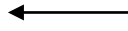
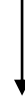
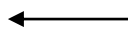


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( DOKTORA TEZİ )**

**DÜŞÜK DÜZEYLİ LAZER TEDAVİSİNİN BİFOSFONAT  
KULLANIMINA BAĞLI GELİŞEN ÇENE OSTEONEKROZLARINDA  
ÇEVRE YUMUŞAK DOKUDAKİ BİYOSTİMÜLE EDİCİ ETKİSİNİN İN  
VİTRO DEĞERLENDİRMESİ**

**NESİMİ SOFUOĞLU**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. ÖZEN DOĞAN ONUR**

**AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI  
AĞIZ, DIŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ PROGRAMI**

**İSTANBUL - 2014**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programında Nesimi SOFUOĞLU tarafından hazırlanan DÜŞÜK DÜZEYLİ LAZER TEDAVİSİNİN BİFOSFONAT KULLANIMINA BAĞLI GELİŞEN ÇENE OSTEONEKROZLARINDA ÇEVRE YUMUŞAK DOKUDAKİ BİYOSTİMÜLE EDİCİ ETKİSİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRMESİ başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

23 / 06 / 2014

Tez Sınav Jürisi

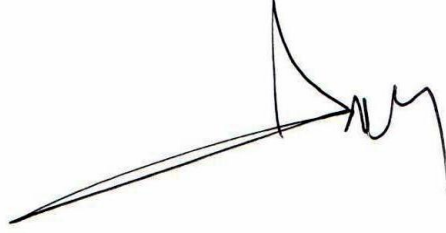
Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) \_\_\_\_\_ İmzası

1. Prof. Dr. Cengizhan KESKİN /İstanbul Üniversitesi/Diş Hekimliği Fakültesi/Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
2. Prof. Dr. Özen DOĞAN ONUR /İstanbul Üniversitesi/Diş Hekimliği Fakültesi/Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
3. Prof. Dr. Serhat YALÇIN /İstanbul Üniversitesi/Diş Hekimliği Fakültesi/Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
4. Prof. Dr. Yaşar ÖZKAN /Marmara Üniversitesi/Diş Hekimliği Fakültesi/Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
5. Doç. Dr. Mustafa RAMAZANOĞLU /İstanbul Üniversitesi/Diş Hekimliği Fakültesi/Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

NESİMİ SOFUOĞLU



## **İTHAF**

**Aileme ithaf ediyorum...**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca benimle bilgilerini ve tecrübelerini paylaşan ve her zaman destek olan, tez danışman hocam Sayın Prof.Dr.Özen Doğan ONUR'a ve diğer tüm hocalarıma,

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında desteğinden dolayı Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Bilimdalı başkanı Sayın Prof. Dr. Fikretin ŞAHİN'e, Doç. Dr. May KORACHI'ye, doktora öğrencisi Fatma ÖZEN'e, doktora eğitimim boyunca her zaman destek olan Sayın Doç. Dr. Mustafa RAMAZANOĞLU'na, tezimin yazım aşamasında yardımlarından ötürü Dt. Sevinç KENAN ve Dt. Ceyhun MEMMEDOV'a, lazer cihazını temin etmemde yardımcı olan İdealdent firmasına ve Dt. Zafer KAZAK'a, Zometa ilacını temin eden Dr. Faruk AYABAKAN'a, doktora çalışmamın istatistiksel değerlendirmesini yapan biyoistatistik uzmanı A.Rana KONYALIOĞLU'na, tez çalışmamın genetik aşamasında desteğinden dolayı Molgen firmasına ve Sayın Hüseyin Remzi KAPUCI'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **16523**

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİ
ÖZET .....	İİ
ABSTRACT.....	İİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. DİŞETİ.....	4
2.1.1. Dişeti morfolojisi ve histolojisi.....	4
2.1.2. Hücresel organizasyon .....	7
2.1.3. Fibroblast histolojisi.....	7
2.1.4. Fibroblastların sekresyon ürünleri .....	8
2.1.5. Kollagenler.....	8
2.2. YARA İYİLEŞMESİ.....	9
2.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ .....	11
2.4. BİFOSFONATLAR.....	15
2.4.1. Bifosfonatların kimyasal yapısı .....	17
2.4.2. Bifosfonatların etki mekanizması .....	19
2.4.2.1. Zoledronik asit .....	21
2.4.2.2. Kimyasal yapı.....	21
2.4.2.3. Farmakokinetik özellikleri .....	22
2.4.2.4. Etki mekanizması.....	22
2.4.3. Bifosfonatların yan etkileri .....	24
2.4.3.1. Çenelerin bifosfonata bağlı osteonekrozu .....	24
2.4.3.2. Epidemiyoloji.....	30

2.4.3.3. Laboratuvar Testleri .....	32
2.4.3.4. Histopatolojisi .....	37
2.4.3.5. Bifosfonat kullanımına bağlı çene osteonekrozunda diğer tedavi seçenekleri .....	43
2.4.3.6. Ozon tedavisi.....	45
2.4.3.7. Hiperbarik oksijen tedavisi .....	46
2.4.3.8. Düşük Doz Lazer Tedavisi.....	48
2.5. LASERİN TANIMI .....	48
2.5.1. Elektromanyetik dalga ve fotonlar .....	49
2.5.2. Lazerlerin sınıflaması.....	54
2.5.3. Lazer doku etkileşimleri.....	59
2.5.4. Dokuların Optik Özellikleri .....	59
2.5.5. Dokuların Biyolojik Özellikleri .....	63
2.5.6. Diyet Lazer .....	65
2.5.7. Düşük Doz Lazer Tedavisi (Biyostimulasyon).....	67
2.5.8. Lazerin Uygulama Şekilleri .....	73
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	74
3.1. GEREÇLER.....	74
3.2. YÖNTEM .....	77
3.2.1. Kültür kuyucuklarının hazırlanması.....	77
3.2.2. Kaplama özelliklerinin belirlenmesi .....	78
3.2.3. Gingival fibroblast kültürü.....	78
3.2.4. Absorbe ZA taşıyan CaP'ın fibroblast aktivitesi üzerine etkisi (Pilot çalışma).....	79
3.2.5. Araştırma grupları .....	79
3.2.6. Düşük düzeyli lazer tedavisi (DDLDT).....	79
3.2.7. WST-1 yöntemi ile kültür ortamında ZA ve DDLDT'nin gingival fibroblast hücre canlılığı ve proliferasyonuna etkisinin incelenmesi .....	81
3.2.8. RNA izolasyonu ve real time PCR analizi.....	81
3.2.9. Hücre apoptozunun değerlendirilmesi .....	82
3.2.10. Hücre morfolojisinin değerlendirilmesi .....	82
3.2.11. İstatiksel Analiz.....	83
4. BULGULAR.....	84

4.1. WST-1 yöntemi ile kültür ortamında ZA ve DDLT'nin gingival fibroblast hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi .....	84
4.2. ZA ve DDLT'nin Kollajen Tip 1 Sentezi Üzerine Etkisi .....	88
4.3. ZA ve DDLT'nin MMP3 Sentezi Üzerine Etkisi .....	91
4.4. ZA ve DDLT'nin Hücre Apoptozu Üzerine Etkisi .....	95
4.5. ZA ve DDLT'nin Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi .....	97
5. TARTIŞMA .....	100
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	114
KAYNAKLAR .....	116
FORMLAR .....	145
ETİK KURUL KARARI .....	150
ÖZGEÇMİŞ .....	154

## TABLOLAR LİSTESİ

<b>Tablo 2.4-1:</b> Bifosfonatların R1, R2 zincirlerinin moleküler yapıları, etkinlikleri ve osteonekroz oluşturma riski sıralaması.....	<b>17</b>
<b>Tablo 2.4-2:</b> Bifosfonatların, kullanım alanları, nitrojen içerikleri, doz ve kullanım yolları.....	<b>18</b>
<b>Tablo 2.4-3:</b> ÇBBON boyutuna göre sınıflaması .....	<b>27</b>
<b>Tablo 2.4-4:</b> Yaş gruplarına, cinsiyete ve hormon durumuna göre NTx değerleri.....	<b>33</b>
<b>Tablo 2.4-5:</b> Kemik formasyon belirteçleri .....	<b>34</b>
<b>Tablo 2.4-6:</b> Kemik rezorpsiyon belirteçleri.....	<b>35</b>
<b>Tablo 2.4-7:</b> Oral bifosfonat kullanan hastaların osteonekroz risk değerlendirmesi.....	<b>36</b>
<b>Tablo 2.4-8:</b> ÇBBON olgularında izlenen kemik metabolizması ile ilişkili serumparametreleri .....	<b>37</b>
<b>Tablo 2.4-9:</b> AAOMS'nin 2009 yılında belirlediği ÇBBON evrelerine göre tedavi protokolü.....	<b>41</b>
<b>Tablo 2.5-1:</b> Lazer tipi ve dalga boyu .....	<b>55</b>
<b>Tablo 2.5-2:</b> Lazerlerin özelliklerine göre diş hekimliğinde kullanım alanları (yumuşak doku lazerleri ve dalga boyları) .....	<b>56</b>
<b>Tablo 2.5-3:</b> Tehlike riskine göre lazerlerin sınıflaması .....	<b>59</b>
<b>Tablo 2.5-4:</b> Isıya bağlı doku reaksiyonu .....	<b>64</b>
<b>Tablo 2.5-5:</b> Düşük doz lazer tedavisi ile yara iyileşmesinin hızlandırılmasına ilişkin olası mekanizmalar .....	<b>69</b>
<b>Tablo 2.5-6:</b> DDLT'nin farklı dalga boyunda biyostimulasyon etkisi .....	<b>72</b>
<b>Tablo 2.5-7:</b> Diş hekimliğinde düşük doz lazer tedavisi uygulamalarının güncel durumu .....	<b>73</b>
<b>Tablo 3.2-1:</b> Ekspresyonu değerlendirilen genlerin ileri ve geri primer dizilimleri.....	<b>87</b>
<b>2</b>	
<b>Tablo 4.1-1:</b> WST-1 yöntemi ile gingival fibroblast hücre proliferasyonunun sayısal değerleri .....	<b>85</b>
<b>Tablo 4.1-2:</b> WST-1 yöntemi ile gruplar arasında gingival fibroblast hücre proliferasyonunun karşılaştırılması.....	<b>86</b>
<b>Tablo 4.1-3:</b> WST-1 yöntemi ile gruplar arasında gingival fibroblast hücre proliferasyonunun gün ve gruba göre karşılaştırılması.....	<b>87</b>
<b>Tablo 4.2-1:</b> 48 ve 96 saat diliminde gruplar arasında kollajen Tip 1 sayısal değerlerinin karşılaştırılması.....	<b>89</b>
<b>Tablo 4.2-2:</b> Gruplara göre 48 ve 96 saat diliminde kollajen Tip 1 sayısal değerlerinin karşılaştırılması.....	<b>89</b>
<b>Tablo 4.3-1:</b> 48 ve 96 saat diliminde gruplar arasında MMP3 sayısal değerlerinin karşılaştırılması.....	<b>92</b>
<b>Tablo 4.3-2:</b> Gruplara göre 48 ve 96 saat diliminde MMP3 sayısal değerlerinin karşılaştırılması.....	<b>92</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1-1: Dişeti dokusunun morfolojisi .....	4
Şekil 2.1-2: Oral epitelin elektron mikroskobu altındaki görüntüsü .....	5
Şekil 2.4-1: Amino bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi mevalonat yolu üzerinden inhibe etme mekanizması.....	21
Şekil 2.4-2: Doğal ortam ile bifosfonat bulunan ortamda osteoklast faaliyetleri.....	23
Şekil 2.4-3: Fizyolojik kemik remodelinginin ve anjiyogenezisinin bifosfonatlarla baskılanması sonucu kemiğin iyileşme kapasitesinin bozulması ve osteonekroz gelişimi .....	25
Şekil 2.4-4: Multiple Myeloma nedeniyle üç yıldır ayda bir i.v. ZA kullanan 56 yaşında kadın hastada bir yıl önce üst total protez tavmasına bağlı gelişen ÇBBON'un klinik görünümü .....	26
Şekil 2.4-5: Multiple myeloma nedeniyle üç yıl süreyle 21 günde bir i.v. ZA ve devamında üç yıl boyunca 21 günde bir ibandronat kullanmış 57 yaşında kadın hastada spontan gelişen ve ekstraoral fitül oluşumuna neden olan ÇBBON'un klinik görünümü .....	26
Şekil 2.4-6: Prostat CA nedeniyle iki yıldır ayda bir i.v. ZA tedavisi gören 78 yaşında erkek hastada implant operasyonu ardından meydana gelen ve ekstraoral fistül oluşumuna sebep olan ÇBBON'un klinik görünümü .....	27
Şekil 2.4-7: Meme CA tanısı ile iki yıl süreyle oral yolla ibandronat ve ardından toplam üç doz olmak üzere ayda bir i.v. denosumabkullanan 78 yaşında kadın hastada diş çekimleri sonucu meydana gelen ÇBBON'un radyolojik görünümü.....	28
Şekil 2.4-8: Meme CA nedeniyle 18 aydır28 günde bir i.v. ZA kullanan 41 yaşında kadın hastada bifosfonat kullanımına bağlı meydana gelen lamina durada kalınlaşma ve periodontal aralıkta genişlemenin radyolojik görünümü .....	28
Şekil 2.4-9: ÇBBON'un kemik sintigrafisinde tespit edilen görünümü .....	29
Şekil 2.4-10: Oral bifosfonat kullanan hastaların diş çekim protokolü.....	39
Şekil 2.4-11: Antimikrobial kemoterapi ve non invaziv cerrahi ile birlikte ozon tedavisi protokolü .....	45
Şekil 2.5-1: Elektromanyetik spektrum.....	49
Şekil 2.5-2: Lazer ortamı.....	53
Şekil 2.5-3: Lazer doku etkileşimleri .....	60
Şekil 2.5-4: Farklı lazer dalga boylarının doku elemanları tarafından emilim oranları..	61
Şekil 2.5-5: Lazerin biyolojik dokuda etki mekanizması.....	63
Şekil 2.5-6: DDLT hücre etkileşimi .....	71
Şekil 3.1-1: Temel besiyeri ve fetal bovin serum.....	75
Şekil 3.1-2: 24 kuyucuklu hücre kültür kapları .....	75
Şekil 3.1-3: Laminar akışlı steril hava kabini.....	76
Şekil 3.1-4: Diyot lazer cihazı.....	76
Şekil 3.2-1: CaP kaplı yüzeyin TEM görüntüsü (x10000 büyütme).....	77
Şekil 3.2-2: ZA absorbe edilmiş CaP yüzeyin TEM görüntüsü (x10000 büyütme).....	78
Şekil 3.2-3: Laminer hava akımlı kabinde yalnız lazer uygulanacak kuyucuğu açıkta bırakan siyah zemin ile 9 mm'ye sabitlenmiş lazer uygulaması .....	80
Şekil 3.2-4: Elisa Plaka Okuyucu.....	81
Şekil 3.2-5: Taramalı Elektron Mikroskobu.....	83
Şekil 4.1-1: WST-1'nin gruplara göre 2.-3.-4. günde gingival fibroblastlara etkisi .....	87
Şekil 4.1-2: WST-1'nin 2.-3.-4. günde gruplara göre gingival fibroblastlara etkisi .....	88

<b>Şekil 4.2-1:</b> 48 ve 96 saat diliminde gruplar arasında kollajen Tip 1 değişiminin karşılaştırılması.....	<b>90</b>
<b>Şekil 4.2-2:</b> Gruplara göre 48 ve 96 saat diliminde kollajen Tip 1 değişiminin karşılaştırılması.....	<b>90</b>
<b>Şekil 4.3-1:</b> 48 ve 96 saat diliminde gruplar arasında MMP3 değişiminin karşılaştırılması.....	<b>94</b>
<b>Şekil 4.3-2:</b> Gruplara göre 48 ve 96 saat diliminde MMP3 değişiminin karşılaştırılması .....	<b>94</b>
<b>Şekil 4.4-1:</b> Hücre apoptozunun flow-sitometrik değerlendirmesi.....	<b>96</b>
<b>Şekil 4.5-1:</b> ZA içermeyen ve DDLT uygulanmayan kontrol grubunun 96 saat sonrasında TEM görüntüsü (büyütme x5000).....	<b>97</b>
<b>Şekil 4.5-2:</b> 30 µm ZA içeren DDLT uygulanmayan deney grubunun 96 saat sonrasında TEM görüntüsü (büyütme x5000).....	<b>98</b>
<b>Şekil 4.5-3:</b> ZA içermeyen 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunun 96 saat sonrasında TEM görüntüsü (büyütme x5000).....	<b>98</b>
<b>Şekil 4.5-4:</b> 30 µm ZA içeren, 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunun 96 saat sonrasında TEM görüntüsü (büyütme x5000).....	<b>99</b>

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

**AAOMS:** American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (Amerikan Oral ve Maksilofasyal Cerrahlar Birliği)

**Abs-ZA:** Absorbe Zoledronik Asit

**Al:** Alüminyum

**ALP:** Alkalın Fosfataz

**ANNEXINS:** Ca<sup>2+</sup> bağımlı fosfolipid bağlama kapasitesi ile yapısal olarak ilgili olan pıhtılaşma önleyici özellikleri ile tanınan bir protein ailesi

**ArF:** Argon Fluoride

**Ar:** Argon

**As:** Arsenid

**ATP:** Adenozin Trifosfat

**BAP:** Kemik Alkalen Fosfataz

**BCE:** Bone Kollajen Equivalent

**BMP:** Bone Morfogenetik Protein

**BP:** Bifosfonat

**BSP:** Kemik Sialoprotein

**Ca:** Kalsiyum

**CaCl<sub>2</sub>:** Kalsiyum Klorür

**cAMP:** Cyclic Adenosine Monophosphate

**CaP:** Kalsiyum Fosfat

**C<sup>0</sup>:** Santigrad Derece

**C:** Karbon

**cDNA:** Komplementer DNA

**CO<sub>2</sub>:** Karbondioksit

**CTx:** Karboksi Terminal Çapraz Bağlı Telopektid Kollajen

**CTx-MMP:** Matriks Metalloproteinazdan Oluşan Karboksi Terminal Çapraz bağli Telopektid Kollajen

**CW:** Devamlı Dalga

**ÇBBON:** Çenelerin Bifosfonata Bağli Osteonekrozu

**DDLt:** Düşük Doz Lazer Tedavisi

**DFTS:** Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serumu

- DMEM:** Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
- DNA:** Deoksiribonükleik Asit
- DPD:** Deoksipiridinolin
- EHDP:** Etan-1-Hidroksil, 1-Difosfonat
- ECLIA:** Elektrokemoluminesans İmmün Test
- Er Cr YSGG:** Erbium, Chromium Yttrium Scandium Gallium Garnet
- ELİSA:** Enzim İlintili İmmün Test
- Er YAG:** Erbium Yttrium Aluminum Garnet
- Er YSGG:** Erbium:Yttrium Scandium Gallium Garnet
- eV:** e iyonun yükü V hızlandırıcı potansiyeldir. Bu iyonların kinetik enerjilerine eşittir.
- FACScan:** Fluidics Access Scan (Flow sitometri cihazı)
- FBS:** Fetal Bovine Serumu
- FDA:** Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Yönetimi)
- FDPyr/Cr:** Serbest Deoksipiridinolin/Kreatinin
- FGF:** Fibroblast Büyüme Faktörü
- FITC:** Fluorescein İsothiocyanate
- FL:** Fluorescentlabel (fluorosen etiketli)
- FPP:** Farnesyl Diphosphate; Farnesil Difosfat
- Ga:** Galyum
- GaAlAs:** Gallium Aluminum Arsenide
- GaAs:** Gallium Arsenide
- GAPDH:** Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
- GGPP:** Geranylgeranyl-Diphosphate; Geranylgeranyl-Difosfat
- GIS:** Gastrointestinal Sistem
- GLA:** Glutamik Asit
- GTP:** Geranyl Trifosfat
- GTP:** Guanozin Trifosfat
- H<sub>2</sub>O:** Di hidrojen monoksit
- HBO:** Hiperbarik Oksijen
- HCl:** Hidrojen Klorür
- He:** Helyum
- HELP:** Kollajen I Alfa 1 spiral Peptid
- HeNe:** Helium-Neon

**Ho:** Holmium

**Ho YAG:** Holmium:YAG

**HPLC:** Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

**HYL-GLYC:** Hidroksilin-glikozid

**Hz:** Hertz

**ICMA:** İmmunohistokimyasal Test

**ICTP:** Tip I Karboksiterminal Telopeptid Kollajen

**İL-1:** İnterlökin-1

**İL-2:** İnterlökin-2

**İ.M:** İntramusküler

**İnGaAsP:** Indium Gallium Arsenide Phosphorus

**İnGaAs:** Indium Gallium Arsenide

**İnk-ZA:** İnkorpore ZA

**IU:** International Unit

**İ.V:** İntravenöz

**J:** Joule

**KMY:** Kemik Mineral Yoğunluğu

**KTP:** Potassium Titanyl Phosphate

**LASER:** Laser Amplification by Stimulated Emission of Radiation

**λ:** Dalga Boyu

**µg:** mikrogram

**µm:** mikrometre

**M:** Molarite

**µM:** mikromolar

**MASER:** Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation

**MgCl<sub>2</sub>:** Magnezyum Klorür

**MEM:** Minimum Eagle's Medium

**ml:** mililitre

**MMP:** Matriks Metalloproteinaz

**MTS:** (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-Yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium Assay)

**mW/cm<sup>2</sup>:** miliwatt/santimetre kare

**NaCl:** Sodyum Klorür

- NaHCO<sub>3</sub>**: Sodyum Hidrokarbonat
- NaHPO<sub>4</sub>**: Sodyum Hidrofosfat
- NCSS**: Number Cruncher Statistical System
- Nd: YAG**: Neodymium Yttrium Aluminum Garnet
- Ng**: Nanogram
- Ne**: Neon
- nm**: Nanometre
- NO**: Nitrik Oksit
- NTx**: Amino Terminal Çapraz Bağlı Telopektid Kollajen
- NTx-I**: Tip I Kollajenin Aminoterminal Çapraz Bağlı Telopektidi
- OK**: Osteokalsin
- P**: Fosfor
- PBS**: Fosfat Tamponlu Salin
- PCR**: Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
- P-C-P**: Organik Pirofosfat
- PDGF**: Platelet-Derived Growth Factor (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)
- PGE<sub>2</sub>**: Prostaglandin E<sub>2</sub>
- pH**: Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
- Pg**: Pikogram
- PI**: Propidium İyodür
- PICP**: Tip I Prokollajen Karboksi Terminal Propeptit
- PINP**: Tip I Prokollajen Amino Terminal Propeptit
- PMS**: Phenazine Methosulfate
- Pmol**: Pikomol
- P-O-P**: İnorganik Pirofosfat
- P.O.:** Per os; ağız yoluyla
- ROS**: Reaktif Oksijen Türleri
- PRGP**: Prolinden Zengin Gamma Karboksiglutamik Asit Protein
- PTH**: Paratiroid Hormon
- PTH-rP**: Paratiroid Hormon İlişkili Protein
- PYD**: Piridinolin
- R1, R2**: Bifosfonatlarda Bulunan Yan Zincirlerin Adları
- Ras, Rho, Rac**: Osteoklast Fonksiyonunu Düzenleyici Proteinler

- RIA:** Radyoimmünassay
- RNA:** Ribonükleik Asit
- SBF:** Simulated body fluid
- SCS:** Süpersatüre Kalsiyum Fosfat Çözeltisi
- Sn:** Saniye
- TEM:** Taramalı Elektron Mikroskobu
- TCP:** Tricalcium Phosphate
- TCP:** Tissue Culture Plate
- Tc99mMDP:** Technetium-99m Methylene Diphosphanate
- TMG:** Transmembran Gamma Karboksiglutamik Asit Protein
- TNF:** Tumor Nekrozis Faktor
- TRAP:** Tartrat Rezistans Asit Fosfotaz
- TRACP-5b:** Tartrat-Rezistans Asit Fosfotaz İzofom 5b
- TRIS:** (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride
- TSH:** Tirotropin
- TZP:** Trombositten Zengin Plazma
- TZBF:** Trombositten Zengin Büyüme Faktörleri
- T<sub>4</sub>:** Tiroksin
- T<sub>3</sub>:** Triiyodotironin
- V:** Frekans
- W:** Watt
- WHO:** World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
- WST-1:** 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum tuzları
- XeCl:** Xenon Chloride
- XPS:** X-ışını fotoelektron spektroskopisi
- XRD:** X-Işını Difraksiyon Spektroskopisi
- ZA:** Zoledronik Asit

## ÖZET

Sofuoğlu N. Düşük Düzey Lazer Tedavisinin Bifosfonata Bağlı Çene Osteonekrozlarında Çevre Yumuşak Dokudaki Biyostimüle Edici Etkisinin İn Vitro Değerlendirmesi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi. İstanbul, 2014.

**Amaç:** ZA kullanımına bağlı meydana gelen hücresel bozuklukların önlenmesinde DDLT'nin etkinliğinin araştırılması

**Gereç ve Yöntem:** Tabanı 20-50 µm kalınlığında biyomimetik oktakalsiyum fosfat tabakası ile kaplı kültür kuyucuğu oluşturuldu. Kültür kuyucukları literatürde bildirildiği üzere 30 µM ZA içeren veya içermeyen fosfat tamponlu salin ile 2 saat inkübe edilerek absorbe ZA grubu oluşturuldu. Sağlıklı bireylerden yirmi yaş dişi operasyonu sırasında eksize edilmesi ve atık madde olarak kabul edilecek dişeti örnekleri toplandı, kültüre edildi. 810 nm dalga boyunda, 600 µm çaplı fiber uç içeren 0.4 W'a kadar ayarlanabilir güç çıkışı olan, 2. gün 75 sn, 3. gün 150 sn, 4. gün 300 sn Ga-As diyot lazer kültür kuyucuklarına uygulandı. Kültürün 48 ve 96 'ncı saatlerinde RNA, kültür kuyucuklarından Ambion PureLink® RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) standard protokollerine göre çıkarıldı. ZA ve DDLT'nin Kollajen Tip I, MMP 3, MMP 9 ekspresyonu, hücre apoptozisi ve hücre morfolojisine etkisi değerlendirildi.

**Bulgular:** Grup 1'de elde edilen WST-1 değerlerinin 2., 3. ve 4. gün değerleri arasında azalma yönünde saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grup 2'de 2., 3. ve 4. günlerde gingival fibroblast hücre sayılarında saptanan ciddi azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grup 3'de 2., 3. ve 4. günlerde gingival fibroblast hücre sayılarında saptanan azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grup 4'de 2., 3. ve 4. günlerde gingival fibroblast hücre sayılarında ciddi azalma görülmüştür. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grup 1'de 48 ve 96 saat diliminde kollajen Tip 1 sentezi incelendiğinde, ilerleyen saatte hafif azalma yönünde değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grup 2'de 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde kollajen Tip 1 sayısında azalma olduğu görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grup 3'de 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde kollajen Tip 1 sayısında azalma görülmüş fakat sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grup 4'de 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde kollajen Tip 1 sayısında ciddi azalma görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

**Sonuç:** ZA'nın fibroblast hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerine ileri dönemde olumsuz etkisinin ortaya çıktığını, ZA'nın kollajen Tip 1 üretimi üzerine erken dönemde uyarıcı etkisinin olduğu, bu etkinin ilerleyen zamanda azaldığı, ZA'nın MMP3 üretimine toksik etkisi olduğu görüldü. ZA uygulamasının yüzeyde fibroblast yapışmasını ve yayılmasını engelleyecek bir yüzey kimyası oluşturmadığı, DDLT uygulamasının yüzeyde yayılan hücre miktarı ve morfolojisine olumlu/olumsuz katkı sağlamadığı görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Bifosfonat, Düşük Doz Lazer Tedavisi, Osteonekroz, Fibroblast, Biostimülasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 16523

## ABSTRACT

Sofuoğlu, N. In vitro evaluation of the effects of low level laser therapy on the biostimulation of surrounding soft tissues in bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Oral Surgery. Doctoral thesis. Istanbul. 2006.

**Purpose:** To investigate the effects of low level laser therapy on the prevention of cellular dysfunctions induced by employment of zometa.

**Material and method:** Culture wells, coated basally with biomimetic octacalcium phosphate 20-50  $\mu\text{m}$  in thickness, were prepared. Absorbed ZA group was formed by incubating the culture wells for 2 hours using phosphate buffered saline with and without 30  $\mu\text{M}$  ZA, as reported in the literature. Gingival tissue samples, which were excised during third molar removal surgery and were otherwise considered as waste materials, were collected and cultured. Ga-As diode laser, containing fiber ends 600  $\mu\text{m}$  in diameter and an adjustable power output up to 0.4 W, was applied to the culture wells for 75 sec on day 2, 150 sec on day 3 and 300 sec on day 4. RNA was extracted from the culture wells in the 48th and 96th hours using Ambion PureLink® RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the standard protocol. ZA and LLLTcollagen type I, MMP 3, MMP 9 expression, cell morphology and cell apoptosis has been evaluated.

**Results:** When fibroblast proliferation and viability were investigated with WST-1 method, the amount of decrease detected between the measurements on days 1, 2, 3 and 4 in group 1 was statistically insignificant. Only in the 2nd group containing 30  $\mu\text{M}$  ZA, severe decrease detected in the number of gingival fibroblast cells on days 2, 3 and 4 is found statistically significant. Only in the 3rd group, which underwent LLLT application of 0.4 Watt, the decrease detected in the number of gingival fibroblasts on days 2, 3 and 4 was found insignificant statistically. In the 4th group, containing 30  $\mu\text{M}$  ZA and having 0.4 Watt LLLT application, the decrease in the number of gingival fibroblasts on days 2, 3 and 4 was found statistically significant.

**Conclusion:** It is found that ZA has negative effects on fibroblast proliferation and viability in the long term, yet its toxic effects could not be prevented with the application of LLLT. It is found that ZA represses the production of Type I Collagen in the early period and this effect lessens in later stages, but the expected biostimulation effect of LLLT is low. It is found that ZA has a toxic effect on MMP3 production and this effect could not be overcome with the application of LLLT.

**Key Words:** Bisphosphonate, low level laser therapy, osteonecrosis, fibroblast, biostimulation.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. **16523**

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

### GİRİŞ

Bifosfonatlar (BP), kalsiyum iyonlarının şelasyonunu kolaylaştıran pirofosfatların sentetik analoglarıdır (67,192). Kalsiyum kristallerine afinitelerinden dolayı kemiğe bağlanma potansiyelleri çok yüksek olan bifosfonatlar, osteoklastların mevalonat döngüsünü inhibe ederek osteoklast kaynaklı kemik rezorpsiyonlarını azaltırlar (190,199). Üçüncü jenerasyon olan ve nitrojen içeren Zoledronik Asit (ZA) bifosfonatlar arasında en etkili preparattır (102). ZA, kemik döngüsü ve remodelasyonun azaltılması istenen tümör metastazları, yüksek hiperkalsemi ve metabolik kemik hastalıkları gibi sağlık sorunlarının tedavisinde etkinliğinin çok yüksek olması nedeniyle tercih edilmektedir (117,174).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, özellikle ZA tedavisinin hastaların çenelerinde osteonekroz meydana getirebileceğini ortaya koymuştur (79). Çenelerin bifosfonat kullanımına bağlı gelişen osteonekrozu (ÇBBON), baş-boyun bölgesinden kesinlikle radyasyona maruz kalmamış maksiller veya mandibuler kemiğin en az sekiz hafta ağız içine ekspoz olmasına ile klinikte gözlemlenen iyileşmeyen yaralar şeklinde tanımlanır. İntravenöz (I.V) bifosfonat tedavisi gören hastaların %0.8-%12'lik bölümünün ÇBBON'dan etkilendiği bildirilmiştir (212). Uzun süre (10-59 ay) I.V bifosfonat kullanan hastalarda diş çekimi ve subgingival küretaj gibi invaziv dental tedavilerin ve protez vurukları gibi mukoza bütünlüğünün bozulduğu durumların ÇBBON oluşumunu tetikleyebildiği gösterilmiştir (203).

İliyak kemikle karşılaştırıldığında çene kemiklerinde bulunan stromal hücrelerin proliferasyon yeteneklerinin fazla olması, maksilla ve mandibulanın yüksek doz bifosfonata duyarlı hale gelmesiyle sonuçlanmaktadır (9,42,217). Alveolar kretler tibiadan on kat, mandibular kanal seviyesinin üzerindeki bölgeden beş kat ve mandibular kanal altındaki inferior kısımdan 3.5 kat daha fazla kemik yapım yıkım hızına sahiptir. Bu nedenle alveolar kemikte BP birikimi ve yoğunluğu diğer alanlara

göre daha fazladır (169). ZA'nın kemik yapım yıkımı yüksek olan çenelerde diğer kemiklere oranla daha fazla biriktiğinin bilinmesine rağmen ÇBBON'nin patofizyolojik mekanizması halen aydınlatılamamıştır. Bifosfonatlar osteoklast aktivitesine etki etmenin yanısıra tümör hücrelerinin adezyon, proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi aksiyonlarını azaltarak sitotoksik etki gösterirler (94,190).

Bifosfonatların, diğer hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olduğunu ve hücrelerin gen ekspresyonlarında değişimler meydana getirdiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur (187,203). Bu sonuçlara dayanarak ÇBBON'nin oluşum mekanizmasında bifosfonatların osteoblast ve oral fibroblast gibi diğer hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmalar planlanmaya başlanmıştır (99,187,203,205). Elde edilen veriler doğrultusunda en çok kabul gören hipotez, aktif osteoklastların çevresinde kemik yıkımına bağlı lokal bifosfonat salınımının arttığı ve bunun asidik bir ortam meydana getirdiğidir. Bu asidik ortam ve yüksek bifosfonat miktarı çevredeki diğer hücelere sitotoksik etki yapmaktadır (192).

Reid ve ark. (188) yaptıkları çalışmada bifosfonatların kemiğin bazı bölümlerinde oral epitele sitotoksik etki gösterecek kadar biriktiğini, böylece oral mukozada meydana gelebilecek küçük bir yıkım ve ülserasyon gelişiminin ardından uzun dönemde kemiğin açığa çıkarak nekrozuna sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Bu bilgiler ışığında, oral mukoza hücrelerinin bifosfonat toleransının artırılmasının ve stimüle edilmesinin ÇBBON oluşumunun önlenmesi ve tedavisi için bir alternatif olabileceğini düşünmekteyiz. Düşük doz lazer tedavisinin (DDLTL) etki mekanizmasının çok iyi bilinmemesine rağmen, bazı biyokimyasal mekanizmaları tetikleyerek yara iyileşmesini arttırdığı ve inflamatuvar mekanizmalarda pozitif bir etkisi olduğu öne sürülmektedir (61). Fibroblast kültürlerinde gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, farklı dalga boylarına sahip lazer ışığının hücre proliferasyonunu (44), deoksiribonükleik asit (DNA) sentezini (135), fibroblast büyüme faktörü üretimini (250) ve miyoblastik özelleşmeyi artırdığı bildirilmiştir (182). Wong ve Wilder-Smith (244) kemoterapi öncesi profilaksi amacıyla uygulanan lazerin oral mukozit gelişiminin

sıklığını ve ciddiyetini azalttığını bildirmişlerdir. Yüksek mitotik aktiviteye sahip hücreler düşük aktiviteli hücelere göre sitotoksik ajanlara daha duyarlıdır. Bu sebeple, DDLT uygulamasıyla gingival fibroblastların erken hücre döngüsüne girmesi sağlanarak bifosfonatın sitotoksik etkisinin azaltılabileceği ve ÇBBON tedavisine katkı sağlayabileceği fikrini savunmaktayız.

## **AMAÇ**

Bu çalışmanın amacı, çene kemiklerindeki bölgesel bifosfonat konsantrasyonunun yumuşak doku üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla, in vitro koşullar altında deneysel bir modelin oluşturulmasıdır. Bu amaçla, kültür kuyucuklarının tabanı kemiğe benzer bir apatit tabakasıyla kaplanacaktır. Bifosfonatlı kemiği taklit etmek amacıyla ZA bu apatit tabakasına absorbe edilecektir. Sağlıklı bireylerden elde edilen gingival fibroblastlar ZA içeren kalsiyum fosfat tabakası üzerinde kültüre edilecek ve ilk önce ZA'in yumuşak doku hücreleri üzerinde sitotoksik ve genetik etkileri değerlendirilecektir. ZA kullanımına bağlı meydana gelen hücresel bozuklukların önlenmesinde ise DDLT'nin etkinliği ölçülecektir.

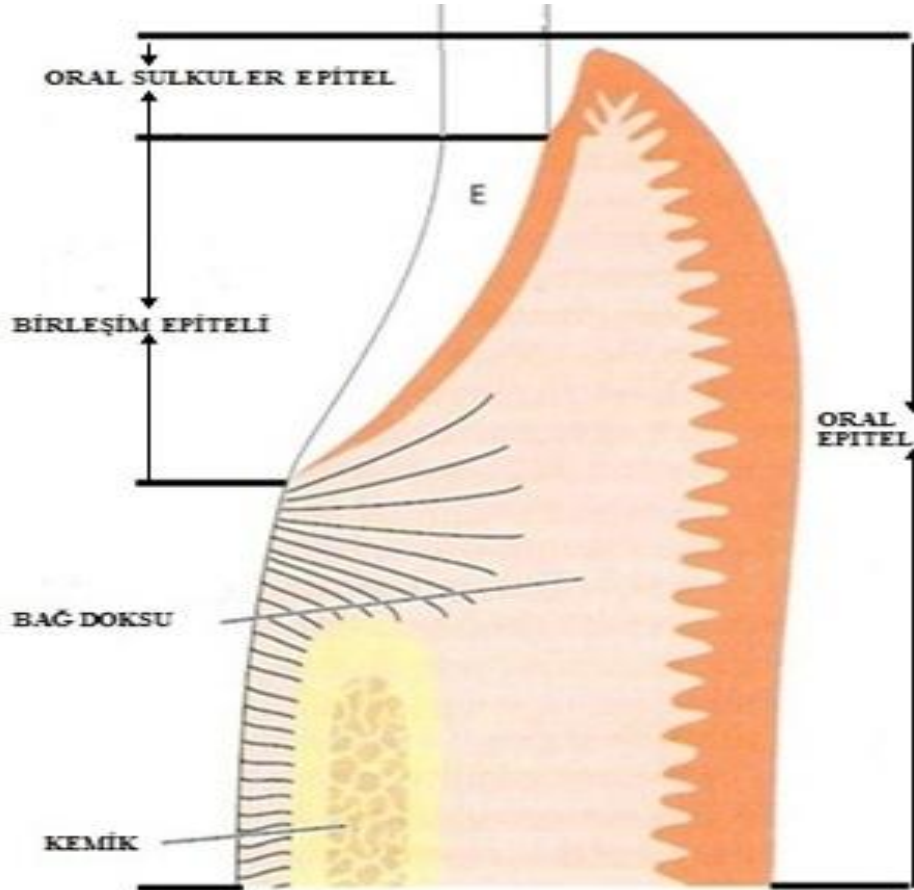
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. DİŞETİ

Dışeti kendini sürekli yenileyen aktif bir dokudur. Dışeti kalınlığı bireysel ve fenotipe bağı farklılık gösterse de devamlı yeni hücrelerin yapılması ve ölü hücrelerin doku yüzeyinden atılması ile kurulan denge halinde kalınlığını korumaktadır (100,165).

#### 2.1.1. Dışeti morfolojisi ve histolojisi

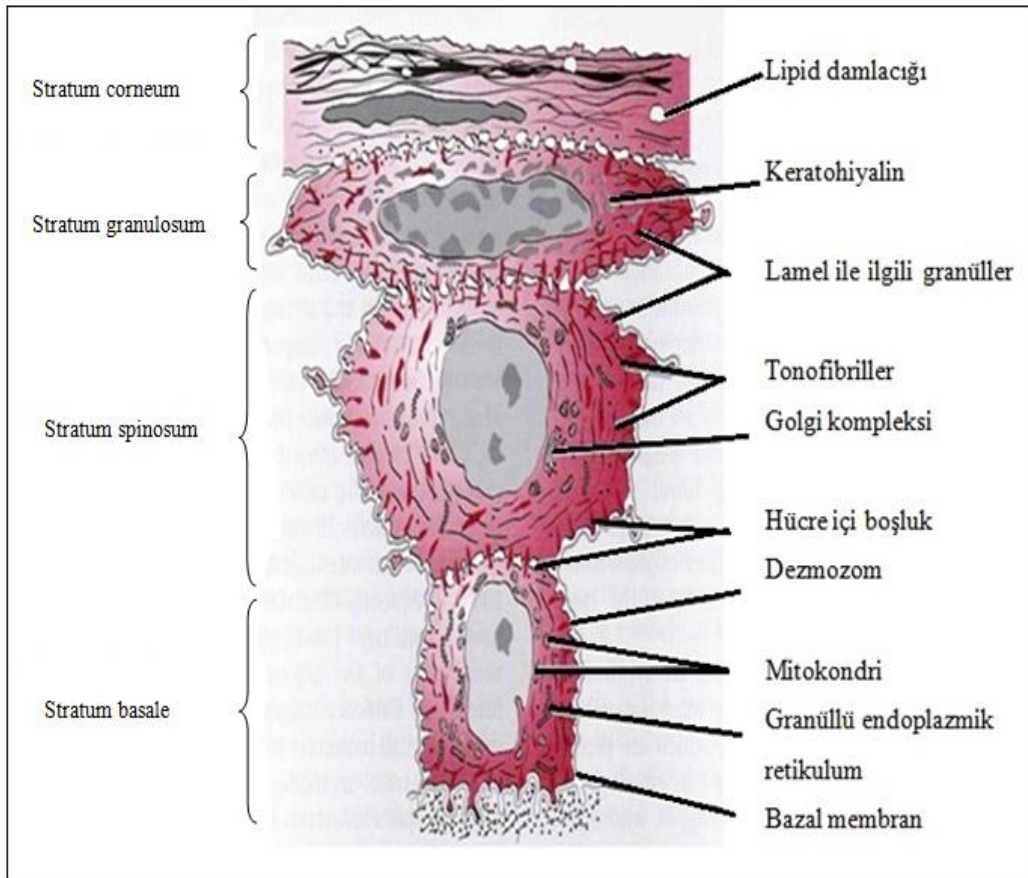
Dışeti, çenelerin alveoler proçeslerini örten ve dişleri kolelerinden saran oral mukoza parçasıdır. Dışeti epitelı oral epitel, sulkuler epitel ve birleşim epitelinden oluşur (Şekil 2.1-1) (133).



Şekil 2.1-1: Dışeti dokusunun morfolojisi (133)

## 1. Oral Epitel:

Yapışık dişeti ve serbest dişetinin ağız boşluğuna bakan yüzeyini örter. Keratinize veya parakeratinize yapıdadır. Oral epitel histolojik olarak, stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum corneum tabakalarından oluşur (Şekil 2.1-2) (100,165,177).



Şekil 2.1-2: Oral epitelin elektron mikroskobu altındaki görüntüsü (165)

### a. Stratum Basale:

Bağ dokusuna komşu tabakadır. Genellikle kuboidal hücrelerden oluşur ve bazal lamina ile bağ dokusuna tutunur. Bazal hücrelerin stoplazmalarında yaygın şekilde dağılmış sitokeratin de denilen tonofilamentler bulunur. Bunlar keratin öncüleridir. Bazal tabaka, mitozun sık görüldüğü, çekirdekleri belirgin, DNA sentezi yapılan son derece aktif hücreler içerir (100,165,177).

**b. Stratum Spinosum:**

Epitelin ara tabakasıdır, geniş, yıldızlı hücrelerden oluşur. Bu tabakadaki hücreler mitoz kabiliyetlerini koruyabilseler de bazal tabakadaki hücrelere göre daha az aktiftirler (100,165,177).

**c. Stratum Granulosum:**

Bu tabakada, karakteristik olarak, hücrelerin stoplazmalarında keratohyalin granülleri gözlenir. Hücre çekirdekleri yassılaştı ve organellerinde dejenerasyon başlamıştır. Keratohyalin tonofilamentlerin üzerine çökelmiş, hücre aktivitesi oldukça azalmıştır (100,165,177).

**d. Stratum Korneum:**

Bu tabaka yassılaştı, çekirdek ve organellerini kaybetmiş hücrelerden oluşur. Hücre membranı kalınlaşmış, hücre içi, tonofilamentler ve izole lipid damlacıklarıyla dolmuştur. Hücre tamamen keratinize olmuş, hücreler arası bağlantılar bozulmuş ve hücre canlılığını yitirmiştir. Bu durum ortokeratinizasyon olarak tanımlanır. Keratinizasyonun tam olmadığı hücre çekirdeği ve izole organellerin izlendiği duruma parakeratinizasyon denir. Stratum korneumda bulunan hücreler sonuçta ağız boşluğuna atılırlar (100,165,177).

**2. Sulkuler Epitel:**

Genelde keratinize olmayan fakat parsiyel keratinizasyon gösterebilen çok katlı yassı epiteldir. Dişeti kenarında oral epitel ile devam eder ve sulkusun yan duvarını oluşturur. Sulkusun tabanında ise birleşim epiteli bulunur. İnsanda sulkuler epitel sürekli bakteriler ile karşı karşıya olduğundan en sağlıklı dişetinde dahi bir miktar enflamatuar reaksiyon gözlenir. Enflamasyon epitelyal döngüyü hızlandırır ve epitel hücreleri keratinize olmaya fırsat bulamaz. Bu nedenle sulkuler epitelde stratum korneum yoktur (100,165,177).

### **3. Birleşim Epiteli:**

Keratinize olmayan çok katlı yassı epiteldir. Oral ve sulkuler epitelden farklı olarak eksternal ve internal bazal lamina olmak üzere iki farklı bazal lamina mevcuttur. Birleşim epiteli eksternal bazal lamina ile bir tarafta bağ dokusuna, internal bazal lamina ile diğer tarafta dişe tutunur. Sulkus tabanına yakın bölge, en kalın olduğu yer olup yaklaşık 10-30 hücre kalınlığındadır. Dişeti epitelinin döngü hızı 1-2 hafta, birleşim epitelinin bir haftadan az, oral epitelin ise daha yavaştır. Yeni hücreler bazal hücrelerin bölünmesi ile oluşurken, yüzeydeki eski hücreler deskuamasyon ile ağız boşluğuna dökülürler (100,165,177).

### **4. Dişeti Bağ Dokusu:**

Dişeti bağ dokusu temelde kollajen ve retiküler fibrillerden oluşmaktadır. Az miktarda elastik ve oksitalan fibriller içerir. Fibriller, proteoglikan ve glikoproteinlerden oluşmuş ara madde içinde yer alırlar. Dişeti bağ dokusunda birkaç tip hücre bulunur. Fibroblastlar sağlıklı dişeti bağ dokusunun temel hücreleri olup proteoglikan ve glikoproteinlerin sentezinde rol oynarlar (100,165,177).

Fibroblastlar bağ dokusunun esas maddesi ve fibröz komponentinin oluşumundan, korunmasından sorumludurlar (178,163).

#### **2.1.2. Hücresel organizasyon**

Fibroblastlar genelde kollajen lif demetleri ile bağlantı halindedir. Fibroblastların sentez ve sekresyon gücü sitoplazmada bulunan endoplazmatik retikulumun miktarına, sekresyon granülleri, mitokondri ve Golgi kompleksinin büyüklüğüne bağlıdır (163).

#### **2.1.3. Fibroblast histolojisi**

Fibroblastlar bağ dokusunun yapısal bütünlüğünün korunmasında en önemli görevi üstlenen hücresel bileşenlerdir. Çeşitli ekstrasellüler proteinleri ve proteinazları sentezler. Fibroblastlar aktif ve durgun olmak üzere iki safhada yaşarlar. Aktif fibroblastlar matriks içinde dağılmış olarak bulunur (116).

Fibroblastların sitoplazmalarında hücrelerarası madde yapımı durgunlaşmış olanlarına fibrosit denir. Bu tanım farklı bir hücre olmayıp fibroblastın durgun evresini simgeler. Fibroblastlar düzensiz hücrelerdir. Uzantıları düzensiz dallanmalar yapar. Çekirdekleri oval yapıda ve merkezi yerleşimli olup bir veya iki nükleolus, az miktarda granüler kromatin içerir. Ökromatik olarak boyanırlar. Sitoplazma içinde iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi gözlenir. Fibrositlerin sitoplazmik uzantıları daha azdır (222).

Fibrositler uyarı aldığıında fibroblast durumuna geçerek sentez aktivitelerini yeniden başlatabilir. Fibroblastlar kollajen, retiküler ve elastik lifler ile amorf hücrelerarası maddenin glikozaminoglikanlarını ve glikoproteinlerini sentezler. Erişkinlerde bağ dokusunun hasara uğraması halinde fibroblastlar bölünerek çoğalabilirler (116).

#### **2.1.4. Fibroblastların sekresyon ürünleri**

Fibroblastlar, proteinazlar, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi pek çok biyolojik aktif molekül sentezleyip salgılayabilirler. Ana metabolik fonksiyonları kollajen, proteoglikan ve elastin sentezidir. Fibroblastlar, yarada enflamatuar fazın sonuna doğru görülmeye başlar. Dokularda düşük oksijen miktarı fibroblast yapımını uyarır (178,163).

#### **2.1.5. Kollagenler**

Bağ dokusunun ana makro molekülü kollajendir. Diğer tüm proteinlerde olduğu gibi kollajenin ön maddeleri, ribozomlarda yapılır. Yeni oluşan prokollajen, dış çevreye salınır ve proteazlar her iki uca bulunan propeptid kısımlarını kopararak kollajen molekülünü oluşturur. Kollajen fibrilleri, kovalent bağlar ile birbirlerine bağlanarak kollajen liflerini oluşturur (100,163).

Kollajen üretim hızı, birçok faktöre bağlıdır. Bunlardan en önemlileri, dolaşım yeterliliği ve doku oksijen basıncıdır. Kollajen sentezi için ayrıca demir, askorbik asit, piridoksin ve bakır gibi elementlere ihtiyaç vardır. Fibroblastlar ve diğer mezenkimal hücrelerce yapılan ve kollajen liflere sahip olan interstisyel matriksin ana elemanı proteoglikanlar olup, yeni oluşan skar dokusunun %50'sini oluşturur. Diğer %50 miktarı kollajen oluşturur (177,178).

### **Kollajenler supramoleküler yapılarına göre dokuz alt gruba ayrılmaktadır:**

1. **Fibrilyer kollajenler (Tip I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII):** Bu kollajenler 64 nm'lik bağlayıcı yapılarıyla ekstrasellüler kompartmanda iyice organize olarak fibriller oluştururlar.
2. **Bazal lamina kollajeni (Tip IV):** Kollajen Tip IV ölçülerinde kollajen Tip I'e benzemektedir ancak fibril oluşturmamaktadır.
3. **Kesintili üçlü sarmalları olan fibril bağlantılı kollajenler:** Tip IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI kollajenler farklı boyutlarda zincirlerden oluşmaktadır ve çok sayıda nonkollajen yapı içermektedir.
4. **Ağ oluşturan kollajenler:** Tip VIII kollajen heksagonal kafes yapıda olup, açık poröz ağ oluşumunda baskı gerilimi oluşturduğuna inanılmaktadır.
5. **Ankraj fibril kollajenler:** Genellikle Tip VII kollajenin büyük nonhelezonik sonluğu molekül boyutunun 2/3'ünü oluşturur. C terminal sonlukları dimer oluşturarak destek fibrillerle bağlanıp bazal laminadan altındaki bağ dokusuna kadar uzanırlar.
6. **Mikrofibril oluşturan kollajenler:** Tip VI kollajenin büyük N- ve C terminal globular zincirleri olup bu zincirler arka arkaya birleşerek boncuk şeklinde filamentler oluşturmaktadırlar.
7. **Transmembran tip XIII, XVII, XXIII ve XXV kollajenleri:** Bunlar C terminal nonkollajen zincirlerle ekstrasellüler kollajenler arasında transmembran kollajenleri olup hücre adezyonunda görev yapmaktadırlar.
8. **Multipleksin kollajenler:** Tip XVIII kollajen epiteliyal ve endotelyal hücrelerin bazal laminasının komponenti olup bazal lamina yapısını stabilize etmektedir.
9. **Protein içeren helezonik kollajen zincirler:** Büyük heterojen kollajen protein grubu kollajen zincirlerden oluşur fakat kollajen olarak tanımlanmamıştır (163,177).

## **2.2. YARA İYİLEŞMESİ**

Yara iyileşmesinde fibroblastların esas görevi sekresyondur. Yaralanmanın 4.-5. gününde granüler endoplazmik retikulum ve golgi kompleksindeki artış ile hücreler hipertrofiye olurlar. Fibroblastlar, daha sonra protein ile birleşerek proteoglikanları

oluşturacak glikozaminoglikan, fibronektin, kollajen Tip 1 ve Tip 3 gibi ekstrasellüler matris komponentlerinin sentezine ve sekresyonuna başlar. Glikozaminoglikan ve proteoglikanlar yara bölgesindeki maksimum konsantrasyonlara 1. haftanın sonlarına doğru ulaşır ve bunlar yüksek derecede hidrate olarak daha sonra kollajen fibrillerinin içine gömülebileceği jel benzeri esas maddeyi oluştururlar. Fibronektin ise yara bölgesinde proteoglikanlara benzer biçimde toplanarak normal seviyelerine 2. haftanın sonlarına doğru ulaşırlar (55,104,205).

Fibroblastlar tarafından kollajen sentezi, yaralanmanın ilk 24 saati içinde başlarken, anlamlı bir kollajen birikimi ancak 3.-4. günde ortaya çıkar. Bu günler yaranın gerilim kuvvetinde gözlenen ilk gerçek artışlara denk gelmektedir. Tip 1 ve Tip 3 kollajen aynı anda sentezlenirken yara iyileşmesindeki esas kollajen Tip 3'tür. Kollajen lifleri insizyon hattı boyunca yerleşim gösterirken 1. haftanın sonlarına doğru yaranın kenarlarının bir arada tutunmasına yardımcı olur. Bu devrede iyileşme bölgesindeki kollajenin ekstrasellüler yıkım hızı artar ve birkaç ay devam eder. Bu yüksek yıkım hızı süresince remodeling olayı gerçekleşir ve Tip 3 kollajen, Tip 1 ile yer değiştirir (104).

Kollajen molekülü muntazam bir sıra içinde yıkılır. Kollajenaz enzimi polipeptid zincirin özel bir yerinde proteolitik bir kırılma yapar ve ortaya çıkan parçalar proteazlar tarafından peptidlere parçalanır. Bu peptidler de fagosite edilirler. Makrofajlar ve fibroblastlar yara iyileşmesindeki histamin kollajenaz üreticileri olmakla beraber nötrofil ve epitelyal hücreler de bu enzimi üretme kapasitesine sahiptir (122,205).

Enflamasyon aşamasında histamin düzeyinin normalin üzerine çıkması, doku kan akımını, anjiogenezi ve fibroplaziyi artırarak iyileşmeyi hızlandırır (104,205).

Polipeptid yapısında olup hedef hücredeki reseptörlerle birleşerek mitojen, kemotaktik uyarıcı etki gösteren on ayrı büyüme faktörü izole edilmiştir. Bunlar:

1. **Dönüştürücü büyüme faktörü beta:** Çok fonksiyonlu olan bu molekül trombosit, makrofaj ve lenfositler ile kemik, böbrek, plasenta hücrelerinden ve diğer hücrelerden sentezlenir. Kuvvetli anabolik olarak fibrozis ve anjiogeneze yol açar.
2. **Trombosit kaynaklı büyüme faktörü:** Trombositler, makrofajlar, damarsal endotelyal hücreler, fibroblastlar ve bazı düz kas hücrelerinden kaynaklanır. Kan

damarlarının devamlılığı bozulduğunda trombosit kaynaklı büyüme faktörü yara iyileşmesinde bir kemotaktik ve mitojen olarak görev yapar. Ayrıca kollajen sentezini stimüle eder.

3. **Fibroblast büyüme faktörü:** Fibroblastların, kondrositlerin ve endotel hücrelerinin çoğalmasını hızlandırarak yara iyileşmesine katkı sağlar. Ayrıca anjiogenezisi stimüle eder.
4. **Epidermal büyüme faktörü:** Epidermal hücreler için kuvvetli mitojen olup rejenerasyonu hızlandırır. Granülasyon dokusunun miktarını artırarak, hücrelerden DNA miktarını iki katına çıkarır. Kollajen miktarını artırır.
5. **Dönüştürücü büyüme faktörü alfa:** Makrofajlardan ve trombositlerden sentezlenir. Epitel hücrelerinin, fibroblastların ve endotelial hücrelerin üremesini stimüle eder.
6. **Epidermal hücre kaynaklı faktör:** Epidermal hücrelerden üretilir. Epidermal kök hücreler için primer uyarandır ve fibroblastların üremesiniinhibe eder.
7. **Monosit kaynaklı büyüme faktörü:** Makrofajlar, yara onarımında temizleyici olarak ve fibroplazi ile anjiogenezekatkı sağlayan büyüme faktörlerinin kaynağı olarak çok önemli rol oynarlar.
8. **İnsulin benzeri büyüme faktörü:** Otokrin düzenleyici olarak fibroblastlardan sentezlenen somatomedinler anabolik hormonlardır. Yara sıvısında önemli ölçüde somatomedin C bulunur. Bu madde DNA, ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezini, protein yıkımı ve çoğalmasını stimüle eder.
9. **İnterlökin 1(IL 1) ve İnterlökin 2(IL2):IL 1:** Fibroblast stimüle edici etkisi olup makrofaj ürünü bir monokindir. Kronik enfeksiyonlarda, fibroblast proliferasyonunu ve fibrozisi düzenler. Kollajen sentezini, kollajenaz ve hyalüronidaz aktivitesini stimüle eder. **IL 2:** Yardımcı T lenfositlerden sentezlenir. Dolaylı olarak fibroplaziyi etkiler. IL 1 salgılanmasını uyarak fibrogenezise katkı sağlar.
10. **Fibroblast aktive edici faktör:** T lenfositlerden üretilir. Fibroblast çoğalmasını, göçünü ve kollajen sentezini artırır (55,104,205).

### 2.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Enzimatik parçalanma ile dokudan ayrılan hücrenin bir besi yeri içerisinde doku bağlantısı olmadan in vitro olarak üretilmesine hücre kültürü denir. Hücre kültürü ile ilgili ilk deneysel çalışmalar 20. yüzyıl başlarında yapılmıştır. Harrison 1907' de model

hayvan olarak kurbağayı seçerek hücre kültürü yapmaya başlamıştır. Earle ve arkadaşları 1943'de fare tümör hücrelerini izole etmeyi başarmıştır. İnsan tümör hücrelerinin devamlı hücre hatları verebildiğinin bulunması hücre kültürüne olan ilgiyi artırmıştır (248).

Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısısında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik durumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenerek çoğaltılmaktadır. Besleyici sıvılar, hayvan embriyo ekstratlarını, plazma ve serum amino grup asit minerallerini, şeker ve tuzları, vitamin ve antibiyotikleri içermektedir. Bu hücre süspansiyonu 37° C'de bekletildiğinde hücreler kabin çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denir. Çok çeşitli kaynaklardan sağlanan ve dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç bölümde incelenir:

- a. Primer (birincil) hücre kültürü
- b. Sekonder veya diploid hücre kültürü
- c. Sürekli veya heteroploid hücre kültürü (71).

**Primer hücre kültürü:** Doğrudan dokudan tripsin ile ayrıştırılarak elde edilen hücrelerin invitro üretilmeleri ile elde edilen kültürlere primer hücre kültürleri denir. Primer kültürler elde edildikleri dokunun özelliklerini taşırlar. Genellikle heterojen bir yapı gösterirler, hücre hatları gibi tek tip hücreler değildir (142).

Primer hücre kültürleri küçük doku parçalarının petri yüzeylerine ekilmesiyle eksplant kültürler halinde ya da enzimatik uygulanmasıyla tek hücre süspansiyonu halinde yapılabilir. Primer kültürler kontaminasyon riski olan kültürlerdir. Bu yüzden çalışmalarda sterilizasyona özen gösterilmeli, tüm işlemler laminar kabin içinde yapılmalıdır (71,142).

**Sekonder hücre kültürü:** Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden primer kültürün pasajlanması ile elde edilirler. En fazla 50 kez pasajları yapılabilir (142).

**Sürekli hücre kültürü:** Teorik olarak sonsuz pasajları yapılabilir. Genellikle habis tümörlerden elde edilirler. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve kromozom sayıları sabit değildir (142).

**Pasajlama:** Subkültür veya hücrelerin ayrılması olarak da bilinen bu terimle az sayıdaki hücrelerin yeni bir kap içine aktarılması ifade edilir. Hücreler düzenli olarak ayırdıklarında uzun süre kültüre edilebilirler. Böylece artmış hücre yoğunluğu nedeniyle gerçekleşen yaşlanma engellenmiş olur (71).

Hücre kültürleri, bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, tekrarlanabilme özellikleri, ara aşamada kontrollerin kolay olması, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları ve hayvan deneylerinde olduğu gibi canlı varlıkların öldürülmemesi gibi insancıl yaklaşımların tercih nedeni olmaktadır (71,142).

Primer hücre kültürleri, üretim aşamasındaki zorluklara, hassas hücreler olması nedeniyle çalışma esnasında ortaya çıkabilecek sorunlara ve bunların kontrolünün son derece güç olmasına karşın, orijinal fizyolojik durumun ifadesi olması nedeniyle pek çok çalışmada örnek sistem olarak kullanılmaktadır (71).

#### **Hücre kültürü için gerekli ekipmanlar:**

- Hücreler
- Laminar hava akımlı steril kabin
- Sterilizasyon filtreleri
- Kültür ortamı (medium)
- Kültür kapları
- Mikroskop
- Hücre sayıcı cihazlar
- Destekleyici ortam bileşikleri
- Diğer: steril pipetler, santrifüj, aspirasyon pompaları vb (71,142).

#### **Laminar Hava Akımlı Steril Kabin:**

- Steril çalışmaya olanak tanır.
- Horizontal ve vertikal tipleri vardır (142).

### **İnkübatör:**

- Tüm memeli hücreleri için CO<sub>2</sub> içeren inkübatör kullanılır.
- Birçok memeli hücresi için; 37<sup>0</sup> C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> gereklidir (142).

Hücre kültürü besi yerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikro çevreyi sağlayan besleyici solüsyonlardır. Hücre kültürü besi yerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini destekler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Hücre kültürü besi yerleri, içeriklerindeki iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'yı da sağlarlar (71,142).

Besi yeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Hücreler besi yerinin özelliklerine göre farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına yönelik hücrenin besi yeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir. Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için aminoasitler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin ortamda bulunması şarttır. Standart bir besi yerinde iki temel solüsyon kullanılır:

#### **1) Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumu (DMEM)**

Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa Eagle tarafından 1955'de tanımlanmıştır. Kendi ismini taşıyan Minimum Eagle's Medium (MEM) isimli besi yeri bazı modifikasyonlarla bugüne kadar gelmiştir. Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM solüsyonu bugün somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besi yeri bileşenidir. DMEM hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukozu, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir (71,142).

## 2) Fetal bovine serumu (FBS)

Serum, hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltilisidir. Bu protein çözeltilisinin içinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunur. Hücre çeşidine ve uygulamalara göre besi yerindeki serum oranı değişebilir. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10'dur. Sığır embriyolarının kanlarının toplanmasıyla hazırlanan serumların üretiminde bir standart yoktur. Farklı hayvanlardan elde edilen serumlar birbirlerinden farklılık gösterirler. Bu da deneylerin sonuçlarını etkilemektedir. Bu dezavantajlarından dolayı bazı laboratuvarlar serumsuz besi yerlerini kullanmaktadırlar. Serum kullanılmayan bir besi yerinin çeşitli büyüme ve tutunma faktörleriyle desteklenmesi gerekir (71).

## Dulbecco'nun fosfat tamponlu serumu (DFTS)

Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solusyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. PH'ı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar (142).

## Tripsin

Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Tripsin, bir serin proteaz tipi enzimdir, lizin ve arginin aminoasitlerinden peptidleri yıkar (142).

## 2.4. BİFOSFONATLAR

Bifosfonatlar 1865 yılında Almanya'da, Menschutkin tarafından sentezlenmiş olup ilk kez tekstil, yağ, gübreleme gibi endüstriyel alanlarda kullanılmıştır (40). 1960'lı yıllarda bu ilaçların böbrek taşı oluşumunu engelleme potansiyelini hedef alan çalışmalarda antirezorptif etkisi Fleisch ve ark. (93) tarafından tanımlanmıştır. Son 30 yılda osteoklastik aktivite üzerindeki inhibitör etkilerinin ve antianjiyojenik özelliklerinin tanımlanmasıyla, maligniteye bağlı hiperkalsemi, meme, prostat, akciğer kanserleri gibi solid tümörlerin kemik metastazlarında ve multiple myeloma gibi kanser ilişkili hastalıklarda, ayrıca osteoporoz, osteopeni, Paget hastalığı, osteogenezis imperfekta gibi

kemik metabolizmasının etkilendiği patolojilerde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (115,222,236,239).

Bifosfonatlar, kemik matriksinde bol miktarda bulunan ve kemik metabolizmasının doğal düzenleyicileri olan inorganik pirofosfatın P-O-P grubu yerine P-C-P grubunu içeren organik pirofosfat analoglarıdır (83). Bifosfonatlar kanda albümin başta olmak üzere proteinlere bağlanarak taşınırlar. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık iki saattir. Kemik dokusundaki yarı ömürleri ise yıllarla ifade edilecek kadar uzundur. Bifosfonatlar hem oral hem i.v yoldan kullanılabilirler. İdeal koşullarda peroral verilen dozun ince barsaklardan ancak %1'i emilir. Emilen veya intravenöz uygulanan dozun %50'den fazlası hızla iskelet sistemine katılırken, geri kalanı renal yoldan itrah olur. Bifosfonatların kemikteki yarılanma ömürleri 1-10 yıl arasında değişmekle beraber bazı bifosfonatlar hayat boyu kemikte kalabilmektedir. Kemikte depolanmış olan bifosfonatlar rezorbsiyon aşamasında yeniden salınarak etki gösterir (93,141,198).

Bifosfonatlar, genellikle hidroksiapatite bağlanarak ve sonrasında onunla ilişkili osteoklastların aktivitelerini inhibe ederek kemik rezorbsiyonu üzerine etki ederler. Kemik yapım yıkımının fazla olduğu bölgelerde daha fazla tutulurlar. Klinik etkilerinin ortaya çıkış zamanı ilacın türüne, kullanım süresine ve dozuna bağlıdır (48,93,226).

Düzenli bifosfonat kullanımının kemik mineral yoğunluğunda artışa neden olduğu, günlük ya da belirli aralıklarla verilen dozların aynı derecede etkili olmasına rağmen doz aralıklarından çok uygulanan toplam dozun önemli olduğu rapor edilmektedir (170).

Bifosfonatlar osteoklastik kemik rezorpsiyonunu dört farklı şekilde engeller:




- 1) Osteoklastların kemik yüzeyinde toplanmasını engellemek,
- 2) Kemik yüzeyinde osteoklast aktivitesini inhibe etmek,
- 3) Osteoklastların yaşam sürelerini kısaltmak,
- 4) Doğrudan veya dolaylı yollarla kemik mineralinin çözünüm hızını azaltmak (47,106).

Tıbbi kullanıma ilk giren bifosfonat bileşiği etidronattır. Daha sonra alendronat, klodronat, pamidronat, risedronat ve zoledronat üretilmiştir (81).

### 2.4.1. Bifosfonatların kimyasal yapısı

Bifosfonatlar molekül yapılarında pirofosfatlarda bulunmayan iki grubu içermektedir. R1 ve R2 olarak bilinen bu iki grup, molekülün merkezindeki karbon atomuna bağlanmıştır. R1 ile birlikte bulunan fosfonat gruplarının, bifosfonatların kemiğe tutunmalarından sorumlu olduğu, biyoaktif R2 yapının ise bifosfonatların kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkisinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Tablo 2.4-1). Yan zincirlerden biri (R1) genellikle hidroksil grubu içerir ve bu grup bileşiğe kemik mineraline ve kalsiyum kristallerine yüksek bağlanma özelliğini vererek kemik matriksine yapışmasını sağlar. İkinci serbest karbon bağına (R2) değişik kimyasal gruplar bağlanır ve bu değişkenlik bisfosfonatın antirezorptif etkinliğini belirler (90,173). Bifosfonatların biyolojik ve klinik etkileri, yapılarındaki varyasyonlara bağlı olarak değişmektedir. Özellikle R2 yan zincirindeki nitrojen atomu varlığı önemlidir. En etkili bifosfonatlar, nitrojen içerikli olanlardır (Tablo 2.4-2) (77).

**Tablo 2.4-1: Bifosfonatların R1, R2 zincirlerinin moleküler yapıları, etkinlikleri ve osteonekroz oluşturma riski sıralaması (90)**

BİFOSFONAT	R 1 zinciri	R 2 zinciri	Etkinlik	Osteonekroz oluşturma risk sıralaması
ZOLENDRONAT	OH		X 10000	1
RİSEDRONAT	OH		X 5000	2
IBANDRONAT	OH	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	X 5000	3
ALENDRONAT	OH	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	X 1000	4
PAMİDRONAT	OH	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	X 100	5
TİLUDRONAT	H		X 10	6
KLODRONAT	Cl	$-\text{Cl}$	X 10	7
ETİDRONAT	OH	$-\text{CH}_3$	X 1	8

**Tablo 2.4-2: Bifosfonatların, kullanım alanları, nitrojen içerikleri, doz ve kullanım yolları (77)**

BİFOSFONAT	PRİMER ENDİKASYON	NİTROJEN İÇERİĞİ	FDA ONAYI	DOZ	KULLANIM YOLU
<b>Etidronat</b>	<b>Paget Hastalığı</b>	<b>Yok</b>	<b>1977</b>	<b>Günlük 300-750mg 6 ay boyunca</b>	<b>Oral</b>
<b>Tiludronat</b>	<b>Paget Hastalığı</b>	<b>Yok</b>	<b>1997</b>	<b>Günlük 400 mg 3 ay boyunca</b>	<b>Oral</b>
<b>Alendronat</b>	<b>Osteoporozis</b>	<b>Var</b>	<b>1995</b>	<b>Günlük 10 mg Haftalık 70 mg</b>	<b>Oral</b>
<b>Residronat</b>	<b>Osteoporozis</b>	<b>Var</b>	<b>1998</b>	<b>Günlük 5 mg Haftalık 35 mg</b>	<b>Oral</b>
<b>Ibandronat</b>	<b>Osteoporozis</b>	<b>Var</b>	<b>2003</b>	<b>Günlük 2.5 mg Aylık 150 mg 3 ayda bir 3 mg</b>	<b>Oral İ.V</b>
<b>Pamidronat</b>	<b>Kemik metastazları, Multipl myeloma</b>	<b>Var</b>	<b>1991</b>	<b>3 haftada bir 90 mg</b>	<b>İ.V</b>
<b>Zoledronat</b>	<b>Kemik metastazları, Multipl myeloma</b>	<b>Var</b>	<b>2001</b>	<b>3 haftada bir 4 mg</b>	<b>İ.V</b>
<b>Zoledronat</b>	<b>Osteoporozis</b>	<b>Var</b>	<b>2007</b>	<b>Yılda 5 mg</b>	<b>İ.V</b>

**Bifosfonatlar moleküler yapıları, intrasellüler etki mekanizmaları ve azot atomu taşımalarına göre ikiye ayrılırlar (Ebetino ve ark. 1996) (81):**

1. Nonaminobifosfonatlar (Birinci Kuşak)

Adenozin trifosfat (ATP)'ın intrasellüler analoglarının içine dahil olanlar:

- Etidronat
- Klodronat
- Tiludronat

2. Aminobifosfonatlar (İkinci Kuşak)

Osteoklast formasyonu, fonksiyonu ve hayatta kalmaları için gerekli olan Guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinlerin fonksiyonunu inhibe edenler:

- Alendronat
- Risedronat
- İbandronat
- Pamidronat
- Zolendronik Asit (81).

**R2 zincir yapısındaki farklılığa göre BP sınıflandırılması:**

1.kuşak bifosfonatlar: Etidronat, Tiludronat, Klodronat (kısa alkil yan zincir)

2.kuşak bifosfanatlar: Alendronat, İbandronat, Pamidronat (aminobifosfonatlar)

3.kuşak bifosfonatlar: Zolendronik Asit, İbandronat, Risedronat (siklik yan zincir) (199).

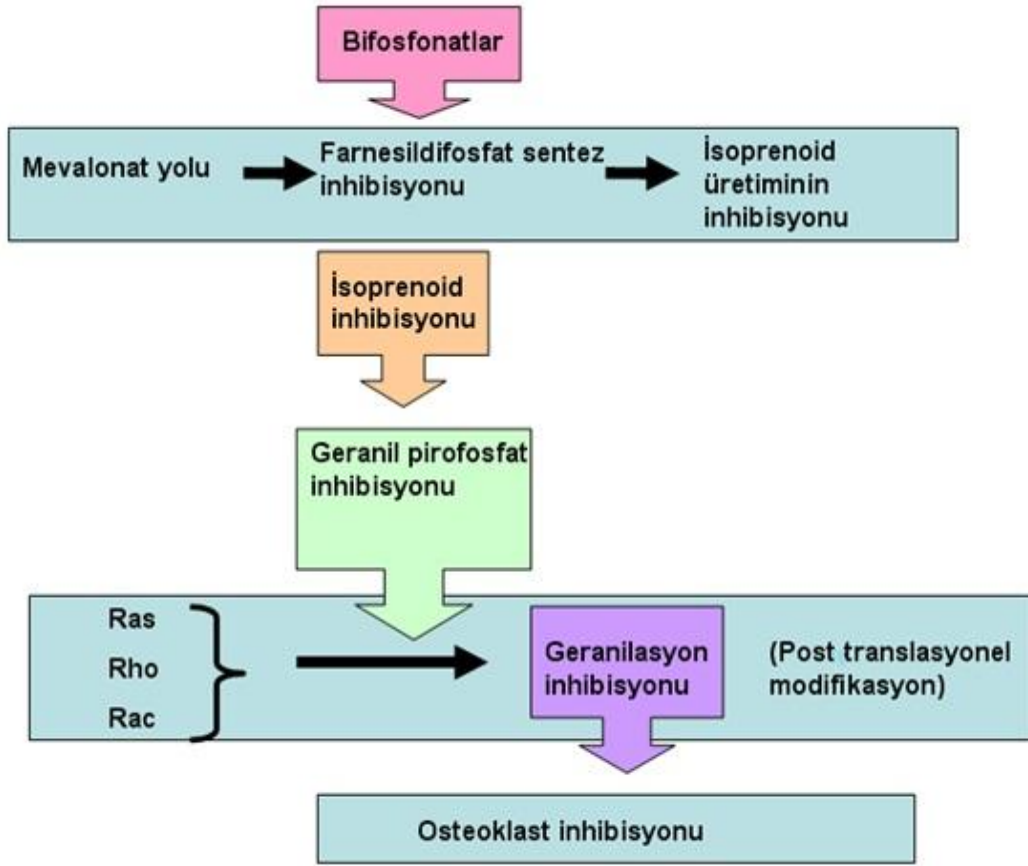
**2.4.2. Bifosfonatların etki mekanizması**

Amino ve nonaminobifosfonatların osteoklastlara karşı gösterdikleri etki mekanizmaları farklıdır. Nonaminobifosfonatlar osteoklast hücresi içerisine alındıktan sonra hidrolize olamayan ve sitotoksik etkiye sahip ATP analoglarına metabolize olurlar. Bu ATP analogları fonksiyonel olmadıkları için hücrel enerji metabolizmasını aksatarak osteoklastın apoptozisine neden olur (106).

Bifosfonatlar, fizyolojik dozlarda verildiğinde, kemiğe yüksek afiniteleri nedeniyle kemik matriksine kolaylıkla bağlanır. Osteoklastik aktivitenin potansiyel inhibitörleridir. Kemik metabolizmasına, osteoklastların hem aktivitesini hem de sayısını azaltarak etki etmektedir. Bifosfonatların kemikteki etkileri doku düzeyinde, hücre ve moleküler düzeylerde incelenebilir (53,154).

Moleküler düzeyde, alkil zincirlerindeki nitrojen atomu, osteoklastlar üzerinde toksik etki yaratır veya osteoklastlardaki spesifik hücre içi mekanizmalara zarar verir (226).

Pamidronat, alendronat ve risedronat gibi aminobifosfonatlar ise, nonamino bifosfonatların aksine metabolize edilemez. Hücre içerisine alınan amino bifosfonat molekülü esas olarak mevalonik asit gidiş yolundaki kolesterol ve izopentenildifosfat, farnesildifosfat sintaz enzime ve geranil geranildifosfat enzimi gibi izoprenoid lipidlerin sentezinden sorumlu olan, dolayısıyla osteoklast fonksiyonunda önemli olan mevalonat mekanizmasını inhibe ederek etki gösterir (193,198). Farnesildifosfat ve geranilgeranildifosfat, osteoklast fonksiyonundaki düzenleyici proteinler olan Ras, Rho ve Rac gibi proteinlerin (guanosine triphosphate-bağlayıcı protein) prenilasyonu için gerekmektedir. Amino bifosfonatların mevalonat mekanizmasındaki inhibisyonu sonucu hücre proliferasyonu, hayatta kalma süresi ve iskeletsel organizasyondan sorumlu sinyal moleküllerin prenilasyonu gerçekleşemediğinden osteoklast fonksiyonu engellenmekte, ATP analogları oluşmakta ve osteoklastların apoptozu meydana gelmektedir (Şekil 2.4-1) (106,193).



**Şekil 2.4-1: Amino bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi mevalonat yolu üzerinden inhibe etme mekanizması (106)**

Bifosfonatların, antianjiojenik ve antineoplastik etkileri ile tümör hücrelerinin apoptozisine neden olduğu, özellikle pamidronat ve zoledronat gibi nitrojen içerikli bifosfonatların, tümör hücrelerinin kemik matrisine adhezyonunu engellediği in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (148,196).

#### 2.4.2.1. Zoledronik asit

#### 2.4.2.2. Kimyasal yapı

ZA kimyasal olarak (1-hidroksi 2-imidazol -1- yl-fosfonoetil) bifosfonik asit monohidrat olarak adlandırılır. Molekül formülü  $C_5H_{10}N_2O_7P_2 \cdot H_2O$ , molar kütlesi 290,1 g/mol'dur. ZA sodyum hidroksit solüsyonunda büyük ölçüde çözünürken su ve hidroklorik asitte az çözünür, organik solventlerde ise çözünmez (83,105).

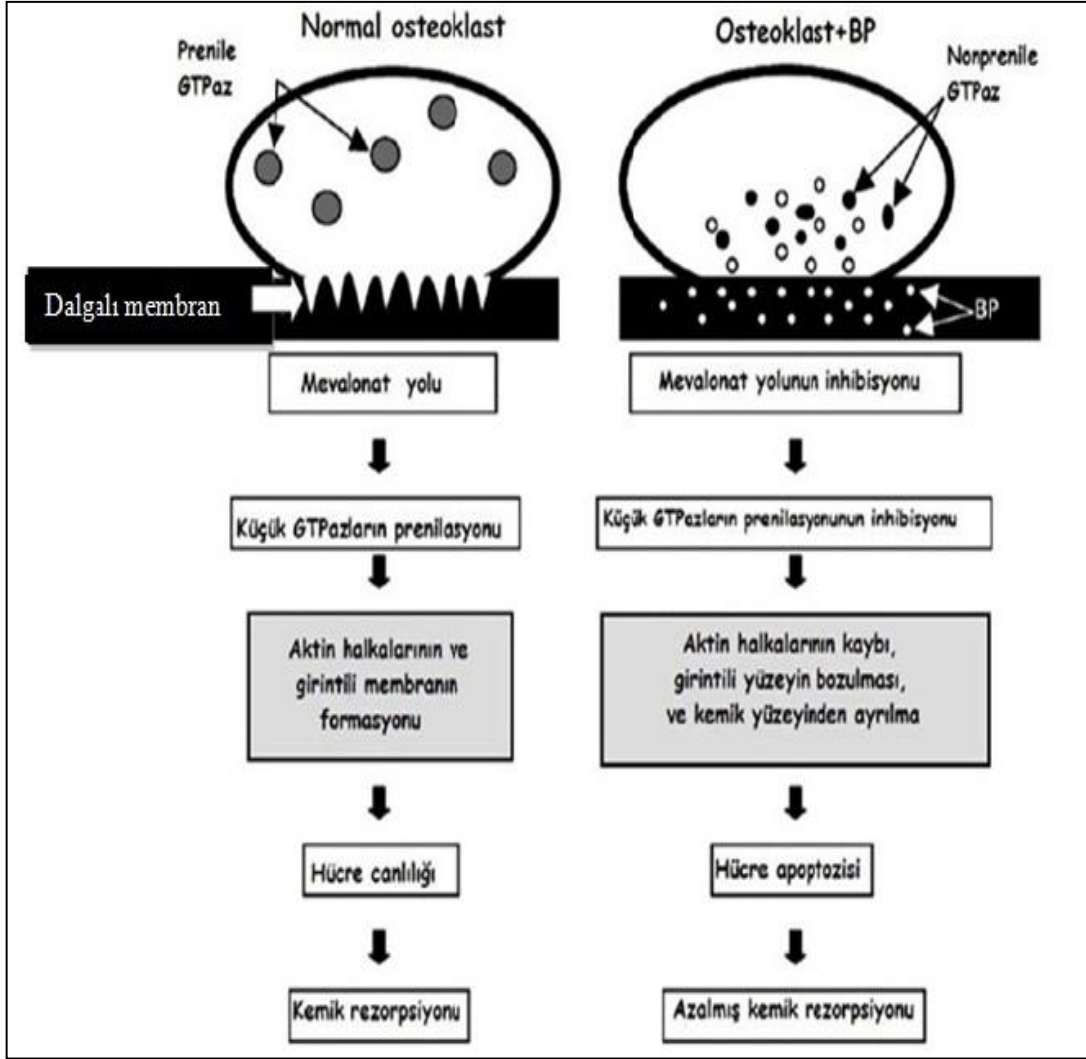
### **2.4.2.3. Farmakokinetik özellikleri**

Zoledronik asit infüzyonu sonrasında vücutta ilacın plazma konsantrasyonu hızla artmakta, infüzyon periyodunun sonunda doruk düzeyine ulaşmakta, ardından dört saat sonra doruk düzeyinin %10'una, 24 saat sonra %1'ine inecek şekilde hızlı azalma göstermektedir. İkinci ilaç infüzyonunun uygulandığı 28. güne kadar doruk düzeyinin % 0.1'ini aşmayacak seviyede oldukça düşük konsantrasyonda kalır (113).

Her 28 günde bir verilen ilacın tekrarlanan dozlarından sonra ilaç birikimi olmamaktadır. Zoledronik asit metabolize olmaz ve değişmeden böbreklerden atılır. İlk 24 saatte, uygulanan dozun %  $39 \pm 16$ 'sı idrarda bulunur, kalanı ise kemik dokusuna bağlanır. Kemik dokusundan çok yavaş sistemik dolaşıma geri serbestlenir ve böbreklerden atılır (241).

### **2.4.2.4. Etki mekanizması**

Zoledronik asit azot içeren yeni kuşak bir bifosfonat molekülü olup osteoklastik aktiviteyi ve kemik rezorpsiyonunu engeller. ZA osteoklastlara olan etkileri nedeniyle kemik rezorpsiyon döngüsünde potent bir inhibisyon yapar. Osteoklast formasyonunu ve osteoklastların rezorpsiyon aktivitelerini inhibe eder. Osteoklastların apoptotik hücre ölümünü indüklemesi de ayrı bir etkinliktir. Diğer bifosfonatlara benzer şekilde hidroksiapatite karşı yüksek afinitesi olduğundan doğrudan mineralize kemiğe bağlanır. Kemik rezorpsiyonu ile açığa çıkan bifosfonat, osteoklastları tekrar etkileyerek inhibisyon yapar. ZA diğer amino bifosfonatlara benzer şekilde mevalonat gidiş yolunu bozarak etki eder. Bunun sonucu olarak osteoklast aktiviteleri bozulur ve apoptozis meydana gelir (Şekil 2.4-2) (35,132).



Şekil 2.4-2: Doğal ortam ile bifosfonat bulunan ortamda osteoklast faaliyetleri (81)

ZA'nın ileri sürülen etki mekanizmaları:

- Osteoklast matürasyonunun inhibisyonu.
- Kemik rezorpsiyonu bölgesine osteoklastların toplanmasının inhibisyonu (83).
- Olgun osteoklast işlevinin baskılanması.
- Sitokin üretiminin azalması (interlökin-6).
- Anti tümör etkinlik (sitostatik ve sitolitik) (113,122).
- Tümör hücrelerinin yayılmasının ve kemik matriksine adhezyon ile invazyonunun engellenmesi.
- Anti anjiyojenik etki (245).

### **2.4.3. Bifosfonatların yan etkileri**

Bifosfonatların kullanımı sırasında sık karşılaşılabilecek ve klinik önem gösteren yan etkiler şu şekilde özetlenebilir:

- Gastrointestinal yan etkiler ve özofagus kanseri
- Renal yan etkiler
- Akut faz reaksiyonu ile ilişkili semptomlar
- Kemik, eklem veya kas ağrıları
- Atrial fibrilasyon
- Oküler inflamasyon
- Subtorakanterik veya diafizal kırıklar
- Çenelerin bifosfonata bağlı osteonekrozu (39,137,140,175).

#### **2.4.3.1. Çenelerin bifosfonata bağlı osteonekrozu**

Bifosfonat kullanımına bağlı çene kemiklerinde oluşan osteonekrozlar ilk olarak 2003 yılında Marx ve ark. (140) tarafından yayınlanmıştır. Bifosfonatların neden özellikle çene kemiklerinde osteonekroz oluşturduğu tam olarak açıklanamamıştır. Bifosfonatlar alveol kemiği gibi yüksek yenilenme oranına sahip olan kemiklerde ve komşu yumuşak dokuda yüksek oranda birikirler. Buna bağlı olarak mukoza bütünlüğünün bozulması halinde yara iyileşmesinin gerçekleşmediği ve açıkta kalan çene kemiklerinde sekonder enfeksiyonların olduğu, ilerleyen dönemde de osteonekroza dönüştüğü düşünülmektedir (Şekil 2.4-3) (43,68,128,188).



**Şekil 2.4-3: Fizyolojik kemik remodelinginin ve anjiyogenezisinin bifosfonatlarla baskılanması sonucu kemiğin iyileşme kapasitesinin bozulması ve osteonekroz gelişimi (188)**

Bifosfonat kullanımına bağlı çenelerde gelişen osteonekroz tablosunun 3 temel özelliği bulunur:

- 1) Devam eden ya da sonlandırılmış bisfosfonat tedavisi;
- 2) Çeneler bölgesine radyoterapi uygulanmamış olması;
- 3) Sekiz haftadan uzun süredir maksillofasial bölgede nekrotik kemiğin açığa çıkmış olması (13).

ZA ile tedavi gören hastalarda ÇBBON görülme riski diğer ilaçlarla tedavi görenlere göre daha fazladır ve zamanla artmaktadır. Bunun sebebi ilacın uzun yarılanma ömrü olabilir. Oral lezyonlar bifosfonat tedavisinden sonra 4 ay gibi bir sürede gelişebilmektedir (23,139,147).

Woo ve ark. (2006) yayınladığı 368 vaka raporunu içeren sistematik derlemede ÇBBON'nin mandibulada görülme oranı % 65 maksillada % 26 ve her iki çenede birden görülme oranı ise % 9 olarak rapor edilmiştir. Vakaların yaklaşık olarak üçte

birinin ağrısız olduğu rapor edilmiştir. Kadın erkek oranının 3:2 olduğu seride lezyonların maksillada mandibulaya göre multifokal veya bilateral görülme sıklığı daha fazla bulunmuştur (sırasıyla % 31 ve % 23). Lezyonların çoğu posterior lingual mandibulada mylohyoid sırta yakın olarak saptanmıştır. Lezyonların % 60'ı diş çekimi veya diğer dentoalveolar cerrahi işlemleri takiben gelişirken, geriye kalanların kendiliğinden oluştuğu bildirilmiştir. Lokal travmanın muhtemel etkenlerinden dental protez kullanımı da diş çekiminden sonra ikinci sırada gelen etken olarak görülmektedir (Şekil 2.4-4, Şekil 2.4-5, Şekil 2.4-6) (246).



**Şekil 2.4-4:** Multiple Myeloma nedeniyle üç yıldır ayda bir i.v. ZA kullanan 56 yaşında kadın hastada bir yıl önce protez vuruğuna bağlı gelişen ÇBBON'nin klinik görünümü (Prof.Dr.Özen DOĞAN ONUR'un arşivinden)



**Şekil 2.4-5:** Multiple myeloma nedeniyle üç yıl süreyle 21 günde bir i.v. ZA ve devamında üç yıl boyunca 21 günde bir ibandronat kullanmış 57 yaşında kadın hastada spontan gelişen ve ekstraoral fistül oluşumuna neden olan ÇBBON'nin klinik görünümü (Prof.Dr.Özen DOĞAN ONUR'un arşivinden)



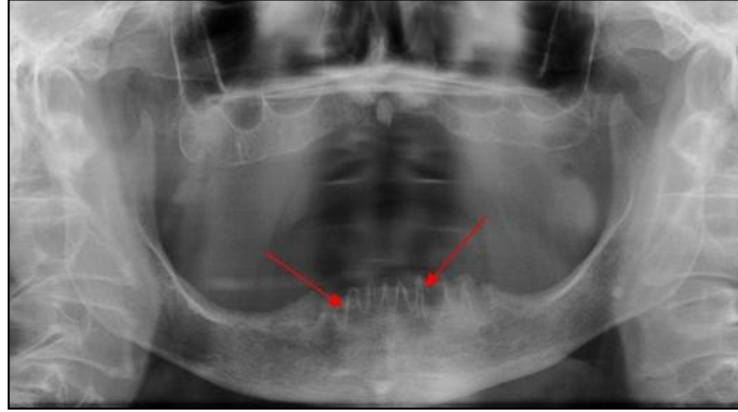
**Şekil 2.4-6: Prostat CA nedeniyle iki yıldır ayda bir i.v. ZA tedavisi gören 78 yaşında erkek hastada implant operasyonu ardından meydana gelen ve ekstraoral fistül oluşumuna sebep olan ÇBBON'nin klinik görünümü (Prof.Dr.Özen DOĞAN ONUR'un arşivinden)**

Alveolar kemik kaybından bağımsız diş mobilitesi ve dental etyolojiyle ilişkilendirilemeyen kemik ağrıları, çenelerde büyüme hissi ve parestezi bifosfonatların kemik üzerindeki toksisitesinin ön bulgularıdır (141). İleri dönemde mukozada tek/çok sayıda fistüllerden kötü kokulu püy akışı ya da oroantral fistül sebebiyle kronik sinüzite benzer yakınmalar olurken, pek çok vakada kemiğin asemptomatik şekilde açığa çıkması tek şikayet olarak görülmektedir (Tablo 2.4-3) (80,82,184,242).

**Tablo 2.4-3: ÇBBON boyutuna göre sınıflama (Weitzman R. 2007) (242)**

Boyut sınıflaması	Boyut diameteri
1A	Tek lezyon, <0.5 cm
1B	Multiple lezyon,<0.5 cm
2A	Tek lezyon, 0.5-0.99 cm
2B	Multiple lezyon,0.5-0.99 cm
3A	Tek lezyon, 1-2 cm
3B	Multiple lezyon, 1-2cm
4A	Tek lezyon, >2 cm
4B	Multiple lezyon, >2 cm

Radyolojik görünüm olgularda değişkenlik göstermekle birlikte radyolüsent ya da radyopak sklerotik kemik görünümünde olabilmektedir. Bazı vakalarda çekim soketinin iyileşmediği gözlenir (Şekil 2.4-7) (107,133). Erken dönemde radyografilerde özellikle molar dişler bölgesinde bifosfonatların kemik üzerindeki toksisitesinin erken belirtileri, alveol kemiğinde ve lamina durada yaygın sklerozis (Şekil 2.4-8), genişlemiş periodontal aralık halinde izlenebilir. ÇBBON'nin radyolojik incelemesi aşamasında kullanılacak yöntemler arasında konvansiyonel radyografilerin yanısıra kemik sintigrafisi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme, pozitron emisyon tomografi yöntemleri de yer almaktadır (16,34,37,141,246).

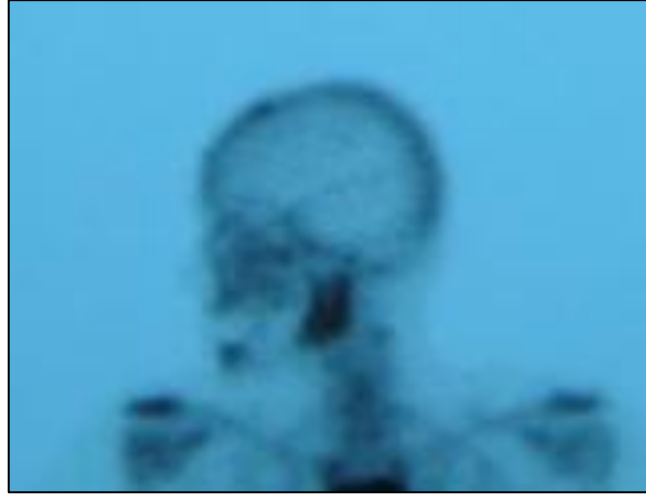


**Şekil 2.4-7:** Meme CA tanısı ile iki yıl süreyle oral yolla ibandronat ve ardından toplam üç doz olmak üzere ayda bir i.v. denosumab kullanan 78 yaşında kadın hastada diş çekimleri sonucu meydana gelen ÇBBON'nin radyolojik görünümü (Prof.Dr.Özen DOĞAN ONUR'un arşivinden)



**Şekil 2.4-8:** Meme CA nedeniyle 18 aydır28 günde bir i.v. ZA kullanan 41 yaşında kadın hastada bifosfonat kullanımına bağlı meydana gelen lamina durada kalınlaşma ve periodontal aralıkta genişlemenin radyolojik görünümü (Prof.Dr.Özen DOĞAN ONUR'un arşivinden)

Günümüzde gelişmiş olan bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme yöntemlerinin, ÇBBON'nin radyolojik erken tanısında önemli katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (20,38,151,184). Bunun yanı sıra Technetium 99 (Tc-99m) ile yapılan kemik sintigrafisinin mandibuladaki nekrotik lezyonların görüntülenmesinde etkili bir araç olduğu belirtilmektedir (Şekil 2.4-9) (2,12).



**Şekil 2.4-9: ÇBBON'nin kemik sintigrafisinde tespit edilen görünümü (Prof.Dr.Özen DOĞAN ONUR'un arşivinden)**

ÇBBON'nun radyolojik olarak ayırıcı tanısında kronik sklerozan osteomyelitis, multiple myeloma, osteoradyonekroz, metastatik tümörler, travmatik lezyonlar veya Paget hastalığı düşünülmelidir (34,157,177,185,191,224,243).

Woo ve ark. (2006) ÇBBON vakalarının %94'ünde pamidronat ya da zoledronik asit kullanıldığını, bu hastaların %91,4'de onkolojik endikasyon varlığını bildirmişlerdir. Yapılan değerlendirmelere göre bifosfonat tedavisi sonucu oluşan osteonekrozların %46,5'i multiple myeloma, %38,8'i metastatik meme kanseri, %6,2'si prostat kanseri, %4,1'i osteoporoz, %3,5'i diğer metastatik kanserler, %0,8'i Paget hastalığında saptanmıştır (246).

Gasser ve ark. (2007) postmenapozal osteopeni oluşturulan overektomili sıçanlarda ZA kullanımının uzun dönem koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada,

ZA tek dozunun (100 µg/kg) kemik üzerindeki etkisinin 32 hafta sürdüğünü bildirmişlerdir (101).

Yao ve ark. (2007) yaşlı overektomili sıçanlarda kemik mineralizasyonunun derecesini inceledikleri çalışmalarında, tek doz verilen ZA'nın trabeküler kemik kaybını 180 güne kadar engellediği saptanmıştır (45).

Sonis ve ark. (2009) sıçanlara ZA ve kortikosteroid uyguladıktan sonra diş çekimlerini yaptıkları çalışmalarında, sıçanlarda insanlarda oluşan ÇBBON'ye benzer, mukozada ülserasyon, nekrotik kemik ve inflamatuvar infiltrasyon gözleendiği, maksiller molar dişleri çekilen sıçanların %80'inde, mandibular molar dişleri çekilen sıçanların ise %60'ında çekim bölgelerinde ülserasyon meydana geldiğini bildirmişlerdir (216).

#### **2.4.3.2. Epidemiyoloji**

Genel olarak intravenöz bifosfonat kullanan hastalarda ÇBBON görülme sıklığının %0,8–12 arasında değiştiği ancak oral bifosfonat kullanan hastalarda bu sıklığın %0,09-0,34 oranında olduğu pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (5,9,10,24,80,111,145,152).

ÇBBON gelişiminde osteonekroz insidansını artırabilecek kemoterapi, immün sistem bozukluğu, glukokortikosteroid, metotreksat, östrojen kullanımı ve enfeksiyon gibi diğer faktörlerin rolü olduğu belirtilmiştir. Kemik metabolizması üzerinde katabolik etki gösteren glukokortikoidler, osteoblastogenezisi inhibe ederek osteoblastların apoptozunu hızlandırmaktadır. Sentetik yapıda glukokortikoid olan deksametazonun uzun süreli sistemik kullanımında histomorfometrik ve klinik olarak kemik yoğunluğunda azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Deksametazon kanser tedavisinde diğer ilaçlara ait etkilerin ortaya çıkmasında yardımcı madde olarak sıklıkla kullanılmaktadır (80,108,139,141,155,168,204).

Onkolojik endikasyonla kullanılan bifosfonat dozları, osteoporoz tedavisinde kullanılan dozdan yaklaşık 12 kat fazladır. ÇBBON oluşma riskinin intravenöz bifosfonat uygulanan onkoloji hastalarında daha fazla olduğu ve kullanma süresinin uzaması ile bu riskin arttığı bildirilmektedir (2,5,188).

ÇBBON gelişmesinde rol oynayan lokal ve sistemik risk faktörleri üç ana grup altında açıklanabilir (13,20,38,184).

### **İlaca bağlı risk faktörleri**

- Bifosfonat etkinlik potansiyeli (zoledronat > pamidronat > alendronat)
- Kullanım yolu ( i.v. > oral)
- Tedavinin süresi (13).

### **Lokal risk faktörleri**

- Dentoalveolar cerrahi
- Çene kemiklerine yansıyan travma
- Kötü oral hijyen
- Periodontal hastalık, periodontal ve dental abseler
- Alkol ve sigara kullanımı
- Uyumsuz protezler ve protez vurukları
- Osteomyelit ve osteonekroz geçmişi
- Mandibulada torus mandibularis, keskin linea mylohyoidea, maksillada torus palatinus (13).

### **Demografik ve sistemik risk faktörleri**

- Yaşlılık (65 yaş ve üzeri)
- Cinsiyet (kadın> erkek)
- Kronik kortikosteroid tedavisi
- Kemoterapi
- Östrojen tedavisi
- Kanser tanısı
- Kanser ile eş zamanlı osteopeni ve osteoporoz tanısı
- Malnutrisyon
- Diabet
- Kazanılmış immün yetmezlik
- Anemi ve talasemi
- Koagülopatiler, vasküler hastalıklar

- Hiperlipidemi
- Bağ dokusu hastalıkları
- Gaucher's hastalığı
- Sistemik lupus eritematozus
- Hipotiroidizm (13).

#### **2.4.3.3. Laboratuvar Testleri**

Kemik yıkımı, osteoklastlar tarafından kemik yüzeyinin bölgesel olarak asiditesinin artırılması ve proteinazların salınması ile yürütölmektedir. Kemik yıkımında bir yandan kalsiyum ve fosfor açığa çıkarken bir yandan da osteoklastlar kemik Tip 1 kollajenini parçalarlar. Kollajenin parçalanması ile açığa çıkan peptid dizileri serum ve idrarda ölçölerek tüm iskelet sisteminin kemik yıkım hızı tespit edilmeye çalışılmaktadır. Yeni kemik yapımı sırasında kollajen sentezi artmakta ve osteoblastik aktivite ile oluşan kemik matriks proteinleri açığa çıkmaktadır. Kemik yapım yıkımının biyokimyasal belirteçleri idrarda ve serumda ölçölebilmektedir (Tablo 2.4-5, Tablo 2.4-6). Osteoklastlar kemik yıkımında, osteoblastlar ise yeni kemik oluşumunda görev almakta, bu sırada bir takım son ürünler serbestlenmektedir. Bu son ürünler kemik yapım ve yıkım belirteçleri olmak üzere iki ana grup altında incelenmektedir (208).

Tip I kollajen, kollajenin öncül formudur. Osteoblastlar tarafından Tip 1 kollajen sentezi sırasında amino (-N) ve karboksi (-C) propeptidleri ekstrasellöler endopeptidazlar tarafından koparılmaktadır. Serum Tip 1 Prokollajenin Karboksiterminal Propeptidi (PICP) ve Tip 1 Prokollajenin Aminoterminal Propeptidinin (PINP) düzeyleri, kemikte osteoblastlar ve bağ dokusundaki fibroblastlarda sentezlenen yeni kollajen sentezindeki değişiklikleri yansıtır. Kemik yıkımı sırasında kollajene çapraz bağlarla bağlı telopeptidler olarak isimlendirilen amino- ve karboksiterminal fragmanları dolaşıma salınmakta ve idrarla atılmaktadır. NTx'in (Amino Terminal Çapraz Bağlı Telopeptid Kollajen) artmış konsantrasyonları, aşırı kemik yıkımını göstermektedir. NTx son zamanlarda başta osteoporoz olmak üzere geniş bir kemik hastalığı grubunda kemik yıkım oranını saptayan bir test olarak kabul edilmektedir (129).

N-telopeptid çapraz bağları, kemiğin organik matriksinin %90'ını oluşturan Tip I kollajene spesifik yapılar olup olgun kemik kollajeninin osteoklastlar tarafından yıkımı esnasında salınır ve değişime uğramadan idrarla atılır. Deri gibi diğer Tip 1 kollajen içeren dokulardaki kollajen yıkımı esnasında NTx çapraz bağları ortaya çıkmaz. Bu nedenle NTx kemik rezorbsiyonunun ölçümünde spesifik ve stabil bir belirteç olarak kullanılabilir. İdrar veya serumda NTx ve CTx (Karboksi Terminal Çapraz Bağlı Telopeptid Kollajen) immünassay yöntemi ile ölçülürler. İdrarda NTx, kemik yıkımı için spesifik ve hassas bir göstergedir. Çünkü kemikte osteoklast aktivasyonu sonucu yıkılan Tip 1 kollajenden, spesifik NTx çapraz bağları önemli miktarda yükselmektedir. Yapılan çalışmalarda, bifosfonat kullanan hastalarda idrar NTx düzeyi ölçümünün, kemik yıkımı için Deoksipiridinolinden (DPD) daha iyi bir belirleyici olduğunu göstermiştir. Osteoporoz başlangıcını kemik mineral dansite ölçümünden çok daha erken gösterir ve hasta için kolay ve zararsız bir testtir. Hastanın kemik rezorbsiyon düzeyinin saptanmasında ve tedavinin takibinde önemli klinik yarar sağlamaktadır. Tedaviye başlamadan önce bazal seviyeler tespit edilmeli, tedavinin takibinde ve değerlendirilmesinde kontrol analizleri yapılmalıdır. Eğer tedaviye başlamadan önce idrar NTx değerleri anormal ise tedavi başlangıcından 4-8 hafta sonra ölçümün tekrarlanması tavsiye edilir. Bu sürede beklenen azalma saptanırsa test 6-12 ayda bir tekrarlanarak tedaviye devam edilir (Tablo 2.4-4) (64).

**Tablo 2.4-4: Yaş gruplarına, cinsiyete ve hormon durumuna göre NTx değerleri (64)**

Yaş	Erkek	Kadın
7-9 yaş	167-578 nM BCE/mM kreatin	201-626 nM BCE/mM kreatin
10-12 yaş	152-505 nM BCE/mM kreatin	173-728 nM BCE/mM kreatin
13-15 yaş	103-776 nM BCE/mM kreatin	38-515 nM BCE/mM kreatin
16-17 yaş	34-313 nM BCE/mM kreatin	20-144 nM BCE/mM kreatin
18 ≤ yaş	21-83 nM BCE/mM kreatin	
Menopoz öncesi		17-94 nM BCE/mM kreatin
Menopoz sonrası		26-124 nM BCE/mM kreatin

NTx ünit = nM BCE/mM kreatin

BCE = Bone Kollajen Equivalent

Risk faktörlerinin belirlenmesinde bir diğer belirteç kemik yapım yıkımını ölçen CTx serum testidir (Tablo 2.4-7). CTx değeri sabah aç karnına alınan kandan ölçülür. Bazı laboratuvar sonuçları pmol/ml olarak bildirilecektir, bunlar klinik bulguların CTx ile korelasyon gösterdiği çalışmalarda kullanılan birimler değildir. Böyle durumlarda sonucu pg/ml olarak bulmak için değer 7.75 e bölünür (140).

$$\text{Ör: } 650 \text{ pmol/ml} : 7.75 = 84 \text{ pg/ml}$$

100 pg/ml altındaki değerler çene kemiği osteonekrozu için yüksek risk grubudur. 100-125 pg/ml arasındaki değerler osteonekroz için orta derecede risklidir. 150 pg/ml üzerindeki değerlerde klinik olarak çenelerde normal kemik rejenerasyonu görülür. Kemiğin yapım yıkımı, kanda ve idrarda kullanılan birçok belirteçle değerlendirilebilir. ÇBBON'da rezorpsiyon belirteçleri kullanılır. İdrarın alınma tekniklerindeki hataları ve biçimsel değişiklikleri nedeniyle serum testi tercih edilir ve serum CTx kemik rezorpsiyonunun tek belirleyicisidir. Serum CTx, birkaç günden iki haftaya kadar kemiğin yapım yıkım değişikliklerini tanımlayabilir (141).

**Tablo 2.4-5: Kemik formasyon belirteçleri (208)**

BELİRTEÇLER	DOKU KAYNAĞI	ANALİZ ÖRNEĞİ	ANALİZ YÖNTEMİ
Kemik Alkalen Fosfataz (BAP)	Kemik	Serum	Elektrofarez, Çöktürme, IRMA, EIA
Osteokalsin (OC)	Kemik, trombosit	Serum	RIA, IRMA, ELISA, ECLIA
C-terminal propeptid tip I prokollajen (PICP)	Kemik, yumuşak doku, cilt	Serum	RIA, ELISA
N-terminal propeptid tip I prokollajen (PINP)	Kemik, yumuşak doku, cilt	Serum	RIA, ELISA

**Tablo 2.4-6: Kemik rezorpsiyon belirteçleri (208)****Kollajen ile ilişkili belirteçler**

BELİRTEÇLER	DOKU KAYNAĞI	ANALİZ ÖRNEĞİ	ANALİZ YÖNTEMİ
Hidroksiprolin (HYP)	Kemik, kırık, yumuşak doku, cilt	İdrar	Kolorimetre HPLC
Hydroxylysine-glycosides (HYL-GLYC)	Kemik, yumuşak doku, cilt, serum kompleman	İdrar, Serum	HPLC ELISA
Piridinolin (PYD)	Kemik, kırık, tendon, kan damarları	İdrar, Serum	HPLC ELISA
Deoksipiridinolin (DPD)	Kemik, dentin	İdrar, Serum	HPLC ELISA
MMP den oluşan Karboksiterminal Tip I kollajen çapraz telopeptit (ICTP, CTx-MMP)	Kemik, cilt	Serum	RIA
Karboksiterminal Tip I kollajen çapraz telopeptit (CTx-I)	Tip I kollajen içeren bütün dokular	İdrar ( $\alpha/\beta$ ) Serum (yalnız $\beta$ )	ELISA RIA
Aminoterminal Tip I kollajen çapraz telopeptid (NTx-I)	Tip I kollajen içeren bütün dokular	İdrar Serum	ELISA ECLIA RIA
Kollajen I alfa 1 spiral peptid (HELP)	Tip I kollajen içeren bütün dokular	İdrar	ELISA

**Non-Kollajen Proteinler**

BELİRTEÇLER	DOKU KAYNAĞI	ANALİZ ÖRNEĞİ	ANALİZ YÖNTEMİ
Kemik Sialoprotein (BSP)	Kemik, dentin, hipertrofik kırık	Serum	RIA, ELISA
Osteokalsin (OC)	Kemik	İdrar	ELISA

**Osteoklast Enzimleri**

BELİRTEÇLER	DOKU KAYNAĞI	ANALİZ ÖRNEĞİ	ANALİZ YÖNTEMİ
Tartrat-rezistans asit fosfotaz izoform 5b (TRACP-5b)	Kemik, Kan	Plazma, Serum	Kolorimetre, RIA, ELISA
Katepsin	Osteoklast, Makrofaj	Plazma, Serum	ELISA

**Tablo 2.4-7: Oral bifosfonat kullanan hastaların osteonekroz risk değerlendirmesi (141)**

CTx değerleri (C-terminal çapraz bağlı telopeptit)	Osteonekroz Riski
≥150 pg/mL	Yok
149-126 pg/mL	Minimal
125-100 pg/mL	Orta
< 100 pg/mL	Yüksek

Marx ve ark. (140) ÇBBON riskinin kemik döngüsü belirteçleri kullanılarak tahmin edilmesine yönelik yaptıkları çalışmada oral bifosfonat kullanan ve ÇBBON gelişen 30 hastayı değerlendirmiştir. Çalışmada hastaların serum CTx seviyeleri takibe alınmış ve ÇBBON semptomları ve hikayesi ile ilişkisi incelenmiştir. Yazarlar çalışmanın sonucunda CTx seviyesinin 100 pg/ml'nin altına düştüğünde yüksek risk, 100–150 pg/ml seviyesinin orta derecede risk ve 150 pg/ml'nin üzerinin düşük ÇBBON riskine sahip olduğunu belirtmektedir. Bu veriler doğrultusunda osteoporoz/osteopeni endikasyonları ile oral bifosfonat preparatları kullanan olgularda, onkolojik endikasyonla intravenöz bifosfonat kullanımına göre oldukça düşük ÇBBON insidansı olduğunu bildirmişlerdir.

Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahlar Birliği (AAOMS) 2009 tarafından belirlenen kemik metabolizması ile ilişkili serum parametreleri kalsitonin (131), troid stimulan hormone (TSH), T4, T3, N-Telopeptit, C-Telopeptit, 25-Hidroksi Vitamin D, kemiğe özgü alkalin fosfotaz, osteokalsin, paratroid hormondur (Tablo 2.4-8) (130,131). Bifosfonat kullanan hastalarda kemikte remodelasyon ve rezorptif aktiviteyle ilgili bu değerlerin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir (140).

**Tablo 2.4-8: ÇBBON olgularında izlenen kemik metabolizması ile ilişkili serum parametreleri (130)**

Tahlil	Normal değer
Kalsitonin	pg/mL 0.0-5.0
TSH	µIU/mL 0.35-5.5
T4	µg/dL 4.5-10.9
T3	ng% 79-149
NTx	pmol/l 8.2-34.0
CTx	pg/mL 32-580
25-Hidroksi Vitamin D	ng/mL 9.5-52.0
Kemik alkale fosfataz	µg/L 0.0-21.3
Osteokalsin	ng/mL 9.4-47.4
Paratiroid hormon	pg/mL 16.0-87.0

#### 2.4.3.4. Histopatolojisi

Bifosfonata bağlı oluşan osteonekrozun histopatolojik yapısı incelendiğinde kemik iliğinde fibrozisle birlikte akut-kronik inflamatuvar hücreler, plazma hücreleri ve çeşitli fungal-bakteriyel mikroorganizma kolonizasyonları görülmektedir. ÇBBON olgularının histopatolojik incelemelerinde belirgin bir biçimde inflamasyon görüldüğü, en sık izlenen etken bakterinin *actinomyces* olduğu, ancak yaygın ağız içi mikroorganizması olan *actinomyces*'in risk faktörü olabileceği gibi ÇBBON gelişimi sonucunda yoğunlaşabileceği rapor edilmiştir (54).

Mikrobiyolojik incelemede primer olarak *Actinomyces* olmak üzere, *Enterococcus*, *Candida albicans*, *Haemophilus influenzae*, *Alpha-hemolytic streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter* ve *Klebsiella pnömonia* türleri izole edilmiştir (54).

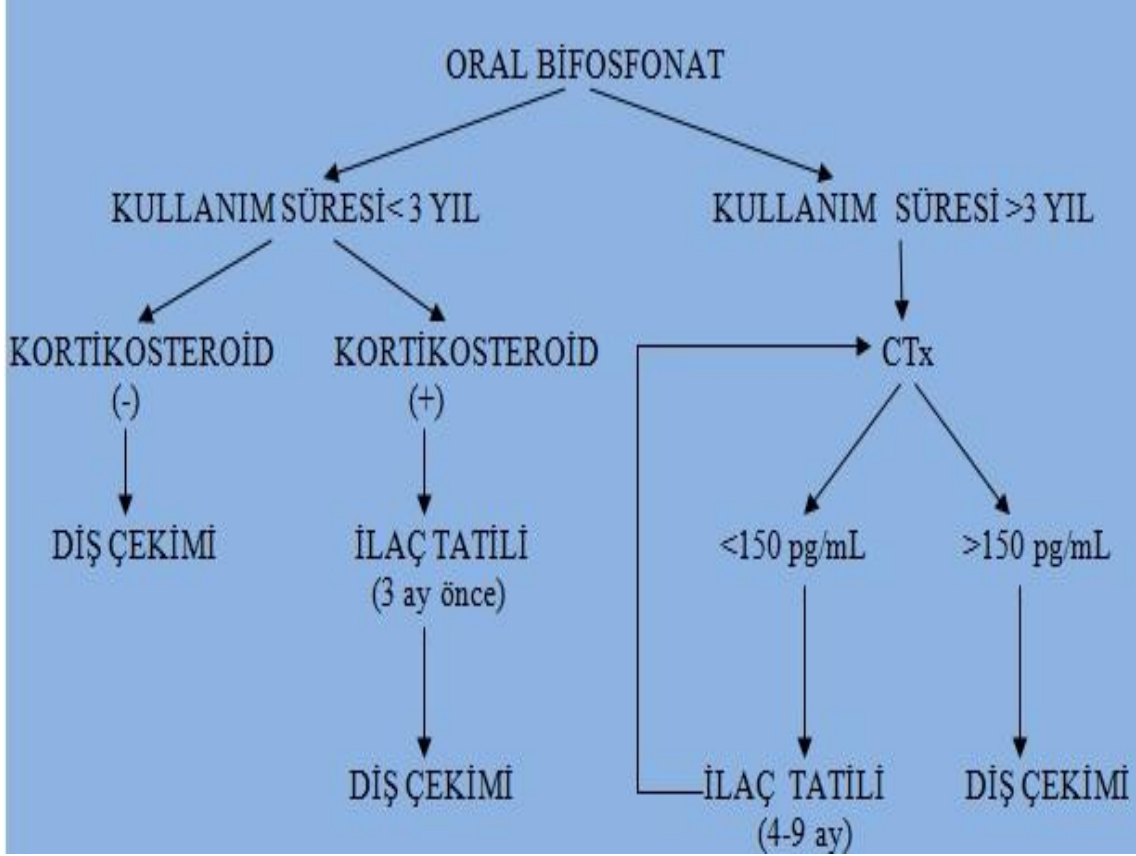
İntravenöz bifosfonat kullanan hastalarda intraoral muayenede keskin ve sivri kemik konturları, başta özellikle retromolar bölgede linea mylohyoidea, mandibular ve palatinal toruslar, vestibülde kemik ekzostozları, keskin undercut alanlar incelenmeli, periodonsiyum ve furkasyon alanları klinik ve radyolojik olarak değerlendirilmelidir (139).

Oral bifosfonatlarla indüklenen çene kemiği osteonekrozu vakaları intravenöz bifosfonatlarla indüklenen olgularda üç önemli noktada ayrılır:

- 1) Oral bifosfonat tedavisi çok daha uzun zamana yayılmaktadır.
- 2) Ekspozite olan kemik miktarı ve semptomları daha az şiddetlidir.
- 3) Oral bifosfonat tedavisinin kesilmesi, ekspozite olmuş kemiğin kendiliğinden iyileşmesini sağlayabilmektedir ve ekspozite olmuş kemik 6-12 ay sonraki lokal debridman uygulamalarına daha olumlu yanıt vermektedir (141).

Marx ve ark. (140) Evre 0'da I.V bifosfonat kullanan hastaların mümkünse ilaç kullanımının 2-3 ay süre ile bırakmalarını diş hekimlerine çene osteonekrozundan korunmada önemli katkı sağlayacağı için önermişlerdir.

AAOMS'un 2009 tarihli ÇBBON Durum Değerlendirme Raporunda, oral yolla bifosfonat kullanan hastalarda, sistemik koşulların elvermesi halinde, bifosfonat tedavisine verilecek 6-12 aylık aranın lezyonların spontan sekestrasyonuna veya debridman cerrahisini izleyerek gerilemesine katkı sağlayacağı bildirilmiştir. Oral bifosfonat kullanımının süresi ve beraberinde kortikosteroid kullanımının diş çekimi gibi cerrahi uygulamalarda farklı yaklaşım gerektirdiği bildirilmiştir. Üç yıldan az bir süre oral bifosfonat kullanan hastalarda kortikosteroid kullanılmaması halinde diş çekiminin yapılabileceği, kortikosteroid kullanılması halinde ise diş çekiminden üç ay önce bifosfonat kullanımına ara verilmesi önerilmektedir. Oral bifosfonatların üç yıldan daha uzun süre kullanan hastalarda CTx değerinin 150 pg/ml altında ise 4-9 ay ilaç tatili verilmesi, 150 pg/ml üzerinde ise diş çekiminin yapılabileceği bildirilmiştir. Bu süreçte bifosfonat kullanımına ara verilen her ay CTx değerinde 25 pg/ml yükselme beklenir (Şekil 2.4-10) (141,169).



**Şekil 2.4-10: Oral bifosfonat kullanan hastaların diş çekimi protokolü (160)**

Damar yoluyla bifosfonat tedavisi almakta olan hastalarda ise bifosfonat tedavisine ara verilmesinin kısa dönemde hiçbir yarar sağlamayacağı ancak uzun süre ara verilmesi halinde, yeni lezyonların oluşumunun önüne geçilebileceği ve klinik semptomların azaltılabileceği öne sürülmektedir. İlgili raporda her iki durumda da, bifosfonat tedavisine ara verilmesi yönündeki kararın mutlaka hastanın sorumlu onkoloğuna danışılarak alınması gerektiği vurgulanmaktadır (160).

Ruggiero ve ark. (197) önerisine göre ÇBBON'de medikal tedavi, uygulanacak olan cerrahi tedaviye güvenli bir zemin oluşturur. Cerrahi tedavide amaç, çıplak kemik veya sökesterin olabildiğince atravmatik bir yaklaşımla uzaklaştırılması ve ardından tutulum alanının çevresindeki canlı kemiğin yumuşak doku ile primer olarak kapatılmasıdır.

ÇBBON lezyonunun daha geniş alana yayılarak önemli anatomik oluşumlarla ilişkide olduğu veya patolojik fraktür gerçekleşen olgularda (AAOMS Evre 3) radikal

yaklaşımları içeren tedaviler önerilmektedir. Bu tür olgularda, nekrotik kemik kısmının marjinal veya segmental rezeksiyon ile uzaklaştırılmasını izleyerek lokal/rejyonel flepler veya vaskülarize/nonvaskülarize flepler yardımı ile bölgenin rehabilitasyonuna ve fonksiyonun iadesine çalışılır. Hatta bazı cerrahi girişimler sonrasında oronazal veya oroantral fistüllerin gelişebileceği ve bu durumlarda hastanın ağız fonksiyonlarına obturatör kullanımı ile yardımcı olunabileceği belirtilmektedir (17,141,160,197).

ÇBBON teşhisi konan hastalarda tedavi planı, ağrının giderilmesi, yumuşak ve sert dokuda oluşan enfeksiyonun kontrolü ve ÇBBON'un ilerlemesini en aza indirmeyi içermektedir. ÇBBON gelişen hastalar, osteomyelit veya osteoradyonekroz olgularında uygulanan cerrahi tedavilere farklı cevap vermektedir. Yumuşak doku irritasyonuna neden olan nekrotik kemik düzeltilmeli veya uzaklaştırılmalıdır. Patolojik mandibular kırık oluşan semptomatik hastalarda segmental rezeksiyon ve plak ile immediyat rekonstrüksiyon gerekebilmektedir. Ancak nonvaskülerize veya vaskülerize kemik ile rekonstrüksiyon, alıcı sahada nekroz gelişme riski olduğundan problem oluşturabilmektedir (154).

Çoğunlukla enfeksiyon bulguları ile karakterize olan ÇBBON lezyonlarının tedavisinde antimikrobiyal tedavi gerekliliği üzerine araştırmalar görüş birliği taşımaktadırlar (46,197,206). Bifosfonat kullanan hastalarda ağız hijyeninin sağlanması ve sürdürülmesinin önemi ve gereği vurgulanmaktadır. Özellikle erken evredeki ÇBBON olgularında (AAOMS Evre 0,1) antiseptik ağız gargaralarının (klorheksidin-glukonat, hidrojen-peroksit) kullanımı ile enfeksiyon riskinin azaltılabileceği gösterilmiştir (Tablo 2.4-9) (21,78,189).

**Tablo 2.4-9: AAOMS'nin 2009 yılında belirlediği ÇBBON evrelerine göre tedavi protokolü (14)**

EVRE	KLİNİK	TEDAVİ
<b>Risk altındaki hastalar:</b>	Oral ya da I.V bisfosfanat kullanan, nekrotik ekspoze kemiği olmayan olgular	Tedavi gerektirmez Hasta bilgilendirmesi
<b>Evre 0:</b>	Nekrotik kemiğe yönelik klinik bulgu göstermeyen, nonspesifik klinik semptom ve bulgular gösteren olgular	Ağrı kesici ve antibiyotiklerle sistemik tedavi
<b>Evre 1:</b>	Enfeksiyon bulgusu gözlenmeyen, asemptomatik ekspoze nekrotik kemik varlığı	Antibakteriyel ağız gargarası (0.12% chlorhexidine), klinik takip, hasta eğitimi
<b>Evre 2:</b>	Enfeksiyon bulgusu gözlenmeyen, asemptomatik ekspoze nekrotik kemik varlığı	Oral antibiyotiklerle sistemik tedavi, oral antibakteriyel ağız gargarası, ağrı kontrolü, yumuşak doku irritasyonunu önlemek için yüzeyel debridman
<b>Evre 3:</b>	Ağrı ve enfeksiyonlarla birlikte ekspoze nekrotik kemik dokusunun alveoler kemikten mandibulada alt sınır ya da ramusa kadar, maksillada ise maksiller sinüs ya da zigomatik kemiğe kadar ilerleme göstererek patolojik fraktürlerle sonuçlanan olgular, ekstraoral fistül varlığı, oro-antral ya da oro-nasal bağlantının oluştuğu, osteolizisin mandibula alt sınırına ya da maksiller sinüsün tabanına kadar ilerlediği olgular	Oral antibiyotiklerle sistemik tedavi, oral antibakteriyel ağız gargarası, ağrı kontrolü, enfeksiyonun ve ağrının hafifletilmesi için cerrahi debridman

Konservatif yaklaşım uygulanan olgularda, kemiğin açığa çıktığı lezyonlarda oral antibiyotik, antienflamatuar ilaç tedavisinin yanısıra povidone iodin solüsyonu ve %0,12'lik klorheksidin ile lokal irrigasyon yapılarak ilgili alanın temizlenmesi önerilmektedir. Bu tedavi protokolü pek çok olguda küçük lezyonların ilerlemesini durdurmaktadır. Kemiğin daha geniş alanda açığa çıkmasına yol açabilen kemik rezeksiyonu gibi agresif cerrahi müdahaleler genellikle önerilmemektedir. Mukozal bütünlüğün bozulduğu cerrahi işlemlerde açığa çıkan kemiğin flep kaydırılarak kapatılmaya çalışılması halinde de yıkım oluşabildiği bildirilmektedir (29,50,85,89,221,229,241,242).

Bifosfonat kullanımına, osteonekroz varlığında veya herhangi bir dental cerrahi öncesi ara verilmesi konusunda görüş birliği yoktur (89,140,227,228). Ancak ilacın yumuşak dokular ve periost üzerindeki etkisinin ortadan kalkmasının iyileşme sürecinde etkili olacağı belirtilmiştir. Bu sebeple, dentoalveolar cerrahiden bir birkaç ay önce başlayarak, işlemde birkaç ay sonrasına kadar oral bifosfonat tedavisinin bırakılması Woo ve ark (246) tarafından önerilmiş, ancak ilacın bırakılmasına rağmen yeni lezyonların oluşabildiği bildirilmiştir. Uygun antibiyotik kullanımı, klorheksidinli gargara ve yara yüzeyinin irrigasyonu çoğu vakada faydalıdır (221). Marx ve ark.'na (139) göre, küretajı takiben açığa çıkmış kemik yüzeyinin flap ile örtülmesi veya kemik konturunun düzeltilmesi tarzında cerrahi tedavi yaklaşımı, semptomların daha kötüleşmesine ve çenede kırıklara sebep olabileceğinden önerilmemektedir.

ÇBBON'nin tedavisinde antibiyotik kullanımının faydası bilinsede bu tedavinin süresi ile ilgili farklı görüşler dikkati çekmektedir. Antibakteriyel tedavide tercihin çoğunlukla, geniş spektrumlu penisilin türevleri veya penisilin kombinasyonlarından (fenoksimetilpenisilin, amoksisilin+klavulonat veya ko-amoksilav+klavulonat) yana olduğu görülmektedir (139,141). Ancak, klindamisin grubu antibiyotiklerle, ÇBBON lezyonlarından sık izole edilen *actinomyces* ve *eikenella* türleri üzerinde yeterli antibakteriyel etkinlik sağlanamayacağını öne süren çalışmalar da bulunmaktadır (210). Bu çalışmalarda penisilin alerjisi olduğunda antibakteriyel tedavide, metranidazolün, kinolon veya eritromisin ile kombine edilmesi önerilmektedir. Gerektiğinde kültür ve antibiyotik duyarlılık testi sonucuna göre tedavi protokolüne nistatin gibi antifungal

ajanların veya asiklovir, valasiklovir gibi antiviral ilaçların eklenebileceği belirtilmektedir (139,141,144,210).

Oral kavitede aynı anda birden fazla segmentte osteonekroz alanı teşhis edildiği takdirde mümkünse önce sadece bir bölgenin tedavisi yapılarak 2 ay süreyle antimikrobiyal önlemler altında bölgenin tamamen iyileşmesi beklendikten sonra sırayla diğer bölgeler tedavi edilmelidir (50).

#### **2.4.3.5. Bifosfonat kullanımına bağlı çene osteonekrozunda diğer tedavi seçenekleri**

ÇBBON hastalarının tedavisinde amaç, hassasiyet, ağrı ve ödem gibi klinik bulgularla beraber yumuşak doku ve/veya kemikteki infeksiyon bulgularını ve kemik nekrozunun ilerlemesini ortadan kaldırmaktır. Hastada var olan klinik belirti ve bulguları azaltmak veya gidermek için medikal ve cerrahi tedavilerin yeterli olmadığı olgularda veya tedavinin etkinliğine katkı sağlamak amacıyla hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi, paratiroid hormon (PTH), trombositten zengin plazma, ozon tedavisi ve düşük doz lazer tedavisi (DDL) gibi yöntemlerle desteklenebileceği öne sürülmektedir (4,7,96,179,232).

ÇBBON tedavisinde paratiroid hormon kullanılması tavsiye edilmektedir. Bisfosfonat tedavisine ara vererek 6 ay boyunca PTH kullanılması kemikteki yapım yıkım oranını gösteren osteokalsin değerinin % 74 artmasını sağlar. Aminoterminal çapraz bağlı telopeptid kollajen (NTx), kemik dokusunda osteoklastik aktivite sonucu indirgenmiş kollajen ürün miktarını bildirir. Günlük 20 µml dozlarda verildiğinde, PTH osteoblastları yeni kemik yapımı için stimule eder. PTH osteoklastik aktivitede önemli bir değişiklik yaratmasa da osteonekrozun iyileşmesine katkı sağlar (215).

Lazarovici ve ark. (2010) bifosfonat tedavisi görmüş 78 hastadan preoperatif dönemde CTx, kemik alkalin fosfat ve paratiroid hormon değerlerini ölçerek postoperatif dönemde ÇBBON gelişen ve gelişmeyen hastalar arasında karşılaştırma yapmak için kan örneği almıştır. Hastalardan 51 tanesi oral bifosfonat tedavisi, 27 hasta ise I.V bifosfonat tedavisi görmüştür. Hastalara uygulanan cerrahi tedaviler

konservatiftir ve postoperatif dönemde hastalara 7 gün boyunca antibiyotik tedavisi verilmiştir. Cerrahi tedavi sonrasında oral bifosfonat kullanan 4 hastada, I.V bifosfonat kullanan 14 hastada ÇBBON gelişmiştir. Araştırma sonucunda şu verilere ulaşılmıştır (129).

1.CTx seviyesinin 150 pg/ml az olmasının ÇBBON gelişimi ile önemli derecede ilişkidir. Buna rağmen kesin bir bulgu olarak kabul edilmemelidir.

2.Kemik alkalen fosfotaz seviyesi ise ÇBBON gelişen oral bifosfonat kullanan hastalarda önemli derece düşüktür.

3.Paratroid hormon seviyesi ise ÇBBON gelişen ve gelişmeyen hastaların hepsinde benzer seviyelerde izlenmiştir (129).

Trombositten zengin plazma (TZP)'nin ÇBBON tedavisinde cerrahi yöntemlere destek olarak uygulandığı ve etkinliğinin araştırıldığı çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir. Coviello ve ark. multipl myeloma hastalarında diş çekiminin ardından gelişen ÇBBON olgularında yapılan cerrahi debridman bölgelerine TZP uygulaması ile olumlu sonuç elde ettiklerini rapor etmişlerdir (65). Benzer olumlu bulgular Curi ve ark.'nın ileri evre ÇBBON lezyonlarına parsiyel rezeksiyonu izleyerek TZP uyguladıkları çalışmalarında elde edilmiştir (70). Ancak literatürde TZP'nin, sağlıklı bireyler üzerinde yapılan birçok çalışmada dahi, cerrahi yaklaşımı destekleyici rolünün belirsiz olması, bu uygulamanın kemik iyileşme mekanizmaları hasar görmüş ÇBBON hastalarında ne denli başarılı olabileceğini tartışılır kılmaktadır.

Mozzati ve ark. (2012) onkolojik nedenlerle I.V bifosfonat tedavisi gören ve ÇBBON gelişmiş 32 hastada nekrotik kemiğin rezeksiyonu ve sonrası trombositten zengin büyüme faktörlerinden (TZBF) kullanarak kemik defekti üzerindeki mukozanın primer kapatılması yöntemini uygulamışlar ve olguların başarı ile tedavi edildiğini, TZBF'nin damarlanmayı artırıp, kemik ve epitelyal dokuların rejenerasyonuna olumlu etki yaptığını bildirmişlerdir (162).

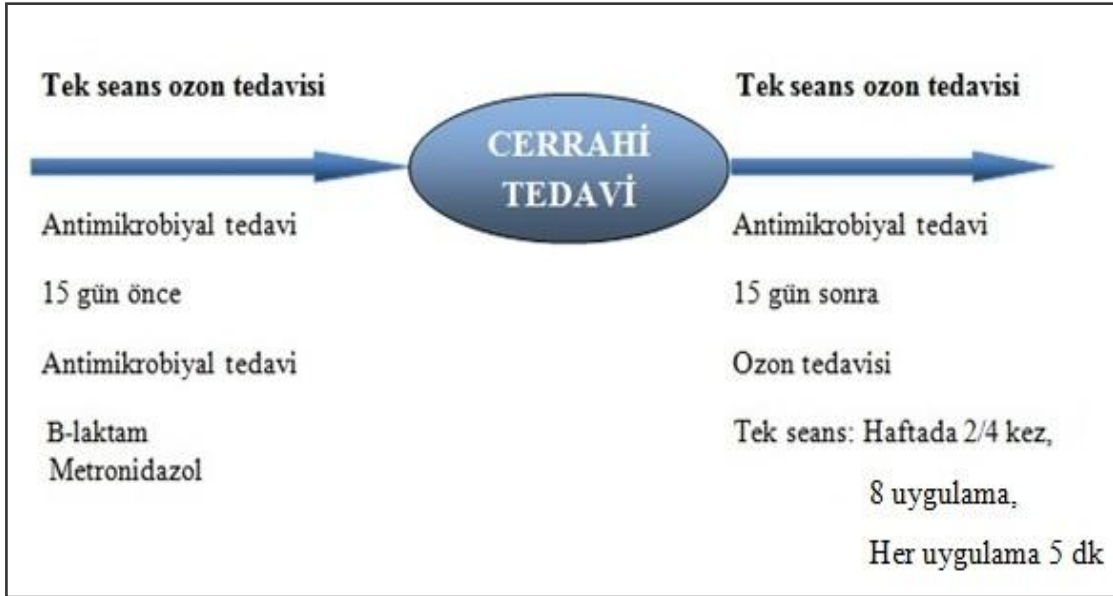
Harper ve ark. (2007) rapor ettikleri bir ÇBBON olgusunda, minimal invaziv cerrahi yaklaşımın günlük düşük doz paratiroid hormon tedavisi ile desteklenmesinin belirti ve bulguların azalmasında ve iyileşmede önemli rol oynadığını öne sürmüşlerdir.

Paratiroid hormonun osteoklast ve osteoblastları uyarıp, kemik metabolizmasını ve kemik yapım yıkımını hızlandırdığı varsayılmaktadır (110).

#### 2.4.3.6. Ozon tedavisi

Ozon, avasküler nekroza bağlı patolojilerde

- Endojen antioksidan sistemi stimüle ederek,
- Kan akımını, kırmızı kan hücrelerini ve hemoglobin konsantrasyonunu aktive ederek, diapedezi ve fagositozu artırarak,
- Tüm biyolojik reaksiyonları, özellikle doku oksijenlenme sürecini, kalsiyum, fosfor ve demir metabolizmasını stimüle ederek, bakterisid ajan olarak,
- Hafif analjezik etki oluşturarak iyileşmeye katkı sağlar (Şekil 2.4-11) (41,56,179,248).



**Şekil 2.4-11: Antimikrobiyal kemoterapi ve non invaziv cerrahi ile birlikte ozon tedavisi protokolü (160)**

Ozon tedavisinin etkinliğini artırmak için invaziv olmayan cerrahi girişimlerin yanı sıra antimikrobiyal kemoterapi (beta laktam grubu ve antifungal ilaçlar) gerekmektedir (7).

#### 2.4.3.7. Hiperbarik oksijen tedavisi

Hiperbarik Oksijen Tedavisi (HBO) dokularda oksijen difüzyonunun artırılması ile lökosit fonksiyonlarında artış sağlanarak, nekrotizan infeksiyonların etkin olduğu hipoksik yara bölgelerinde antibakteriyel etkinlik sağlanması ve yara iyileşmesine ivme kazandırılması esasına dayanır. HBO tedavisi ile artırılan oksijen düzeyinin anjiyogenez süreci üzerinde olumlu etkileri olduğu ve inert gazların eliminasyonunu sağladığı da bilinmektedir (166). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile HBO tedavisinin, yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinin hücresel sinyalizasyon süreçlerine etki eden ‘Reaktif Oksijen Türleri’ ve ‘Reaktif Nitrojen Türleri’nin oluşumunu sağladığı da gösterilmiştir (97).

Hiperbarik oksijenin osteoradyonekroz tedavisindeki yeri 1970’li yılların sonlarından itibaren anlaşılmaya ve uygulanmaya başlanmıştır. Marx, çalışmalarının sonucunda, osteoradyonekroz tedavisi için hastaları üç evrede ele aldığı bir protokol oluşturmuştur. ‘Marx Protokolü’ veya ‘Miami Protokolü’ olarak adlandırılan bu yaklaşım yalnızca HBO tedavisi ile ve/veya nonagressiv cerrahi girişimler ile iyileşebilecek hastaları daha ağır olgulardan ayırt edebilmeyi, ağır olguları ise agressiv cerrahi için hazırlamayı amaçlar (72).

Bu protokole göre;

1.evrede; hastalar 30 seans HBO tedavisi alırlar. Yara bakımı ve gerekiyorsa antibiyotik tedavisi uygulanır. 30 seans HBO tedavisi sonrasında yapılan değerlendirmede ekspozite kemikte olumlu yanıt saptanırsa 10 seans daha HBO uygulanır. Eğer yanıt yetersiz ise hastanın 2. evrede olduğu kabul edilir.

2.evrede; daha önce 30 seans HBO tedavisi almış olan hastanın ekspozite olan ölü kemik dokusu transoral olarak rezeke edilir. Kanayan kemik dokusuna ulaşıldığında yara katmanları kapatılır. Cerrahi sırasında periosta azami özen gösterilmelidir. Hasta, cerrahi girişimin ardından 10 seans daha HBO tedavisine alınır.

3.evrede; mandibulanın alt sınırını da tutan osteolizis, patolojik fraktür veya orokütanöz fistül ile gelen hastalar ile 2. evredeki tedaviye yanıt vermeyen olgular yer alır. Hastalara 30 seans HBO uygulandıktan sonra transoral mandibula rezeksiyonu ile ölü kemik ve beraberinde nekrotik yumuşak dokular çıkartılır. Rezeksiyon sınırları kanayan kemiğe ulaşılan kadar genişletilir. Geriye kalan mandibula segmentleri

eksternal pin fiksasyonu veya maksillomandibüler fiksasyon ile stabilize edilerek hasta 10 seans daha HBO tedavisine alınır. Rekonstrüksiyon cerrahisi rezeksiyondan üç ay sonra yapılabilir (72).

Hiperbarik oksijen tedavisi çene kemiklerinde görülen osteoradyonekrozun tedavisi ve önlenmesinde önemli bir tedavi seçeneği olmakla beraber ÇBBON vakalarında yararlılığı kanıtlanmamıştır. Osteoradyonekrozun ve ÇBBON patofizyolojik mekanizmaları birbirinden tamamen farklıdır. Osteoradyonekrozda kemikhipoksik, hiposellüler ve hipovasküler yapıdadır (166).

ÇBBON ise ilacın doğrudan osteoklastlar üzerine kimyasal toksisitesi nedeniyle kemiğin yeniden şekillenmesi ve yenilenmesinin engellenmesi sonucu oluşur. Osteoradyonekrozda radyasyon gören alanda hiposellüler etki sonucu hipovasküler yapı oluşurken ÇBBON’unda kapillerlerdeki hasar kemik ölümü sonucu sekonder olarak gelişir (141).

Freiberger ve ark. yaptıkları çalışmalarda HBO tedavisinin özellikle bifosfonat tedavisine ara verilmesini izleyerek yapılacak cerrahi tedaviye destek olabileceği ancak tek başına uygulanması halinde herhangi bir yararının olmayacağı görüşü savunulmaktadır (96,97). HBO’nun ÇBBON tedavisinde olumlu herhangi bir etkisi olmadığını savunan çalışmalar da bulunmaktadır (87,88,164).

HBO tedavisinin, özellikle metastatik kanserler nedeniyle bifosfonat tedavisi altında olan ÇBBON hastalarında tümöral dokularda da vasküler artışa neden olabileceği varsayımı bu hastalarda kullanımını tartışılır hale getirmektedir. Ayrıca, HBO tedavisinin bazı kemoterapötik ajanlarla beraber uygulanmasının sakıncaları da vurgulanmaktadır (156,240). Bu farklı sonuçlar ve yorumlar HBO’nun ÇBBON’un tedavi protokolü içerisinde destek tedavi olarak yer almasında soru işareti yaratmakta ve ileri çalışmaları gerektirmektedir.

#### 2.4.3.8. Düşük Doz Lazer Tedavisi

Lazer tedavisinin deri ve mukozanın beslenmesi üzerine etkinliği birçok araştırmacı tarafından in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Bu sonuçlar, lazer biyostimulasyon tedavisinin, ÇBBON vakalarında da kullanılabileceğini desteklemektedir. Kemik biyostimulasyonunda kullanılan lazer tipleri, argon, karbondioksit, helyum/neon, diyot ve Nd:YAG şeklindedir. DDLT ağız dokularına uygulandığında antimikrobiyal ve biyostimulan etkiye sahiptir. DDLT'nin hücre artışı stimule ettiğini ve yara yerinin iyileşmesi üzerine etkili olduğunu göstermiştir. Kan ve lenf damarlarının da lazer tedavisi ile stimüle edildiği görülmüştür (183,233). İn vitro ışın tedavisi, hücre büyüme gelişimi, hücre enzimlerinin ve proteinlerinin üretimi üzerine etkilidir. Ayrıca kortikosteroid veya antibiyotik gibi ilaçlarla destek tedavisinden bağımsız olarak osteoblast benzeri hücrelerin artışına katkı sağlar (98,176).

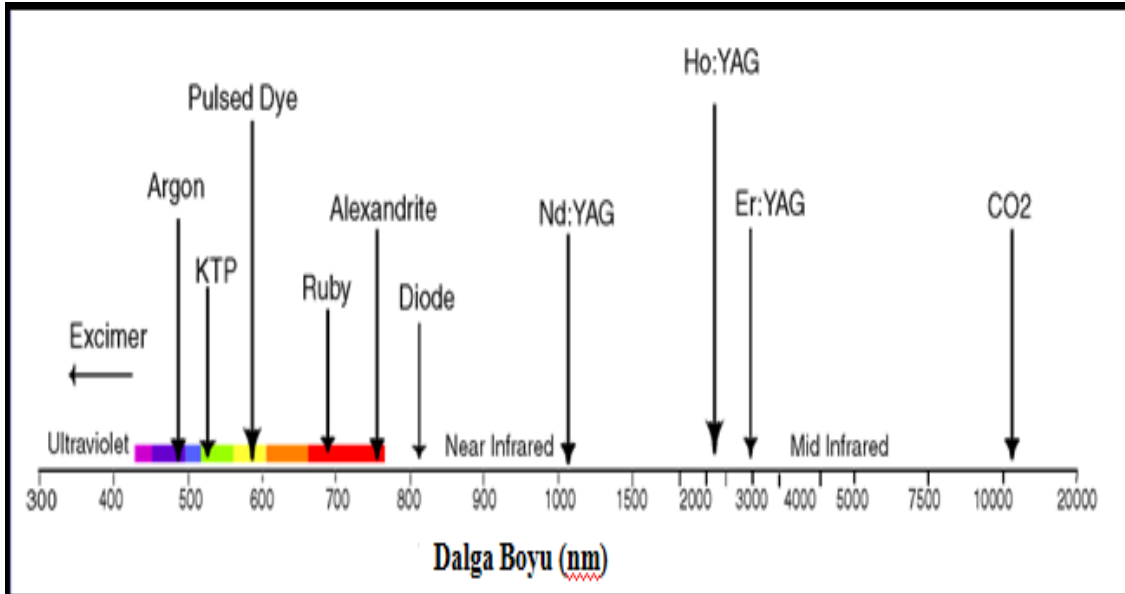
Kemik dokusunda lazerin biyostimulasyon etkisi üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında helyum-neon, görünür ve kızılötesi diyot lazer kullanılmıştır (98,118,165,191). Çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre görüşler, kızıl ötesi ve görünür ışığın kemik dokusunda etkili olabileceği yönündeyse de, tüm dalga boylarının biyostimulan etki gösterdiği, bu nedenle ÇBBON tedavisinde lazerin biyostimulasyon etkisinden faydalanılabileceği bildirilmektedir (218,232).

## 2.5. LASERİN TANIMI

“Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” kelimelerinin ilk harflerinden oluşturulan LASER terimi, 'radyasyonun uyarılmış emisyonu ile ışığın güçlendirilmesi' anlamına gelmektedir. Lazer ışığı, aktive olmuş doğal gazların, elementlerin, moleküllerin ve çeşitli kristallerin etkileşimi ile meydana gelen, yüksek yoğunlukta, paralel hareket eden, aynı dalga boyundaki elektromanyetik radyasyondan oluşan ışıktır (31,60,158).

### 2.5.1. Elektromanyetik dalga ve fotonlar

Elektromanyetik radyasyon, uzayda yayılım gösteren bir enerji türüdür. Sabit hızdaki ışık dalgalarının hareketinden oluşan elektromanyetik enerjinin bir şekli olan lazer enerjisinin birimine foton ya da ışığın parçası denilir. Elektromanyetik radyasyon iki farklı kavram olan frekans ve dalga boyu ile ifade edilir. Frekans ( $\nu$ ) saniyedeki yayılım sayısını ifade eder ve birimi Hertz (Hz)'dir. Dalga boyu ( $\lambda$ ) ise, ışığın dalga boyunun metrik sistem ile ölçümünün sayısal ifadesidir. Dalga boyu dokular ile reaksiyonun nasıl olduğunun ve lazer ışığının cerrahi alanda nasıl iletildiğinin önemini gösteren fiziksel ölçüdür. Bir radyasyonun ışık spektrumunun gözle görülebilir bölgesindeki dalga boyu o ışığın aynı zamanda rengini de belirler. Tüm elektromanyetik dalgaların maksimal hızları ışık hızı (C) olarak bilinir ve  $C=299792.458$  m/sn'dir. Dalga genişliği dalga boyundaki enerji miktarının ölçümüdür. Tıpta dalga genişliğinin, enerji miktarının ve dalga yüksekliğinin büyük olması tercih edilir. Diş hekimliği için yararlı miktar mili joule'dir (J/1000) (Şekil 2.5-1) (31,49,58,91).



Şekil 2.5-1: Elektromanyetik spektrum

Elektromanyetik spektrumdaki uzun dalga genişliği düşük enerji üretir. Bu kural kızılötesi ve mikrodalgalar için geçerlidir. Kısa dalga boyunda ise yüksek enerjili ultraviolet ışınları, X ışınları ve gama radyasyonu vardır. Lazer ışınlarının taşıdığı enerji ve elektromanyetik spektrum, dalga genişliği ve frekans tarafından oluşturulur (84).

Tıpta kullanılan tüm lazer cihazları klinisyen tarafından ayarlanabilir parametrelere sahiptirler. Lazerin kullanım parametreleri, istenilen terapötik etkinin elde edilmesinde dikkat edilmesi gereken unsurlardır. Uygulamalarda göz önünde bulundurulması gereken parametreler şunlardır:

- Lazer dalga boyu,
- Yayılım tipi (devamlı veya atımlı),
- Enerji yoğunluğu,
- Güç yoğunluğu,
- Tekrarlama hızı,
- Atım sayısı,
- Süresi ve şekli (86).

Güç belirli bir zaman aralığında yapılan işin ölçümüdür. Birimi Watt (W)'tır. Joule (J) ise enerji birimidir. 1 Watt 1 saniyede üretilen 1 Joule'lük iştir. Bu ayarlanabilir parametrelerden biri ya da her ikisi lazer cihazında bulunur (91).

$$\text{Enerji} = \text{Güç} \times \text{Zaman} \quad \mathbf{J = W \times sn' dir}$$

Lazer ışığının merkezindeki %86'lık kısmı dokular üzerinde istenilen etkiyi yaratmak için kullanılabilir ve bu oran lazer ışığının çalışan spot büyüklüğü olarak adlandırılır. Geriye kalan %14'lük miktarın komşu dokulara yayıldığı ve bu dokularda biyolojik etki oluşturduğu gözlemlenmiştir. Lazer ışığının bu iletim şekli Gaussian dağılım modeli ile açıklanmıştır ve düşük düzeyli lazer tedavisinin temelini oluşturmuştur (58).

Lazerin odaklandığı ve enerji yoğunluğunun en fazla olduğu nokta 'fokal spot' olarak adlandırılır. Fokal spotta enerji yoğunluğu maksimumdur ve bu mesafe lazerin iş gördüğü mesafesidir. Fokal spot insizyonel ve eksizyonel işlemlerde önemlidir. Tıpta kesme ve koagülasyon işlemleri için  $1 \text{ W/cm}^2$  ile  $10^6 \text{ W/cm}^2$  arasında güç yoğunluğu değerleri kullanılır (230).

Lazerin biyolojik etkilerinin oluşması için uygun güç yoğunluğu gereklidir. Lazer demetinin alanı yoğunluk hesaplamalarında kullanılır. Her ne kadar lazer ışını kolimine

ışın olsa da, katedilen yolla birlikte ışın demeti çapının bir miktar arttığı ve yayıldığı görülür. Fiber optik taşıyıcı sistemlerde ve diyot lazerlerde bu değer  $15^0$ - $30^0$  civarındadır (161). Uygulanan ışın demetinin alanının belirlenmesinde kontakt ve non kontakt çalışma etkilidir. Küçük bir alanda odaklanmış lazer ışınının dokuda ablasyon için yeterli enerji yoğunluğunu elde etmesi mümkündür (36,171).

Lazer devamlı veya atımlı şekilde enerjisini açığa çıkarır. Yumuşak dokuda pedala basıldığı sürece çalışan devamlı lazer kullanılır. Sert dokuda ise termik zarar vermemek için atımlı lazer tercih edilir. Lazer ışığının atımlı modda kullanımı, yüksek güçte, kısa süreli atımlar uygulayarak çevre dokuların ısınması ve hasarı için geçen sürenin minimumda tutulmasını sağlar (59,186). Günümüzde lazer cihazlarını üç yayılım tipinde kullanmak mümkündür:

- Devamlı dalga modu,
- Kendiliğinden atımlı mod,
- Kesintili atımlı mod.

Lazer sisteminde lazerin dokuya iletimi kontakt ya da non kontakt olmak üzere iki şekilde olabilir. Cerrahi işlemler için kontakt uçların kullanıldığı lazerler daha çok tercih edilmektedirler (58,158,230).

Lazerin kullanım endikasyonlarını birincil olarak dalga boyu belirler. Spesifik tedaviye uygun dalga boyuna sahip lazeri seçmek, başarının ilk adımıdır (138). Lazer uygulamalarında enerji, enerji yoğunluğu, atım süresi ve sayısı, toplam etki süresi bakımından çeşitli varyasyonlar oluşturmak olasıdır (186).

Bir lazer cihazı aşağıdaki komponentlerden oluşmaktadır:

- Aktif madde,
- Pompalama kaynağı,
- Optik rezonatör,
- Optik taşıyıcı sistem,
- Soğutma sistemi,
- Kontrol paneli,
- Odaklayıcı lens (36,59,60).

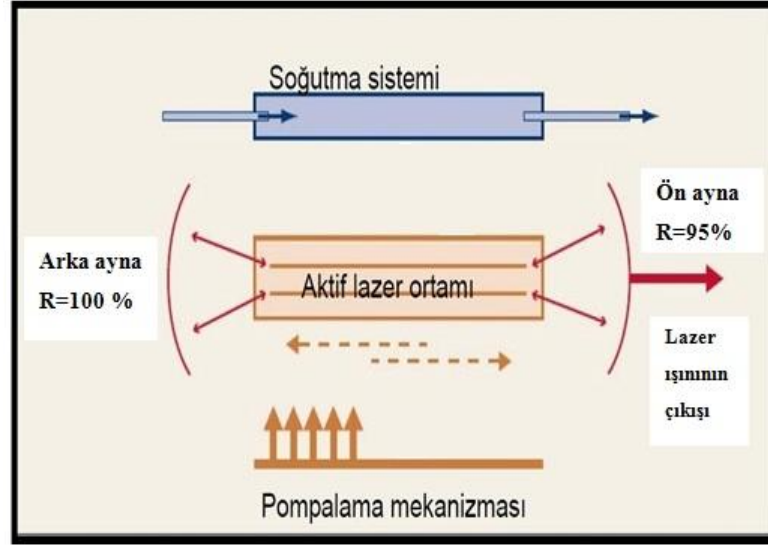
Aktif madde, uyarıldığında lazer ışını salınımı yapan doğal veya yapay maddedir. Aktif maddenin cinsi lazerin tipini ve dalga boyunu belirler (171).

Aktif madde;

- Organik likit ise Dye lazer,
- Argon, kripton veya xenon gibi inert gazlar ve florin, klorin gibi reaktif gazların karışımı ise Excimer lazer,
- Karbondioksit gazı ise CO<sub>2</sub> lazer,
- Argon gazı ise Argon lazer,
- Yarı iletken aluminyum-galyum-arsenid (AlGaAs) levhalarından oluşan mikro çip ise Diyot lazer,
- Katı kristal (Neodmiyum, Holmiyum, Erbiyum, Erbiyum-krom) ve bu kristale katılan İtriyum-Aluminyum-Garnet (YAG) ya da İtriyum-Skandiyum-Galyum-Garnet(YSGG) ise Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG lazer adını alır (36).

Aktif madde, optik rezonatör adını alan karşılıklı aynaların yerleştirilmiş olduğu ve pompalama mekanizması ile çevrili bir kavitede bulunur. Boşlukta fotonların üretilmesi için aktif maddeyi uyararak enerji kaynağına ihtiyaç vardır. Bu görevi pompalama kaynağı yapar. Pompalama kaynağı flaş lambası gibi bir ışık kaynağıdır. Oluşturduğu ışık enerjisi aktif madde tarafından emilerek uyarılmış salınım ile lazer fotonlarının oluşumuna yol açar (18,36).

Uyarılmış aktif madde tarafından salınan aynı fazda (koherent), aynı dalga boyuna sahip (monokromatik) fotonlar optik rezonatör içerisinde birbirine paralel konumlandırılmış iki ayna arasında gidip gelmeye başlarlar. Bu işlem ışının güçlendirilmesidir. Aynalardan biri tam yansıtıcı, diğeri ise selektif geçirgendir ve bir kısım ışının optik rezonatörü terk etmesine izin verir. Ortamı terk eden ışın aynaların paralelliği sayesinde kolimine, yani yayılma ve sapma göstermeyen paralel demet halindedir (Şekil 2.5-2) (36,59).



Şekil 2.5-2: Lazer Ortamı

Soğutma sistemi, lazer cihazlarının en hacimli ve ağır kısmını oluşturur. Isı, lazer oluşumu sırasında ortaya çıkan yan üründür. Doku kesme işlemlerinde kullanılan lazerlerin gücü yüksek olduğundan, ısı üretimi ve soğutma ihtiyacı da artar. Soğutma sistemleri su veya hava aracılığı ile çalışır. Odaklayıcı lensler birbirine paralel fotonlardan oluşan lazer ışınını daha da yoğunlaştırmak amacıyla kullanılırlar. Bu sayede lazerin enerji yoğunluğu ve etkisi artar, ancak kullanılan merceğin kısa mesafeli odak uzaklıkları olması nedeniyle lazerin dokudaki etki derinliği azalır (18,171).

Kontrol paneli, lazerin pratikte kullanımı sırasında bazı değerlerin uygulanan işleme göre ayarlanmasını sağlar.

Değişken parametreler:

- Enerji yoğunluğu ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ),
- Atım (pulsasyon) süresi ( msn veya nsn),
- Maksimal atım enerjisi (mJ),
- Atım (pulsasyon) frekansı (Hz) (36).

Dalga boyu (nm) ise aktif maddeye bağlı olup sabittir, ancak bazı kombine lazer cihazlarında bu parametre de değiştirilebilir. Kontrol panelinden uygulanan klinik parametrelerin çıktısı alınabilir (36).

### 2.5.2. Lazerlerin sınıflaması

Medikal alanda kullanılan lazerlerin sınıflandırılması yapılırken çeşitli parametreler kullanılmıştır.

#### A. Kullanım Alanlarına Göre Lazerler

Kullanım alanlarına göre lazerler dörde ayrılırlar.

**I. Cerrahi (Sıcak) lazerler:** Taşıdıkları yüksek enerji sonucu meydana gelen termal etki ile öncelikle lokal bir ısı ve dehidratasyon, sonra koagülasyon, karbonizasyon ve buharlaşma oluşur.

**II. Fotokoagülatör lazerler:** Kanama kontrolünde kullanılan lazerlerdir.

**III. Fotoradyan lazerler:** Kanser tedavisinde kullanımı denenen lazerlerdir.

**IV. Soğuk lazerler:** Termal olmayan yollarla etki eden düşük enerjili lazerlerdir (143).

#### B. Kullanılan Aktif Maddeye Göre Lazerler

**I. Katı lazerler:**

Yakut (ruby) lazer: 694.3 nm dalga boyundadır. Dermatolojide kullanılmaktadır.

Nd:YAG lazer: 1064 nm dalga boyundadır. Dişhekimliğinin bir çok alanında kullanılmaktadır.

Holmium: Yttrium-Aluminum-Garnet lazer (Hol:YAG): 130 nm dalga boyuna sahip bir lazerdir. Koagülasyon amacıyla kullanılır.

Er:YAG lazer: 2940 nm dalga boyundadır. Diş hekimliğinin birçok alanında kullanılır.

**II. Sıvı lazerler:**

Dye lazer: 507-510 nm dalga boyuna sahip lazerlerdir. Cerrahide kullanılırlar.

Rhodamine lazer: 560-650 nm dalga boyundadır. Dermatolojide kullanılırlar.

**III. Gaz lazerler:**

He-Ne lazer: 633 nm dalga boyundadır. Biyostimülasyon amaçlı kullanılırlar.

Argon lazer: 350-514 nm dalga boyundadır. Dermatoloji, damar cerrahisi ve oftalmolojide kullanılır.

CO<sub>2</sub> lazer: 10600 nm dalga boyundadır. Cerrahide kullanılırlar.

Excimer lazer: 193, 248, 308 nm dalga boyundadır. Oftalmolojide kullanılır.

**IV. Yarı iletken lazerler:**

Gallium-Arsenide lazer (Ga-As): 904 nm dalga boyundadır. Biyostimülasyon amaçlı kullanılırlar.

Ga-Al-As lazer: 800-830nm, 904-950nm dalga boyundadır. Biyostimülasyon ve cerrahi amaçlı kullanılırlar (Tablo 2.5-1, Tablo 2.5-2) (103,209).

**Tablo 2.5-1: Lazer tipi ve dalga boyu (15)**

Lazer tipi	Lazer	Dalga boyu	Renk
Eximer lazerler	Argon Fluoride (ArF)	193 nm	Morötesi
	Xenon Chloride (XeCl)	308 nm	Morötesi
Gaz lazerler	Argon	488 nm	Mavi
		514 nm	Mavi-yeşil
	Helium-Neon (HeNe)	637 nm	Kırmızı
	Carbon Dioxide (CO <sub>2</sub> )	10.600 nm	Kızılötesi
Diyot lazerler (yarı iletken lazerler)	Indium Gallium Arsenide Phosphorus (InGaAsP)	655 nm	Kırmızı
	Gallium Aluminum Arsenide (GaAlAs)	670-830 nm	Kırmızı-kızılötesi
	Gallium Arsenide (GaAs)	840 nm	Kızılötesi
	Indium Gallium Arsenide (InGaAs)	980 nm	Kızılötesi
Sert lazerler (Kristal ortamlı lazer)	Alexandrite	337 nm	Morötesi
	Potassium Titanyl Phosphate (KTP)	532 nm	Yeşil
	Neodymium:YAG (Nd: YAG)	1.064 nm	Kızılötesi
	Holmium:YAG (Ho:YAG)	2.100 nm	Kızılötesi
	Erbium, chromium:YSGG (Er,Cr:YSGG)	2.780 nm	Kızılötesi
	Erbium:YSGG (Er:YSGG)	2.790 nm	Kızılötesi
	Erbium:YAG (Er:YAG)	2.940 nm	Kızılötesi

**Tablo 2.5-2: Lazerlerin özelliklerine göre diş hekimliğinde kullanım alanları (yumuşak doku lazerleri ve dalga boyları) (74)**

Lazer Tipi	Dalga boyu	Dalga formu	Uygulamalar
CO <sub>2</sub> lazer	10.6 µm	Atımlı veya devamlı	Yumuşak doku insizyonu ve ablasyonu, periodontal rejeneratif uygulamalarda dişetin reepitelizasyonu
Neodymium:Yttrium-Aluminum-Garnet lazer	1.064 µm	Atımlı	Yumuşak doku insizyonu ve ablasyonu, başlangıç çürük lezyonların temizlenmesi
Erbium:Yttrium-Aluminum-Garnet lazer	2.94 µm	Atımlı	Çürük temizlenmesi, mine ve dentinde kavite hazırlanması, sement ve kemikte kullanımı
Erbium, Chromium: Yttrium-Selenium-Gallium-Garnet lazer	2.78 µm	Atımlı	Mine pürüzlendirilmesi, çürük temizlenmesi ve kavite hazırlanması, yanma, erime ve kalsiyum-fosfor oranı değişmeksizin kemikte kesi yapılması, kök kanalı şekillendirilmesi
Argon lazer	457-502 nm	Atımlı veya devamlı	Reçine polimerizasyonu, yumuşak doku insizyonu ve ablasyonu, diş beyazlatma
Holmium: Yttrium-Aluminum-Garnet lazer	2.1 µm	Atımlı	Yumuşak doku insizyonu ve ablasyonu
Gallium-Arsenide (Diyot) lazer	810-980 nm	Atımlı veya devamlı	Yumuşak doku insizyonu ve ablasyonu

## **C. Dozlarına Göre Lazerler**

### **I. Yüksek Doz Lazerler**

Sert veya sıcak lazerler olarak da adlandırılırlar. Cerrahide ve sanayide kullanılırlar. Güçleri 80 mW'tan yüksek olan termal etkiye sahip lazerlerdir. Tıpta en çok Argon, CO<sub>2</sub>, Nd:YAG, ve Er:YAG lazerler kullanılmaktadır.

### **II. Orta Doz Lazerler**

Yarı iletken lazerler de denir. Aktif madde olarak galyum-alimünyum-arsenid maddesi kullanılır. Diyot lazer olarak da tanımlanır. Dalga boyu 830-904 nm'dir. Aralıklı ışın yayarlar. İndirekt penetrasyon 5 cm'ye kadar çıkabilir. Orta doz lazer olarak tanımlanan kızılötesi lazerlerin güçleri düşük doz lazerlere yakındır. Bu nedenle bazı sınıflamalarda düşük doz lazerler içinde yer alırlar.

### **III. Düşük Doz Lazerler**

Soğuk ya da yumuşak lazer olarak da tanımlanırlar. Aktif madde olarak galyum-alüminyum-arsenid ya da Helium-Neon gazının kullanıldığı lazerlerdir. Düşük enerjili lazerlerin güçleri en çok 50-80 mW'a kadar çıkabilmektedir. Dokularda fotokimyasal etki yaratarak iyileşmenin stimülasyonunda etkili olurlar. 632.8 nm dalga boylu lazerlerdir. Emniyetli ve pratik olup, devamlı ışın yayarlar. Atımlı veya devamlı modda uygulama yapılabilir. Işın kaynağına sürekli bakılırsa gözde harabiyet yapar. Helyum-Neon lazeri yüksek dağılım ve düşük absorpsiyonda geniş bir doku kitlesine etki eder. Bu nedenle transkutan ışınlama tedavileri için en uygun lazer tipidir. Helyum-neon lazerin penetrasyon derinliği 0.8 mm'nin üzerinde, 10-15 mm arasındadır. Direkt penetrasyon, lazerin karakteristik özelliklerinin değişmeden ulaştığı derinliği ifade ederken, indirekt penetrasyon lazerin karakteristik özelliklerinin değiştiği, çevre dokuların özelliklerine göre absorpsiyonu ile oluşan derinliği ifade eder (8,103,136,209).

Bu lazerler hücrel aktiviteyi uyaran dalga boylarında, soğuk ve düşük enerji yayan kaynaklardır. Doku rejenerasyonuna yardımcı sistemler olarak, tıp ve dişhekimliği alanında ağrının giderilmesi, enflamasyon ve ödemin azaltılması ile iyileşmenin hızlandırılması amacıyla kullanılmaktadır. Düşük doz lazerlerin yara

iyileşmesini hızlandırıcı etkisinin fibroblastların uyarılması sonucunda kollagen yapımının artmasına bağlı olduğu öne sürülmektedir (92).

Düşük doz lazerler dişhekimliğinde dentin duyarlılığının giderilmesinde, akut lokalize osteitisin tedavisinde, aftların neden olduğu ağrının giderilmesi ve iyileşmenin hızlandırılmasında kullanılmaktadır (150).

#### **D. Dalga boylarına göre lazerler:**

1-Ultraviyole: Spektrumun ultraviyole kısmında yer alan lazerler: Excimer ve Argon Fluoride (ArF) lazerler bu grupta yer alırlar.

2-Görünen ışık: Spektrumun görülmür ışık kısmında yer alan lazerler: Ar, Potassium-Titanyl-Phosphate (KTP) lazerler bu grupta yer alırlar.

3-Enfraruj: Spektrumun kızılötesi kısmında yer alan lazerler: GaAs, Ga-Al-As, Nd: YAG, Er: YAG, Er,Cr:YSGG (Erbium, Chromium: Yttrium-Selenium-Gallium-Garnet) ve CO<sub>2</sub> lazerler bu grupta yer alır (8,136).

#### **E. Dokuda hasar oluşturma risklerine göre lazerler:**

1.Sınıf: Düşük güçte biyolojik dokularda zarar oluşturmayan güvenli (Diyot Laser) lazerlerdir.

2.Sınıf: Gücü 1 mW 'ın altında olan ve ışığı gözle görülen lazerler (He-Neon). Doğrudan içlerine bakmadıkça tehlike teşkil etmezler. Göz kırpma refleksinin bu lazerlere karşı yeterli bir savunma mekanizması olduğu varsayılır.

3.Sınıf: Ciltle temas ettiklerinde tehlike teşkil etmeyen, yangın tehlikesi yaratacak kadar gücü olmayan, ancak doğrudan veya yansıyan ışıklarına bakılmasında tedbir gerektiren lazerlerdir. İki alt sınıfa ayrılır:

3a Sınıfı: Işığa büyüteç, mikroskop gibi optik sistemlerle korumasız gözle bakılabilen lazerler.

3b Sınıfı: Işığa gözlüksüz bakılmaması gereken lazerler.

4.Sınıf: Yangın tehlikesi oluşturan, cilt ve gözler için tehlike teşkil eden lazerler. Bu lazerlerin yansıyan veya genişleyerek saçılan ışıkları dahi gözler için tehlikelidir. Emniyet tedbirlerinin alınması gereklidir. Tedavi amaçlı kullanılan lazerlerin çoğu bu kategoriye girmektedir (Tablo 2.5-3) (8,136).

**Tablo 2.5-3: Tehlike riskine göre lazerlerin sınıflaması (238)**

Sınıf	Risk	Örnek
<b>I</b>	Tamamen kapalı sistem	Diş laboratuvarında lehimlemede kullanılan Nd:YAG lazer
<b>II</b>	Göz kırpma refleksi ile korunulabilen görünür düşük güçlü lazer	Cerrahi lazerlerin görünür kırmızı renkte hedefleme ışığı
<b>IIIa</b>	1 mW üzeri görünür lazer	Dental örneği yok
<b>IIIb</b>	Görünür olan veya olmayan yüksek güçlü (0.5 W'a kadar) lazer. Direkt bakışta göz hasarı riski.	Biyostimülasyon amaçlı kullanılan düşük güç diyet lazer (50 mW)
<b>IV</b>	Göz ve cilt hasarı mümkün. Direkt veya indirekt bakışta göz hasarı riski.	Oral cerrahi, diş beyazlatma ve dolgu kavitesi hazırlığında kullanılan tüm dental lazerler

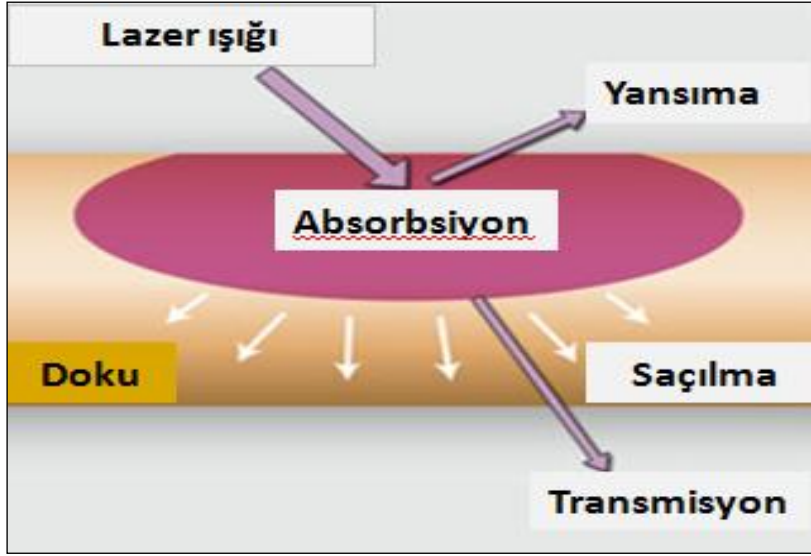
**F. Lazer ışını hareketlerine göre:**

- 1-Devamlı ışın verenler
- 2-Atımlı (Nabızsal) ışın verenler
- 3-Dalgalı akım olarak ışın verenler (8,136).

**2.5.3. Lazer doku etkileşimleri****2.5.4. Dokuların Optik Özellikleri**

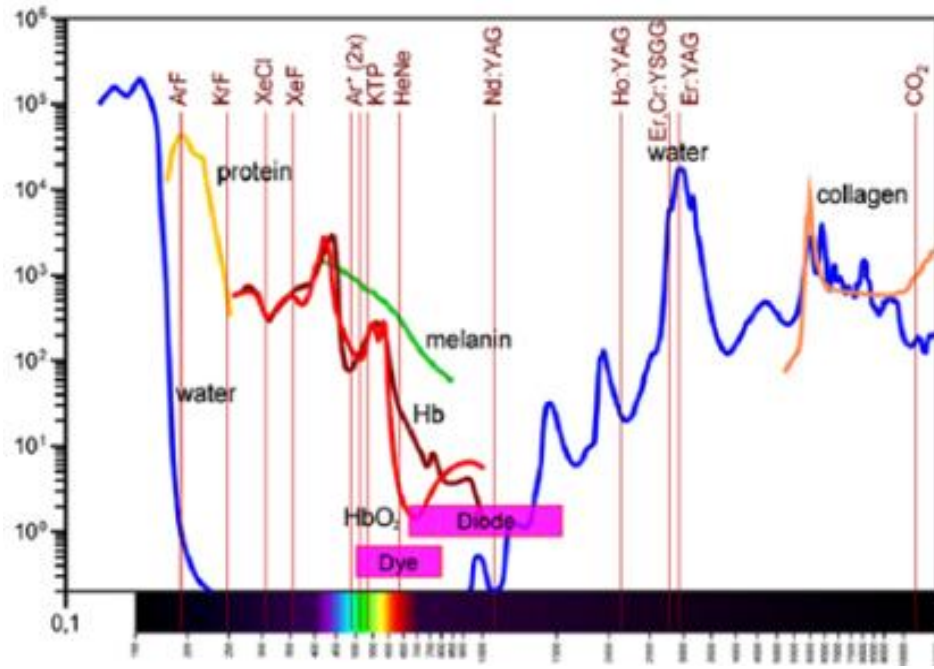
Lazer cihazıyla çalışırken dokuların optik özellikleri ve buna bağlı oluşan termik ve tıbbi etkiler dikkat edilmesi gereken faktörlerdir. Lazer ışığının doku ile etkileşimi dokunun optik özelliklerine göre dört farklı şekilde gerçekleşir.

- Absorbsiyon (emilim)
- Transmission (geçiş)
- Reflection (yansıma)
- Scatter (saçılma) (Şekil 2.5-3)(60,95).



Şekil 2.5-3: Lazer doku etkileşimleri

**Absorbsiyon (emilim):** İlk ve en çok istenilen doku lazer etkileşimi, hedef dokuya lazerin absorpsiyonudur. Doku tarafından absorbe edilen enerjinin miktarı dokunun yapısal özelliklerine, lazerin dalga boyuna ve yayılım tipine göre değişiklik gösterir. Dokular içerisinde spesifik bir dalga boyuna sahip lazer ışığını absorbe eden yapılar kromofor olarak adlandırılır. Doku içerisindeki kromoforların sayısı lazer ışığının absorpsiyon miktarını belirler. Lazer ışığının dokularca absorbe edilen miktarı absorpsiyon katsayısı  $\alpha$  ile ifade edilir. Lazer ışığının dokudaki penetrasyon derinliği absorpsiyon miktarı ile ters orantılıdır. Dokuyu oluşturan organik yapılar yoğun olarak mor ötesi spektrumunu absorbe ederken kızıl ötesi spektrum yoğun olarak su tarafından absorbe edilir. Kısa dalga boyuna sahip lazer ışını (500-1000 nm) pigment ve hemoglobin içeriği yoğun dokular tarafından absorbe edilir. Argon lazer hemoglobin tarafından fazla miktarda absorbe edilirken, Diyot ve Nd:YAG lazerler melanin pigmentince nispeten daha fazla emilirler (Şekil 2.5-4) (57,62,194).



Şekil 2.5-4: Farklı lazer dalga boylarının doku elemanları tarafından emilim oranları

Lazer ışınının enerji yoğunluğu, gücü, yayılım tipi ve uygulama süresi absorbe edilen ışın miktarını tayin eder (211).

Devamlı lazerler, dokuya kesintisiz ışın aktarımı ile belirli sürede daha fazla enerji aktarımı yaptıklarından ışın absorpsiyonu yüksek seviyede gerçekleşir. Bu nedenle genelde düşük güç parametreleri ile kullanılırlar. Atımlı modda ise dokulara yoğun ancak kesintili enerji yollanarak absorpsiyon sağlanır (74).

Uzun dalga boyuna sahip olan lazerler, daha derin dokulara penetre olurlar. Örneğin Ga-As lazerler (830-904 nm), He-Ne lazerlerden (632,8 nm) daha derin dokulara ulaşırlar. Ayrıca ışınlanan dokunun durumu önemli rol oynar. Yumuşak dokularda 20-30 mm'ye kadar penetre olan lazer, kemikte yalnızca 2-3 mm'ye penetre olur. Sıvı içeren dokularda, mukus membranı gibi daha fazla absorpsiyon görülür (201).

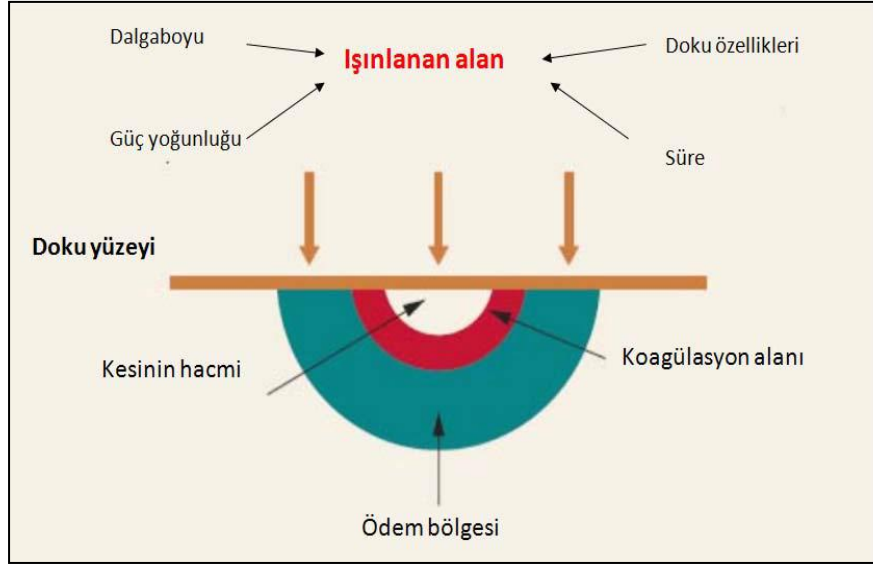
Dokuda kanlanmanın az olması, doku tarafından absorbe edilen enerji miktarını azaltır (26).

**Transmisyon (geçiş):** İkinci etkileşim, lazerin hedef doku için yüzeysel dokulardan etkileşime girmeden geçmesi ve hedef doku aralığında etkisini göstermesidir. Bu özellik büyük oranda ışığın dalga boyu ile ilişkilidir. Bu etkileşime örnek olarak diyot ve Nd:YAG lazerlerin lens, iris ve korneadan geçerek retina tarafından absorbe edilmesi gösterilebilir (60,95).

Geçiş, emilim ile ters orantılıdır. Lazer ışınının dokuda emilimi azaldıkça etki oluşturmadan daha derin dokulara doğru ilerleme miktarı artar. Geçiş derinliğinin temel belirleyenleri dokunun içeriği, lazerin dalga boyu ve lazer ışınının yoğunluğudur. İletim sonucu kat edilen dokularda etki oluşmaz (211).

**Reflection (yansıma):** Yansıma lazer ışığının hedef dokuda herhangi bir etkileşime girmeden yüzey dokudan geri dönmesidir. Dokuların homojen olmayan yapısı lazer ışığının yansımasında en önemli faktördür. Bazı lazerlerdeki ışık demetleri yansıma yaptıkları alandan 3m'lik uzaklıkta halen yeterli enerjiye sahip olabilmektedir. Yansıyan lazer ışığının uygulama sırasında korunması gereken göz gibi bölgelere gelebilme ihtimali yaralanmalara neden olabilir. Bu etkileşim lazer güvenliği açısından önemlidir (60).

**Scatter (saçılma):** Bir diğer etkileşim de ışığın doku içerisinde saçılmasıdır. Lazer ışığının saçılması, hedeflenen bölgeye istenilen miktarda enerji transfer edilmesini olanaksız kılacak ve istenilen biyolojik etki elde edilemeyecektir. Saçılan lazer ışığı komşu dokularda absorbe edilerek ısı transferine neden olarak istenmeyen hasarlara yol açabilir. Bununla birlikte değişik doğrultuda saçılan ışıklardan kök kanal sistemlerinin dezenfeksiyon ve sterilizasyonunda faydalanılır (Şekil 2.5-5) (31,60).



**Şekil 2.5-5: Lazerin biyolojik dokuda etki mekanizması**

### 2.5.5. Dokuların Biyolojik Özellikleri

Lazerden kaynaklanan ışık enerjisinin hedef dokudaki etki mekanizması, hedef dokunun optik özelliklerine, ışının dalga boyuna ve birim zamanda yüzeye düşen enerji yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Lazer ışığının dokuda meydana getirdiği biyolojik etkileşimler dalga boyuna, enerji miktarına, ışınlanma süresine ve dokuların özelliklerine bağlıdır. Lazer ışığının dokulardaki etkileri (60):

#### 1) Fototermal etki:

Lazer enerjisi ısıya dönüşerek dokuyu tahrip eder. Lazer ışığının termik etkisi denilince dokuda koagülasyon ve buharlaşma anlaşılır. Oluşan ısının derecesi ve aplikasyon süresine göre değişik termik etkiler oluşur. Lazerin dokudaki termik etkileri hiçbir zaman ayrı ayrı oluşmaz. Örneğin kesme işinde olduğu gibi hepsi değişik oranlarda aynı anda gözlenir. Lazer homojen olan bir dokuya uygulanırsa, gücü azalarak alt tabakalara ulaşır ve kısmen yansıyarak rezorbe edilir. Isının 300° C'den fazla olduğu durumlarda doku buharlaşır ve buharlaşan kısmın altında 150° C'den fazla ısı içeren bir bölge karbonize olur. Bundan sonraki tabakada da doku koagüle olur (Tablo 2.5-4). Daha alt tabakada ise doku sıcaklığının daha az artması nedeniyle geri dönüşümü olan hafif değişiklik meydana gelir (52,75).

**Tablo 2.5-4: Isıya bağılı doku reaksiyonu (75)**

ISI (°C)	Doku Değişikliği
37	Geri dönüşümlü değişiklikler görülür
40-45	Enzim salgılanması, ödem oluşumu ve zamana bağlı hücre ölümü
60	Protein denatürasyonu, koagülasyon nekrozu
80	Kollajen denatürasyonu, membran defektleri
100	Kuruma
150<	Karbonizasyon
300>	Buharlaştırma

**2) Fotodinamik etki:**

Genellikle fotodinamik etkileşimler, ışığa duyarlı molekülleri kullanarak, oksijenin biyokimyasal olarak reaktif formunu yani serbest oksijeni oluştururlar. Serbest oksijen radikali sitotoksiktir ve dokudaki bazı önemli komponentleri okside ederek doku yıkımını başlatır. Lazer ışınının fotodinamik etkileşimi daha çok kanserli hücrelerde kullanılır. Lazerin dokulardaki etkisini belirleyen faktörler; lazerin dalga boyu, dokunun absorpsiyon karakteri, kullanılan güç miktarı, ışının odaklandığı alandaki keskinliği ve lazer ucunun objeye olan uzaklığıdır (249).

**3) Fotoakustik etki:**

Atımlı lazer enerjisi, hedeflenen dokunun fiziksel olarak kesilmesine yol açan şok dalgaları veya yüksek basınçlı dalgalar halinde akustik enerjiye dönüşür (95,225).

**4) Fotodekompozisyonel etki:**

**Fotodisrupsiyon:** Yüksek enerjili lazerlerin kullanılması ile toplam yükü nötral olan iyonize partikül bulutundan oluşan sekonder şok dalgası, dokuyu mekanik olarak tahrip eder (249).

**Fotoablasyon:** Lazer ışını komşu dokulara hiçbir zarar vermeden hedef dokunun atomik ve moleküler bağlarını kırar. Isı enerjisi dokunun buharlaşma sıcaklığından fazla ise enerjinin büyük kısmı absorbe edilerek aniden patlama şeklinde buharlaşır. Buna fotoablasyon denir. Diş sert dokularından parçacıklar halinde madde kaldırılarak kavite açma bu etki ile gerçekleştirilmektedir. Absorbsiyonun şiddeti doku cinsine ve lazer dalga boyuna bağlıdır. Dokunun derin kısmında ısı enerjisi azalır, dolayısıyla dokudaki ısı enerjisinin oluşturduğu sıcaklık da azalır. Bu durumda dokudaki termik zararlar çok az olup aşağı yukarı lazer ışınının penetrasyon derinliği kadar olur. Fotoablasyonun oluşması için şart olarak kısa lazer pulsasyonları ve ışının doku içerisine çok az bir derinlikte girmesi gerekir (124).

### 5) Fotokimyasal etki:

Lazer ışığının herhangi bir termal etkisi olmadan absorpsiyonu ile molekül ve atomların fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmesidir. Dokuların iyileşme ve tamir gibi biyokimyasal ve moleküler işlemlerinde uyarıcı rol oynar. Enerji yoğunluğu arttığında fotokimyasal etkiler fototermal etkiye dönüşebilir (225).

### 2.5.6. Diyot Lazer

Dalga boyu 800-980 nm arasındadır. Sert yarı iletken lazerdir. Elektrik enerjisini ışık enerjisine dönüştürmek için Galyum, Arsenid, Alüminyum, İndiyum gibi elementlerin kombinasyonu kullanılır.

InGaAs (İndiyum-galyum-arsenid),

InGaAsP (İndiyum-galyum-arsenid-fosfor),

AlGaAs (Alüminyum-galyum-arsenid),

GaAs (Galyum-arsenid) tümüne Diyot lazerler adı verilir (36,124,138).

Diyot lazerlerin iletim sistemleri fiber optik kablolardır. Yumuşak doku cerrahisi için temaslı (kontakt) tipte, derin koagülasyon için temassız tipte kullanılırlar (59,60,114,181). Yüksek oranda hemoglobin ve diğer pigmentler tarafından absorbe edilir. Yumuşak doku cerrahisinde kullanımı tercih edilir (142).

Dişetin kesilmesi, pıhtılaştırılması, yumuşak doku küretajı ve sulkuler debridmanda kullanılır. Tedavi alanında kalın bir pıhtı tabakası oluşur. Kullanımı elektrokoterizasyona oldukça benzerdir. Diyet lazerin doku penetrasyonu Nd:YAG lazerden daha az iken, ısı oluşum oranı daha yüksektir (142).

Dental amaçlı kullanıma uygun mevcut dalga boyları, görünür olmayan noniyonize spektrumun yakın kızılötesi kısmındadır (36). Diyet lazerlerin dalga boyları 810-980 nm arasındadır ve pigmente (melanin, hemoglobin) yumuşak dokular tarafından emilimleri çok yüksektir. Diş ve kemik gibi sert dokularda emilimleri az olduğundan yumuşak doku cerrahisinde kullanılırlar (120). Diyet lazer dalga boylarının suda emilimi zayıftır (138).

Diyet lazerlerden AlGaAs'in dalga boyu 800-830 nm iken, InGaAs'in dalga boyu 980 nm'dir. 655nm dalga boyuna sahip Diyet lazer tipi de mevcuttur. Diyet lazerler, küçük ve portatif aletlerdir. 400 mikronluk fiber içeren kalem boyutunda el parçası ile kullanılırlar. Bazı Diyet lazerlerde ameliyat öncesi hazırlık gerekir. Hazırlık, ısı enerjisini fiber uçta yoğunlaştırma işlemi olup lazer çalıştırılırken fiber ucun artikülasyon kağıdına basitçe vurulması ile gerçekleştirilir. Ameliyat sonrası fiber ucun 2-3 mm'lik kısmı koparılarak yeni uç açığa çıkartılır. Diyet lazer ile yapılan cerrahi işlemlerde fiber uç dokuya hafifçe temas halinde tutulur. Eksizyon amacıyla uç nazikçe kayan fırça darbeleri şeklinde kullanılmalıdır. İyi bir aspirasyon, hafif yanık kokusunu azaltmada ve lazer dumanını ortadan kaldırmada önemlidir. İşlem sonrası dokular minimal kanamalı açık kahverengi renk almalıdır. Temaslı tipte kullanılmaları, hekime kolaylık sağlar (120).

Diyet lazerler, devamlı dalga veya atımlı dalga modunda kullanılabilirler. Atımlı tip, atımlar arası dokuda soğumaya izin verirken, devamlı tipte uygulamada termal relaksasyon oluşmaz, dokuda ısı birikimi artar. Daha fazla koagülasyon gereken durumlarda ya devamlı dalga yönteminde çalışılır, ya da atım süreleri uzatılarak dokudaki residüel ısı miktarı artırılır ve açık damarlar kapatılır (120).

Yumuşak doku cerrahisi dışında diş beyazlatma, çürük tespiti, sulkuler debridman, aftöz ülserlerin tedavisi, herpetik lezyonların tedavisi, periodontal cep ve

kök kanalı dezenfeksiyonu, biyostimülasyon gibi farklı kullanım alanları mevcuttur (36, 120,124,127,238).

Pigmentler tarafından absorbe edilen diyot lazerler, yumuşak dokularda düşük enerji seviyelerinde yüksek penetrasyonlarından dolayı yüzeysel ve derin doku biyostimülasyonunda etkilidirler. Diyot lazerler tüm DDLT işlemlerinde biyostimülasyon ve bakterisid etki amaçlı kullanılmaktadırlar (124).

Lazer uygulamaları; hücre bölünmesi ve kollajen liflerin artması, vaskülarizasyonun artması, esneme direncinin artması ve enzimatik değişikliklere neden olması sonucu deneysel ve klinik uygulamalarda yara ve kırık iyileşmesinin stimüle edilmesi ve analjezi sağlanması için kullanılmaktadır (201).

### **2.5.7. Düşük Doz Lazer Tedavisi (Biyostimülasyon)**

Lazer ışınının fototermal etkilerinin dışında bir diğer fotokimyasal etkisi düşük doz lazer tedavisi olarak da bilinen biyostimülasyondur. DDLT, düşük yoğunlukta kızıl ya da kızıl ötesi dalga boyuna sahip lazer ışınlarının  $10^{-2}$  ile  $10^0$  W/cm<sup>2</sup> güç yoğunluğunda ve  $10^{-2}$  ile  $10^2$  joule/cm<sup>2</sup> enerji yoğunluğunda kullanılması ile elde edilir (213).

Hücrel fonksiyonların stimülasyonu için lazerlerin kullanımına ‘düşük doz lazer tedavisi’ adı verilir. Spesifik dalga boyu ve enerji seviyesine sahip bu lazerler dokularda termal değişikliklere neden olmadan hücrenin biyokimyasal yapısını, proliferatif aktivitenin stimülasyonunu ya da inhibisyonunu etkilerler. Bu grupta kullanılan lazerlerin etki mekanizması lazerlerin fotokimyasal teorisi ile açıklanmaya çalışılır (25,33,235).

DDLT ile dokularda elde edilen biyolojik yararlar, antienflamatuar ve analjezik etki ile biyomodülasyondur. Farklı dokulara uygulandığı çalışmalarda DDLT’nin protein sentezine, hücrelerin büyüme, çoğalma ve farklılaşmalarına etki ettiği bildirilmiştir (213). Çalışmalarda, mitokondriyal sitokrom sisteminin veya endojen porforinlerin enerji absorbe eden kromoforlar olduğu iddia edilmiştir. DDLT’de lazer enerjisinin doku penetrasyonu 5-10mm’ye kadar çıkabilir, böylelikle hem yüzeysel hem derin yapılara etki edebilir (237).

Düşük doz lazerlerin kullanımı ile ağrının azaltılması, yara iyileşmesinin uyarılması veya bazı biyolojik süreçlerin değiştirilmesi akut patolojik olgularda kısa sürede gerçekleşirken, kronik olgularda olumlu cevap daha uzun sürede alınabilir (24).

DDLT, aft ve yumuşak dokuyaralarının iyileşmesinin hızlandırılmasında, TME rahatsızlıkları ve romatizmal artritlerin tedavisinde onkoloji hastalarında kemoterapiye ve radyoterapiye bağlı oluşan ülserasyonların ve oral mukozitlerin tedavisinde, sinir yaralanmalarında, tükürük bezlerinin hipofonksiyonları ve inflamatuvar rahatsızlıklarına bağlı hiposalivasyonların tedavisinde kullanılmaktadır (247).

Düşük doz lazer uygulamalarında çok düşük enerji kullanıldığı için, dokuda oluşan termal değişiklik 1°C'den azdır. Bu nedenle düşük doz lazerin etkileri nontermal etki olarak tanımlanır (119,209).

Biyostimülasyon amacıyla kullanılan lazerler, düşük dozda kullanılan He-Ne lazer ve Diyot lazerlerdir. Yüksek güç lazerlerin de (Er:YAG, CO<sub>2</sub>, Nd:YAG) odaklanmamış moda ve düşük güç yoğunluğunda çalıştırıldıklarında analjezik, antiinflamatuvar ve biyomodülan etkileri mevcuttur (36).

Düşük doz lazerin etkinliğini açıklamak için iki ayrı teori ortaya atılmıştır:

- Biyostimülasyon veya lazerin katalizlediği reaksiyonlar teorisi,
- Fotokimyasal teori (33).

Biyostimülasyon teorisine göre düşük doz lazer ile verilen elektromanyetik enerji, tüm hücre fonksiyonlarını stimüle ettiğinden düşük doz lazer cihazlarına biyostimülasyon cihazı adı da verilmektedir. Bu etki, hücrelerde hastalığa bağlı gelişen enerji düzeyi değişikliğinin lazer ile etkilenmesi sonucu, biyokimyasal ve proliferatif aktivitenin stimülasyonu veya inhibisyonu şeklinde olabilir. Fotokimyasal teoriye göre lazer ışınlarının absorpsiyonunu dokulardaki fotoreseptörler yapar. Lazerin neden olduğu etkilerin bu fotoreseptörlerin aktivasyonuna bağlı olduğu ileri sürülür (33,119).

Klinik uygulamalarda DDLT mekanizması ablasiv olmayıp stimulandır ve doz çok önemlidir. Enerji yoğunluğuna göre, 60 mJ/cm<sup>2</sup> altı sıfır biyoaktivasyon, 120-240 mJ/cm<sup>2</sup>

biyostimulasyon, 240-300 mJ/cm<sup>2</sup> sıfır biyoaktivasyon ve 300-600 mJ/cm<sup>2</sup> biyoinhibisyon etki yapmaktadır (Tablo 2.5-5) (172).

**Tablo 2.5-5: Düşük doz lazer tedavisi ile yara iyileşmesinin hızlandırılmasına ilişkin olası mekanizmalar (237)**

<b>Fibroblastlar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proliferasyon</li> <li>Olgunlaşma</li> <li>Hücre hareketlilik</li> <li>Miyofibroblastlara dönüşüm</li> <li>PGE<sub>2</sub> ve IL-1 salgılanmasında azalma</li> <li>FGF salgılanmasında artış</li> </ul>
<b>Makrofajlar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fagositoz</li> <li>Fibroblast büyüme faktörlerinin (FGF) salgılanması</li> <li>Fibrin rezorpsiyonu</li> </ul>
<b>Lenfositler</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aktivasyon</li> <li>Proliferasyon artışı</li> </ul>
<b>Epitel hücreleri</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hareketlilik</li> </ul>
<b>Endotel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Granülasyon dokusunda artış</li> <li>Damar düz kaslarının gevşemesi</li> </ul>
<b>Sinir dokusu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Enflamatuvar mediyatör maddelerin sentezinde azalma</li> <li>Olgunlaşma ve rejenerasyon</li> <li>Aksonal büyüme</li> </ul>

#### **A. Düşük Doz Lazerin Biyolojik Etkileri**

1. Kapiller kan akımı artar, arterial vazodilatasyon oluşur ve hücre metabolizması uyarılır.
2. Mitokondrial aktivite artar ve ATP üretimi hızlanır.
3. Hidrostatik ve interkapiller basınç artırılarak eksuda absorpsiyonu sağlanır.

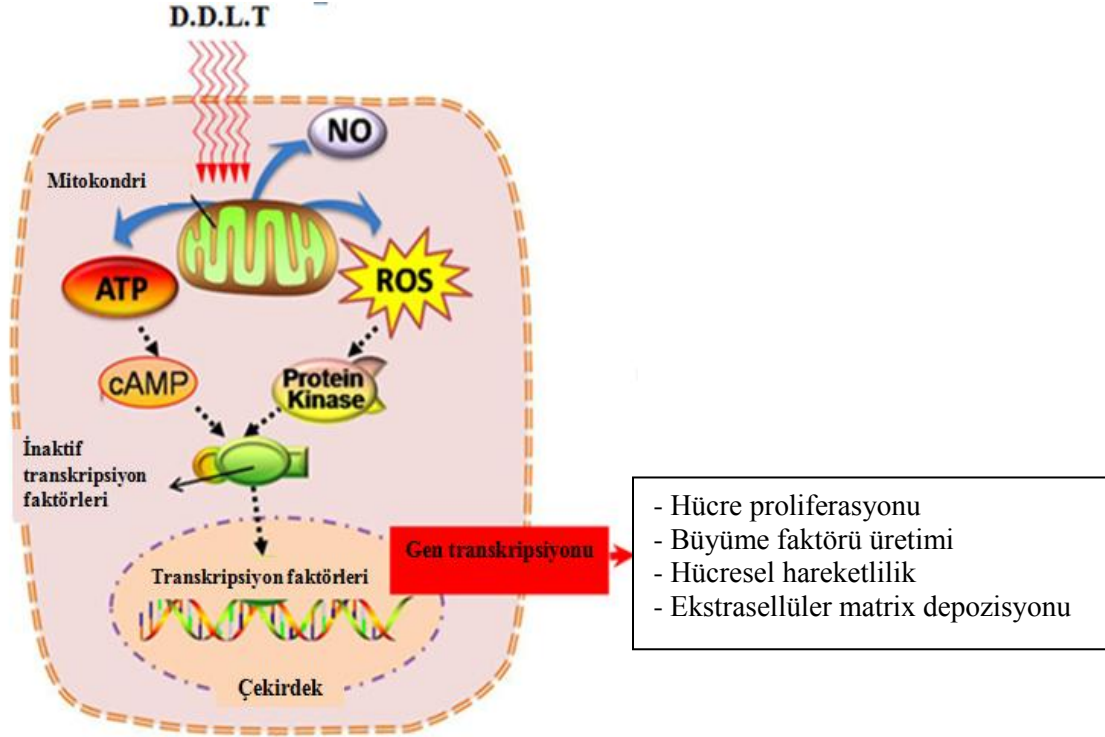
4. Antiinflamatuvar etki olarak kortizol seviyeleri artar.
5. Antibakteriyel etki oluşur.
6. Elektrolitlerin yer değişiminin uyarılmasıyla hücre metabolizmasında artış meydana gelir.
7. Antikor üretiminde artış görülür.
8. Hücresel düzeyde IL-1 $\beta$ , prostoglandin üretimi azalır, endorfin ve eukefalin salınımını artırarak analjezik etki oluşturur.
9. Kollajen oluşumu ve yaraların vaskülarizasyonu artar. Makrofajların stimülasyonunda, fibroblast aktivasyonunda, hücre zarı mekanizmasında değişiklikler, fagositik aktivitede artış görülür.
10. Hücresel aktiviteyi, yara epitelizasyonunu artırır.
11. Hasara uğramış optik ve periferik sinirlerin tamiri ve fonksiyonu hızlanır.
12. Kemik dokusunda osteoblast proliferasyonu ve kemik defektlerinin rejenerasyonunu artırır.
13. Miyofibroblastlarda dejeneratif değişiklik olmaksızın DNA sentezini artırma ve fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü hızlandırır (19,24,51,167,178,247).

## **B. Düşük Doz Lazerin Biyofiziksel Etkileri**

### **1. Analjezik ve antiinflamatuvar etki**

Analjezik etkilerin ortaya çıkışında bazı mekanizmaların rol aldığı sanılmaktadır. Bunlar:

- Anormal kasılmış kas lifleri depolarize ve repolarize olmaktadır.
- Kas arteriollerindeki spazm azalarak reaktif vazodilatasyon olmaktadır.
- Mitokondrilerin uyarılmasıyla transport ve metabolik süreçlerde değişiklikler meydana gelmektedir.
- ATP oluşumuyla enerji süreci aktive edilmektedir.
- Periferik sinir aktivitesini etkileyerek ağrı azaltıcı etkisi vardır.
- Kronik ağrı GaAs ve HeNe lazerlerle tedavi edildiğinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 2.5-6) (200).



**Şekil 2.5-6: DDLT hücre etkileşimi**

(ATP: Adenozin trifosfat. cAMP: Cyclic adenosine monophosphate. NO: Nitric oxide. ROS: Reaktif oksijen türleri)(<http://www.photobiology.info/Photomed.html>)

## 2. Biyostimulan Etki

Biyostimulasyon, canlı organizmanın kendi kendini tamir ve tedavi yeteneğinin uyarılması ve canlandırılmasıdır. Biyostimulasyon, lazerin doğrudan etkisi ve lazerin kullanılma tekniğine bağlı dolaylı olarak gelişen lenfatik drenaj etkisi sonucu olur. Lazerin etkisiyle hücre zarının geçirgenliği artar, hücrenin oksijen, glikoz ve aminoasit miktarı artar, hücre metabolizması hızlanır. Lokal kan akımı hızlanır. Hücre zarının aktif transport yapan enzimleri aktive olur. Sonuç olarak kollajen, elastin gibi büyük moleküllerin sentezi hızlanır (Tablo 2.5-6) (201).

## 3. Yara İyileştirici Etki

Düşük doz lazer uygulaması, açık yaraların iyileşmesinde bir takım regülasyon mekanizmalarını uyararak iş görür. Yara esnekliği, kollojen sentezi, germe dayanıklılığının artması fibroblastlarla ilgilidir ve epitelizasyon, epidermal hücrelerin proliferasyonuna bağlıdır. Düşük doz lazerin selektif olarak fibroblastları stimule ettiği

söylenbilir (10 J/cm<sup>2</sup>'nin altında uygulamalarda). Değişik kademedeki iyileşme sürecinde olan yaralara lazer uygulandığında, yaranın takiben ilk 10-14 günlük zamanda yaranın esneme kuvvetine sahip olduğu bildirilmiştir (Tablo 2.5-7) (200,201).

**Tablo 2.5-6: DDLT'nin farklı dalga boyunda biyostimulasyon etkisi (126)**

DALGA BOYU	ENERJİ YOĞUNLUĞU	ETKİSİ
540 nm ve 600-900 nm	0-56 J/cm <sup>2</sup>	Doz ve ışın sıklığına bağlı olarak fibroblast proliferasyonu
632.8 nm	2.4 J/cm <sup>2</sup>	Vazodilatasyon, mast hücre ekzositozu, hücrelerarası ödem ve hücre membranındaki porların açılması
632.8 nm	2.4 J/ cm <sup>2</sup>	Nötrofil fagositozunun artması
632.8 nm	2 J/ cm <sup>2</sup>	Fibroblast metabolik hızının iyileşmesi
632.8 ve 904 nm	0.25-4 J/cm <sup>2</sup>	Keratinosit proliferasyonunun artması
660, 820, 870, 880 nm	2.4 J/ cm <sup>2</sup>	Makrofaj yanıtının etkilenmesiyle fibroblast yanıtının uyarılması
660 nm	2.4-9.6 J/cm <sup>2</sup>	Makrofaj yanıt ve proliferasyonunun artması
820 nm	2.4-7.2 J/cm <sup>2</sup>	Makrofaj yanıt ve fibroblast proliferasyonunun artması
830 nm	10 J/ cm <sup>2</sup>	Fare deri fleplerinde angiogenezis ve geçirgenliyin artması
830 nm	10 J/ cm <sup>2</sup>	Nötrofillerin fagositik aktivitesinin artması
904 nm	76.4 J/ cm <sup>2</sup>	Ödem azalması, derin yaraların kapanma hızının artması

**Tablo 2.5-7: Diş hekimliğinde düşük doz lazer tedavisi uygulamalarında güncel durum (237)**

Tedavi etkinliği bilinen	Kesin olmayan	Etkinliği olmayan
Yara iyileşmesi Aftöz stomatit Pulpotomi Mukozit Sinir rejenerasyonu Post herpetik nevrалji	Sinovit Artrit TME rahatsızlıkları Akut abse Periapikal granülom Kronik orofasiyal ağrı Diş çekimi sonrası ağrı Kemik rejenerasyonu	Gingivitis Alveolit HSV ülserleri Periodontitis Perikoronitis Akut sinüzit Dental plak oluşumu

### 2.5.8. Lazerin Uygulama Şekilleri

**1.Izgara (Grid) Tekniği:** Yara iyileşmesinde kullanılır. Açık yara varsa, üzeri steril bir kağıtla örtülür. Tedavi alanı ufak kare şeklinde bölümlere ayrılır. Hedeflenen alana lazer probu hafifçe değdirilerek basınç uygulamadan ışınlama yapılır.

**2.Tarama (Scanning) Tekniği:** Lazer probu hedeflenen alana temas ettirilmeden ışınlama yapılır. Prob ile doku arasında 5-10 mm uzaklık olur, mesafenin 1 cm'yi geçmemesi önerilir (60,200).

**Bölgesel Işınlama:** En yaygın kullanım alanı lokal ağrılı sendromlardır. Noktasal olarak ağrılı bölgeler tespit edilir ve dik ışınlama yapılır (95,200).

**Stimulasyon Tedavisi:** Çok ince bir lazer ışını demetiyle bazı noktaların uyarılması şeklinde yapılan tedavidir. Ağrı tedavisinde motor noktalar ya da akupunktur noktalarına stimulasyon yapılabilir. Fizyolojik disfonksiyonun olduğu alana direkt olarak uygulanması en basit tekniktir (95,201).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tezin hücre kültürü çalışmaları, Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüleri ve lazer uygulamaları Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü laboratuvarında, genetik bölümü ise İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde gerçekleştirildi.

#### 3.1. GEREÇLER

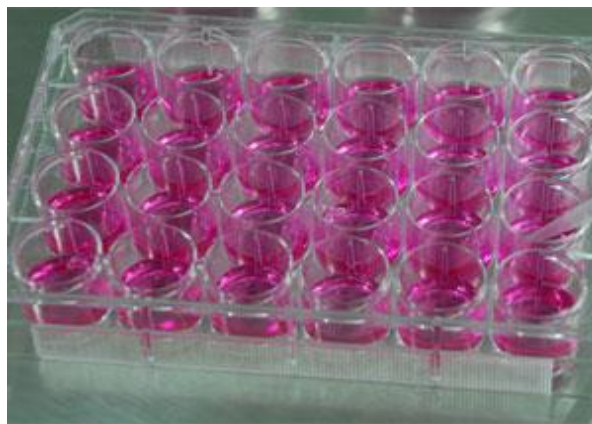
Çalışmamızda sistemik sağlık problemi olmayan hastalarımızın, gömük yirmi yaş dişlerinin cerrahi çekiminden sonra eksize edilen ve atık madde olarak kabul edilen dişeti örnekleri fibroblast kültürü için kullanıldı.

- Zoledronik asit (Zometa, Novartis Sağlık, Gıda ve Tarım Ürünleri San. Tic. A.Ş.)
- Fetal bovine serum
- Penisilin/Streptomisin/Amphoteresin
- Serolojik pipet 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml
- Pipet uçları 1 ml, 20 µl, 100 µl, 200 µl
- 6 kuyucuklu steril doku kültür kapları
- Trypsin-0.5%-EDTA
- Pipet uçları 1 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl
- Eliza Plaka Okuyucu (Bio-Tek ELx800, ABD)
- Hücrelerin morfolojik değerlendirilmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (EvoSeries, Carl Zeiss, Almanya)
- WST-1 Hücre proliferasyon kiti (Roche)
- Ethanol
- Glutaraldehit
- Paraformaldehit
- Sodyum kakodilat
- Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (Şekil 3.1-1)
- α-MEM
- 24 kuyucuklu steril doku kültür kapları (Şekil 3.1-2)

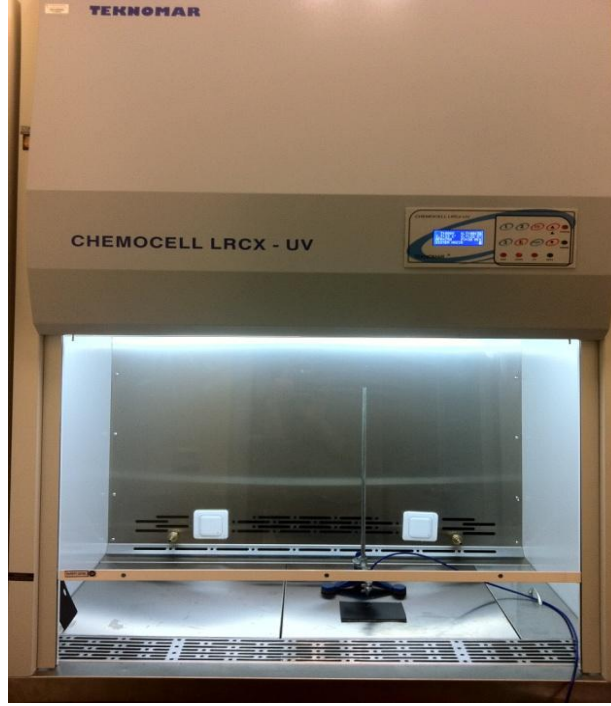
- 96 kuyucuklu steril doku kültür kapları
- Teknomar CHEMOCELL LRC X UV laminar akışlı steril hava kabini (Şekil 3.1-3)
- Lazer uygulaması için Gigaa GBOX-15A/B Diyot lazer (Wuhan, China) (Şekil 3.1-4)
- Ambion PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies)
- RT2 HT First Strand Kit 96 (Roche)
- qPCR GreenMaster ile UNG/lowROX (Jena Bioscience) (PCR-306S )
- Primerler: Kollajen tip I, MMP 3, MMP-9, GAPDH
- V-FITC apoptoz belirleme kiti (BioVision, Mountain View, CA) kullanıldı.



Şekil 3.1-1: Temel besiyeri ve fetal bovin serum



Şekil 3.1-2: 24 kuyucuklu hücre kültür kapları



Şekil 3.1-3: Laminar akışlı steril hava kabini

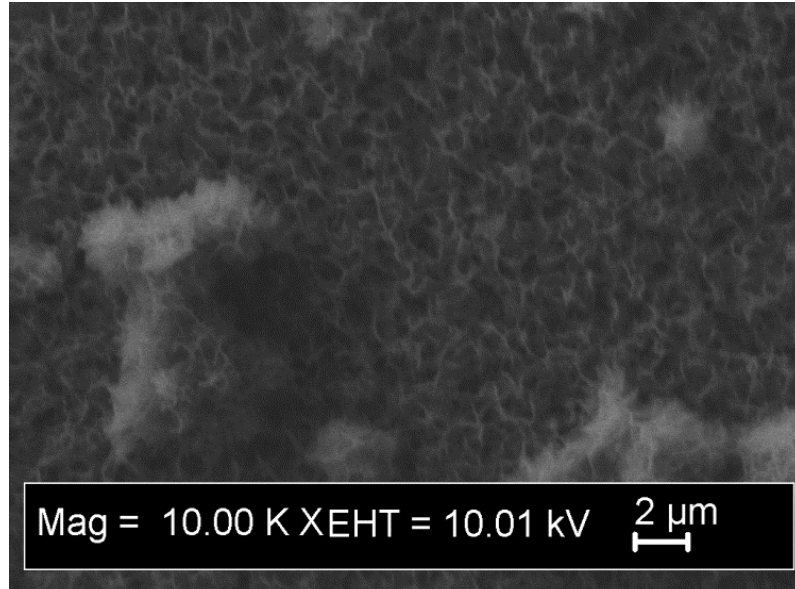


Şekil 3.1-4: Diyot lazer cihazı (Gigaa GBOX-15A/B Diyot lazer, Wuhan, China)

## 3.2. YÖNTEM

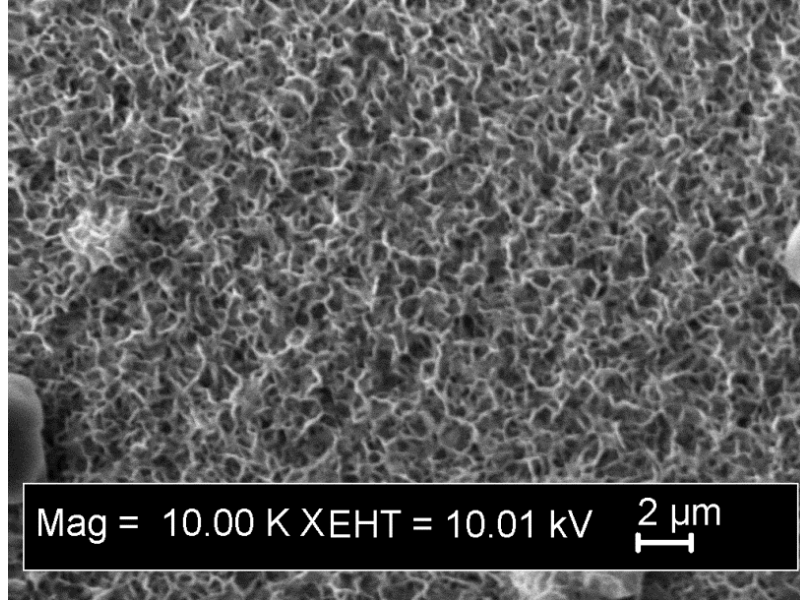
### 3.2.1. Kültür kuyucuklarının hazırlanması

Kültür kuyucuklarının kalsiyum fosfat (CaP) ile kaplanması iki aşamalı biyomimetik kaplama metodu ile gerçekleştirildi. İlk aşamada, beş kat simüle edilmiş vücut sıvısı (SBFx5) NaCl (40 g), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1,84 g), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (1,52 g), NaHCO<sub>3</sub> (1,76g) ve Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O (0,89 g) tuzlarını 1000 ml demineralize su içinde sürekli karbon dioksit gazı desteğinde (pH 5,8) ve sabit 250 rpm karıştırma hızında çözerek elde edildi. Bu yüksek doygunluktaki SBFx5 çözeltisinden her bir kuyucuğa 1 ml eklenerek 37 ° C’de 24 saat kuyucuk tabanında bir ön kaplama oluşturuldu. Böylece oluşacak 2-3 µm kalınlığa sahip amorf CaP tabakasının, bir sonraki kaplama aşamasında çökmeyi kolaylaştırması sağlandı. Kuyucuklar daha sonra 15 dakika demineralize su ile sonike edildi. İkinci aşamada, süpersatüre kalsiyum fosfat çözeltisi (SCS) NaCl, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ve Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O tuzları (Mg<sup>2+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup> iyonları olmadan) demineralize suda çözülerek ve TRIS ve 1M HCl ile pH 7.4’ de tamponlanarak elde edildi. Bu SCS çözeltisinden 1 ml kuyucuklara eklenerek ve 37 ° C’de 48 saat bekletilerek kuyucuk tabanında bir ikinci kaplama oluşturuldu. İlk 24 saatin sonunda çözelti bir defaya mahsus olarak değiştirildi. Böylece kültür kuyucuğunun tabanı 20-50 µm kalınlığında biyomimetik oktakalsiyum fosfat tabakası ile kaplandı (Şekil 3.2-1).



Şekil 3.2-1: CaP kaplı yüzeyin TEM görüntüsü (x10000 büyütme)

Kültür öncesinde CaP kaplı kültür kuyucukları, literatürde bildirildiği üzere (6) 30  $\mu\text{M}$  ZA içeren veya içermeyen fosfat tamponlu salin (PBS) ile 2 saat inkübe edildi. Bağlanmamış ZA'yı uzaklaştırmak için kuyucuklar üç defa kültür medyumu ile yıkandı. Böylece ZA içeren ve içermeyen test grupları oluşturuldu (Şekil 3.2-2).



Şekil 3.2-2: ZA absorbe edilmiş CaP yüzeyin TEM görüntüsü (x10000 büyütme)

### 3.2.2. Kaplama özelliklerinin belirlenmesi

Kuyucuk tabanı, kültür kabından bir makas vasıtasıyla kesilerek çıkartıldı ve kaplama morfolojisi, CaP kristal yapısı gibi özellikler TEM ile görüntülenerek belirlendi (Şekil 3.2-1,2).

### 3.2.3. Gingival fibroblast kültürü

Fibroblast kültürü için, sağlıklı bireylerden yirmi yaş dişi operasyonu sırasında eksize edilen ve atık madde olarak kabul edilen dişeti örnekleri toplandı. Çalışma, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik yönden uygun bulundu (Etik Kurul dosya no: 2011/826-576). Elde edilen yumuşak dokular keskin bir bistüri vasıtasıyla 60 mm'lik kültür kaplarında ufak parçalara ayrılarak 37° C'de eksplant kültüre alındı. Kültür medyumu olarak

Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM), %10 Fetal Bovin Serum (FBS) ve 100 ünite/ml penisilin-streptomisin kullanıldı. Hücreler kültür kabının tabanında % 80'lik bir kaplama gösterdiklerinde subkültüre devam edildi. Pasajlama işlemleri sırasında 625 µg/ml tripsin solüsyonu ile hücreler flasktan ayrılarak kültüre devam edildi. Beşinci pasaj hücreleri kalsiyum fosfat kaplı yüzeylerde kültüre alındı.

### **3.2.4. Absorbe ZA taşıyan CaP'ın fibroblast aktivitesi üzerine etkisi (Pilot çalışma)**

Kalsiyum fosfat kaplı yüzeylere 10 µM, 30 µM, 100 µM ve 300 µM dozlarda ZA absorbe edilerek farklı pilot gruplar oluşturuldu. Yeterli sayıda hücreye ulaşıldığında,  $3 \times 10^5$  adet hücre 24 kuyucuklu kültür kaplarının farklı ZA konsantrasyonları içeren kuyucuklarına ekildi ve 37 ° C 'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Bu pilot çalışma sonunda, fibroblastların birinci gün çoğalmalarına ve ZA'nın sitotoksik etkisine göre WST-1 hücre canlılığı testleri eşliğinde devam eden deneylerde ZA'nın hangi konsantrasyonda CaP tabakasına uygulanacağına karar verildi.

### **3.2.5. Araştırma grupları**

Kalsiyum fosfat ile kaplanan kültür kuyucukları dört farklı grup oluşacak şekilde farklı işlemlere tabi tutuldu.

Grup 1: Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen ve DDLT uygulanmayan kontrol grubu

Grup 2: Fibroblast kültür ortamında 30 µM ZA içeren DDLT uygulanmayan deney grubu

Grup 3: Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen, 810 nm dalga boyunda, 0.4 W gücünde, 2. gün 75 sn, 3. gün 150 sn, 4. gün 300 sn DDLT uygulanan deney grubu

Grup 4: Fibroblast kültür ortamında 30 µM ZA içeren, 810 nm dalga boyunda, 0.4 W gücünde, 2. gün 75 sn, 3. gün 150 sn, 4. gün 300 sn DDLT uygulanan deney grubu

### **3.2.6. Düşük düzeyli laser tedavisi (DDLTL)**

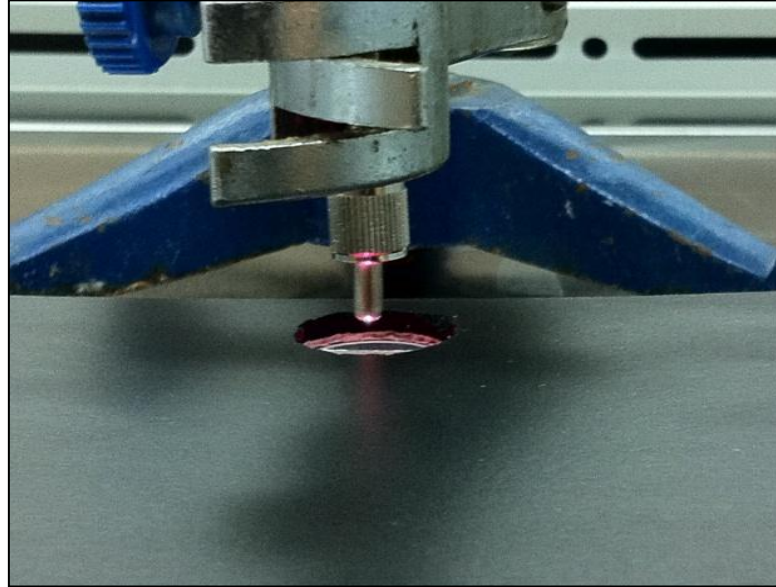
810 nm dalga boyunda, 600 µm çaplı fiber uç içeren (Gigaa GBOX-15A/B Diyot lazer, Wuhan, China) 0.4 W'a kadar ayarlanabilir güç çıkışı olan Ga-As diyot

lazer ile ışınlama, 24 saatte bir olmak üzere sürekli dalga modunda 3 gün kültür kuyucuklarına uygulandı. Uygulama sürecinde lazer piyasemeninin 1.5 mm kalınlığında fiber ucu bir tutucu ile 9 mm lik mesafeye sabitlendi. Piyasemenin sabitlenmesi sayesinde hücreler ile piyasemen arası mesafesinin her bir kuyucuk için eşitlenmesi sağlandı. Çevre kuyucuklara ışığın yansımalarını engellemek amacıyla steril edilmiş ve yalnız lazer uygulanacak kuyucuğun yüzey alanı kadar bir dairesel deliği olan siyah bir yüzey hazırlandı. Böylece lazerin yalnız tek bir kuyucuğa ulaşması ve olası ışın saçılmasının engellenmesi hedeflendi. Işın çapı 1 cm olarak ayarlandı ve hücrelere 0.4 W ışınlama gücü uygulandı (Şekil 3.2-3). 0.4 W'lık güç bütün deneyler boyunca sabit tutuldu. Bu değerın literatürde hücrelerin biostimülasyonu için optimal olduğu kabul edilmektedir. Işınlama 3. ve 4. grupta her kuyucuğa

2. gün  $0.4 \text{ W} \times 75 \text{ sn} = 30 \text{ J}$

3. gün  $0.4 \text{ W} \times 150 \text{ sn} = 60 \text{ J}$

4. gün  $0.4 \text{ W} \times 300 \text{ sn} = 120 \text{ J}$  enerji olarak uygulandı (119).



**Şekil 3.2-3: Laminar hava akımlı kabinde yalnız lazer uygulanacak kuyucuğu açıkta bırakan siyah zemin ile 9 mm'ye sabitlenmiş lazer uygulaması**

### 3.2.7. WST-1 yöntemi ile kültür ortamında ZA ve DDLT'nin gingival fibroblast hücre canlılığı ve proliferasyonuna etkisinin incelenmesi

Canlı hücre sayısını belirlemek ve sitotoksiteyi saptamak amacıyla WST-1 kiti kullanılmaktadır. Hücreler, %10 FBS eklenmiş medyumda, CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C sıcaklıkta kültüre edildi. Hücreler 5x10<sup>4</sup> hücre/ml olacak şekilde seyreltilip, 24 kuyucuklu kültür kabının son iki sütunu hariç her bir kuyucuğa 1000 µl eklendi. Her bir konsantrasyon için üç kopya kuyucuk kullanıldı ve tüm zaman aralıklarında üçlü olarak tekrarlandı. İki, üç ve dört günlük inkübasyon sürelerini takiben, hücreler PBS ile üç kez yıkandı. WST-1 (Roche, USA) testi üreticinin talimatı doğrultusunda uygulandı. Her bir kuyucuğa WST-1 proliferasyon reaktörü (5µl WST1 ve 45µl medyum) eklenip, 37°C'de 2 saat süresince enkübe edildi (plaklar alüminyum folyo ile kaplandı). Enkübasyonun ardından, optik dansiteler 490 nm ELISA plak okuyucu ile değerlendirildi (Bio-Tek ELx800, USA) (Şekil 3.2-4).

Canlılık yüzdesi (%) = İşleme tabi tutulmuş hücrelerin ortalama absorpsiyonu / İşlem uygulanmamış hücrelerin ortalama absorpsiyonu x 100



Şekil 3.2-4: Elisa Plaka Okuyucu

### 3.2.8. RNA izolasyonu ve real time PCR analizi

Kültürün 48 ve 96 'ncı saatlerinde RNA, kültür kuyucuklarından Ambion PureLink® RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) standard protokollerine göre çıkarıldı. RNA kalitesi ve miktarı nanodrop ile ölçüldü. Komplementer DNA (cDNA), RT2 HT First Strand Kit 96 (Roche) kullanılarak yüksek kaliteli 5 ng RNA'dan

sentezlendi. 2 ul cDNA eklenerek qPCR GreenMaster ile UNG/lowROX (Jena Bioscience) (PCR-306S ) kiti kullanılarak Stratagene Mx3005P cihazı ile real time PCR gerçekleştirildi. H<sub>2</sub>O negatif kontrol olarak kullanılırken, GAPDH döngünün normalizasyonu için seçildi. Kollajen Tip I, MMP 3, MMP 9 ekspresyonları değerlendirildi (Tablo 3.2-1).

**Tablo 3.2-1: Ekspresyonu değerlendirilen genlerin ileri ve geri primer dizilimleri**

Gen	İleri Primer	Geri Primer	Isı (°C)	cDNA boyutu (bp)	Genomik DNA (bp)
MMP-3	5'-GGCTTCCCAAGCAAATAGC-3'	5'-GTGCCCATATTGTGCCTTCT-3'	57	205	1276
MMP-9	5'-GAACCAATCTCACCGACAGG-3'	5'-GCCACCCGAGTGTAACCATA-3'	59	67	868
KOL1A1	5'-CCCCAGCCACAAAGAGTCTA-3'	5'-CTGTACGCAGGTGATTGGTG-3'	59	164	1627
GAPDH	5'-GAGTCAACGGATTGGTCGT-3'	5'-GACAAGCTCCCGTTCTCAG-3'	59	185	185

### 3.2.9. Hücre apoptozunun değerlendirilmesi

Bütün deney gruplarındaki apoptotik hücreler, annexin V-FITC apoptoz belirleme kiti (BioVision, Mountain View, CA) ile boyanarak belirlendi. Özetle, hücreler 3 kere PBS ile yıkandı ve annexin V-FITC ve propidyum iyodid (PI) ile 5 dk. oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Annexin V-FITC bağlanması, FITC sinyal dedektörü FL1 ve fikoeritrin emisyon sinyal dedektörü FL2 ile PI boyaması yapılarak FACScan sitometre kullanılarak gerçekleştirildi. Histogramlar, FITC boyanmış propidyum iyodide-negatif hücreleri gösterecektir.

### 3.2.10. Hücre morfolojisinin değerlendirilmesi

Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) (Evo Series, Carl Zeiss, Almanya) kullanılarak, hücrelerin morfolojisi ve sitoskeletsel yapısı üzerine ZA'nın etkisi

değerlendirildi (Şekil 3.2-5). 24 ve 96 saatlik inkübasyon periyotları sonunda 4° C’de % 2.5 glutaraldehit, % 2 paraformaldehit ve 0.1 M sodyum kakodilat tampon çözeltisinde (pH 7.4) bir gece boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonrası örnekler PBS ile yıkandı ve 0.1 M sodyum kakodilat tampon çözeltisinde (pH 7.4) -4° C’de saklandı. Elektron mikroskopunda görüntülenmeden önce deiyonize su ile temizlendi ve kurutuldu. Son olarak yüzeyler, taramalı elektron mikroskobu görüntülemesi için altın ile kaplandı ve kaplama cihazı 20 mA akımda ve 0.05 mbar basınçta 20 saniye boyunca 10 nm altın tabakası oluşturulması için ayarlandı.



**Şekil 3.2-5: Taramalı Elektron Mikroskobu** (Evo Series, Carl Zeiss, Almanya)

### 3.2.11. İstatiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 Statistical Software (Utah, USA) paket programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma) yanı sıra çoklu grupların tekrarlayan ölçümlerinde Friedman testi, gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi, alt grup karşılaştırmalarında Dunn’s çoklu karşılaştırma testi, 48 ve 96 saat karşılaştırmasında Wilcoxon testi kullanılmıştır. Sonuçlar, anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. WST-1 yöntemi ile kültür ortamında ZA ve DDLT'nin gingival fibroblast hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi

WST-1 yöntemi ile gingival fibroblast hücrelerinin proliferasyonu ve canlılığı incelendiğinde fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen ve DDLT uygulanmayan kontrol grubunda (Grup 1) elde edilen WST-1 değerlerinin 2., 3. ve 4. gün değerleri arasında azalma yönünde saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,882$ ) (Tablo 4.1-1) (Şekil 4.1-1).

WST-1 yöntemi ile gingival fibroblast hücrelerinin proliferasyonu ve canlılığının incelendiği fibroblast kültür ortamında 30  $\mu\text{M}$  ZA içeren DDLT uygulanmayan deney grubunda (Grup 2) 2., 3. ve 4. günlerde gingival fibroblast hücre sayılarında saptanan ciddi azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,0001$ ) (Tablo 4.1-1) (Şekil 4.1-1).

WST-1 yöntemi ile gingival fibroblast hücrelerinin proliferasyonu ve canlılığının incelendiği fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen, 810 nm dalga boyunda, 0.4 Watt gücünde, 2. gün 75 sn, 3. gün 150 sn, 4. gün 300 sn DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 3) 2., 3. ve 4. günlerde gingival fibroblast hücre sayılarında saptanan azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,417$ ) (Tablo 4.1-1) (Şekil 4.1-1).

WST-1 yöntemi ile gingival fibroblast hücrelerinin proliferasyonu ve canlılığının incelendiği fibroblast kültür ortamında 30  $\mu\text{M}$  ZA içeren, 810 nm dalga boyunda, 0.4 Watt gücünde, 2. gün 75 sn, 3. gün 150 sn, 4. gün 300 sn DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 4) 2., 3. ve 4. günlerde gingival fibroblast hücre sayılarında ciddi azalma görülmüştür. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,0001$ ) (Tablo 4.1-1) (Şekil 4.1-1).

**Tablo 4.1-1: WST-1 yöntemi ile gingival fibroblast hücre proliferasyonunun sayısal değerlerinin karşılaştırılması**

<b>WST-1</b>	<b>2.Gün</b>	<b>3.Gün</b>	<b>4.Gün</b>	<b>p</b>
<b>Grup 1</b>	0,654±0,071	0,633±0,043	0,599±0,106	0,882
<b>Grup 2</b>	2,121±0,301	1,024±0,104	0,653±0,119	<b>0,0001</b>
<b>Grup 3</b>	0,719±0,065	0,559±0,189	0,538±0,23	0,417
<b>Grup 4</b>	2,205±0,214	0,942±0,178	0,505±0,158	<b>0,0001</b>
<b>p</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	0,265	

Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'ün 2. gün WST-1 değerleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0,0001$ ) (Tablo 4.1-1) (Şekil 4.1-2). Kontrol grubunun 2. gün WST-1 değerleri grup 2 ve grup 4'den istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken ( $p=0,001$ ,  $p=0,001$ ), grup 3 ile aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p=0,248$ ). Grup 3'ün 2. gün WST-1 değerleri grup 2 ve grup 4'den istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ( $p=0,001$ ), grup 2 ile grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p=0,753$ ) (Tablo 4.1-2) (Şekil 4.1-2).

Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'ün 3. gün WST-1 ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0,0001$ ) (Tablo 4.1-1) (Şekil 4.1-2). Kontrol grubunun WST-1 ortalama değerleri grup 2 ve grup 4'den istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ( $p=0,001$ ,  $p=0,001$ ), grup 3'ün WST-1 değerleri grup 2 ve grup 4'den istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ( $p=0,001$ ,  $p=0,005$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.1-2) (Şekil 4.1-2).

Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'ün 4. gün WST-1 ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p=0,265$ ) (Tablo 4.1-1) (Şekil 4.1-2).

**Tablo 4.1-2: WST-1 yöntemi ile gruplar arasında gingival fibroblast hücre proliferasyonunun karşılaştırılması**

<b>Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi</b>	<b>2.Gün</b>	<b>3.Gün</b>
<b>Grup 1/Grup 2</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<b>Grup 1/Grup 3</b>	0,248	0,753
<b>Grup 1/Grup 4</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<b>Grup 2/Grup 3</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<b>Grup 2/Grup 4</b>	0,753	0,345
<b>Grup 3/Grup 4</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>

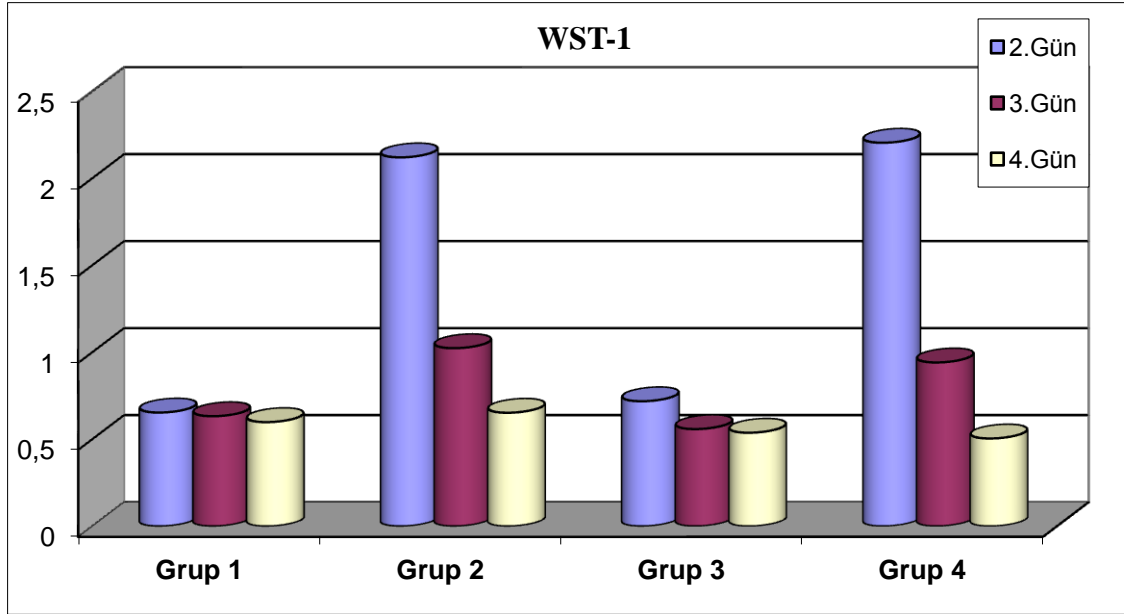
Fibroblast kültür ortamında 30  $\mu$ M ZA içeren, DDLT uygulanmayan deney grubunun (Grup 2) 2. gün WST-1 ortalama değerleri 3. gün ve 4. gün WST-1 ortalama değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,021$ ,  $p=0,012$ ). Aynı deney grubunun 3. gün WST-1 ortalama değerleri 4. gün WST-1 ortalama değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,014$ ) (Tablo 4.1-3) (Şekil 4.1-1).

Fibroblast kültür ortamında 30  $\mu$ M ZA içeren, 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunun (Grup 4) 2. gün WST-1 ortalama değerleri 3. gün ve 4. gün WST-1 ortalama değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,033$ ,  $p=0,011$ ). Aynı deney grubunun 3. gün WST-1 ortalama değerleri 4. gün WST-1 ortalama değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,038$ ) (Tablo 4.1-3) (Şekil 4.1-1).

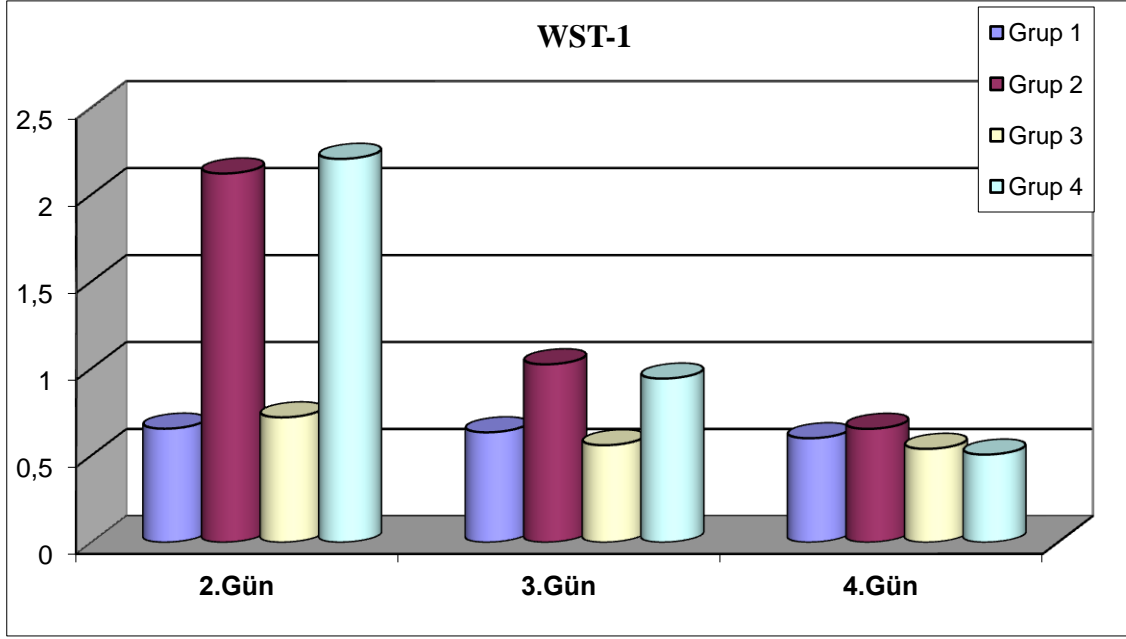
Grup 1 ve grup 3'ün WST-1 ortalama değerlerinin 2.,3. ve 4. gün ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmediğinden günler arası karşılaştırma yapılmamıştır.

**Tablo 4.1-3: WST-1 yöntemi ile gruplar arasında gingival fibroblast hücre proliferasyonunun gün ve gruba göre karşılaştırılması**

Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi	Grup 2	Grup 4
2.Gün / 3.Gün	0,021	0,033
2.Gün /4.Gün	0,012	0,011
3.Gün / 4.gün	0,014	0,038



**Şekil 4.1-1: WST-1'in gruplara göre 2.-3.-4. günde gingival fibroblastlara etkisinin karşılaştırması**



**Şekil 4.1-2: WST-1'in 2.-3.-4. günde gruplara göre gingival fibroblastlara etkisinin karşılaştırılması**

#### **4.2. ZA ve DDLT'nin Kollajen Tip 1 Sentezi Üzerine Etkisi**

Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen ve DDLT uygulanmayan kontrol grubunda (Grup 1) 48 ve 96 saat diliminde kollajen Tip 1 sentezi incelendiğinde, ilerleyen saatte hafif azalma yönünde değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,513$ ) (Tablo 4.2-1) (Şekil 4.2-1).

Fibroblast kültür ortamında 30  $\mu\text{M}$  ZA içeren DDLT uygulanmayan deney grubunda (Grup 2) 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde kollajen Tip 1 sayısında azalma olduğu görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,002$ ) (Tablo 4.2-1) (Şekil 4.2-1).

Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 3) 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde kollajen Tip 1 sayısında azalma görülmüş fakat sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,448$ ) (Tablo 4.2-1) (Şekil 4.2-1).

Fibroblast kültür ortamında 30 µM ZA içeren, 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 4) 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde kollajen Tip 1 sayısında ciddi azalma görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,047) (Tablo 4.2-1) (Şekil 4.2-1).

**Tablo 4.2-1: 48 ve 96 saat diliminde gruplar arasında kollajen Tip 1 sayısal değerlerinin karşılaştırılması**

Kollajen Tip 1	48 Saat		96 Saat		p
	Ort±SS	Median (IQR)	Ort±SS	Median (IQR)	
<b>Grup 1</b>	2,36±1,16	2,06 (1,38-3,64)	2,34±0,19	2,43 (2,12-2,47)	0,513
<b>Grup 2</b>	4,86±0,64	4,54 (4,45-5,59)	1,21±0,09	1,26 (1,1-1,27)	<b>0,002</b>
<b>Grup 3</b>	4,83±1,41	5,48 (3,21-5,79)	3,68±2,53	2,66 (1,82-6,56)	0,448
<b>Grup 4</b>	8,13±2,04	7,33 (6,61-10,44)	2,05±1,68	1,4 (0,8-3,96)	<b>0,047</b>
<b>p</b>	<b>0,007</b>		0,321		

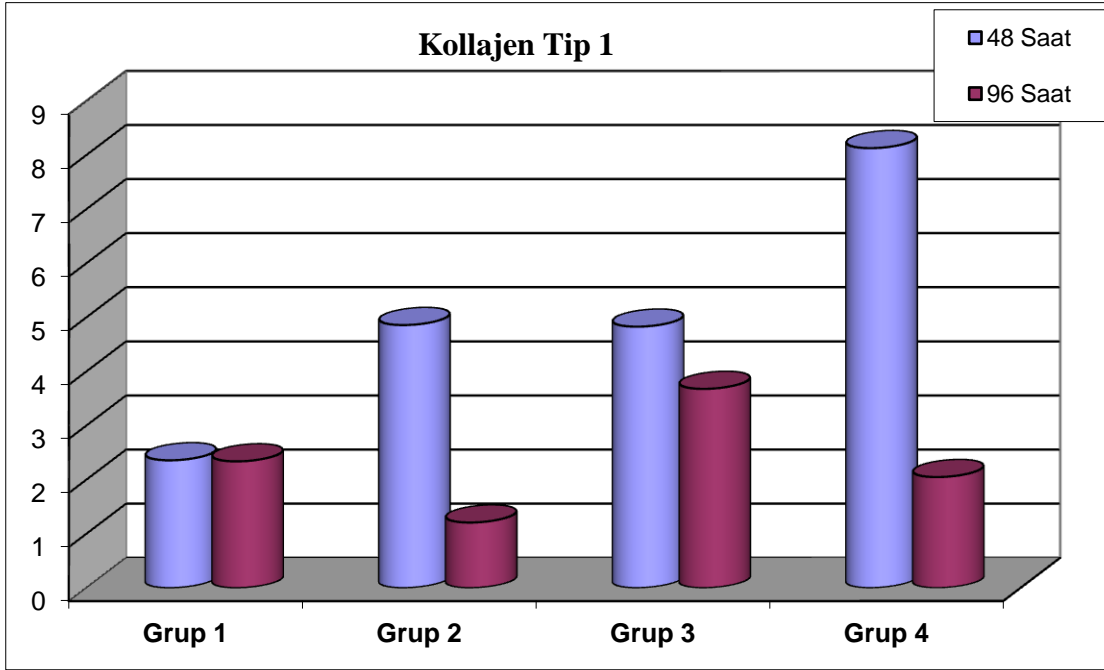
**Tablo 4.2-2: Gruplara göre 48 ve 96 saat diliminde kollajen Tip 1 sayısal değerlerinin karşılaştırılması**

Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi	48 Saat
<b>Grup 1/Grup 2</b>	0,207
<b>Grup 1/Grup 3</b>	0,216
<b>Grup 1/Grup 4</b>	<b>0,004</b>
<b>Grup 2/Grup 3</b>	0,998
<b>Grup 2/Grup 4</b>	0,082
<b>Grup 3/Grup 4</b>	0,079

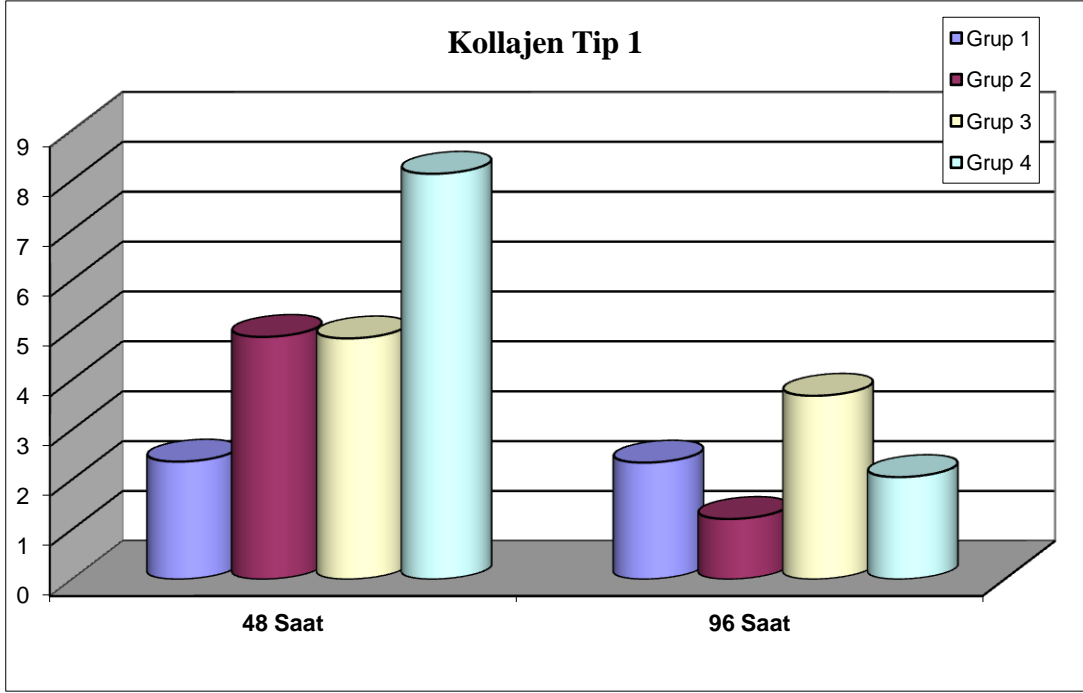
Kollajen Tip 1 miktarının 48 saat sonunda gruplar arası ortalama değerleri karşılaştırıldığında grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'ün değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,007) (Tablo 4.2-1) (Şekil 4.2-2). Kontrol grubunun 48 saat sonunda elde edilen kollajen Tip 1 ortalama değerleri grup 2 ve grup 3'ün kollajen Tip 1 ortalama değerlerinden istatistiksel olarak anlamsız, grup 4'ün

kollajen Tip 1 ortalama değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ( $p=0,207$ ,  $p=0,216$ ,  $p=0,004$ ), diğer gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p=0,998$ ,  $p=0,082$ ,  $p=0,079$ ) (Tablo 4.2-2) (Şekil 4.2-2).

96 saat sonunda gruplar arasında kollajen Tip 1 miktarında fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p=0,321$ ) (Tablo 4.2-2) (Şekil 4.2-2).



**Şekil 4.2-1: Gruplara göre 48 ve 96 saat diliminde kollajen Tip 1 değişiminin karşılaştırması**



**Şekil 4.2-2: 48 ve 96 saat diliminde gruplar arasında kollajen Tip 1 değişiminin karşılaştırması**

#### 4.3. ZA ve DDLT'nin MMP3 Sentezi Üzerine Etkisi

Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen ve DDLT uygulanmayan kontrol grubunda (Grup 1) 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde MMP3 miktarında görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,026$ ) (Tablo 4.3-1) (Şekil 4.3-1).

Fibroblast kültür ortamında 30  $\mu$ M ZA içeren DDLT uygulanmayan deney grubunda (Grup 2) 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde MMP3 miktarında az miktarda artış görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,127$ ) (Tablo 4.3-1) (Şekil 4.3-1).

Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 3) 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde MMP3 miktarında az miktarda artış görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,119$ ) (Tablo 4.3-1) (Şekil 4.3-1).

Fibroblast kültür ortamında 30 µM ZA içeren, 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 4) 48 ve 96 saat dilimi incelendiğinde MMP3 miktarında ciddi artış görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,047) (Tablo 4.3-1) (Şekil 4.3-1).

**Tablo 4.3-1: 48 ve 96 saat diliminde gruplar arasında MMP3 sayısal değerlerinin karşılaştırması**

MMP3	48 Saat		96 Saat		p
	Ort±SS	Median (IQR)	Ort±SS	Median (IQR)	
<b>Grup 1</b>	0,07±0,02	0,08 (0,05-0,08)	0,01±0	0,01 (0-0,01)	<b>0,026</b>
<b>Grup 2</b>	0,1±0	0,1 (0,09-0,1)	0,27±0,15	0,34 (0,1-0,36)	0,127
<b>Grup 3</b>	0,12±0,01	0,12 (0,1-0,13)	0,23±0,08	0,25 (0,15-0,29)	0,119
<b>Grup 4</b>	0,22±0,03	0,22 (0,19-0,26)	0,55±0,2	0,63 (0,33-0,7)	<b>0,047</b>
<b>p</b>	<b>0,001</b>		<b>0,026</b>		

**Tablo 4.3-2: Gruplara göre 48 ve 96 saat diliminde MMP3 sayısal değerlerinin karşılaştırılması**

Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi	48 Saat	96 Saat
<b>Grup 1 / Grup 2</b>	0,308	0,137
<b>Grup 1 / Grup 3</b>	0,055	0,224
<b>Grup 1 / Grup 4</b>	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>
<b>Grup 2 / Grup 3</b>	0,613	0,983
<b>Grup 2 / Grup 4</b>	<b>0,001</b>	0,103
<b>Grup 3 / Grup 4</b>	<b>0,001</b>	0,062

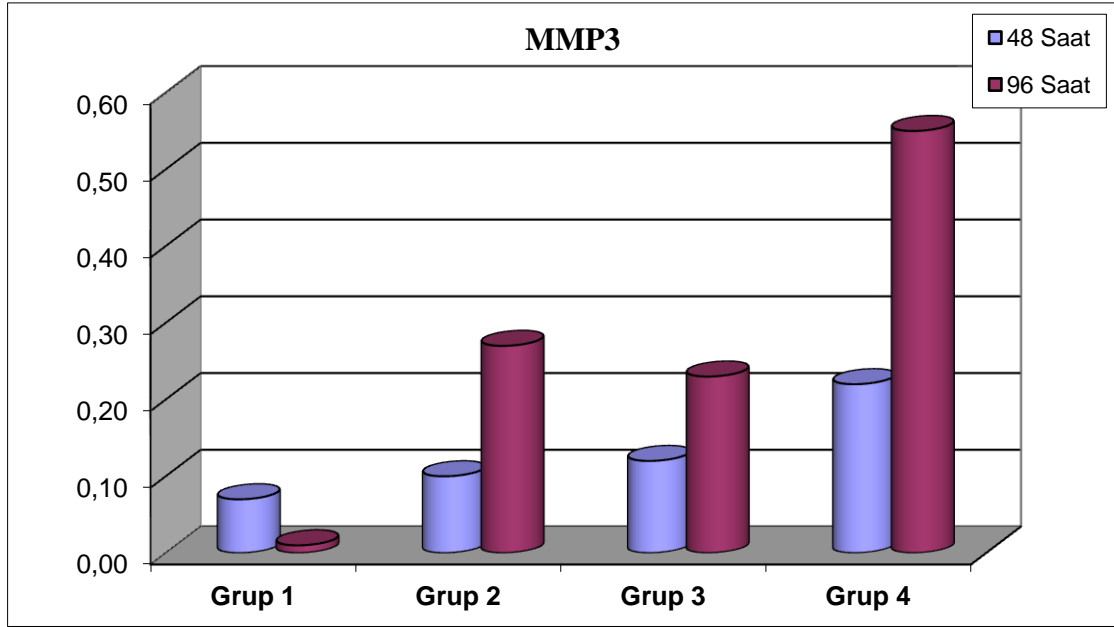
Gruplar arası karşılaştırmada 48 saat diliminde grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'ün MMP3 ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0,001$ ) (Tablo 4.3-1).

Kontrol grubunun 48 saat sonunda elde edilen MMP3 ortalama değerleri grup 2 ve grup 3'ün ortalama değerlerinden istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,308$ ,  $p=0,055$ ), grup 4'ün MMP3 ortalama değerlerinden anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p=0,001$ ). Grup 2'nin grup 3 ile MMP3 değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiş ( $p=0,613$ ), grup 2 ve grup 3'ün MMP3 ortalama değerleri grup 4'ün MMP3 ortalama değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p= 0,001$ ) (Tablo 4.3-2) (Şekil 4.3-2).

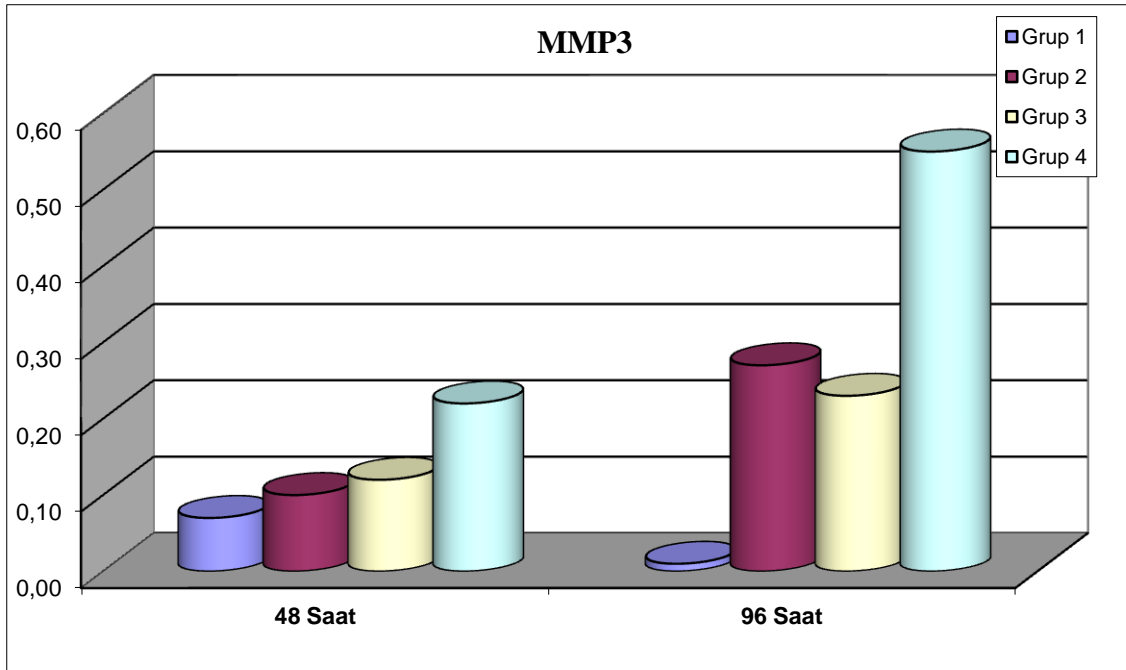
Gruplar arası karşılaştırmada 96 saat diliminde grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'ün MMP3 ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ( $p=0,026$ ) (Tablo 4.3-1).

Kontrol grubunun 96 saat sonunda elde edilen MMP3 ortalama değerleri grup 2 ve grup 3'ün ortalama değerlerinden istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,137$ ,  $p=0,224$ ), grup 4'ün MMP3 ortalama değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p=0,004$ ). Grup 2'nin grup 3 ve grup 4 ile MMP3 değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiş ( $p=0,983$ ,  $p=0,103$ ), grup 3'ün MMP3 ortalama değerleri ile grup 4'ün MMP3 ortalama değerleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $0,062$ ) (Tablo 4.3-2) (Şekil 4.3-2).

Çalışmamızda yapılan realtime PCR işlemleri sonucunda numunelerden MMP9 ekspresyonu gözlenmediğinden veri gösterilememektedir.



Şekil 4.3-1: Gruplara göre 48 ve 96 saat diliminde MMP3 değişiminin karşılaştırması

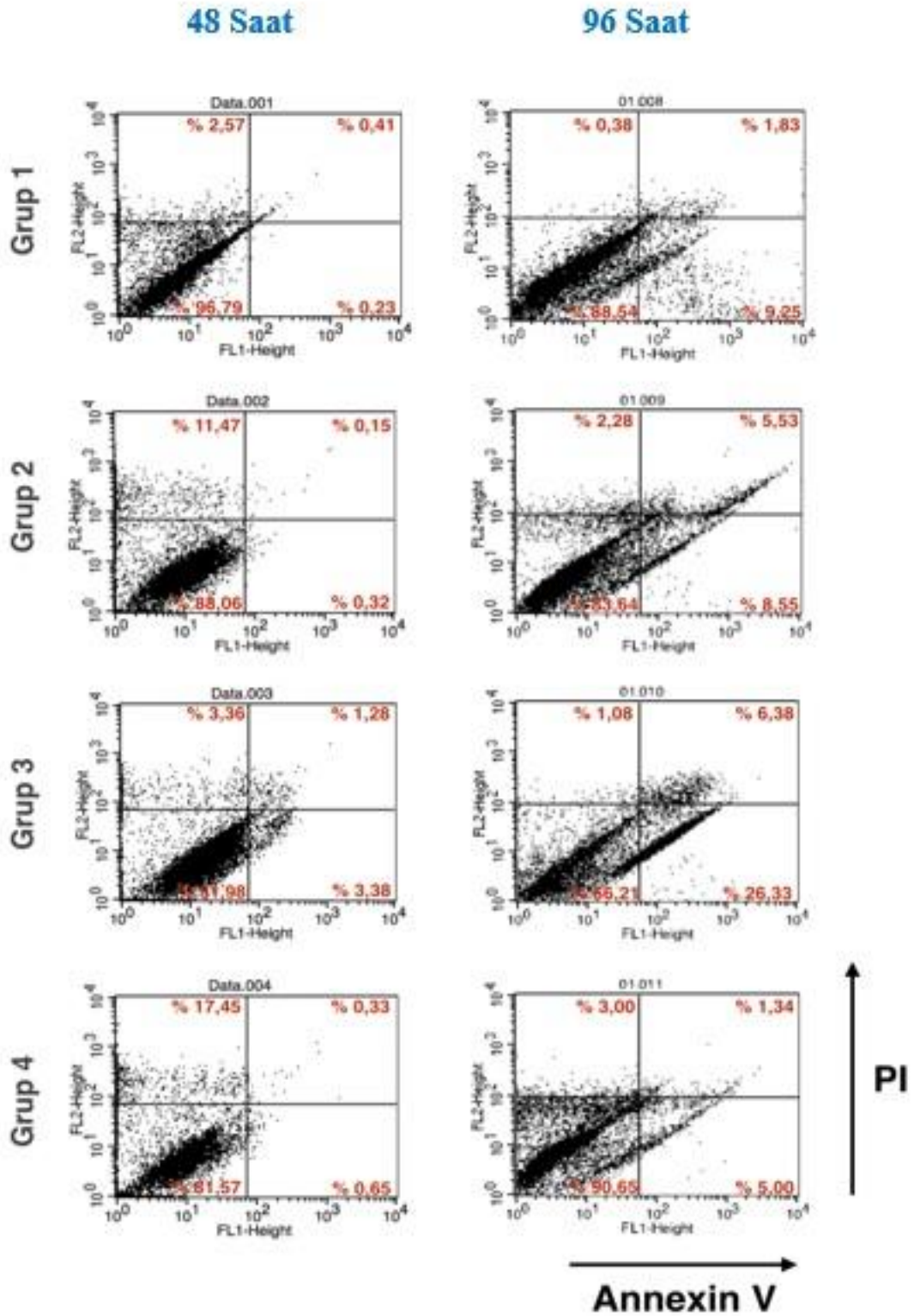


Şekil 4.3-2: 48 ve 96 saat diliminde gruplar arasında MMP3 değişiminin karşılaştırması

#### 4.4. ZA ve DDLT'nin Hücre Apoptozu Üzerine Etkisi

Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen ve DDLT uygulanmayan kontrol grubunda (Grup 1) 48 saat dilimi incelendiğinde canlı hücre yüzdesi (% 96,79) diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur (Şekil 4.4-1). Fibroblast kültür ortamında 30 µM ZA içeren DDLT uygulanmayan deney grubunda (Grup 2) 48 saat dilimi incelendiğinde ölü hücre yüzdesinde (% 11,47) kontrol grubuna göre (Grup 1) artış görüldü (Şekil 4.4-1). Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 3) 48 saat dilimi incelendiğinde hem erken (% 3,38) ve geç (% 1,28) apoptotik hücre yüzdesi hem de ölü hücre yüzdesinde (% 3,36) kontrol grubuna göre (Grup1) az miktarda bir artış gözlemlendi (Şekil 4.4-1). Fibroblast kültür ortamında 30 µM ZA içeren, 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 4) 48 saat dilimi incelendiğinde ölü hücre yüzdesinde (%17,45) diğer gruplara göre ciddi artış görüldü (Şekil 4.4-1).

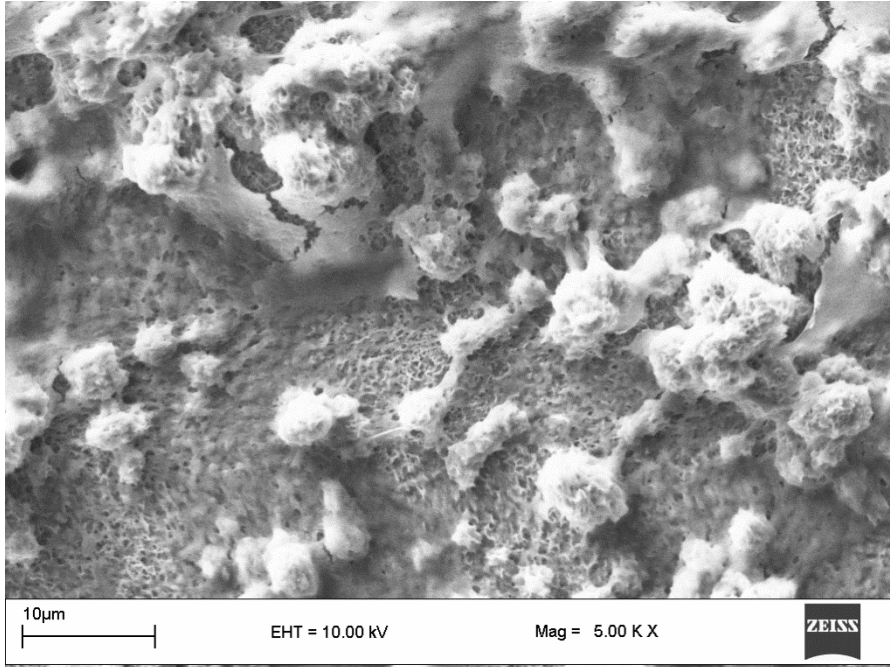
Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen ve DDLT uygulanmayan kontrol grubunda (Grup 1) 96 saat dilimi incelendiğinde ölü hücre yüzdesi (% 0,38) diğer gruplara göre düşük bulunmuştur (Şekil 4.4-1). Fibroblast kültür ortamında 30 µM ZA içeren DDLT uygulanmayan deney grubunda (Grup 2) 96 saat dilimi incelendiğinde canlı hücre yüzdesinde (% 83,64) kontrol grubuna göre (Grup 1) azalma görüldü (Şekil 4.4-1). Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 3) 96 saat dilimi incelendiğinde özellikle erken apoptotik hücre yüzdesi ve ölü hücre yüzdesinde (% 26,33) diğer gruplara göre ciddi miktarda artış gözlemlendi (Şekil 4.4-1). Fibroblast kültür ortamında 30 µM ZA içeren, 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunda (Grup 4) 96 saat dilimi incelendiğinde canlı hücre yüzdesi (%90,65) diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur (Şekil 4.4-1).



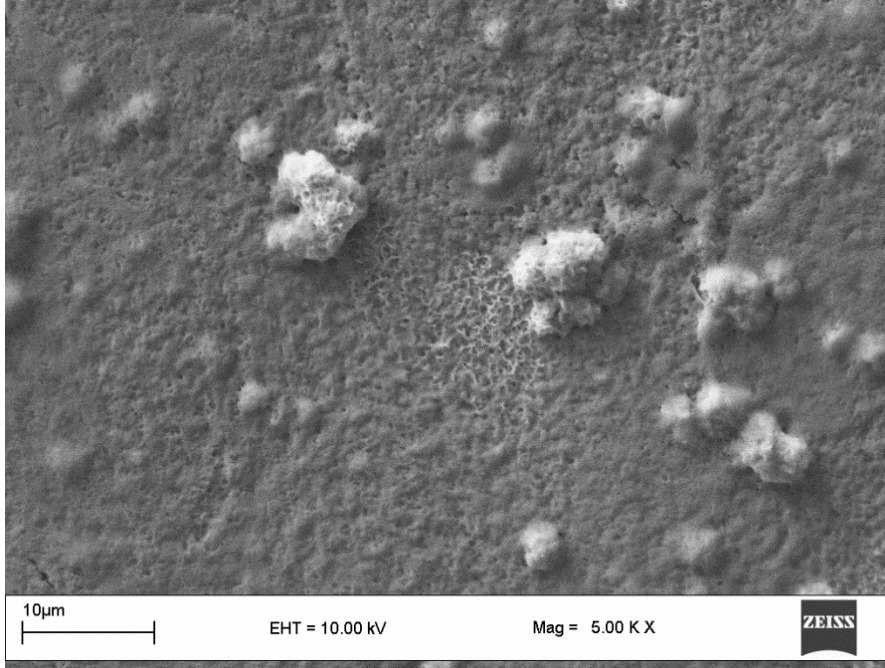
Şekil 4.4-1: Hücre apoptozunun flow-sitometrik değerlendirmesi (Kvadrantlar; sol alt = Canlı hücreler, sağ alt = erken apoptoz, sağ üst = geç apoptoz, sol üst = ölü hücreler)

#### 4.5. ZA ve DDLT'nin Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi

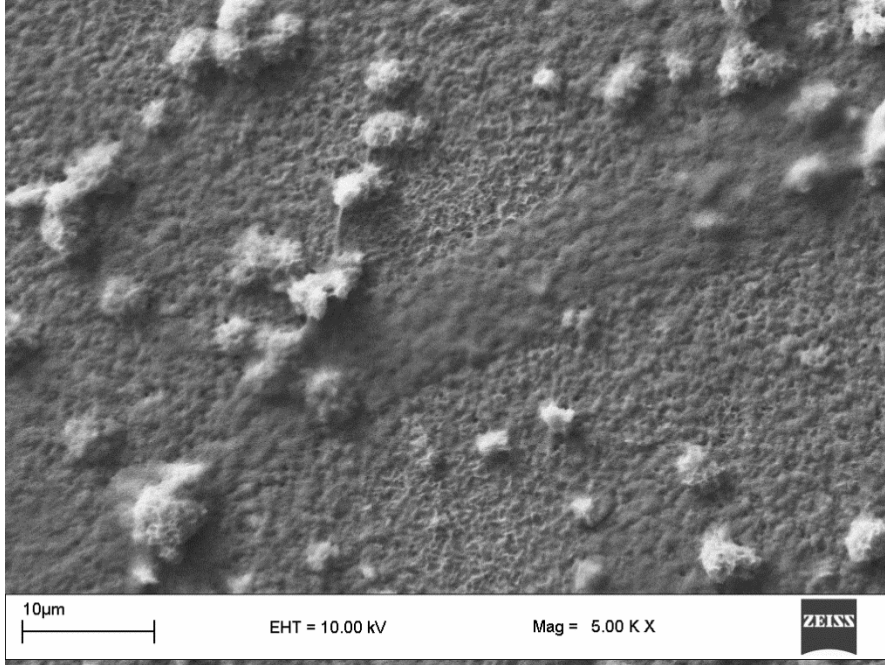
Tüm deney grupları 96 saat sonrasında görsel olarak taramalı elektron mikroskopunda değerlendirildiğinde, gerek ZA uygulamasının gerekse DDLT uygulamasının hücre morfolojisinde önemli değişimlere sebep olmadığı gözlemlenmiştir. Bütün yüzeylerde hücrelerin benzer bağlanma ve yayılma karakterleri sergiledikleri izlenmiştir (Şekiller 4.5-1,2,3,4). Özellikle kristal yapısının daha pürüzlü olduğu bölgelerde fillopodial uzantıların kristal pitleri arasında uzandığı gözlemlenmiş (Şekiller 4.5.1, 4.5-4) ve hücrenin bu uzanma davranışı bütün yüzeylerde saptanmıştır. Hücreler bütün yüzeylerde yassı morfolojiye sahip olmuşlardır. Bu gözlem ZA uygulamasının yüzeyde fibroblast yapışmasını ve yayılmasını engelleyecek şekilde bir yüzey kimyası oluşturmadığını düşündürmüştür. Ayrıca DDLT uygulanan gruplarda, gerek yüzeyde yayılan hücre miktarı gerekse hücre morfolojisi açısından pozitif veya negatif bir etkiyi ortaya koyacak farklılıklar gözlemlenmemiştir.



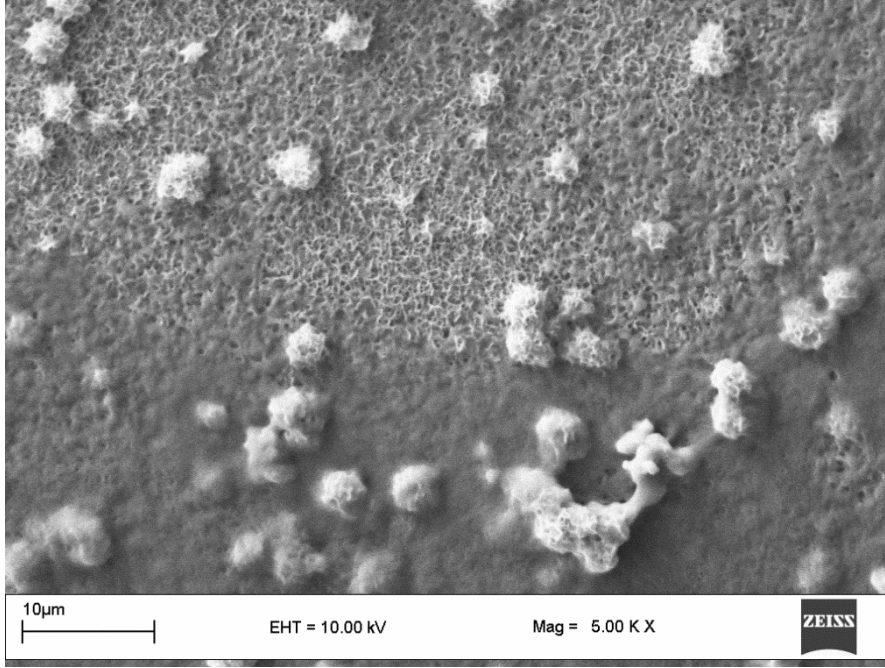
**Şekil 4.5-1: ZA içermeyen ve DDLT uygulanmayan kontrol grubunun 96 saat sonrasında TEM görüntüsü (büyütme x5000)**



**Şekil 4.5-2: 30 µm ZA içeren DDLT uygulanmayan deney grubunun 96 saat sonrasında TEM görüntüsü (büyütme x5000)**



**Şekil 4.5-3: ZA içermeyen 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunun 96 saat sonrasında TEM görüntüsü (büyütme x5000)**



**Şekil 4.5-4: 30 μm ZA içeren, 0.4 Watt DDLT uygulanan deney grubunun 96 saat sonrasında TEM görüntüsü (büyütme x5000)**

## 5. TARTIŞMA

İlk olarak 2003 yılında Marx, Migliorati, Mehrotra, Ruggiero, Rosenberg ve ark. tarafından yapılan eş zamanlı yayınlar ile ÇBBON'nin tanımlanmasının ardından araştırmacılar kemoterapötik ajanlara ve kortikosteroidlere bağlı geliştiği düşünülen lezyonların aslında bifosfonat kullanımı ile doğrudan ilişkili komplikasyonlar olduğu gerçeğinde bulmuşlardır. İzleyen yıllarda ÇBBON üzerinde artan sayıda in vivo ve in vitro çalışmalar yapılmış ve bunların sonuçları bilimsel yayınlarda yer almaya başlamıştır (11,146,152,195).

Bifosfonatların, osteoklastlar üzerindeki kısıtlayıcı etkisi ile kemik yapım yıkımının azaldığı bildirilmektedir. Bifosfonatlar ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü ve yeni kapiller oluşumunu da engellemektedir (74).

Pamidronat ve ZA'nın alendronat gibi oral bifosfonatlara göre osteoklastlar üzerinde daha güçlü etkiye sahip oldukları, uzun dönem kullanımları sonucunda osteoklastların, kemiğin rezorbsiyonunu engelleyerek, osteoblastların ve osteositlerin aselüler kemik matriksinden ayrılarak ölümüne neden oldukları, bununla birlikte kapiller dejenerasyon, avaskularizasyon ve mikrokırıklara yatkınlığın izlendiği bildirilmektedir (82,134).

Marx ve ark. (2005) yaygın olarak kullanılan Pamidronate, Zoledronate ve Alendronate adlı üç bifosfonat preparatının kullanıldığı 119 ÇBBON olgusunu değerlendirdikleri çalışmada hastaların 32'nin Pamidronate (%26), 48'nin Zoledronate (%40.3), 36'sının önce Pamidronate ardından Zoledronate (%30.2) ve 3'nün Alendronate (% 2.5) kullandığını bildirilmişlerdir. Klinik olarak kemik açılımının gözlenmesi ve semptomların oluşmasına kadar geçen ortalama süre Pamidronate kullanan hastalarda 14.3 ay, iki ilacı kombine kullanan hastalarda 12.1 ay, Zoledronate kullanan hastalarda ise 9.4 ay ve Alendronate kullananlarda 3 yıl olarak ifade etmişlerdir (139).

Çalışmamızda, literatür verileri doğrultusunda, en hızlı ÇBBON gelişmesine sebep olan preparat olması nedeniyle ZA'yı tercih ettik.

Kobayashi ve ark. sıçanlarda diş çekimini takiben çekim soketine lokal olarak ZA uyguladıkları, yara iyileşmesinde oluşan farklılıkları inceledikleri araştırmalarında ZA'nın yeni kemik oluşumunu inhibe ettiğini, vaskülarizasyonu bozduğunu, oral mukoza epitel hücrelerinin göçünü önlediğini ve bu durumun soketin bakteri kontaminasyonuna yol açtığını, kemik yüzeyini örten yumuşak dokuda toksik etki oluşturduğunu bildirmişlerdir (123).

Bauss ve ark. yüksek dozda lokal bifosfonat uygulanması halinde oral epitelde toksik etkinin arttığını bildirmiştir (30).

ÇBBON'nin klinik tablosuna bakıldığında, epitelizasyonu bozulmuş diş eti ile birlikte nekrotik kemik görülmektedir. Yumuşak dokudaki iyileşme gecikmesi, ÇBBON'nin sadece kemik dokusu kaynaklı değil, yumuşak dokuda da eş zamanlı gelişen toksik etki sonucu oluştuğunu düşündürmelidir (125).

ÇBBON lezyonlarının evrelendirilmesinde sağlanan görüş birliği henüz ideal tedavi yöntemi için oluşturulamamıştır. Günümüzde genel olarak ÇBBON tedavisi medikal, cerrahi, destekleyici tedavi yaklaşımlarının birlikte uygulanması şeklinde yapılmaktadır (14).

Çok sayıda olgu raporunun yansıttığı üzere ÇBBON tedavisinde, yalnız medikal tedavi, yalnız cerrahi tedavi veya her iki tedavinin birlikte uygulandığı olguların çoğunda tam başarı sağlanamamıştır. Bu nedenle ÇBBON tedavisinde klinisyenler ve araştırmacılar iyileşmeye destek tedavi yöntemlerinin arayışına yönelmişlerdir.

ÇBBON tedavisinde destekleyici olarak uygulanan farklı yaklaşımlar henüz tartışılırken, son yıllarda düşük yoğunluklu lazer enerjisi ile sağlanan biyostimülasyonun olumlu etkisini yansıtan araştırmaların sayısının her geçen gün arttığı görülmektedir. Lazer enerjisinin düşük enerji yoğunluğunda uygulanması ile sağlanan antiinflamatuvar ve antibakteriyel etkilerin dokularda onarım ve yeniden yapılanma sürecinin hızına, mitotik aktivitenin uyarılmasına ve kemikte organik matriksin depolanmasına olumlu yansıdığı yapılan çok sayıda in vivo ve in vitro

çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu özelliklerinin yanı sıra, yan etkilerinin/risklerinin yok denecek kadar az olması, farmakolojik olmaması ve kolay uygulanabilir bir yöntem olması DDLT'nin ÇBBON tedavisinde destekleyici rolünü güçlendirmektedir (11,149,180,207,233).

Vescovi ve ark. (231) 19 ÇBBON hastasının tedavisinde medikal/cerrahi yaklaşımın Nd:YAG lazer biyostimülasyonu ile destekli tedavi modellerinin sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmada, DDLT uygulanan 9 hastanın 8'inde tamamen iyileşme ve bir hastada semptomlarda gerileme rapor etmişlerdir. Bu sonucu, DDLT uygulanmayan 10 hastanın 5'inde tamamen iyileşme ve bir hastada semptomlarda gerileme olarak izledikleri sonuçla karşılaştırarak DDLT uygulamasının ÇBBON tedavisinde ideal bir destekleyici yaklaşım olabileceğine dikkati çekmişlerdir.

Freiberger ve ark. (96) ÇBBON tedavisi için 16 hastada hiperbarik oksijen tedavisi uygulamışlar ve sonuçlarını % 62,5 oranında iyileşme ve semptomların kaybolması şeklinde rapor etmişlerdir.

Curi ve ark. (69) cerrahi rezeksiyon yaptıkları üç ÇBBON hastasına işlem sırasında ve sonrasında BP tedavisini kesmeden rezeksiyon yaptıktan sonra cerrahi bölgeye trombositten zengin plazma uygulayıp bölgeyi primer olarak kapatmışlar, 6-8 aylık takip sonucunda iki hastada tam, bir hastada kısmen iyileşme elde etmişlerdir.

Scoletta ve ark.'nın 20 ÇBBON olgusu üzerinde cerrahi yaklaşım olmaksızın antimikrobiyal tedaviyle beraber uygulanan Ga-As diyot lazer biyostimülasyonunun, postoperatif dönem klinik bulguları ve iyileşme düzeyi üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, DDLT uygulanan grupta ağrı, ödem ve diğer infeksiyon bulgularında anlamlı düzeyde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle konservatif yaklaşım gerektiren hasta gruplarında ÇBBON tedavisinde lazer biyostimülasyonunun klinik önemine dikkat çekilerek, DDLT'nin kolay uygulanan, morbidite düzeyini arttırmayan ve yan etkisi olmayan bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (207).

Vescovi ve ark. (232) yaptıkları bir diğer çalışmada, Nd:YAG lazer biostimülasyonu ve/veya konvansiyonel medikal/cerrahi yaklaşımlarla tedavi edilen 28

ÇBBON olgusunda, postoperatif dönemde semptomların ciddiyeti, püy formasyonu, mukozal fleplerin primer iyileşmesinde başarı gibi klinik değişkenleri değerlendirmiştir. Çalışmada DDLT uygulanan 14 hastadan oluşan grupta, 9 hastada ağrı kontrolü, infeksiyon bulgularının, püy drenajının ve fistül varlığının giderilmesi konusunda klinik başarı sağlanmış, 3 hastada ise, 4-7 aylık takip dönemlerinde semptomlara yönelik iyileşme kaydedildiği rapor edilmiştir.

ÇBBON tedavisinde medikal ve cerrahi tedavinin yanı sıra Ozon, HBO, DDLT alternatifleri içerisinde DDLT haricindeki yöntemlerin katkısının düşük olduğu (HBO, Ozon) bilgisine dayanarak araştırmamızda destekleyici tedavi yöntemi olarak DDLT'yi tercih ettik (72,96,179).

Araştırmamızda sağlıklı bireylerin, enfeksiyon bulgusu olmayan gömük yirmi yaş dişlerinin cerrahi çekiminden sonra elde edilen dişetinden hazırlanan fibroblast hücre kültürlerinde 30  $\mu$ M ZA'nın ve 810 nm dalga boyunda, 0.4 W gücünde 2. gün 75sn, 3. gün 150 sn, 4. gün 300 sn uygulanan DDLT'nin fibroblast hücrelerinin proliferasyonu, canlılığı, kollajen Tip 1 sentezi, MMP3 ve MMP9 seviyeleri üzerine etkilerini inceledik.

Çalışmamızda insan dişeti fibroblast hücrelerine 2., 3. ve 4. gün sonunda ZA ve DDLT'nin hücre sayısı ve canlılığı üzerine etkilerini değerlendirdik. Kontrol grubu olarak tasarlanmış, ZA içermeyen ve DDLT uygulanmayan grubun 2., 3. ve 4. gün fibroblast hücre sayısında azalma yönünde fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,882$ ).

Kendi içinde değerlendirilen, yalnız 30  $\mu$ M ZA uygulanan 2. deney grubunun 2., 3. ve 4. gün sonunda fibroblast hücre sayısında ciddi azalma görülmüş, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,0001$ ). Bu deney grubunun fibroblast hücre sayısında saptanan artış 2. ve 3. günde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,001$ ), 4. günde ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Çalışmamızda elde edilen bu veriler literatürde bildirilen sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda insan dişeti fibroblast hücrelerine yalnız 810 nm dalga boyunda 0.4 W gücünde, 75 sn DDLT uygulanan 3. deney grubunun 2., 3. ve 4. gün sonunda kendi içinde yapılan değerlendirmesinde fibroblast hücre sayısında ve canlılığında az miktarda azalma saptanmış, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,417$ ). Yalnız DDLT uygulanan 3. deney grubunun 2. gün sonunda elde edilen hücre sayısı ve canlılığı değerleri kontrol grubuna göre hafif artış yönünde değişkenlik gösterirken ( $p=0,248$ ), 3. ve 4. gün hücre sayılarında hafif azalma saptanmış ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,753$ ).

Çalışmamızda elde edilen bu sonuca dayanarak DDLT'nin erken dönemde biyostimulatif etki gösterdiğini, ilerleyen zaman ve dozda etkinliğinin azaldığını savunmaktayız.

Çalışmamızda 30  $\mu$ M ZA ile birlikte 0.4 W gücünde DDLT uygulanan 4. deney grubunun kendi içinde yapılan değerlendirmesinde 2., 3. ve 4. gün sonunda fibroblast hücre sayısında ciddi azalma görülmüş, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,0001$ ). Bu deney grubunun fibroblast hücre sayısı ve canlılığında kontrol grubuna göre 2. ve 3. gün artış yönünde saptanan fark anlamlı bulunurken ( $p=0.001$ ,  $p=0.001$ ), 4. günde azalma görülmüş ve fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Gruplar arası karşılaştırmada 30  $\mu$ M ZA içeren 2. ve 4. deney gruplarının 2. ve 3. gün fibroblast hücre proliferasyonu değerleri arasında fark istatistiksel olarak anlamsız ( $p=0,753$   $p=0,345$ ) bulunurken, 2. deney grubu ile 3. deney grubunun, 3. deney grubu ile 4. deney grubunun arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,001$   $p=0,001$   $p=0,001$   $p=0,005$ ).

Araştırmamızda elde edilen veriler doğrultusunda ZA uygulanmış gruplarda başlangıçta saptanan fibroblast hücre sayısındaki artışın ilerleyen zamanda korunamayıp düşmesinin ilacın toksik etkisi ile ilintili, DDLT'nin biyostimulatif etkisinin düşük olduğu görüşündeyiz.

Bamias ve ark. ZA kullanan 252 hastayı inceledikleri prospektif araştırmalarında 111 multiple myeloma hastasının 11'inde (% 9.9), 70 meme kanseri hastasının 2'sinde

(% 2.9), 46 prostat kanseri hastasının 3'ünde (% 6.5) ve diğer 25 kanser hastasının 1'inde (% 4) ÇBBON saptamışlardır. İlacın verilmiş sayısı ve bisfostonata maruz kalınan süre ortalama değerleri ÇBBON gelişen hastalarda 35 infüzyon ve 39.3 ay, ÇBBON gelişmemiş hastalarda 15 infüzyon ve 19 ay olarak bildirilmiştir. ÇBBON gelişim insidansı 4-12 aya kadar BP alan hastalarda %1.5 seviyesinde iken, 37-48 aya kadar BP alan hastalarda %7.7 seviyesine yükselmektedir. Araştırmacılar ÇBBON gelişiminin BP kullanımına bağlı olduğunu, bu komplikasyonun gelişiminde ilaca maruz kalma süresinin en önemli risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir (24).

Hikita ve ark. çalışmalarında, diş çekimi öncesinde çekim bölgesine 16 gün süre ile lokal olarak alendronat uyguladıkları 5 haftalık erkek sıçanlarda, diş çekim socketinde yeni kemik oluşumunun geciktiğini, ayrıca iyileşme sürecinin erken dönemindeki enfeksiyonun, ÇBBON gelişimini tetikleyebileceğini bildirmişlerdir (112).

Correia ve ark. insan periodontal ligaman kaynaklı fibroblastların hücre kültürü çalışmalarında bifosfonatların yumuşak doku hücrelerinde sitotoksik etkilerinin olduğu, hücre proliferasyonunun baskılandığı ve mukozal kalınlığın azalması sonucu kemiğin açığa çıkması ile ÇBBON'nin tetiklendiğini savunmuşlardır (63).

Bifosfonat tedavisinin en önemli yan etkisi olan ÇBBON'nin tedavisinde çeşitli tedavi yöntemleri denenmekte ve bu yöntemlerin etkinliği literatürde tartışılmaktadır.

Dimitrakopoulos ve ark. (77) ZA ve/veya pamidronat kullanımı sonrası yapılan dental tedavileri izleyerek ÇBBON gelişen 11 hastaya medikal ve/veya cerrahi tedavi uygulamışlar, yalnız bir hastada tam iyileşme elde etmişlerdir.

Stockman ve ark. (219) i.v. bifosfonat kullanan 50 hastada ÇBBON tedavisinde yaranın primer olarak kapatıldığını, cerrahi tedavi ile birlikte medikal tedavi yaptıklarını ve %89 başarı elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Vieillard ve ark. (234) pamidronat ve/veya ZA kullanan 13 hastanın 12'sine sekestrastomi ve küretaj, birisine ise parsiyal mandibula rezeksiyonu yapmışlar, yaklaşık 13 aylık takip süresinde sadece beş hastada iyileşme gözlemlemişlerdir.

Merigo ve ark. (148) pamidronat veya ZA kullanan dört hastada oluşan ÇBBON'nin cerrahi ve medikal tedavisinden 6 ay sonra rekürrens olduğunu belirtmişlerdir.

Pamidronat veya ZA kullanımı sonrası diş çekimini izleyerek ÇBBON gelişen yedi hastada, lokal debridman ve antibiyotik tedavisi uygulayan Mortensen ve ark. (160) bu tedaviye cevap alınamayan üç hastada eksizyonel yöntem uygulamışlar ve bunlardan sadece iki tanesinde olumlu sonuçlar elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Açıl ve ark. farklı dozlarda intravenöz ZA, Pamidronate ve oral alendronate'ın insan dişeti fibroblastları, osteoblastlar ve osteogenik sarkoma hücreleri (SaOS-2 hücreleri) üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında tüm BP dozlarının in vitro kollagen üretimini ve hücre proliferasyonunu azalttığını, en fazla inhibitör etkinin ZA grubunda gözlendiğini bildirmişlerdir (3).

Çalışmamızda ZA ve DDLT'nin kollajen Tip 1 sentezine etkisini 48 saat ve 96 saat diliminde karşılaştırmalı olarak inceledik. ZA içermeyen, DDLT uygulanmayan kontrol grubunun 48 ve 96 saat sonunda elde edilen kollajen Tip 1 miktarında ilerleyen zamanda istatistiksel anlamlılık taşımayan hafif azalma görülmüştür ( $p=0,513$ ).

Yalnız 30  $\mu$ M ZA uygulanan 2. deney grubunun ve ZA ile birlikte 0.4 W DDLT uygulanan 4. deney grubunun kendi içinde yapılan değerlendirmesinde 48 saat ve 96 saat sonunda kollajen Tip 1 miktarında ciddi azalma saptanmış ve sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,002$   $p=0,047$ ).

Tüm çalışma gruplarının 48 saat sonunda elde edilen kollajen tip 1 değerlerinin arasında saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,007$ ).

ZA, DDLT, ZA+DDLTL uygulanan deney gruplarının 48 saat sonunda kollajen tip 1 miktarındaki artışının kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmasında ZA+DDLTL uygulanan 4. deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,004$ ), diğer gruplararası karşılaştırma sonuçları istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Kollajen tip 1 miktarının 96 saat sonunda gruplararası ortalama değerleri karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p=0,321$ ).

Kontrol grubunun 96 saat sonunda elde edilen kollajen tip 1 değerlerinin diğer deney gruplarının değerleri ile yapılan karşılaştırmasında fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda kollajen Tip 1 üretimini ZA varlığında erken dönemde artış gösterdiği, ilacın toksik etkisinin ilerleyen zamanda devam ettiği, DDLT uygulamasının ise erken dönemde olumlu katkı sağladığı sonucuna vardık.

Migliorati ve ark.'nın kanser tedavisi gören hastalarda gelişen oral komplikasyonların nedenlerini inceledikleri klinik çalışmalarında, her bireyin bifosfonata farklı cevaplar vermesinin ve artan BBON riskinin sorumlusunun genetik polimorfizm olduğu bildirilmiştir (153).

Scheper ve ark. ZA'nın yumuşak dokular ve kemik üzerine in vitro ortamda oral mukoza hücreleri kullanarak yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda ZA (0.25-3  $\mu\text{mol/l}$ ) etkisini incelemişler, artan ZA konsantrasyonları ile birlikte hücre apoptozisi ve proliferasyonunda doza bağlı etki görüldüğünü bildirmişlerdir. Hücre apoptozisinde TNF, BCL-2, Caspase, IAP, TRAF ve Death Domain ailesi gibi pek çok genin ekspresyonunda değişimler gözlenmiştir. Western Blot analizi ile caspase 3 ve 9'un aktive formlarında artış olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, ZA'nın düşük konsantrasyonlarda oral mukoza dokularına hızlı ve doğrudan etki ederek, gen regülasyonu yoluyla hücre apoptozis mekanizmasını indüklediği, osteonekroz oluşumunda yumuşak doku hasarının olası neden olabileceği sonucuna varılmıştır (202).

Balla ve ark. bifosfonat nekrozlu 46 hastada CYP2C8 rs1934951 SNP'nin etkilerini ve bunun pek çok klinik ve biyokimyasal faktörlerle olan ilişkisini araştırmışlardır. Hastalardan kan örnekleri alınarak DNA elde edilmiş, CYP2C8 geninin SNP analizi yapılmış, genetik değerlendirme ile birlikte klinik ve biyokimyasal

değişkenler ölçülmüştür. Sonuç olarak, normal GG genotipi yerine AG genotipine sahip deneklerde mandibulada lokalize ÇBBON riskinin 19.2 kat fazla olduğu bildirilmiştir. Maksillar lokalizasyonlu ÇBBON ile intravenöz BP tedavisi ve serum lipid markerları arasında güçlü pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Mandibular ÇBBON'nin, serum kalsiyum, 25-Hidroksi Vitamin D ve PTH ölçümleri, oral BP kullanımı ve tedavi süresinin uzunluğu ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (22).

Ravosa ve ark. insan oral fibroblast ve epitel hücre kültüründe ZA'nın hücrelerin proliferasyonu, apoptozisi ve migrasyon kapasitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. ZA uygulamasının, hem oral epitel hücrelerinin hem de fibroblastların proliferasyonunu inhibe ettiği, apoptozisi arttırdığı, oral fibroblastların hareketliliğini azalttığı görülmüştür. Quantitative real-time PCR analizi ile ZA tedavisinin oral fibroblastlarda Tip I kollajenin kollajen1a1 ve kollajen1a2 zincirlerinin ekspresyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda araştırmacılar ZA tedavisinin, oral fibroblastların büyüme ve göç kapasitelerini bloke etmek ve Tip I kollajen yapımını azaltmak yoluyla reepitelizasyon için gerekli granülasyon dokusu oluşumunu engelleyerek yara iyileşmesini bozduğunu bildirmişlerdir (187).

Basso ve ark. DDLT uygulaması ile insan dişeti fibroblast hücre kültüründe biyostimulan etki oluşturulan yeterli enerji dozlarının belirlenmesi amacıyla planladıkları in vitro çalışmada InGaAsP diyot lazer ( $780 \pm 3$  nm; 40 mW) kullanarak 0.5, 1.5, 3, 5, ve 7 J/cm<sup>2</sup> enerji dozlarında, 24 saatte bir ve toplam üç gün ışınlama yapmışlardır. Son ışınlamadan 24 saat sonra hücre metabolizmaları ölçülerek, en etkili iki doz (0.5 ve 3 J/cm<sup>2</sup>) seçilmiş ve bu dozlarda hücre sayısı ve migrasyon kapasitesi değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, fibroblastların 0.5 ve 3 J/cm<sup>2</sup> dozlarında ışınlanmasının, lazer uygulanmayan gruba kıyasla hücre metabolizmasında anlamlı ölçüde artış oluşturduğu, her iki enerji dozunun, hücre sayısı ve hücre migrasyonunda belirgin artışa yol açtığı, DDLT'nin fibroblastlarda in vitro biyostimulasyon etki yarattığı bildirilmiştir (28).

Bayram ve ark. bifosfonatların osteoblast hücrelerinde oluşturduğu inhibitor ve sitotoksik etkiye karşı, düşük doz lazer uygulaması ile biyostimülatif etki yaratarak oluşabilecek değişiklikleri araştırmışlardır. Bu çalışmada Saos-2 insan osteoblast

benzeri hücreleri kullanılarak 0, 1, 10, 100  $\mu$ M konsantrasyonlarında ZA hücre kültür ortamına verildikten sonra 24. ve 48. saatte 0, 0.25, 0.50 watt diyot lazer uygulanmıştır. Lazer uygulamasını izleyen 48. saatte osteoblast hücrelerinde lazerin biyostimulatif etkilerini değerlendirmek üzere osteoblastlar, proliferasyon, ALP aktivitesi ve ALP spesifik aktivitesi yönünden incelenmiş ve hem ilaç dozuna, hem de lazer gücüne bağlı olarak bu değerlerdeki olası değişiklikler karşılaştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda ZA uygulanan gruplarda hücre sayısı azalırken farklı lazer güçlerinin tüm hücreler üzerinde artan proliferasyon ve/veya differansiyasyon ile sonuçlanan biyostimulatif etki sağladığını bildirmişlerdir (32).

Simon ve ark. 28 gün devamlı olarak ZA ve pamidronata maruz bırakılan insan dişeti fibroblast, osteoblast ve osteosarkoma (SaOS-2) hücreleri tarafından sentezlenen Tip I, II, III ve V kollagenlerinin ekspresyonu, ELISA ve real-time PCR testleri ile değerlendirilmiştir. Real-time PCR incelemesinde ZA'nın tüm konsantrasyonlarda gen ekspresyonunu %16 oranında azalttığı, maksimum gen ekspresyon oranları fibroblastlar için %31, osteoblastlar için % 56 ve SaSO-2 hücreleri için %14 olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada azalmış kollagen yapımı ölçülmüş, böylece uzun süre zoledronik asit ve pamidronata maruz bırakılmanın olumsuz etkileri bildirilmiştir. Bifosfonata maruz kalan hücrelerce ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretiminde oluşan azalmanın, osteonekroz oluşumu ve yara iyileşmesinde bozukluğun nedeni olabileceği bildirilmiştir (214).

Çalışmamızda ZA ve DDLT'nin MMP3 sentezine etkisini 48 saat ve 96 saat diliminde karşılaştırmalı olarak inceledik. ZA içermeyen, DDLT uygulanmayan kontrol grubunun 96 saat sonunda MMP3 miktarında görülen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,026$ ). 30  $\mu$ M ZA uygulanan 2. deney grubunun ve sadece 0.4 W DDLT uygulanan 3.deney grubunun 96 saat sonunda MMP3 miktarında saptanan artış istatistiksel olarak anlamsız bulunurken ( $p=0,127$   $p=0,119$ ), 30  $\mu$ M ZA+ 0.4 W DDLT uygulanan 4. deney grubunda anlamlı artış bulunmuştur ( $p=0,047$ ).

Çalışmamızda hem 48 saat hem 96 saat sonu MMP3 değerlerinin gruplararası karşılaştırmasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,001$   $p=0,026$ ).

Kontrol grubuna göre diğer tüm çalışma gruplarında MMP3 değerlerinde yükselme saptanmış ancak sadece ZA+DDLTL uygulanan 4. deney grubu ile hem 48 saat hem 96 saat verileri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,001$   $p=0,004$ ). 30  $\mu$ M ZA uygulanan 2. deney grubunun ve DDLTL uygulanan 3. deney grubunun MMP3 değerleri ile ZA+DDLTL uygulanan 4. deney grubunun 48 saat sonu değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,001$   $p=0,001$ ).

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda tek başına ZA uygulamasının MMP3 sentezi üzerinde anlamlı fark yaratmadığı, biyostimülatif etkisi beklenen DDLTL'nin tek başına MMP3 sentezinde yeterli etkinlik göstermediği, ZA+DDLTL'nin birlikte MMP3 değerlerinin artışında daha etkin olduğu sonucuna vardık.

Dickson ve ark. Ga-Al-As lazerin ALP enzim aktivitesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında doku örneklerine 10  $J/cm^2$  doz lazer uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, lazer uygulanan grup örneklerinde ALP enzim aktivitesinin kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (76).

DDLTL uygulaması yapılan in vitro çalışmalarda kollajen fibrillerde artış izlenmiştir. Bu bulgu DDLTL'nin kemik onarımı üzerine erken dönem etkisi olarak yorumlanabilir. Bazı çalışmalarda ise DDLTL'yi takiben yapılan in vitro çalışmalarda kollajen üretiminde artış izlenmiştir. Bu çalışmalarda kemikle beraber yumuşak dokularda da yararlı etkileri olduğu saptanan 1-5  $J/cm^2$  dozlar uygulanmıştır. Biyolojik dokuyu uyarıcı etkilerin ışının dozuna bağlı olduğu gösterilmiştir (159,223).

Takeda Y, diş çekimi sonrası sıçanlarda AlGaAs lazerin bir hafta süre ile günlük kullanımının yara iyileşmesinde fibroblast proliferasyonu ve kemik matriksinin oluşumunda artış yönünde katkı sağladığını bildirmiştir (220).

Hakkı ve Bozkurt, insan dişeti fibroblastlarına 940 nm diyot lazer uyguladıkları çalışmalarında, hücre proliferasyonu ile büyüme faktörleri ve Tip I kollajenin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisini insan dişeti fibroblastlarına farklı parametrelerde lazer uygulamışlar, hücre proliferasyon miktarında hiçbir grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark saptayamamışlardır. Lazer uygulanan gruplarda IGF, VEGF, TGF- $\beta$  ve

mRNA ekspresyonunda anlamlı artışlar tespit ettiklerini, sadece diyet lazerin biyostimulasyon modunda Tip I kollajen mRNA seviyesinde anlamlı artış olduğunu bildirmişlerdir (109).

Damante ve ark. gingivoplasti sonrası insan oral mukozasının iyileşmesinde 15 mW, 670 nm GaAlAs diyet lazerin etkilerini incelemişlerdir. 7. 14. 21 ve 60 gün sonra dokulardan elde edilen insizyonel biyopsi örneklerinin ışın mikroskopunda morfometrik değerlendirmesi sonucu, gingivoplasti sonrası DDLT'nin yara iyileşmesini hızlandırmadığını bildirmişlerdir (73).

Kreisler ve ark. DDLT'nin insan dişeti hücrelerinin proliferasyon hızındaki etkisini in vitro ortamda araştırdıkları çalışmalarında, dişeti bağ dokusundan elde edilen insan dişeti fibroblast hücreleri kültüre edilmiş ve 1.96-7.84 J/cm enerji yoğunluğu ile 10 mW gücünde devamlı modda 809 nm yarı iletken lazer ışınına tabi tutulmuştur. Lazer ışını 24 saat arayla bir kez, iki kez ve üç kez olmak üzere 75-300 saniye arasında uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu 24, 48 ve 72 saat sonra ölçülmüştür. Sonuç olarak, lazer uygulanan hücrelerde daha yüksek proliferasyon aktivitesi gözlemlendiği, irradyasyondan 24 saat sonra artışın en belirgin seviyesinde olup, enerjiyle ters orantılı bir şekilde 48 ve 72 saat sonra azaldığı, DDLT'nin etki süresinin sınırlı olduğu, klinik uygulamalarda istenen etkiyi elde etmek için tekrarlayan uygulamalar yapmak gerektiği bildirilmiştir (121).

DDLT'nin temel hedefleri yara iyileşmesinin hızlandırılması, ağrının ve inflamatuvar cevabın azaltılmasıdır. DDLT dokuların temel birimi olan farklı özellikteki hücrelerde biyolojik fonksiyonları etkileyerek inflamasyon ve iyileşme üzerinde olumlu sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Yara iyileşmesinin bütün fazlarında etkisi olan DDLT'nin, özellikle hücrelerin proliferatif aşamasında etkili olduğu gösterilmiştir (158).

Çalışmamızda da 810 nm dalga boyunda, 600 µm çaplı fiber uç içeren (Gigaa GBOX-15A/B Diyet lazer, Wuhan, China) 0.4 W'a kadar ayarlanabilir güç çıkışı olan Ga-As diyet lazer ile ışınlama, 24 saatte bir olmak üzere sürekli dalga modunda 3 gün kültür kuyucuklarına uygulandı. Araştırmamızda tek başına DDLT uygulanan

gruplardan elde edilen verilerin kontrol grubu ile ve kendi aralarında yapılan karşılaştırmasında fibroblast hücre proliferasyonu, kollajen tip 1 sentezi, MMP3 üretimi üzerine olumlu bir katkısının olmadığı saptandı.

Basi ve ark. (2012) sıçanlarda nitrojen içerikli BP'nin diş çekimi sonrası yara iyileşmesi sürecinde matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) ekspresyonuna etkisini araştırmışlardır. Sıçanlar postoperatif 1, 3, 7, 21. günlerde sakrifiye edilerek western blotting ve multiplex elisa testleri ile hedeflenen protein araştırılmış, RT-PCR analizi ile hedef mRNA miktarı ölçülmüş ve zimografi ile MMP-9 enzimatik aktivitesi değerlendirilmiştir. ZA uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla diş çekiminden 21 gün sonraki kemik mineralizasyonu oranında anlamlı azalma tespit edilmiştir. ZA verilen sıçanlarda postoperatif 3. ve 21. günde MMP-9 spesifik mRNA seviyesinde, postoperatif 3. ve 7. günlerde ise MMP-9 protein seviyesinde artış saptanmıştır. Ayrıca ZA grubunda MMP-9 enzimatik aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla artış bildirilmiştir (27).

Bifosfonatların oral yumuşak dokular üzerindeki etkileri Landesberg ve ark. tarafından pamidronat preparatının kullanıldığı in vitro çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada pamidronatın oral keratinosit hücre proliferasyonunu baskılayarak yara iyileşmesini geciktirdiği fakat apoptoza neden olmadığı belirtilmiştir (128).

Aminobifosfonatların oral mukozanın fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı in vivo çalışmalarla gösterilmişken, apoptotik etkileri ile ilgili kesin veri bildirilmemiştir (202).

Cozin ve ark. ZA ve pamidronatın primer insan oral fibroblastları üzerindeki etkilerini araştırdıkları in vitro çalışmalarında primer dişeti fibroblastlarının hücresel proliferasyonu, migrasyonu ve apoptozisini incelemişler, hem pamidronatın hem de ZA'nın hücre migrasyonunu azalttığını saptamışlardır. Bu çalışmada hücre alt katman adezyonunda kayıp ve F-actin demetinde azalma saptanmıştır. Bu etkilerin geraniolgeriolden (GGOH) ve insan trombosit kaynaklı büyüme faktörü BB (rhPDGF-BB) muamelesi ile geri dönüştürülebilmesinin, ÇBBON'nin tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde önem taşıdığını açıklamışlardır (66).

Araştırmamızda ZA ve DDLT'nin hücre apoptozu üzerine etkisi incelendiğinde fibroblast kültür ortamında ZA ve DDLT içermeyen kontrol grubunda 48 ve 96 saat diliminde ilerleyen zamanda canlı hücre sayısında artış saptanmıştır (%96.79 : %99.62).

Deney gruplarının 48 ve 96 saat dilimleri arasında 2. ve 3. deney grubunda ölü hücre sayısında artış yönünde (Grup 2: %11.47 : % 16.36 - Grup 3: %3.38 :%26.33), 4. deney grubunda ise azalma (Grup 4: %17.45 : %9.35) yönünde fark saptanmıştır.

Kontrol grubu ile diğer deney grupları arasında 48 saat diliminde canlı hücre sayısında azalma olduğu görülmüştür. Ölü hücre sayısında en belirgin artış (% 17.45), 30 µM ZA ve 0.4 W DDLT uygulanan 4. deney grubunda saptanmıştır.

Fibroblast kültür ortamında ZA içermeyen, DDLT uygulanmayan kontrol grubuna göre diğer deney grupları arasında 96 saat diliminde canlı hücre sayısında azalma olduğu görülmüştür.

ZA ve DDLT'nin hücre morfolojisi üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan TEM incelemesinde 30 µM ZA ve 0.4 W DDLT uygulamasının hücre morfolojisinde önemli değişimlere sebep olmadığı, bütün yüzeylerde hücrelerin benzer bağlanma ve yayılma karakteri sergiledikleri izlenmiştir. ZA uygulamasının yüzeyde fibroblast yapışmasını ve yayılmasını engelleyecek bir yüzey kimyası oluşturmadığı, DDLT uygulamasının yüzeyde yayılan hücre miktarı ve morfolojisine olumlu/olumsuz katkı sağlamadığı görüşündeyiz.

Çalışmamızdan elde edilen tüm bu veriler doğrultusunda ZA'nın hücre proliferasyonu ve canlılığını inhibe ettiği, apoptozu artırdığı, ilerleyen zamanda toksik etkinin sürdüğü, DDLT'nin ZA'nın olumsuz etkilerini giderecek biyostimülan etkisinin yetersiz olduğu, farklı enerji seviyelerinde ve sürelerde DDLT uygulamaları ile düzenlenecek çalışmalara ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, güçlü anti-rezorptif etkisi nedeniyle malignitelerde kemik metastazlarının önlenmesinde yaygın olarak tercih edilen BP'lerden Zoledronik Asit (ZA) ve DDLT'nin insan dişeti fibroblast hücre proliferasyonu, canlılığı, kollajen Tip 1, MMP3 ve MMP9 sentezi üzerine etkilerini incelediğimiz çalışmamızın bulguları doğrultusunda;

1. Tüm gruplarda ilerleyen zamanla fibroblast hücre sayısı ve canlılığında azalma saptanmıştır. 30  $\mu$ M ZA uygulanan 2. ve 4. deney grubunda fibroblast hücre sayısı ve canlılığında kontrol grubuna oranla 2. ve 3. günde anlamlı artış saptanmış, fakat 4. günde kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır. Bu bulguya dayanarak ZA'nın fibroblast hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerine ileri dönemde olumsuz etkisinin ortaya çıktığını, ZA'nın toksik etkisinin DDLT uygulamasıyla önlenemediğini savunmaktayız.
2. Çalışmamızda kollajen Tip 1 sayısal değerlerinin 48 ve 96 saat dilimi sonunda ilerleyen zamanla artış yönünde gösterdiği fark kontrol grubunda anlamsız bulunmuş, sadece ZA uygulanan grupta anlamlı azalma görülmüş, sadece 0.4 W DDLT uygulanan grupta ise azalma yönünde anlamsız fark saptanmıştır. ZA'nın DDLT ile birlikte uygulandığı grupta anlamlı azalma görülmüştür. Bu bulgular eşliğinde ZA'nın kollajen Tip 1 üretimi üzerine erken dönemde uyarıcı etkisinin olduğu, bu etkinin ilerleyen zamanda azaldığı, ancak DDLT'nin erken dönemde kontrol grubuna göre düşük biyostimülan etki gösterdiği, ilerleyen zamanda ise DDLT uygulamasının beklenen biyostimülan etkisinin olmadığını savunmaktayız.
3. Çalışmamızda MMP3 değerleri incelendiğinde ilerleyen zamanda kontrol grubunda anlamlı azalma, sadece 30  $\mu$ M ZA ve sadece 0.4 W DDLT uygulanan gruplarda anlamlı olmayan değişme görülürken, ZA'nın DDLT ile birlikte uygulandığı grupta

anlamli artiş görülmüştür. Bu bulgular eşliğinde ZA'nın MMP3 ekspresyonunu yükselttiği, DDLT uygulanması ile ekspresyonun daha da arttığı sonucuna vardık.

4. Çalışmamızda ZA ve DDLT'nin hücre apoptozu üzerine etkileri değerlendirildiğinde, sadece 30 µM ZA ve sadece 0.4 W DDLT uygulanan 2. ve 3. deney gruplarında 48 ve 96 saat dilimlerinde ilerleyen zamanda ölü hücre sayısının arttığı, ZA ile birlikte DDLT uygulanan 4. deney grubunda ise ölü hücre sayısının azaldığı saptanmıştır. Ancak kontrol grubunda canlı hücre sayısı tüm deney gruplarından yüksek sayıdadır.
5. Çalışmamızda ZA ve DDLT'nin hücre morfolojisi üzerine etkisinin incelendiği TEM görüntülerinde 30 µM ZA ve 0.4 W DDLT uygulamasının hücre morfolojisinde önemli değişimlere sebep olmadığı, bütün yüzeylerde hücrelerin benzer bağlanma ve yayılma karakteri sergiledikleri izlenmiştir. ZA uygulamasının yüzeyde fibroblast yapışmasını ve yayılmasını engelleyecek bir yüzey kimyası oluşturmadığı, DDLT uygulamasının yüzeyde yayılan hücre miktarı ve morfolojisine olumlu/olumsuz katkı sağlamadığını savunmaktayız.
6. Çalışmamızdan elde edilen tüm bu veriler doğrultusunda ZA'nın hücre proliferasyonu ve canlılığını inhibe ettiği, apoptozu artırdığı, ilerleyen zamanda toksik etkinin sürdüğü, DDLT'nin ZA'nın olumsuz etkilerini giderecek biyostimülan etkisinin yetersiz olduğu, farklı enerji seviyelerinde ve sürelerde DDLT uygulamaları ile düzenlenecek çalışmalara ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

## KAYNAKLAR

1. Abramovitch-Gottlib L, Gross T, Naveh D, Geresh S, Rosenwaks S, Bar I, Vago R. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci.* 2005;20:138-146.
2. Abu-Id MH, Warnke PH, Gottschalk J, Springer I, Wiltfang J, Acil Y, Russo PAJ, Kreuzsch T. “Bis-phosphy jaws”: High and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg.* 2008;36:95-103.
3. Açil Y, Möller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wiltfang J, Simon MJK. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* 2012; 40: 229-235.
4. Adornato MC, Morcos I, Rozanski J. The treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws with bone resection and autologous platelet-derived growth factors. *J Am Dent Assoc.* 2007;138:971-977.
5. Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:369–376.
6. Agis H, Blei J, Watzek G, Gruber R. Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblasts? *J Dent Res.* 2010;89:40-45.
7. Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Craniofac Surg.* 2007; 18:1071-75.
8. Akgün K. (2002). *Lazer. İçinde: Sarı H, Tüzün S, Akgün K. Hareket sistemi hastalıklarında fiziksel tıp yöntemleri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 73-81.*

9. Akintoye SO, Lam T, Shi S, Brahim J, Collins MT, Robey PG. Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*. 2006;38:758–768.
10. Allegra A, Oteri G, Nastro E, Alonci A, Bellomo G, Del Fabro V, Quartarone E, Alati C, De Ponte FS, Cicciù D, Musolino C. Patients with bisphosphonates associated osteonecrosis of the jaw have reduced circulating endothelial cells. *Hematol Oncology*. 2007;25:164–169.
11. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001;29:179-84.
12. American Dental Association Council on Scientific Affairs. Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy: expert panel recommendations. *Journal of American Dental Association*. 2006;137:1144-1150.
13. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65:369-376.
14. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate- related osteonecrosis of the jaw–2009 update. Approved by the Board of Trustees January 2009. *Australian endodontic journal: the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. December. 2009;35:119–130.
15. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontal*. 2000; 36: 59-97.

16. Arce K, Assael LA, Weissman JL, Markiewicz MR. Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:75-84.
17. Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A. In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia.* 1998;12:220-9.
18. Arndt KA, Noe JM, Northam DBC, Itzkan I. 'Laser Therapy'. *J Am Acad Dermatol.* 1981;5:649-654.
19. Arun Maiya G, Sagar MS, Fernandes D. Effect of low level helium-neon (he-ne) laser therapy in the prevention & treatment of radiation induced mucositis in head & neck cancer patients. *Indian J Med Res.* 2006;124:399-402.
20. Badros A, Weikel D, Salama A, Goloubeva O, Schneider A, Rapoport A, Fenton R, Gahres N, Sausville E, Ord R, Meiller T. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *J Clin Oncology.* 2006; 24: 945-952.
21. Bagan JV, Hens-Aumente E, Leopoldo-Rodado M, Poveda-Roda R, Bagan L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Study of the staging system in a series of clinical cases. *Oral Oncology.* 2012;48:753-757.
22. Balla B, Vaszilko M, Kosa JP, Podani J, Takacs I, Tobias B, Nagy Z, Lazary A, Lakatos P. Original Article. New approach to analyze genetic and clinical data in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *Oral Diseases.* 2012;18: 580-585.
23. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Mouloupoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, Koutsoukou V, Gika D, Anagnostopoulos A, Papadimitriou C, Terpos E, Dimopoulos MA. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncology.* 2005;23:8580-8587.

24. Basford JR. Low intensity laser therapy, stil not an established clinical tool. *Lasers Surg Med.* 1995;16:331-42.
25. Basford JR. Laser therapy. *Scientific Basis and Clinical Role Orthopedics.* 1993;16: 541-547.
26. Basford JR. The clinical and experimental status of low energy laser therapy. *Physical Rehabilitation and Medicine.* 1989;1:1-9.
27. Basi DL, Hughes PJ, Thumbigere-Math V, Sabino M, Mariash A, Lunos SA, Jensen E, Gopalakrishnan R. Matrix metalloproteinase-9 expression in alveolar extraction sockets of zoledronic acid-treated rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69:2698-2707.
28. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *International Journal of Dentistry.* 2012;12:1-6.
29. Basu N, Reid DM. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Menopause Int.* 2007;13:56-59.
30. Bauss F, Pfister T, Pappapoulos S. Ibandronate uptake in the jaw is similar to long bones and vertebrae in the rat. *J Bone Miner Metab.* 2008;26:406-408.
31. Baxter GD. *Therapeutic lasers, theory and practice.* 1st edn. New York: Churchill Livingstone; 1994; 35-39
32. Bayram H, Kenar H, Taşar F, Hasırcı V. Effect of low level lasertherapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2013;42:140–146.
33. Beckerman H, Bie RA, Bouter L, Cuyper HJ, Oostendrop R. The efficiency of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: A Criteria-based meta-analysis of randomised clinical trials. *Physical therapy.* 1992;72:483-491.

34. Bedogni A, Saia G, Ragazzo B, Capelli P, D'Alessandro E, Nocini PF, Lo Russo L, Lo Muzio L, Blandamura S. Bisphosphonate-associated osteonecrosis can hide jaw metastases. *Bone*. 2007;41:942-5.
35. Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ. Visualization of bisphosphonate induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone*. 2001;28:465-473.
36. Bhat AM. Lasers in prosthodontics- An overview part 1: Fundamentals of dental lasers. *Journal of Indian Prosthodontic Society*. 2010;10:13-26.
37. Bianchi SD, Scoletta M, Cassione BF, Migliaretti G, Mozzati M. Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104:249-58.
38. Bilezikian JP. Osteonecrosis of the jaw- do bisphosphonates pose a risk? *N Engl J Med*. 2006;355:2278-81.
39. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Mautalen C, Mesenbrink P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Eriksen EF, Cummings SR; HORIZON Pivotal Fracture Trial. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 2007;356:1809-22.
40. Blomen LJMJ: History of the bisphosphonates: discovery and history of the non-medical uses of bisphosphonates. In *Bisphosphonates on bones*. Edited by Bijvoet OLM, Fleisch HA, Canfield RE, Russell RGG. Amsterdam:Elsevier; 1995:111-124.
41. Boci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of Inflammation*. 2004; 13: 3-11.

42. Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G. Bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncology*. 2008;44:857-869.
43. Bonacina R, Mariani U, Villa F, Villa A. Preventive strategies and clinical implications for bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a review of 282 patients. *J Can Dent Assoc*. 2011;77:b147.
44. Bolton P, Young S, Dyson M. The direct effect of 860 nm light on cell proliferation and on succinic dehydrogenase activity of human fibroblasts in vitro. *Laser Therapy*. 1995;7:55-60.
45. Brouwers JEM, Lambers FM, Gasser JA, van Rietbergen B, Huiskes R. Bone degeneration and recovery after early and late bisphosphonate treatment of ovariectomized wistar rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int*. 2008;82:202–211.
46. Brozoski MA, Traina AA, Deboni MC, Marques MM, Naclério-Homem Mda G. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rev Bras Reumatol*. 2012;52:265-70.
47. Brown JP, Josse RG. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis society of canada. *Osteoporosis update*. 2002;1:19.
48. Burr DB, Allen MR. Mandibular necrosis in beagle dogs treated with bisphosphonates. *Orthod Craniofac Res*. 2009;12:221-228.
49. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Laser induced killing of photosensitized cariogenic bacteria. *J Dent Res*. 1992;71:675.
50. Campisi G, Di Fede O, Musciotto A, Lo Casto A, Lo Muzio L, Fulfaro F, Badalamenti G, Russo A, Gebbia N. Bisphosphonate related osteonecrosis of the

- jaw: run dental management designs and issues in diagnosis. *Ann Oncology*. 2007; 18:168-172.
51. Carvalho Pde T, Silva IS, Reis FA, Belchior AC, Facco GG, Guimaraes RN, Fernandes GH, Denadai AS. Effect of 650 nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. *Acta Cir Bras*. 2006;21: 4:63-8.
  52. Catone GA, Alling CC. *Laser Application in Oral and Maxillofacial Surgery*. Philadelphia, W. B. Saunders Co. 1997; 30-40.
  53. Cheng A, Mavrokokki A, Carter G, Stein B, Fazzalari NL, Wilson DF, Goss N. The dental implications of bisphosphonates and bone disease. *Australian Dental Journal*. 2005;50: 4-13.
  54. Chiandussi S, Biasotto M, Dore F, Cavalli F, Cova MA, Di Lenarda R. Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol*. 2006;35:236-243.
  55. Christopher Stone. *Plastic Surgery Facts*. 2nd Ed. Cambridge University Press; 2006. Chapter 1;82-83.
  56. Clavo B, Catala L, Perez JL, Rodríguez V, Robaina F. Ozone therapy on cerebral blood flow: a preliminary report. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2004;1:315-319.
  57. Clayman L, Clauser C. Effects of exposure time and pulse parameters on CO<sub>2</sub> osteotomies. *Lasers Surg Med*. 1989;9:22-9.
  58. Clayman L, Kuo P. *Lasers in maxillofacial surgery and dentistry*. 6th ed. New York: Thieme, 1997: 1-9.
  59. Coluzzi DJ. An overview of laser wavelengths used in dentistry. *Dent Clin North Am*. 2000;44:753-65.

60. Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers. *Laser in clinical dentistry*, Ed. By T. Vassala, 4, WB Saunders. New York. 2004;751-70.
61. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: a review. *J Clin Periodontol*. 1996;23:492-6.
62. Convissar RA. The biologic rationale for the use of lasers in dentistry. *Dent Clin N Am*. 2004;48:771-794.
63. Correia VdeF, Caldeira CL, Marques MM. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dent Traumatol*. 2006;22:312-317.
64. Costa L, Demers LM, Gouveia-Oliveira A, Schaller J, Costa EB, de Moura MC, Lipton A. Prospective evaluation of the peptide-bound collagen type I cross-links n-telopeptide and c-telopeptide in predicting bone metastases status. *J Clin. Oncology*. 2002;20:850-856.
65. Coviello V, Peluso F, Dehkhargani SZ, Verdugo F, Raffaelli L, Manicone PF, D'Addona A. Platelet-rich plasma improves wound healing in multiple myeloma bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw patients. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012;26:151-5.
66. Cozin M, Pinker BM, Solemani K, Zuniga JM, Dadaian SC, Cremers S, Landesberg R, Raghavan S. Novel therapy to reverse the cellular effects of bisphosphonates on primary human oral fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69:2564-2578.
67. Cremers SC, Pillai G, Papapoulos SE: Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44:551-570.

68. Curtis JR, Westfall AO, Cheng H, Delzell E, Saag KG. Risk of hip fracture after bisphosphonate discontinuation: implications for a drug holiday. *Osteoporos Int.* 2008;19:1613-20.
69. Curi M.M, phosphonate therapy by combining bone resection and autologous platelet-rich plasma: report of 3 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:349-55.
70. Curi MM, Cossolin GS, Koga DH, Zardetto C, Christianini S, Feher O, Cardoso CL, dos Santos MO. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws-an initial case series report of treatment combining partial bone resection and autologous platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69:2465-72.
71. Çiçek C, Bilgiç A. Klinik Viroloji Laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı: Bir model. *Turkish Journal of Infection.* 2006; 20: 231-241.
72. Çimşit M. Hiperbarik tıp. 1.basım. Eflatun yayınevi. Ankara. 2009; 2. kısım, 2.7. bölüm: 262-263.
73. Damante CA, Greggi SL, Sant'Ana AC, Passanezi E, Taga R. Histomorphometric study of the healing of human oral mucosa after gingivoplasty and low-level laser therapy. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2004;35:377-384.
74. Dederich DN, Bushick RD. Lasers in dentistry: Separating science from hype. *J Am Dent Assoc.* 2004;135:204-212.
75. De Mello ED, Pagnoncelli RM, Munin E, Filho MS, de Mello GP, Arisawa EA, de Oliveira MG. Comparative histological analysis of bone healing of standardized bone defects performed with the Er:YAG laser and steel burs. *Lasers Med Sci.* 2008;23:253-60.

76. Dickson GR, Clingen H, Jordan GR, Linton T. The effect of low level laser therapy on alkaline phosphatase expression during fracture repair. *Laser Therapy*. 1994;6:16.
77. Dimitrakopoulos I, Magopoulos C, Karakasis D. Bisphosphonate-induced avascular osteonecrosis of the jaws: a clinical report of 11 cases. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2006;35:588-593.
78. Dimopoulos MA, Kastritis E, Bamia C, Melakopoulos I, Gika D, Roussou M, Migkou M, Eleftherakis-Papaiakovou E, Christoulas D, Terpos E, Bamias A. Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *Ann Oncology*. 2009;20:117-20.
79. Dunstan CR, Felsenberg D, Seibel MJ. Therapy insight: the risks and benefits of bisphosphonates for the treatment of tumor-induced bone disease. *Nat Clin Pract Oncology*. 2007;4:42-55.
80. Durie B, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates (letter). *New Engl J Med*. 2005;353 99-102.
81. Ebetino FH, Bayless AV, Amburgey J, Ibbotson KJ, Dansereau S, Ebrahimpour A. Elucidation of a pharmacophore for the bisphosphonate mechanism of bone antiresorptive activity. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem*. 1996;109:217-220.
82. Eckert AW, Maurer P, Meyer L, Kriwalsky MS, Rohrberg R, Schneider D, Bilkenroth U, Schubert J. Bisphosphonate-related jaw necrosis severe complication in maxillofacial surgery. *Cancer Treat Rev*. 2007;33:58-63.
83. Evans CE, Braidman IP. Effects of two novel bisphosphonates on bone cells in vitro. *Bone Miner*. 1994;26:95-107.

84. Fan KF, Hopper C, Speight R, Buonaccorsi G, Bown SC. Photodynamic therapy using mTHPC for malignant disease in the oral cavity. *Int J Cancer*. 1997;73:25-32.
85. Farrugia MC, Summerlin DJ, Krowiak E, Huntley T, Freeman S, Borrowdale R, Tomich C. Osteonecrosis of the mandible or maxilla associated with the use of new generation bisphosphonates. *Laryngoscope*. 2006;116:115-120.
86. Featherstone JDB, Fried D. Fundamental interactions of lasers with dental hard tissues. *Med Laser Appl*. 2001;16:181-194.
87. Feldmeier JJ, Heimbach RD, Davolt DA, Brakora MJ. Hyperbaric oxygen and the cancer patient: a survey of practice patterns. *Undersea Hyperb Med*. 1993;20:337-345.
88. Feldmeier J, Carl U, Hartmann K, Sminia P. Hyperbaric oxygen: does it promote growth or recurrence of malignancy? *Undersea Hyperb Med*. 2003;30:1-18.
89. Ficarra G, Beninati F, Rubino I, Vannucchi A, Longo G, Tonelli P, Pini Prato G. Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 1123-1128.
90. Filleul O, Crompton E, Saussez S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. *J Cancer Res Clin Oncology*. 2010;136:1117-24.
91. Fishbane PM., Gasirowicz S, Thornton ST. *Temel Fizik Cilt-II*. (Çeviri: Prof. Dr. Cengiz Yalçın), 2. Baskı, Arkadaş Yayınevi 2003, Ankara. (İlgili Bölümler: 22-28).
92. Fleet JC, Cashman K, Cox K, Rosen V. The effects of aging on the bone inductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology*. 1996;37:4605-10.
93. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of actions. *Endocrine Reviews*. 1998;19:80-100.

94. Fleisch H. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur Spine J.* 2003;12:142-146.
95. Frank F. Laser light and tissue biophysical aspects of medical laser application. *SPIE Lasers Med.* 1989;1353:37-45.
96. Freiburger JJ, Padilla-Burgos R, Chhoeu AH, Kraft KH, Boneta O, Moon RE, Piantadosi CA. Hyperbaric oxygen treatment and bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a case series. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:1321-1327.
97. Freiburger JJ. Utility of hyperbaric oxygen in treatment of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:96-106.
98. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Laser Surg Med.* 2006;38:332-336.
99. Gangoiti MV, Cortizo AM, Arnol V, Felice JJ, McCarthy AD. Opposing effects of bisphosphonates and advanced glycation end-products on osteoblastic cells. *Eur J Pharmacol.* 2008;600:140-147.
100. Garant PR. Oral cells and tissues. *Quintessence.* 2003; Chapter 5:123-131.
101. Gasser JA, Ingold P, Venturiere A, Shen V, Green JR. Long-term protective effects of zoledronic acid on cancellous and cortical bone in the ovariectomized rat. *J Bone Miner Res.* 2008;23:544-551.
102. Goffinet M, Thoulouzan M, Pradines A, Lajoie-Mazenc I, Weinbaum C, Faye JC, Seronie-Vivien S. Zoledronic acid treatment impairs protein geranyl-geranylation for biological effects in prostatic cells. *BMC Cancer.* 2006;6:60.
103. Göktepe AS. *Laser İçinde N. Tuna (Ed.), Elektroterapi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.* 2001;155-161.

104. Grabb and Smith's. Plastic Surgery, 6th Ed. By Charles H. Thorne. 2007 By Lippincott Williams & Wilkins. Part 1. Chapter 2; 15-21.
105. Green JR, Müller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res.* 1994; 9: 745–751.
106. Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist.* 2004;9:3-13.
107. Groetz KA, Al-Nawas B. Persisting alveolar sockets-a radiologic symptom of BP-ONJ? *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64:1571-1572.
108. Guarneri V, Donati S, Nicolini M, Givannelli S, D'Amico R, Conte PF. Renal safety and efficacy of i.v. bisphosphonates in patients with skeletal metastases treated for up to 10 years. *Oncologist.* 2005;10:842-848.
109. Hakki SS, Bozkurt B. Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2012; 27: 325–331.
110. Harper RP, Fung E. Resolution of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the mandible: possible application for intermittent low-dose parathyroid hormone [rhPTH(1-34)]. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:573-80.
111. Hasmim M, Bieler G, Rüegg C. Zoledronate inhibits endothelial cell adhesion, migration and survival through the suppression of multiple, prenylation-dependent signaling pathways. *J Thromb Haemost.* 2007;5:166-173.
112. Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab.* 2009;27:663-672.

113. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami-HA, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer*. 2001;84:1126–1134.
114. Jefferey A. Rossmann. American Academy of Periodontology. Lasers in periodontics. *J Periodontol*. 2002;73:1231-39.
115. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2007;57:43-66.
116. Junqueira LCU, Carneiro J, Kelley RO. *Temel Histoloji, Barış Kitapevi, İstanbul*. 1998;5:104.
117. Kanis JA: Bone and cancer: pathophysiology and treatment of metastases. *Bone*. 1995;17:101-105.
118. Khadra M, Ronold HJ, Lyngstaddas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:325-332.
119. Kitchen SS, Partridge CJA. Review of low level laser therapy. *Physiotherapy*. 1991;72,984-1488.
120. Kravitz ND, Kusnoto B. Soft-tissue lasers in orthodontics: An overview. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008;133:110-114.
121. Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;30:365-9.
122. Kryger ZB, Sisco M. *Practical plastic surgery*. Landes Bioscience, U.S.A. Texas. 2007. Section I. Chapter 1;1-11.

123. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, Yatani H, Yoneda T. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab.* 2010;28:165-175.
124. Kurtuluş B. Distraksiyon osteogenezinde Er:YAG lazer osteotomisinin ve düşük düzeyli lazer tedavisinin yeni kemik oluşumu üzerindeki etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ağız dışı çene cerrahisi Anabilim dalı. Doktora Tezi. İstanbul 2010.S:38-60.
125. Kyrgidis A, Triaridis S, Antoniadis K. Effects of bisphosphonates on keratinocytes and fibroblast having a role in the development of osteonecrosis of the jaw. *Bioscience Hypotheses.* 2009;2:153-159.
126. Laakso EL, Richardson CR, Cramond T. Factors affecting low level laser therapy. *Aust J Physio.* 1993;39:95-99.
127. Lagdive S, Doshi Y, Maravar PP. Management of gingival hyperpigmentation using surgical blade and diode laser therapy: A comparative study. *J Oral Laser Appl.* 2009;9:41-47.
128. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, Garrett-Sinha L, Raghavan S. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:839-47.
129. Lazarovici TS, Mesilaty-Gross S, Vered I, Pariente C, Kanety H, Givol N, Yahalom R, Taicher S, Yarom N. Serologic bone markers for predicting development of osteonecrosis of the jaw in patients receiving bisphosphonates. *J Oral Maxillofac. Surg.* 2010;68:2241-2247.

130. Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, Pessin-Minsley M, Pfail J, Stock RG, Kogan R. Normal serum bone markers in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:389-91.
131. Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, Pessin-Minsley M, Pfail J, Stock RG, Kogan R. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws, bone markers, and a hypothesized candidate gene. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:159-166.
132. Li EC, Davis LE. Zoledronic acid: a new parenteral bisphosphonate. *Clin Ther.* 2003;25:2669-2708.
133. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Anatomy of the periodontium. *Clinical periodontology and implant dentistry.* 5th ed. Blackwell. 2008; Chapter 1. 3-26.
134. Lipton A, Milton S. The safety of zoledronic acid. *Expert Opin Drug Saf.* 2007;6:305-313.
135. Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1994;14:347-354.
136. Low S, Reed A. *Laser Therapy. Electrotherapy Explained Principles and Practice.* London: Butterworth- Heinemann. 1990;299-313.
137. Lyles KW, Colon-Emeric CS, Magaziner JS, Adachi JD, Pieper CF, Mautalen C, Hyldstrup L, Recknor C, Nordsletten L, Moore KA, Lavecchia C, Zhang J, Mesenbrink P, Hodgson PK, Abrams K, Orloff JJ, Horowitz Z, Eriksen EF, Boonen S; HORIZON Recurrent Fracture Trial. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med.* 2007;357:1799-809.
138. Mahajan A. Lasers in periodontics-a review. *European Journal of Dentistry and Medicine.* 2011;3:1-11.

139. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:1567-1575.
140. Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:2397-410.
141. Marx RE. Oral and intravenous bisphosphonates-induced osteonecrosis of the jaws: History, etiology, prevention and treatment. Hanover Park, Illinois Quintessence Books. 2012. 2nd Ed; 25-68.
142. Mather JP, Roberts PE. Introduction to cell and tissue culture theory and technique. 1998. Chapter 5;63-67.
143. Mayer HM., Müller G, Schwetlick G. Lasers in percutaneous disc surgery. *Acta Orthopaedics Scandinavia.* 1993;64:38-44.
144. McLeod NM, Brennan PA, Ruggiero SL. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaw: a historical and contemporary review. *Surgeon.* 2012;10:36-42.
145. McLeod NM, Davies BJ, Brennan PA. Bisphosphonate osteonecrosis of the jaws; an increasing problem for the dental practitioner. *Br Dent J.* 2007;203:641-644.
146. Mehrotra B, Fantasia J, Nissel Horowitz S, Vinarsky S, Sheth M, Ruggiero. Osteonecrosis of the maxilla; an unusual complication of prolonged bisphosphonate therapy; a case report. *Proc Am Soc Clin Oncology.* 2003; 22:795.
147. Melo MD, Obeid G. Osteonecrosis of the jaws in patients with a history of receiving bisphosphonate therapy: strategies for prevention and early recognition. *J Am Dent Assoc.* 2005;136:1675-81.

148. Merigo E, Manfredi M, Meleti M, Corradi D, Vescovi P. Jaw bone necrosis without previous dental extractions associated with the use of bisphosphonates (pamidronate and zoledronate): a four-case report. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2005; 34: 613-617.
149. Merli LA, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg*. 2005;23:212-5.
150. Midda M, Harper PR. Lasers in Dentistry. *Br Dent J*. 1991;343-346.
151. Milillo P, Garribba AP, Favia G, Ettorre GC. Jaw osteonecrosis in patients treated with bisphosphonates: MDCT evaluation. *Radiol Med (Torino)*. 2007;112:603-611.
152. Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncology*. 2003; 15:21:4253-4254.
153. Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE, Seneda LM. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer*. 2005;104:83-93.
154. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel M, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. *Journal of American Dental Association*. 2005;136:1658-68.
155. Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncology*. 2006;7: 508-514.
156. Monstrey SJ, Mullick P, Narayanan K, Ramasastry SS. Hyperbaric oxygen therapy and free radical production: an experimental study in doxorubicin (Adriamycin) extravasation injuries. *Ann Plast Surg*. 1997;38:163-8.

157. Montebugnoli L, Felicetti L, Gissi DB, Pizzigallo A, Pelliccioni GA, Marchetti C. Bisphosphonate-associated osteonecrosis can be controlled by nonsurgical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104:473-477.
158. Moritz A, Beer F, Goharkhay K, Schoop U, Strassl M, Verheyen P, Walsh L.J, Wernisch J, Wintner E. *Oral Laser Application.* Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin. 2006:38-55.
159. Morrone G, Guzzardella GA, Torricelli P, Fini M, Giardino R. In vitro experimental research of rabbit chondrocytes biostimulation with diode laser Ga-Al-As: a preliminary study. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology.* 1998;26:437-439.
160. Mortensen M, Lawson W, Montazem A. Osteonecrosis of the Jaw Associated With Bisphosphonate Use: Presentation of Seven Cases and Literature Review. *The Laryngoscope.* 2007;117:30-34.
161. Moseley H, Davison M, Allan D. Beam divergence of medical lasers. *Phys Med Biol.* 1985;30:853-857.
162. Mozzati M, Gallesio G, Arata V, Pol R, Scoletta M. Platelet-rich therapies in the treatment of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A report of 32 cases. *Oral Oncology.* 2012;48:469-474.
163. Nanci A. Ten Cate's. *Oral Histology Development, Structure and Function.* 7th Ed: Mosby Elsevier; 2008:64-69.
164. Nastro E, Musolino C, Allegra A, Oteri G, Cicciù M, Alonci A, Quartarone E, Alati C, De Ponte FS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast cancer. *Acta Haematol.* 2007; 117:181-187.

165. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. The Gingiva. Carranza's Clinical Periodontology. 10th Ed. WB Saunders Co. Chapter 1. 2007:46-60.
166. Niinikoski JH. Clinical hyperbaric oxygen therapy, wound perfusion, and transcutaneous oximetry. *World J Surg.* 2004;28:307-311.
167. Obradović R, Kesić L, Mihailović D, Ignjatović N, Uskoković D. Comparative efficacy analysis of biomaterials and soft lasers in repair of bone defects. *J Oral Laser Appl.* 2007;7:161-166.
168. Odvina CV, Zerwekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:1294-1301.
169. Otomo-Corgel J. Osteoporosis and Osteopenia: Implications for periodontal and implant therapy. *Periodontology.* 2000, 2012, 59:111-139.
170. Owens G, Jackson R, Lewiecki EM. An integrated approach: Bisphosphonate management for the treatment of osteoporosis. *Am J Manag Care.* 2007;13:290-308.
171. Parker S. Introduction, history of lasers and laser light production. *Brit Dent J.* 2007; 202: 21-31.
172. Parker S. Low-level laser use in dentistry. *Brit Dent J.* 2007;202:131-138.
173. Papapoulos SE. Bisphosphonate actions: physical chemistry revisited. *Bone.* 2006; 38: 613-616.
174. Pazianas M, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, Kothawala P. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with

- oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. *Clin Ther.* 2007;29:1548-1558.
175. Pazianas M, Cooper C, Ebetino FH, Russell RG. Long-term treatment with bisphosphonates and their safety in postmenopausal osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2010;21:325-43.
176. Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 2002;31:263-267.
177. Permar D. (Ed). *Oral embryology and microscopic anatomy.* Melfi RC, Alley KE. 10th Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2000. Chapter 2;237-247.
178. Peterson LJ, Ellis Edward, Hupp JR, Tucker MR. *Contemporary oral and maxillofacial surgery.* 4th Ed. Mosby. 2003, Chapter 4; 49-54.
179. Petrucci MT, Gallucci C, Agrillo A, Mustazza MC, Foa R. Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematologica.* 2007;92:1289-1290.
180. Polosukhin VV. Dynamics of the ultrastructural changes in blood and lymphatic capillaries of bronchi in inflammation and following endobronchial laser therapy. *Virchows Arch.* 1997;431:283-90.
181. Position Paper. Lasers in periodontics. *J Periodontol.* 1996;67:826-830.
182. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, Martin PM. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol.* 1990;137:171-178.

183. Pourzarandian A, Watanabe H, Aoki A, Ichinose S, Sasaki KM, Nitta H, Ishikawa I. Histological and TEM examination of early stages of bone healing after Er:YAG laser irradiation. *Photomed Laser Surg.* 2004;22:342-350.
184. Pozzi S, Marcheselli R, Sacchi S, Baldini L, Angrilli F, Pennese E, Quarta G, Stelitano C, Caparotti G, Luminari S, Musto P, Natale D, Broglia C, Cuoghi A, Dini D, Di Tonno P, Leonardi G, Pianezze G, Pitini V, Polimeno G, Ponchio L, Masini L, Musso M, Spriano M, Pollastri G; Gruppo Italiano Studio Linfomi. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: a review of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients. *Leuk Lymphoma.* 2007; 48: 56-64.
185. Pozzi S, Raje N. The role of bisphosphonates in multiple myeloma: mechanisms, side effects, and the future. *Oncologist.* 2011;16:651-662.
186. Prause AM. Dişhekimliği ve lazer sistemleri. *Dişhekimliğinde Klinik Dergi.* 2000; 13:44-47.
187. Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Archives of oral biology.* 2011;56:491-498.
188. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone.* 2007;41:318-20.
189. Ripamonti CI, Maniezzo M, Campa T, Fagnoni E, Brunelli C, Saibene G, Bareggi C, Ascani L, Cislighi E. Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumour patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan. *Ann Oncology.* 2009;20:137-45.
190. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6222-6230.

191. Rochkind S, Kogan G, Luger EG, Salame K, Karp E, Graif M, Weiss J. Molecular structure of the bony tissue after experimental trauma to the mandibular region followed by laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2004;22:249-253.
192. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer.* 2000;88:2961-2978.
193. Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Monkkonen J, Auriola S, Chilton KM, Russell RG. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone.* 1999;24:73-79.
194. Rossmann JA, Israel M. Laser de epithelization for enhanced guided tissue regeneration. *Dent Clin North.Am.* 2000;44:793-809.
195. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:527-534.
196. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: Background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod.* 2006;102:433-441.
197. Ruggiero SL, Mehrotra B. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: diagnosis, prevention, and management. *Annu Rev Med.* 2009;60:85-96.
198. Russell RGG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone.* 1999;25:97-106.
199. Russell RG. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics.* 2007; 119:150-162.

200. Saliba E, Foreman-Saliba S. Low-Level Laser Therapy. İçinde: Prentice, W. E. (Ed), Therapeutic Modalities in Rehabilitation. A.B.D.: The McGraw- Hill Companies. 2005;410-426.
201. Sarı, H., Tüzün, S. ve Akgün, K. Fiziksel Tıp Yöntemleri. İstanbul: 2002. Nobel Tıp Kitabevi.
202. Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol.* 2009;144:667-676.
203. Scheper M, Chaisuparat R, Cullen K, Meiller T. A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010;3:1-11.
204. Schwartz HC. Osteonecrosis and bisphosphonates: correlation versus causation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:763-764.
205. Schwartz S. Principles of surgery. 9th Ed..2010; Chapter 9 :490-503.
206. Scoletta M, Arduino PG, Dalmaso P, Broccoletti R, Mozzati M. Treatment outcomes in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110:46-53.
207. Scoletta M, Arduino PG, Reggio L, Dalmaso P, Mozzati M. Effect of low level laser irradiation on bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: preliminary results of a prospective study. *Photomed Laser Surg.* 2010;28:179-184.
208. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover Part I: Biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005;26:97-122.

209. Sengir O. Fizik Tedavi. İstanbul. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 1984.
210. Shannon J, Shannon J, Modelevsky S, Grippo AA. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59:2350-5.
211. Shokrollahi K, Raymond E, Murison MSC. Lasers: Principles and surgical applications. *The Journal of Surgery.* 2004;2:28-34.
212. Silverman SL, Landesberg R. Osteonecrosis of the jaw and the role of bisphosphonates: a critical review. *Am J Med.* 2009;122:33-45.
213. Simoes A, Nicolau J, Souza DN, Ferreira LS, Eduardo CP, Apel C, Gutknecht N. Effect of defocused infrared diode laser on salivary flow rate and some salivary parameters of rats. *Clin Oral Invest.* 2008;12:25-30.
214. Simon MJK, Niehoff P, Kimmig B, Wiltfang J, Açıl Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clinical Oral Investigations.* 2010;14:51-58.
215. Song K, Min Y, Lee J, Lee KB, Joo HJ, Kwack K, Chung Y. A Probable case of oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw and recovery with parathyroid hormone treatment. *Current Therapeutic Research.* 2008;69:356-62.
216. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman M, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonates-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncology.* 2009;2:164-172.
217. Stefanik D, Sarin J, Lam T, Levin L, Leboy PS, Akintoye SO. Disparate osteogenic response of mandible and iliac crest bone marrow stromal cells to pamidronate. *Oral Dis.* 2008;14:465-71.

218. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005;23:161-166.
219. Stockmann P, Vairaktaris E, Wehrhan F, Seiss M, Schwarz S, Spriewald B, Neukam FW., Nkenke E. Osteotomy and primary wound closure in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A Prospective clinical study with 12 months follow-up. *Supportive Care In Cancer.* 2010;18:449-460.
220. Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1988;17:388-391.
221. Tanvetyanon T, Stiff PJ. Management of the adverse effects associated with intravenous bisphosphonates. *Ann Oncology.* 2006;17:897-907.
222. Tekelioğlu M. Genel Tıp Histolojisi. Beta Yayınevi, İstanbul, 1998; 116.
223. Toricelli P, Giavaresi G, Fini M. Laser biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2001;55:117-120.
224. Treister N, Sheehy N, Bae EH, Friedland B, Lerman M, Woo S. Dental panoramic radiographic evaluation in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis.* 2009;15:88-92.
225. Tuner J, Hode L. Depth of penetration of laser light in tissue. *Laser Partner. Clinixperience.* Chapter 15, 2000:1-3.
226. Van Beek ER., Löwik CW, Papapoulos SE. Bisphosphonates suppress bone resorption by a direct effect on early osteoclast precursors without affecting the osteoclastogenic capacity of osteogenic cells: the role of protein

geranylgeranylation in the action of nitrogen-containing bisphosphonates on osteoclast precursors. *Bone*. 2002;30:64-70.

227. Van den Wyngaert T, Huizing MT, Vermorken JB. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: cause and effect or a post hoc fallacy? *Ann Oncology*. 2006;17:1197-1204.
228. Van den Wyngaert T, Huizing MT, Vermorken JB. Osteonecrosis of the jaw related to the use of bisphosphonates. *Curr Opin Oncology*. 2007;19:315-322.
229. Van Poznak C, Estilo C. Osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving IV bisphosphonates. *Oncology*. 2006;20:1053-1062.
230. Verdaasdonk RM, van Swol CF. Laser light delivery systems for medical applications. *Phys Med Biol*. 1997;42:869-894.
231. Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Fornaini C, Nammour S, Manfredi M. Nd:Yag laser biostimulation of bisphosphonate-associated necrosis of the jawbone with and without surgical treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007;45:628-632.
232. Vescovi P, Merigo E, Manfredi M, Meleti M, Fornaini C, Bonanini M, Rocca JP, Nammour S. Nd:YAG laser biostimulation in the treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: clinical experience in 28 cases. *Photomed Laser Surg*. 2008;26:37-46.
233. Vidinsky B, Gal P, Toporcer T, Balogacova M, Hutnanova Z, Kilik R, Bober J, Sabo J, Longauer F. Effect of laser irradiation of diode laser on healing of surgical wounds in rats. *Rozhl Chir*. 2005;84:417-421.
234. Vieillard MH, Maes LM, Penel G, Facon T, Magro L, Bonnetterre J, Cortet B. Thirteen cases of jaw osteonecrosis in patients on bisphosphonate therapy. *Joint Bone Spine*. 2008;75:34-40.

235. Wagner RF JR, Brown T, MC Carthy EM. What is low level laser therapy? *Dermatologic Surgery*. 2007;26:7237.
236. Walker K, Medhurst SJ, Kidd BL, Glatt M, Bowes M, Patel S, McNair K, Kesingland A, Green J, Chan O, Fox AJ, Urban LA. Disease modifying and antinociceptive effects of the bisphosphonate, zoledronic acid in a model of bone cancer pain. *Pain*. 2002;100:219-229.
237. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. I. Soft tissue applications. *Aust Dent J*. 1997;42:247-254.
238. Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. *Aust Dent J*. 2003; 48:146-155.
239. Wang EP, Kaban LB, Strewler GJ, Raje N, Toulis MJ. Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:1328-1331.
240. Wang PH, Yuan CC, Lai CR, Chao HT, Tseng JY, Chiang H, Lee WL, Lee SD, Ng HT. Rapid progression of squamous cell carcinoma of the cervix after hyperbaric oxygenation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999;82:89-91.
241. Wang HL, Weber D, McCauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: literature review and a case report. *J Periodontol*. 2007; 78:584-594.
242. Weitzman R, Sauter N, Eriksen EF, Tarassoff PG, Lacerna LV, Dias R, Altmeyer A, Csermak-Renner K, McGrath L, Lantwicki L, Hohneker JA. Critical review: Updated recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in cancer patients. *Crit Revs Oncol Hematol*. 2007;62: 148-152.

243. Wipff J, Adamsbaum C, Kahan A, Job-Deslandre C. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis. *Joint Bone Spine*. 2011;78:555-560.
244. Wong SF, Wilder-Smith P. Pilot study of laser effects on oral mucositis in patients receiving chemotherapy. *Cancer J*. 2002;8:247-54.
245. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:1055–1061.
246. Woo S, Hellstein JW, Kalmar JR. Systemic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*. 2006;144:753-761.
247. Yasukawa A, Ohru H, Koyama Y, Nagai M, Takakuda K. The effect of low reactive-level laser therapy (lllt) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. *J Vet Med Sci*. 2007;69:799-806.
248. Yaylalı C. Tendon kılıfı fibroblastlarının hücre kültüründe tenositlere farklılaşması ve tenositlerin sentezlediği kollajen tiplerinin belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi yayınları, Biyoloji Anabilim dalı, Yüksek lisans tezi. Ankara; 2007: 3.
249. Yazıcı RA, Dayangaç B., Dişhekimliği ve lazer. Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi. 1998;23:20-29.
250. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol*. 1994;59:167-170.

**FORMLAR**

## BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

### *Sorumlu Araştırmacının Beyanı*

Yirmi yaş dişi olarak adlandırılan dişlerin folikülleri belirli ortodontik nedenlerden dolayı ameliyatla alınır. Alınan folikül bu operasyonlar sonucu elde edilen bir atık materyal olup atılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu atık materyalin kök hücre içerdiğini ve bu hücrelerin doku mühendisliği açısından büyük öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur. Dental folikül kök hücreleri deneysel pek çok çalışmanın ana malzemesi olarak bilime hizmet etmektedir.

Biz de insan dental folikülü içerisinde bulunan değerli kök hücrelerin izole edilmesi ve bu hücrelerin bifosfonat kullanımına bağlı uğradıkları değişikliklerin ve düşük düzeyli laser tedavisine verdikleri cevabın belirlenmesini amaçlayan **“Düşük doz lazer tedavisinin bifosfonat kullanımına bağlı gelişen çene osteonekrozlarında çevre yumuşak dokuda biyostimüle edici etkisinin in vitro değerlendirmesi”** adlı bir araştırma yapmaktayız. Bizim yaptığımız ve bu konuda dünyada yapılan diğer araştırmalardan elde edilen sonuçlar gelecekte bifosfonat kullanımına bağlı gelişen yan etkilerin tedavisine katkıda bulunabilir.

Özetle bu araştırmada biz, sizden operasyon sonucu çöpe atılacak olan dişinizden elde ettiğimiz dental folikülden kök hücre izolasyonu yapıp bu hücrelerin çoğalma ve farklılaşma potansiyellerini araştıracağız. Araştırmada hücrelerin davranış biçimleri incelenecek, hücreler herhangi bir şekilde depolanmayacak, tedavi veya ticari amaçlı kullanılmayacaklardır.

Size dental folikülünüzden elde edebileceğimiz hücrelerinizi araştırma amaçlı kullanmamıza izin vererek, bu araştırmaya katılmanızı teklif ediyoruz.

Bu araştırmaya katılırsanız, size ait bilgilerin gizliliğine büyük saygı gösterilecek ve ihtimamla korunacaktır. Tedavinizin normal ücreti dışında, araştırmada yapılacak harcamalarla ilgili, herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyeceksiniz.

Bu araştırmaya gönüllü katılmaya karar verdiğiniz için de size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmaya katılmak zorunda değilsiniz. Araştırmaya katılmadığınız için tıbbi bakımınıza ve benim ile olan ilişkinize herhangi bir zarar gelmeyecektir.

### ***Katılımcının/Hastanın Beyanı***

Sayın Prof. Dr. Özen Onur tarafından İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olmam teklif edildi.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim.Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim.Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım.Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "**dişim ve çevre dokusunda bulunan hücrelerimin araştırma amaçlı kullanılmasında hiçbir sakınca olmadığı**" kararını aldım.Yapılacak araştırmaya bu sayede verdiğim destekten tüm kalbimle mutluluk duymaktayım.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

**GÖNÜLLÜNÜN**

Adı, soyadı: .....  
Adres: .....  
Tel: .....  
İmza: .....  
Tarih: .....

**VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN**

Adı, soyadı: .....  
Adres: .....  
Tel: .....  
İmza: .....  
Tarih: .....

**AÇIKLAMAYI YAPAN ARAŞTIRMACININ**

Adı, soyadı: .....  
Adres: .....  
Tel: .....  
İmza: .....  
Tarih: .....

**RIZA ALMA İŞLEMİNDE BAŞTAN SONA TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİNİN**

Adı, soyadı: .....  
Adres: .....  
Tel: .....  
İmza: .....  
Tarih: .....

## HASTA TAKİP FORMU

### **Hastaya ait bilgiler:**

*Adı Soyadı:* .....

*Yaşı:* .....

*Doğum Yeri:* .....

*Telefon:* .....

*Adres:* .....

### **Sistemik değerlendirme:**

*Kardiyovasküler sistem:* .....

*Santral sinir sistemi:* .....

.....

.....

*Solunum sistemi:* .....

*Sindirim sistemi:* .....

.....

.....

*Endokrin sistem:* .....

*Hematopoyetik sistem:* .....

.....

.....

*Allerjiler:* .....

*Genitoüriner sistem:* .....

.....

.....

*Kemik/eklem rahatsızlıkları:* .....

*Neoplazmalar:* .....

.....

.....

*Kullanılan ilaçlar:* .....

*Hamilelik/Kontraseptif kullanımı:* .....

.....

.....

### **Araştırmaya alınacak dişe ait bilgiler:**

*Operasyon tarihi:* .....

*Operasyonu yapan hekim ve kurumu:* .....

*Radyolojik muayene:* .....

.....

*Klinik muayene:* .....

.....

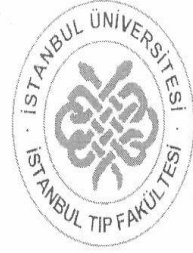
*Dişe ait postoperatuar bulgular:* .....

.....

## **ETİK KURUL KARARI**



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 908

Tarih : 03.06.2011

Konu : Prof.Dr. Özen Doğan ONUR hk,

Sayın Prof. Dr. Özen Doğan ONUR  
Diş Hekimliği Fakültesi - Klinik Bilimleri Bölümü  
Ağız, Diş, Çene Hastalıkları Cerrahi Anabilim Dalı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Doktora Öğrencisi Dt. Nesimi SOFİYE'ın yürüteceği 2011/826-576 dosya numaralı "Düşük Düzey Lazer Tedavisinin Bifosfonata Bağlı Çene Osteonekrozlarında Çevre Yumuşak Dokudaki Biyostimüle Edici Etkisinin İn Vitro Değerlendirmesi" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 27.05.2011 tarihli 08 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

## KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	İstanbul Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Hulusi Behçet Kütüphanesi Kat 3 Çapa Fatih/İstanbul 34380
TELEFON	0 212 414 20 00 – 313 46
FAKS	0 212 414 21 53
E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Düşük Düzey Lazer Tedavisinin Bifosfonata Bağlı Çene Osteonekrozlarında Çevre Yumuşak Dokudaki Biyostimüle Edici Etkisinin İn Vitro Değerlendirmesi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU	-			
	EUDRACT NUMARASI	-			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Özen Doğan ONUR			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Diş Hekimliği			
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Özen Doğan ONUR			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Diş Hekimliği			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi			
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	İstanbul Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ	AKADEMİK AMAÇLI (X)		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1			
		FAZ 2			
FAZ 3					
FAZ 4					
BE/BY					
DİĞER		Diğer ise belirtiniz:			
İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA		Belirtiniz:			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	ÇOK MERKEZLİ X	ULUSAL X	ULUSLARARASI	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	01.02.2011	1	Türkçe X	İngilizce	Diğer
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-		Türkçe	İngilizce	Diğer
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	01.02.2011	1	TürkçeX	İngilizce	Diğer
	OLGU RAPOR FORMU	-		Türkçe	İngilizce	Diğer

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	X	
	SIGORTA		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ		
	İLAN		
	YILLIK BİLDİRİM		
	SONUÇ RAPORU		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		
DİĞER		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 08	Tarih : 27.05.2011
	Prof. Dr. Özen Doğan ONUR ve Doktora Öğrencisi Dt. Nesimi SOFİYEV'in koordinatörlüğü ve sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen tez başvuru dosyası ve araştırma ile ilgili belgeler gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

## ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	İstanbul Üniversitesi İnsan Denekler Üzerinde Yürütülecek Bilimsel Araştırmalar ve Etik Değerlendirme Kurulları Yönergesi, 10 Aralık 2010 tarihli, T.C. Sağlık Bakanlığı İyi Klinik Uygulamaları Klavuzu
---------------	--

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN

## ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E X	K	E H X	E X H	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E	K X	E H X	E X H	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	EX	K	E H X	E HX	T.Katılmadı.
Prof. Dr. Rukiye EKER ÖMEROĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İstanbul Tıp Fakültesi	E	K X	E H X	EX H	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	EX	K	E H X	EX H	
Prof. Dr. Pınar SAİP	Onkoloji	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü	E	K X	E H X	EX H	
Uzm. Dr. Ahmet Rıza URAS	Biyokimya	Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araş.Hast.Biyokimya	EX	K	E H X	EX H	
Prof.Dr. Ayşen BULUT	Halk Sağlığı	Emekli	E	K X	E H X	E HX	T.Katılmadı.
Doç.Dr. Tufan TÜKEK	İç Hastalıkları	Okmeydanı Eğitim ve Araş.Hast.İç Hast.1.Dahiliye Kliniği	EX	K	E H X	E HX	T.Katılmadı.
Prof. Dr. Ünal KUZGUN	Ortopedi	Şişli Etfal E. ve Arş. Hst	EX	K	E H X	EX H	
Prof. Dr. Ahmet O. ARAMAN	Eczacılık	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	EX	K	E H X	E HX	T.Katılmadı.
Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK	Hukukçu	İstanbul Üniversitesi	E	K X	E H X	EX H	
Prof. Dr. Demir TIRYAKI	Biyofizik	Emekli	EX	K	E H X	E HX	T.Katılmadı.
M. Kerim AKMAN	İİBF İktisat bölümü	Özel (Ekonomist)	EX	K	E H X	EX H	

\* :Araştırma ile ilişki

\*\* :Toplantıda Bulunma

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	NESİMİ	<b>Soyadı</b>	SOFUOĞLU
<b>Doğ.Yeri</b>	BAKÜ/AZERBAYCAN	<b>Doğ.Tar.</b>	08.03.1982
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	65905360352
<b>Email</b>	nesimisofi@gmail.com	<b>Tel</b>	05554763817

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2014
<b>Yük.Lis.</b>	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2007
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2003-2007
	Azerbaycan Tıp Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2002-2003
<b>Lise</b>	Mehti Hüseyinzade orta öğretim okulu	1999