



**TOPIKAL OZON GAZI UYGULAMASININ GİNGİVAL YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Zeynep TAŞTAN EROĞLU

**DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2015

Zeynep TAŞTAN EROĞLU tarafından hazırlanan “Topikal Ozon Gazı Uygulamasının Gingival Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Histolojik ve İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Periodontoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mazlum Bülent KURTİŞ

Periodontoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan : Prof. Dr. Gönen ÖZCAN

Periodontoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Yaşar AYKAÇ

Periodontoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Gülay TÜTER

Periodontoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Doç. Dr. Diş Tbp. Hasan Ayberk ALTUĞ

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Gülhane Askeri Tıp Akademisi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Zeynep TAŞTAN EROĞLU

27.05.201

TOPIKAL OZON GAZI UYGULAMASININ GİNGİVAL YARA İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
İNCELENMESİ
(Doktora Tezi)

ZEYNEP TAŞTAN EROĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2015

ÖZET

Serbest dişeti grefti, laterale kaydırılan flep, gingivektomi ve gingivoplasti gibi operasyonlar sonrası sekonder iyileşmeye bırakılan yaraların iyileşmeleri primer yara iyileşmesinden daha yavaş seyreder. Bu tür yaralarda kanama, infeksiyon ve anatomik bütünlüğünün bozulması gibi dezavantajlar nedeniyle hasta konforu azalmakta ve iyileşme sürecinde çeşitli komplikasyonlarla karşılaşılabilir. Çalışmamızda, ozon gazı uygulamasının sekonder yara iyileşmesi üzerine etkileri, sağlıklı 8 domuzdan elde edilen örneklerle histolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Çalışmadaki her bir domuzun palatinal diş eti bölgesinde 10 mm çapında 6 adet yara oluşturuldu. Oluşturulan yaralardan 3'üne ozon gazı uygulandı (test grubu), 3'üne ise herhangi bir ek uygulama yapılmadı (kontrol grubu). Her bir grupta yer alan yaraların birincisinden 3.gün, ikincisinden 7.gün, üçüncüsünden ise 10.gün örnek alındı. Elde edilen örnekler, hemotoksilen eozin Masson's trikrom boyaması ile histolojik olarak değerlendirildi ve yara iyileşmesinde önemli rolleri bulunan TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta) ve VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)'nin incelemesi immünohistokimyasal boyamayla yapıldı. İnflamasyon skorları ve epitel oluşumunun histolojik incelemesinde, deney ve kontrol grupları arasında bir fark bulunamadı. İmmünohistokimyasal incelemede ise 3. ve 7. güne ait deney grubu örneklerinin VEGF boyanma yoğunlukları, kontrol grubu örneklerine göre istatistiki olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p<0,05$). 3. 7. ve 10. günlerdeki TGF- β ve 10. gündeki VEGF boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi. Çalışma sonucunda, ozon gazının topikal uygulamasının, yara iyileşmesinin erken döneminde VEGF miktarlarını artırarak iyileşmede etkili olabileceği görüldü.

Bilim Kodu : 1048

Anahtar Kelimeler : Ozon gazı, Ozon tedavisi, Gingival doku, Yara iyileşmesi, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü, Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta, Histolojik analizi, Plazma terapisi

Sayfa Adedi : 113

Danışman : Prof. Dr. M. Bülent KURTİŞ

EFFECT OF TOPICAL APPLICATION OF OZONE GAS ON GINGIVAL WOUND
HEALING IN PIGS: HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS

(Ph. D. Thesis)

ZEYNEP TAŞTAN EROĞLU

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

May 2015

ABSTRACT

The healing period of wounds that are left to seconder healing after surgical procedures is slower than wounds that are left to primary healing. Because these wounds have some disadvantages like bleeding, infection and deformation of the anatomic collectivity, the patients feel themselves comfortless at post-operative healing period and some complications can be encountered during healing period. In this study, the effects of ozone gas application on seconder wound healing was evaluated histologically and immunohistochemical by using samples obtained from 8 healthy pigs. 6 wounds were created by punch technique with 10 mm diameter on palatinal gingiva of each pig. Ozone gas was applied only on the 3 wounds (test group) and other 3 wounds were left to natural healing (control group). Samples were taken from the wounds in each group on third day, seventh day, tenth day and samples were done routine histological analysis. TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) and VEGF (Vasculer Endotelial Growth Factor) were investigated by using immunohistochemical staining. Statistically significant higher VEGF expression were found in test group than control for 3 and 7 days samples ($p<0,05$). No statistically differences were found between test and control group in terms of epithelial formation and inflammation scores, in view of VEGF expression on 10 days samples and in terms of TGF- β expression for any sampling days. In conclusion, it was seen that the topical application of ozone gas could be effective in the early stages of wound healing by increasing the amount of VEGF expression.

Science Code : 1048

Key Words : Ozone gas, Ozonotherapy, Gingival wound, Wound healing, Vasculer Endotelial Growth Factor, Transforming Growth Factor Beta, Histological analysis, Plasma therapy

Page Number : 113

Advisor : Prof. Dr. M. Bülent KURTIŞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında bilgisi, tecrübesi ve hoşgörüsü ile hep yanımda olan, iyi bir hekim olarak daima örnek aldığım, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk ve onur duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Bülent KURTİŞ'e,

Başta Periodontoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gönen ÖZCAN olmak üzere bilgilerini ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen Periodontoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Doktora tezimin en başından itibaren hiçbir yardımını esirgemeyip, çalışmamın hayata geçmesinde çok büyük katkıları olan değerli hocam Doç Dr. Sermet ŞAHİN'e, çalışmamda büyük yardımları olan Doç. Dr. Ayberk ALTUĞ ve Prof. Dr. Gülay TÜTER ve araştırmamı kendi işiymişçesine sahiplenip ozon cihazının teminini sağlayan Dr. Dt. Özgür TORUN'a, başta Uzm. Vet. Hek. Alb. Ali KARABACAK olmak üzere araştırmamın tüm yükünü çeken GATA Hayvan Deneyleri Araştırma Merkezi personeline, çalışmamın şekillenmesinde ve değerlendirilmesinde büyük katkıları olan Dr. Dt. Emre BARIŞ'a, çalışmamda emeği geçen Dr. Farid MUSEYİBOV ve Dt. Sahar HASANZADEH'e ,

Doktora eğitimim boyunca çok güzel günler geçirmemi sağlayan başta Serap KARAKIŞ, Rana ÇULHAOĞLU, Selen ARSLAN, Simge ERÇELİK BAYRAMOĞLU olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan dostlarım Berceste GÜLER, Duygu YAVUZER, Neslihan BULAK, Kıvanç KÜLAH, Ezgi DOĞAN, Tuğba AZMAZ, Ayseli OKUMUŞ ve Alparslan EROĞLU'na,

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımı daima kendi hayatlarının önünde tutan, emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem Hatice TAŞTAN ve babam Rüştü TAŞTAN'a, üzerimde en az annem babam kadar emekleri olan anneannem Nazmiye ULUSOY ve dedem Bahri ULUSOY'a, dünyaya geldiği ilk günden itibaren hayatımı renklendiren canım kardeşim Hannenur TAŞTAN'a, bana kendi çocukları gibi değer veren ve destekleyen Huriye ve Ali Fuat EROĞLU'na, en zor anlarımda bile beni mutlu etmeyi başarabilen, bundan sonra da hayatımı güzelleştirmeye devam edecek olan sevgili eşim Kubilay EROĞLU'na,

Doktora tezimi destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje 03/2013-05) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Dişetin Yapısı.....	5
2.1.1. Epitel.....	5
2.1.2. Dişeti bağ dokusu (Lamina propria)	7
2.2. Yara İyileşmesi.....	9
2.2.1. Yara iyileşme tipleri.....	10
2.2.2. Periodontal cerrahide sekonder yara iyileşmesi.....	11
2.2.3. Yara iyileşmesinin fizyolojisi.....	12
2.2.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler.....	21
2.2.5. Yara iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri.....	26
2.2.6. Yara iyileşmesinde kullanılan topikal kemoterapötik ajanlar.....	31
2.3. Ozon.....	32
2.3.1. Ozonun kullanım şekilleri.....	34

	Sayfa
2.3.2. Periodontolojide ozon kullanımı.....	35
2.3.3. Ozon jeneratörleri.....	43
2.3.4. Diş hekimliğinde kullanılan ozon cihazları.....	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	51
3.1. Deneysel Model.....	51
3.2. Cerrahi Protokol.....	52
3.3. Ozon Uygulama İşlemi.....	54
3.4. Deney ve Kontrol Gruplarından Biyopsi Alınması.....	55
3.6. Histolojik Yöntem.....	56
3.7 Histokimyasal Yöntem.....	56
3.8. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	56
3.9. Histolojik Değerlendirme.....	57
3.10. İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	58
3.11. İstatistiksel Değerlendirme.....	58
4.BULGULAR.....	61
4.1. Histolojik Bulgular.....	61
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	70
4.2.1. VEGF.....	70
4.2.2. TGF- β	75
4.3. Korelasyon Analizi Sonuçları.....	79
5. TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	93
KAYNAKLAR.....	95
EKLER.....	109

Sayfa

EK-1. Etik Kurul..... 110

ÖZGEÇMİŞ..... 112

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Ozonyton XP'nin cam proplarının kullanım alanları.....	49
Çizelge 3.1. Çalışma Protokolü.....	51
Çizelge 3.2. İnflamatuar hücre skoru.....	57
Çizelge 3.3. Epitelizasyon skoru.....	58
Çizelge 3.4. Boyanma yoğunluğu skoru.....	58
Çizelge 4.1. Gruplara göre 3, 7 ve 10. güne ait inflamasyon skorları.....	66
Çizelge 4.2. Kontrol grubu için inflamasyon değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları.....	67
Çizelge 4.3. Deney grubu için inflamasyon değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları.....	67
Çizelge 4.4. İnflamasyon değerleri bakımından deney ve kontrol grupları arasındaki farklılığa ilişkin Mann-Whitney U testi sonuçları.....	68
Çizelge 4.5. Gruplara göre 3, 7 ve 10. güne ait epitelizasyon skorları.....	69
Çizelge 4.6. Epitelizasyon 7. gün değerleri bakımından deney ve kontrol grupları arasındaki farklılığa ilişkin Mann Whitney U testi sonuçları.....	69
Çizelge 4.7. Gruplara göre 3, 7 ve 10. güne ait VEGF boyanma yoğunlukları.....	72
Çizelge 4.8. Kontrol grubu için VEGF değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon işaret testi sonuçları.....	73
Çizelge 4.9. Deney grubu için VEGF değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları.....	73
Çizelge 4.10. VEGF değerleri bakımından deney ve kontrol grupları arasındaki farklılığa ilişkin Mann-Whitney U testi sonuçları.....	74
Çizelge 4.11. Gruplara göre 3, 7 ve 10. güne ait TGF- β boyanma yoğunlukları.....	77
Çizelge 4.12. Kontrol grubu için TGF- β değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları.....	78
Çizelge 4.13. Deney grubu için TGF- β değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları.....	78

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.14. TGF- β değerleri bakımından deney ve kontrol grupları arasındaki farklılığa ilişkin Mann-Whitney U testi sonuçları.....	79
Çizelge 4.15. Deney ve kontrol grupları için inflamasyon, TGF- β ve VEGF 3. gün değerleri arasındaki ilişkilerine ilişkin Spearman Korelasyon analizi sonuçları.....	80
Çizelge 4.16. Deney ve kontrol grupları için inflamasyon, TGF- β ve VEGF 7. gün değerleri arasındaki ilişkilerine ilişkin Spearman Korelasyon analizi sonuçları.....	80
Çizelge 4.17. Deney ve kontrol grupları için inflamasyon, TGF- β ve VEGF 10. gün değerleri arasındaki ilişkilerine ilişkin Spearman Korelasyon analizi sonuçları.....	81

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Dişeti epitelinin tabakaları [13].....	6
Şekil 2.2. Primer ve sekonder yara iyileşmesi [24]	10
Şekil 2.3. Yara iyileşmesinin fazları [39]	13
Şekil 2.4. Anjiyogenezis [24]	18
Şekil 2.5. VEGF'nin yara iyileşmesindeki rolü [85]	28
Şekil 2.6. Ozonun oluşumu [104].....	33
Şekil 2.7. Maddenin halleri[130].....	44
Şekil 2.8. Plazmanın içeriği[131].....	45
Şekil 3.1. Deney ve kontrol gruplarının oluşturulması.....	54
Şekil 4.1. İnflamasyon değerleri bakımından deney ve kontrol gruplarının günlere göre ortalamalarının grafiği.....	68
Şekil 4.2. VEGF değerleri bakımından deney ve kontrol gruplarının günlere göre ortalamalarının grafiği.....	74
Şekil 4.3. TGF- β değerleri bakımından deney ve kontrol gruplarının günlere göre ortalamalarının grafiği.....	79

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. a. Ozonytron XP b. Healozone c. Prozone.....	48
Resim 2.2. Ozonyton XP'de kullanılan proplar.....	49
Resim 3.1. Domuzun palatinal bölgesinden alınan ölçü üzerindeki oluşturulan perforasyonlar.....	53
Resim 3.2. a. Domuzun palatinal bölgesinde yaraların oluşturulması b. Domuzun palatinal bölgesinde oluşturulmuş yaralar.....	53
Resim 3.3. Deney bölgelerine ozon gazı uygulaması.....	54
Resim 3.4. Günlere göre örneklerin alındığı yara bölgeleri.....	55
Resim 3.5. Yara bölgelerinden örneklerin alınması.....	55
Resim 4.1. 3. gün deney (A, B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. Yara yüzeyinin nötrofil topluluklarının oluşturdukları fibrin eksuda ile örtülü olduğu görüldü (HE; A, C X 20, BX100, DX40)(yb: yara bölgesi, e: eksuda, n:nötrofil, ep: epitel, smyd:submukozal yağ dokusu).....	61
Resim 4.2. 3. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. İnflamasyonun submukozal yağ dokusuna kadar uzandığı ve yara yüzeyinin eksuda ile örtülü olduğu görüldü (Masson's Trikrom; A,CX20, B, DX 100)(yb: yara bölgesi, e: eksuda, n:nötrofil topluluğu , ep: epitel, smyd: submukozal yağ dokusu).....	62
Resim 4.3. 7. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. Yara yüzeyinin eksuda ile kaplı olduğu görüldü. Yara bölgesinin fibrovasküler granülasyon dokusu ile dolu olduğu izlendi (HE; A,C: x20, B,D: x40))(yb: yara bölgesi, e: eksuda, ep: epitel, smyd: submukozal yağ dokusu, gd: granülasyon dokusu).....	63
Resim 4.4. 7. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. Yara yüzeyinin eksuda ile kaplı olduğu görüldü. Yara bölgesinin fibrovasküler granülasyon dokusu ile dolu olduğu izlendi. Yüzey epitelinin yara kenarlarından merkeze doğru proliferere olduğu (ok başı) görüldü (Masson's Trikrom; A,C: x20, B,D: x100)(yb: yara bölgesi, e: eksuda, ep: epitel, smyd: submukozal yağ dokusu, gd: granülasyon dokusu, k: kolajen).....	64
Resim 4.5. 10. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. 10. günde yara yüzeyinin tümüyle epitelle örtülü olduğu görüldü (HE;A,C:x20, B,D: x40)(yb: yara bölgesi, ep: epitel, pe: proliferere epitel).	65

Resim	Sayfa
Resim 4.6. 10. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. Tamamen epitel ile örtülü yara bölgesinin fibroblastlardan zengin granülasyon dokusu yapısında olduğu görüldü (Masson's Trikrom; A,D x40, B,D: x200) (yb: yara bölgesi, ep: epitel, pe:prolifere epitel, gd: granülasyon dokusu, k: kolajen)	66
Resim 4.7. 3. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu VEGF ekspresyonu. VEGF'nin eksuda altında sağlam kalan doku içerisinde vasküler endotel ve inflamatuvar hücreler tarafından eksprese edildiği (ok) gözlemlendi (AEC boyaması; A,C: x100, B,D: x200) (yb: yara bölgesi, e:eksuda, ep: epitel, ve: vasküler endotel).....	70
Resim 4.8. 7. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu VEGF ekspresyonu. VEGF'nin eksuda altından itibaren yara bölgesini tamamen dolduran fibroblast ve vasküler endotelden eksprese olduğu (ok) izlendi (AEC boyaması; A,C: x40, B,D: x100)(e: eksuda, ep: epitel, gd: granülasyon dokusu, pe:prolifere epitel)	71
Resim 4.9. 10. gün deney ve kontrol grubu VEGF ekspresyonu. 10 günde VEGF'nin granülasyon dokusunu oluşturan fibroblastlardan eksprese olduğu (ok) görüldü (AEC boyaması; A,C: x40, B,D: x200)(pe: prolifer epitel).....	72
Resim 4.10. 3. gün deney(A,B) ve kontrol (C,D) grubu TGF- β ekspresyonu. 3. günde yalnızca eksuda tabanındaki inflamatuvar hücrelerde TGF- β pozitifliği (ok) izlendi (AEC boyaması; A: x40, B: x100, C: x20, D: x100))(yb: yara bölgesi, e: eksuda, ep: epitel, smyd: submukozal yağ dokusu)	75
Resim 4.11. 7. gün deney(A,B) ve kontrol(C,D) grubu TGF- β ekspresyonu. TGF- β 'nın yara bölgesini tamamen dolduran fibroblast, inflamatuvar hücreler ve endotel hücrelerden eksprese edildiği (ok) gözlemlendi (AEC boyaması; A,C: x100, B,D: x200)(e:eksuda).....	76
Resim 4.12. 10. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu TGF- β ekspresyonu. TGF- β 'nın vasküler endotel ve fibroblastlardan eksprese olduğu (ok) gözlemlendi (AEC; A,C: x100, B,D: x200)	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
dk	Dakika
g	Gram
g/m ³	Gram/metre küp
kg	Kilogram
mm	Milimetre
mg/kg	Miligram/kilogram
pH	Hidrojenin gücü
ppm	Milyonda bir birim
sn	Saniye
µg/ml	Mikrogram/mililitre
µg/m ³	Mikrogram/metre küp
µm	Mikrometre
g/mol	Gram/mol
mg/l	Miligram/litre
mEq	Miliekivalen
l	Litre

Kısaltmalar**Açıklama****ATP**

Adenozin Trifosfat

BAP

Bilimsel Araştırma Projeleri

BMP

Kemik Morfojenik Protein

CTGF

Bağ Dokusu Büyüme Faktörü

DBD

Dielektrik Bariyer Deşarj

DNA

Deoksiribonükleik Asit

EGF

Epidermal Büyüme Faktörü

FGF

Fibroblast Büyüme Faktörü

GATA

Gülhane Askeri Tıp Akademisi

HA

Hyoluronik Asit

HBO

Hiperbarik Oksijen

HE

Hemotoksilen Eozin

ICAM

Hücreler Arası Adezyon Molekülü

IGF

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL

İnterlökin

KDR

Kinaz Ek Alan Reseptörü

KGF

Keratinosit Büyüme Faktörü

MMP

Matriks Metalloproteinaz

NF-KB

Nükleer Faktör Kappa B

NO

Nitröz Oksit

TIMP

Doku Metalloproteinaz İnhibitörü

TGF

Transforme Edici Büyüme Faktörü

Kısaltmalar**Açıklama****TNF**

Tümör Nekroz Faktör

TRC

Trikróm

PDGF

Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

PGI

Prostoglandin

PUFA

Doymamış Yağ Asitleri

ROS

Reaktif Oksijen Türleri

RNS

Reaktif nitrojen türleri

SOD

Süperoksit Dismutaz

UV

Ultraviyole

VCAM

Vasküler Hücre Adezyon Molekülü

VEGF

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGFRVasküler Endotelyal Büyüme Faktör
Reseptörü

1. GİRİŞ

Doku veya organların çeşitli etkenler tarafından bütünlüğünün ve fonksiyonlarının bozulmasına yara; bu bütünlüğün yeniden sağlanmasına ise yara iyileşmesi adı verilir[1].

Yara iyileşmesi, doku katmanlarının ve hücresel yapının restorasyonunu kapsayan kompleks ve dinamik bir süreçtir[2]. Bu süreçte, epitel hücreleriyle, platelet, endotelial hücre, fibroblast ve makrofaj gibi hücreler arasında bir koordinasyon meydana gelir[3].

Yara iyileşmesi, birbiriyle iç içe geçmiş çeşitli fazlardan oluşur. Bu fazlar: inflamasyon, re-epitelizasyon, granülasyon doku formasyonu ve doku remodelingidir[3].

Re-epitelizasyon veya epitelyal iyileşme en önemli ve en karmaşık süreçtir. Bu süreç, dokunun fonksiyonel ve yapısal olarak onarılmasını sağlayan, hücre hareket, proliferasyon ve farklılaşmayı içerir[4].

Yara onarımının en komplikasyonsuz şekli dikiş materyali ile uç uca getirilmiş temiz, enfekte olmamış bir cerrahi kesinin iyileşmesidir. Bu tarz iyileşmeye primer yara iyileşmesi adı verilmektedir. Yara kenarlarının dikiş materyali ile bir araya getirilmediği veya getirilemediği, doku kaybıyla seyreden ameliyat yara bölgelerinin spontan iyileşmeye bırakılmış iyileşmesine ise sekonder yara iyileşmesi adı verilmektedir. Bu iyileşme primer yara iyileşmesinden daha yavaş seyreder ve primer yara iyileşmesine göre dış etkilere daha açık bir haldedir.

Periodontolojide, palatinal bölgeden serbest dişeti grefti elde edilmesi, laterale kaydırılan flep operasyonu, gingivektomi ve gingivoplasti operasyonları gibi işlemler sonrasında oluşan yara iyileşmesi sekonder yara iyileşmesi şeklindedir.

Ağız ortamı, periodontal işlemler sırasında meydana gelen yaraların, özellikle de sekonder yara iyileşmesine bırakılmış olanların, iyileşmesi için zor bir ortamdır. Çiğnemeyle oluşan travma, ağız ortamının oldukça geniş kommensal florası ve mikrobiyal dental plak, normal iyileşme sürecini bozabilmektedir[5, 6]. Bu nedenlerle de oral bölgedeki yaraların iyileşmesi zaman zaman gecikmektedir[3].

Yapılan çalışmalarda, klorheksidin, sodyum hipoklorit, povidon iyodür, hidrojen peroksit gibi bilinen antimikrobiyallerin, epitelyal hücreler ve gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri olduğu izlenmiştir[7, 8]. Yara iyileşme süresinin kısaltmak amacıyla kullanılan kemoterapötik ajanlardan olan Hyoluronik asidin (HA) topikal olarak uygulanıldığı çalışmaların sonuçları incelendiğinde, bazı çalışmalarda HA kullanımı ile yara iyileşme süresinin kısaldığı, bazılarında ise HA ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçların elde edilemediği görülmüştür[9].

Son zamanlarda, yara iyileşmesine katkısı olduğu düşünüldüğü için diş hekimliğinde de kullanılmaya başlayan diğer bir ajan ise “Ozon” dur.

Ozon; oksijenin, atmosferde doğal olarak meydana gelen allotropik bir formudur. Doğada, ultraviyole ışınların oksijen atomlarını geçici olarak üçlü gruplar şeklinde rekombine etmesiyle oluşur[10].

Ozon, kararsız bir gazdır ve 1 oksijen molekülünü vererek hızla oksijen gazına dönüşür. Oluşan oksijen molekülü ise uzun yıllardır tıpta, bakteri ve mantarları öldürmede, virüsleri etkisiz hale getirmede ve kanamayı kontrol etmede kullanılmaktadır. Tıpta tüm bu etkilerinden dolayı kullanılmakta olan ozon, saf medikal oksijenden, ozon jeneratörleri yardımıyla elde edilir[10].

Antimikrobiyal etkisi, ilaç direnci geliştirmemesi ve ağız bölgesindeki yaraların iyileşmesini kolaylaştırması gibi özelliklerinden dolayı, ozon son zamanlarda direkt veya su ya da yağ içinde çözünmüş şekilde, ağız içinde, topikal olarak kullanılmaya başlanmıştır. Çalışmaların birçoğu ozonun bakterisidal etkisine odaklanmıştır. Ozonun, fosfolipitlerin ve lipoproteinlerin oksidasyonu yoluyla bakterilerin hücre membranının bütünlüğünü bozduğu, hücre zarına penetre olarak sitoplazma içindeki DNA yapısını etkilediği bildirilmiştir[2, 11].

Ayrıca ozon etkisi altında, hücresel metabolizmanın aktive olduğu, hücre içi ATP konsantrasyonunun arttığı, başta TGF- β_1 ve VEGF olmak üzere yara iyileşmesi ile ilgili sitokinlerin yükseldiği gözlenmiştir [2, 12].

Tüm bu antimikrobiyal etkisi, büyüme faktörlerini artırması, lokal antioksidan mekanizmaları aktive etmesi ve doku onarımını etkilemesinden dolayı, ozon gazının yara üzerine uygulanmasının, yara iyileşmesini hızlandırabileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte günümüze kadar ozonun oral bölgedeki yara iyileşmesi üzerine etkisini inceleyen çalışma sayısı oldukça sınırlıdır ve ozonun oral yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisine dair henüz bir uzlaşma ya da direkt kanıt yoktur. Ozonun yağ içinde çözünmüş formunun oral kavitedeki yara üzerine topikal etkinliğini inceleyen çalışmalar insanlar üzerinde ve sadece bir fırça yardımıyla elde edilen epitelyal hücrelerin değerlendirilmesi şeklinde planlandığı için yara iyileşmesi bir bütün olarak incelenememiştir [2, 3]. Ayrıca yaptığımız literatür taramasında, gaz formundaki ozonun gingival bölgedeki yara üzerine topikal etkisini değerlendiren histolojik ve immünohistokimyasal çalışmaların olmadığı gözlenmiştir.

Yaptığımız bu çalışmayla, gaz formundaki ozonun çeşitli periodontal operasyonlar esnasında oluşan yaraların iyileşmesi üzerine etkisini histolojik ve immünohistokimyasal olarak inceleyerek bilime katkı sağlayacağımıza inanmaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişetin Yapısı

Oral mukoza 3 bölümden oluşmaktadır:

- a) Dişeti ve sert damağı içeren *çiğneyici mukoza*
- b) Dilin üstünü örten *özelleşmiş mukoza*
- c) Oral kavitenin geri kalanını örten *oral müköz membran*

Oral mukozanın alveoler kemiğı ve dişlerin servikal kısımlarını çevreleyen bölümüne dişeti adı verilmektedir[13].

Dişeti histolojik açıdan 2 bölümden oluşmaktadır[13].

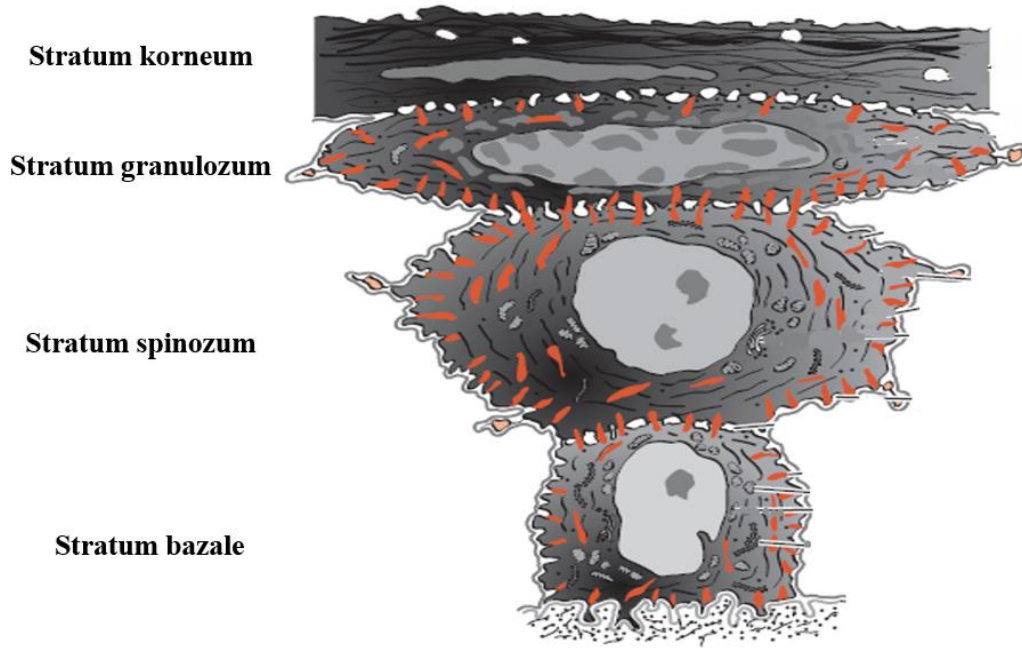
- a) Dişeti epiteli
- b) Dişeti bağ dokusu

2.1.1. Epitel

Mekanik, mikrobiyal ve kimyasal yaralanmaya karşı koruma sağlayan oral mukozanın yüzey epiteli, bulunduğu yere göre keratinize, parakeratinize veya nonkeratinize çok katlı yassı epitel yapısındadır. Çiğneyici mukozayı oluşturan sert damak ve dişetini örten epitel keratinize çok katlı epiteldir[14].

Keratinize çok katlı yassı epitel, 4 tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.1).

- a) Stratum bazale
- b) Stratum spinozum
- c) Stratum granulozum
- d) Stratum korneum



Şekil 2.1. Dişeti epitelinin tabakaları [13]

Stratum bazale:

Epitelin en alt tabakasını oluşturmaktadır ve epitel ile altındaki bağ dokuyu ayıran bazal membranla sıkı kontakt içerisinde. Hücreler birbirlerine desmozomlar bazal membrana ise hemidesmozomlar aracılığı ile bağlanırlar.

Bazal tabakayı oluşturan hücreler, tek sıra halinde dizilmiş, kübik veya silindirik şekilde, mitotik aktiviteleri yüksek, protein üretimini sağlayan organellerce zengin hücrelerdir[14]. Keratinositler ve ara filamentlerinin yapımında görev alırlar[15].

Stratum spinozum:

Epitelin en kalın tabakası olan spinoz tabakada, hücrelerin hacmi artmış ve çok yüzeyli bir şekil almıştır. Sitoplazmalarında bol sitokeratin filamanlarının yanı sıra keratohyalin granülleri vardır. Hücreler birbirlerine dikensi sitoplazmik çıkıntılar ve desmozomlar ile sıkıca bağlanmıştır ve bu bağlanma spinoz tabakanın karakteristik görüntüsünü oluşturmaktadır[13-15].

Stratum granulozum:

Yassılaşılmış, küçülmüş ve içi keratin filamentleri dolu hücrelerden oluşmaktadır. Bu tabakaya granüller tabaka denmesinin nedeni içeriğindeki bazofilik keratohyalin granülleridir. Bu granüller keratin yapımında görevlidir[13-15].

Stratum korneum:

Epitelin en üst tabakasıdır. Birbirine yakın olarak dizilmiş, yassılaşılmış, çekirdeklerini ve diğer birçok organellerini kaybetmiştir. Hücre çekirdeklerini tamamen kaybetmişse ortokeratotik, çekirdek kalıntıları veya küçük çekirdekler varsa parakeratotik olarak adlandırılırlar. Bu tabakanın görevi, çiğneyici mukozayı dış etkenlerden korumaktır[13-15].

Epitel-Bağ doku yüzleşmesi

Sulkus epiteli ve birleşim epiteli dışında kalan çiğneyici mukozadaki epitel bağ doku yüzleşmesi düzgün bir yüzey halinde olmayıp girinti ve çıkıntılar gösterir ve bu yapıya “retepeg” denir [13].

Epitel ve bağ dokusu arasında ‘bazal lamina’ adı verilen 300-400 angström kalınlığında bir membran bulunmaktadır. Bazal lamina, lamina lusida ve lamina densa adı verilen iki komponentten oluşmaktadır. Epitelin bazal tabakası ile komşu olan kısım glikoprotein yapıdaki lamina lusida, bağ dokusu ile komşu kısım ise tip IV kolajenden oluşan lamina densadır. Epitelin bazal hücreleri, hemidesmozomlar vasıtasıyla lamina lusidaya bağlanmaktadır [13]. Bazal tabakadan çıkıp, bazal laminayı transvers olarak geçen ve bağ dokusu içine sokulan çapa fibriller de epitel, bazal lamina ve bağ dokusu arasındaki bağlantıya yardımcı olur[15].

2.1.2. Dişeti bağ dokusu (Lamina propria)

Lamina propria, üzerinde bulunan epitele destek veren yoğun bir bağ dokusudur. Papiller tabaka ve retiküler tabaka olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Papiller tabaka, bağ dokusunun epitel ile yaptığı girinti çıkıntıların bulunduğu kısımdır. Retiküler tabaka ise periost ve alveoler kemikle bitişik olan bölgedir[14]. Mezoderm kökenli bu doku, amorf bir madde

içinde bulunan hücreler, lifler, kan damarları ve sinir liflerinden oluşmaktadır. Dişeti bağ dokusu, hücrel ve hücre dışı bileşenlerden meydana gelmektedir[13].

Dişeti bağ dokusunun hücrel bileşenleri:

Fibroblastlar:

Bağ dokusunun temel hücreleri olan fibroblastlar, bağ dokusundaki toplam hücre sayısının %65'ini oluşturmaktadırlar. Bir veya birkaç oval şekilde çekirdeği bulunan, iğ veya yıldız şeklinde hücrelerdir. Fibroblastlar, bağ dokusunda bulunan çeşitli tipteki liflerin ve bağ dokusu matriksinin üretimi ve yıkımından sorumludur ve yapım-yıkım arasındaki dengeyi sağlamaktadır[16].

Mast hücreleri:

Matriksin bazı komponentlerinin sentezinden sorumlu olan mast hücreleri aynı zamanda mikrovasküler sistemin fonksiyonunu etkileyen ve dokuya kan akışını kontrol eden vazoaktif maddelerin sentezini sağlamaktadır. Mast hücreleri elektron mikroskopunda incelendiğinde çok sayıda veziküller izlenmektedir. Bu veziküllerin içi proteolitik enzim, histamin ve heparin gibi biyolojik aktif maddelerle doludur[16].

Makrofajlar:

Kanda bulunan monositler doku içerisine girerek makrofajlara dönüşürler. Savunma sisteminin önemli hücreleridir ve doku içine giren mikroorganizmaları fagosit edebilme yeteneğine sahiplerdir[16].

Nötrofiller:

Dişeti bağ dokusunda nötrofil, lenfosit ve plazma hücreleri gibi inflamatuvar hücreler bulunmaktadır ve bu hücrelerin çoğunluğunu nötrofiller oluşturmaktadır. Nötrofiller sitoplazmalarında çok sayıda lizozime ve lizozomal enzimlere sahiptir ve bu nedenle 'polimorfonükleer lökosit' olarak adlandırılırlar. Esas fonksiyonları mikroorganizmaların öldürülmesidir[16].

Dişeti bağ dokusunun hücre dışı bileşenleri

İnterselüler matriks, esas olarak proteoglikanlar (hyaluronik asit ve kondroidin sülfat) ve glikoproteinlerden (fibronektin, osteonektin vb.) oluşan bir yapıdır. Hücresel elemanlar ve lifler bu yapının içinde gömülü olarak bulunurlar.

Lifler:

Fibroblastlar tarafından üretilen bağ dokusu lifleri 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar, kolajen lifler, retiküler lifler, oksitalan lifler ve elastik liflerdir. Kolajen lifler bağ dokusunun predominant lifleridir ve çoğunluğunu bağ dokusuna gerilmeye karşı direnç sağlayan tip I kolajen oluşturur. Tip IV kolajen lifler ise, tip I kolajen demetleri arasında yer alır, damar duvarı ve bazal membran lifleriyle devam eder [13].

2.2. Yara İyileşmesi

Normal anatomik yapı ve fonksiyonun hasarına veya bozulmasına yara denilmektedir [17]. Yaralar, çeşitli hastalıklar sonucunda patolojik olarak, kazalar nedeniyle ve cerrahi işlemler ile oluşmaktadır[18].

Yara iyileşmesi, keratinositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler, makrofajlar ve plateletler gibi birçok hücreyi içeren, ciltteki ve mukozadaki bariyer restorasyonunu amaçlayan çok hücreli karmaşık bir süreçtir. Yara iyileşme süreci her dokuda benzer iyileşme fazlarından oluşmaktadır ve bu süreçteki kesintiler ve anormallikler, yara iyileşmesinin gecikmesine ve iyileşmeyen kronik yaraların oluşmasına neden olabilmektedir[19, 20].

Doku iskemisi, diabetes mellitus, venöz staz hastalığı, böbrek yetmezliği, yetersiz beslenme, sigara, radyasyona maruz kalma ve basınç gibi nedenlerle kronik yaralar oluşarak yara iyileşmesi gecikebilmektedir[21]. Ayrıca doku defektinin kontamine olması sonucunda oluşan komplike yaralarda da iyileşme süreci uzamaktadır[22].

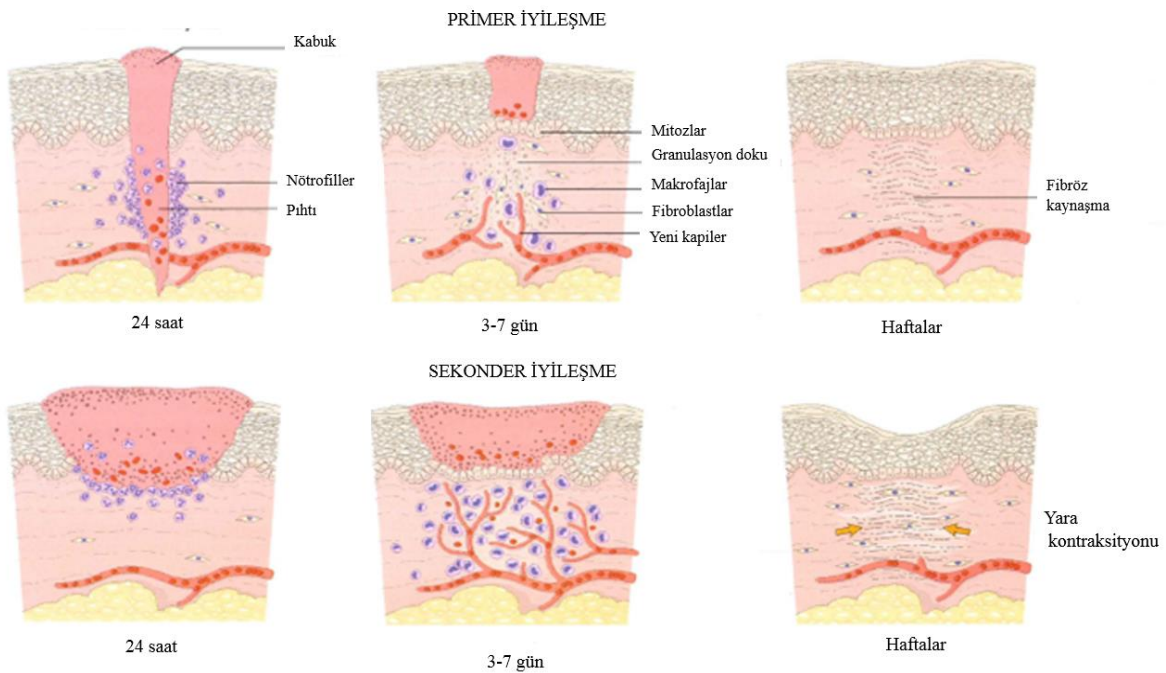
Yaranın iyileşme sürecinde oluşan erken ve geç dönem komplikasyonlar problemi daha da zorlaştırmaktadır[23]. Doğru klinik uygulamalarla yara iyileşmesi olumlu yönde etkilenmekte ve komplikasyon oluşum potansiyeli azalmaktadır[22]. Etkili yara yönetimi

için, yara iyileşme fizyolojisinin tam olarak anlaşılması ve yeni terapötik yöntemler üzerinde çalışılması gerekmektedir.

2.2.1. Yara iyileşme tipleri

Yara iyileşmesi, primer ve sekonder olarak 2 şekilde gerçekleşebilmektedir(Şekil 2.2). Primer yara iyileşmesi, derideki temiz, enfekte olmamış, kenarları süturlarla birbirine yaklaştırılmış cerrahi insizyonun iyileşmesidir. Yapılan insizyon, epitel bazal membranının sürekliliğinde yalnızca fokal bir bozulma yapar ve nispeten az sayıda epitel ve bağ dokusu hücrelerinin ölmesine neden olur. Dar insizyon aralığı önce fibrin kan pıhtısıyla dolar, granülasyon dokusu hızla bu pıhtıya invaze olur ve son olarak yaranın üzeri epitle örtülür[24].

Sekonder yara iyileşmesi, yara kenarlarının dikiş materyali ile bir araya getirilmediği veya getirilemediği, doku kaybıyla seyreden ameliyat yara bölgelerinin spontan iyileşmeye bırakılan iyileşmesidir. Bu iyileşme primer yara iyileşmesinden daha yavaş seyreder ve daha çok hücre ve doku artığı olduğu için daha şiddetli bir inflamatuvar cevap oluşturur. Sekonder yaraların iyileşme süreleri, yaranın derinliğine ve kenarların birbirinden uzaklığına bağlıdır[24].



Şekil 2.2. Primer ve sekonder yara iyileşmesi [24]

2.2.2. Periodontal cerrahide sekonder yara iyileşmesi

Palatinal bölgeden serbest dişeti grefti elde edilmesi, frenektomi, laterale kaydırılan flep operasyonu, gingivektomi ve gingivoplasti operasyonları gibi işlemler sonrasında oluşan yara iyileşmesi sekonder yara iyileşmesi şeklindedir.

Serbest dişeti grefti

Yetersiz keratinize dişeti kalınlığı mukogingival problemlerin başında yer almaktadır. Gingival sağlığın idamesinde minimum yapışık dişeti miktarının yeterli olduğunu gösteren çalışmalar olsa da yapışık dişeti miktarının az olduğunda veya yokluğunda, yeterli oral hijyen prosedürlerini uygulamak zorlaşabilmekte ve oluşan plak akümüasyonu, ataçman kaybıyla sonuçlanan inflamasyona neden olabilmektedir[25].

Serbest dişeti grefti, neredeyse yarım asırdır keratinize doku yetersizliğinde uygulanan ve yüksek başarı oranına sahip cerrahi bir tekniktir[25]. Ancak bu tekniğin, verici bölgedeki yaranın sekonder iyileşmeye bırakılması nedeniyle hastalarda postoperatif ağrı ve kanama oluşturması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır[26].

Frenektomi

Frenulum, kas ve bağ dokusu liflerini içeren, dudağı ve yanağı alveoler mukozaya, dişetine ve altındaki periosta bağlayan müköz membran katlantısıdır[27].

Frenulum, gingival marjine çok yakın bağlandığında, plak kontrolünü zorlaştırması ve içerdiği kasın diş eti çekilmesi oluşturabilmesi nedeniyle dişeti sağlığını tehlikeye sokabilmekte, ayrıca orta hatta tekrarlayan diastema oluşumu gibi estetik ve ortodontik problemler oluşturabilmektedir[27].

Normal konumda olmayan frenulum, frenektomi işlemiyle tedavi edilebilmektedir. Frenektomi, frenulumun alttaki kemiğe kadar içerdiği tüm bağlantılarla birlikte tamamen uzaklaştırılmasıdır. Ancak frenektomi tekniklerinin birçoğunda oluşan yaranın bazı bölgelerinde iyileşme sekonder yara iyileşmesi şeklinde olmaktadır[28, 29].

Laterale kaydırılan flep

Diş malpozisyonları, frenulum ve kas ataçmanları, hatalı diş fırçalama, yetersiz oral hijyen, kemik dehisensleri, oklüzal travma, uyumsuz restorasyonlar, ortodontik hareketler ve periodontal hastalık gibi nedenlerle meydana gelen dişeti çekilmeleri birleşim epitelinin apikale migrasyonu sonucunda kök yüzeyinin açığa çıkmasıdır[30, 31].

Dişeti çekilmesi sonucunda, estetik sorunlar, dişlerde hassasiyet, yeterli plak kontrolünün sağlanamaması ve bununla bağlantılı olarak kök çürükleri meydana gelebilmektedir[32].

Dişeti çekilmesinin tedavisi için birçok farklı uygulama rapor edilmiştir. Bu yöntemlerden birisi olan laterale kaydırılan flep, dişeti çekilmesi olan dişin çevresinde yapışık dişetinin olmadığı veya yetersiz olduğu durumlarda, komşu dişte yeterli yapışık dişeti varsa tercih edilen bir tekniktir[32]. Yeterli kan desteğine sahip olan laterale kaydırılan flepler, açık kök yüzeyini iyi bir şekilde kapatabilir ve başarılı estetik sonuçların elde edilmesini sağlar[33]. Ancak, verici sahada oluşan yaranın iyileşmesi sekonder yara iyileşmesi şeklinde olmaktadır.

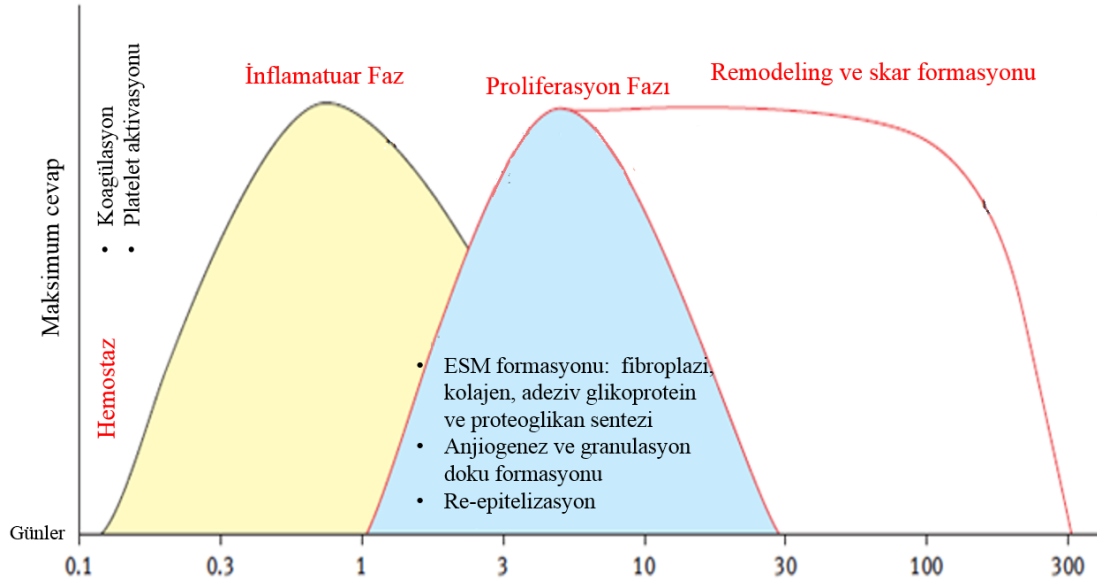
Gingivektomi/ Gingivoplasti

Hastalıklı dişeti dokusunun uzaklaştırılması, kemik üstü periodontal cep derinliğinin azaltılması, kron boyu uzatılması, depigmentasyon, gingival estetiğin geliştirilmesi ve normal dişeti yapısının elde edilmesi amacıyla gingivektomi ve gingivoplasti teknikleri kullanılmaktadır[34]. Bu operasyonlardan sonra, açık bağ dokusu yarası oluşmakta ve oluşan yaraların iyileşme süreci sekonder şeklinde olmaktadır[35].

2.2.3. Yara iyileşmesinin fizyolojisi

Yara iyileşmesi, biyolojik ve immünolojik sistemler arasında koordineli etkileşimleri içeren bir süreçtir[36]. İyileşmenin hassas bir şekilde düzenlenmiş farklı evreleri boyunca yara yatağındaki çeşitli hücreler arasında bazı ilişkiler meydana gelir[22]. Akut ve kronik yaralarda iyileşme sürecinde komponentler arasındaki ilişki ve zamanlama farklı olsa da ana fazlar aynı kalmaktadır[37].

Yaralanmanın hemen sonrasında başlayan iyileşme süreci, koagülasyon, inflamasyon, re-epitelizasyon, granülasyon dokusu, matriks ve doku remodelingi olaylarını içeren birbiriyle iç içe geçmiş 3 fazdan oluşmaktadır. Bunlar; inflamatuvar, proliferatif ve remodeling fazlarıdır(Şekil 2.3)[38].



Şekil 2.3. Yara iyileşmesinin fazları [39]

İnflamatuvar faz:

Koagülasyon ve hemostaz

İnflamatuvar evre vücudun onarım cevabının habercisidir ve genellikle 3-5 gün sürmektedir[38].

Yaralanmanın hemen ardından, yara bölgesinde hemostaz ve koagülasyon mekanizmaları başlar. Bu mekanizmaların temel amacı vasküler sistemi koruyarak vital organların fonksiyonlarının devamlılığını sağlamaktır. İkinci amacı ise iyileşmenin ileri evrelerinde yer alacak hücrelerin akümüasyonu için matriks sağlamaktır[22, 36, 40].

Yaralanma sonrası, etkilenen bölgedeki kan kaybını durdurmak veya yavaşlatmak için hasarlı kan ve lenf damarlarında geçici bir vazokonstriksiyon meydana gelir. Damarlardaki vazokonstriksiyon, vazoaaktif aminler tarafından başlatılır. Epinefrin periferel dolaşıma

salınarak, lokal nörepinefrinin serbest kalmasını sağlayan sempatik sinir sistemini uyarır. Hasarlı hücreler tromboksan gibi prostoglandinleri salgılar ve vazokonstrüksiyonun artışına katkıda bulunur[41].

Platelet agregasyonu, hasarlı hücreler tarafından salınan doku faktörleriyle uyarılır. Plateletler vasküler subendotelyuma ve birbirlerine fibrinojen ve von Willebrand faktör aracılığıyla bağlanırlar[41]. Plateletler sadece hemostatik tıkaç oluşumunu kolaylaştırmaz aynı zamanda nötrofil, makrofaj, fibroblast ve endotelial hücrelerin bölgeye göçünü sağlayan PDGF, TGF- β , EGF gibi yara iyileşmesi için gerekli çeşitli mediatörleri salgılar[22, 42].

Vazoaktif mediatör ve kemotaktik faktörler aynı zamanda, koagülasyon ve aktif kompleman yolları, yaralı veya aktif parankimal hücreler tarafından da üretilirler. Bu maddeler, lökositlerin yaralanma bölgesine gelmesini sağlar[43].

Koagülasyon zinciri, intrinsek ve ekstrinsek komponentlerin ayrı ayrı tetiklenmesiyle meydana gelir. Ekstrinsek yol, normal iyileşme için esansiyelken intrinsek yol değildir[44]. Kan, yabancı yüzeyler ile karşılaştığında intrinsek koagülasyon yolu faktör XII'in aktivasyonu ile başlar. Ekstrinsek kaskat ise faktör VII ve faktör VIIa'ya bağlanan doku faktörlerinin açığa çıkmasıyla başlar. Doku faktörü damar dışı hücrelerde özellikle de fibroblastların yüzeyinde bulunur. Ekstrinsek ve intrinsek yollar, trombin üretilmesiyle sonuçlanır. Trombin fibrinojeni fibrine çevirir ve inflamatuvar hücrelerin damar dışına çıkışını kolaylaştıran vasküler permeabilite artışını stimüle eder[45]. Hasar sonrası yara bölgesinde geçici matriksin gelişmesi için anahtar faktör olan fibrin, serumdan elde edilen vitronektin ile kaplanarak plateletleri birleştirir ve platelet tıkaçı stabilize eden bir ağ şeklini alır. Bu olay, fibroblastlar ve epitelyal hücrelerden üretilen fibronektine bağlanmayı kolaylaştırır [41]. Fibronektin geçici yara matriksi için ikinci anahtar faktördür [46]. Fibrin ve fibronektin ağı iyileşmenin diğer aşamalarında kullanılacak olan dolaşımdaki sitokinler için tutucu bir görev görür[47].

Tepkisel vazokonstrüksiyon sonrasında, histamin, prostoglandin, kinin ve lökotrien tarafından oluşturulan ve daha uzun süre devam eden vazodilatasyon meydana gelir. Vasküler permeabilitenin artışı, kan plazmasının ve iyileşmenin diğer hücrel mediatörlerinin kan damarlarından diapedez yoluyla geçerek ekstravasküler boşlukta

toplanmasına izin verir. Bunun sonucunda şişlik, kızarıklık, sıcaklık artışı ve ağrı görülür. Sitokinler yara bölgesine gelerek, sırasıyla nötrofil ve makrofajların bölgeye göçünü sağlar[38].

Erken inflamatuvar faz

İnflamatuvar fazın erken evrelerinde predominant hücre olan nötrofiller, platelet ürünlerine cevap olarak gelen ilk hücrelerdir[48, 49]. Nötrofiller, yaralanmayı takiben ilk 24-36. saatlerde TGF- β , C3a ve C5a gibi kompleman komponentleri ve formil metionil peptit ürünleri gibi çeşitli kemotaktik ajanlar tarafından yara bölgesine çekilir[18]. Yüzey adhezyon moleküllerinin düzenlediği değişiklik nedeniyle nötrofiller yapışkan hale gelir ve marjinasyon boyunca yarayı çevreleyen post-kapiller venüllerdeki endotel hücrelere bağlanmaya başlar, daha sonra nötrofiller, kan akışı tarafından ileri itilerek endotel yüzeyinde yuvarlanır, bu adhezyon ve rolling mekanizması, selektin bağımlı etkileşimler aracılığı ile oluşur ve zayıf bağlantı olarak sınıflandırılır[22, 50].

Endotelial hücreler tarafından salınan kemokinler, integrinler aracılığı ile adhezyon sistemini aktive eder. Hücreler yuvarlanmayı bırakır, endotelial hücrelerin arasına sıkışarak venüllerin dışına geçerler. Bu durum diapedez olarak bilinir[22]. Nötrofillerden tarafından serbestleştirilen elastaz ve kolajenaz, nötrofillerin hücre dışına migrasyonuna yardım eder[49]. Daha sonraki migrasyon, kemokin ve kemotaktik ajanlara bağlıdır[22]. Yara bölgesine gelen nötrofillerin kritik fonksiyonları işgalci mikroorganizmaları ve hücre artıkları, salgıladıkları proteolitik enzimler ve serbest oksijen radikalleri ile temizlemektir[42]. Bununla birlikte diğer bir görevleri de, epitelyal hücreler ile fibroblastları bölgeye toplayan IL-1 ve TNF- α 'nın üretimini sağlamaktır [49].

Nötrofiller ortamdaki bakterileri hücre artıklarını temizleyip görevlerini tamamladığında, iyileşmenin sonraki fazına geçmeden önce makrofajlar tarafından elimine edilmektedir[22].

Geç inflamatuvar faz

Geç inflamatuvar fazda predominant hücre olan makrofajlar, serum faktörleri, TGF- β ve fibronektin aracılığıyla monositlerin değişmesiyle oluşur[48]. Makrofajlar, kemotaktik faktörler aracılığıyla, yaralanma sonrası 48-72. saatlerde yara bölgesine gelir ve yara

iyileşmesinde önemli rol oynarlar [22, 48, 51]. Erken yarada makrofajlar, ilave lökosit teminini ve aktivasyonuyla inflamatuvar cevabı geliştiren sitokinleri salgılar. Makrofajlar ayrıca apoptotik hücrelerin (nötrofil içeren) oluşmasını artırarak ve bu hücreleri temizleyerek inflamasyonun çözülmesine katkıda bulunur. Makrofajlar, apoptotik hücreleri temizlediğinde, fenotipik değişime uğrar ve tamir aşamasında, doku rejenerasyonunu destekleyen anjiogenezisi, keratinositleri ve fibroblastları stimüle eder [52, 53]. Bu yolla, makrofajlar iyileşmenin proliferatif evreye geçişine öncülük ederler[42]. Makrofajlar, fibroblast proliferasyonunu, kolajen üretimini ve diğer iyileşme sürecini stimüle eden sitokinlerin üretiminden sorumludur. Proliferatif faz için gerekli olan PDGF, TGF- β , FGF, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokin ve büyüme faktörlerini serbestleştirirler[48, 49].

Lenfositler, geç inflamatuvar fazda yara bölgesine gelen son hücrelerdir. Yaralanmadan 72 saat sonra, IL-1, komplement komponentleri ve IgG'nin parçalanma ürünlerinin etkisiyle bölgeye çekilirler. IL-1 kolajenaz regülasyonunda önemli rol oynar[36, 54]. Kolajenaz regülasyonu, kolajenin remodelasyonunda, ekstraselüler matriks komponentlerinin üretimi ve bunların bozulması için gereklidir[22]. Lenfositler, fibroblast teminine yardımcı olan IL-2 üretiminde önemlidir[49]. Bununla birlikte T lenfositler, IL-1, TNF- α , EGF, FGF ve TGF- β 'nın önemli kaynaklarıdır[41].

Proliferatif faz

Makroskopik düzeyde incelendiğinde bol miktarda granülasyon doku formasyonunun izlendiği bu faz, fibroblast migrasyonu ve ekstraselüler matriks sentezi ile karakterizedir. [22]. Proliferatif faz, inflamatuvar fazı takip eder ancak inflamatuvar fazdan kesin sınırlarla ayrılamaz. Yara oluşumunu takiben 3. günde başlar ve yaklaşık 2 hafta devam eder[41, 55].

Proliferatif faz içerisinde çeşitli süreçler yer alır. Bunlar;

- Fibroblast migrasyonu
- Anjiyogenez ve granülasyon doku formasyonu
- Epitelizasyon
- Kontraksiyon[22, 41, 49]

Fibroblast migrasyonu

Normalde dermis içerisinde bulunan fibroblastlar, yara iyileşmesinde yer alan birincil mezenşimal hücrelerdir[48].

Yaranın hücresel ortamı ilk bir hafta dramatik olarak değişmektedir. Başlangıçta oluşan geçici fibrin-fibronektin matriksi ağırlıklı olarak inflamatuvar hücreleri içerirken bir kaç gün sonrasında fibroblastlar ve endotelial hücreler baskın hücre olmaktadır[56]. Yerel hücrelerin yok olması veya yaralanması sonucunda, yara iyileşmesinde ilave fibroblastlara ihtiyaç olmaktadır. Fibroblastlar yaralanma sonrası 3. gün yara bölgesinde görülürler. Bölgede repopüle olması, komşu dokulardan fibroblast göçüyle ve yara bölgesindeki hücrelerin fibroblastlara proliferasyonu ile gerçekleşir. Ayrıca yara ortamındaki sitokinlerin etkisiyle yara çevresindeki diferansiye olmamış hücreler de fibroblastlara dönüşür[41].

Fibroblast migrasyonunu, PDGF, TGF- β , EGF ve ekstraselüler matriksin birincil komponenti olan fibronektin stimüle eder[41, 48].

Yara bölgesindeki diferansiye olmamış hücreler, kemotaktik faktörler tarafından stimüle olarak fibroblastlara dönüşürler. Fibroblastlar ve diğer hücre tiplerinin migrasyonu, integrinlerin ekstraselüler matriksdeki fibronektine bağlanmasıyla gerçekleşir[48].

PDGF, fibroblastlarla birlikte düz kas hücrelerin mitojenik uyarımını ve yara bölgesindeki mezenşimal hücre popülasyonunu artırıcı rol oynar[57].

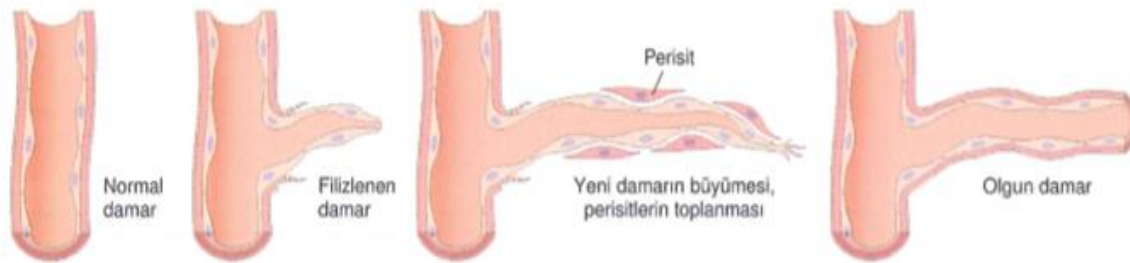
Fibroblastlar, hyaluronan, proteoglikan tip 1 ve tip 3 prokolajen gibi ekstraselüler matriks proteini sentezlemede görev alırlar[22].

Fibroblastlar, kolajen gibi yapısal proteinlerin yanında MMP-1, MMP-2 (jelatinaz) MMP-3 (stromelizin) gibi proteazları üretirler. Bu proteolitik enzimler, fibroblastların matriks içindeki hareketini kolaylaştırır[58]. Daha sonra fibroblastlar proteolitik aktivitelerini azaltırlar ve yapısal proteinleri üretmeye başlar. Bu aşama iki büyüme faktörü tarafından düzenlenir. Bunlardan biri platelet ve makrofajlardan sentezlenen TGF- β , diğeri ise fibroblastların kendilerinden sentezlenen bağ doku büyüme faktörü (CTGF)'dür[49].

Anjiyogenez ve granülasyon doku formasyonu

Anjiyogenez, mevcut damarların kapiller filizlenmesi ile yeni kapiller damarların oluşmasıdır ve yaralanmadan 2 gün sonra başlamaktadır[41]. Yara anjiyogenezi, dokudaki yüksek laktat seviyesi, asidik pH ve özellikle de oksijen basıncının (pO_2)’nın düşmesiyle uyarılır[48]. Granülasyon dokusundaki şiddetli derecedeki hipoksi, yerel damarlanmanın zarar görmesiyle birlikte yara bölgesinde hücrelerde oksijen tüketiminin artmasıyla meydana gelir. Prolifere olan hücreler, dinlenme siklusundaki hücrelerden 5 kat daha fazla oksijen tüketirler[41].

Anjiyogenez boyunca yara çevresiyle temasta olan kapillerde endotelial filizler gelişir[59]. Bu filizler hücrel migrasyon ve proliferasyonla büyür. Bir kapillerden gelişen filiz diğeriyle temasa geçerek yeni kapiler meydana getirir(Şekil 2.4). Bu büyüme için gerekli endotelial hücrelerin migrasyonu, fibroblastlarda olduğu gibi integrinler aracılığıyla meydana gelir. Endotelial hücrelerin matriks içindeki migrasyonu MMPlerin proteolitik aktivasyonu ile kolaylaşır[41].



Şekil 2.4 Anjiyogenezis [24]

Kapiller filizler büyümeye ve bağlanmaya devam eder ve belirgin vasküler düğüm şeklini alır. Anjiyogenezde öncelikli görev alan sitokinler, FGF, TGF- β , VEGF ve prostoglandinlerdir ve bu uyarıcı sitokinler, yara tamamen vaskülerize olduğunda azalır[48]. Makrofajlar, yaralanmayı takiben yaklaşık 4. günde proliferatif fibroblastlar ve vaskülerize stroma, kolajen matriks, fibrinojen, fibronektin ve hyaluronik asit ile birlikte akut granülasyon dokusunu oluştururlar[22]. Kemotaktik, mitojenik ve diğer düzenleyici aktivitelere sahip sitokinler için bir rezervuar görevi gören bu doku fibrin bazlı geçici

matriksin yerini alır[29]. Kolajen akümüasyonu kan damarlarının densitesi azalır ve granülasyon dokusu skar oluşumak için giderek matürleşir[22].

Epitelizasyon

Epidermal hücreler dış çevreyle iç ortam arasında bir bariyer görevi görmek için sürekli rejenere olurlar. Yarayı korumak için epitelyal hücrelerin rejenere olmasına ve göçmesine epitelizasyon denir. Epitelizasyon oral mukozal yaralarda cilt yaralarına göre daha hızlıdır[38].

Zarar görmüş epitelin rekonstrüksiyonu yarananmadan hemen sonra başlar. Gerekli epitelyal hücreler yara kenarlarından gelişir. Epitelizasyon insizyonel yaralarda, bir yara kenarının diğerine uzaklığı az olduğu ve bunun sonucunda da epitelyal hücrelerin göçü kısa sürede gerçekleşeceği için daha hızlıdır. Yarananmadan 24-48 saat sonra epitelizasyon gerçekleşir[41]. Ancak geniş yaralarda, yaranın genişlik miktarına bağlı olarak epitelizasyon haftalar sürebilir[48].

Epitelizasyon süreci, hücresel ayrılmayı, proliferasyonu ve değişimi içerir. Bu sürece EGF, KGF ve TGF- α yardım eder. Marjinal bazal hücreler yaranın merkezine tek tabaka olarak göçer. Hücrelerin migrasyonu karşı taraftan göçen hücrelerle karşılaşana kadar devam eder ve migrasyon, “kontakt inhibisyon” ile sonlanır. Epitelyal hücrelerin yeni yüzeyi keratinize olmaya başlar. Oluşan epitelyal yüzey, daha az bazal hücreye sahiptir, rete-peg içermez ve yara kenarındaki epiteliden daha incedir[48].

Yara kontraksiyonu (büzülmesi)

Yara kenarlarının yaranın merkezine doğru hareketini ifade eden yara kontraksiyonu, yarananmadan 4-5 gün sonra başlar, 12-15. güne kadar devam eder[48].

Yara kontraksiyonun en kabul edilen mekanizması, ilk olarak 1971’de Gabbiani tarafından bahsedilmiş olan miyofibroblastlara dayanan mekanizmadır[60]. Miyofibroblastlar büyük bir olasılıkla, yara içindeki normal fibroblastlardan gelişmektedir ve ilk olarak yaranın 3. gününde görülmektedir ve yaranın 21. güne kadar bölgede kalmaya devam

etmektedir. Deneyler, miyofibroblastların yara kenarında resim çerçevesi görünümünde olduğunu göstermektedir[61].

Yara kontraksiyonun alternatif teorisi, fibroblastların yara kenarlarında , sitoplazmalarındaki gerilim lifleriyle birlikte modifikasyona uğramasıdır. Kontraksiyon hücre yönlendirilmeli bir süreçtir ve kolajen sentezi içermez. PDGF ve TGF- β yara kontraksiyonun mediyatörleridir. FGF ve IGF ise kontraksiyonu inhibe eder. Radyasyon ve sitotoksik ilaçlar, selüler aktiviteyi inhibe ederek kontraksiyonu geciktirirler[48].

Remodeling fazı

İyileşme olaylarının sonuncusu olan remodeling fazında, inflamatuvar hücreler ortamdaki ayrılır ve büyüme faktörü salgılayan hücreler azalır[48, 49]. İyileşen dokudaki kolajen içeriği, yaralanma sonrası 21. günde maksimum düzeye ulaşır[48]. Remodeling kolajen moleküllerinin daha fazla kovalent olarak çapraz bağlanması ile gerçekleşir. Bu fazın başlarındaki gerilim direnci yaklaşık %15 iken, bu fazın sonunda %60-70lere ulaşabilmektedir. Hatta iyi bir şekilde iyileşmiş yaradaki final gerilim direnci, normal dokunun sahip olduğu %80 oranı kadar yüksek olabilir[49]. Bu süreç boyunca Tip III kolajen miktarı azalırken, yerini tip I kolajen almaktadır[48].

Remodeling fazında, kolajen sentezi azalır ve kolajen yıkımıyla aynı miktarda sentezleme gerçekleşmiş olur. Kolajen sentezinin azalmasının düzenlemesine gama-interferon, TNF- α ve kolajen matriksin kendisi aracılık eder[41]. Matriks metalloproteinazlar (MMPs) kolajen moleküllerinin bozulmasında görev alırlar ve MMP aktivitesi “metalloproteinazların doku inhibitörleri” (TIMPs) tarafından düzenlenir[62]. MMP ve TIMP arasındaki denge, TGF- β , PDGF ve IL-1 tarafından sağlanır[41].

2.2.4. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Lokal ve sistemik kaynaklı birçok faktör yara iyileşmesini etkilemektedir.

Lokal faktörler

Yara iyileşmesini etkileyen lokal faktörlerin başlıcaları, infeksiyon, oksijenasyon, yabancı cisim, doku perfüzyonu, yaranın lokalizasyonu ve radyasyondur.

İnfeksiyon

İnfeksiyon, gecikmiş yara iyileşmesinin önemli bir nedenidir[63]. İnflamasyon, yara iyileşme sürecinin normal bir parçasıdır ve mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında önemlidir. Etkili dekontaminasyonun yokluğunda, bakteri ve endotoksinleri, IL-1, TNF- α gibi proinflatuar sitokinlerin uzaklaştırılmasını geciktirerek inflamatuvar fazın uzamasına ve yaranın kronik hale gelmesine neden olabilmektedir[42].

Doku perfüzyonu

Dokunun kanlanması, yaranın iyileşmesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Yeterince kan akımı olmayan bir yarada, nötrofiller ve diğer inflamatuvar mediatörler yara bölgesine geç gelmekte ve bunun sonucunda da fagositik savunma sistemi zayıflayarak infeksiyon riski artmaktadır. Oksijen ve besleyici maddelerin yara yerine yeterli miktarda ulaşamaması dokuda nekroza neden olabilmektedir[64].

Oksijenasyon

Oksijen, hücre metabolizmasında özellikle de ATP yoluyla enerji üretilmesinde önemlidir ve neredeyse bütün yara iyileşme sürecinde kritik rol oynar[42]. Ayrıca aerobik glikoliz, yağ asitlerinin β -oksidasyonu, oksidatif fosforilizasyon yoluyla enerji üretimiyle sıkı ilişkili olan sitrik asit siklusu da oksijene bağlıdır[65].

Moleküler oksijen, kolajen maturasyonunda prolin ve lizinin hidroksilasyonu için esansiyeldir ve hidroksilasyonda çok miktarda oksijene ihtiyaç vardır[65]. Ayrıca oksijen,

keratinizasyon farklılaşmasını ve migrasyonunu, fibroblast ve endotelial hücrelerin üretimini artırır[38].

Yaralanmayla beraber damarlarda oluşan ezilme veya kesik sonucunda mikrosirkülasyon azalır ve dokuda iskemi meydana gelir ve sonuç olarak dokunun metabolik ihtiyaçlarını karşılayacak yeterli doku perfüzyonu sağlanamaz. Yaralanmanın erken fazında, iyileşmenin gerçekleşebilmesi ve enfeksiyonun kontrol altına alınabilmesi için dokunun oksijen ihtiyacı 20 kat artmaktadır[66].

Akut yaralarda, hipoksi, birçok yara iyileşme sürecini başlatıcı olarak görev alır. Hipoksi, makrofaj, keratinosit ve fibroblastlardan sitokin ve büyüme faktörü üretimini indükleyebilir. Hipoksiye cevap olarak üretilen, PDGF, TGF- β , VEGF, TNF- α ve endotelin-1 gibi faktörler, hücre proliferasyonu, migrasyonu, kemotaksisinde ve anjiyogeneze rol oynarlar[42, 66]. Ancak uzamış veya kronik hipoksi yara iyileşmesini geciktirir[64, 67].

Hipoksi gibi hiperoksi de reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarını artırarak büyüme faktörlerinin salınımını aktive eder. Hiperbarik oksijen ve ozon terapisi gibi tedaviler, dokuda hiperoksi oluşturur[65].

NADPH-bağımlı oksijenaz enzimi yara iyileşmesi için önemli bir enzimdir. İnflamatuvar fazda, yüksek miktarda oksijeni yakarak, peroksit anyon (HO_2^-), hidroksil iyon (HO^-), superoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi yüksek miktarda ROS oluşumunu sağlar. ROS, yara iyileşme sürecinde bakterilerin öldürülmesinde ve nötrofil kemotaksisinde önemli rol oynar[68]. Proliferasyon evresinde, EGF, TGF- β , VEGF gibi büyüme faktörlerinin indüklenmesini sağlar. Ayrıca ROS, FGF üretimini artırır, miyofibroblast farklılaşmasını başlatarak yara kontraksiyonuna katkıda bulunur, VEGF üretimini indükleyerek anjiyogenezi artırır[67].

Yabancı cisimler

Doku oksijen basıncı ve pH'da düşüşe neden olan yabancı cisimler yara iyileşmesi için zararlıdır. Yabancı cisim varlığında yara iyileşmesi, alternatif kompleman yollarının aktivasyonu ile oluşan uzamış inflamatuvar cevap tarafından geciktirilebilir. Yabancı cisimler, bakteriyel tutunma ve proliferasyon için mükemmel bir alan sağlar [63].

Yaranın Lokalizasyonu

Kanlanması zengin bölgelerde oluşan yaralar, kanlanması daha az olan bölgelerdeki yaralardan daha hızlı iyileşir[69].

Radyasyon

Radyasyon, yara iyileşme sürecinin tüm basamaklarını etkiler. İnflamasyonu, fibroblast proliferasyonunu, angiogenezis ve büyüme faktörü sentezinin inhibe eder[70].

Sistemik faktörler

Yaş

Yapılan klinik ve hayvan çalışmalarında, yaşla bağlantılı olarak gerçekleşen moleküler ve hücresel değişimler sonucunda, yaşlı bireylerdeki yara iyileşmesinin genç bireylerdekine oranla daha geç tamamlandığı görülmüştür[71].

Cinsiyet

Cinsiyet hormonlarından olan östrojen ve androjen yara iyileşmesinde önemli rol oynar. Çalışmalar, östrojenin erkeklerde ve kadınlarda meydana gelen yara iyileşmesindeki yaşla ilişkili bozulmanın iyileşmesinde etkili olduğunu, androjenin ise kutanöz yara iyileşmesini negatif yönde etkilediğini göstermektedir. Yaşlı kadınlarla kıyaslandığında yaşlı erkeklerde, akut yara iyileşmesindeki gecikmenin daha fazla olduğu görülmektedir[72].

Stres

Stres, insan sağlığında ve sosyal davranışlarında çok önemli bir etkiye sahiptir[42]. Yapılan insan ve hayvan çalışmalarında, psikolojik stresin, yara iyileşmesinde önemli gecikmelere neden olduğu gösterilmiştir. Alzaymırlı hastalara bakan kişiler ve akademik stres altındaki öğrenciler üzerinde yapılan çalışmalarda çalışma boyunca yara iyileşmelerinde gecikmeler gözlenmiştir[73, 74].

Diyabet

Diyabetli bireylerde yetersiz kanlanma ve yetersiz anjiyogenezis sonucunda oluşan hipoksi, oksijen radikallerinin miktarını artırarak erken inflamatuvar cevabı kuvvetlendirir.

Keratinosit ve fibroblast disfonksiyonu, bozulmuş immünite ve nöropatiler diyabetli bireylerde yara iyileşmesinin gecikmesine neden olur.

Diyabetli bireylerdeki iyileşmeyen yaralarda yüksek MMP seviyeleri gözlenmiştir. Bu durum, proteaz aktivitesini artırarak doku destrüksiyonuna katkıda bulunur ve normal tamir sürecini bozar[42].

Kullanılan ilaçlar

Glukortikoid steroidler, non-steroidal anti-inflamatuvarlar, kemoteröpatik ilaçlar veya antikoagülan ilaçlar gibi kullanılan pek çok ilaç, pıhtı formasyonunu, platelet fonksiyonunu, inflamatuvar cevabı veya hücre proliferasyonunu etkileyerek yara iyileşmesinde gecikmelere neden olabilmektedir[42].

Obezite

Obezitenin, koroner kalp hastalıkları, tip II diyabet, kanser, hipertansiyon, dislipidemi, inme ve uyku apnesi gibi hastalıklara ve yara iyileşmesinde bozulmalara neden olduğu bilinmektedir[75]. Obez bireylerde gerçekleştirilen operasyonlar sonrasında yara iyileşmesiyle ilgili komplikasyonların sıklığında artış olduğu rapor edilmiştir. Özellikle, obez bireylerdeki cerrahi bölge komplikasyonlarıyla sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bu komplikasyonların çoğunun, subkutanöz adipoz dokunun neden olduğu hipoperfüzyon ve iskemi sonucunda oluştuğu düşünülmektedir[76].

Sigara

Sigara içen hastalara yapılan operasyonlar sonrasında, yara iyileşmesinde gecikme, enfeksiyon, yaranın ruptüre olması, anastomotik sızıntı, yara ve flebin nekrozu, epidermolizis ve yaranın gerilmeye karşı direncinde bozulma gibi komplikasyonlar gözlenmektedir[77].

Yapılan pek çok çalışmada, sigaranın içeriğindeki zararlı maddelerden en çok nikotine odaklanılmıştır. Nikotin sempatik sinir sistemini aktive ederek, epinefrin salımına neden olur ve bu da periferel vazokonstriksiyon oluşturarak doku kanlanmasında azalmaya yol açar[78]. Sigara dumanında bulunan diğer bir zararlı gaz olan karbonmonoksit ise doku hipoksisine neden olur. Hemoglobine oksijenden 200 kat daha fazla bağlanma afinitesine sahip olan karbonmonoksit, hemoglobinlere agresif bir şekilde bağlanarak, kan damarlarındaki oksijen bağlı hemoglobin miktarının azalmasına neden olmaktadır. Bütün bu etkilerinin yanında sigara, ateroskleroz ve kronik obstruktif pulmoner hastalık riskini artırmaktadır ve bu hastalıklara sahip bireylerin dokularında ise düşük oksijen basıncı gözlenmektedir[42].

Sigaranın dokulardaki oksijen miktarını düşürücü etkilerinin yanı sıra yara iyileşme fazlarında da direkt etkileri vardır. İnflamatuar fazda, dokudaki makrofaj ve monosit sayısının azalmasına neden olmakta, lenfosit fonksiyonlarının, doğal öldürücü hücrelerin sitotoksitesini ve IL-1 üretimini deprese etmektedir. Bu etkiler ise zayıf yara iyileşmesiyle sonuçlanmakta ve fırsatçı enfeksiyon riskini artırmaktadır. Proliferatif fazda ise yara kontraksiyonunu, ekstraselüler matriks üretimini, fibroblast göçünü ve proliferasyonunu azaltmakta, epitelyal rejenerasyonu ve proteaz dengesini bozmaktadır[42, 78].

Beslenme

100 yıldan fazladır beslenmenin yara iyileşmesinde önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir. Beslenme bozuklukları ve spesifik besin eksiklikleri travma ve cerrahi işlemlerde sonra oluşan yaraların iyileşmesinde büyük bir etkiye sahip olabilmektedir[79].

Karbonhidratlar, yağlar ve proteinler

Karbonhidratlar ve yağlar, yara iyileşmesinde hücrenin enerji kaynağı olarak görev alırlar. Yağlar, başta hücre membranının sentezinde olmak üzere hücre üretiminde önemli bir role sahiptir. Karbonhidrat ve yağların eksiklikleri yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir[80].

Protein eksiklikleri, kapiller formasyonu, fibroblast proliferasyonunu proteoglikan ve kolajen sentezini etkilemektedir[42]. Protein eksikliğinde kolajen ve diğer protein yapıların sentezi için gerekli olan aminoasitlerin kullanımı kısıtlanmakta ve bu durum immün sistemin

zayıflamasına neden olmaktadır. Ayrıca arjinin, methionin ve sistein gibi aminoasitler yara iyileşmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar[81].

Eser elementler

Eser elementlerin yara iyileşmesinde önemli görevleri vardır ve eksikliklerinde optimal doku onarımı zarar görmektedir.

Magnezyum, protein ve kolajen sentezi için gerekli olan pek çok enzimde ko-faktör olarak görev alır. Bakır; sitokrom oksidaz, sitozolik anti-oksidan superoksit dismutaz ve kolajenin optimal çapraz bağlanması için gerekli enzimlerin ko-faktörüdür. Çinko, RNA ve DNA polimeraz enzimleri için ko-faktördür ve eksikliğinde yara iyileşmesinde önemli bozulmalar görülür. Demir, prolin ve lizinin hidroksilasyonunda görev alır ve eksikliğinde kolajen üretimi engellenir[79, 82, 83].

Vitaminler

A vitamini, anti-oksidan aktivitesinin yanı sıra, fibroblast aktivitesini artırır, hücresel farklılaşmayı ve proliferasyonu düzenler, kolajen ve hyaluronat sentezini artırır ve MMP aracılı ekstraselüler matriks bozulmasını azaltır[84].

C vitamini, yara iyileşmesinde birçok role sahiptir. Eksikliğinde inflamasyon sürecinde ve kolajen sentezinin hidroksilasyon basamağında aksaklıklar oluşur. C vitaminin eksikliği, kolajenin yapısını zayıflatarak yara gerilme kuvvetinin azalmasına neden olur[80].

E vitamininin, anti-oksidan, anti-inflamatuar ve skar dokusu oluşumunu önleyici etkileri vardır[79, 84].

2.2.5. Yara iyileşmesinde rol oynayan büyüme faktörleri

Yaraların kapanması, hemoraj, inflamasyon, re-epitelizasyon, granülasyon doku formasyonu ve geç remodeling fazı gibi kompleks doku hareketlerini içermektedir. Bu olaylar, tamir sürecinin aşamalarının kontrolünde önemli rollere sahip matriks proteinleri ve birçok hücre tipinin koordinasyonu ile meydana gelmektedir. Daha önce yapılmış pek çok

çalışma, vasküler endotelial büyüme faktörü (vaskular endothelial growth factor-VEGF), transforme edici büyüme faktörü (transforming growth factor-TGF- β), fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor-FGF) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (platelet derived growth factor-PDGF) gibi birçok endojen büyüme faktörünün iyileşme sürecinin koordinasyonu için polipeptitlerin düzenlenmesinde önemli olduklarını göstermektedir. Makrofajlardan, fibroblastlardan ve yaralanma bölgesindeki keratinositlerden salgılanan bu yapılar, re-epitelizasyonun, granülasyon doku formasyonunun, kolajen sentezinin ve neovaskülarizasyonun düzenlenmesini sağlarlar[12].

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)

Homodimerik glikoprotein yapısına sahip bir büyüme faktörü olan ve birçok hücre tarafından salınan VEGF, anjiojenik yolun pek çok komponentini uyarır. VEGF miktarı, kapiller büyümenin maksimuma ulaştığı, iyileşmenin ilk günleri boyunca artmaktadır[85]. VEGF, farklı sayılardaki aminoasitlerin farklı sıralarla bağlanması sonucunda oluşmuş 5 izoforma sahiptir. bunlar VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörüdür.

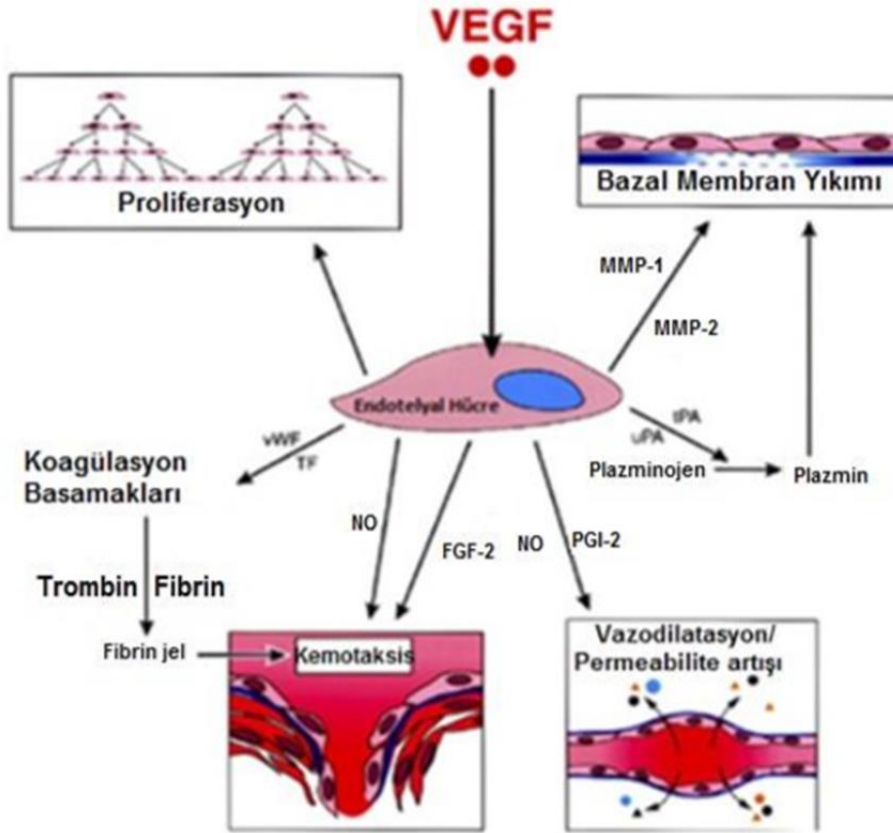
Bu ailenin baskın formu olan VEGF-A, yara iyileşme sürecinde endotelial hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri, plateletler, nötrofiller ve makrofajlar tarafından sentezlenmektedir[20].

İnsanlarda VEGF iki farklı reseptöre bağlanarak işlev görür. Bunlar; Flt-1 (VEGFR-1) ve KDR (VEGFR-2)'dir.

VEGF KDR'ye bağlanarak endotelial hücrelerin kemotaksisini ve proliferasyonunu sağlar. Flt-1 reseptörüne bağlanarak ise, vasküler geçirgenlikte artışa, nötrofil ve makrofajların kemotaksisine, vasküler düz kas hücrelerinden MMP salınımına ve anti-apoptotik proteinlerin uyarılmasına neden olur[20].

Yara iyileşmesinde VEGF'nin en önemli rolü anjiyogenezi uyarmasıdır. Anjiyogenezi, vazodilatasyon, bazal membranda bozulma, endotelial hücre göçü ve endotelial hücre proliferasyonu gibi birçok basamaktan oluşmaktadır. Bu basamakların sonrasında, paralel kapiller filizlerin anastomozunu takiben kapiller tüp formasyonu meydana gelir ve son

olarak yeni bazal membran oluşur. VEGF tüm bu süreçlerde önemli rollere sahiptir[85] (şekil 2.5) .



Şekil 2.5. VEGF'nin yara iyileşmesindeki rolü [85]

Yaralanma sonucunda dokudaki oksijen miktarının azalmasıyla, düzenleyici enzim olan HIF-1 (Hipoksi-İndüklenebilir Faktör) 'in üretiminde artış meydana gelir. HIF-1, VEGF miktarının artışı sağlayarak, yeni kan damarlarının oluşmasını, dokudaki oksijen konsantrasyonunun artmasını sağlar. Yeni kan damarları oluşup dokudaki oksijen konsantrasyonu arttığında HIF-I ve VEGF miktarları azalır[66].

Vasküler geçirgenliğin artmasında önemli etkileri olan VEGF, KDR'ye bağlanarak, nitrik oksit sentezini ve siklooksijenaz aktivitesini uyarır. NO ve prostoglandinler ise vazodilatasyon ve vasküler geçirgenliğin artışının uyarılmasını sağlar[85].

VEGF ürokinaz tipi ve doku tipi plazminojen aktivatörünün (uPA ve tPA) salınımını uyarak plazminojenin plazmine dönüşümünü sağlar. Vasküler düz kas hücrelerinden ise

MMP-1, MMP-3 ve MMP-9 salınmasına neden olur. Tüm bu enzimler bazal membranda bozulma sağlayarak, endotelial hücrelerin damar dışına hareketlerini kolaylaştırır[85].

Yaralanmanın erken safhalarında plateletler, monositler ve nötrofillerden salınarak kemotaktik ajan olarak rol oynar ve aynı zamanda diğer büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin uyarılmasını sağlar.

Tüm bu görevlerinin yanında epitelizasyonu ve kolajen depolanmasını da sağladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır[85].

Diyabetli farelerde yapılan birçok kontrollü çalışmada, insandan elde edilip kültüre edilen ve adenovirüs vektörleriyle yüksek salınımını sağlanan VEGF'ün yara bölgesine enjekte edilmesiyle, test grubunda kontrol grubuna göre yara kapanmasının hızlı olduğu rapor edilmiştir[86-89].

Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β)

TGF- β ailesi, TGF- β 1-3, kemik morfojenik proteinler (KMP) ve aktivinlerden oluşmaktadır. Memelilerdeki ana formlar olan TGF- β 1-3 içerisinden yara iyileşmesinde predominant olanı TGF- β 1'dir. TGF- β makrofajlar, fibroblastlar, keratinositler ve plateletler tarafından üretilir ve tip I ve tip II reseptörlerinden oluşan heteromerik reseptör kompleksine bağlanarak çalışır[90, 91].

Yaralanmanın başlangıcında salınımının arttığı görülen TGF- β 1, inflamasyonda, anjiyogenezde, reepitelizasyonda ve bağ dokusunun rejenerasyonunda önemli rol oynar. [92]. TGF- β 1, ilave inflamatuvar hücrelerin toplanmasını ve makrofaj aracılı debridmanı kolaylaştırmaktadır[20]. İn vitro çalışmalar, TGF- β 1'in ekstraselüler matriksle ilişkili genlerin ekspresyonunu artırarak başlangıç granülasyon doku formasyonuna yardım ettiğini göstermektedir[93]. Ayrıca, anjiyojenik büyüme faktörü VEGF'nin miktarını artırır ve kolajen matriksin fibroblast kontraksiyonunu kolaylaştırarak yaranın kontrakte olmasında önemli rol oynar [20].

Yapılan birçok çalışma, TGF- β_1 'in keratinosit proliferasyonunu inhibe ettiğini gösterse de, diğer çalışmalar özellikle yara iyileşmesinin geç dönemleri boyunca TGF- β_1 'in keratinositlerin proliferatif fenotipini artırdığını belirtmektedir[20, 94].

TGF- β_1 , yara iyileşmesinin remodeling fazında ve matriks formasyonunda, kolajen üretiminde (özellikle de tip I ve III) rol alır. TGF- β_1 , MMPlerin doku inhibitörü olan TIMP-1 miktarını artırarak MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'un inhibe olmasına neden olur ve kolajen yıkımının önlenmesini sağlar[93, 95].

TGF- β , keloid fibroblastları aktive eder ve fibrozis patogeneziinde önemli rol oynar. TGF- β_1 'in ekspresyonu bağ dokusu büyüme faktörünü (connective tissue growth factor-CTGF) uyarılmasını sağlayarak, hipertrofik ve keloid skarların oluşmasına neden olur[96].

TGF- β 'nın diğer bir izoformu olan TGF- β_2 de TGF- β_1 gibi inflamatuvar hücrelerin ve fibroblastların yara bölgesine repopüle olmasını sağlar. Anjiyogenezisi indükleyerek granülasyon doku formasyonunu uyarır ve re-epitelizasyonu hızlandırır. Matriks formasyonu ve doku remodeling aşamasında protein, DNA ve kolajen üretimini artırır. Fibroblastların yara bölgesine gelmesini uyararak kolajen depolanmasını ve skar doku formasyonunu sağlar[20].

Diğer izoform olan TGF- β_3 de inflamatuvar hücrelerin ve fibroblastların yara bölgesine repopüle olmasını sağlar ve keratinositlerin migrasyonunu kolaylaştırarak, neovaskülarizasyonu ve vasküler yapının yeniden düzenlenmesini uyarır ve diğer iki izoformun aksine skar formasyonu oluşumunu engeller[97].

Yamano ve ark[98], yaptıkları çalışmada zayıf kontrollü diyabetin ağızda oluşan yaraların iyileşmesini geciktirme nedenini değerlendirmişlerdir. Çalışmada tip II diyabetli ve sağlıklı farelerden oluşan iki grup yer almıştır. Farelerde yapılan diş çekimi sonrası 4. ve 7. günde alınan örneklerde histolojik değerlendirme ve yara iyileşmesinin anahtar faktörlerinin (tip 1 kolajen, IL-1 β , MMP-8, MMP-9, VEGF-B, TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF β_3 , TGF β RII, TGFRIII, β -glikan, β -aktin) gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Yapılan değerlendirmede 4. ve 7. günde TGF'nin tüm türleri, diyabetli farelerde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha az bulunmuştur ($p < 0.05$). Otörler bu sonuçtan yola çıkarak yara iyileşmesindeki gecikmenin TGF'deki azalmadan kaynaklanabileceğini ifade etmiştir.

Fibroblast büyüme faktörü (FGF)

Birçok fizyolojik ve patolojik olayı kontrol eden geniş bir büyüme faktörü ailesi olan FGF, keratinositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler, kondrositler ve mast hücreleri tarafından üretilir[20, 99]. Bu ailenin bir üyesi olan bazik FGF (bFGF) olarak da bilinen FGF-2, yara iyileşme sürecinde yer alan inflamatuvar hücreler, vasküler endotelyal hücreler ve fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir. FGF-2, endotelyal hücrelerin proliferasyonunu, diferansiyasyonunu ve VEGF ekspresyonunu uyararak anjiogenezisi teşvik etmektedir[100]. Granülasyon dokusunun yapımı ve reepitelizasyonu hızlandırarak yara iyileşmesine katkı sağlamaktadır[20].

Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)

Primer olarak hücreleri bölünmeye yönlendiren PDGF, başta trombositler olmak üzere, monositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler, makrofajlar, kemik matriksi, keratinositler gibi farklı hücre tipleri tarafından üretilir. Belirli hücrelerin PDGF'ye yanıt oluşturabilme kapasitesi bu reseptörlerin varlığına ve hücre yüzeylerindeki reseptör sayısına bağlıdır. Mitojenik ve kemotaktik aktiviteleri yoluyla PDGF, bağ doku oluşumunu uyararak yara iyileşmesinde önemli rol oynar[101].

2.2.6. Yara iyileşmesinde kullanılan topikal kemoterapötik ajanlar

Ağız ortamı, periodontal işlemler sırasında meydana gelen yaraların, özellikle de sekonder yara iyileşmesine bırakılmış olanların, iyileşmesi için zor bir ortamdır. Çiğnemeyle oluşan travma, ağız ortamının oldukça geniş kommensal florası ve operasyon sonrası mekanik temizliğin zorlaşmasına bağlı olarak artan mikrobiyal dental plak, normal iyileşme sürecini bozabilmektedir[5].

Plak kontrolünün sağlanması ve oral hijyenin idamesi, başta sekonder iyileşmeye bırakılan yaralar olmak üzere tüm ağız cerrahisi işlemlerinin başarısını belirleyen önemli faktörlerden biridir[102]. Etkili bir plak kontrolü sağlanamadığında, plakta bulunan bakteri ve endotoksinleri, IL-1, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin uzaklaştırılmasını geciktirerek

inflatuar fazın uzamasına ve yara iyileşmesinin yavaşlamasına neden olmakta, bununla birlikte post-operatif konforsuzluk ve ağrı meydana gelmektedir [42, 102].

Cerrahi işlemler sonrası kullanılan kemoterapötik ajanlar plak akümüasyonu azaltarak, post-operatif ağrı, kanama, doku ödemi ve yara iyileşmesinde gecikmeleri önlemektedir. Bu amaçla yapılan araştırmalarda bisguanidin klorheksidin diglukonat (Corsodyl®, Klorhex®), fenolik bileşikler (Listerine®), ağır metal tuzları, stanöz florid (Meridol®) ve H₂O₂ gibi maddeler kullanılmıştır[5, 103]

Uygun antimikrobiyal tedavi ile mikrobiyal floranın baskılanması ve uygun yara bakımıyla iyileşme sürecinin hızlandırılabilceğı düşünülmesine rağmen yara iyileşme süresini kısaltmak amacıyla kullanılan mevcut kemoterapötik ajanlarla istenilen sonuçlar elde edilememiştir[7]. Yapılan çalışmalarda, klorheksidin, sodyum hipoklorit, povidon iyodür, hidrojen peroksit gibi kimyasal ajanların epitelyal hücreler ve gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri olduğı gösterilmiştir[7, 8].

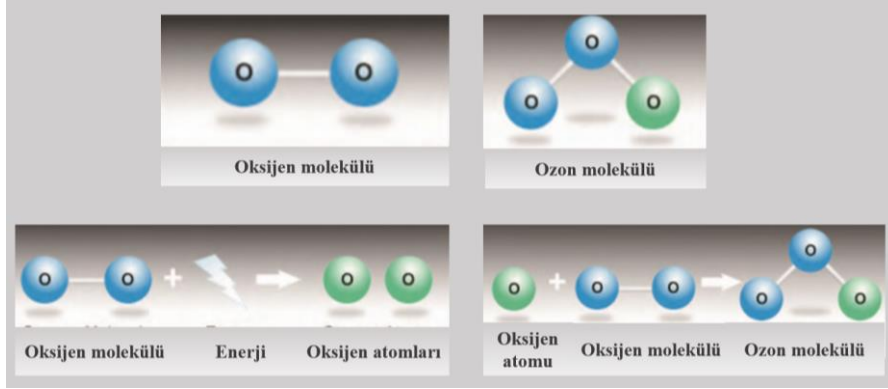
Yara iyileşme süresinin kısılması için ek olarak farklı kemoterapötik ajanlar da kullanılmıştır. Hyoluronik asidin(HA) topikal olarak kullanıldığı çalışmaların sonuçları incelendiğinde, bazı çalışmalarda HA kullanımı ile yara iyileşme süresinin kısaldığı, bazılarında ise HA ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçların elde edilemediğı görülmüştür[9, 102].

Yaraların iyileşme sürecinde topikal olarak kullanılabilen diğeri bir ajan da “ozon”dur. Ozon son yıllarda antimikrobiyal özelliğı ve yara iyileşmesini hızlandıran mediatörleri artırabilmesi nedeniyle tercih edilmeye başlanmıştır[12, 103].

2.3. Ozon

Ozon; oksijenin, atmosferde doğal olarak meydana gelen allotropik bir formudur ve doğada, ultraviyole ışınların oksijen atomlarını geçici olarak üçlü gruplar halinde rekombine

etmesiyle oluşur. Kararsız bir gaz olan ozon, 1 oksijen molekülünü vererek hızla oksijen gazına dönüşür(Şekil 2.6)[10].



Şekil 2.6. Ozonun oluşumu [104]

Ozon gazını veya ozonlanmış suyu diş hekimliği pratiğinde kullanmayı düşünen ilk kişi olan İsviçreli diş hekimi Dr. E. A. Fisch, 1930'lu yılların başında ozonlanmış suyu dezenfektan olarak kullanmıştır[105].

Medikal kullanım amacıyla oksijenden ozon üretimini sağlayan ozon jeneratörünü ilk tasarlayanlar Alman fizikçi ve hekim Joachim Hansler ve Alman hekim Hans Wolff'tür ve tasarımları halen modern jeneratörlerin temelini oluşturur[10].

Ozonun insan vücudu üzerindeki çeşitli etkileri, diş hekimliğinde pek çok alanda kullanılmasını sağlamıştır. Bu etkiler;

- Antimikrobiyal etki
- İmmün sistemi uyarıcı etki
- Antihipoksik etki
- Biyosentezi artırıcı etki
- Büyüme faktörlerini artırıcı etki
- Nitroz oksit (NO) gibi vazodilatatör maddelerin salınımını uyarması. (Bu maddeler ise anjiogenezi uyarır.)
- Dişin remineralizasyonunu ve dentin tübüllerinin kapanmasını sağlamasıdır[10].

2.3.1. Ozonun kullanım şekilleri

Ozon, tıpta ve diş hekimliğinde genel olarak 3 şekilde kullanılır[10].

- Distile su içerisinde çözünmüş ozonun uygulanması
- Ozon gazının direkt olarak kullanılması
- Çeşitli bitkisel yağlar içerisinde çözünmüş ozonun uygulanması

Ozonlanmış su, 75 µg/ml ozon gazının distile su içinde çözünmesiyle elde edilir ve elde edilen çözelti dilüe edilerek çeşitli konsantrasyonlarda kullanılabilir[103]. Distile su içerisinde çözünmüş ozon, bakteri, mantar ve virüslere karşı oldukça etkilidir[106].

Gaz formundaki ozonun ozonlanmış sudan daha fazla antimikrobiyal etkisi olduğunu belirten çalışmalar vardır. Oizumi ve arkadaşlarının ozonlanmış su ve gaz formunda ozon uygulamasının *Streptococcus mutans*, *Streptococcus aureus* ve *Candida albicans* üzerine etkisini değerlendirdikleri kontrollü çalışmada bakterisit etki ozon gazında daha fazla bulunmuştur[107].

Yapılan başka bir çalışmada ise ozonlanmış suyun ozon gazından daha biyoyumlu olduğuna dikkat çekilmiştir[8]. Huth ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ozonun çeşitli kullanım formlarının oral hücrelere etkisini, diğer antimikrobiyallerle karşılaştırarak değerlendirmişlerdir [8]. Çalışmada insan epitel hücreleri ve gingival fibroblastları hücre kültürüyle üretilmiş ve üretilen hücrelerden test grubunda olanlara 1 dk boyunca gaz formunda ozon (0,2-53 µg/ml), sıvı formda ozon (1,25-20 µg/ml), klorheksidin (%2, %0,2), H₂O₂ (%3) veya NaOCl (%5,25,%2,25) uygulanmış, kontrol grubundakilere ise 24 saat boyunca lokal metranidazol uygulaması yapılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra hücre miktarları ve canlılıkları değerlendirilmiş ve sıvı formdaki ozon uygulanan grupta, epitel ve fibroblast sayısında önemli bir fark bulunmamıştır. Her iki yoğunlukta klorheksidin uygulanan gruplarda epitel hücrelerinde önemli bir azalma görülmüştür ancak %0,2 yoğunlukta klorheksidin fibroblast sayısı üzerine önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Ozon gazı, H₂O₂ ve NaClO uygulamasında ise hem epitel hem de fibroblast sayılarında anlamlı azalmalar olmuştur. Sıvı formdaki ozonun, klorheksidin, H₂O₂ ve NaClO'den daha az sitotoksik ve daha fazla biyoyumlu olduğu belirtilmiştir.

Ozon gazının direkt olarak uygulanması

1930'lu yılların başında, intraoral olarak ozon, suyun içinde ya da ozonlanmış yağ olarak kullanılmış, gaz formunda kullanımı güvenli olmadığı için önerilmemiştir. Ancak günümüzde cerrahi emici sistemlerinin ve kullanılan ozon cihazlarının gelişmesiyle birlikte özellikle diffüzyonun önemli olduğu durumlarda güvenle kullanılabilir[10].

Gaz formda ozonun ayakta oluşan diyabetik yaralara iyileştirici özelliği olduğu bilinmektedir. Martínez-Sánchez ve arkadaşlarının diyabet nedeniyle ayakta oluşmuş yaralarda ozonun iyileştirici etkisini inceledikleri araştırmaya katılan 101 hastadan 52'si gaz formunda ozonla, 49'u ise topikal ve sistemik antibiyotik kullanımı ile tedavi edilmiştir. [108]. İyileşme boyunca, yara boyutundaki değişimler standardize edilmiş dijital fotoğraf makinesi yardımıyla değerlendirilmiş ve ozon kullanılan grupta, antibiyotik kullanılan gruba göre yara boyutundaki küçülmenin, istatistiksel olarak önemli miktarda daha fazla olduğu belirtilmiştir($p \leq 0.05$). Ozon gazının bu özelliği ile ağız bölgesindeki cerrahi işlemler sonrasında da yara iyileşmesine olumlu etki sağlayacağı düşünülmektedir[2].

2.3.2. Periodontolojide ozon kullanımı

Ozon terapisi, periodontal dokular üzerindeki çeşitli etkileri nedeniyle, diş hekimliğinin birçok alanında olduğu gibi, periodontolojide de kullanılmaktadır. Bunlar,

- Antimikrobiyal etkisi
- Yara iyileşmesi üzerine etkisi
- Dişler üzerine hassasiyet giderici etkisidir[10].

Antimikrobiyal etkisi

Gaz veya sıvı formdaki ozonun, bakteri, mantar, protozoa ve virüslere karşı güçlü antimikrobiyal etkisi olduğu bilinmektedir[107].

Ozon bakteri hücre membranına ozonoliz yoluyla zarar verir ve hücre içi proteinleri okside ederek organel fonksiyonunun kaybına neden olur. Fakat bu durum mikrobiyal hücrelere özgüdür. Sahip oldukları süperoksit dismutaz, katalaz, hidrolaz gibi serbest radikal temizleyicileri, C, E vitaminleri, beta-karoten gibi antioksidan besinler, selenyum, metiyonin

ve glutatyon gibi serbest radikallerin kontrolsüz aktivitelerini inhibe eden maddeler nedeniyle sağlıklı insan vücut hücrelerini etkilemez.[105].

Ozonun antimikrobiyal etkinliği, oluşturduğu asidik pH'a sahip çevre ile artmakta, antibiyotik dirençli suşlar üzerine oldukça etkili olmaktadır[109].

Viral infeksiyonlarda, ozon enfekte olmuş hücreyi peroksidaza duyarlı hale getirir ve ters-transkriptaz enziminin aktivitesini değiştirerek viral protein sentezini engeller[110].

Ozon, immünitesi güçlü olmayan ve immün yetmezliği olan hastalarda, makrofaj aktivasyonu ve sitokin salınımı yoluyla immün sistemi yeniden aktive eder[105].

Ozonun antimikrobiyal etkinliği üzerine yapılan çalışmaların birçoğunda ozon bakteriler üzerine oldukça etkili bulunurken diğerlerinde bakteriler üzerine etkili olmadığı veya yeterli etkisi bulunmadığı görülmüştür[111, 112].

Baysan ve arkadaşları yaptıkları in vitro çalışmada ozon cihazı (Healozone, Kavo, USA) kullanılarak elde edilen ozonlanmış suyun ve ozon gazının kök çürüğü lezyonlarına, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sabrinus*'a etkisini değerlendirmişlerdir[111]. Çalışmanın ilk kısmında kök çürüğü olan yeni çekilmiş dişlerden test grubunda yer alanların çürük lezyonları üzerine 10 veya 20 saniye ozonlanmış su uygulanmış, kontrol grubunda yer alanlara ise herhangi bir ek uygulama yapılmamıştır. İkinci kısmında ise deneysel olarak üretilen mikroorganizma kültürlerinden test grubunda yer alanlara 10 veya 20 saniye ozon gazı uygulanmış, kontrol grubunda yer alanlara ise herhangi bir ek uygulama yapılmamıştır. Her iki değerlendirme sonucunda da 10 veya 20 saniyelik ozon uygulamasının kontrol grubuna göre daha etkili olduğu görülmüştür. ($p<0000,1$)

Nagayoshi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ozonlanmış suyun (0.5-4 mg/l) dental plak ve mikroorganizmalar üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada ozonlanmış suyun gram (+) ve gram (-) bakteriler üzerine oldukça etkili olduğu bulunmuştur[11]. *Porphyromonas endodontalis* ve *Porphyromonas gingivalis* gibi gram (-) bakterilerde, streptokoklar gibi gram (+) bakterilere ve *Candida albicans* 'a göre daha etkili olduğu görülmüştür. Bunlarla birlikte ozonlanmış suyun plak biyofilmi içerisindeki bakterilere karşı güçlü bakterisidal

etkisi olduğu ve in vitro ortamda deneysel dental plak akümülayonunu engellediği dikkati çekmiştir.

Müller ve arkadaşları yaptıkları in vitro çalışmada, çok tür içeren (*Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sabrinus*, *Streptococcus oralis* ve *Candida albicans*) oral biyofilm üzerine ozon gazının (60 saniye), fotodinamik terapinin (60 saniye) ve iyi bilinen antiseptiklerin (% 0,2 ve %2 klorheksidin, %0,5 ve %5 hipoklorit solüsyonları) etkilerini değerlendirmişlerdir[112]. Gaz formunda ozonun üretiminde Healozone® (Kavo Dental, Biberach/Riss Almanya) kullanılmıştır. Araştırmacılar biyofilm içerisindeki matrikste bulunan mikrobiyal popülasyonun antimikrobiyallere karşı iyi korunduğu sonucuna varmışlardır. Çalışmada sadece %5 hipoklorit solüsyonu tüm bakterileri elimine ederken, ozon gazının ve fotodinamik terapinin biyofilm içerisindeki bakterileri tamamen elimine edemediği görülmüştür. Ozon gazı, fotodinamik terapi ve %0,2'lik klorheksidinin mikroorganizmalar üzerine diğer kullanılan antiseptiklere göre daha az etkili olduğu bulunmuştur(p=0.05).

Huth ve arkadaşlarının ozonun periodontopatojenlere karşı etkisini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, dondurulmuş kurutulmuş mikroorganizmaları (*A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, ve *P. micra*) tekrardan kültüre ederek kullanmışlardır. Planktonik mikroorganizmalar ve biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar ayrı ayrı değerlendirilmiştir[103]. 1 dk boyunca çeşitli konsantrasyonlarda gaz formunda ozon (1-53 g/m³) sıvı formda ozon (1,25-20 µg/ml) ve klorheksidin (%0,2-2) kullanılmıştır. Düşük konsantrasyondaki sıvı ozon %2'lik klorheksidinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az etkili bulunmuştur. 4g/m³'lük konsantrasyonun üstündeki ozon gazının, % 2'lik klorheksidinle benzer etkiye sahip olduğu görülmüştür. Planktonik mikroorganizmalar ve biyofilm içerisindeki mikroorganizmalara karşı yüksek konsantrasyonda sıvı ozon (20µg/ml) ve 4 g/m³' ün altındaki ozon gazı, %.0,2'lik klorheksidinden anlamlı derecede daha etkili bulunmuştur. Kullanılan hiç bir antimikrobiyal ajanla, biyofilmdeki *A.actinomycescomitanslar* tamamen elimine edilememiştir. Biyofilm içerisinde bulunan *P. gingivalis*, *T. forsythia* ve *P. micra* ise %2'lik klorheksidin veya 53 g/m³ ozon gazı ile tamamen elimine edilebilmiştir.

Ozonun antimikrobiyal özelliği sayesinde, periodontitis hastalarında kök kazıma ve düzeltme işlemlerini takiben özel uçlar yardımıyla cep içine yapılan ozon uygulanması, cep içindeki periodontopatojenlere karşı etki sağlamaktadır[113].

Iliadis ve arkadaşlarının daha önce subgingival ve supragingival diş taşı temizliği ve oral hijyenin iyileştirilmesini kapsayan konvansiyonel yöntemlerle tedavi edilip sonuç alınamayan ceplere sahip 25 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, ozon gazının inatçı cepler üzerine etkisi değerlendirilmiştir[114]. Konvansiyonel periodontal tedavi sonrası ceplere antimikrobiyal özelliğe sahip bir madde olan ozon gazı (Ozotop®, TTT Switzerland) uygulanmış, en derin 6 cebin tedavi öncesi ve sonrasındaki (6. hafta ve 3. ay) temel periodontal durum incelemesi yapılmıştır. İnceleme sonucunda cep derinliklerinde önemli miktarda azalma olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

Yara iyileşmesi üzerine etkisi

Yara iyileşme sürecinde, granülositler yara çevresinde, yara iyileşmesini bozan ROS üretmekte ve oksidatif stresi artırmaktadır[115, 116]. Ancak kontrollü yapılan ozon uygulamasının oksidatif strese karşı koruyuculuk sağladığı düşünülmektedir[117].

Ozon yara yüzeyiyle temasa geçtiğinde doymamış yağ asitleriyle (PUFAs) reaksiyona girerek hidrojen peroksit gibi ROS oluşturur. Hidrojen peroksitin toksik olduğu düşünülür ancak yüksek dozda toksik olan bir maddeye kısa bir süre için maruz kalma vücudun savunma tepkilerini uyarır. Bu olgu “hormesis” olarak bilinir. Ozon tarafından üretilen az miktardaki lipid peroksidasyon ürünleri ve ROS, vücudun intrinsek antioksidan sistemini harekete geçirerek, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutein pekoksidad gibi antioksidanların artışı sağlar. Yara dokusundaki antioksidanların artışı ise iyi bir yara iyileşmesinin belirtisi olarak görülmektedir [2, 116].

Ozonun doymamış yağ asitleriyle girdiği tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini, NFkB gibi redoks transkripsiyon faktörleri yoluyla VEGF gibi büyüme faktörlerinin ve siklin D1 gibi pro-proliferatif mediatörlerin salımını indüklediği ve hücre siklusunu hızlandığı kabul edilmektedir[118].

Yapılan çalışmalarda ozonun yaradaki kolajen miktarını artırarak gerilmeye karşı daha dirençli bir doku oluşturduğu gösterilmiştir. Bu durumun ozonun PDGF, TGF- β ve siklin D'yi etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir[116].

Martínez-Sánchez ve arkadaşları diyabet nedeniyle ayakta oluşmuş yaralarda ozonun iyileştirici etkisini incelemişlerdir. Araştırmaya katılan 101 hastadan 52'si gaz formunda ozonla, 49'u ise topikal ve sistemik antibiyotik kullanımı ile tedavi edilmiştir. İyileşme boyunca, yara boyutundaki değişimler standardize edilmiş dijital fotoğraf makinesi yardımıyla değerlendirilmiş ve diyabete bağlı oluşan komplikasyonların bir belirtici olan oksidatif stresin biyokimyasal işaretleri (ROS) incelenmiştir[108]. Çalışmanın başlangıcında tüm gruplarda yüksek oksidasyon ürünü protein miktarının fazla olduğu görülmüştür. Tedavi sonunda protein miktarındaki azalmanın, ozon kullanılan grupta daha fazla olduğu izlenmiştir ($p < 0.05$). Antioksidan enzimler olan glutatyon pekoksidad, süperoksit dismutaz ve katalazın tedavi sonundaki artışı ozon kullanılan grupta, antibiyotik kullanılan gruba göre daha fazla bulunmuştur. Tedavi sonunda ozon kullanılan grupta, antibiyotik kullanılan gruba göre yara boyutundaki küçülmenin, istatistiksel olarak önemli miktarda daha fazla olduğu belirtilmiştir ($p \leq 0.05$). Çalışmanın sonunda ozonun oksidatif stresi azaltarak diyabete bağlı oluşan komplikasyonların azalmasını sağladığı vurgulanmıştır.

Koca ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, önceden uygulanan hiperbarik oksijen (HBO) ve ozon tedavisinin, ratların kemiklerinde turnike yoluyla oluşturulan iskemi-reperfüzyon (I/R) yaralarına¹ etkisini değerlendirmişlerdir[117]. Çalışmada 32 adet rat kullanılmış ve denekler 4 gruba ayrılmıştır. 1. gruba herhangi bir işlem uygulanmamış, 2. grupta sadece I/R yarası, 3 gruba HBO + I/R yarası, 4. gruba ise ozon +I/R yarası oluşturulmuştur. Çalışma sonunda I/R yaralanması oluşturulan bütün gruplarda oksidatif stresin belirteçleri olan melondialdehit (MDA) ve protein karbonil (PCO) seviyelerinde artış olduğu görülmüştür. Önceden ozon ve HBO tedavisi uygulanan gruplarda, yaralanma sonrası MDA ve PCO seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli miktarda daha az bulunmuştur ($p < 0,01$). Antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri ise ozon ve HBO tedavisi uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,01$). Araştırmacılar, kontrollü ozon uygulamasının, dokuların oksidatif

¹ İskemi sonrası dokuların reperfüzyon sürecinde, oksijenlenen kan, kan hücrelerinin sekestrasyonuna neden olur ve oksidanların aktivitesi ve miktarı artar. Reperfüzyon, ROS ve sitokin salınımına neden olarak iskeminin zararlı etkisini artırır. Bu fenomene I/R yaralanması denir.

strese adaptasyonunu sağladığı, ozon etkisiyle oluşan SOD ve GSH-Px seviyelerindeki artışın, oksidatif strese karşı koruyucu etkiye neden olduğu yorumunu yapmıştır.

Campanati ve arkadaşları yaptıkları çalışmada topikal ozonlanmış yağ uygulamasının ikinci dereceden yanıkların üzerine etkisini topikal hyaluronik asitle karşılaştırarak değerlendirmişlerdir [120]. 30 hasta üzerinde yapılan çalışmada her gün her bir yanığın yarısına ozon yağı diğer yarısına ise hyaluronik asit uygulanmıştır. 6. ve 12. haftalarda yapılan inceleme sonrasında kızarıklık, gerilim, kaşıntı ve yanma hissi bakımından iki madde arasında bir fark bulunamamıştır. Ancak lezyon sonrası hiperpigmentasyon oluşumunun engellenmesinde ozonlanmış yağ uygulamasının hyaluronik asit uygulamasına göre daha etkili olduğu görülmüştür. ($p<0,05$)

Zhang ve arkadaşları tip 2 diyabetli ve diyabetik ayak ülseri olan 50 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada non-invaziv oksijen-ozon terapisinin etkinliğini değerlendirmiştir [121]. Çalışma sonunda deney grubundaki hastalarda, kontrol grubundakilere göre 20. günde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla yara kapanması elde edilmiş ($p<0.001$), 11. gündeki VEGF, TGF- β ve PDGF ekspresyonu test grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla bulunmuştur ($p<0.001$).

Yıldırım ve arkadaşlarının 63 rat üzerinde yaptıkları çalışmada, HBO ve ozon tedavisi uygulanmış gruplarda kontrol grubuna göre inflamasyon belirteçlerinde ve ödem miktarında önemli miktarda azalma olduğu görülmüştür ($p<0,001$) [66].

Valacchi ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları çalışmada farklı oranlarda ozon içeren susam yağının yara iyileşmesi üzerine etkisi değerlendirilmiştir [118]. Her bir farenin sırtında 6 adet yara oluşturularak yaraların birincisine sadece susam yağı, ikincisine düşük yoğunlukta ozonlanmış yağ (949 ± 33 mEq/1000 g), üçüncüsüne orta yoğunlukta ozonlanmış yağ (1631 ± 64 mEq/1000 g), dördüncüsüne yüksek oranda (3170 ± 101 mEq/1000 g) ozonlanmış yağ uygulanmıştır. Beşinci ve altıncısına ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Her bir gruptaki yaralardan 0, 3, 7, 14. günlerde örnek alınmış ve yara kapanma oranı, VEGF ve siklin D1 miktarı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak ilk 7 günde orta yoğunlukta ozonlanmış yağ uygulanan yaralarda diğer tüm gruplara göre daha hızlı yara kapanma oranı, daha yüksek anjiyogenez, VEGF ve siklin D1 gözlenmiştir ($p<0,001$). Ozonun olumlu etkilerinin doza bağlı olduğu vurgulanmıştır.

Pai ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, ozonun yara iyileşmesi üzerine etkisi değerlendirilmiştir [116]. Her birinin sırtında yara oluşturulan ve rastgele olarak dört gruba ayrılan ratlardan birinci gruptakilere sadece susam yağı, ikinci gruptakilere framycetin (0,5 g/gün), üçüncü gruptakilere düşük doz ozonlanmış susam yağı (500 mEq/1000 g), dördüncü gruptakilere ise yüksek doz ozonlanmış susam yağı (700 mEq/1000 g) uygulanmıştır. Uygulama her gün yapılmış ve 12. güne kadar devam etmiştir. 12. günde yapılan incelemede, yara kontraksiyonunun yüksek dozda ozonlanmış yağ kullanılan grupta, sadece yağ ve framycetin kullanılan gruplara göre daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Hem yüksek doz hem de düşük doz ozonlanmış yağ uygulanan yaralarda, sadece yağ ve framycetin uygulanan yaralara göre gerilmeye karşı direncin ve kolajen miktarının daha fazla olduğu dikkati çekmiştir ($p<0,05$).

Ozon, plazmadaki hidrojen peroksit gibi ROS miktarlarını artırarak antioksidan enzim ekspresyonu gibi çeşitli defans mekanizmalarını uyarır. Hidrojen peroksit, kandaki 2-3 difosfogliserat seviyesini artırarak hemoglobinin oksijen ayrılmasını kolaylaştırır ve sonuç olarak dokuda oksijenin serbest kalmasını sağlar. Bu durumdan, ozonun biyokimyasal olarak doku oksijen basıncını artırdığı yorumu yapılabilir [66]. Bununla birlikte ozon, birçok proinflatuar genin (IL-8, TNF- α , TGF- β , VEGF) ve adezyon molekülünün (ICAM, VCAM) aktivatörü olarak rol oynayan nükleer faktör kappa B (NFkB) gibi redoks duyarlı transkripsiyonel faktörleri aktive edebilmektedir[17, 57].

Kim ve arkadaşlarının kobaylar üzerinde yaptıkları araştırmada, topikal olarak uygulanan ozonlanmış yağın akut yaralar üzerine iyileştirici etkisi değerlendirilmiştir [12]. Çalışmada 16 kobay yer almış ve her bir kobayın bacağına punch yardımıyla 6 mm çapında 4 adet yara oluşturulmuştur. Yaralardan ikisine her gün 2 damla ozonlanmış yağ, birine her gün saf zeytin yağ uygulanmış, birine ise herhangi bir ek uygulama yapılmamıştır. Operasyonu takip eden 3,7 ve 10. günlerde oluşturulmuş yaralardan eksizyonel biyopsi ile örnekler alınmış ve bu örneklerin histolojik ve immünohistokimyasal incelemesi yapılmıştır. Histolojik incelemede, 7.günde ozon grubunda kolajen lifler ve fibroblast hücre sayısında daha fazla artış olduğu görülmüştür($p\leq 0.05$). İmmünohistokimyasal incelemede ise 7. günde ozon grubunda daha fazla miktarda PDGF, TGF- β ve VEGF sentezlendiği belirtilmiş ancak istatistiksel bilgi verilmemiştir. Araştırmacılar, çalışmanın sonucunda, ozonlanmış yağın

topikal olarak kullanılmasının, PDGF, TGF- β ve VEGF'yi artırarak, akut yara iyileşmesini hızlandırabileceğini ifade etmiştir.

Patel ve arkadaşlarının ozon yağının serbest diş eti grefti elde ettikleri palatal bölgedeki yaranın reepitelizasyonu üzerine etkisini değerlendirmişlerdir [2]. Araştırmada, serbest dişeti operasyonu yapılan 18 hasta yer almıştır (test grubu:8, kontrol grubu:10). Palatal greftler 9x10 mm genişliğinde 2 mm derinliğinde standardize edilerek alınmış, sonrasında test grubuna 1 hafta boyunca her gün 14 μ g/ml konsantrasyonda 2 ml ozon yağı uygulanmıştır. Ameliyat öncesi, ameliyat sonrası, 24. saat, 5. ,7. ,14. ,21. , 28. günlerde standardize edilmiş dijital fotoğraflar çekilerek yaraların boyutundaki değişiklik incelenmiştir. Epitelyal keratinizasyon, rejenerasyon ve dejenerasyonun sitolojik incelemesi için, bölgeden steril ara yüz fırçaları yardımıyla, operasyon öncesi, 24.saatte, 3. ,7. ,14. , 21.günlerde, 2.ve 3.aylarda smear alınmış, örnekler “Hızlı PAP boyama tekniği” (papanicalaou tecnique) ile boyanmıştır. Planimetrik incelemede 24. saatte önemli bir değişiklik olmazken, 5. , 7. ,14. ,21. ve 28. günlerde test grubunda, kontrol grubuna göre yara boyutunda daha hızlı bir küçülme görülmüştür. ($p \leq 0.05$) Yapılan sitolojik incelemede keratinizasyon ve yüzeyel hücre indekslerinde, 7. ve 21. günlerde test grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli miktarda daha hızlı bir artış gözlenmiştir. ($p \leq 0.001$)

Dişler üzerine hassasiyet giderici etkisi

Ekpoze olmuş kök yüzeyindeki smear tabakası, kalsiyum ve flor iyonlarının dentin tübülleri içine penetre olmasını önlemektedir. Ozon, bu smear tabakasını uzaklaştırır, dentin tübüllerini açar, genişliklerini artırır, kalsiyum ve flor iyonlarının dentin tübülleri içine kolayca daha derinlere etkili bir biçimde girmesini sağlar ve sonuç olarak dentin tübüllerini tıkar. Ozonun bu etkisi sayesinde dentin hassasiyetini etkili bir şekilde azaltabileceği ve bu etkinin uzun süre devam edebileceği düşünülmektedir[122]. Ozon gazının dentin hassasiyeti üzerine etkisini değerlendiren kontrollü klinik çalışmalar incelendiğinde, ozon gazı kullanılan dişlerde dentin hassasiyetinde azalma meydana geldiği ancak kontrol ve deney grubu arasında önemli farklılıklar olmadığı görülmektedir[123, 124].

Ozonun tüm bu özelliklerinin dışında, cerrahi işlemlerden sonra oluşan ağrı üzerine de olumlu etkisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Kazancıoğlu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 20 yaş diş çekimlerinden sonra oluşan şişlik, ağrı ve postoperatif konforsuzluk

üzerine ozon gazının etkisini değerlendirmişlerdir [125]. 60 hastanın yer aldığı çalışmada her bir hastanın 2 tane alt 3. molar dişi 2 hafta arayla çekilmiş, rastgele seçilen bir tarafın çekiminden hemen sonra, 1, 3, 5. ve 7. günlerde özel bir cihaz yardımıyla (Ozonytron® MIOInternational, GmbH, Germany) ozon gazı uygulanmış (test grubu), diğer tarafa ise plasebo uygulaması yapılmıştır (kontrol grubu). 1, 3, 5 ve 7. günlerde yapılan değerlendirme sonucunda ozon gazının trismus ve şişlik üzerine belirgin etkisi görünmezken, ozon gazı uygulanan bölgedeki çekimden sonra hastalar diğer bölgelerine göre istatistiksel olarak daha az ağrı sorunu yaşamış ve daha az analjezik kullanma ihtiyacı hissetmiştir ($p<0,05$). Ozon tedavisiyle ağrının azalmasının, ozonun ağrı reseptör hücreleri üzerine membran stabilize edici etkisinden kaynaklı olabileceği, algopeptitlerin (hasarlanmış dokudan beyine ağrı uyarılarının ulaşmasına yardım eden peptitler) ozon aracılığıyla okside olması sonucunda ağrının azaldığı düşünülmektedir[126].

2.3.3. Ozon jeneratörleri

Ozon üretimi için kullanılan jeneratörler, atmosferik gaz veya medikal oksijen tüpleri kullanarak ozon üretebilmektedir. Eğer ozon jeneratöründe saf oksijen kullanılırsa sadece ozon üretilir, ancak atmosferik gaz kullanılırsa, atmosferdeki diğer bileşikler ve moleküller de değişime uğrayarak ozon ile birlikte OH^- , H_2O_2 , NO_x , gibi radikallerden oluşan kimyasal bir kokteyl oluşacaktır[127, 128].

3 tip ozon jeneratörü vardır [10, 104]. Bunlar;

- Ultraviyole sistem
- Corona deşarj sistem
- Soğuk plazma sistemidir.

Medikal ve dental kullanım için ozon üretimi genellikle “Corona Discharge Sistem” ve “Soğuk Plazma Sistemi” ile sağlanmaktadır[10, 110]

Ultraviyole sistem

Ultraviyole sistem kullanılan jeneratörlerde, havadaki diatomik oksijeni moleküler oksijene çevirmek ve sonrasında havadaki diatomik oksijenle birleştirip ozon elde etmek için gerekli

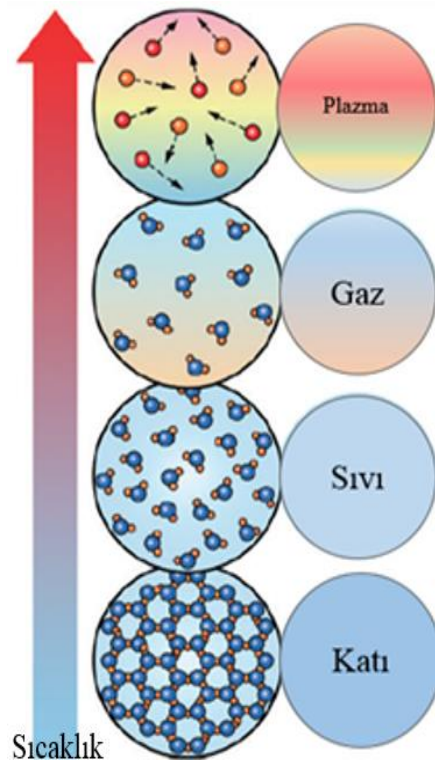
ultraviyole ışık dalgasını üretme amacıyla bir plazma tüp kullanılır[128]. Daha çok havanın temizlenmesi amacıyla kullanılan bu sistemle düşük konsantrasyonda ozon üretilir [129]

Corona deşarj sistem:

Ozon, yüksek voltaj elektrodu ve düşük voltaj elektrodu arasındaki yüzey deşarj fenomeni kullanılarak üretilir. Bu fenomen, iyonize havayı alet boyunca ve iki elektrot arasından geçmeye zorlamaktadır[128].

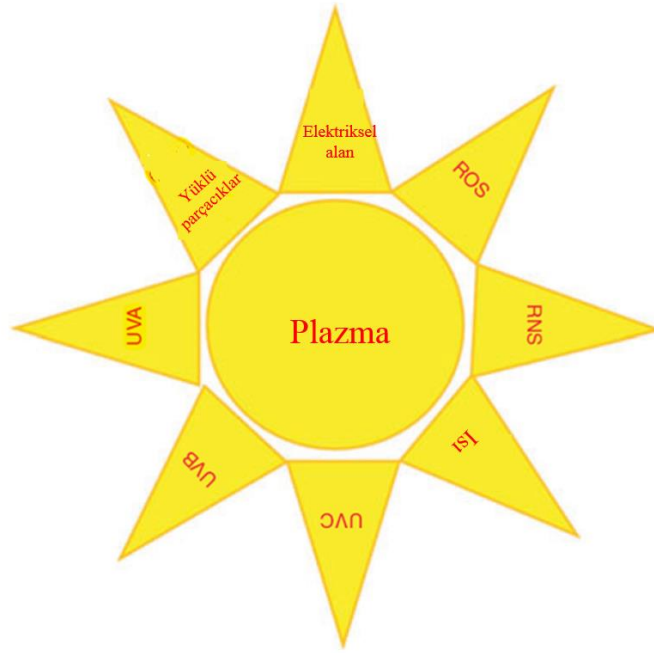
Soğuk plazma sistemi:

Plazma, yeterli miktarda enerji uygulandığında atom ve moleküllerden elektronların ayrılması sonucunda meydana gelmektedir(Şekil 2.7)[127].



Şekil 2.7. Maddenin halleri[130]

Oluşan plazmanın içeriğinde reaktif nitrojen parçaları, reaktif oksijen parçaları, elektriksel alan, yüklü parçacıklar, ısı, UVA (Ultraviyole A), UVB ve UVC yer almaktadır (Şekil 2.8) [127].



Şekil 2.8. Plazmanın içeriği[131]

Tıpta ilk plazma uygulamalarında “Termal Plazma” ($>80^{\circ}\text{C}$) kullanılmış ve konu ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda plazmanın termal özelliklerine odaklanılmıştır. Termal plazmalar dokuların uzaklaştırılması, kesilmesi, koterizasyonu ve medikal enstrümanların sterilizasyonu amacıyla uygulanmıştır[131, 132].

Günümüzde ise medikal kullanımda çoğunlukla “Non-termal Plazma” özellikle de “Soğuk Atmosferik Plazma” kullanılmakta ve çalışmalarda da daha çok plazmanın termal olmayan özelliklerine odaklanılmaktadır[131]. Bu plazmaların “soğuk” olarak adlandırılmasının sebebi taşıyıcı gazların (argon, helyum, hava vs.) iyonize olup, iyonların sıcaklığının saliseler içerisinde çok hızlı bir şekilde oda sıcaklığının altına düşmesidir[127]. Plazmanın etkisi için önemli olan faktör, pozitif veya negatif yüklü Ar^+ , N_2^+ gibi aktif iyonların akışı ve kararsız plazma reaksiyonları sonucu oluşan O_3 , OH , H_2O_2 , NO ve OH radikalleri gibi yüksüz atom parçaları ve moleküllerinden oluşan kimyasal kokteyldir[127].

Soğuk Atmosferik plazmanın; direkt ve indirekt olmak üzere iki çeşidi vardır[133].

İndirekt plazma sisteminde iki elektrot arasında oluşan elektriksel köprüler sonucunda meydana gelen plazma aletten dışarı püskürtülür. Bu sistemin önemli avantajları farklı

gazlardan plazma elde edilebilmesi ve elde edilen plazmanın daha geniş alanların tedavisinde kullanılabilmektedir[127, 133].

Direkt plazma sisteminde en yaygın kullanılan teknoloji “Dielektrik Bariyer Deşarj” (DBD)’dır. Bu sistemde plazma, yalıtkanla çevrilmiş en az bir elektrot yoluyla küçük bir boşluk boyunca yüksek voltaj uygulamasıyla üretilir. Tedavi edilen doku karşı elektrot olarak rol oynar. İki elektrot arasında mikrodeşarj adı verilen küçük elektrik kırılmaları meydana gelir[133]. Bu elektrikseldeşarj, prob ve cilt arasında kalan havadaki tüm bileşenleri değişime uğratarak içinde O_3 , OH , H_2O_2 , NO , OH gibi radikallerin yer aldığı, maddenin 4. hali olan plazma formuna dönüştürmektedir. Soğuk plazma sisteminde kullanılan probun içinde genellikle argon ve neon gibi soy gazlar yer almaktadır[129].

Cilt sıcaklığının $40^\circ C$ ’nin üstüne çıkması hücrelerde dejenerasyon ve destrüksiyon oluşumuna neden olur. $45^\circ C$ ’nin üzerinde ise denaturasyon, fonksiyon kaybı ve proteinlerde yapısal değişimler meydana gelmektedir. Ancak sıcaklıktaki $38,5^\circ C$ ’ye kadar hafif yükselme, keratinositlerin proliferasyonunu stimüle etmektedir[133]. Soğuk Plazma Sistemiyle domuz derilerinde ve agar plakalarıyla yapılan çalışmalarda, 12 saniyelik uygulama ile agar plakalarında $0,6^\circ C$ ’lik bir artış, 20 saniyelik uygulama ile domuz derilerinde çok az bir sıcaklık değişimi meydana gelmiştir. Ortaya çıkan bu sıcaklığın ise bir risk faktörü oluşturmadığı belirtilmiştir[133].

Plazma cihazlarıyla az miktarda UVA, UVB ve UVC ışınları meydana gelebilmektedir. Ancak oluşan bu ışınların zararlı bir etki oluşturması beklenmemektedir[133].

Plazma kaynakları başta reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olmak üzere reaktif gaz türlerinin üretimini sağlarlar. Bu ürünlerin, plazmanın antimikrobiyal etkisinde ve yara iyileşme sürecini uyarılmasında çok önemli oldukları düşünülmektedir[133].

Nitrojen ürünlerinin, kan damarlarının tonusunu düzenleme, kanın koagülasyonunu sağlama, hücreler üzerinde proliferasyonu uyarma, antimikrobiyal ve anti-inflamatuvar etki gibi görevleri vardır[134].

Plazma cihazlarınca oluşan NO^{3-} ve NO^{2-} gibi reaktif nitrojen türleri, insanda lipit yüzeylerinin asidifikasyonunu ve sonuç olarak da pH’da azalmayı sağlar. Asiditedeki bu

artışın iyileşmeyen kronik yaralarda bakteri kolonizasyonunun artmasını engelleyerek yaraların iyileşmesini hızlandırabileceği düşünülmektedir[133]. Emmerta ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada plazma cihazları kullanarak oluşan pH'daki azalmanın insan derisi lipid bariyerinde önemli değişiklikler meydana getirdiği görülmüştür. Bu sonuçtan yola çıkarak plazma cihazlarınca oluşan nitrojen ürünlerinin dermatolojide egzama gibi hastalıkların tedavisini sağlayabildiği düşünülmektedir [135].

Birleşik Milletler Ulusal Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü, NO²'ye maruz kalma limitini 8 saatlik uygulamada 5 ppm olarak belirtmektedir[131]. Soğuk Plazma cihazları kullanıldığında ortamda oluşan NO² en fazla 5 ppm olmaktadır ve uygulama süresi ise 8 saatin çok altındadır[133].

Ozon yıllardır tıpta yara dezenfeksiyonunda ve immünomodulasyonda kullanılmaktadır. Plazma cihazları oluşturdıkları plazmada başta ozon olmak üzere çeşitli reaktif oksijen türleri yer almaktadır. Ozonun maksimum inhalasyon dozu (MIK) 30 dakikada 120µg/m³'iken çalışma ortamındaki maksimal dozu (MAK) 8 saatte 200µg/m³'tür. Soğuk plazma cihazları kullanıldığında ise elektrotun 5 mm uzağında ölçülen ozon miktarı 100 µg/m³'ün altındadır[133, 135]. Sonuç olarak ozon üretiminde kullanılan plazma cihazları güvenle kullanılabilir .

2.3.4. Diş hekimliğinde kullanılan ozon cihazları

Diş hekimliği kullanımı için üretilmiş HealOzone (Kavo, Biberach/Riß, Germany), Prozone (W&H, Bürmoos, Austria) ve OzonytronXP (MIOInternational, München, Germany) gibi çeşitli ozon jeneratörleri bulunmaktadır[10] (Resim 2.1).



Resim 2.1. a. Ozonytron XP b. Healozone c. Prozone

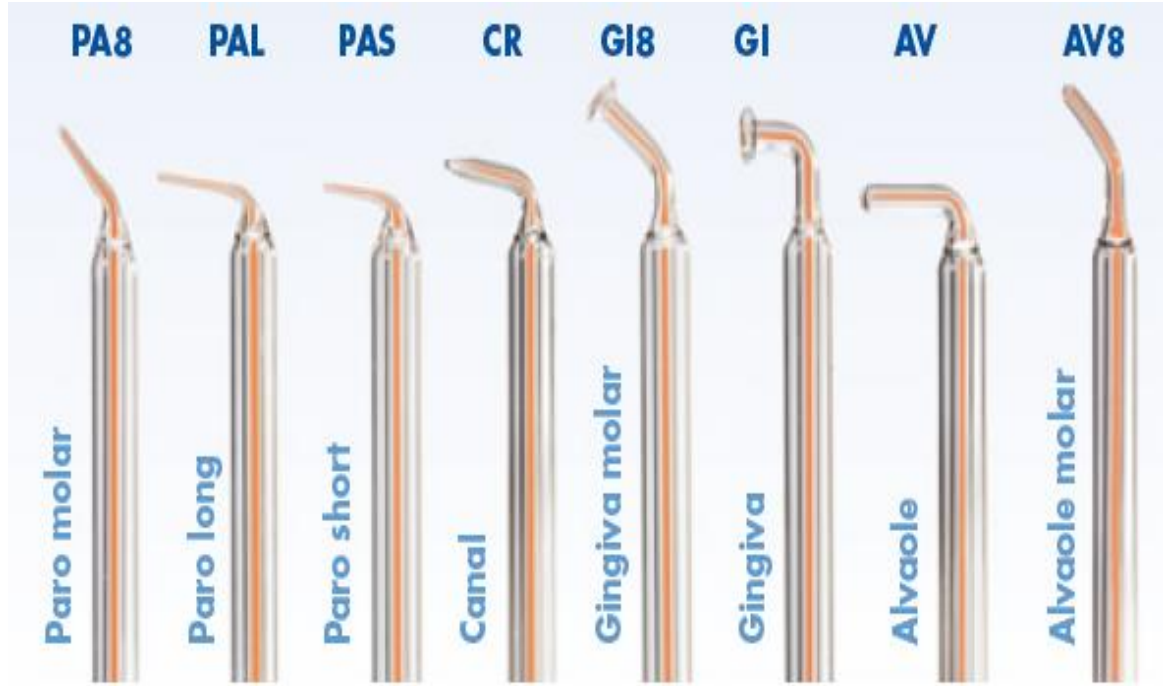
Ozonytron XP

Ozonytron'da oksijen aktivasyon jeneratörü yüksek frekansta ve voltajda bir güç kullanır. Aktive olmuş oksijenin oluşturduğu ozon konsantrasyonu, akım gücü yoluyla ayarlanabilmektedir. Çift kat camdan oluşan probun içinde, elektromanyetik enerji üreten ve yayan soy gazlardan oluşan bir karışım vardır. Probun ucu vücutla temasa geçtiğinde tedavi edilen bölgenin çevresine enerji yayar ve çevredeki diatomik oksijeni tek atomlu oksijene ve ozona parçalar. Operasyon sahasındaki ozonun konsantrasyonu 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 'dir (1-5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda fungusid, virüs ve bakteriosid etki göstermeye başlar)[10].

Plazma problemleri, ciltle arasında kalan havadaki tüm bileşenleri değişime uğratarak içinde atom, iyon ve elektronların yer aldığı maddenin 4. hali olan plazma formuna dönüştürmektedir. Üretici firma bu değişim sonucunda oluşanlardan sadece ozonun değil tüm bileşenlerin dezenfekte edici etkisi olduğunu belirtmektedir. Elektriksel deşarj sonucunda soğuk bir plazmanın üretildiğini, oluşan tedavinin ise bir çeşit plazma terapisi olduğunu söylemektedir.

Bu cihazın çeşitli uygulama sahaları için üretilmiş özel cam propları vardır. Bu uçlar sayesinde, yara bölgesi, gingival cep ve kök kanalı gibi ulaşımı zor yerlere ozon uygulanabilmektedir[121].

Prop uçları ve kullanım alanları Çizelge 2.1 ve Resim 2.2’de gösterilmektedir.



Resim 2.2. Ozonyton XP'de kullanılan proplar

Çizelge 2.1. Ozonytron XP'nin cam proplarının kullanım alanları

Prop Uçları	Kullanım Alanları
CR prop ucu	Çürük, pulpa dezenfeksiyonu, hiperemi ve pulpitis, hipersensitivite, kök kanal tedasi, abse, granüloma, kavite dezenfeksiyonu, vitalite testleri, ulaşılması zor alanlar
PA prop ucu	İmplantoloji, re-implantasyon, kanama kontrolü, gingivitis, periodontitis, cerrahi işlemlerde dezenfeksiyon, fistül tedavisi, kuron dezenfeksiyonu, vitalite testleri
PA/8 prop ucu	Derin periodontal ceplerde, gingivitis, periodontitis, cerrahi işlemlerde dezenfeksiyon, periapikal enfeksiyonlar, fistül tedavisi
AV prop ucu	Cerrahi işlemlerin dezenfeksiyonu, implant öncesi kemik dokunun hazırlanması, cerrahi işlemlerde ve yaraların dezenfeksiyonu, hemorojik kanamalar

Çizelge 2.2. (devam) Ozonytron XP'nin cam proplarının kullanım alanları

GI prop ucu	Gingivitis, periodontitis, stomatitler, yumuşak doku lezyonları, implantoloji, apseler, fistül tedavisi
CA prop ucu	Özellikle anestezi yapılamayan çocuklarda, ağrı ya da hassasiyete neden olan dişlerin ve kavitelelerin dezenfeksiyonu
KP prop ucu	Ulaşılması güç alanlar (Kanal tedavilerinde kanal dezenfeksiyonu ve apikal lezyonların dezenfeksiyonu, fissürler ve derin periodontal cepler)

OzonyTron® cihazının ürettiği ozon miktarı ve konsantrasyonu TÜV SÜD (Industrie Service GmbH kuruluşu/Technischer Überwachungs-Verein) tarafından değerlendirilmiştir. Ozon tedavisinin diş hekimliğinde kısa sürelerde (20–120 s) uygulanması sonucu oluşabilecek maksimum ozon konsantrasyonunun (Kademe 5, 120 saniye) insanlar için zararlı ozon konsantrasyonu eşik değerinin (TLV) %37'inde kalması nedeniyle, güvenli uygulanabilirliğine izin verilmiş ve herhangi bir toksik etki yaratmadığı "TÜV" belgesi ile kanıtlanmıştır[136].

Ozonun oral bölgedeki yara iyileşmesi üzerine etkisini inceleyen çalışma sayısı oldukça sınırlıdır ve ozonun oral yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisine dair henüz bir uzlaşma ya da direkt kanıt yoktur. Ayrıca yaptığımız literatür taramasında, ozon jeneratörleri ile üretilen gaz formundaki ozonun gingival bölgedeki yara üzerine topikal etkisini değerlendiren histolojik ve immünohistokimyasal çalışmaların olmadığı gözlenmiştir.

Buradan hareketle çalışmamızda, domuzların palatinal bölgesinde oluşturulan densesel yaralarda ozon gazının iyileşme sürecine etkilerinin histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 03/2013-05 kodlu bu çalışma, Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Deney Hayvanları Araştırma Merkezi ve Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce, 08.02.2013 tarih ve Etik-2012-64 dosya numaralı GATA Hayvan Deneyleri Etik Kurul onayı alınmıştır.

3.1. Deneysel Model

Bu çalışmada GATA Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden sağlanan, ortalama ağırlıkları 40-60 kg olan 8 adet² sağlıklı domuz kullanılmıştır. Çalışma protokolü çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma Protokolü

Yapılan işlemler	
0.gün	Her bir domuzun palatinal bölgesinde 6 adet yara oluşturuldu ve oluşturulan yaralar üzerine gaz formunda ozon topikal olarak uygulandı.
1. gün	Bütün yaralara topikal ozon gazı uygulaması yapıldı.
2. gün	Bütün yaralara topikal ozon gazı uygulaması yapıldı.
3. gün	Her bir domuzdaki kontrol grubunda bulunan 1. yaralardan örnek alındı. 2. ve 3. yaralara topikal ozon gazı uygulaması yapıldı.
4. gün	2. ve 3.yaralara topikal ozon gazı uygulaması yapıldı.
5.gün	2. ve 3. yaralara topikal ozon gazı uygulaması yapıldı.

² Çalışma öncesinde yapılan biyoistatistiksel incelemede çalışmanın %80 güçle gerçekleştirilebilmesi için çalışmada en az 7 domuz (6 yara X 7 =42 yara) kullanılması gerektiği ancak olası veri kayıpları dikkate alındığında 1 yedek domuz (6 yara) ilave edilmesinin uygun olduğu görüldü. Bu nedenle toplam deney hayvanı sayısı 8 olarak belirlendi.

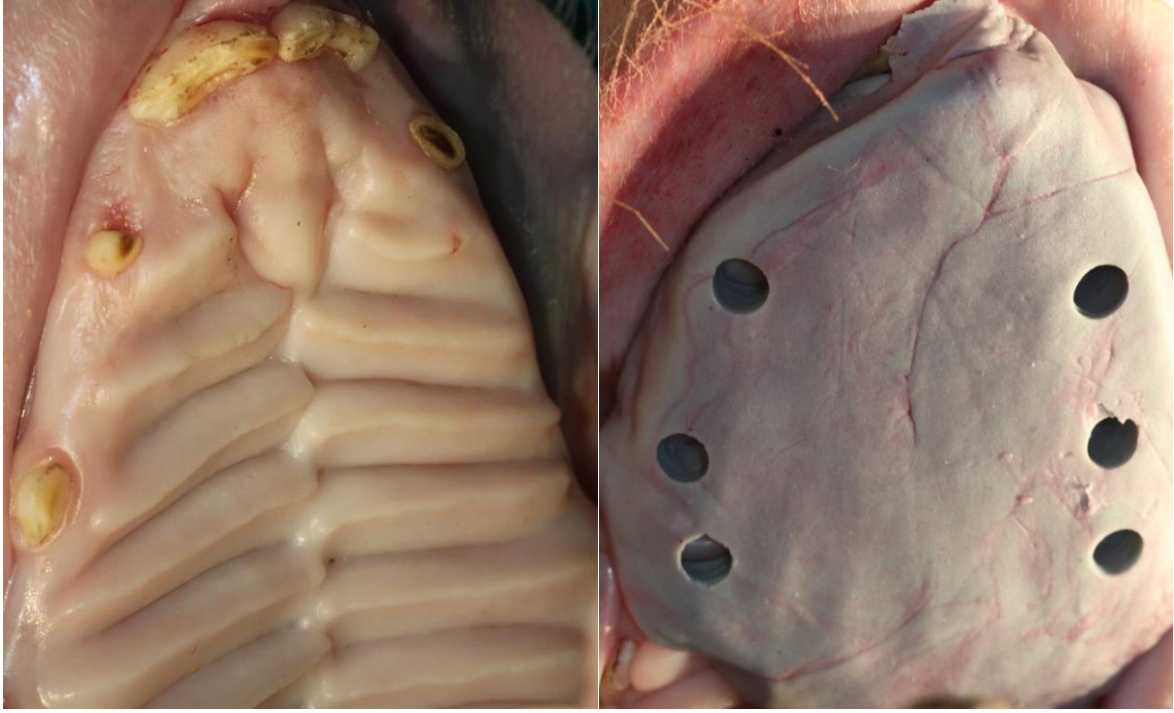
Çizelge 3.1. (devam) Çalışma Protokolü

Yapılan işlemler	
6. gün	2. ve 3. yaralara topikal ozon gazı uygulaması yapıldı
7.gün	Her bir domuzdaki kontrol grubunda bulunan 2. yaralardan örnek alındı. 3. yaralara topikal ozon gazı uygulaması yapıldı.
8. gün	3. yaralara topikal ozon gazı uygulaması yapıldı.
9. gün	3. yaralara topikal ozon gazı uygulaması yapıldı.
10. gün	Her bir domuzdaki kontrol grubunda bulunan 3. yaralardan örnek alındı.

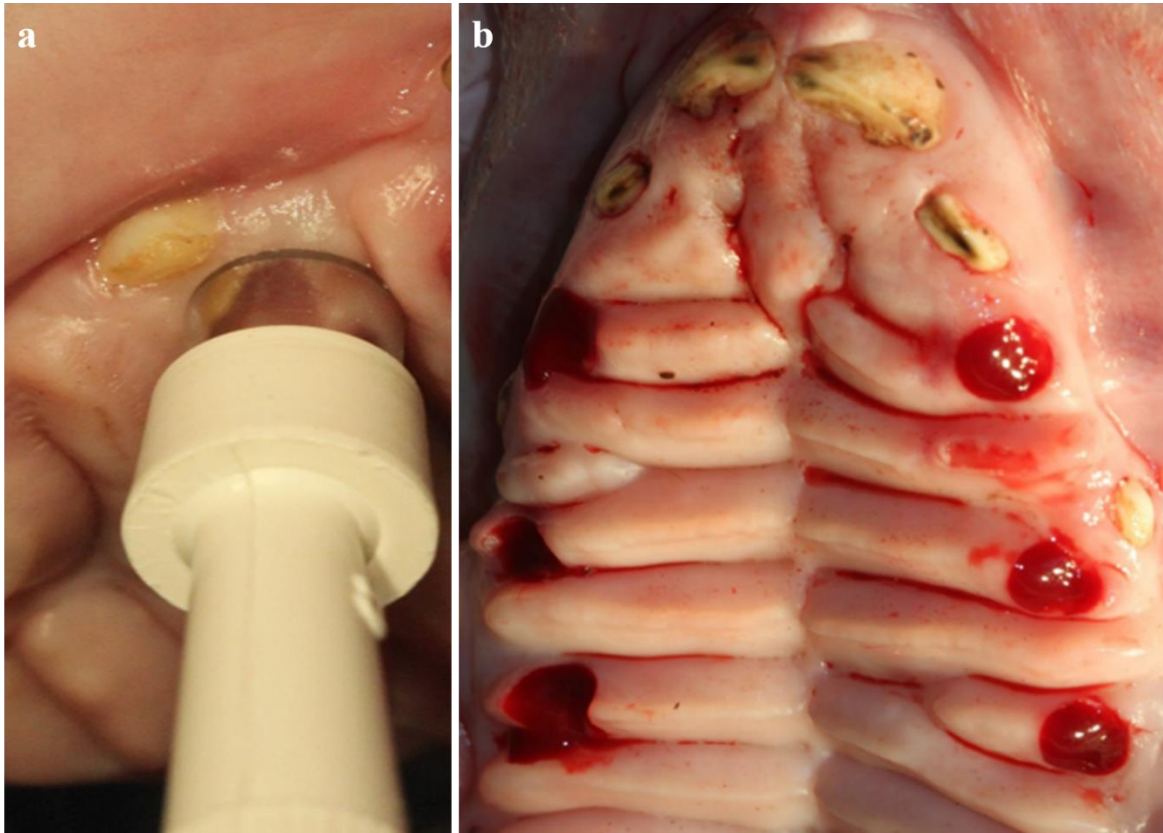
3.2. Cerrahi Protokol

Cerrahi işlemler öncesinde tüm domuzlara, intramusküler enjeksiyon ile 6-10 mg/kg ketamin hidroklorür ve 1-3mg/kg xylasin hidroklorid intramusküler, %1,5-3/kg izofloren inhalasyon yoluyla verilerek genel anestezi uygulandı.

Çalışmada ozon gazının sadece operasyon alanında lokalize kalması amacıyla yara oluşturmada önce domuzların palatinal bölgesinden silikon ölçü maddesiyle (Zeta plus®, Zhermack) ölçü alındı. Elde edilen silikon ölçü palatinal bölgeden çıkarılıp ölçü üzerinde punch biyopsi yönteminde kullanılan ve çapı 10 mm olan bıçaklar yardımıyla belli aralıklarla, 3 adet sağda 3 adet solda olmak üzere 10 mm çapında perforasyonlar oluşturuldu (Resim 3.1). Silikon ölçü tekrar palatinal bölgeye yerleştirildi ve perforasyonların hemen altında palatinal mukozadaki izdüşümünlerine göre steril punch biyopsi bıçağı (Paramount Sterile Dermal Biopsy Punch, Germany)(Resim 3.2.a) kullanılarak palatinal mukozada işaretleme yapıldı. Ölçünün palatinal bölgeden tekrar çıkarılmasını takiben milimetrik işaretli biyopsi bıçağı ile 2,5 mm derinliğinde 6 adet yara bölgesi oluşturuldu (Resim 3.2.b).



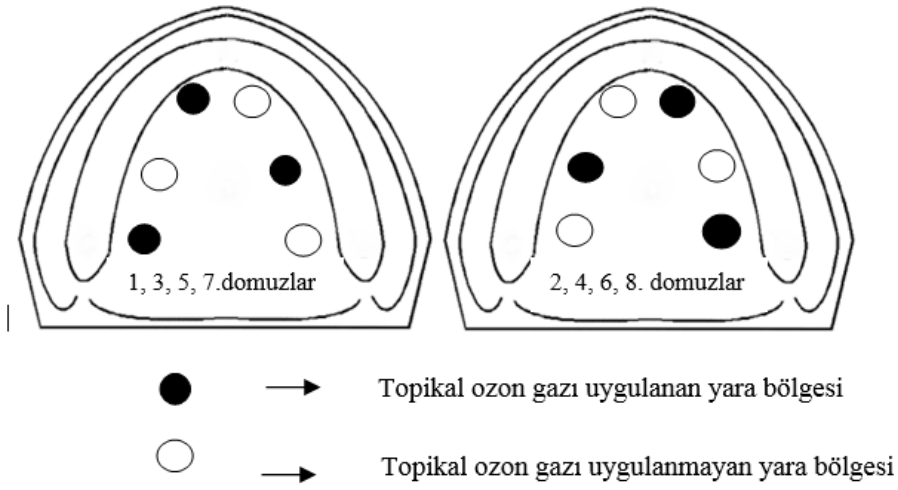
Resim 3.1. Domuzun palatinal bölgesinden alınan ölçü üzerindeki oluşturulan perforasyonlar



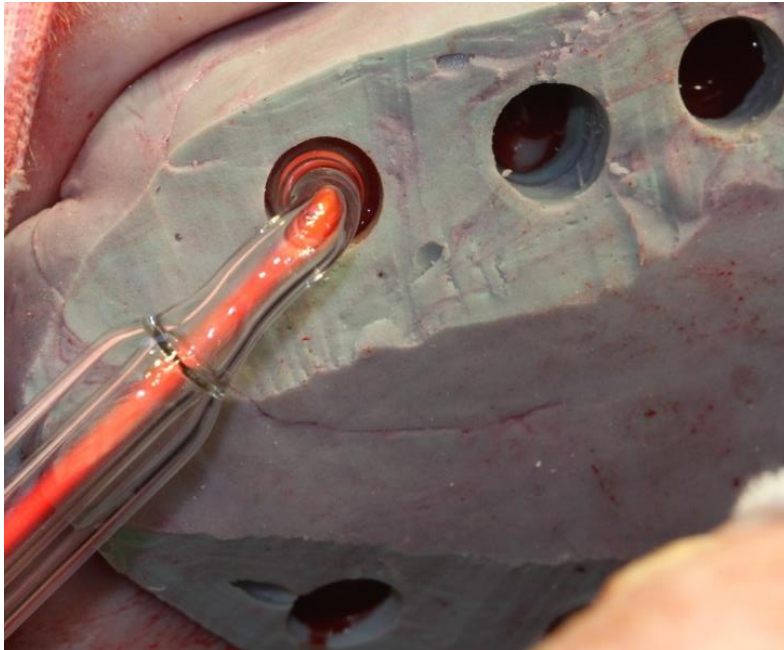
Resim 3.2. a. Domuzun palatinal bölgesinde yaraların oluşturulması
b. Domuzun palatinal bölgesinde oluşturulmuş yaralar

3.3. Ozon Uygulama İşlemi

Her bir domuzdaki oluşturulmuş 6 yaranın 3'ü randomize olarak seçilerek, her bir yaraya 10 gün boyunca özel bir cihaz kullanılarak (Ozonytron®, MIOInternational, GmbH, Germany) günde 120 sn süreyle cihazın 5. seviyesinde %100 yoğunlukta topikal ozon gazı uygulaması yapıldı (Şekil 3.1) (Resim 3.3). Ozon gazı uygulanan yaralar test grubunu hiçbir uygulama yapılmayan diğerleri ise kontrol grubunu oluşturdu. Ozon uygulamaları sırasında 10 mm çapındaki cam prob (GI prop ucu), ölçü üzerindeki perforasyonlara yerleştirilerek elde edilen gazların sadece uygulama bölgesini hedeflemesi sağlandı.



Şekil 3.1. Deney ve kontrol gruplarının oluşturulması

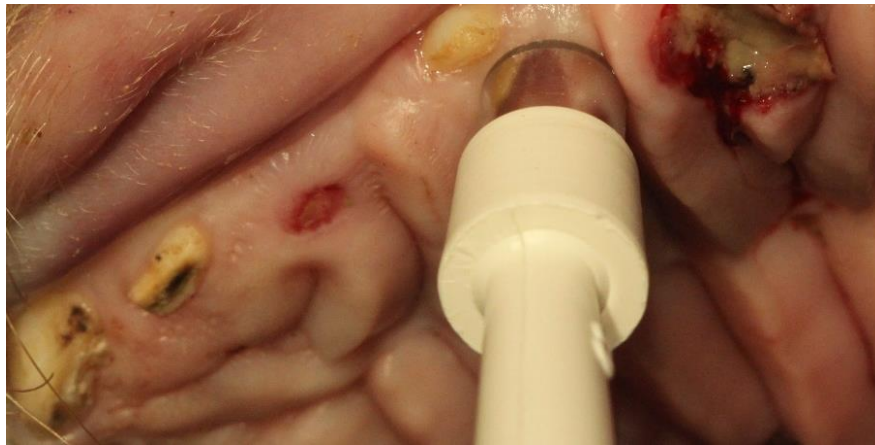
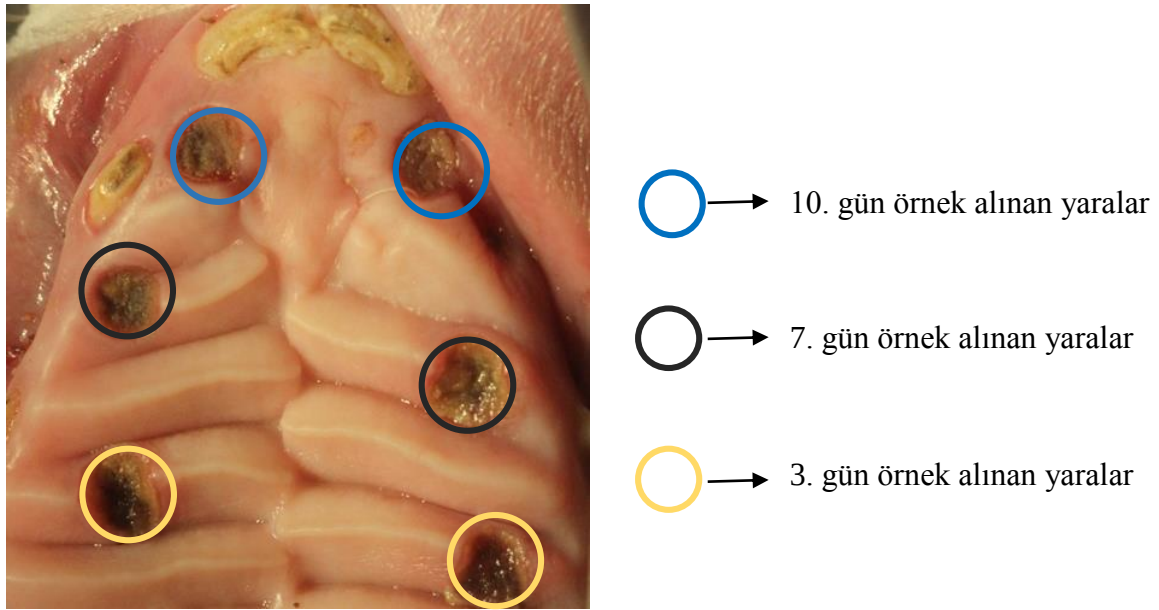


Resim 3.3. Deney bölgelerine ozon gazı uygulaması

Deney hayvanlarına su ve yiyeceğe serbest erişim imkanı (Ad Libitum) verildi ancak yumuşak gıdalarla beslenmesi sağlandı.

3.4. Deney ve Kontrol Gruplarından Biyopsi Alınması

Her bir gruptaki oluşturulmuş olan 1. yaradan 3. gün, 2. yaradan 7. gün, 3. yaradan ise 10. gün olmak üzere (Resim 3.4) yine steril bir punch yardımıyla, tüm yarayı ve yara kenarlarını içeren örnekler alındı (Resim 3.5). Alınan örnekler, histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelerinin yapılması için formaldehit içeren kaplara konuldu.



Araştırmamızın hiçbir periyodunda hayvanlar sakrifiye edilmedi.

3.6. Histolojik Yöntem

Elde edilen örnekler %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda 24–72 saat fikse edildikten sonra rutin doku takip prosedürü sonrası parafin bloklara gömüldü. Dokulardan, adeziv lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, 56°C'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra 30 dakika ksilende bekletilerek deparafinize edildi. 20 dakika %96'lık etil alkolde dehidrate edildi ve bu işlemi takiben rutin hemotoksilen eozin (HE) ve Masson's trikrom (TRC) boyalarıyla boyandı.

3.7 Histokimyasal Yöntem

Masson's trikrom boyaması

Deparafinize edilen örnekler 56°C'de, 1 saat Bovin solüsyonunda bekletildi. Çeşme suyunda sarı renkleri gidene kadar yıkanan örnekler, Weigerts iron hematoksin solüsyonunda 10 dakika bekletildi ve çeşme suyunda yıkandı. Yıkanan örnekleri sırasıyla trikrom solüsyonunda 30 dakika ve %5'lik glacial asetik asit solüsyonunda 2 dakika bekletildi, distile sudan geçirilip kurutuldu ve ksilen bazlı kapatma solüsyonu ile kapama işlemi yapıldı.

3.8. İmmünohistokimyasal Yöntem

%10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda 24-72 saat fikse edildikten sonra rutin doku takip prosedürünü takiben parafin bloklara gömülen dokulardan, adeziv lamlara (Surgipath, X-tra Adhesive Microslides, Illinois, USA) 5µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler etüv içerisinde 56°C'de 12 saat bekletildikten sonra 30 dakika süreyle ksilol ile muamele edilerek deparafinizasyon, beşer dakika süreyle sırasıyla %100, %96 ve %90'lık etil alkolde bekletilerek dehidratasyon işlemleri gerçekleştirildi. Kesitler 1 dakika çeşme suyunda yıkandıktan sonra distile sudan geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için % 3 hidrojen peroksit (H₂O₂) 10 dakika süreyle uygulandı. Kesitler tirisle tamponlanmış serum (TBS, pH:7,80) ile püskürtme yöntemi kullanılarak iyice yıkandı. Formalin fiksasyonu ve parafin bloklama nedeniyle dokuda maskelenmiş olan antijenik yapıları açığa çıkarmak amacıyla kesitler EDTA solüsyonu (pH:8,00) içerisinde 20 dakika mikrodalga fırında, takiben oda ısısında 30 dakika bekletildi ve distile su ile üç kez yıkandı. Kesitler 5-

10 dakika süreyle non-immün bloklama serumunda (Ultra V Block) bekletildi. 1/250'lik primer antikor (TGF- β , Lot# K0910 mouse monoclonal IgG₁, Santa Cruz Biotechnology ve VEGF, lot# C0613 mouse monoclonal IgG₂₈, Santa Cruz Biotechnology) uygulandı ve + 4°C'de bir gece süreyle muamele edildi. Bu işlemi takiben kesitler TBS ile 5 dakika püskürtme yöntemi ile yıkanıp kurulandıktan sonra biyotine bağlanmış bağlayıcı (sekonder) antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, cat#TP-015-BN, Labvision Co, California, USA) oda ısısında 10 dakika uygulandı. Kesitler yeniden TBS ile yıkanıp ve kurulandıktan sonra streptavidin ile konjuge alkalin fosfat (Streptavidin Peroxidase, cat#TP-015-HR, Lab Vision Cor., Ca, USA) uygulanarak 10 dakika bekletildi. Takiben kesitler TBS ile yıkandı ve kurulandı. 10 dakika süre ile renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla amino etil karbazol solüsyonu (AEC, substrate kit, Lot: 11067520, Zymed S.San Francisco, California,USA) ile inkübe edildi. Kesitler üç kez distile sudan geçirildi. Zemin boyaması için Meyer's hematoksilende 1 dakika bekletildi. Kesitler üç kez distile sudan geçirildi. PBS ile yıkanan kesitler kurulandıktan sonra suda çözülebilen kapatıcı solüsyon (Clearmount, Lot:10364117, Zymed S.San Francisco, California, USA) ile kapatıldı.

3.9. Histolojik Değerlendirme

Histolojik değerlendirme HE ve TRC ile boyanmış deney ve kontrol grubu örneklerinde gerçekleştirildi. Tüm kesitlerde yara bölgesinde yer alan inflamatuvar eksuda, bağ dokusu ve inflamatuvar hücre yoğunluğu değerlendirildi. Tüm örneklerde yara bölgesindeki inflamatuvar hücre yoğunluğu daha önce Ryu ve arkadaşlarının kullandığı skarlama sistemine göre skorlandı[137] (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. İnflamatuvar hücre skoru

Skor	
0	İnflamasyon yok
1	Hafif derece inflamasyon
2	Orta derecede inflamasyon
3	Yoğun derecede inflamasyon

Deney ve kontrol grupları arasındaki epitelizasyon farklılıklarının belirlenebilmesi için trikrom ile boyanmış kesitler değerlendirildi. 100 birimlik oküler grid yardımıyla yara bölgesinin toplam genişliği ile yara kenarlarından merkeze doğru proliferen olan yeni epitel

dokusunun miktarları mikrometre cinsinden hesaplandı. Hesaplanan değerler birbiriyle oranlanarak Innes ve ark. kullandığı epitelizasyon derecelemesi yöntemiyle skora gerçekleştirildi [132] (izelge 3.3).

Çizelge 3.3. Epitelizasyon skoru

Skor	
0	Epitelizasyon yok
1	Epitel yara yüzeyinin %50'sinden azını örtmüştür
2	Epitel yara yüzeyinin %50'sinden fazlasını örtmüştür
3	Epitel yara yüzeyini tamamen örtmüřtür.

3.10. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

TGF- β ve VEGF incelenmesi için immünohistokimya boyaması yapılan örnekler x200 büyütmede değerlendirildi. Örneklerin boyanma yoğunlukları daha önce Ryu ve arkadaşlarının kullandığı skora sistemine göre skorlandı [137] (izelge 3.4).

Çizelge 3.4. Boyanma yoğunluğu skoru

Skor	
0	Boyanma yok
1	Az yoğunlukta boyanma
2	Orta yoğunlukta boyanma
3	Yoğun boyanma

3.11. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Science) 20 paket programı ile analiz edildi.

Deney ve kontrol grupları arasında farklılık incelenirken değerlerin normal dağılımdan gelmemesi nedeniyle Mann Whitney U Testi kullanıldı.

Deney ve kontrol gruplarında inflamasyon, TGF-B ve VEGF değerlerinin günler arasındaki farklılığı test edilirken normal dağılmayan değişkenler için Wilcoxon İşaret Testi kullanıldı.

Deney ve kontrol gruplarında 3, 7 ve 10. gün İnflamasyon, TGF-B ve VEGF değerleri arasındaki ilişkiler araştırılırken Spearman Korelasyon Analizi kullanıldı.

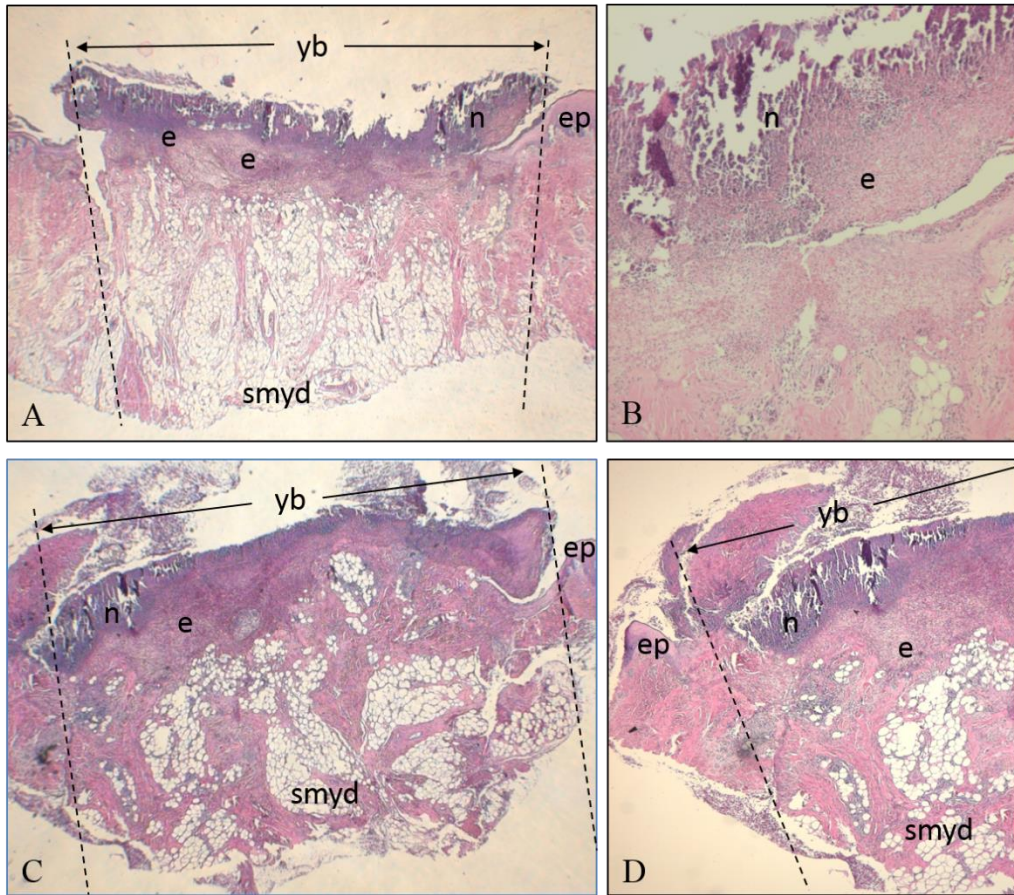
Sonuçlar yorumlanırken anlamlılık düzeyi olarak 0,05 kullanılmış olup $p < 0,05$ olması durumunda Mann-Whitney ve Wilcoxon İşaret Testlerinde farklılığın; Spearman Korelasyon Analizinde ise bir ilişkinin olduğu, $p > 0,05$ olması durumunda ise anlamlı bir farklılığın ve ilişkinin olmadığı belirtildi.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

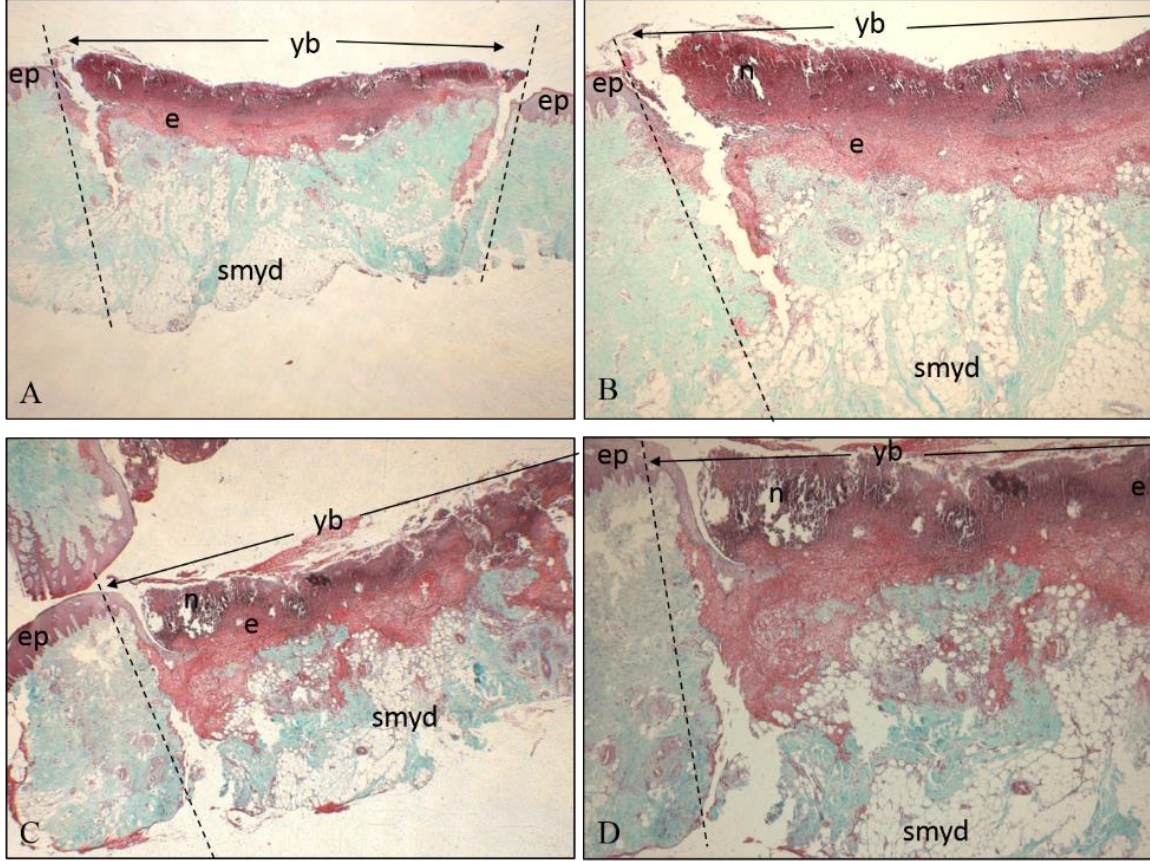
3. gün

3. günde deney ve kontrol grubundaki tüm örneklerde yara bölgesi, sağlıklı epitel ve bağ dokusu kenarlarda, ortada biyopsi alanı bulunacak biçimde net olarak izlendi. Gerek deney gerekse kontrol grubunda yara bölgesinde, yüzey epiteli ve lamina proprianın tamamen ortadan kalktığı görüldü. Yara bölgesinin hemen tamamını geniş fibrin eksuda ve nötrofilik infiltrasyon doldurmaktaydı. Yara tabanına komşu bağ dokuda nötrofillerden zengin, plazma hücrelerinin ve lenfositlerin de eşlik ettiği miks tipte inflamasyon dikkati çekti (Resim 4.1).



Resim 4.1. 3. gün deney (A, B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. Yara yüzeyinin nötrofil topluluklarının oluşturdukları fibrin eksuda ile örtülü olduğu görüldü (HE; A, C X 20, BX100, DX40)(yb: yara bölgesi, e: eksuda, n:nötrofil, ep: epitel, smyd:submukozal yağ dokusu)

Örneklerin hemen hemen tamamında yara derinliğinin submukozal yağ dokuya kadar uzandığı, bu alanların fibrin ve eritrositlerden oluşan eksuda ile kaplı olduğu dikkati çekti. Eksuda içerisinde yer yer topluluklar biçiminde izlenen yoğun nötrofiller (PMNL) izlendi(Resim 4.2).



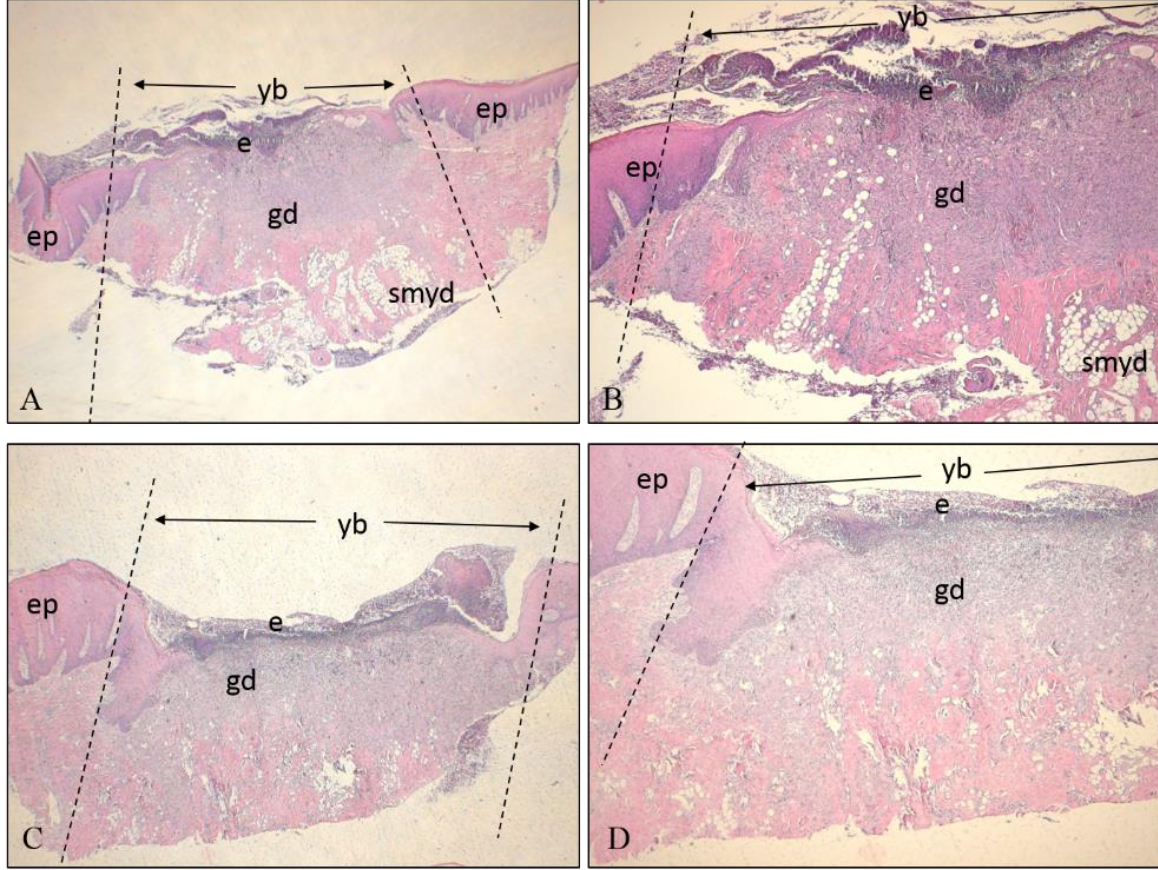
Resim 4.2. 3. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. İnflamasyonun submukozal yağ dokusuna kadar uzandığı ve yara yüzeyinin eksuda ile örtülü olduğu görüldü (Masson's Trikrom; A,CX20, B, DX 100)(yb: yara bölgesi, e: eksuda, n:nötrofil topluluğu, ep: epitel, smyd: submukozal yağ dokusu)

3. gün kontrol grubu örneklerinin 4'ünde eksuda tabanında nötrofilik agregat görüldü. Diğer 4 örnekte ise eksuda tabanı, fibrin ve inflamatuvar hücreden oluşmaktaydı. Deney grubu örneklerinin 4'ünde eksuda yüzeyinde nötrofilik agregatlar izlenirken 3'ünde ise kontrol grubundakilere benzer şekilde nötrofilik agregatların eksuda tabanında olduğu dikkati çekti.

7. gün

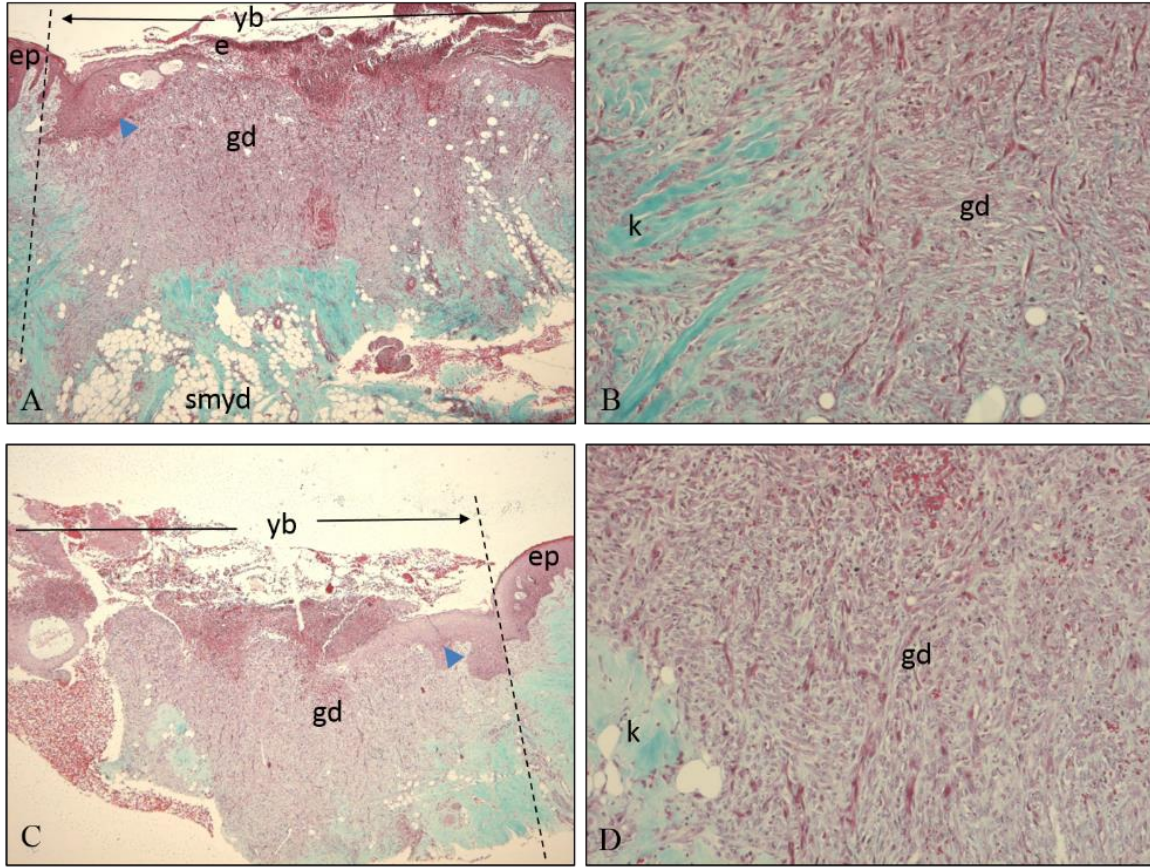
Yara bölgesinin yüzeyinde fibrin ve nötrofil topluluklarından oluşan eksudanın yer aldığı ve eksuda içerisinde mikroorganizma kolonilerinin bulunduğu görüldü. Her iki gruba ait

örneklerde de submukozal yağ dokusundan yüzeye doğru yara bölgesini tamamen dolduran fibrovasküler granülasyon dokusu izlendi(Resim 4.3).



Resim 4.3. 7. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. Yara yüzeyinin eksuda ile kaplı olduğu görüldü. Yara bölgesinin fibrovasküler granülasyon dokusu ile dolu olduğu izlendi (HE; A,C: x20, B,D: x40) (yb: yara bölgesi, e: eksuda, ep: epitel, smyd: submukozal yağ dokusu, gd: granülasyon dokusu)

Yara bölgesini dolduran granülasyon dokusunun, kapiller proliferasyon, yoğun lenfosit, histiyosit ve daha az oranda PMNL içeren inflamatuvar hücrelerden oluştuğu dikkati çekti. Deney ve kontrol grubunda yara bölgesinde belirgin kolajen üretimi izlenmedi (Resim 4.4).



Resim 4.4. 7. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. Yara yüzeyinin eksuda ile kaplı olduğu görüldü. Yara bölgesinin fibrovasküler granülasyon dokusu ile dolu olduğu izlendi. Yüzey epitelinin yara kenarlarından merkeze doğru proliferate olduğu (ok başı) görüldü (Masson's Trikrom; A,C: x20, B,D: x100)(yb: yara bölgesi, e: eksuda, ep: epitel, smyd: submukozal yağ dokusu, gd: granülasyon dokusu, k: kolajen)

7. günde hem deney hem kontrol grubunda tam olarak yara bölgesini örtmese de yara kenarlarından başlayarak granülasyon dokusunu örtecek biçimde yüzey epitelinin proliferate olduğu görüldü (Resim 4.4).

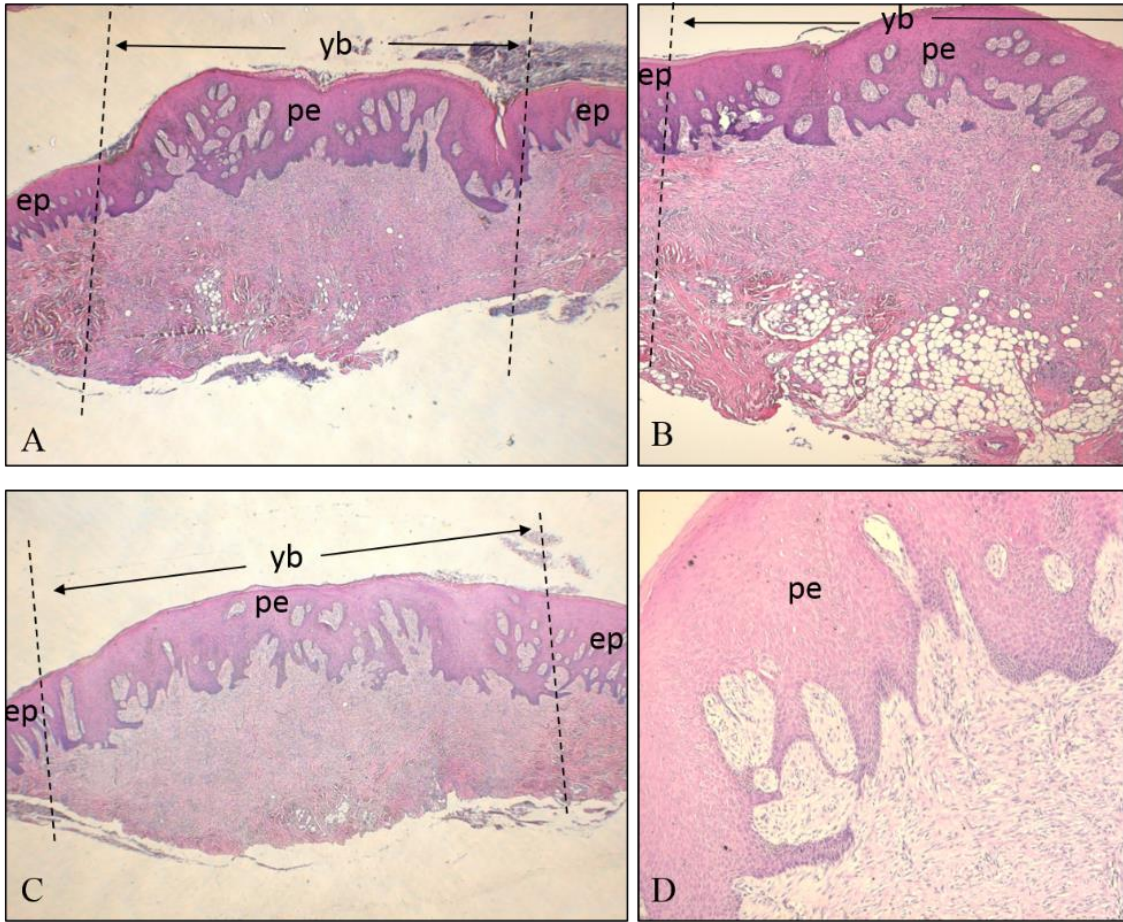
7. gün kontrol grubunda genel olarak (5 örnekte) yara bölgesini dolduran granülasyon dokusu içerisinde fibroblastlar etrafında belirgin kolajen matriks üretiminin bulunduğu izlendi.

7. günde inflamasyonun 3. güne göre gerilediği dikkati çekti. İnflamatuar hücrelerin ağırlıklı eksudaya yakın komşulukta olduğu görüldü. İnflamasyonunun perivasküler yerleşimli ağırlıklı lenfosit ve daha az oranda nötrofil içeren miks tipte olduğu dikkati çekti.

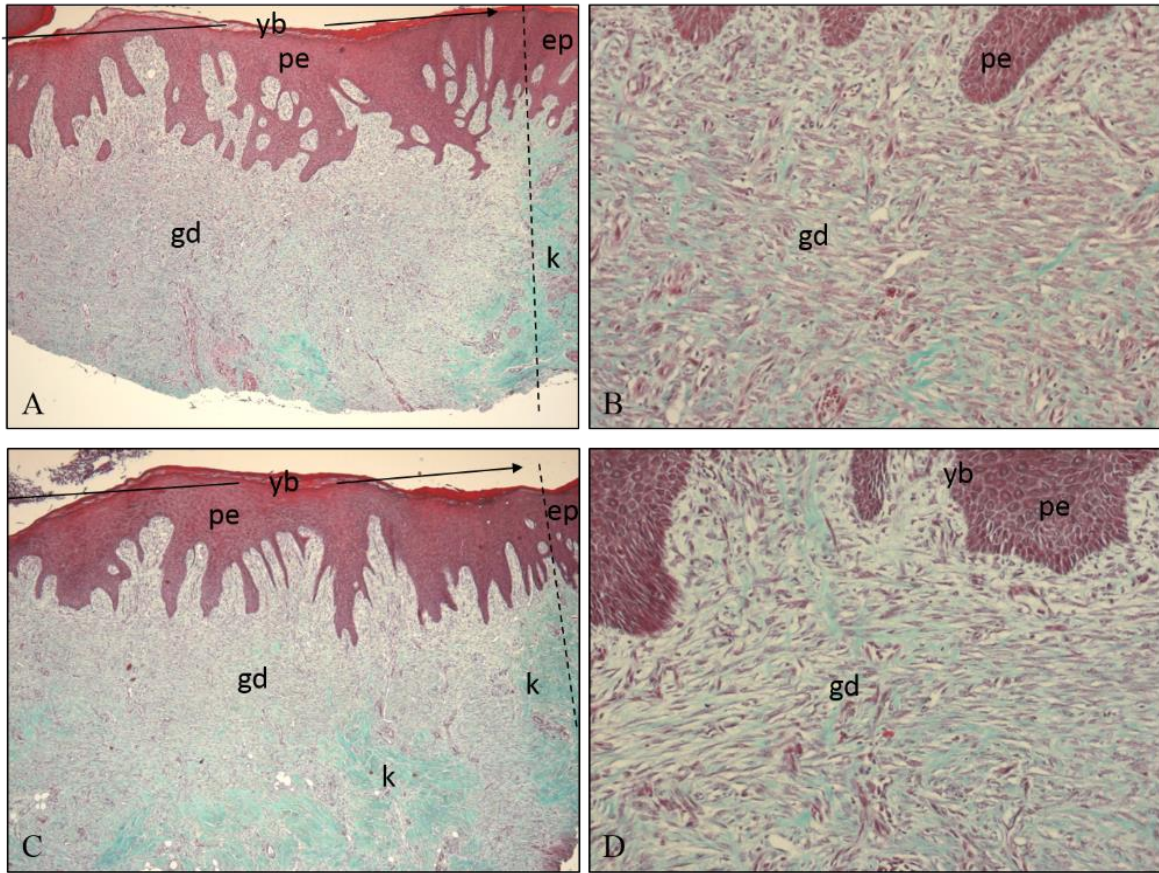
Perivasküler yerleşimli az sayıda nötrofillerin de eşlik ettiği lenfositik infiltrasyon biçiminde inflamasyon izlendi.

10.gün

10. günde tüm örneklerde yara yüzeyindeki eksudanın ortadan kalktığı, yara bölgesinin yüzey epiteli ile örtülü olduğu dikkati çekti(Resim 4.5). Her iki grupta da 7. güne benzer biçimde yara bölgesinin fibroblastlardan zengin granülasyon dokusu biçiminde olduğu izlendi. İki grup için de yara bölgesindeki kolajen üretiminin benzer olduğu dikkati çekti. Eksuda içerisinde 7. günden farklı olarak yara bölgesinin daha kolajenize olduğu izlendi(Resim 4.6). Yara bölgesinde perivasküler yerleşimli 7.güne göre azalmış hafif düzeyde lenfositik infiltrasyon dikkati çekti



Resim 4.5. 10. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. 10. günde yara yüzeyinin tümüyle epitelle örtülü olduğu görüldü (HE; A,C: x20, B,D: x40)(yb: yara bölgesi, ep: epitel, pe: proliferatif epitel)



Resim 4.6. 10. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu, yara bölgesinin görünümü. Tamamen epitel ile örtülü yara bölgesinin fibroblastlardan zengin granülasyon dokusu yapısında olduğu görüldü (Masson's Trikrom; A,D: x40, B,D: x200) (yb: yara bölgesi, ep: epitel, pe:prolifere epitel, gd: granülasyon dokusu, k: kolajen)

3, 7 ve 10. güne ait inflamasyon skorları çizelge 4.1'de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Gruplara göre 3, 7 ve 10. güne ait inflamasyon skorları

	3. gün		7. gün		10. gün	
Örnek no.	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu
1	3	3	2	3	1	1
2	3	3	3	3	1	1
3	3	3	2	2	1	1
4	3	3	2	2	1	1
5	3	3	3	3	1	1
6	3	3	3	3	2	1
7	3	3	3	3	1	2
8	3	2	3	2	1	1

Kontrol grubunun inflamasyon skorlarının günler içindeki değişimi değerlendirildiğinde, 3. ve 7. gün inflamasyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0,05$). İnflamasyon 3. gün ve 7. gün değerleri, 10. gün değerlerinden anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,05$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Kontrol grubu için inflamasyon değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları

	Kontrol						Wilcoxon Test	
	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	Ss		
İnflamasyon 3.	8	2.9	3	2	3	0.4	-1.41	0.157
İnflamasyon 7.	8	2.6	3	2	3	5		
İnflamasyon 3.	8	2.9	3	2	3	0.4	-2.64	0.008
İnflamasyon 10.	8	1.1	1	1	2	0.4		
İnflamasyon 7.	8	2.6	3	2	3	0.5	-2.58	0.010
İnflamasyon 10.	8	1.1	1	1	2	0.4		

Deney grubunun inflamasyon skorlarının günler içindeki değişimi değerlendirildiğinde, 3. ve 7. gün inflamasyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0,05$). İnflamasyon 3. Gün ve 7. gün değerleri 10. gün değerlerinden anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,05$) (Çizelge 4.3).

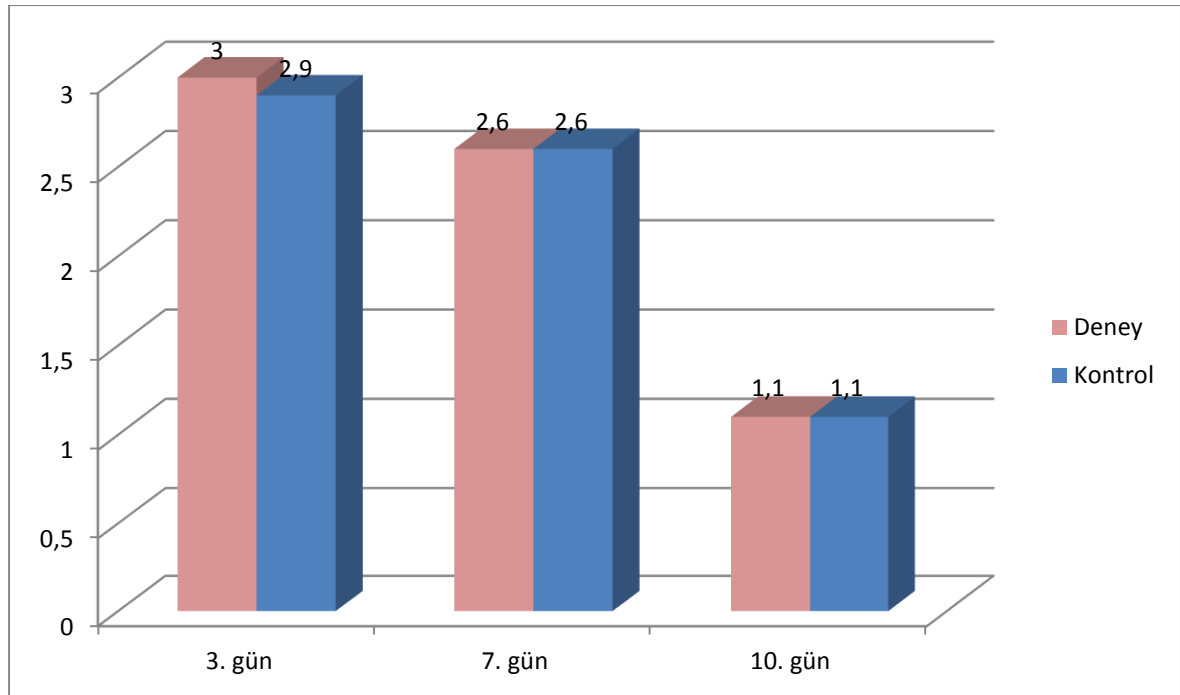
Çizelge 4.3. Deney grubu için inflamasyon değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları

	Deney						Wilcoxon Test	
	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	Ss	z	p
İnflamasyon 3.	8	3.0	3	3	3	0.0	-1.73	0.083
İnflamasyon 7.	8	2.6	3	2	3	0.5		
İnflamasyon 3.	8	3.0	3	3	3	0.0	-2.53	0.011
İnflamasyon 10.	8	1.1	1	1	2	0.4		
İnflamasyon 7.	8	2.6	3	2	3	0.5	-2.43	0.015
İnflamasyon 10.	8	1.1	1	1	2	0.4		

Deney ve kontrol gruplarının 3, 7. ve 10. gün inflamasyon skorları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.4)(Şekil 4.1).

Çizelge 4.4. İnflamasyon değerleri bakımından deney ve kontrol grupları arasındaki farklılığa ilişkin Mann-Whitney U testi sonuçları

		N	Mean	Median	Minimum	Maximum	ss	Sıra Ort	Mann-Whitney U	
İnflamasyon 3.	Deney	8	3.0	3	3	3	0.0	9	-1	0.317
	Kontrol	8	2.9	3	2	3	0.4	8		
	Toplam	16	2.9	3	2	3	0.3			
İnflamasyon 7.	Deney	8	2.6	3	2	3	0.5	8.5	0	1.000
	Kontrol	8	2.6	3	2	3	0.5	8.5		
	Toplam	16	2.6	3	2	3	0.5			
İnflamasyon 10.	Deney	8	1.1	1	1	2	0.4	8.1	-0.10	0.922
	Kontrol	8	1.1	1	1	2	0.4	7.9		
	Toplam	16	1.1	1	1	2	0.4			



Şekil 4.1. İnflamasyon değerleri bakımından deney ve kontrol gruplarının günlere göre ortalamalarının grafiği

Gruplar arasındaki epitelizasyon farklılıklarının belirlenebilmesi için trikrom kesitlerinde, 100 birimlik oküler grit yardımıyla yara alanının toplam yüzeyi ve yara kenarlarından proliferen olan yeni epitel dokusunun miktarı birbiriyle oranlandı ve bu orana göre skorlandı (Çizelge 4.5).

Özellikle 10. gün örneklerinde, yeni oluşan epitel dokusu sağlam alanlarla karşılaştırıldığında, akantotik yapıda olduğu ve irregüler rete hiperplazisi gösterdiği izlendi.

Çizelge 4.5. Gruplara göre 3, 7 ve 10. güne ait epitelizasyon skorları

	3. gün		7. gün		10. gün	
Örnek no.	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu
1	0	0	1	1	3	3
2	0	0	1	1	3	3
3	0	0	1	1	3	3
4	0	0	2	2	3	3
5	0	0	1	1	3	3
6	0	0	1	1	3	3
7	0	0	1	1	3	3
8	0	0	1	1	3	3

3, 7. ve 10. güne ait epitelizasyon skorları incelendiğinde, 3. ve 10. gün örneklerine ait skorların, her bir gün için aynı olduğu görülmektedir. Bu sebeple bu günlere ait örneklerin skorlarının istatistiksel değerlendirilmesi yapılmamıştır.

Deney ve kontrol gruplarının 7. güne ait örneklerin epitelizasyon skorları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Epitelizasyon 7. gün değerleri bakımından deney ve kontrol grupları arasındaki farklılığa ilişkin Mann Whitney U testi sonuçları

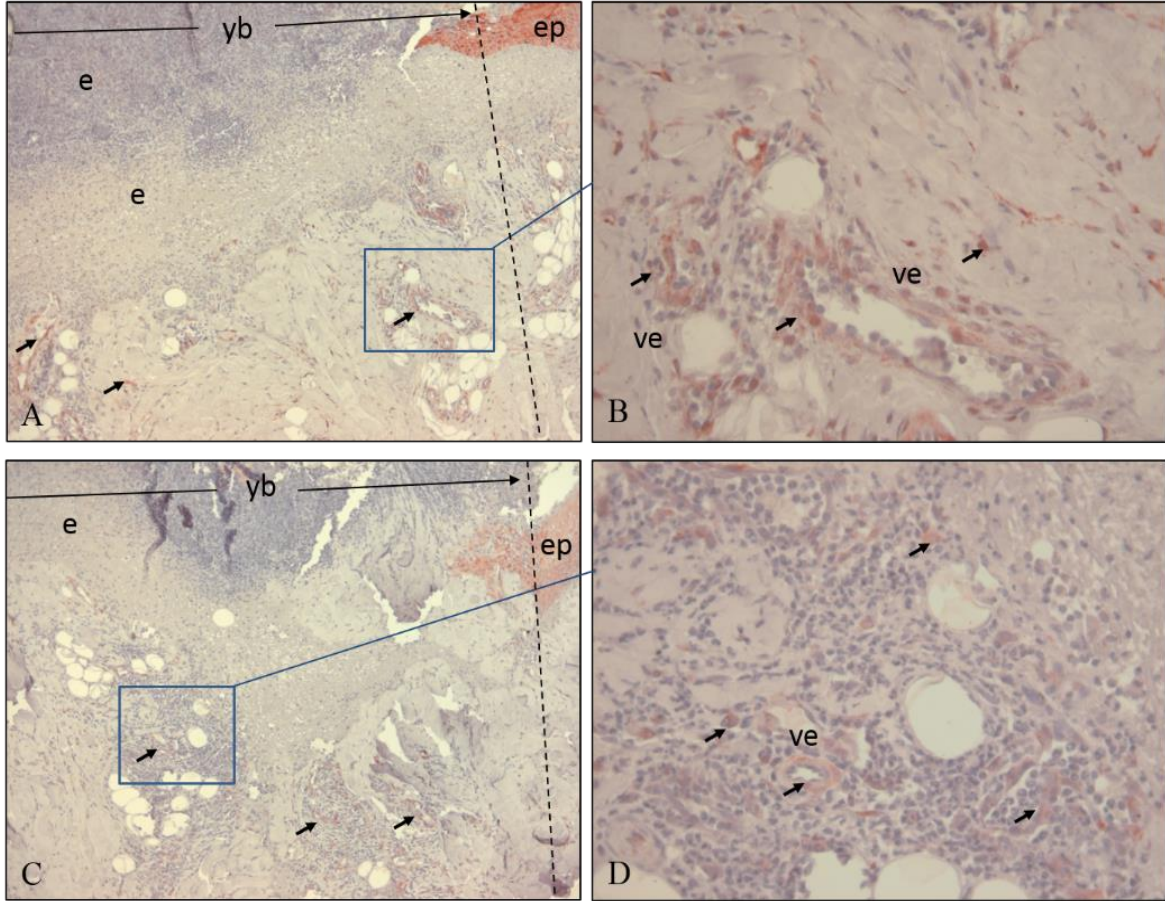
	Epitelizasyon 7. Gün						Mann Whitney U		
	n	Mean	Median	Min	Max	SS	Sıra Ort.	z	P
Deney	8	1,1	1	1	2	0,35	8,50	0	1
Kontrol	8	1,1	1	1	2	0,35	8,50		

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. VEGF

3. günde her iki grupta da VEGF pozitifliği yara tabanında yer alan damarların endotellerinde izlendi. Buna göre VEGF ile pozitif boyanan hücreler damar endoteli başta olmak üzere doku histiyositleri ile lenfosit ve plazma hücrelerinin oluşturduğu inflamatuvar hücrelerdi (Resim 4.7).

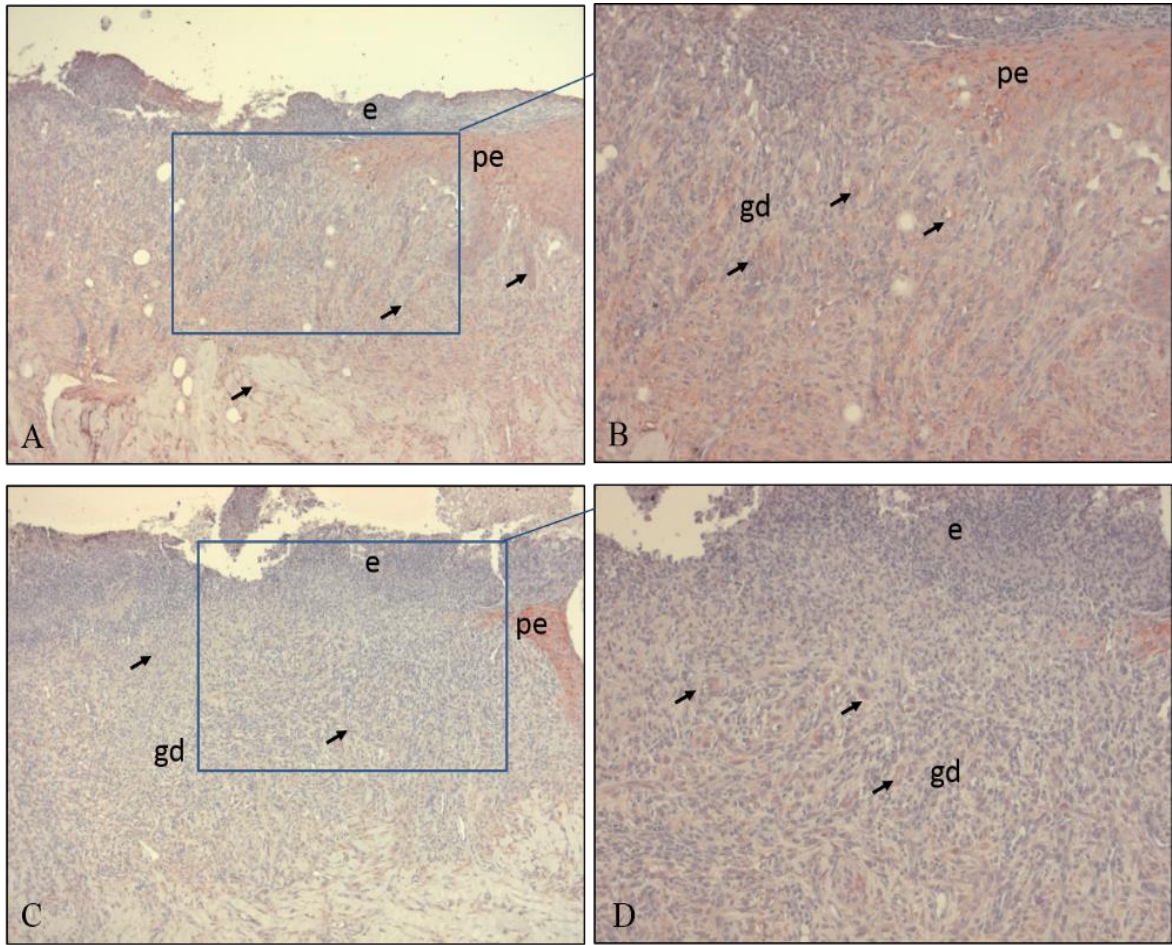
Fibrin eksuda içerisinde ise ağırlıkla nötrofil infiltrasyonu mevcuttu. Eksuda içindeki az sayıda plazma hücresi ve lenfositte de VEGF ekspresyonu dikkati çekti.



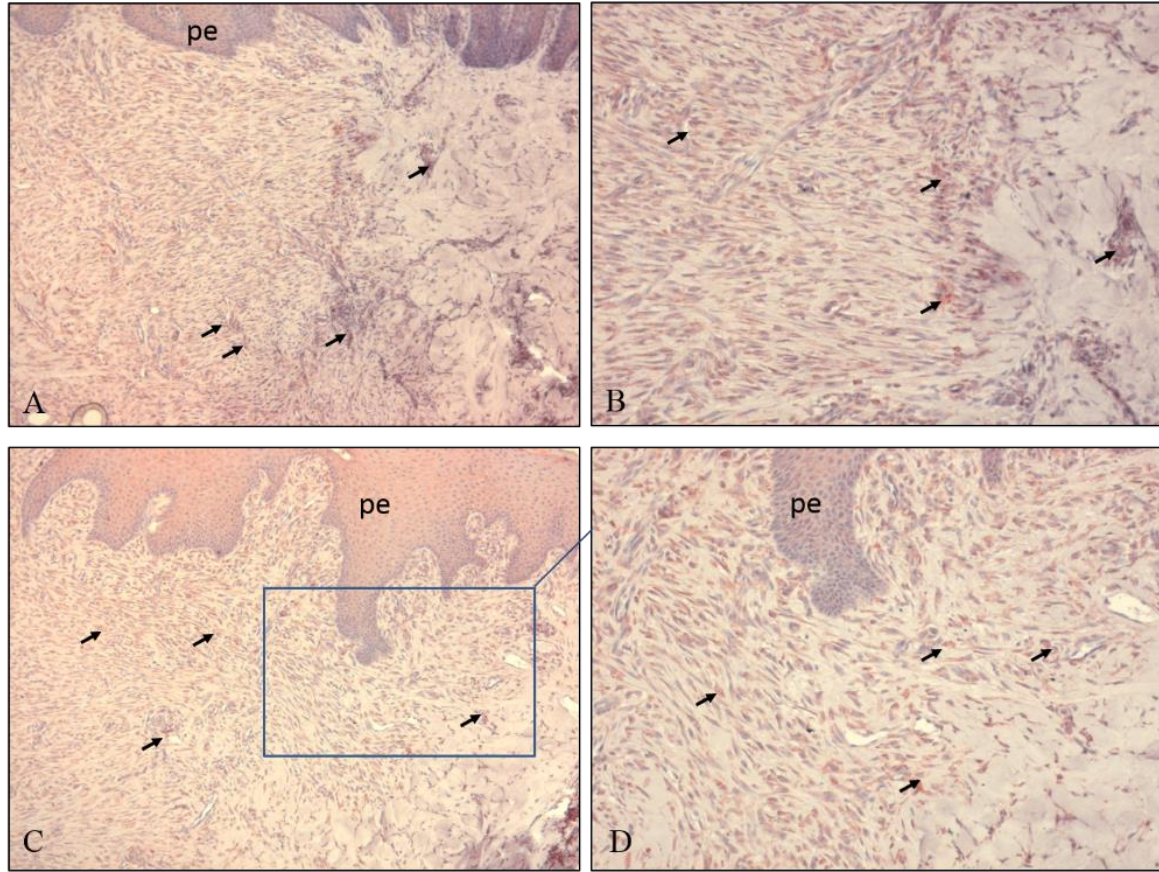
Resim 4.7. 3. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu VEGF ekspresyonu. VEGF'nin eksuda altında sağlam kalan doku içerisinde vasküler endotel ve inflamatuvar hücreler tarafından eksprese edildiği (ok) gözlemlendi (AEC boyaması; A,C: x100, B,D: x200) (yb: yara bölgesi, e:eksuda, ep: epitel, ve: vasküler endotel)

7. günde VEGF boyanmasının yara alanını dolduran tüm granülasyon dokusu boyunca olduğu dikkati çekti. Eksudayı oluşturan nötrofillerde boyanma izlenmedi (Resim 4.8).

10. günde VEGF ile pozitif boyanan hücreler, 7. günde olduğu gibi yara bölgesinde yer alan kapiller yapıları döşeyen endotel hücreler, fibroblastlar ve az sayıda inflamatuvar hücre olduğu dikkati çekti (Resim 4.9).



Resim 4.8. 7. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu VEGF ekspresyonu. VEGF'nin eksuda altından itibaren yara bölgesini tamamen dolduran fibroblast ve vasküler endotelden ekspresye olduğu (ok) izlendi (AEC boyaması; A,C: x40, B,D: x100) (e: eksuda, ep: epitel, gd: granülasyon dokusu, pe:prolifere epitel)



Resim 4.9. 10. gün deney ve kontrol grubu VEGF ekspresyonu. 10 günde VEGF'nin granülasyon dokusunu oluşturan fibroblastlardan eksprese olduğu (ok) görüldü (AEC boyaması; A,C: x40, B,D: x200)(pe: proliferatif epitel)

3, 7 ve 10. Günlere ait örneklerin VEGF ile boyanma yoğunlukları Çizelge 4.7'de görülmektedir.

Çizelge 4.7. Gruplara göre 3, 7 ve 10. güne ait VEGF boyanma yoğunlukları

	3. gün		7. gün		10. gün	
Örnek no.	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu
1	2	2	3	2	2	3
2	3	2	3	2	3	3
3	3	1	3	2	3	3
4	3	2	2	2	3	2
5	3	2	3	1	3	3
6	2	1	3	2	2	2
7	3	2	2	2	2	3
8	3	3	2	2	2	3

Kontrol grubunun VEGF ile boyanma yoğunluklarının günler içindeki değişimi değerlendirildiğinde, 3. ve 7. gün VEGF değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0,05$). 10. gün değerleri, 3. gün ve 7. gün değerlerinden anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,05$)(Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Kontrol grubu için VEGF değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon işaret testi sonuçları

	Kontrol						Wilcoxon Test	
	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	Ss	z	P
VEGF 3.	8	1.9	2	1	3	0.6	0.00	1.000
VEGF 7.	8	1.9	2	1	2	0.4		
VEGF 3.	8	1.9	2	1	3	0.6	-2.33	0.020
VEGF 10.	8	2.8	3	2	3	0.5		
VEGF 7.	8	1.9	2	1	2	0.4	-2.33	0.020
VEGF 10.	8	2.8	3	2	3	0.5		

Deney grubunun VEGF ile boyanma yoğunluklarının günler içindeki değişimi değerlendirildiğinde, 3, 7. ve 10. gün VEGF değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0,05$) (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Deney grubu için VEGF değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları

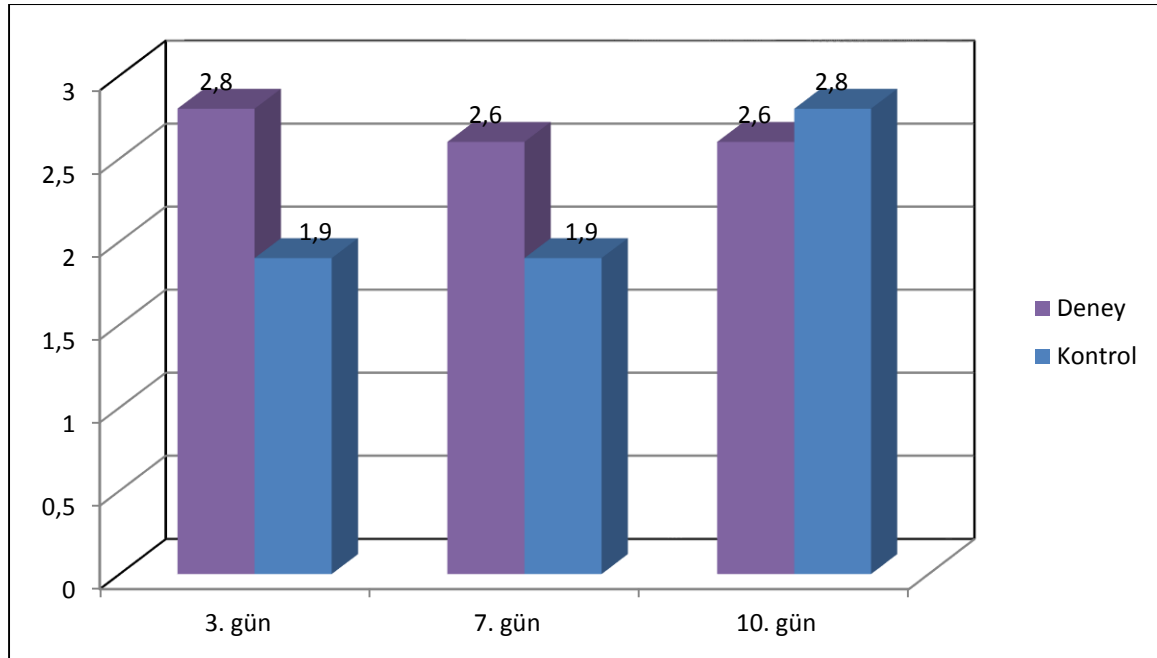
	Deney						Wilcoxon Test	
	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	Ss	z	P
VEGF 3.	8	2.8	3	2	3	0.5	-0.45	0.655
VEGF 7.	8	2.6	3	2	3	0.5		
VEGF 3.	8	2.8	3	2	3	0.5	-1.00	0.317
VEGF 10.	8	2.6	3	2	3	0.5		
VEGF 7.	8	2.6	3	2	3	0.5	-0.58	0.564
VEGF 10.	8	2.6	3	2	3	0.5		

Deney ve kontrol gruplarının 3, 7. ve 10. gündeki VEGF boyanma yoğunlukları karşılaştırıldığında, 3. ve 7. güne ait deney grubu örneklerinin VEGF boyanma yoğunlukları,

kontrol grubu örneklerine göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). VEGF 10. gün değerlerinde deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir ($p>0,05$). (Çizelge 4.10)

Çizelge 4.10. VEGF değerleri bakımından deney ve kontrol grupları arasındaki farklılığa ilişkin Mann-Whitney U testi sonuçları

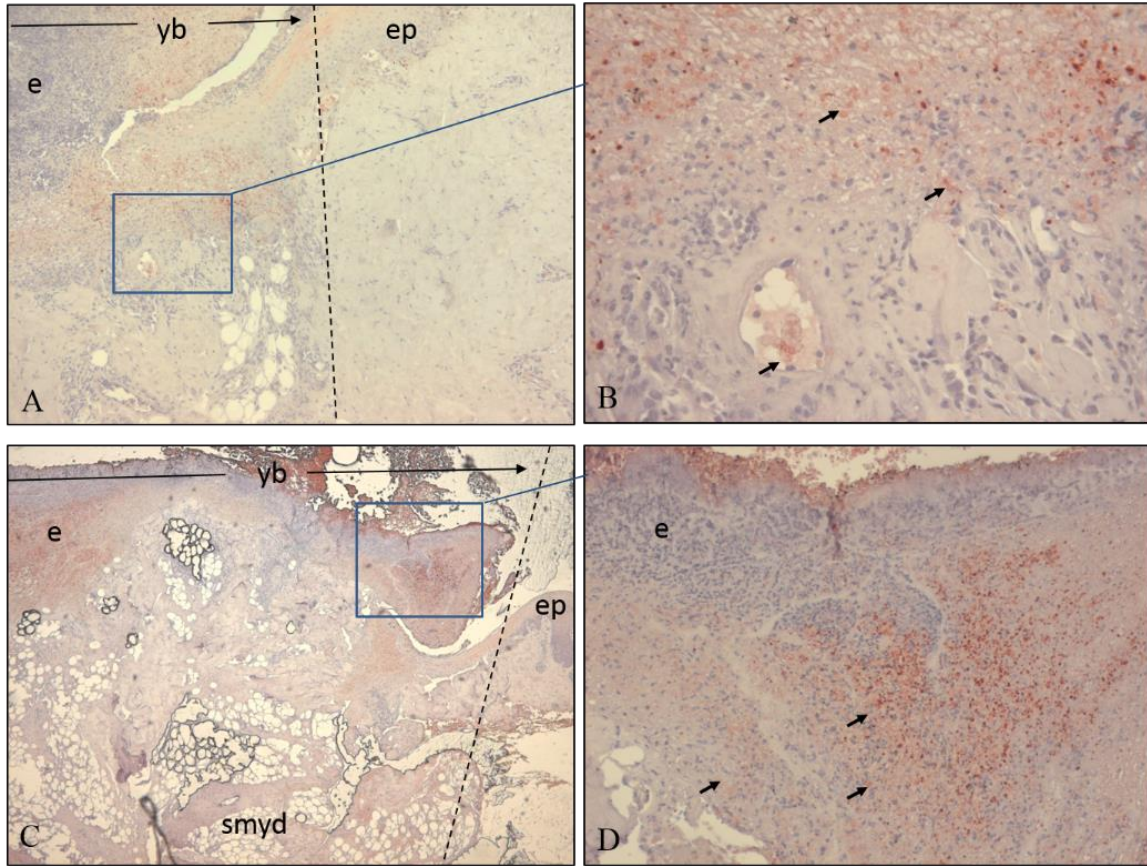
		n	Mean	Median	Minimum	Maximum	ss	Mean Rank	Mann-Whitney U	
VEGF 3.	Deney	8	2.8	3	2	3	0.5	11.3	-2.53	0.011
	Kontrol	8	1.9	2	1	3	0.6	5.8		
	Toplam	16	2.3	2	1	3	0.7			
VEGF 7.	Deney	8	2.6	3	2	3	0.5	11.2	-2.65	0.008
	Kontrol	8	1.9	2	1	2	0.4	5.8		
	Toplam	16	2.3	2	1	3	0.6			
VEGF 10.	Deney	8	2.6	3	2	3	0.5	7.3	-0.71	0.480
	Kontrol	8	2.8	3	2	3	0.5	8.6		
	Toplam	16	2.7	3	2	3	0.5			



Şekil 4.2. VEGF değerleri bakımından deney ve kontrol gruplarının günlere göre ortalamalarının grafiği

4.2.2. TGF- β

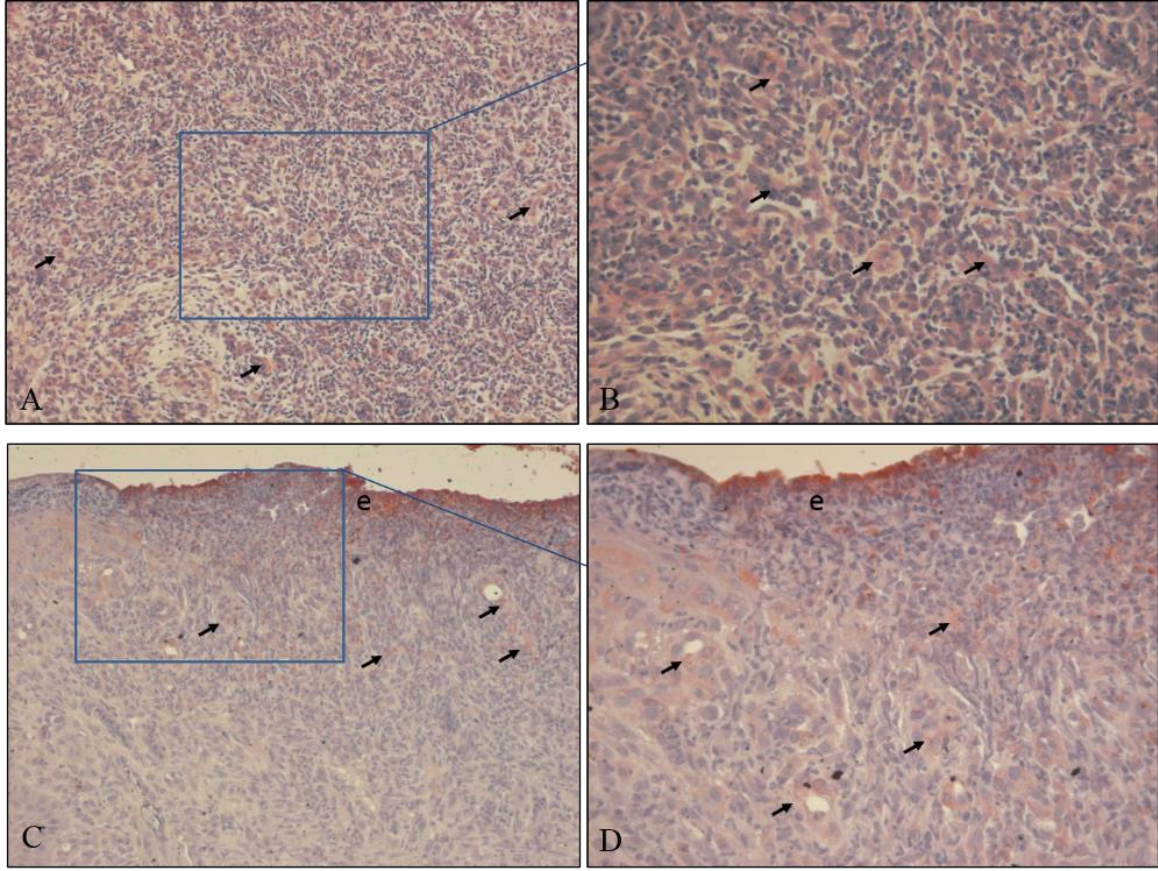
3. günde her iki grupta da yara alanını dolduran eksuda ve eksudanın hemen altında diffüz TGF- β boyanması görüldü. Submukozal bağ dokuda yer alan vasküler yapılar ve bunların etrafındaki inflammatuar hücrelerde TGF- β pozitifliği saptanmadı (Resim 4.10).



Resim 4.10. 3. gün deney(A,B) ve kontrol (C,D) grubu TGF- β ekspresyonu. 3. günde yalnızca eksuda tabanındaki inflammatuar hücrelerde TGF- β pozitifliği (ok) izlendi (AEC boyaması; A: x40, B: x100, C: x20, D: x100) (yb: yara bölgesi, e: eksuda, ep: epitel, smyd: submukozal yağ dokusu)

7. gün deney ve kontrol grubu örneklerinde TGF- β pozitif hücrelerin eksuda tabanında yer alan hücreler olduğu dikkati çekti. TGF- β pozitifliği, yara çevresindeki sağlıklı bağ doku içerisindeki vasküler yapılardan endotelde ve perivasküler inflammatuar hücrelerde izlendi (Resim 4.11).

7. gün deney grubu örneklerinin yarısında kuvvetli boyanma izlenirken kontrol grubu örneklerinde ise genellikle orta derecede boyanma görüldü. Boyanan hücrelerin eksudanın tabanında yer alan inflammatuar hücreler olduğu görüldü.



Resim 4.11. 7. gün deney(A,B) ve kontrol(C,D) grubu TGF- β ekspresyonu. TGF- β 'nın yara bölgesini tamamen dolduran fibroblast, inflamatuvar hücreler ve endotel hücrelerden eksprese edildiği (ok) gözlemlendi (AEC boyaması; A,C: x100, B,D: x200)(e:eksuda)

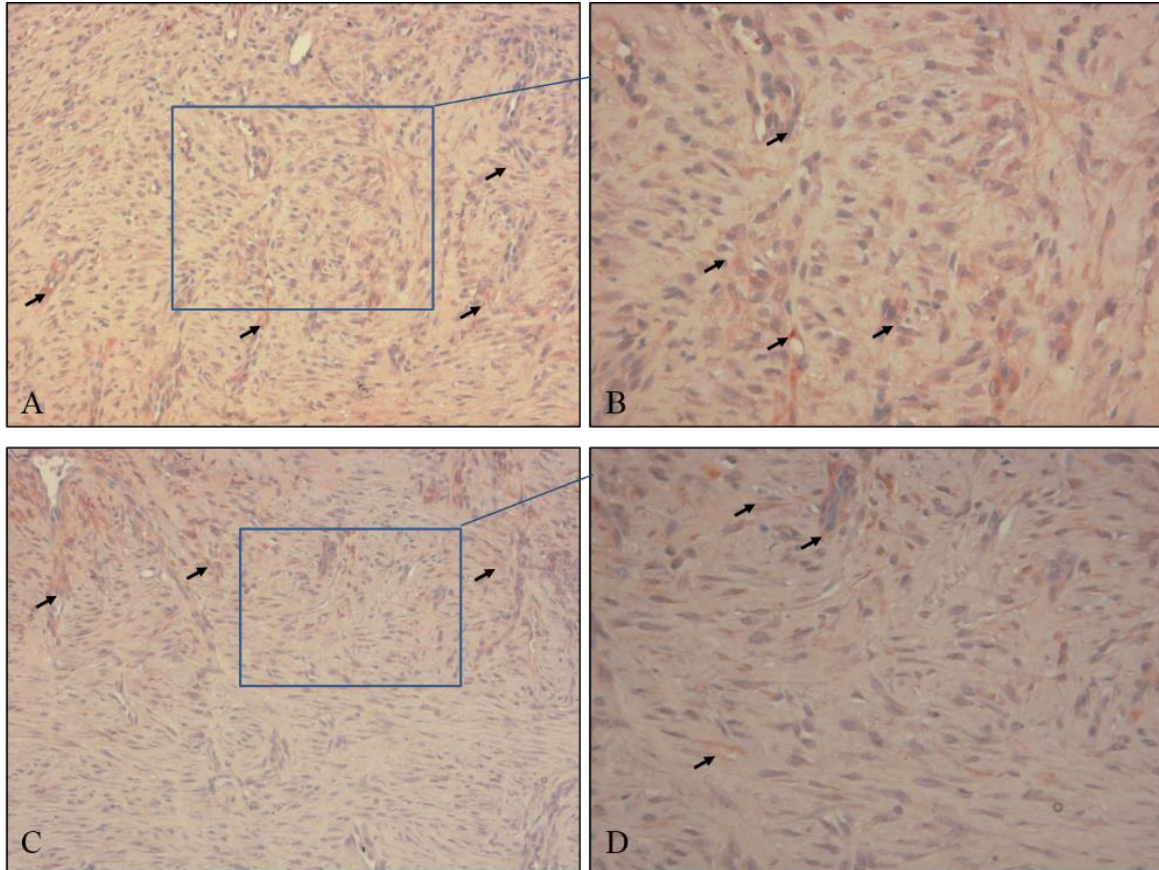
10. günde deney ve kontrol gruplarında yara bölgesinin epitelle örtüldüğü eksudanın ortadan kalktığı görüldü. 7. güne benzer şekilde yara alanında sağlıklı bağ doku içerisindeki kapillerleri döşeyen endotelde ve perivasküler inflamatuvar hücrelerde TGF- β pozitifliği dikkati çekti (Resim 4.12).

10. gün deney grubu örneklerinin yarısında orta derecede (2) boyanma görüldü. Boyanan hücrelerin kontrol grubundaki örneklere benzer şekilde inflamatuvar hücreler etrafında olduğu dikkati çekti. Birkaç fibroblastta zayıf TGF- β pozitifliği izlendi.

3, 7. ve 10. gün örneklerinin TGF- β ile boyanma yoğunlukları Çizelge 4.11'de görülmektedir.

Çizelge 4.11. Gruplara göre 3, 7 ve 10. güne ait TGF- β boyanma yoğunlukları

	3. gün		7. gün		10. gün	
Örnek no.	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu
1	3	3	2	2	2	1
2	2	1	3	3	1	1
3	3	2	3	2	2	1
4	3	3	1	1	1	1
5	2	2	2	2	2	1
6	3	3	2	2	1	1
7	2	2	3	2	2	2
8	3	2	3	2	1	1

Resim 4.12. 10. gün deney (A,B) ve kontrol (C,D) grubu TGF- β ekspresyonu. TGF- β 'nın vasküler endotel ve fibroblastlardan eksprese olduğu (ok) gözlemlendi (AEC; A,C: x100, B,D: x200)

Kontrol grubunun TGF- β ile boyanma yoğunluklarının günler içindeki değişimi değerlendirildiğinde, 3. ve 7. gün TGF- β değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

fark görülmemektedir ($p>0,05$). 3. gün ve 7. gün değerleri, 10. gün değerlerinden anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,05$) (Çizelge 4.12)

Çizelge 4.12. Kontrol grubu için TGF- β değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları

	Kontrol						Wilcoxon Test	
	n	Mean	Median	Minimum	Maksimum	ss	z	p
TGF-β 3.	8	2.3	2	1	3	1.0	-0.56	0.577
TGF-β 7.	8	2.0	2	1	3	1.0		
TGF-β 3.	8	2.3	2	1	3	1.0	-2.25	0.024
TGF-β 10.	8	1.1	1	1	2	0.0		
TGF-β 7.	8	2.0	2	1	3	1.0	-2.33	0.020
TGF-β 10.	8	1.1	1	1	2	0.0		

Deney grubunun TGF- β ile boyanma yoğunluklarının günler içindeki değişimi değerlendirildiğinde, 3. ve 7. gün TGF- β değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0,05$). 3. gün değerleri 10. gün değerlerinden anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,05$). 7. ve 10. gün TGF- β değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir ($p>0,05$). (Çizelge 4.13)

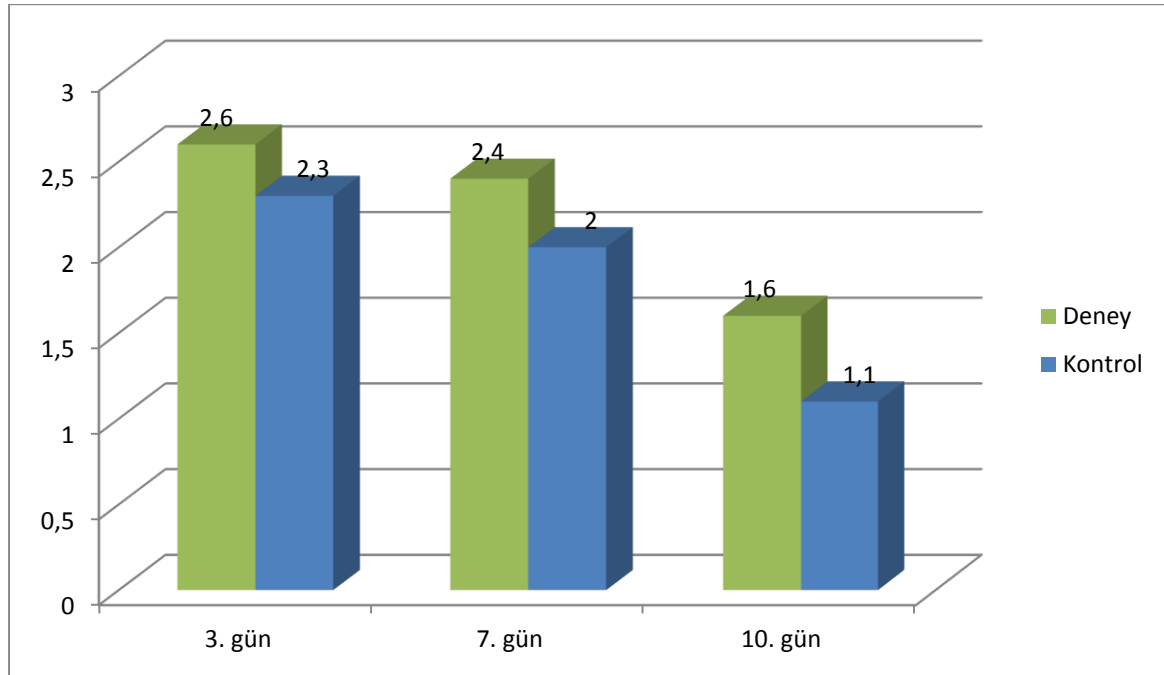
Çizelge 4.13. Deney grubu için TGF- β değerlerinin günlere göre farklılığına ilişkin Wilcoxon İşaret Testi sonuçları

	Deney						Wilcoxon Test	
	n	Mean	Median	Minimum	Maksimum	Ss	z	p
TGF-β 3.	8	2.6	3	2	3	0.5	-0.71	0.480
TGF-β 7.	8	2.4	2.5	1	3	0.7		
TGF-β 3.	8	2.6	3	2	3	0.5	-2.07	0.038
TGF-β 10.	8	1.6	2	1	2	0.5		
TGF-β 7.	8	2.4	2.5	1	3	0.7	-1.89	0.059
TGF-β 10.	8	1.6	2	1	2	0.5		

Deney ve kontrol gruplarının 3, 7. ve 10. gündeki TGF- β boyanma yoğunlukları karşılaştırıldığında, deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte 3, 7. ve 10. günlerdeki TGF- β boyanma yoğunluklarının deney grubunda daha yüksek olduğu görülmüştür. (Çizelge 4.14)

Çizelge 4.14. TGF- β değerleri bakımından deney ve kontrol grupları arasındaki farklılığa ilişkin Mann-Whitney U testi sonuçları

		N	Mean	Median	Minimum	Maksimum	ss	Sıra Ort	Mann-Whitney U	
TGF- β 3.	Deney	8	2.6	3	2	3	0.5	9.7	-1.12	0.263
	Kontrol	8	2.3	2	1	3	0.7	7.3		
	Toplam	16	2.4	2.5	1	3	0.6			
TGF- β 7.	Deney	8	2.4	2.5	1	3	0.7	9.8	-1.24	0.215
	Kontrol	8	2.0	2	1	3	0.5	7.2		
	Toplam	16	2.2	2	1	3	0.7			
TGF- β 10.	Deney	8	1.6	2	1	2	0.5	9.8	-1.77	0.077
	Kontrol	8	1.1	1	1	2	0.4	6.4		
	Toplam	16	1.3	1	1	2	0.5			



Şekil 4.3. TGF- β değerleri bakımından deney ve kontrol gruplarının günlere göre ortalamalarının grafiği

4.3. Korelasyon Analizi Sonuçları

Kontrol ve Deney grubunda inflamasyon, TGF- β ve VEGF 3. gün değerleri arasındaki korelasyon incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir ($p>0,05$)(Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Deney ve kontrol grupları için inflamasyon, TGF- β ve VEGF 3. gün değerleri arasındaki ilişkilerine ilişkin Spearman Korelasyon analizi sonuçları

Grup			TGF-B 3.	VEGF 3.
Deney	İnflamasyon 3.*	r	-	-
		p	-	-
		N	8	8
	TGF-B 3.	r		-0,447
		p		0,267
		N		8
Kontrol	İnflamasyon 3.	r	0,181	-0,667
		p	0,668	0,071
		N	8	8
	TGF-B 3.	r		-0,248
		p		0,553
		N		8

* İnflamasyon 3. gün değerleri 1. grupta hiç değişim göstermediğinden korelasyon hesaplanamamıştır.

Kontrol ve Deney grubunda inflamasyon, TGF-B ve VEGF 7. gün değerleri arasındaki korelasyon incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir ($p>0,05$). (Çizelge 4.16)

Çizelge 4.16. Deney ve kontrol grupları için inflamasyon, TGF- β ve VEGF 7. gün değerleri arasındaki ilişkilerine ilişkin Spearman Korelasyon analizi sonuçları

Grup			TGF-B 7.	VEGF 7.
Deney	İnflamasyon 7.	r	0,370	-0,067
		p	0,367	0,875
		N	8	8
	TGF-B 7.	r		-0,062
		p		0,885
		N		8
Kontrol	İnflamasyon 7.	r	0,516	-0,293
		p	0,190	0,482
		N	8	8
	TGF-B 7.	r		0
		p		1
		N		8

Kontrol ve Deney grubunda inflamasyon, TGF- β ve VEGF 10. gün değerleri arasındaki korelasyon incelendiğinde, kontrol grubunda, inflamasyon ve TGF- β değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmüştür ($p<0,05$). İnflamasyon 10. gün değerleri arttıkça TGF- β 10. gün değerlerinin de artması beklenmektedir. (Çizelge 4.17)

Çizelge 4.17. Deney ve kontrol grupları için inflamasyon, TGF- β ve VEGF 10. gün değerleri arasındaki ilişkilerine ilişkin Spearman Korelasyon analizi sonuçları

Grup			TGF-B 10.	VEGF 10.
Deney	İnflamasyon 10.	r	-0,471	-0,471
		p	0,286	0,286
		N	7	7
	TGF-B 10.	r		-0,167
		p		0,721
		N		7
Kontrol	İnflamasyon 10.	r	1*	0,218
		p	0	0,604
		N	8	8
	TGF-B 10.	r		0,218
		p		0,604
		N		8

5. TARTIŞMA

Ağız, başta sekonder yara iyileşmesine bırakılanlar olmak üzere, periodontal işlemler sonrasında meydana gelen yaraların iyileşmesi için zor bir ortamdır. Çiğnemenin oluşturduğu travma, geniş kommensal flora ve operasyon sonrası mekanik temizliğin zorlaşmasına bağlı olarak artan mikrobiyal dental plak, iyileşme sürecini olumsuz olarak etkileyebilmektedir[5].

Ağız cerrahisi işlemlerinin başarısını belirleyen önemli faktörlerden biri plak kontrolünün sağlanması ve oral hijyenin idamesidir[102]. Etkili bir plak kontrolü sağlanamadığında, plakta bulunan bakteriler yara yüzeyinde kolonize olarak, inflamasyona, granülasyon dokusunda artışa ve bunun sonucunda ise tamir sürecinin uzamasına neden olabilmektedir. Bakteriler, epitelyal ve bağ dokusu hücrelerini direkt veya indirekt olarak etkileyerek, tiplerine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak yara iyileşmesini geciktirebilmektedir[4]. Yara iyileşmesinin olumsuz olarak etkilenmesinde kolonize olan bakteri miktarı önemlidir. Bakteri miktarındaki artış ($>10^5$) epitelizasyonu azaltmakta, bakteriyel metabolitler epitelyal hücre göçünü inhibe etmekte, dermal proteinleri ve polisakkaritleri sindirmekte, nötrofilik proteazların ve sitotoksik enzimlerin artışına neden olmaktadır[5]. Yara iyileşmesinde gecikmeyle birlikte post-operatif konforsuzluk ve ağrı meydana gelmektedir[102].

Dişetinin ve alveoler mukozanın anatomik, gelişimsel ya da travmatik deformitelerini düzeltmek amacıyla uygulanan gingivektomi, serbest diş eti grefti, laterale kaydırılan flep gibi bazı periodontal cerrahi işlemlerde oluşturulan yaraların sekonder iyileşmeye bırakılması gerekmektedir. Yapılan bazı operasyonlar sonrasında ise oluşan greft membran açılmaları sonucunda iyileşme, sekonder yara iyileşmesi şeklinde olmaktadır. Sekonder yara iyileşmesine bırakılan yaralarda onarım, yara kenarlarının karşı karşıya getirildiği yaralardan daha yavaştır. Özellikle bu tarz yaraların bakteriyel kontaminasyon riski daha fazladır[24]. Bu açıdan, periodontal yara iyileşmesinde klinik sonuçları geliştirmek, hasta konforunu artırmak ve iyileşme sürecini kısaltıp sağlıklı bir doku oluşmasını sağlamak için bazı terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır [29].

Bu amaçla yapılan araştırmalarda bilinen antimikrobiyaller olan bisguanidin klorheksidin diglukonat (Corsodyl®, Klorhex®), fenolik bileşikler (Listerine®), ağır metal tuzları, stanöz florid (Meridol®) ve H_2O_2 gibi maddeler kullanılmıştır [5, 103]. Uygun antimikrobiyal

tedavi ile mikrobiyal floranın baskılanması ve uygun yara bakımıyla iyileşme sürecinin hızlandırılabilceğı düşünülmesine rağmen yara iyileşme süresini kısaltmak amacıyla kullanılan mevcut kemoterapötik ajanlarla istenilen sonuçlar elde edilememiştir[7]. Yapılan çalışmalarda, klorheksidin, sodyum hipoklorit, povidon iyodür, hidrojen peroksit gibi kimyasal ajanların epitelyal hücreler ve gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir[7, 8].

Tüm bu nedenlerle yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla kullanılacak en az yan etkiye sahip ve herhangi bir direnç gelişmesine neden olmayacak yeni kemoterapötik ajanlara ihtiyaç duyulmuştur.

Antimikrobiyal özelliğı olan ozonun, yaranın enfekte olmasını önleyerek yara iyileşmesine katkıda bulunduğı düşünölmektedir[2]. Yapılan çalışmalarda, ozonun antimikrobiyal etkisinin yanı sıra çeşitli mekanizmalar yoluyla iyileşme üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir.[2, 3, 12].

Ozon, arteriol ve venüllerde dilatasyonu sağlayan nitroz oksit sentezine neden olur, vazodilatasyon, alyuvarların yığılmasını önleyerek oksijen taşımaları için kontakt alanlarını artırır. Glikoliz ve krebs döngüsü gibi aerobik süreçleri aktive ederek dolaşımı aktive eder. Bu nedenle ozon, dolaşım bozukluklarının tedavisinde de kullanılabilmektedir[105].

Ozon, hidrojen peroksit miktarını artırarak antioksidan enzim ekspresyonu gibi çeşitli defans mekanizmalarını uyarır. Hidrojen peroksit, kandaki 2-3 difosfogliserat seviyesini artırarak hemoglobin-oksijen ayrılmasını kolaylaştırır ve sonuç olarak dokuda oksijenin serbest kalmasını sağlar. Bu durumdan yola çıkılarak, ozonun biyokimyasal olarak doku oksijen basıncını artırdığı yorumu yapılabilir[66].

Ozonun antimikrobiyal özelliğı ve kutanöz yaralar üzerine olumlu etkileri göz önünde bulundurulduğunda ağız bölgesinde oluşturulan yaralar üzerine de etkili olabileceğı düşünölmektedir. Ağız bölgesinde oluşturulan yaraların iyileşmesi üzerine ozonun etkisini inceleyen çalışmalarda ozonlanmış yağ ve ozonlanmış su kullanıldığı, ancak ozon gazı uygulamasının yapılmadığı dikkati çekmektedir[2, 3]. Tüm bu bilgiler sonucunda araştırmamızda ağız bölgesinde oluşturulmuş yaralarda topikal ozon gazı uygulamasının yara iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda ozon elde etmek için kullanılan Ozonytron'da (MIOInternational, GmbH, Germany) oksijen aktivasyon jeneratörü yüksek frekansta ve voltajda bir güç kullanır. Çift kat camdan oluşan probun içinde, elektromanyetik enerji üreten ve yayan soy gazlardan oluşan bir karışım vardır. Probun ucu vücutla temasa geçtiğinde ciltle arasında kalan havadaki tüm bileşenleri değişime uğratarak maddenin 4. hali olan plazma formuna dönüştürmektedir. Üretici firma bu değişim sonucunda oluşanlardan sadece ozonun değil tüm bileşenlerin, dezenfekte edici ve iyileştirici etkisi olduğunu ve elektriksel deşarj sonucunda soğuk bir plazmanın üretildiğini, oluşan tedavinin ise bir çeşit plazma terapisi olduğunu belirtmektedir[138]. Ozon jeneratörlerinin çalışma prensipleriyle ilgili literatürlerin incelenmesinde, Ozonytron®'da "Soğuk Plazma Sistemi"nin kullanıldığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızdaki deney gruplarının ve değerlendirme protokolünün oluşturulması için Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalardan faydalanılmıştır[12]. Kim ve arkadaşlarının kobaylar üzerinde yaptıkları araştırmada, topikal olarak uygulanan ozonlanmış yağın akut yaralar üzerine iyileştirici etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada 16 kobay yer almış ve her bir kobayın bacağına punch biyopsi yöntemiyle 6 mm çapında 4 adet yara oluşturulmuştur. Yaralardan ikisine her gün 2 damla ozonlanmış yağ, birine her gün saf zeytin yağ uygulanmış, birine ise herhangi bir ek uygulama yapılmamıştır. Operasyonu takip eden 3, 7. ve 10. günlerde oluşturulmuş yaralardan eksizyonel biyopsi ile örnekler alınmıştır. Araştırmacılar, domuz derisinin yapısıyla insan derisi arasındaki benzerlik nedeniyle, domuz modellerinin en çok kullanılan modeller olduğunu belirtmişler ancak bu çalışmada daha ucuz ve daha kolay elde edilebilir olması nedeniyle domuz yerine kobay kullandıklarını ifade etmişlerdir. Bu çalışmadan hareketle çalışmamızda erken yara iyileşmesini değerlendirmek için örneklerin 3, 7 ve 10. günlerde alınması planlandı. Bireysel farklılığı ortadan kaldırmak için kontrol ve deney gruplarının aynı denek üzerinde olması ve farklı günlerde alınan örneklerin de yine aynı denekten elde edilmesine karar verildi. Ancak gingival bölgede 6 adet yara oluşturma ve yara bölgelerinden 3,7. ve 10.günde histolojik inceleme için biyopsi alma gereksinimi bu çalışmayı insan üzerinde gerçekleştirmemizi engellemiştir. Diğer laboratuvar hayvanlarının ağız bölgesinde yeterli büyükte 6 adet yara oluşturmak imkansız olacağından çalışmamızın yeterli büyükte gingival dokuya sahip bir hayvan üzerinde yapılması gerekmiştir. Bu çalışmada daha küçük laboratuvar hayvanlarının seçilmemesinin diğer bir nedeni de, bu hayvanların insanlardan anatomik ve fizyolojik olarak çok farklı

olmasıdır. Domuzlar ise anatomik ve fizyolojik olarak insanlarla oldukça benzer cilt özelliklerine sahiptir. Küçük memeli hayvanlar daha ince epidermis ve dermise sahipken, domuzlardaki epidermis ve dermis kalınlıkları insaninkilerle benzerdir. Epidermis kalınlığı insanlarda 30-140µm, domuzlarda ise 50-120 µm'dir[139]. Domuzlardaki dermal kolajen yapısı ve dermis içerisindeki kan damarlarının büyüklüğü ve dağılımı insanlardakine benzer yapıya sahiptir[12]. Çoğu küçük memeli hayvanda yara iyileşmesi yara kontraksiyonu şeklinde olurken, insanlarda ve domuzlarda reepitelizasyon ile gerçekleşmektedir. Bunun yanında, domuz fizyolojisi insan fizyolojisi ile oldukça benzerdir ve çoğu organ sistemleri benzer anatomik ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. İnsan ve domuz arasındaki bu benzerlikler göz önünde bulundurulduğunda, yara iyileşmesinin değerlendirileceği bu çalışma için domuzun oldukça uygun bir hayvan modeli olduğu sonucuna varıldı[139].

Çalışma öncesinde yapılan biyoistatistiksel incelemede çalışmanın %80 güçle gerçekleştirilebilmesi için çalışmada en az 7 domuz (6 yara X 7 =42 yara) kullanılması gerektiği ancak olası veri kayıpları dikkate alındığında 1 yedek domuz (6 yara) ilave edilmesinin uygun olduğu görüldü. Bu nedenle toplam deney hayvanı sayısı 8 olarak belirlendi.

Daha önce gingival bölgedeki oluşturulan yaralarda gaz formundaki ozonun yara iyileşmesi üzerine etkisini değerlendiren çalışma olmadığı için, ozonun kullanılma sıklığına, ozonlanmış yağın yara iyileşmesi üzerine etkisini inceleyen çalışmalara bakılarak karar verildi. Bu çalışmalarda yağ yara bölgesine her gün uygulandığı için bizim araştırmamızda da ozon gazı uygulaması her gün yapıldı[2, 3, 12].

Çalışmada kullanılacak optimum ozon dozunun, uygulama süresinin ve sıklığının belirlenmesi amacıyla yapılan literatür taramasında, bu konuda bir uzlaşma olmadığı görülmektedir[140]. Literatürde, araştırmamızda yer alan ozon cihazı (Ozonytron®) kullanılarak elde edilen ozon gazının yara iyileşmesi üzerine etkisini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır ve aynı cihazın kullanımı için referans alınabilir bir konsantrasyon ve uygulama süresi yoktur. Bu nedenle araştırmamızda, cihazla elde edilebilecek en yüksek ozon gazı konsantrasyonuyla çalışılmaya karar verildi ve cihaz en üst seviyede (5.seviye) kullanıldı [125].

Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yaraların oluşturulması ve örneklerin elde edilmesi punch biyopsi yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve epitelizasyonun değerlendirilebilmesi için en uygun yöntemin bu yöntem olduğu belirtilmiştir[12]. Çalışmamızda bu yöntem kullanılarak elde edilecek yaralarda histolojik ve immünohistokimyasal incelemelerin yapılabileceği en uygun genişliğini belirlemek amacıyla ön çalışma yapıldı ve sonuç olarak, çalışmada eksizyonel yara modeli için punch biyopsi yöntemiyle 10 mm çapında defektler oluşturuldu.

Çalışmada ozon gazının sadece operasyon alanında lokalize kalması amacıyla yara oluşturmada önce domuzların palatinal bölgesinden silikon ölçü maddesiyle (Zeta plus®, Zhermack) ölçü alındı, ölçüyü takiben elde edilen silikon ölçü palatinal bölgeden ayrıldı ve ölçü üzerinde punch biyopsi yardımıyla 10 mm çapında perforasyonlar elde edildi. Perforasyonların altında yer alan palatinal bölgede yine punch biyopsi kullanılarak 10 mm çapında yara oluşturuldu. Araştırmadaki ozon uygulamaları sırasında 10 mm çapındaki cam prob, bu perforasyonlara yerleştirilerek elde edilen gazların sadece uygulama bölgesini hedeflemesi sağlandı.

Yara iyileşme süreci farklı birçok hücre tipi, büyüme faktörü ve ekstraselüler matriksin (ESM) birbirleriyle etkileşime girerek ilerlediği karmaşık olaylar zinciridir[141,142]. Araştırmamızda, iyileşme süreci boyunca dokuda meydana gelen değişimlerin gözlemlenmesi amacıyla defekt bölgeleri histolojik olarak incelendi. Histolojik incelemede inflamatuvar hücre miktarı ve epitelizasyon farklılıkları değerlendirildi.

Ayrıca, yaraların iyileşme sürecini etkileyen faktörlerin de ortaya konması amacıyla immünohistokimyasal olarak TGF- β ve VEGF miktarları değerlendirildi.

Yeni doğmuş fareler üzerinde yapılan bir çalışmada TGF- β 'nın normal cilt içine enjeksiyonu sonucunda, anjiyogenezis, fibrozis, yeni kolajen sentezi ve matriks içinde birleşmede artış olduğu görülmüştür[143]. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada insizyonel yaranın TGF- β ile tedavisi sonucunda, kolajen deposizyonunun ve yara dayanıklılığının arttığı izlenmiştir[144]. Yine ratlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada TGF- β 'ya karşı eksojen nötralize edici antikorların kullanılması sonucunda normal makrofaj akışının, anjiyogenezezin, kolajen ve fibronektin içeriğinin azaldığı dikkati çekmiştir [145, 146]. TGF- β_1 'den yoksun 10 günlük farelerle doğal tip farelerin karşılaştırıldıkları çalışmada, yara

oluşturulmasını takiben 10. günde TGF- β_1 'den yoksun farelerde, doğal farelere göre epitelizasyonun geciktiği ve granülasyon doku formasyonunun azaldığı görülmüştür[147].

Yapılan çalışmalarda VEGF'nin lokal olarak uygulanmasının yara iyileşmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada eksojen VEGF'nin iskemik fleplerin yara iyileşmesindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında VEGF uygulanan grupta gerilmeye direncin ve mikro damar yoğunluğunun daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, VEGF'nin ekstraselüler matriks üretimini artırdığını, erken anjiyogenezisi uyardığını ve doku onarımı için uygun bir ortam oluşturduğunu göstermiştir[148-150].

Brem ve arkadaşlarının diyabetli fareler üzerinde yaptıkları kontrollü çalışmada, insandan elde edilip kültüre edilen ve adenovirüs vektörleriyle yüksek salınımını sağlanan VEGF'ün yara bölgesine enjekte edilmesiyle, test grubunda kontrol grubuna göre yara kapanmasının hızlı olduğu rapor edilmiştir[86].

Ozonlanmış yağın yara iyileşmesi üzerine etkisini inceleyen çalışmalarda, ozonlanmış yağ uygulanan yaralarda VEGF ve TGF- β miktarlarının daha fazla olduğu gözlenmiştir[12]. Ayrıca diyabetik hastalardaki oluşmuş ayak ülserlerinde ozon terapisi uygulanan hastalarda iyileşmesinin daha hızlı ve iyileşme sürecinde VEGF ve TGF- β miktarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir[121].

Bu çalışmalardan yola çıkılarak araştırmamızda iyileşmenin değerlendirilmesinde VEGF ve TGF- β 'nın incelenmesine karar verildi.

Yıldırım ve arkadaşlarının 63 rat üzerinde yaptıkları çalışmada, ratların bacaklarında yumuşak doku travması oluşturulmuş ve ratlar rastgele üç gruba ayrılmıştır [66]. Birinci grup 1, 3, 7. günlerde ozonla (0,7 g/kg yoğunlukta ozon/oksijen karışımı)(OZONOSAN Photonic 1014, Hans GmbH Nordring & Iffezheim, Germany), ikinci grup 1, 3, 7. günlerde hiperbarik oksijen terapisiyle (HBO) tedavi edilmiş, üçüncü gruba ise ilave bir uygulama yapılmamıştır (kontrol grubu). Prosedürün sonunda inflamasyonun değerlendirilmesi için gerekli doku ve kan örnekleri alınmış ve inflamasyon belirteçleri (Doku Lipit Peroksidasyon ve indüklenbilir Nitröz Oksit Sentez enzimleri) değerlendirilmiştir. İnflamasyon belirteçlerinin 1, 3 ve 7. günlerdeki değerlendirilmesinde, bütün gruplarda inflamasyon

belirteçlerinin günler içinde azaldığı görülmüştür[66]. Çalışmamızda da bu çalışmayla benzer olarak inflamasyon skorlarının hem deney hem de kontrol grubunda günler içinde azaldığı izlendi. Kontrol ve deney gruplarında inflamasyonun 10. gün değerlerinin 3. ve 7. gün değerlerinden düşük olduğu dikkati çekti ($p<0,05$).

Yıldırım ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 3. ve 7. günlerde, inflamasyon belirteçlerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında ozon grubunda ve HBO grubunda daha az olduğu görüldü ($p<0,05$) [66]. Ancak bizim çalışmamızda deney ve kontrol gruplarının 3, 7. ve 10. günlerdeki inflamasyon skorları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, diyabetik ayak ülseri olan tip 2 diyabetli 50 hastada non-invaziv oksijen-ozon terapisinin etkinliğini değerlendirmiştir [121]. Hastalar rastgele iki gruba ayrılmış kontrol grubuna yalnızca iki günde bir yaranın debride edilerek nemli kalması için kapatılmasını içeren standart tedavi protokolü uygulanmıştır. Deney grubuna ise standart tedavi protokolüne ilaveten 20 gün boyunca her gün özel bir torba içerisinde 30 dakikalık oksijen ozon terapisi ($52 \mu\text{g/ml}$) (Huma-zon Promedic, Germany) uygulanmıştır. Yara boyutu başlangıçta ve 20. günde ölçülmüştür. Tedavi sonundaki kolajen miktarı incelenmiştir ve dokudan elde edilen örneklerdeki VEGF, TGF- β ve PDGF miktarları başlangıçta, 3, 7. ve 11. günlerde immünohistokimyasal boyaması yapılarak ve ELISA kiti kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada her iki grupta da kolajen miktarının günler içinde arttığı görülmüştür ancak araştırmacıların tedavi sonunda yaptıkları incelemede ozon kullanılan gruptaki yaraların kontrol grubundakilerden daha fazla kolajen lifi içerdiği izlenmiştir($p<0,05$).

Kim ve arkadaşları, 11. günde yaptıkları incelemede hem kontrol hem de deney gruplarındaki bütün yaralarda epitelizasyonun tamamlandığını görmüştür[12]. Benzer şekilde çalışmamızda da 10. günde yapılan histolojik incelemede bütün yaralarda epitelizasyonun tamamlandığı izlendi.

Patel ve arkadaşlarının ozon yağının serbest diş eti grefti elde ettikleri palatal bölgedeki yaranın re-epitelizasyonu üzerine etkisini inceledikleri çalışmada, re-epitelizasyon sitolojik yöntemler kullanılarak elde edilen keratinizasyon indeksi ve yüzeyel hücre indeksiyle değerlendirilmiştir[2]. Bu sitolojik indekslerde ozon grubunda 7. ve 21. günlerde kontrol

grubuna göre istatistiksel olarak önemli miktarda daha hızlı artış gözlenmiştir ($p \leq 0.001$). 2. ve 3. aylarda yapılan incelemede ise ozon grubunun keratinizasyon indeksinin daha fazla olduğu görülmüştür. ($p \leq 0.001$). Çalışmamızda 3, 7. ve 10. güne ait epitelizasyon skorları incelendiğinde, 3. ve 10. gün örneklerine ait skorların, her bir gün için aynı olduğu görüldü. Bu sebeple bu günlere ait örneklerin skorlarının istatistiksel değerlendirilmesi yapılmadı. Deney ve kontrol gruplarının 7. güne ait örneklerin epitelizasyon skorları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$).

Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada VEGF değerlerinin tüm gruplarda 7. ve 11. günlerde artmış olduğu görülmüştür[121]. Çalışmamızda da benzer olarak kontrol grubunun 10. gün VEGF değerleri, 3. gün ve 7. gün değerlerinden anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,05$). Bununla birlikte 3. ve 7. gün VEGF değerleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). Deney grubunun VEGF ile boyanma yoğunluklarının günler içindeki değişimi değerlendirildiğinde, VEGF değerlerinin günler içinde arttığı ancak artışın istatistiksel olarak anlam ifade etmediği görüldü ($p>0,05$).

Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada tüm gruplardaki TGF- β seviyelerinin 7. ve 11. günde artmış olduğu görülmüştür[121]. Çalışmamızda ise kontrol grubunun TGF- β ile boyanma yoğunluklarının günler içindeki değişimi değerlendirildiğinde, TGF- β 'nın günler içinde azaldığı gözlemlendi ancak 3. ve 7. gün TGF- β değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). 3. ve 7. gün değerleri, 10. gün değerlerinden anlamlı olarak daha yüksek olarak görüldü ($p<0,05$). Deney grubunun TGF- β ile boyanma yoğunluklarının günler içindeki değişimi değerlendirildiğinde, TGF- β 'nın günler içinde azaldığı gözlemlendi ancak 3. ve 7. gün TGF- β değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). 3. gün değerleri 10. gün değerlerinden anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0,05$). 7. ve 10. gün TGF- β değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$).

Kim ve arkadaşlarının yaptıkları immünohistokimyasal incelemede 7. günde ozon grubunda daha fazla miktarda VEGF ve TGF- β sentezlendiği belirtilmiş ancak istatistiksel bilgi verilmemiştir[12]. Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 7. ve 11. gündeki VEGF seviyeleri, 11. gündeki TGF- β ekspresyonu, ozon grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla bulunmuştur ($P<0.001$)[121]. Bizim çalışmamızda ise deney ve kontrol gruplarının 3, 7. ve 10. gündeki VEGF boyanma

yoğunlukları karşılaştırıldığında, 3. ve 7. güne ait deney grubu örneklerinin VEGF boyanma yoğunlukları, kontrol grubu örneklerine göre anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p<0,05$). VEGF 10. gün değerlerinde deney ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$). Deney ve kontrol gruplarının 3, 7. ve 10. gündeki TGF- β boyanma yoğunlukları karşılaştırıldığında ise, deney grubunun boyanma yoğunlukları daha fazla olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$)

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, topikal olarak uygulanan ozon gazının domuzların palatinal mukozasında deneysel olarak oluşturulan eksizyonel yaraların sekonder iyileşme sürecindeki etkileri histolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Histolojik incelemede, inflamasyon skorları, kolajen lifleri ve epitelizasyon oluşumu değerlendirildi ancak hiçbir değişken için deney ve kontrol grupları arasında bir fark bulunamadı.

İmmünohistokimyasal incelemede 3, 7 ve 10. günlerdeki TGF- β ve VEGF boyanma yoğunlukları değerlendirildi. 3. ve 7. güne ait deney grubu örneklerinin VEGF boyanma yoğunlukları, kontrol grubu örneklerine göre istatistiki olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p<0,05$). 3. 7. ve 10. günlerdeki TGF- β ve 10. günde VEGF boyanma yoğunlukları bakımından kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmedi($p<0,05$).

Çalışmamız, ozon gazının ağız içi mukozal dokularda oluşturulmuş yaraların sekonder iyileşmesi üzerine etkisini histolojik ve immünohistokimyasal olarak inceleyen literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır. Bununla birlikte bu çalışmada kullanılan gereç ve yöntem ozonun sekonder yara iyileşmesi üzerine etkilerini konu alan diğer çalışmalardakilerin farklıdır. Bu nedenle diğer çalışmalarla, çalışmamız arasında tam bir kıyaslama yapabilmek mümkün değildir.

Daha detaylı bir değerlendirme için konuyla ilgili başka çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmalarda;

- İnsan modeli kullanılabilir ve yapılacak klinik araştırmalarda VAS skalası kullanılarak ağrı durumu değerlendirilebilir ve standardize edilmiş fotoğraflar kullanılarak fotografik inceleme yapılabilir.
- Farklı yoğunlukta ve sürelerde yapılacak uygulamaların yara iyileşmesine etkisi değerlendirilmelidir.
- Post-operatif değerlendirmelere daha uzun süre devam edilerek ozon gazının uzun dönemdeki etkileri görülebilir.

- Hayvan deneylerinde, yara iyileşmesinin değerlendirilmesinde antioksidan enzim seviyeleri, ROS miktarı veya yara boyutu gibi farklı değişkenler incelenebilir.
- Mikrobiyolojik parametrelerdeki değişikliklerle yara iyileşme hızı arasındaki ilişki değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

1. Aktaş, Ş. (2012). Kronik yarada lokal faktörler ve yardımcı tedaviler. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*, 26(2), 217-222
2. Patel, P.V., Kumar, V., Kumar, S., Vidya, G.D., and Patel, A. (2011). Therapeutic effect of topical ozonated oil on the epithelial healing of palatal wound sites: a planimetric and cytological study. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 2(4), 248–258.
3. Patel, P.V., Kumar, S., Vidya, G.D., Patel, A., Holmes, J.C., and Kumar, V. (2012). Cytological assessment of healing palatal donor site wounds and grafted gingival wounds after application of ozonated oil: an eighteen-month randomized controlled clinical trial. *Acta Cytologica*, 56(3), 277-284.
4. Hakkinen, L., Uitto, V.J., and Larjava, H. (2000). Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology 2000*, 24, 127-152.
5. Kozlovsky, A., Artzi, Z., Hirshberg, A., Israeli-Tobias, C., and Reich, L. (2007). Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(2), 164-171.
6. Nooh, N., and Graves, D.T. (2003). Healing is delayed in oral compared to dermal excisional wounds. *Journal of Periodontology*, 74(2), 242-246.
7. Thomas, G.W., Rael, L.T., Bar-Or, R., Shimonkevitz, R., Mains, C.W., Slone, D.S., Craun, M.L., and Bar-Or, D. (2009). Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. *The Journal of Trauma* 66(1), 82-90
8. Huth, K.C., Jakob, F.M., Saugel, B., Cappello, C., Paschos, E., Hollweck, R., Hickel, R., and Brand, K. (2006). Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *European Journal of Oral Sciences* 114(5), 435-440.
9. Voigt, J., and Driver, V.R. (2012). Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of The Wound Healing Society and The European Tissue Repair Society*, 20(3), 317-331.
10. Gupta, G., and Mansi, B. (2012). Ozone therapy in periodontics. *Journal of Medicine and Life*, 5(1), 59-67.

11. Nagayoshi, M., Fukuizumi, T., Kitamura, C., Yano, J., Terashita, M., and Nishihara, T. (2004). Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(4), 240-246.
12. Kim, H.S., Noh, S.U., Han, Y.W., Kim, K.M., Kang, H., Kim, H.O., and Park, Y.M. (2009). Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *Journal of Korean Medical Science*, 24(3), 368-374.
13. Fiorellini, J.P., Kim, David. M., and Uzel, N.G. (2012). Anatomy of The Periodontium. In Newman, M.G., Takei, H., Klokkevold, P.R., Carranza, F.A., *Carranza's Clinical Periodontology*, 11 th edition, Philadelphia: W. B. Saunders Company, 12-27
14. Winning, T.A., and Townsend, G.C. (2000). Oral mucosal embryology and histology. *Clinics in Dermatology*, 18(5), 499-511.
15. Bartold, PM., Bartold, W.L., and Narayanan, A.S. (2000). Moleculer and cell biology of the gingiva. *Periodontology 2000*, 24, 28-55.
16. Lindhe, J., Karring, T., Araitjo, M. (2003). Anatomy of the Periodontium. In Lindhe, J., Karring, T., Lang, N.P., *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th edition, Oxford, Blackwell Publishing Company, 21-49
17. Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Percoraro, R.E., Rodeheaver, G., and Robson, M.C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound repair and Regeneration: Official Publication of The Wound Healing Society [and] The European Tissue Repair Society*, 2(3), 165-170.
18. Robson, M.C., Steed, D.L., and Franz, M.G. (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery* 38(2), 72-140.
19. Robson, M.C. (1988). Disturbances of wound healing. *Annals of Emergency Medicine*, 17(12), 1274-1278.
20. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of The Wound Healing Society and The European Tissue Repair Society*, 16(5), 585-601.
21. Nauta, A., Gurtner, G., and Longaker, M.T. (2011). Wound healing and regenerative strategies. *Oral Diseases*, 17(6), 541-549.
22. Velnar, T., Bailey, T., and Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.

23. Natarajan, S., Williamson, D., Stiltz, A.J., and Harding, K. (2000). Advances in wound care and healing technology. *American Journal of Clinical Dermatology*, 1(5), 269-275.
24. Kumar, V., Abbas, A.K., and Aster, J.C., (2014) *Robbins Temel Patoloji*. (Çev Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U.). İstanbul: Nobel-Yüce. (Eserin orijinali 2013'de yayınlandı), 29-74.
25. Silva, C.O., Ribeiro Edel, P., Sallum, A.W., and Tatakis, D.N. (2010). Free gingival grafts: graft shrinkage and donor-site healing in smokers and non-smokers. *Journal of Periodontology*, 81(5), 692-701.
26. Orsini, M., Orsini, G., Benlloch, D., Aranda, J.J., Lazaro, P., and Sanz, M. (2004). Esthetic and dimensional evaluation of free connective tissue grafts in prosthetically treated patients: a 1-year clinical study. *Journal of Periodontology*, 75(3), 470-477.
27. Devishree, Gujjari, S.K., and Shubhashini, P.V. (2012). Frenectomy: a review with the reports of surgical techniques. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 6(9), 1587-1592.
28. Morselli, P., Vecchiet, F., and Marini, I. (1999). Frenuloplasty by means of a triangular flap. *Oral Surgery, Oral Medicine, oral Pathology, oral Radiology, and Endodontics*, 87(2), 142-144.
29. Seymen, G. Tıbbi Bir Bitki Ekstresi Olan Ankaferd Blood Stopper Uygulamasının Sekonder Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Histolojik Ve Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, sayfa: 4-31
30. Tugnait, A., and Clerehugh, V. (2001). Gingival recession-its significance and management. *Journal of Dentistry*, 29(6), 381-394.
31. Kassab, M.M., and Cohen, R.E. (2003). The etiology and prevalence of gingival recession. *Journal of the American Dental Association*, 134(2), 220-225.
32. Agarwal, K., Chandra, C., Agarwal, K., and Kumar, N. (2013). Lateral sliding bridge flap technique along with platelet rich fibrin and guided tissue regeneration for root coverage. *Journal of Indian Society of Periodontology* 17(6), 801-805.
33. Smukler, H., and Goldman, H.M. (1979). Laterally repositioned "stimulated" osteoperiosteal pedicle grafts in the treatment of denuded roots. A preliminary report. *Journal of Periodontology*, 50(8), 379-383.
34. Amorim, J.C., de Sousa, G.R., de Barros Silveira, L., Prates, R.A., Pinotti, M., and Ribeiro, M.S. (2006). Clinical study of the gingiva healing after

- gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, 24(5), 588-594.
35. Takei, H.H., Carranza, F.A., and Shin, K. (2012). Gingival Surgical Techniques. In Newman, M.G., Takei, H., Klokkevold, P.R., Carranza, F.A., *Carranza's Clinical Periodontology*, 11 th edition, Philadelphia: W. B. Saunders Company, 544-549
 36. Broughton, G., 2nd, Janis, J.E., and Attinger, C.E. (2006). Wound healing: an overview. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7), 1-32
 37. Diegelmann, R.F., and Evans, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Viirtual Library*, 1(9), 283-289.
 38. Shetty, V., Bertolami, C.N., (2004). Wound Healing. In Milaro, M., Ghali, G.E., Larsen, P.E., Waite, P.D., *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2nd edition, London, BC Decker Inc, 3-15
 39. Enoch, S., Leaper, D.J., (2008). Basic science of wound healing. *Surgery*, 26(2), 31-37.
 40. Lawrence, W.T. (1998). *Physiology of The Acute Wound*. *Clinics in Plastic Surgery*, 25(3), 321-340.
 41. Monaco, J.L., and Lawrence, W.T. (2003). Acute wound healing an overview. *Clinics in Plastic Surgery*, 30(1), 1-12.
 42. Guo, S., and Dipietro, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229.
 43. Singer, A.J., and Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine* 341(10), 738-746.
 44. Dahlback, B. (2000). Blood coagulation. *Lancet*, 355(9215), 1627-1632.
 45. Stiernberg, J., Redin, W.R., Warner, W.S., and Carney, D.H. (1993). The role of thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP-508) in initiation of tissue repair. *Thrombosis and Haemostasis*, 70(1), 158-162.
 46. Grinnell, F. (1984). Fibronectin and wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*, 26(2), 107-116.
 47. Blatti, S.P., Foster, D.N., Ranganathan, G., Moses, H.L., and Getz, M.J. (1988). Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(4), 1119-1123.

48. Ramasastry, S.S. (2005). Acute wounds. *Clinics in Plastic Surgery*, 32(2), 195-208.
49. Shah, J.M., Omar, E., Pai, D.R., and Sood, S. (2012). Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 45(2), 220-228.
50. Hart, J. (2002). Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *Journal of Wound Care*, 11(6), 205-209.
51. Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M.K., and Ghahary, A. (2013). Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 2(5), 215-224.
52. Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews. Immunology*, 8(12), 958-969.
53. Meszaros, A.J., Reichner, J.S., and Albina, J.E. (2000). Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *Journal of Immunology*, 165(1), 435-441.
54. Hunt, T.K., Hopf, H., and Hussain, Z. (2000). Physiology of wound healing. *Advances in Skin & Wound Care*, 13(2), 6-11.
55. Robson, M.C., Phillips, T.J., Falanga, V., Odenheimer, D.J., Parish, L.C., Jensen, J.L., and Steed, D.L. (2001). Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society*, 9(5), 347-352.
56. Fauci, A.S. (1996). Resistance to HIV-1 infection: it's in the genes. *Nature Medicine*, 2(9), 966-967.
57. Clemmons, D.R. (1984). Interaction of circulating cell-derived and plasma growth factors in stimulating cultured smooth muscle cell replication. *Journal Of Cellular Physiology*, 121(2), 425-430.
58. Duncan, M.R., Frazier, K.S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X., and Grotendorst, G.R. (1999). Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB Journal: Official Publication of The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(13), 1774-1786.
59. Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science*, 235(4787), 442-447.

60. Gabbiani, G., Ryan, G.B., and Majne, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27(5), 549-550.
61. Rudolph, R. (1979). Location of the force of wound contraction. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 148(4), 547-551.
62. Brew, K., Dinakarbandian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477(1-2), 267-283.
63. Karukonda, S.R., Flynn, T.C., Boh, E.E., McBurney, E.I., Russo, G.G., and Millikan, L.E. (2000). The effects of drugs on wound healing: part 1. *International Journal of Dermatology*, 39(4), 250-257.
64. Bishop, A. (2008). Role of oxygen in wound healing. *Journal of Wound Care*, 17(9), 399-402.
65. Tandara, A.A., and Mustoe, T.A. (2004). Oxygen in wound healing: more than a nutrient. *World Journal of Surgery*, 28(3), 294-300.
66. Yildirim, A.O., Eryilmaz, M., Kaldirim, U., Eyi, Y.E., Tuncer, S.K., Eroglu, M., Durusu, M., Topal, T., Kurt, B., Dilmen, S., et al. (2014). Effectiveness of hyperbaric oxygen and ozone applications in tissue healing in generated soft tissue trauma model in rats: an experimental study. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi*, 20(3), 167-175.
67. Rodriguez, P.G., Felix, F.N., Woodley, D.T., and Shim, E.K. (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic Surgery*, 34(9), 1159-1169.
68. Schreml, S., Szeimies, R.M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M., and Babilas, P. (2010). Oxygen in acute and chronic wound healing. *The British journal of Dermatology*, 163(2), 257-268.
69. Deodhar, A.K., and Rana, R.E. (1997). Surgical physiology of wound healing: a review. *Journal of Postgraduate Medicine* 43(2), 52-56.
70. Ozbek, N., Guneren, E., Yildiz, L., Meydan, D., Cakir, S., and Coskun, M. (2005). The effect of pre-operative conventional and hyperfractionated radiotherapy schedules on wound healing and tensile strength in rats: an experimental study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 34(2), 185-192.
71. Gosain, A., and DiPietro, L.A. (2004). Aging and wound healing. *World Journal of Surgery*, 28(3), 321-326.

72. Gilliver, S.C., Ashworth, J.J., and Ashcroft, G.S. (2007). The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clinics in Dermatology* 25(1), 56-62.
73. Kiecolt-Glaser, J.K., Marucha, P.T., Malarkey, W.B., Mercado, A.M., and Glaser, R. (1995). Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet*, 346(8984), 1194-1196.
74. Marucha, P.T., Kiecolt-Glaser, J.K., and Favagehi, M. (1998). Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosomatic Medicine*, 60(3), 362-365.
75. Wilson, J.A., and Clark, J.J. (2004). Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Advances in Skin & Wound Care*, 17(2), 426-435.
76. Pierpont, Y.N., Dinh, T.P., Salas, R.E., Johnson, E.L., Wright, T.G., Robson, M.C., and Payne, W.G. (2014). Obesity and surgical wound healing: a current review. *ISRN Obesity*, 2014, 638936.
77. Chan, L.K., Withey, S., and Butler, P.E. (2006). Smoking and wound healing problems in reduction mammoplasty: is the introduction of urine nicotine testing justified? *Annals of Plastic Surgery*, 56(2), 111-115.
78. Ahn, C., Mulligan, P., and Salcido, R.S. (2008). Smoking-the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences. *Advances in Skin & Wound Care*, 21(5), 227-236
79. Arnold, M., and Barbul, A. (2006). Nutrition and wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117(7), 42-58.
80. Stechmiller, J.K. (2010). Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutrition in Clinical Practice*, 25(1), 61-68.
81. Thompson, C., and Fuhrman, M.P. (2005). Nutrients and wound healing: still searching for the magic bullet. *Nutrition in Clinical Practice*, 20(3), 331-347.
82. Campos, A.C., Groth, A.K., and Branco, A.B. (2008). Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11(3), 281-288.
83. Shepherd, A.A. (2003). Nutrition for optimum wound healing. *Nursing Standard*, 18(6), 55-58.
84. Burgess, C. (2008). Topical vitamins. *Journal of Drugs in Dermatology : JDD*, 7(7), 2-6.

85. Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M.S., Ehrlich, H.P., and Brem, H. (2009). The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *The Journal of Surgical Research*, 153(2), 347-358.
86. Brem, H., Kodra, A., Golinko, M.S., Entero, H., Stojadinovic, O., Wang, V.M., Sheahan, C.M., Weinberg, A.D., Woo, S.L., Ehrlich, H.P., et al. (2009). Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(9), 2275-2287.
87. Li, Y., Hazarika, S., Xie, D., Pippen, A.M., Kontos, C.D., and Annex, B.H. (2007). In mice with type 2 diabetes, a vascular endothelial growth factor (VEGF)-activating transcription factor modulates VEGF signaling and induces therapeutic angiogenesis after hindlimb ischemia. *Diabetes*, 56(3), 656-665.
88. Michaels, J.t., Dobryansky, M., Galiano, R.D., Bhatt, K.A., Ashinoff, R., Ceradini, D.J., and Gurtner, G.C. (2005). Topical vascular endothelial growth factor reverses delayed wound healing secondary to angiogenesis inhibitor administration. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of The Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 13(5), 506-512.
89. Saaristo, A., Tammela, T., Farkkila, A., Karkkainen, M., Suominen, E., Yla-Herttuala, S., and Alitalo, K. (2006). Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *The American Journal of Pathology*, 169(3), 1080-1087.
90. Liu, W., Chua, C., Wu, X., Wang, D., Ying, D., Cui, L., and Cao, Y. (2005). Inhibiting scar formation in rat wounds by adenovirus-mediated overexpression of truncated TGF-beta receptor II. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 115(3), 860-870.
91. Rolfe, K.J., Richardson, J., Vigor, C., Irvine, L.M., Grobbelaar, A.O., and Linge, C. (2007). A role for TGF-beta1-induced cellular responses during wound healing of the non-scarring early human fetus? *The Journal of Investigative dermatology*, 127(11), 2656-2667.
92. Kopecki, Z., Luchetti, M.M., Adams, D.H., Strudwick, X., Mantamadiotis, T., Stoppacciaro, A., Gabrielli, A., Ramsay, R.G., and Cowin, A.J. (2007). Collagen loss and impaired wound healing is associated with c-Myb deficiency. *The Journal of Pathology*, 211(3), 351-361.
93. White, L.A., Mitchell, T.I., and Brinckerhoff, C.E. (2000). Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1490(3), 259-268.

94. Mazzieri, R., Jurukovski, V., Obata, H., Sung, J., Platt, A., Annes, E., Karaman-Jurukovska, N., Gleizes, P.E., and Rifkin, D.B. (2005). Expression of truncated latent TGF-beta-binding protein modulates TGF-beta signaling. *Journal of Cell Science*, 118(10), 2177-2187.
95. Zeng, G., McCue, H.M., Mastrangelo, L., and Millis, A.J. (1996). Endogenous TGF-beta activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression. *Experimental Cell Research*, 228(2), 271-276.
96. Colwell, A.S., Phan, T.T., Kong, W., Longaker, M.T., and Lorenz, P.H. (2005). Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 116(5), 1387-1390; discussion 1391-1382.
97. Tyrone, J.W., Marcus, J.R., Bonomo, S.R., Mogford, J.E., Xia, Y., and Mustoe, T.A. (2000). Transforming growth factor beta3 promotes fascial wound healing in a new animal model. *Archives of Surgery*, 135(10), 1154-1159.
98. Yamano, S., Kuo, W.P., and Sukotjo, C. (2013). Downregulated gene expression of TGF-betas in diabetic oral wound healing. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of The European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 41(2), e42-48.
99. Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*, 83(3), 835-870.
100. Leahy, P.J., and Lawrence, W.T. (2007). Biologic enhancement of wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*, 34(4), 659-671.
101. M, Lütflüoğlu. (2007). Periodontal Rejenerasyon ve Büyüme Faktörleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 17(3), 35-43.
102. Hammad, H.M., Hammad, M.M., Abdelhadi, I.N., and Khalifeh, M.S. (2011). Effects of topically applied agents on intra-oral wound healing in a rat model: a clinical and histomorphometric study. *International Journal of Dental Hygiene*, 9(1), 9-16.
103. Huth, K.C., Quirling, M., Lenzke, S., Paschos, E., Kamereck, K., Brand, K., Hickel, R., and Ilie, N. (2011). Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *European Journal of Oral Sciences*, 119(3), 204-210.
104. Nogales, C.G., Ferrari, P.H., Kantorovich, E.O., and Lage-Marques, J.L. (2008). Ozone therapy in medicine and dentistry. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(4), 75-84.

105. Reddy, A.S., Reddy, N., and Pasari, S. (2013). Role of ozone therapy in minimal intervention dentistry and endodontics - a review. *Journal of International Oral Health : JIOH*, 5(3), 102-108.
106. Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuizumi, T., Nishihara, T., and Terashita, M. (2004). Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of Endodontics* 30(11), 778-781.
107. Azarpazhooh, A., and Limeback, H. (2008). The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *Journal of Dentistry*, 36(2), 104-116.
108. Martinez-Sanchez, G., Al-Dalain, S.M., Menendez, S., Re, L., Giuliani, A., Candelario-Jalil, E., Alvarez, H., Fernandez-Montequin, J.I., and Leon, O.S. (2005). Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European Journal of Pharmacology*, 523(1-3), 151-161.
109. Estrela, C., Estrela, C.R., Decurcio Dde, A., Silva, J.A., and Bammann, L.L. (2006). Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Dental Journal*, 17(2), 134-138.
110. Seidler, V., Linetskiy, I., Hubalkova, H., Stankova, H., Smucler, R., and Mazanek, J. (2008). Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. *Prague Medical Report*, 109(1), 5-13.
111. Baysan, A., Whiley, R.A., and Lynch, E. (2000). Antimicrobial effect of a novel ozone- generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Research*, 34(6), 498-501.
112. Muller, P., Guggenheim, B., and Schmidlin, P.R. (2007). Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *European Journal of Oral Sciences*, 115(1), 77-80.
113. Hayakumo, S., Arakawa, S., Mano, Y., and Izumi, Y. (2013). Clinical and microbiological effects of ozone nano-bubble water irrigation as an adjunct to mechanical subgingival debridement in periodontitis patients in a randomized controlled trial. *Clinical oral Investigations*, 17(3), 379-388.
114. Iliadis D, M.B.J. (2013). Ozone and Its Use in Periodontal Treatment. *Open Journal of Stomatology*, 3(2), 197-202.
115. Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(1-2), 3-8.
116. Pai, S.A., Gagangras, S.A., Kulkarni, S.S., and Majumdar, A.S. (2014). Potential of ozonated sesame oil to augment wound healing in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(1), 87-92.

117. Koca, K., Yurttas, Y., Bilgic, S., Cayci, T., Topal, T., Durusu, M., Kaldirim, U., Akgul, E.O., Ozkan, H., Yanmis, I., et al. (2010). Effect of preconditioned hyperbaric oxygen and ozone on ischemia-reperfusion induced tourniquet in skeletal bone of rats. *The Journal of Surgical Research*, 164(1), 83-89.
118. Valacchi, G., Lim, Y., Belmonte, G., Miracco, C., Zanardi, I., Bocci, V., and Travagli, V. (2011). Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of The Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 19(1), 107-115.
119. Rosen, P., Nawroth, P.P., King, G., Moller, W., Tritschler, H.J., and Packer, L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 17(3), 189-212.
120. Campanati, A., De Blasio, S., Giuliano, A., Ganzetti, G., Giuliadori, K., Pecora, T., Consales, V., Minnetti, I., and Offidani, A. (2013). Topical ozonated oil versus hyaluronic gel for the treatment of partial- to full-thickness second-degree burns: A prospective, comparative, single-blind, non-randomised, controlled clinical trial. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, 39(6), 1178-1183.
121. Zhang, J., Guan, M., Xie, C., Luo, X., Zhang, Q., and Xue, Y. (2014). Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2014, 273475.
122. Das, S. (2011). Application of ozone therapy in dentistry, *Indian Journal Of Dental Advancements*, 3(2)
123. Azarpazhooh, A., Limeback, H., Lawrence, H.P., and Fillery, E.D. (2009). Evaluating the effect of an ozone delivery system on the reversal of dentin hypersensitivity: a randomized, double-blinded clinical trial. *Journal of Endodontics*, 35(1), 1-9.
124. Dahnhardt, J.E., Gygax, M., Martignoni, B., Suter, P., and Lussi, A. (2008). Treating sensitive cervical areas with ozone. A prospective controlled clinical trial. *American Journal of Dentistry*, 21(2), 74-76.
125. Kazancioglu, H.O., Kurklu, E., and Ezirganli, S. (2014). Effects of ozone therapy on pain, swelling, and trismus following third molar surgery. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 43(6), 644-648.
126. Patel, P.V., and Gujjari, S.K. (2013). The Morphometrical and Histopathological Changes which were Observed after Topical Ozone Therapy on an Exophytic

- Fibrous Gingival Lesion: A Case Report. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 7(6), 1239-1243.
127. Heinlin, J., Morfill, G., Landthaler, M., Stolz, W., Isbary, G., Zimmermann, J.L., Shimizu, T., and Karrer, S. (2010). Plasma medicine: possible applications in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 8(12), 968-976.
 128. İnternet: Nolen, James A., Gowu-mensah, Albert Kwame . Generation of gaseous product for insect attraction . US 2004/0103579 A1. 2014-11-14. <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.freepatentsonline.com%2F20040103579.pdf&date=2014-11-14> Son erişim tarihi: 14.11.2014.
 129. Sujatha B, M.K.M., Pratap Gowd MJS, Raja Vardha (2013). Ozone therapy – a paradigm shift in dentistry. *Health Sciences*, 2013;2(3):JS003A
 130. McCombs, G.B., and Darby, M.L. (2010). New discoveries and directions for medical, dental and dental hygiene research: low temperature atmospheric pressure plasma. *International Journal of Dental Hygiene*, 8(1), 10-15.
 131. Heinlin, J., Isbary, G., Stolz, W., Morfill, G., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B., Nosenko, T., Zimmermann, J., and Karrer, S. (2011). Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of The European Academy Of Dermatology and Venereology : JEADV*, 25(1), 1-11.
 132. Innes, M.E., Umraw, N., Fish, J.S., Gomez, M., and Cartotto, R.C. (2001). The use of silver coated dressings on donor site wounds: a prospective, controlled matched pair study. *Burn : Journal of the International Society for Burn Injuries*, 27(6), 621-627.
 133. Tiede, R.H.J., Daeschlein, G., vonWoedtke, T., Vioel, W., and Emmert, S. (2014). Plasma Applications: A Dermatological View. *Contributions to Plasma Physics*, 54(2), 118–130
 134. Ghaffari, A., Neil, D.H., Ardakani, A., Road, J., Ghahary, A., and Miller, C.C. (2005). A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial and mammalian cell cultures. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of The Nitric Oxide Society*, 12(3), 129-140.
 135. Emmerta, S.B.F., Hänßle, H., Helmke, A., Mertens, N., Ahmed, R., Simon, D., Wandke, D., Maus-Friedrichse, W., Däschlein, G., Schöna, M.P., and Viöl, W. (2013). Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcer treatment and much more. *Clinical Plasma Medicine*, 1(1), 24–29.
 136. Çetinkaya M., (2011). Ozon tedavisi uygulanan ve uygulanmayan iki fissür örtücünün in-vivo, in-vitro ve insitu koşullarda değerlendirilmesi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Sayfa: 20-30

137. Ryu, S.W., Lee, S.H., and Yoon, H.J. (2012). A comparative histological and immunohistochemical study of wound healing following incision with a scalpel, CO₂ laser or Er,Cr:YSGG laser in the guinea pig oral mucosa. *Acta Odontologica Scandinavica*, 70(6), 448-454.
138. İnternet: From character to personality. ozone. ozonytron. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ozonytron.com%2Fen%2Fapplication-area%2Fplasma-therapy&date=2015-03-01>, Son Erişim Tarihi: 01.03.2015
139. Sullivan, T.P., Sullivan, E.W., Davis, S.C., and Mertz, P. (2001). The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of The Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 9(2), 66-76.
140. Ureyen Kaya, B., Kececi, A.D., Guldaz, H.E., Cetin, E.S., Ozturk, T., Oksuz, L., and Bozduman, F. (2014). Efficacy of endodontic applications of ozone and low-temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Letters in Applied Microbiology*, 58(1), 8-15.
141. Clark, R.A. (1993). Biology of dermal wound repair. *Dermatologic Clinics*, 11(4), 647-666.
142. Penn, J.W., Grobbelaar, A.O., and Rolfe, K.J. (2012). The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review. *International Journal of Burns and Trauma*, 2(1), 18-28.
143. Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., and Kehrl, J.H. (1986). Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(12): 4167-4171
144. Mustoe, T.A., Pierce, G.F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M.B., and Deuel, T.F. (1987). Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-b. *Science*, 11;237(4820):1333-6.
145. Shah, M., Foreman, D.M., and Ferguson, M.W. (1992). Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor b. *Lancet*. 25;339(8787):213-4
146. Finnson, K.W., Arany, P.R., and Philip, A. (2013). Transforming Growth Factor Beta Signaling in Cutaneous Wound Healing: Lessons Learned from Animal Studies. *Advances in Wound Care*, 2(5), 225-237.

147. Brown, R.L., Ormsby, I., Doetschman, T.C., and Greenhalgh, D.G. (1995). Wound healing in the transforming growth factor-beta-deficient mouse. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of The Wound Healing Society [And] The European Tissue Repair Society*, 3(1), 25-36.
148. Kim, Y.J., Carvalho, F.C., Souza, J.A., Goncalves, P.C., Nogueira, A.V., Spolidorio, L.C., Roque-Barreira, M.C., and Cirelli, J.A. (2013). Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF-beta and VEGF production. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of The Wound Healing Society [And] The European Tissue Repair Society*, 21(3), 456-463.
149. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal: Official Publication of The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(1), 9-22.
150. Zhang, F., Lei, M.P., Oswald, T.M., Pang, Y., Blain, B., Cai, Z.W., and Lineaweaver, W.C. (2003). The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. *British Journal of Plastic Surgery*, 56(4), 334-341.

EKLER

EK-1. Etik Kurul

HİZMETE ÖZEL

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANI BİLİMSEL YARDIMCILIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
ANKARA



08 Şubat 2013

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 08 Şubat 2013
TOPLANTI SAYISI : 2013-2
ETİK KURUL KAYIT NUMARASI : Etik-2012-64
KARAR NUMARASI : 13/22
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Doç.Dr.Diş Tbp.Yb.Hasan Ayberk ALTUĞ
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Domuz - 8 Adet
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ : 24 Ay

GATA K.lığı Ağız, Diş ve Çene Cerr. AD Bşk.lığından Doç.Dr.Diş Tbp.Yb.Hasan Ayberk ALTUĞ'un yürütücüsü olduğu ETİK-2012-64 dosya numaralı "Topikal ozon gazı uygulamasının gingival yara iyileşmesi üzerine etkisinin histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği/oy çokluğu ile onaylanmasına karar verilmiştir.

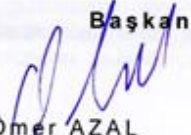
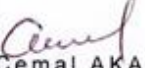
Ömer AZAL
Prof.Hv.Tbp.Kd.Alb.
GATA Hayvan Deneyleri Etik
Krl. Başkanı

ÇALIŞMA EKİBİ :

Doç.Dr.Diş Tbp.Yb.Hasan Ayberk ALTUĞ (Yürütücü)
Uzm.Vet.Hekim Alb.Ali KARABACAK
Doç.Dr.Diş.Tbp.Alb.Sermet ŞAHİN
Dt.Zeynep TAŞTAN
Prof.Dr.M.Bülent KURTIŞ
Dr.Dt.Özgür Y.TORUN
Öğr.Gör.Dr.Emre BARIŞ

HİZMETE ÖZEL

EK-1. (devam) Etik Kurul

T.C. GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARLARI		
KARAR SAYISI : 13 /22	KARAR TARİHİ : 08 Şubat 2013	
GATA K.İği Ağız, Diş ve Çene Cerr. AD Bşk.İğindan Doç.Dr.Diş Tbp.Yb.Hasan Ayberk ALTUĞ'un 31.12.2012 gün ve ETİK-2012/64 no'lu "Topikal ozon gazı uygulamasının gingival yara iyileşmesi üzerine etkisinin histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi" başlıklı deneysel araştırma projesinin etik başvurusu değerlendirilmiştir. Araştırmadaki Deney Hayvanlarının Tür, Sayı ve kullanım amaçları projenin deney hayvanlarına ilişkin yönleri Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Yönergesinin 5 inci maddesinin 3 bendinde belirtilen "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" dikkate alınarak hazırlandığı saptanmıştır. Yönergede belirtilen "Araştırmacının Sorumlulukları" ve "Hayvan Deneyleri ile İlgili İlkeler" ine uygun olarak hazırlanan proje Etik Kurul'un 08 Şubat 2013 gün ve 2 sayılı toplantısında değerlendirilmiş ve çalışmanın 8 Adet Domuz ile yapılmasının hayvan etiği açısından uygun olduğu oy çokluğu ile onaylanmıştır.		
Başkan  Ömer AZAL Prof.Hv.Tbp.Kd.Alb.	Üye (KONGRE İZİNİNDE) Osman EROĞUL Prof.Dr.Dz.Müh.Kd.Alb.	Üye  Cemal AKAY Doç.Dr.Ecz.Alb.
Üye (YILLIK İZİNDE) Engin KURT Yrd.Doç.Tbp.Alb.	Üye (KONGRE İZİNİNDE) Ahmet KORKMAZ Prof.Hv.Tbp.Alb.	Üye  Ali KARABACAK Uzm.Vet.Hekim Alb.
Üye  Nait ERSÖZ Doç.Tbp.Alb.	Biyoistatistik Danışmanı (KONGRE İZİNİNDE) Cengizhan AÇIKEL Doç.Tbp.Alb.	Üye  İlker TAŞÇI Doç.Tbp.Yb.
Üye  Metin ŞENÇİMEN Doç.Diş Tbp.Yb.	Svl. Üye (İZİNLI) Zeliha GOÇGELDI	Sivil Toplum Kuruluşu Dernek Üyesi  Elif BULUT Vet.Hekim

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TAŞTAN EROĞLU, Zeynep
 Uyruğu :T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 1987, Tavşanlı
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 203 42 45
 Faks :0 (312) 203 42 45
 e-posta :dt.zeyneptastan@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi- Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı	2011- Devam etmekte
Lisans	Ankara Üniversitesi- Diş Hekimliği Fakültesi	2005-2010
Lise	Tavşanlı İ.M.K.B Anadolu Öğretmen Lisesi	2001-2005
İlköğretim	Arslanbey İ.Ö.O	1993-2001

Yabancı Dil

İngilizce (ÜDS- 2010 Mart -73,75)

Yayınlar

Bilimsel Toplantı ve Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. Taştan Z., Cengiz M.İ., Bektaş S., 2012. Lignous Periodontitis and Lignous Conjunctivitis Due to Plasminogen Deficiency: a Case Report Poster Sunumu: Lignöz Periodontitis, 7th Conference Of The European Federation Of Periodontology, Vienna, Austria
2. Hassanzadeh S., Taştan Z., Kurtiş B, Maksiller Odontojenik Kistin Cerrahi Tedavi Yalaşımı: Bir Vaka Raporu, Türk Periodontoloji Derneği 43. Bilimsel Kongresi, İzmir, Türkiye.
3. Taştan Z., Kurtiş .B., Bodur A., 2014. Estetik Bölgede Rejeneratif Kemik Cerrahi Uygulaması: Bir Vaka Sunumu, Türk Periodontoloji Derneği 44. Bilimsel Kongresi, İstanbul, Türkiye.

4. Başman A., Taştan Z., 2014. Dev Hücreli Fibrom Tanısıyla Tüm Dişlerini Kaybetmiş Bir Hastada Kemik İçi İmplant Uygulamalarının Erken Dönem Değerlendirilmesi: Vaka Sunumu, Türk Periodontoloji Derneği 44. Bilimsel Kongresi, İstanbul, Türkiye.
5. Yıldırım B., Museyibov F.M., Taştan Z., 2015. Nonspecific Granulomatous Gingivitis: A Case Report Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, Volume 119, Issue 3, March 2015, Page e118
6. Taştan Eroğlu Z., Kurtiş B., 2015. Free Gingival Grafts to Increase Keratinized Tissue Before Dental Implant Placement: A Case Report, 20th BaSS Congress April 23-26, 2015 Bucharest, Romania

Katıldığı Kurslar / Kongreler:

1. Ege Dişhekimleri Odası 16. Uluslar Arası Bilimsel Kongre Ve Sergisi (21-23 Ekim 2011 /İzmir)
2. Europerio 7 (6-9 Haziran 2012/ Viyana, Avusturya)
3. Türk Periodontoloji Derneği 42. Bilimsel kongresi ve 22. Sempozyumu (8-10 Kasım 2012)
4. ITI Türkiye & Azerbaycan Section Toplantısı (30 Kasım-2 Aralık 2012/ Antalya)
5. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu 2012
6. Türk Oral İmplantoloji Derneği XIV. Uluslararası Bilimsel Kongresi (10-12 Ocak 2013/İstanbul)
7. ITI Türkiye Kongresi. (12-13 Nisan 2013/Ankara)
8. Türk Periodontoloji Derneği 43. Bilimsel kongresi (9-11 Mayıs 2013/İzmir)
9. ITI Türkiye & Azerbaycan Section Toplantısı (6-8 Aralık, 2013/ Antalya)
10. Türk Periodontoloji Derneği 44. Bilimsel kongresi (9-10 Mayıs 2014/ İstanbul)
11. ITI Türkiye & Azerbaycan Section Toplantısı (5-7 Aralık 2014/Antalya)
12. 20th BaSS Congress (23-26 Nisan 2015/ Bükreş, Romanya)



GAZİ GELECEKTİR..