



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Deneyisel Diş Hareketleri Sırasında Angiostatinin Kemik Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Evaluation of The Effects of Angiostatin on Bone During Experimental Tooth Movement



Dr. Barış DEMİREL*

Doç.Dr. Hüseyin ÖLMEZ*

Doç.Dr. Erol AKIN**

Yrd.Doç.Dr. Sıla

MERMUT GÖKÇE*

Doç.Dr. Mehmet KÜRKCÜ***

Prof.Dr. Deniz SAĞDIÇ*

*Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Dişhek. Bilimleri Merkezi Ortodonti A.D. Ankara, **Medicana Hastanesi Ortodonti Servisi İstanbul, ***Çukurova Üniv., Dişhek. Fak., Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A.D., Adana, Türkiye / *Gülhane Military Medical Academy, Dental Sciences Center, Dept. of Orthodontics, Istanbul, **Medicana Hospital, Dept. of Orthodontics, Istanbul, *** Çukurova Univ., Faculty of Dentistry, Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Adana, Turkey

Yazışma Adresi/

Corresponding Author:

Dr. Sıla MERMUT GÖKÇE,
Gülhane Askeri Tıp Akademisi,
Diş Hekimliği Bilimleri Merkezi,
Gn. Tevfik Sağlam Cad.,
Ankara, Etilik 06018, Türkiye
Tel: 0312 304 60 25
E-mail: silagokce@yahoo.com

ÖZET

Amaç: Ankraj alınan dişlerin istenmeyen hareketleri ve daha önceden hareket etmiş olan dişlerin relapse, ortodontide önemli bir sorundur. Angiostatin, osteolitik lezyonların ilerlemesini durduran, angiogenezin sirküler bir inhibitörüdür. Bu çalışmanın amacı, ortodontik diş hareketleri sırasında istenmeyen diş hareketlerinin ve relapsın önlenmesinde angiostatinin farklı dozlarının kemik yeniden şekillenmesi üzerine klinik etkilerinin araştırılmasıdır. **Gereçler ve Yöntem:** Deneyisel diş hareketlerinde angiostatinin kemik şekillenmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi için, angiostatin ratlar üzerinde üç farklı dozda (Sırasıyla Grup 1, 2 ve 3; 1,3 ve 10µg/20µl) uygulanmıştır. Bütün gruplarda Ni-Ti kapalı sarmal yaylar ile mandibular birinci azılar mezial yönlü hareket ettirilmiştir. Sonuçlar, histomorfometrik olarak trabeküler kemik hacmi (BV/TV), trabeküler kemik sayısı (Tr.N) ve trabeküler ayıklık (TrSep) parametreleriyle mandibular birinci azıların interradiküler kemik alanlarında incelenmiştir. **Bulgular:** Grup 1 ile Grup 4 ve 5 'in karşılaştırılmasında, sadece Tr.Sep para-metresindeki azalma anlamlı bulunmuştur. Grup 2 ile Grup 4 karşılaştırılmasında, BV/TV'deki artış ve Tr.Sep'daki azalma anlamlı bulunmuştur. Buna ek olarak, Grup 5 ile karşılaştırıldığında Grup 2' deki Tr.Sep azalması istatistiksel olarak anlamlıdır. Grup 3 ile Grup 4 karşılaştırılmasında, BV/TV ile Tr.N artışı ve Tr.Sep azalması istatistiksel olarak anlamlıdır. Grup 3 ve Grup 5 karşılaştırıldığında ise, BV/TV ve Tr.N artması ve Tr.Sep azalması istatistiksel olarak anlamlıdır. **Sonuç:** BV/TV ve Tr.N'deki artış ile Tr.Sep' teki azalma, ortodontik diş hareketi sırasında kemik şekillenmesinde angiostatinin olası anti-osteoklastik aktivitesinin varlığını ortaya koymuştur. Doz artışı, kemik apozisyonuna ve/veya osteoklastik aktivite azalmasına neden olmuştur. Angiostatin, rezorpsiyon miktarını azaltmıştır; ancak kemik şekillenmesi üzerindeki spesifik etkilerinin belirlenmesi için, daha yüksek, farklı doz uygulamaları ve daha detaylı analiz programlarının kullanılarak başka araştırmalar yapılmasına ihtiyaç vardır. (Türk Ortodonti Dergisi 2012;25:224-238)

Anahtar Kelimeler: Angiostatin, Antineoplastik ajan, Angiogenez inhibitör.

Gönderim Tarihi: 06.12.2011

Kabul Tarihi: 27.06.2012

SUMMARY

Aim: The undesired movement of anchor teeth and relapse of previously moved teeth are major clinical problems in orthodontics. Angiostatin, a circulating inhibitor of angiogenesis, inhibits progression of osteolytic lesions. The aim of the study was to investigate the effects of different doses of angiostatin on bone-remodeling during orthodontic tooth movement due to determine the clinical utility in preventing undesired tooth movement and relapse. **Materials and Method:** To determine the effects of angiostatin in bone remodeling during experimental tooth movement, angiostatin was administered to rats at three different doses (Group 1, 2 and 3; 1, 3 and 10µg/20µl respectively). Mandibular first molars were moved mesially by means of Ni-Ti closed coil springs in all groups. The results were evaluated histomorphometrically and parameters of trabecular bone volume (BV/TV), trabecular bone number (Tr.N), and trabecular separation (Tr.Sep) were investigated at the interradicular bone area of the mandibular first molars. **Results:** In the comparison of Group 1 with Group 4 and 5, only the decrease in Tr.Sep was significant. The increase in BV/TV and the decrease in Tr.Sep were significant in the comparison of Group 2 against Group 4. In addition, the decrease in Tr.Sep was also statistically significant in Group 2, compared with Group 5. Increase in BV/TV and Tr.N, and decrease in Tr.Sep were significant in the comparison of Group 3 with Group 4. When Group 3 and Group 5 were compared, the increase in BV/TV and Tr.N, and the decrease in Tr.Sep were also statistically significant. **Conclusion:** Increases in BV/TV and Tr.N and decreases in Tr.Sep demonstrated the possibility of anti-osteoclastic activity of angiostatin in bone remodeling during orthodontic tooth movement. The increase in dose caused an increase in bone apposition and/or inhibition of osteoclastic activity. Angiostatin inhibited the rate of resorption and further investigations with higher doses, different dose sequences and more detailed analyze programs were required to determine the specific effects on bone remodeling. (Turkish J Orthod 2012; 25:224-238)

Key Words: Angiostatin, Antineoplastik agent, Angiogenesis inhibitor.

Date Submitted: 06.12.2011

Date Accepted: 27.06.2012



GİRİŞ

Ortodontik diş hareketi, kontrollü mekanik kuvvetlerin uygulanması ile dişlerin basınç tarafında osteoklastlar tarafından rezorpsiyon, karşı gerilim tarafında osteoblastlar tarafından kemik oluşumu ile başlar. Klinik ortodontinin etkinliğine rağmen, osteoklast aktivitesinin değiştirilmesi ile tedavi etkinliğinin artmasını sağlayacak birtakım şartlar mevcuttur. Bu kapsamda, ankraj alınan dişlerin istenmeyen hareketi ve hareket ettirilmiş dişlerin relapsı, mevcut kuvvet sağlama sistemlerinin yetersizliği yüzünden esas klinik sorunlardır. Güncel araştırmalardaki ilerlemeler, osteoklastları inhibe eden biyolojik modülatörlerin kullanılmasıyla bu sorunların giderilebileceğini ve ortodontik tedaviye yeni yardımcı yöntemler geliştirilebileceğini düşündürmektedir (1). Bisfosfonatlar (2) ve osteoprotegerin (OPG) dahil, reseptör-aktivator nuklear faktör- κ B ligand (RANKL) ile alıcı reseptörü arasındaki bağlantıyı engelleyen ve osteoklast çoğalmasını ve etkinliğini önleyen, çözünebilir protein olan birçok inhibitör incelenmiştir (3). Ancak, bu inhibitörlerin diş hareketi üzerindeki göreceli etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Angiogenезisin sirküler bir inhibitörü olan angiostatin, kringle olarak adlandırılan 4 protein yapısı içeren plasminojen yayılım bölgesinden elde edilir (4-8). İlk olarak, Lewis akciğer hücresi karsinomu için fare modelinin idrar ve serumundan saflaştırılmıştır (4). Angiostatin, sirküler plazminojenlerdeki MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 ve MMP-12 gibi çeşitli matris metalloproteazlarından (MMP) oluşturulabilir (9-11). Angiostatin, in vitro olarak endotelial hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu, farklılaşmasını ve tüp formasyonunu engeller (5,7,12). Angiostatinin sistemik uygulanması, tümör metastazının büyümesini ve nörovaskülarizasyonunu kuvvetli bir biçimde engeller (4,5,7). Angiostatinin anti-angiogenik özellikleri için, çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Angiostatin endotelial hücre yüzeyindeki ATP sentezleyen α ve β alt bileşenlerine bağlanarak enerji kaynağını keser (7,8,13). Angiostatin ayrıca, integrin α v β 3'e bağlanarak angiogenез için gerekli olan α v β 3 kaynaklı sinyal transdüksiyonunda

INTRODUCTION

Orthodontic tooth movement is induced by the controlled application of mechanical force, which results in bone resorption by osteoclasts on the compression side of teeth, and bone formation by osteoblasts on the opposing (tension) side. Despite the efficacy of clinical orthodontics, there are a number of circumstances under which treatment efficiency might be improved by modulating the activity of osteoclasts. In this regard, the undesired movement of anchor teeth, and the relapse of moved teeth, are major clinical problems that result from the limitations of available force delivery systems. Recent research advances suggest that biological modulators which inhibit osteoclasts could be used to address these problems and provide new adjunctive approaches to orthodontic treatment (1). Several such inhibitors have been examined, including bisphosphonates (2) and osteoprotegerin (OPG), a soluble protein that inhibits receptor-activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) interactions with its cognate receptor, and prevents osteoclast differentiation and activation (3). However, the relative efficiency of these inhibitors in preventing tooth movement is unknown.

Angiostatin, a circulating inhibitor of angiogenesis, was derived from plasminogen spanning the first 4 kringle domains (4-8). It was originally purified from the urine and serum of a mice model for Lewis lung cell carcinoma (4). Angiostatin can be generated from circulating plasminogen by various matrix metalloproteases (MMP) including MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 and MMP-12 (9-11). Angiostatin blocks proliferation, migration, differentiation and tube formation of endothelial cells in vitro (5,7,12). Systemic administration of angiostatin strongly blocks neovascularisation and growth of tumor metastasis (4,5,7). Several mechanisms have been proposed for the anti-angiogenic properties of angiostatin. It binds to α and β subunits of ATP synthase on the cell surface of endothelial cells and inhibits proliferation by reduction of energy supply (7,8,13). Angiostatin also acts via binding to integrin α v β 3, perturbing the α v β 3-mediated signal





rol oynar (8,14). Ayrıca, angiostatin kompetatif antagonist gibi davranarak endotelial ve düz kas hücrelerinin hepatosit büyüme faktörüne olan duyarlılığını engeller (5,6).

Kemik, göğüs, prostat, akciğer, böbrek ve tiroid kanserleri için çok yaygın bir metastatik bölgedir (15,16). Mevcut araştırmalar, metastatik hücrelerin osteoklast kaynaklı kemik rezorbsiyonunu stimüle etmesinin ve rezorbe kemikte kemik türevi büyüme faktörlerinin tümör büyümesini arttırmasının bir kısır döngü olduğu görüşünü desteklemektedir (16).

İnsan MDA-MB-231 göğüs kanser hücrelerinin hayvanlarda yüksek vazkularize kemik lezyonlarına neden olduğuna (17), ve hayvanların TNP-470 antikanser ilacı ve antiangiogenik özelliklere sahip fumagillin ile sistemik olarak tedavi edildiğinde, MDA-MB-231 hücrelerinin neden olduğu kemik metastaz formasyonunu düşürdüğüne dair bazı deneysel çalışmalar mevcuttur (18). Ancak bu çalışmalarda sonuçlar, spesifik angiogenez inhibitörlerinin kemik metastazlarında kullanımını önermemektedir (18).

Angiostatin, osteoklast fonksiyonlarını doğrudan inhibe ederek kanser kaynaklı kemik yıkımını ve osteolitik lezyonların ilerlemesini belirgin şekilde durdurur. Kemik rezorbsiyonunu engellemesiyle angiostatin dolaylı olarak kemikten salınan büyüme faktörlerinin salınımını da sınırlar (19).

Anjiyostatin, çeşitli yönleriyle bir anti angiogenez faktörü gibi davranabilir. İlk olarak, angiostatin endotelial hücre proliferasyonunu durdurabilir. İkinci olarak, angiostatin endotelial hücre apoptozisine neden olabilir. Üçüncü olarak ise, endotelial hücre migrasyonunu ve invazyonunu durdurabilir. Bunlara ek olarak, angiostatin endotelial nedenli vazodilatasyonu düzensizleştirir (7). Angiostatin, hsp90 ve eNOS arasındaki etkileşimi azaltabilir. eNOS aktivitesinin ayrıştırılmasıyla, angiostatin endotelial nedenli vazodilatasyonun olumsuz yönde bir düzenleyicisi gibi davranır (20).

Ankraj alınan dişlerin istenmeyen hareketleri ve daha önceden hareket etmiş olan dişlerin relapsı ortodonti kliniğinde önemli bir sorundur. Dental implantlar ankraj korunması için sıklıkla kullanılmaktadır; ancak bunlar invaziv cerrahi prosedürler

transduction necessary for angiogenesis (8,14). Furthermore, angiostatin inhibits the responses of endothelial and smooth muscle cells to hepatocyte growth factor by acting as a competitive antagonist (5,6).

Bone is a very common metastatic site for human breast, prostate, lung, kidney, and thyroid cancers (15,16). Current investigations support the notion that there is a vicious circle at the bone metastatic site at which bone-residing metastatic cells stimulate osteoclast mediated bone resorption and bone-derived growth factors released from resorbed-bone promote tumor growth (16).

There is some experimental evidence to indicate that human MDA-MB-231 breast cancer cells cause the development of highly vascularized skeletal lesions in animals (17), and systemic treatment of animals with the anticancer drug TNP-470, synthetic analogue of fumagillin with antiangiogenic properties, reduces the formation of bone metastases caused by MDA-MB-231 cells (18). However, these results do not suggest the use of specific angiogenesis inhibitors in treating bone metastases (18).

Angiostatin markedly inhibits progression of osteolytic lesions. It inhibits cancer-induced bone destruction through a direct inhibition of osteoclast functions. By inhibiting bone resorption, angiostatin indirectly limits the release of bone-derived growth factors (19).

Angiostatin can act as an anti-angiogenesis factor in several aspects. Firstly, angiostatin can inhibit endothelial cell proliferation. Secondly, angiostatin can induce endothelial cell apoptosis. Thirdly, angiostatin can inhibit endothelial cell migration and invasion. Moreover, angiostatin can downregulate endothelial-dependent vasodilation (7). Angiostatin can decrease the interactions between hsp90 and eNOS. By uncoupling eNOS activity, angiostatin acts as a negative regulator of endothelial-dependent vasodilation (20).

The undesired movement of anchor teeth, and relapse of previously moved teeth, are major clinical problems in orthodontics. Dental implants are increasingly used to preserve anchorage, but these are costly and



gerektirmekte ve maliyeti arttırmaktadır. Ankraj sağlanması için farklı bir strateji ise, biyolojik inhibitörlerin osteoklastik kemik rezorpsiyonda kullanımı ile gerçekleştirilebilmektedir (1). Lokal bölge, osteoklastik aktivitenin düzenlenmesinde asıl merkezdir ve çalışmalar, farklı etkenlerin çeşitli biyomediyatörler sayesinde ortodontik diş hareketini etkileyebileceğini göstermiştir (1,2,3,21,22,23). Angiostatin güçlü bir osteoklastik aktivite karşıtı olarak bilinmektedir (19). Ancak, genel dişhekimliğindeki kullanımındaki rolü, özellikle ortodontik diş hareketi esnasında kemik şekillenmesi üzerine etkileri henüz incelenmemiştir. Bu yüzden bu çalışmada, istenilmeyen diş hareketleri ve relapstan korunma durumlarındaki klinik yararın belirlenmesi için angiostatinin deneysel olarak diş hareketleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇLER ve YÖNTEM

Çalışma yaklaşık olarak aynı yaşta, başlangıçta ağırlık ortalaması 250 gram olan 30 tane yetişkin Sprague Dawley türü erkek rattan oluşmaktadır. Ratlar, rastgele 5 eşit gruba bölünmüştür. Ratlar, 24°C de ısı kontrollü ve 12 saat aydınlık /karanlık döngüsüne sahip mekânlarda standart peletle ve suyla ad libitum beslenmiştir. Deneyler, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Deney Hayvanları Kullanım Yönergesine göre yürütülmüştür.

Ratlara yayların uygulanması esnasında, Xylazine HCL (10 mg/kg) (Alfazyne 2%, Egevet, İzmir, Türkiye) ve Ketamine HCL (90 mg/kg) (Alfamine 10%, Egevet, İzmir, Türkiye) anestezi olarak uygulanmıştır. Aynı kimyasallar daha sonra, ölümcül dozda sakrifikasyon amaçlı kullanılmıştır. İnhalasyon anestezi amacıyla çeşitli uygulamalar öncesinde isoflurane (10mg/kg) kullanılmıştır. Bu uygulamalar, angiostatin ve NaCl solusyonlarının günde iki kez 7 gün boyunca kullanımını ve çalışmanın sonundaki sakrifikasyonu içermektedir. Bütün gruplara, her iki taraftaki mandibular birinci azılar ve kesiciler arasına Ni-Ti kapalı sarmal yaylar (0.305 x 0.915 mm) uygulanıp 0.008 inç paslanmaz çelik tel yardımıyla bağlanarak 60 gramlık resiprokal ortodontik kuvvet uygulanmıştır (Şekil 1). Yayların oluşturabileceği travmaya bağlı enfeksiyon ve

require invasive surgical procedures. An alternative strategy for maintaining anchorage may be the use of biological inhibitors of osteoclastic bone resorption (1). The local microenvironment is central to the regulation of osteoclastic activity, and studies show that different factors may influence the rate of orthodontic tooth movement via various biomediators (1,2,3,21,22,23). Angiostatin has been suggested to have a strong anti-osteoclastic activity (19). However, its role in general dentistry, especially in bone remodeling during orthodontic tooth movement has not been investigated yet. Therefore, in this study, we aimed to evaluate the effects of angiostatin on bone remodeling during experimental tooth movement due to determine the clinical utility in preventing undesired tooth movement and relapse.

MATERIALS and METHOD

The study comprised 30 adult male Sprague Dawley rats of approximately same age with an average initial weight of 250 grams. The rats were randomly divided into 5 equal groups. The animals were fed on a standard pellet diet with tap water ad libitum in a temperature-controlled chamber at 24°C with a 12 hr light/dark cycle. The experiments were carried out according to the guidelines for the use of experimental animals of Gulhane Military Medical Academy.

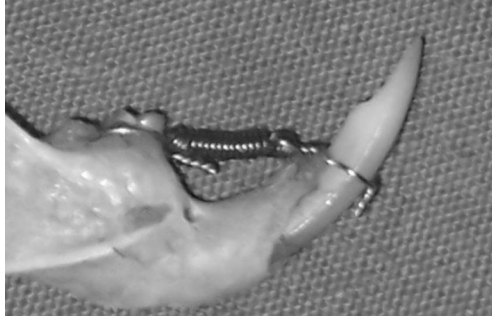
The rats were anesthetized with Xylazine HCL (10 mg/kg) (Alfazyne 2%, Egevet, Izmir, Turkey) and Ketamine HCL (90 mg/kg) (Alfamine 10%, Egevet, Izmir, Turkey) combination for the application of the springs. The same chemicals were also used for sacrifice at lethal dose. Isoflurane inhalation anesthetic (10mg/kg) was used before various procedures. These procedures included the administration of angiostatin and NaCl solutions twice a day during 7 days and the sacrifice at the end of the study. Orthodontic force was applied to all groups. Ni-Ti closed coil springs (0.305 x 0.915 mm), exerting 60 g of reciprocal force, were inserted between the mandibular first molars and incisors at each side cleat by a 0.008 inch stainless steel ligature wire (Figure 1).





Şekil I. Deneysel diş hareketi için oluşturulan çalışma modeli.

Figure I. The study model for the experimental tooth movement.



ödem oluşmaması için profilaktik olarak tek doz Colicillin (0.1 ml/kg i.m.) (100 mg/ml Ampicillin + 250.000 IU/ml Colistin Sulphate, Egevet, İzmir, Türkiye) uygulanmıştır. Uygulanan kuvvet, kuvvet ölçer ile ölçülmüş ve yaylar deney boyunca aktive edilmemiştir.

Angiostatin (A.G. Scientific Inc., San Diego, CA, ABD) 0.9 % NaCl çözeltisinde çözünmüş ve 1, 3 ve 10 µg/20 µl olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. 1. Grupta, 1 µg/20 µl angiostatin günde 2 kez olmak üzere yaklaşık 60 g ortodontik kuvvetle beraber uygulanmıştır. 2. ve 3. Gruplarda sırasıyla 3 ve 10 µg/20 µl angiostatin aynı şekilde uygulanmıştır. Son 2 grup kontrol grupları olarak kullanılmıştır. 4. Gruptaki ratlara 0.9 %NaCl solüsyonları aynı sıra ve doz ile uygulanmıştır (20µl/12 saat). Deneysel solüsyonlar karşılıklı olarak alt birinci azıların meziobukkal subperiostal bölgelerine komşu olarak enjekte edilmiştir. 5. Gruba sadece ortodontik kuvvet uygulanmıştır. Ratlar, deney boyunca gözlenmiş ve deneyin 7. gününde sakrifiye edilmişlerdir. Mandibulaları disseke edilip yumuşak dokulardan arındırılmış ve 72 saat boyunca 0.1 M fosfat ilave edilmiş 2.5 % lik glutaraldehit solüsyonunda fikse edilmiştir.

Kemik Histomorfometrisi

Histolojik kesitler Cutting-Grinding tekniği kullanılarak hazırlanmıştır (24). Mandibulalar, artan seri etanol konsantrasyonları ile dehidrate edilmiştir. Dehidrasyon sonrasında, örnekler etanol-metil metakrilat karışımına maruz bırakılarak plastik infiltrasyonu gerçekleştirilmiştir. Son polimerizasyon işlemi, Technovit 7.200 VLC (Heraeus-Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Almanya) ile tamamlanmıştır.

Prophylactic antibiotic, Colicillin (0.1 ml/kg i.m.) (100 mg/ml Ampicillin + 250.000 IU/ml Colistin Sulphate, Egevet, İzmir, Turkey) was administered for once to prevent infection and edema that could be caused by trauma during application of springs. The force was measured with a gauge, and the springs were not reactivated during the experiment.

Angiostatin (A.G. Scientific Inc., San Diego, CA, USA) was dissolved in 0.9 % NaCl and prepared at 3 different concentrations, as 1, 3 and 10 µg/20 µl. In the 1st group, 1 µg/20 µl angiostatin was administered twice a day with approximately 60 g of orthodontic force. In the 2nd and 3rd groups, 3 and 10 µg/20 µl angiostatin was administered with the same sequence and dose, respectively. The last 2 groups were used as control groups. In 4th group, 0.9 %NaCl solutions were administered to the rats together with orthodontic force with the same amount and prescription (20µl/12 hours). The experimental solutions were injected into the mesiobuccal subperiosteal area adjacent to the bilateral lower first molars. Only orthodontic force was administered in the 5th group. The rats were monitored during the experiment and they were sacrificed on the 7th day of the experiment. Mandibulae were dissected, cleaned of soft tissue and fixated for 72 hours in 0.1 M phosphate-buffered 2.5 % glutaraldehyde solution.

Bone Histomorphometry

The histological sections were prepared according to the "Cutting-Grinding Technique" (24). Mandibulae were dehydrated by using increasing ethanol concentrations. After dehydration, specimens were exposed to plastic infiltration in an increasing mixture of ethanol-methyl methacrylate. Final polymerization process was accomplished with Technovit 7.200 VLC (Heraeus-Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Germany).

Tissue blocks with 100 µm thickness were prepared with a sawband, transferred to a micro-grinding system and tissue thickness of 10-20 µm was obtained. The sections were agitated in 10 % H2O2 for 5 minutes, rinsed



Doku kesitleri, bant testere ile 100 µm kalınlığında hazırlanmış, daha sonra mikro taşlama sistemine aktarılıp 10-20 µm kalınlığında kesitler elde edilmiştir. Kesitler, 10 % H2O2 solüsyonunda 5 dakika boyunca yıkanmış, su ile durulanıp kurutulduktan sonra Toluidine mavisi ile sabitlenmiştir. Bütün kesitler ışık mikroskobu ile incelenmiş ve normalden 4 kat büyütülmüş görüntüler bilgisayar ortamına WinTAS (Trabecular Analyze System, V. 1.2.9) yazılımı ile incelenmek üzere taşınmıştır.

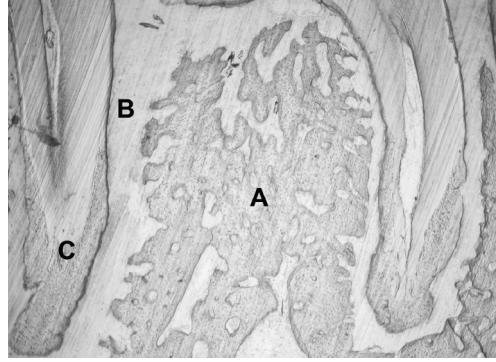
Birinci azıların interradikuler (servikal, orta, apikal) alanlarında üç farklı ölçüm yapılmıştır. Standardizasyon için, birinci azıların mezial ve distal kökleri arasındaki bölge interradikuler bölge olarak belirlenmiştir. Servikal, orta ve apikal interradikuler alanların tanımlanması için, bifurkasyon ve kök ucu arasındaki bölge üç eşit alana bölünmüştür. Ölçümler, iki kez tekrarlanarak yapılmıştır ve ortalama değer alınmıştır. Bütün ölçümler ve hesaplamalar, Amerikan Kemik ve Mineral Araştırmaları Derneği isimlendirme kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir (25). Kemik histomorfometrisi için geliştirileb bilgisayar yazılımı ile, trabeküler kemik hacmi (BV/TV), trabeküler kemik sayısı (Tr.N) ve trabeküler ayrıklık (Tr.Sep) ölçülmüştür.

İstatiksel Yöntem

İstatiksel ölçümler, SPSS 10.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, Il., ABD) yazılım paketiyle gerçekleştirilmiştir. Tanımlayıcı istatistik değerleri, ortalama ± standart sapma ile gösterilmiştir (Tablo 1). Bütün gruplar arasındaki farklar, Kruskal-Wallis testi yardımıyla incelenmiş ve angiostatin (Grup 1, 2 ve 3) ve kontrol grupları (Grup 4 ve 5) arasındaki farklar Mann-Whitney U testi yardımıyla ölçülmüştür (Tablo 2-4). 0.05 ten az ya da eşit P değerleri istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (26).

BULGULAR

BV/TV, Tr.N ve Tr.Sep arasındaki farklar, Kruskal-Wallis testine göre istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Sırasıyla $P < .01$, $P < .05$, ve $P < .001$) (Tablo 2).



Şekil II. Angiostatin Group 1'in histolojik kesiti (1 µg); A) trabeküler kemik, B) kemik rezorbsiyon alanı, C) birinci molar dişin kökü.

Figure II. Histological section of angiostatin Group 1 (1 µg); A) trabecular bone, B) bone resorption area, C) root of the first molar.

in water, wiped dry and stained with Toluidine blue. All sections were evaluated using a light microscope and x4 images were transferred to a computer with WinTAS (Trabecular Analyze System, V. 1.2.9) program (Figure 2-5).

Three different measurements in the interradicular area of the first molars (cervical, middle and apical) were performed. For the standardization, the interradicular area of the first molar was defined as the area between the mesial and distal roots of the molar. In order to define the cervical, middle and apical interradicular area, the area between the bifurcation and root apex was divided into three equal areas. Measurements were repeated twice and mean values were calculated. All measurements and calculations were done following the American Society for Bone and Mineral Research nomenclature and guidelines (25). Trabecular bone volume (BV/TV), trabecular bone number (Tr.N), and trabecular separation (Tr.Sep) were measured using the software package developed for bone histomorphometry.

Statistical Method

The statistics were performed by SPSS 10.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, Il., USA) statistical package. Descriptive statistics were shown as mean ± standard deviation (Table 1). The differences between all groups were investigated by Kruskal-Wallis test and the differences between angiostatin (Group 1,2 and 3) and control groups (Group 4 and 5) were determined with Mann-Whitney U test (Table 2-4). P values less than or equal to 0.05 were evaluated as statistically significant (26).



Şekil III. Angiostatin Group 2'nin histolojik kesiti (3 µg); A) trabeküler kemik, B) kemik rezorbsiyon alanı, C) birinci molar dişin kökü.

Figure III. Histological section of angiostatin Group 2 (3 µg); A) trabecular bone, B) bone resorption area, C) root of the first molar.



Gruplar Arası Farklılıkların Karşılaştırılması

Her bir gruptaki angiostatinin diş hareketi sırasında kemik şekillenmesi üzerine etkin dozuna karar vermek için, doza bağımlı grup karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir. Angiostatin gruplarının karşılaştırılmasında (Grup 1, 2 ve 3 arasında), Grup 3 ve 1 arasındaki BV/TV deki anlamlı artış dışında bütün parametrelerde istatistiksel olarak anlamsız değişiklikler gözlenmiştir. Ayrıca, kontrol grupları arasındaki değişimler (Grup 4 ve 5) istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo 3).

Angiostatinin kemik şekillenmesi üzerine etkilerini incelemek için, angiostatin grupları (Grup 1,2 ve 3) ve kontrol grupları (Grup 4 ve 5) arasında karşılaştırma yapılmıştır. Grup 1 ile Grup 4 ve 5 karşılaştırıldığında, sadece Tr.Sep'daki artış anlamlı bulunmuştur (Sırasıyla $P < .05$ ve $P < .001$). Grup 2, Grup 4 ile karşılaştırıldığında, BV/TV artışı ($P < .05$) ve Tr.Sep azalması ($P < .05$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ek olarak, Grup 2, Grup 5 ile karşılaştırıldığında, Tr.Sep azalması da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < .001$). Grup 3 ile Grup 4

RESULTS

The results of the Kruskal-Wallis test showed significant differences in BV/TV, Tr.N and Tr.Sep ($P < .01$, $P < .05$, and $P < .001$, respectively) (Table 2).

Comparison of Between-Group Differences

In order to determine the effective dose of angiostatin in bone remodeling during orthodontic tooth movement in each group, the dose dependent group comparisons have been done. In the comparison of angiostatin groups (between Group 1, 2 and 3), statistically insignificant alterations were observed in all parameters in angiostatin groups; except the increase in BV/TV was significant in the comparison of Group 3 with Group 1. The differences between control groups (between Group 4 and 5) were also statistically not significant (Table 3).

In order to determine the effect of angiostatin in bone remodeling, the comparisons have been done between angiostatin groups (Group 1, 2 and 3) and control groups (Group 4 and 5). In the comparison of Group 1 with Group 4 and 5, only the decrease in Tr.Sep was significant ($P < .05$ and $P < .001$, respectively). The increase in BV/TV ($P < .05$) and the decrease in Tr.Sep ($P < .05$) were significant in the comparison of Group 2 against Group 4. In addition, the decrease in Tr.Sep was also statistically significant in Group 2, compared with Group 5 ($P < .001$). Increase in BV/TV and Tr.N ($P < .001$ and $P < .01$, respectively) and decrease in Tr.Sep ($P < .01$) were significant in the comparison of Group 3 with

Tablo I. Angiostatin ve kontrol gruplarında BV/TV, Tr.N ve Tr.Sep parametrelerinin tanımlayıcı istatistik değerleri.

Table I. Descriptive statistics of BV/TV, Tr.N and Tr.Sep for angiostatin and control.

	BV/TV		Tr.N		Tr.Sep	
	Ortalama Mean	SS SD	Ortalama Mean	SS SD	Ortalama Mean	SS SD
Angiostatin 1 mg (Grup 1)	23,780	7,380	25,630	8,768	40,922	12,098
Angiostatin 3 mg (Grup 2)	28,950	14,884	27,690	11,210	38,267	17,735
Angiostatin 10 mg (Grup 3)	29,872	7,674	28,135	6,779	32,594	13,996
Kuvvet+ Saline (Grup 4) Force+ Saline (Group 4)	17,165	8,654	19,494	5,887	54,300	13,937
Kuvvet (Grup 5) Force (Group 5)	18,225	12,783	19,168	8,661	64,800	12,994

BV/TV: Trabeküler Kemik Hacmi, Tr.N: Trabeküler Kemik Sayısı, Tr.Sp:Trabeküler Ayrıklık, SS: Standart sapma.

BV/TV: Trabecular Bone Volume, Tr.N: Trabecular Bone Number, Tr.Sp: Trabecular Separation, SD: Standard deviation



	χ^2	P	Anlamlılık/ Significance
BV/TV	14,531	0,006	**
Tr.N	10,055	0,040	*
Tr.Sep	23,902	<0,001	***

BV/TV: Trabeküler Kemik Hacmi, Tr.N: Trabeküler Kemik Sayısı, Tr.Sp: Trabeküler Ayrıklık /
BV/TV: Trabecular Bone Volume, Tr.N: Trabecular Bone Number, Tr.Sp: Trabecular Separation
* P < .05, ** P < .01, *** P < .001

Tablo II. Tüm gruplar için
Kruskal-Wallis testi.

Table II. Kruskal-Wallis test of
all groups.

karşılaştırıldığında, BV/TV ve Tr.N artışı (Sırasıyla P < .001 ve P < .01) ve Tr.Sep azalması (P < .01) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grup 3 ile Grup 5 kıyaslandığında, BV/TV ve Tr.N artışı ve Tr.Sep azalması da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Sırasıyla P < .05, P < .05, ve P < .001) (Tablo 3).

TARTIŞMA

Lokal çevre, osteoklastik aktivitenin düzenlenme merkezidir. Pek çok çeşitli faktörler, birçok biyomediyatörler aracılığı ile ortodontik diş hareketini etkileyebilir (1,2,3,21,22,23,27,28). Bu çalışmada, angiostatinin diş hareketi sırasında kemik şekillenmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Deneysel diş hareketleri, güncel çalışmalara uygun şekilde, kapalı sarmal yayların her bir tarafta mandibular birinci büyük azılar ile keserler arasına bağlanması ile gerçekleştirilmiştir (23,27,28).

Ankraj alınan dişin hareket etmesi, ortodontide tedavi zamanının uzamasına ve/veya optimal klinik sonucun elde edilmesine engel olan, istenilmeyen bir komplikasyondur (1). Bu çalışmada, angiostatinin ratlarda, hareket eden molar dişlerin alveolar kemiğindeki osteoklast aktivitesini azaltmadaki göreceli etkilerini inceledik. Angiostatinin, güçlü bir osteoklastik aktivite önleyici olduğu ileri sürülmüştür (19). Bizim çalışmamızda, uygulanan en yüksek doz angiostatin grubu ile kontrol grupları karşılaştırıldığında gözlenen yaklaşık 17% BV/TV artışı, 14% Tr.N artışı ve 16% Tr.Sep azalması bulguları, angiostatinin güçlü bir osteoklast miktarı ve aktivite inhibitörü olduğu gösterilmiştir.

Kemik metastazının deneysel olarak incelendiği model üzerinde, MDA-MB-

Group 4. When Group 3 and Group 5 were compared, the increase in BV/TV and Tr.N, and the decrease in Tr.Sep were also statistically significant (P < .05, P < .05, and P < .001, respectively) (Table 3).

DISCUSSION

Local microenvironment is central to the regulation of osteoclastic activity. A variety of factors might influence the rate of orthodontic tooth movement via various biomediators (1,2,3,21,22,23,27,28). The present study evaluated the effects of angiostatin on bone remodeling during orthodontic tooth movement. Experimental tooth movement was performed according to the recent studies, with a closed coil spring ligated to the mandibular first molars and incisors at each side (23,27,28).

The movement of anchor teeth is an undesired complication in orthodontics, which may result in prolonged treatment time and/or a less than optimal clinical outcome (1). In the present study we evaluated the relative efficacy of angiostatin in reducing the osteoclast activity at the alveolar bone of the moved molar tooth in rats. Angiostatin has been suggested to have a strong antiosteoclastic activity (19). Our results demonstrate that angiostatin is a powerful inhibitor of osteoclast recruitment and activity, with an increase in BV/TV, Tr.N and a reduction in Tr.Sep of approximately 17%, 14% and 16%, respectively when compared the highest dose angiostatin and control groups.

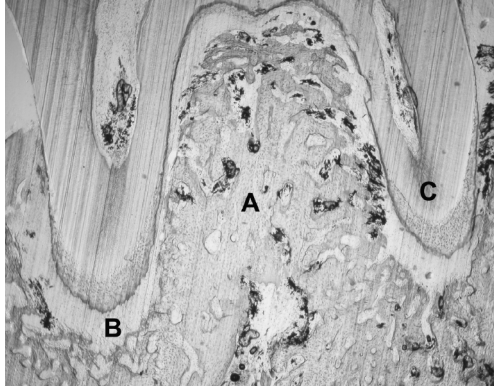
In an experimental model of bone metastasis in which MDA-MB-231/B02 breast cancer cells were engineered to produce at the bone metastatic site, a specific angiogenesis inhibitor, angiostatin inhibited





Şekil IV. Angiostatin Group 1'in histolojik kesiti (1 µg); A) trabeküler kemik, B) kemik rezorbsiyon alanı, C) birinci molar dişin kökü.

Figure IV. Histological section of angiostatin Group 1 (1 µg); A) trabecular bone, B) bone resorption area, C) root of the first molar.



231/B02 göğüs kanseri hücreleri kemik metastazı bölgesinde üretilmiştir, spesifik bir angiogenez inhibitörü olan angiostatin, doğrudan osteoklast fonksiyonlarını engelleyerek kanser kaynaklı kemik yıkımını engellemiştir (19). Histomorfometrik ölçüm, angiostatinin kemik yüzeyindeki osteoklast sayısını milimetre başına (N.Oc/BS) 77 % oranında azalttığını göstermiştir. Ayrıca, saflaştırılmış angiostatin, mononükleer hücrelerin multinükleer hücrelere farklılaşmasını ve olgun osteoklastlara farklılaşmasını engellemiştir (19). Çalışmamızın yöntemi ve uygulama şekli, yukarıda bahsedilen çalışmadan farklı olmasına rağmen, bulgularımız bahsi geçen çalışmayla uygunluk göstermektedir.

Deneyel diş hareketlerinde angiostatinin lokal uygulaması yönündeki çalışmaların olmaması nedeniyle, çalışmamızda doz ayarlaması, diğer sistemik ve lokal uygulamalar ile yapılan çalışmalara göreyapılmıştır. Literatür çalışması sonucunda, hücre kültürü uygulamaları ve sistemik etki elde etmek için intravenöz (i.v.), intramuskuler (i.m) ve subkutanöz (s.c) uygulamalara rastlanmıştır (29-32). Klinik bir çalışmada, farmakokinetik (FK) ve toksite özellikleri için 3 farklı doz seviyesinde insan angiostatinini günde iki kez s.c enjekte edilmiştir (29). Denekler 7.5, 15, ve 30 mg/ml/gün dozları, 7 günlük bekleme periyodunu takiben 28 gün üst üste günde 2 kez s.c olmak üzere almışlardır. Uzun süreli ve günde 2 kez olmak üzere uygulanan angiostatin tedavisi, seçilen dozlarda denekler tarafından iyi tolere edilmiştir. Ratlarda, kısa süreli FK etkileri ve elastaz kaynaklı angiostatinin [angiostatin (k1-3)] tüm vücut dağılımı, radyoaktif proteinin i.v olarak enjeksiyonu sonrasında belirlenmiştir (30). FK analizlere dayanarak, angiostatinin

cancer-induced bone destruction through a direct inhibition of osteoclast functions (19). Histomorphometric quantification revealed that angiostatin expression caused a 77 % decrease of the osteoclast number per millimeter of bone surface (N.Oc/BS). Furthermore, purified angiostatin inhibited the differentiation of mononuclear cells into multinuclear cells and mature osteoclasts (19). Although the technique and type of administration of the current study was different from the above study, our findings are in agreement with the result of the mentioned study.

The absence of investigations for local administration of angiostatin in experimental tooth movement, lead us to take advantage from other studies with systemic/local applications to adjust the doses for our experiment. In literature review, intravenous (i.v.), intramuscular (i.m.) and subcutaneous (s.c.) administrations to obtain systemic effects and cell culture applications were found (29-32). In a clinical study to evaluate the pharmacokinetics (PK) and toxicity of three dose levels of recombinant human angiostatin was administered twice daily by s.c. injection (29). Subjects received 7.5, 15, or 30 mg/ml/day divided in two s.c. injections for 28 consecutive days followed by a 7-day washout period. Long-term twice-daily s.c. treatment with angiostatin was well tolerated and feasible at the selected doses. Short-term PK and whole body distribution of elastase derived angiostatin [angiostatin (k1-3)] in rats after i.v. injection of radiolabelled protein were determined (30). Based on the PK analyses, it was calculated that administration of angiostatin (k1-3) to rats in a bolus injection of 22 µg/kg followed by a continuous infusion of 15µg/kg/hr would permit blood concentrations of angiostatin (k1-3) to be 0.3 µg/ml. To maintain blood levels between 0.1 and 0.5 µg/ml, 26.6 µg/kg angiostatin (k1-3) should be dosed every 2 hr. Continuous administration significantly improves both inhibition of angiogenesis and tumor growth as compared with bolus injections of angiostatin (31). Findings indicate that continuous administration to be superior to the conventional twice-daily bolus injections. Systemic administration of



Gruplar Groups	Z	p	Anlamlılık / Significance
BV/TV	-1,376	0,171	NS
1-2 Tr.N	-0,528	0,616	NS
Tr.Sep	-0,660	0,515	NS
BV/TV	-2,111	0,035	*
1-3 Tr.N	-0,716	0,491	NS
Tr.Sep	-1,771	0,080	NS
BV/TV	-0,415	0,696	NS
2-3 Tr.N	-0,415	0,696	NS
Tr.Sep	-0,754	0,468	NS
BV/TV	-0,114	0,912	NS
4-5 Tr.N	-0,076	0,971	NS
Tr.Sep	-1,740	0,089	NS
BV/TV	-1,898	0,060	NS
1-4 Tr.N	-1,634	0,109	NS
Tr.Sep	-2,214	0,027	*
BV/TV	-1,423	0,165	NS
1-5 Tr.N	-1,687	0,097	NS
Tr.Sep	-3,373	<0,001	***
BV/TV	-2,214	0,027	*
2-4 Tr.N	-1,687	0,097	NS
Tr.Sep	-2,108	0,036	*
BV/TV	-1,950	0,053	NS
2-5 Tr.N	-1,687	0,097	NS
Tr.Sep	-3,320	<0,001	***
BV/TV	-3,110	<0,001	***
3-4 Tr.N	-2,793	0,004	**
Tr.Sep	-3,004	0,002	**
BV/TV	-2,425	0,014	*
3-5 Tr.N	-2,425	0,014	*
Tr.Sep	-3,742	<0,001	***

BV/TV: Trabecular Bone Volume, Tr.N: Trabecular Bone Number, Tr.Sp: Trabecular Separation. /
BV/TV: Trabeküler Kemik Hacmi, Tr.N: Trabeküler Kemik Sayısı, Tr.Sp: Trabeküler Ayrıklık.
* P < .05, NS: Not Significant

Tablo III. BV/TV, Tr.N ve Tr.Sep parametrelerinde gruplararası farkların karşılaştırılması.

Table III. Comparison of between-group differences for BV/TV, Tr.N and Tr.Sep.

(k1-3) ratlara 15µg/kg/saat devamlı infüzyonunu takiben 22µg/kg bolus enjeksiyonu uygulanması, anjiyostatin (k1-3) konsantrasyonunun 0.3 µg/ml olmasına izin vermektedir. Kan konsantrasyonunun 0.1 ve

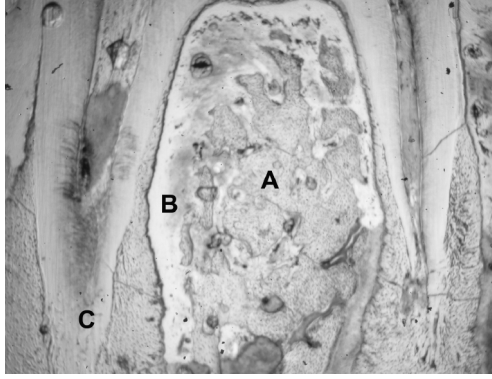
human angiostatin potently inhibits the growth of three human and three murine primary carcinomas in mice (32). An almost complete inhibition of tumor growth could be observed without detectable toxicity or





Şekil V. Kontrol grubunun histolojik kesiti; A) trabeküler kemik, B) kemik rezorpsiyon alanı, C) birinci molar dişin kökü.

Figure V. Histological section of control group; A) trabecular bone, B) bone resorption area, C) root of the first molar.



0.5 µg/ml sağlanması için, 26.6 µg/kg angiostatin (k1-3) her 2 saatte bir uygulanmalıdır. Angiostatinin devamlı olarak uygulanması, bolus enjeksiyon ile kıyaslandığında angiogenezi belirgin şekilde durdurmakta ve tümör büyümesini engellemektedir (31). Bulgular, devamlı uygulamanın geleneksel uygulanan günde 2 kez bolus enjeksiyonuna göre daha üstün olduğunu göstermektedir. İnsan angiostatininin farelerde sistemik uygulanması, kuvvetli bir şekilde üç insan ve üç sıçan kaynaklı karsinomunun büyümesini durdurmuştur (32). Günlük 100 mg/kg dozun ard arda 60 gün boyunca uygulanması, tümör büyümesinin toksite ya da direnç gözlenmeden nerdeyse tamamen engellenmesine neden olmuştur (32). Daha önceki çalışmaların ışığında, sık ve devamlı angiostatin uygulamaları sistemik ve lokal etki amacıyla kullanılmaktadır; angiostatin için doz ayarlaması seyrek aralıklarla uygulanan sistemik dozların altındadır. Buna ek olarak, doza bağımlı angiostatin etkilerinin gözlenmesi için biz, angiogenik inhibitörü üç farklı dozda uyguladık.

Otero ve ark. (33) ratlarda deneysel diş hareketlerini araştırmış ve 36. saatin sonunda hareketin sonlandığını tespit etmişlerdir. Otero ve ark (33) a göre, hyalin dejenerasyonu 48. saatte oluşmuş ve rezorpsiyon alanları en yüksek seviyelere ulaşmıştır. 60. saatte, osteoklast miktarları en yüksek değerlere ulaşmış ve 72. saatte rezorpsiyon alanları azalmaya başlamıştır. 84. ve 108. saatlerde, rezorpsiyon alanları ve osteoklast sayılarında önemsiz azalmalar gözlenmiştir (33). Bu araştırmaya göre, bizim çalışmamızın, hareket eden dişin etrafında sabit bir bölgesel çevre sağlanması için 108 saatten uzun sürmesi kararlaştırılmıştır. Ratlar üzerinde deneysel diş hareketinin incelendiği

resistance at a daily dose of 100 mg/kg body weight for 60 consecutive days (32). In the light of previous studies, the continuous and frequent administrations of angiostatin are used for systemic effects and with the aim for local administration; the dose adjustment for angiostatin was below the systemic doses with rare periods. Additionally, we intended to observe the dose dependent effects of angiostatin, therefore we administered three different doses of the angiogenic inhibitor.

Otero et al. (33) investigated the experimental tooth movement in rats and they determined the movement ended at the 36th hour. According to Otero et al. (33), hyaline degeneration occurred at 48th hour and the resorption areas reached their maximum levels. At 60th hour, the amount of osteoclasts reached their maximum values and at 72nd hour the resorption areas began to decrease. Between 84th and 108th hours, insignificant reduction occurred related to the resorption areas and osteoclast numbers (33). According to that study, it was determined that our study had to continue more than 108 hours in order to obtain a stable local environment around the moved teeth. Based on previous studies related to experimental tooth movement in rats (23,27,28) it was chosen an experimental period of 7 days.

The outcomes of the WinTAS analysis revealed that in the Group 3, the increases in BV/TV were 74 % and 63.9 % when compared with the control groups 4 and 5 respectively. Similarly, in the comparison of Group 2 with Group 4 the increase in BV/TV was 68.7 %. These findings showed the possible mediator effect of angiostatin over osteoclasts and/or osteoblasts that lead to an increase in bone volume. In the comparison of the parameter Tr.N; the increases were 44.3 % and 46.8 % for the Group 3 when compared with the control groups 4 and 5, respectively. These findings supported the increases in BV/TV, and strengthen the evidence of an increase in bone volume. When the Tr.Sep values of angiostatin groups were compared with control groups; the decreases in Tr.Sep were 24.6 %, 29.5 %, and 40 % against the control group 4 and 36.9 %, 41 %, and 49.7 % against the control group



benzer çalışmalara dayanarak deney süresi 7 gün olarak seçilmiştir (23,27,28).

WinTAS analizi sonuçları, Grup 3 ile Grup 4 ve 5 karşılaştırıldığında, Grup 3'te BV/TV artışının sırasıyla 74 % ve 63.9 % olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde Grup 2 ile Grup 4 karşılaştırıldığında, BV/TV artışı 68.7 % dir. Bu sonuçlar angiostatinin, osteoklastlar ve/veya osteoblastlar üzerine olası medyatör etkisini ve onun neden olduğu kemik hacmi artışını göstermektedir. Tr.N parametrelerinin kıyaslaması sonucu; Grup 3 ile kontrol grupları olan Grup 4 ve 5 karşılaştırıldığında, artışlar sırasıyla 44.3 % and 46.8 % olmuştur. Bu bulgular, BV/TV artışını destekler niteliktedir ve kemik hacmi artışı görüşünü kuvvetlendirmektedir. Angiostatin gruplarının Tr.Sep değerleri kontrol gruplarıyla kıyaslandığında; sırasıyla Grup 4'e göre Tr.sep azalması Grup 1'de 24.6 %, Grup 2'de 29.5 % ve Grup 3'te 40 % iken, Grup 5 e göre karşılaştırıldığında Grup 1'de 36.9 %, Grup 2'de 41 % ve Grup 3'te 49.7 % olarak bulunmuştur. Angiostatin gruplarında BV/TV ve Tr.N artışları ve Tr.Sep azalması, angiostatinin kemik rezorbsiyonuna etkisini destekler niteliktedir. Bu etki, osteoblastların aktivasyonu ve/veya osteoklastların inhibisyonu yoluyla olabilmektedir. Bu bulgular, angiostatinin osteoklastik hücreler üzerine durdurucu etkisini gözlemlemiş olan Peyruchaud ve ark. (19) ile benzerlik göstermektedir. Grup 1 kıyaslandığında Grup 3'te BV/TV deki 25%'lik artış ve kontrol gruplarıyla kıyaslandığında Grup 3'teki bütün parametrelerdeki değişiklikler (BV/TV, Tr.N and Tr.Sep) istatikselsel olarak anlamlı bulunmuş; tüm bunlar angiostatinin doza bağlı etkisini ortaya koymuştur.

NOS (nitric oxide synthase) ile angiostatin arasında bir ilişki vardır (6,34). Özellikle NOS inhibisyonu, angiostatin üretiminin artmasına neden olmaktadır. NO üretiminin inhibisyonu, MMP-2 ve MMP-9 aktivitesinin artışına neden olup angiostatin üretimini sağlamaktadır (34). Ayrıca, angiostatin eNOS ile heatshockprotein90 (hsp90) etkileşimini değiştirip vazodilatasyonu bozmaktadır (20). Angiostatin varlığında endotelium uyarılırsa, daha az miktarda hsp90 eNOS ile etkileşime girer. Böylece, eNOS'un -NO 'a ve üretiminden, -NO den üretime yönlendirir. Bu bilgiler bizlere, angiostatinin

5, respectively. Increases in BV/TV and Tr.N, and decreases Tr.Sep in the angiostatin groups reinforced the argument that angiostatin affects the rate of bone resorption. This could be through the inhibition of osteoclasts and/or activation of osteoblasts. These findings are in accordance with the results of Peyruchaud et al. (19) who had demonstrated the inhibitory effect of angiostatin on osteoclastic cells. 25% increase in BV/TV in group 3 when compared with group 1, and the statistically significant alterations in all parameters (BV/TV, Tr.N and Tr.Sep) in group 3 against the control groups revealed a dose dependent effect of angiostatin.

There is an association between NOS (nitric oxide synthase) and angiostatin (6,34). Specifically, NOS inhibition leads to an increase in production of angiostatin. Inhibition of NO production increases activities of MMP-2 and MMP-9, leading to the generation of angiostatin (34). Moreover, angiostatin alters heatshockprotein90 (hsp90) interactions with eNOS to impair vasodilatation (20). Whenever the endothelium is stimulated in the presence of angiostatin, less hsp90 associates with eNOS. This shifts -NO and generation by eNOS from -NO towards . These data indicate that angiostatin acts as a negative regulator of endothelial-dependent vasodilation by uncoupling eNOS activity.

Binding of angiostatin to the α - or β -subunits of ATP synthase inhibits the enzyme by blocking conformational changes of the enzyme complex required for conversion of ADP to ATP (ATP synthesis or hydrolysis) (35). Angiostatin's antiproliferative effect on endothelial cells could be inhibited by as much as 90% in the presence of anti- α -subunit ATP synthase antibody. Binding of angiostatin to the α/β -subunits of ATP synthase on the cell surface may mediate its antiangiogenic effects and down-regulation of endothelial cell proliferation and migration (36). The molecular mechanisms through which angiostatin inhibits osteoclast functions are currently unknown. In endothelial cells, angiostatin binds to integrin $\alpha v \beta 3$, angiostatin, and cell-surface ATP synthase (35,37,38). Osteoclasts also express integrin $\alpha v \beta 3$, and integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists that inhibit bone resorption in vivo (39,40)..





endotelial kaynaklı vazodilatasyona eNOS aktivitesini ayırıştırarak etki eden negatif bir düzenleyici olduğunu göstermektedir.

Angiostatin, ATP sentezindeki α ve β alt ünitelerine bağlanması sonucu ADP'nin ATP'ye değişimi (ATP sentezi ya da hidroliz) için gerekli olan enzim kompleksini engeller (35). Angiostatinin endotelial hücreler üzerindeki antiproliferatif etkisi, ATP sentezindeki anti- α alt ünitelerinin varlığında % 90 oranında inhibe olur. Angiostatinin hücre yüzeyindeki α/β alt ünitelerine bağlanması, antianjiogenik etkilerine aracı olur ve endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonunun düzenini bozar (36). Angiostatinin osteoklast fonksiyonlarını inhibe etmesinin moleküler mekanizması hala bilinmemektedir. Endotelial hücrelerde, angiostatin integrin $\alpha v \beta 3$, angiomotin ve hücre düzeyindeki ATP sentezine bağlanır (35,37,38). Osteoklastlar in vivo kemik rezorbsiyonunu engelleyen integrin $\alpha v \beta 3$ ve integrin $\alpha v \beta 3$ antagonistlerinin ortaya çıkmasına da neden olur (39,40). Bu yüzden angiostatinin, osteoklastlar tarafından ortaya çıkartılan integrin $\alpha v \beta 3$ ' e bağlanarak kemik rezorbsiyonunu inhibe etmesi ihtimali mevcuttur. Diğer taraftan, ATP sentezi inhibisyonu kemikteki osteoklastik aktivitenin inhibisyonuna neden olan bir diğer yol olabilir. Angiostatin, ATP kaynaklı hücre içi olayları inhibe ederek oldukça etkili şekilde kemik rezorbsiyonunu durdurup kemik yoğunluğunu arttırmış olabilir. Bunlara ek olarak, angiostatin, NOS ile arasındaki negatif feedback mekanizması ile osteoklastik aktivite azalmasına ve kemik şekillenmesine neden olabilir. Yapılan araştırmalar, angiostatin ile NOS arasındaki ilişkiyi ortaya koymakta ve kemik metabolizmasında angiostatinin NOS inhibisyonunda rol alan bir ajan gibi davrandığını destekler niteliktedir (20,34).

SONUÇ

Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla angiostatinin ortodontik diş hareketi sırasında kemik metabolizmasında düzenleyici olduğunu gösteren ilk çalışmadır. WinTAS analizi sonuçları, en yüksek dozda angiostatin uygulanan grup ile kontrol grupları arasındaki BV/TV ve Tr.N artışının ve Tr.Sep azalmasının anlamlı olduğunu ortaya

Therefore, it is possible that angiostatin inhibits bone resorption by binding to integrin $\alpha v \beta 3$ expressed by osteoclasts. On the other hand, the inhibition of ATP synthase could be another way for the inhibition of osteoclastic activity in bone. Angiostatin may inhibit ATP-dependent intracellular events, and may be highly effective to inhibit bone resorption and to increase bone mineral density. In addition, an existing negative feedback between NOS activity and angiostatin would result in inhibition of osteoclastic activity and bone remodeling. Previous investigations support the evidence of a relation between NO and angiostatin and that angiostatin could act as an agent in bone metabolism via the inhibition of NOS (20,34).

CONCLUSION

This study is, to the best of our knowledge, the first one to demonstrate that angiostatin is a regulator of bone metabolism during orthodontic tooth movement. The outcomes of the WinTAS analysis revealed that, in the comparison of highest dose angiostatin group with the control groups, the increases in BV/TV, Tr.N and decrease in Tr.Sep were significant. In the present study, it has been concluded that, the local administration of angiostatin following orthodontic tooth movement, may depress the osteoclastic activity in alveolar bone. It has an anti-osteoclastic activity in orthodontic tooth movement and that further investigations with higher doses and different dose sequences were required to determine the specific effects of angiostatin on bone remodeling.

Using this model we can conclude that the local administration of angiostatin is effective in inhibiting tooth movement, suggesting potential utility for maintaining anchorage, reducing relapse potential and shortening the retention period in clinical orthodontics. Besides its well-known anti-angiogenic activity, angiostatin must be considered to be an effective mediator in bone remodeling, thus broaden its potential clinical use in general medicine.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Gulhane Military Medical Academy, Department of Research and Development and the



koymuştur. Bu çalışmada, ortodontik diş hareketini takiben angiostatinin lokal uygulanması, alveoler kemikteki osteoklastik aktiviteyi deprese ettiği sonucuna varılmıştır. Angiostatinin, ortodontik diş hareketi sırasında antiosteoklastik aktivitesi mevcuttur ve daha yüksek dozlarda ve farklı doz aralıklarının uygulandığı çalışmalar ile angiostatinin kemik şekillenmesi üzerinde etkileri incelenmelidir.

Bu çalışma ile, angiostatinin lokal olarak uygulanmasının klinik ortodontide diş hareketini durdurmada etkili olduğu, ankraj sağlanmada potansiyel bir yöntem olarak önerildiği ve relaps potansiyelini azaltıp retansiyon periyodunu kısalttığı sonuçlarına varılabilmektedir. Ayrıca, angiostatinin iyi bilinen antiangiogenik etkisi nedeniyle angiostatinin kemik şekillenmesinde etkin bir medyatör olarak değerlendirilmesi ve potansiyel klinik kullanımları yönünden genel tıp alanında değerlendirilmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Araştırma ve Geliştirme Merkezi tarafından desteklenmiş ve çalışmanın histomorfometrik incelemesi Çukurova Üniversitesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

histomorphometric evaluation of the research was conducted at Çukurova University Laboratories.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Keles A, Grunes B, DiFuria C, Gagari E, Srinivasan V, Darendeliler MA, Muller R, Kent R Jr, Stashenko P. Inhibition of tooth movement by osteoprotegerin vs. pamidronate under conditions of constant orthodontic force. *Eur J Oral Sci* 2007;115:131-6.
2. Liu L, Igarashi K, Haruyama N, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Effects of local administration of clodronate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *Eur J Orthod* 2004;26:469-73.
3. Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2004;83:920-5.
4. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994;79:315-28.
5. Cao Y, Xue L. Angiostatin. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(1):83-93.
6. Takahashi S, Shinya T, Sugiyama A. Angiostatin inhibition of vascular endothelial growth factor-stimulated nitric oxide production in endothelial cells. *J Pharmacol Sci*. 2010;112(4):432-7.
7. Li QF, Rabie AB. A new approach to control condylar growth by regulating angiogenesis. *Arch Oral Biol*. 2007;52(11):1009-17.
8. Lee TY, Muschal S, Pravda EA, Folkman J, Abdollahi A, Javaherian K. Angiostatin regulates the expression of antiangiogenic and proapoptotic pathways via targeted inhibition of mitochondrial proteins. *Blood*. 2009;27:114(9):1987-98.
9. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD. Matrix metallo-proteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol*. 1998;161:6845-52.
10. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem*. 1999;274:29568-71.
11. Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gardner HA. Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor





- vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:2202-7.
12. Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:5579-83.
 13. Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:2811-6.
 14. Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276:39562-8.
 15. Body JJ. Metastatic bone disease: clinical and therapeutic aspects. *Bone*. 1992;13:S57-62.
 16. Guise TA, Mundy GR. Cancer and bone. *Endocr Rev*. 1998;19:18-54.
 17. Pluijm G, Lowik C, Papapoulos S. Tumour progression and angiogenesis in bone metastasis from breast cancer: new approaches to an old problem. *Cancer Treat Rev*. 2000;26:11-27.
 18. Sasaki A, Alcalde RE, Nishiyama A, Lim DD, Mese H, Akedo H, Matsumura T. Angiogenesis inhibitor TNP-470 inhibits human breast cancer osteolytic bone metastasis in nude mice through the reduction of bone resorption. *Cancer Res*. 1998;58:462-7.
 19. Peyruchaud O, Serre CM, NicAmhlaoi bh R, Fournier P, Clezardin P. Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice through a direct anti-osteoclastic activity. *J Biol Chem*. 2003;278:45826-32.
 20. Koshida R, Ou J, Matsunaga T, Chilian WM, Oldham KT, Ackerman AW, Pritchard KA Jr. Angiostatin: a negative regulator of endothelial-dependent vasodilation. *Circulation*. 2003;107:803-6.
 21. Gurton AU, Akin E, Sagdic D, Olmez H. Effects of PGI2 and TxA2 analogs and inhibitors in orthodontic tooth movement. *Angle Orthod*. 2004;74:526-32.
 22. Akin E, Gurton AU, Olmez H. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004;126:608-614.
 23. Mermut S, Bengi AO, Akin E, Kurkcu M, Karacay S. Effects of Interferon-Gamma on Bone Remodeling during Experimental Tooth Movement. *Angle Orthod*. 2007;77:135-141.
 24. Donath K. Preparation of Histologic Sections. Norderstedt, Germany: EXAKT-Kulzer-Publication; 1995.
 25. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Mine Res* 1987;2:595-610.
 26. Zar JH. Biostatistical analysis. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall Inc.; 1996.
 27. Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and alpha(v)beta(3) integrin in rats. *Eur J Orthod* 2010;32:131-9.
 28. Gokce S, Bengi AO, Akin E, Karacay S, Sagdic D, Kurkcu M, Gokce HS. Effects of hyperbaric oxygen during experimental tooth movement. *Angle Orthod*. 2008;78(2):304-8.
 29. Beerepoot LV, Witteveen EO, Groenewegen G, Fogler WE, Sim BK, Sidor C, Zonnenberg BA, Schramel F, Gebbink MF, Voest EE. Recombinant human angiostatin by twice-daily subcutaneous injection in advanced cancer: a pharmacokinetic and long-term safety study. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4025-33.
 30. Molema G, van Veen-Hof I, van Loenen-Weemaes AM, Proost JH, de Leij LF, Meijer DK. Pharmacokinetics and whole body distribution of elastase derived angiostatin (K1-3) in rats. *Int J Cancer*. 2001;91:1-7.
 31. Drixler TA, Borel Rinkes IH, Ritchie ED, van Vroonhoven TJ, Gebbink MF, Voest EE. Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res*. 2000;60:1761-5.
 32. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med*. 1996;2:689-92.
 33. Otero RL, Parodi RJ, Ubios AM, Carranza FA, Jr., Cabrini RL. Histologic and histometric study of bone resorption after tooth movement in rats. *J Periodontal Res*. 1973;8(5):327-33.
 34. Matsunaga T, Weihrauch DW, Moniz MC, Tessmer J, Warltier DC, Chilian WM. Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation*. 2002;105:2185-91.
 35. Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, Roy JA, Goodman MD, Misra UK, Cheek DJ, Pizzo SV. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:6656-61.
 36. Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:2811-6.
 37. Tarui T, Majumdar M, Miles LA, Ruf W, Takada Y. Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. *J Biol Chem*. 2002;277:33564-70.
 38. Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, Matvijenko O, Holmgren L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol*. 2001;152:1247-54.
 39. Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I, Rodan GA. Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol*. 2000;19:97-105.
 40. Carron CP, Meyer DM, Engleman VW, Rico JG, Ruminski PG, Ornberg RL, Westlin WF, Nickols GA. Peptidomimetic antagonists of alphavbeta3 inhibit bone resorption by inhibiting osteoclast bone resorptive activity, not osteoclast adhesion to bone. *J Endocrinol*. 2000;165:587-98.