rats extracted. After 4 weeks of surgical operations all rats sacrificed and the obtained samples examined histo-pathologically. **Results:** Our results showed that systemic application of NBP increases the colonization of microorganisms on and near the extraction socket; inhibits vascularization, healing of extraction socket and decreases the amount of osteoclasts. In present study we observed that 6 exposed bone with NBP; however etidronate didn't caused exposed bone or ulceration. **Conclusion:** These results suggests NBPs have much risk for osteonecrosis and delayed wound healing than non-NBPs.

Anahtar Kelimeler: Çenelerin bisfosfonat ilişkili osteonekrozu; yara iyileşmesi

Keywords: Bisphosphonate-associated osteonecrosis of jaw; wound healing

Bifosfonatlar (BP) osteoporoz, multipl miyelom, Paget hastalığı gibi kemik ile ilgili durumlarda sıklıkla kullanılan, kemik rezorpsiyonunu inhibe edici ajanlardır.^{1,2} BP kalsiyum fosfonat mineraline bağla-

nır ve osteoklastik aktiviteyi bloke ederek kemik miktarının korunmasını sağlar.² BP'lere bağlı gelişen çene kemiği osteonekrozu [bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ)] ciddi bir yan et-

Correspondence: Sabit DEMİRCAN

Beykent Üniversitesi Meslek Yüksekokulu, Ağız Sağlığı Bölümü, İstanbul, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: sabitdemircan@hotmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences.

Received: 25 Apr 2019

Received in revised form: 23 May 2019

Accepted: 28 May 2019

Available online: 13 Jun 2019

2146-8966 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

kidir ve literatürde sıkça rapor edilmiştir.³ Osteoklastik aktivitenin inhibisyonu, anjiyogenezisin inhibisyonu yumuşak doku toksisitesi, immün disfonksiyonlar gibi çeşitli patofizyolojik teoriler literatürde yer bulmuştur.^{2,4} BRONJ vakalarının %63,7'si diş çekimine bağlıdır.⁴ Çoğu vakada hasta, geç dönem meme kanseri veya prostat kanserinin iskeletsel metastazlarını engellemek amacıyla intravenöz nitrojen içeren BP (NBP) ve kortizon ile tedavi görmektedir.^{3,5}

Çekim soketi iyileşmesi inflamatuvar, proliferatif ve yeniden yapılanma fazı olarak ayrılabilir. Erken dönem iyileşme; hemostazis, geçici yara matrisi oluşumu ile nötrofil ve monosit infiltrasyonunu içerir. Proliferasyon fazında granülasyon dokusu şekillenir ve damar yapısı oluşur. Soket duvarına komşu bölgelerden başlayarak ilk kemik dokusu tabakaları oluşmaya başlar. Sonunda yeniden yapılanma fazında bağ dokusu ve kemik yapısı değişiklikleri meydana gelir ve olgunlaşmamış kemik, olgun lamellar kemik ve kemik iliği ile yer değiştirir.⁶ BP'ler, kemik rezorpsiyonunu inhibe ederek normal yeniden yapılanma sürecini de sekteye uğratmaktadırlar.⁷ Çene kemiklerinin, alveoler bölgede artan kemik "remodelling" nedeni ile daha yüksek oranda etkilendiği rapor edilmiştir.^{8,9}

BRONJ çoğunlukla NBP'ler ile rapor edilse de nitrojen içermeyen BP (non-NBP)'ler ile de rapor edilen olgular mevcuttur.^{10,11} Bizim bu çalışmayı düzenlerken hipotezimiz; BP'lerin nitrojen içeriğinin BRONJ sıklığını artırdığı, dolayısıyla non-NBP'lerin daha az çekim yarası iyileşmesini bozacağıdır.

Bu çalışmada amacımız, hem NBP'lerin hem de non-NBP'lerin farelerin çekim soketi ve yumuşak doku iyileşmesine etkilerini histopatolojik olarak incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

HAYVANLAR VE TEDAVİ PROTOKOLÜ

Çalışmamızda 48 adet (350 g±50 g) erkek fare (Sprague-Dawley) kullanılmıştır. Proje kapsamındaki hayvan deneyleri için İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan, 31.05.2012 tarihinde 2012-88 no.lu sayı ile gerekli

izin alınmış ve Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uyulmuştur.

Araştırma kapsamında 2 adet deney, 1 adet de kontrol olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Çalışma boyunca hayvanların beslenmesi düzenli olarak kontrol edilmiştir. Beslenmeye ve strese ait bulgular düzenli olarak haftada bir kez kontrol edilmiştir. Deney gruplarına -BRONJ ile karşılaşılan olgularda sıklıkla ek medikasyon olarak kullanımına rastlanıldığı için kortizon (deksametazon) uygulanmıştır. Ayrıca BRONJ için hayvan modeli oluşturulmasına dair Ali-Erdem ve ark. tarafından 2011 yılında yayımlanan prosedür esas alınmıştır.¹²

1. Deney Grubu (NBP): Bu gruptaki hayvanlara 7, 14 ve 21. günlerde subkütan olarak 1 mg/kg deksametazon enjekte edilmiş ve enjeksiyonu takiben intramusküler olarak 7,5 µg/kg zoledronik asit (Zometa®-Novartis) uygulanmıştır. 28. günde intraperitoneal 70 mg/kg ketamin ve 13 mg/kg ksilazin enjekte edilerek genel anestezi sağlanmış, sonrasında sağ birinci mandibular molar diş çekilmiştir. Çekimi takiben palatinal diş etinde 5 mm uzunluğunda, 1 mm derinliğinde kesi gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları 6 haftalık iyileşme sürecine bırakılmıştır.

2. Deney Grubu (non-NBP): Bu gruptaki hayvanlara 7, 14 ve 21. günlerde subkütan olarak 1mg/kg deksametazon enjekte edilmiş ve enjeksiyonu takiben intramusküler olarak 7,5 µg/kg etidronik asit (Etidronate Didronel; Procter & Gamble UK) uygulanmıştır. Yirmi sekizinci günde intraperitoneal 70 mg/kg ketamin ve 13 mg/kg ksilazin enjekte edilerek genel anestezi sağlanmış, sonrasında sağ birinci mandibular molar diş çekilmiştir. Çekimi takiben palatinal diş etinde 5 mm uzunluğunda, 1 mm derinliğinde kesi gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları 6 haftalık iyileşme sürecine bırakılmıştır.

Kontrol Grubu: Bu gruptaki hayvanlara, 4. haftada intraperitoneal 70 mg/kg ketamin ve 13 mg/kg ksilazin enjekte edilerek genel anestezi sağlanmış, sonrasında sağ birinci mandibular molar diş çekilmiştir. Çekimi takiben palatinal diş etinde 5 mm uzunluğunda, 1 mm derinliğinde kesi gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları 6 haftalık iyileşme sürecine bırakılmıştır.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

Kemik örnekleri EDTA (7,2 pH/4 °C) çözeltisinde 3 hafta süre ile dekalsifiye edilmiş ve dekalsifiye örnekler parafin bloklara gömülerek 5 µ'luk kesitler alınmıştır. Hematoksilen-eozin ile boyanan örnekler tüm preparatlar ışık mikroskobunda incelenmiştir. Çekim alanının tümü küçük (x40), orta (x200) ve büyük (x400) büyütmeyle taranmıştır.

Yumuşak doku örnekleri ise %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonuna koyularak fikse edilmiş ve parafin bloklara gömülmüştür. Bu bloklardan 5-7 µ kalınlığında kesitler alınarak lam üzerine yerleştirilmiştir. Tüm preparatlar ışık mikroskobunda incelenmiştir. Kesi alanının tümü küçük (x40), orta (x200) ve büyük (x400) büyütmeyle taranmıştır.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics V21,0 kullanılmıştır. Çalışmada yer alan değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma, ortanca, min-max) elde edilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında "palatinal mukozadaki damarlanma miktarı" dışındaki tüm parametreler için Kruskal-Wallis (çoklu karşılaştırma için Dunn testi), "palatinal mukozadaki damarlanma miktarı" için ise One-Way ANOVA (çoklu karşılaştırma için Tukey testi) kullanılmıştır. Anlamlılık sınır düzeyi olarak $p \leq 0,05$ kabul edilmiştir.

BULGULAR

Yapılan klinik incelemede 28. günde grupların çoğunluğunda çekim soketi iyileşmesi gözlenmiş ve NBP grubuna ait 6 örnek dışında çekim alanında açığa çıkmış kemik yüzeyi izlenmemiştir.

Çekimi takiben 28. günde örneklerin tamamında interdental kemik rezorpsiyonu ve yeni kemik yapımı izlenmiştir. Yeni kemik trabeküllerinin miktarının NBP grubunda ciddi oranda azaldığı gözlenirse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,17$).

Çekim alanındaki osteoklast miktarı, NBP grubunda non-NBP ve kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur

($p=0,008$) (Tablo 1) (Resim 1). Ayrıca inflamasyon skorları NBP grubunda diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,001$) (Tablo 2) (Resim 2). Nekroz skorları incelendiğinde, NBP grubunun nekroz değerleri diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Örneklerin hiçbirinde yabancı cisim reaksiyonu gözlenmezken, fibrozis skorlarında da anlamlı bir farklılık izlenmemiştir.

Yumuşak doku damarlanması hem NBP hem non-NBP gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Minimum vaskülarite skoru NBP ile izlense de bu fark istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır (Tablo 3).

TARTIŞMA

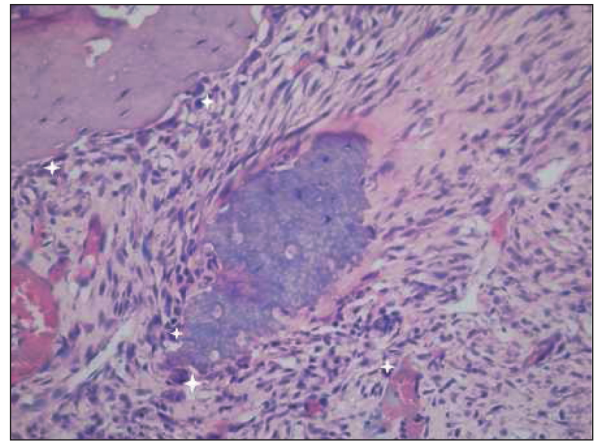
BRONJ'nin patofizyolojisinde osteoklastik kemik rezorpsiyonu ve "remodelling" inhibisyonunun, anjiyogenezis baskılanmasının, yumuşak doku toksitesinin ve immün disfonksiyonların rol oynadığı düşünülmüştür.² %63,7 olgu dış çekimini takiben gö-

TABLO 1: Çekim soketindeki osteoklast oranları.

	n	Mediyan	Min-max	p
ZA	16	6	2-9	
EA	16	3	1-4*	=0,0088
Kontrol	16	4,5	3-9	

*Osteoklast miktarı nitrojen içeren bifosfonat grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

ZA: Zoledronik asit, EA: Etidronik asit.



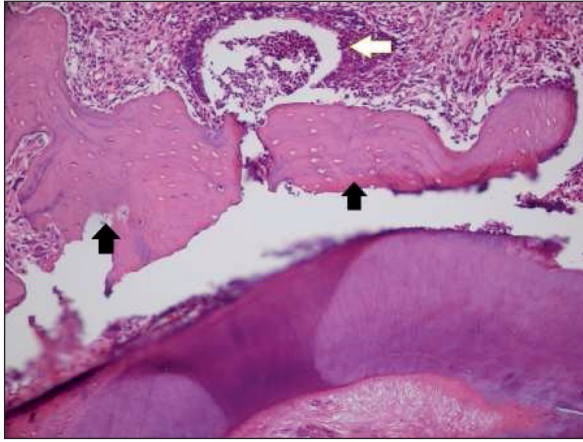
RESİM 1: NBP grubuna ait kesitte osteoklast izlenmektedir. Osteoklast miktarı NBP grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Parafin bloklardan alınan kesitler, hematoksilen-eozin ile boyanmış ve ışık mikroskobunda X200 büyütme ile incelenmiştir (Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japonya).

TABLO 2: Grupların inflamasyon skorları.

	n	Mediyan	Min-max	p
ZA	16	3	3-3*	<0,001
EA	16	2	2-3	
Kontrol	16	0	0-1	

*Nitrojen içeren bifosfonat grubunun inflamasyon skorları diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksektir.

ZA: Zoledronik asit, EA: Etidronik asit.



RESİM 2: Nitrojen içeren bifosfonat grubuna ait kesitte nekroz ve inflamasyon. Parafin bloklardan alınan kesitler, hematoxilen-eozin ile boyanmış ve ışık mikroskopunda X200 büyütme ile incelenmiştir (Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japonya).

rüldüğü için çalışmamızda, daha önceki çalışmaların rehberliğinde fareler üzerinde bir diş çekimi modeli tasarladık.^{12,13}

Farelerin çekim soketi iyileşmesinin değerlendirildiği diğer çalışmalarda; çekim soketi tabanında 2. günde yeni kemik dokusu formasyonunun başladığı ve 14. günde soketin yeni kemik dokusu ile dolduğu bildirilmiştir.^{14,15} Çalışmamızda; 28. günde çekim soketinin tamamen epitelizeasyonu sadece kontrol grubundaki örneklerde görülmüştür. Karşıt olarak, geç dönem iyileşmenin klinik ve histolojik belirtileri özellikle NBP grubunda kendini göstermiştir. Zoledronik asit kullanılan grubumuzda 6 örnekte açığa çıkmış nekrotik kemik yüzeyi izlenmiştir.

Çalışmamızda daha önce yapılan benzer çalışmaları da rehber olarak BP kullanım süresini 28 gün olarak belirledik.^{12,16,17} Ancak belirtmek gerekir ki literatürde, 28 günden daha kısa süre BP kullanımı ile rapor edilen osteonekroz vakaları mevcuttur.^{18,19} Bu durum ile ilgili Hikita ve ark. tarafından yapılan ça-

lışmada yazarlar hemen çekim sonrası uygulanan BP'nin dahi çekim soketi iyileşmesinin geç dönem iyileşme basamaklarını negatif yönde etkilediğini bildirmişlerdir.²⁰ Sonuçlarımız, BP uygulaması ile iyileşmenin erken döneminin de negatif etkilenebileceğini göstermiştir. Biz BP'nin değişik zamanlarda uygulanmasının iyileşmenin erken ya da geç evrelerinin etkilenmesinde etkili olduğunu düşünüyoruz.

Normal şartlarda osteoklast sayısı, kemik rezorpsiyonunun güvenilir bir belirtisidir. Ancak Weinstein ve ark., oral BP kullanan postmenopozal kadınlarda yaptıkları çalışmada, osteoklast sayısının doza bağlı bir artış gösterdiğini ancak buna rağmen bu osteoklastların yaklaşık üçte birinin kemik yüzeyinden ayrılmış dev osteoklastik hücreler olduğunu göstermişlerdi.²¹⁻²³ Biyokimyasal belirteçlerin azalması ve kemik yoğunluğunun artması, normal görünümlü osteoklastların da fonksiyonunun baskılandığını, kemiği rezorbe edemediğini düşündürmüştür.²³ Çalışmamızda zoledronik asit uygulanan gruptaki osteoklast sayısının, etidronik asit uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede az olduğu bulunmuştur. Etidronik asit uygulanan gruptaki osteoklast sayısı ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azdır.

BRONJ çoğunlukla NBP ile rapor edilse dahi non-NBP'ler ile rapor edilen olgular göz ardı edilemez.⁵⁻¹¹ Oizumi ve ark. etidronik asidin NBP'lere alternatif olarak verildiğinde farelerde BRONJ'nin engellenebileceğini rapor etmişlerdir.²¹ Çalışmamızın sonucunda da etidronik asidin artmış osteoklast düzeyine ve açık kemik yüzeyi veya ülserasyona neden olmadığını gördük.

Pabst ve ark., non-NBP'lerin mikrovasküler yapı üzerine negatif etkilerinin NBP'lere oranla anlamlı derecede düşük olduğunu bildirmişlerdir.²⁴ Araştırmacılar, bu farklılığın nedeni olarak NBP ve non-

TABLO 3: Grupların yumuşak doku vaskülarite skorları.

	n	Min-max	p
ZA	16	12,86 +/- 2,73*	<0,001
EA	16	10,86 +/- 2,27	
Kontrol	16	17,13 +/- 2,10	

*Minimum vaskülarite miktarı nitrojen içeren bifosfonat grubunda görülmüştür.
ZA: Zoledronik asit, EA: Etidronik asit.

NBP'lerin etki mekanizmalarındaki farklılığı göstermişlerdir. NBP'ler farnesil fosfataz sentezini bloke ederek etki gösterirken, non-NBP'ler adenosin trifosfat ile mücadele eden nonfonksiyonel moleküller oluşturarak etki göstermektedirler.²⁴⁻²⁶ Sonuçta istatistiksel anlamlılık taşıyacak miktarda olmasa da bizde en düşük vaskülarite skorlarını NBP ile gözlemledik.

Çalışmamızda, gruplar arasında çekim soketi çevresindeki epitel varlığı açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Aynı şekilde palatinal mukozadaki yara çevresinde de epitel rejenerasyonu tam izlenmiş, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Literatürde BP'lerin oral epitel hücrelerine etkileriyle ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Allam ve ark.nın köpeklerde oluşturduğu BRONJ modelinde, zoledronik asidin oral epitel hücreleri üzerine etkisi olmadığını göstermişlerdir.²⁷ Benzer şekilde Sonis ve ark.nın sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada da, zoledronik asit uygulaması sonrasında epitelyal hücre apoptozunun görülmediği kaydedilmiştir.²⁸

SONUÇ

Sonuçlarımız, NBP'lerin non-NBP'lere kıyasla daha yüksek oranda osteonekroz ve gecikmiş yara iyileşmesine neden olduklarını göstermektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Bu çalışma tamamen yazarın kendi eseri olup başka hiçbir yazar katkısı alınmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med.* 1995;333(22):1437-44. [Crossref] [PubMed]
2. Ruggiero S, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(10):1938-56. [Crossref] [PubMed]
3. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61:115-7. [Crossref]
4. Vescovi P, Campisi G, Fusco V, Mergoni G, Manfredi M, Merigo E, et al. Surgery-triggered and non surgery-triggered Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ): A retrospective analysis of 567 cases in an Italian multicenter study. *Oral Oncol.* 2011;47(3):191-4. [Crossref] [PubMed]
5. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(5):527-34. [Crossref] [PubMed]
6. Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, Gkouveris I, Christensen R, Dry SM, et al. Zoledronate impairs socket healing after extraction of teeth with experimental periodontitis. *J Dent Res.* 2018;97(3):312-20. [Crossref] [PubMed] [PMC]
7. Mashiba T, Hirano T, Turner CH, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *J Bone Miner Res.* 2000;15(4):613-20. [Crossref] [PubMed]
8. Zaki AE, Vanhuysen G. Histology of the periodontium following tooth movement. *J Dent Res.* 1963;42:1373-9. [Crossref] [PubMed]
9. Rygh P. Ultrastructural changes in pressure zones of human periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odontol Scand.* 1973;31(2):109-22. [Crossref] [PubMed]
10. Yamaguchi K, Ozumi T, Funayama H, Kawamura H, Sugawara S, Endo Y. Osteonecrosis of the jawbones in 2 osteoporosis patients treated with nitrogen-containing bisphosphonates: osteonecrosis reduction replacing NBP with non-NBP (etidronate) and rationale. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(4): 889-97. [Crossref] [PubMed]
11. Tanaka Y, Nagai Y, Dohdoh M, Ozumi T, Ohki A, Kuroishi T, et al. In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. *Arch Oral Biol.* 2013;58(6):628-37. [Crossref] [PubMed]
12. Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(7):879-83. [Crossref] [PubMed]

13. Khan AA, Morrison A, Kendler DL, Rizzoli R, Hanley DA, Felsenberg D, et al.; International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Case-Based Review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and Application of the International Recommendations for Management from the International Task Force on ONJ. *J Clin Densitom.* 2017;20(1):8-24. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
14. Pietrokovski J, Massler M. Ridge remodeling after tooth extraction in rats. *J Dent Res.* 1967;46(1):222-31. [[Crossref](#)]
15. Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat. A histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand.* 1970;28(4): 441-61. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
16. Mada EY, Santos AC, Fonseca AC, Bigueti CC, Neves FT, Saraiva PP, et al. Effects of green tea and bisphosphonate association on dental socket repair of rats. *Arch Oral Biol.* 2017;75:1-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
17. Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Júnior RC, Sousa FB, et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate related osteonecrosis. *Arch Oral Biol.* 2015;60(9):1237-45. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
18. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013;42(6):744-50. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
19. Williams DW, Lee C, Kim T, Yagita H, Wu H, Park S, et al. Impaired bone resorption and woven bone formation are associated with development of osteonecrosis of the jaw-like lesions by bisphosphonate and anti-receptor activator of NF- κ B ligand antibody in mice. *Am J Pathol.* 2014;184(11):3084-93. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
20. Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(6):663-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
21. Oizumi T, Funayama H, Yamaguchi K, Yokoyama M, Takahashi H, Yamamoto M, et al. Inhibition of necrotic actions of nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs) and their elimination from bone by etidronate (a non-NBP): a proposal for possible utilization of etidronate as a substitution drug for NBPs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(5):1043-54. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
22. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Reports of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2(6):595-610. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
23. Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. *N Engl J Med.* 2009;360(1):53-62. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
24. Pabst AM, Ziebart T, Ackermann M, Konerding MA, Walter C. Bisphosphonates' antiangiogenic potency in the development of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: influence on microvessel sprouting in an in vivo 3D Matrigel assay. *Clin Oral Investig.* 2014;18(3):1015-22. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
25. Frith J, Mönkkönen J, Blackburn G, Russell R, Rogers M. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res.* 1997;12(9):1358-67. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
26. van Beek ER, Cohen LH, Leroy IM, Ebetino FH, Löwik CW, Papapoulos SE. Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone.* 2003;33(5):805-11. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
27. Allam E, Allen M, Chu TM, Ghoneima A, Jack Windsor L. In vivo effects of zoledronic acid on oral mucosal epithelial cells. *Oral Dis.* 2011;17(3): 291-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
28. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol.* 2009;45(2):164-72. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]