



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

**DİYABETİK RATLARDA OLUŞTURULAN KALVARYAL DEFEKTLERDE
DEĞİŞİK GREFT MATERYALLERİ İLE KOMBİNE OLARAK UYGULANAN
OZONUN KEMİK REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

AYSAN LEKTEMÜR ALPAN

**DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

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

**DİYABETİK RATLARDA OLUŞTURULAN KALVARYAL DEFEKTLERDE
DEĞİŞİK GREFT MATERYALLERİ İLE KOMBİNE OLARAK UYGULANAN
OZONUN KEMİK REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

AYSAN LEKTEMÜR ALPAN

**DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HÜLYA TOKER**

SİVAS-2015

“Diyabetik Ratlarda Oluşturulan Kalvaryal Defektlerde Değişik Greft Materyalleri ile Kombine Olarak Uygulanan Ozonun Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkinliğinin Araştırılması” adlı **Doktora** Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Periodontoloji** Ana Bilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Doç.Dr. Mustafa TUNALI	_____
Üye	Doç.Dr. H. Hüseyin KÖŞGER	_____
Üye	Yrd.Doç.Dr. Vildan BOSTANCI	_____
Üye	Yrd.Doç.Dr. Hatice BALCI YÜCE	_____
Üye (Danışman)	Prof.Dr.Hülya TOKER	_____

ONAY

Bu tez çalışması, 03.12.2015 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. ZAHİD TEVFIK AĞAOĞLU
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

ÖZET

DİYABETİK RATLARDA OLUŞTURULAN KALVARYAL DEFEKTLERDE DEĞİŞİK GREFT MATERYALLERİ İLE KOMBİNE OLARAK UYGULANAN OZONUN KEMİK REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Aysan LEKTEMÜR ALPAN

Doktora Tezi

Periodontoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hülya TOKER

2015, 92 sayfa

Bu çalışmanın amacı; diyabetik ratlarda, oluşturulan kalvaryal defektlerin farklı greft materyalleri ile restorasyonu sonrası uygulanan ozon gazının kemik iyileşmesi üzerine etkisinin morfolojik ve immünohistokimyasal açıdan araştırılmasıdır.

84 Wistar erkek ratta 50mg/kg streptozotosin (STZ) intraperitoneal olarak uygulanarak diyabet oluşturuldu. Deneysel diyabet sonrası ratlar rastgele 6 gruba ayrıldı: Boş defekt (Kontrol, n=14) grubu, Otojen greft (OG, n=14) grubu, Ksenogreft (KG, n=14) grubu, Boş defekte ozon uygulaması (Kontrol+Ozon, n=14) grubu, Otojen greftle kombine ozon uygulaması (OG+Ozon, n=14) grubu, Ksenogreftle kombine ozon uygulaması (KG+Ozon, n=14) grubu. Ratlarda 5mm boyutunda kalvaryal defektler oluşturuldu. OG gruplarına otojen greft, KG gruplarına ise sığır kaynaklı ksenogreft uygulandı. Defekt bölgesine, cerrahi sırasında ve takiben 2 hafta boyunca her gün ozon gazı uygulandı. Histolojik analizlerde rezorptif lakün sayısı, osteoblast ve osteoklast sayısı incelendi. Görüntü analiz programı ile defekt dolun alanı ölçüldü. KG gruplarında yeni oluşmuş kemik ve kalan greft materyali ayrıca hesaplandı. Osteokalsin ve kemik morfojenik protein-2 (KMP-2) analizleri immünohistokimyasal olarak gerçekleştirildi.

Deney süresince hiperglisemi tablosu devam etti. Histopatolojik analiz sonuçlarına göre KG gruplarında 4. haftada rezorptif lakün sayısı diğer gruplara göre

yüksekti ($p<0.05$). Osteoklast sayısı 4. haftada KG+Ozon grubunda diğer tüm gruplardan daha yüksekti ($p<0.05$). OG+Ozon grubunda ise osteoklast sayısı 4. haftaya oranla 8. haftada artış gösterdi ($p<0.05$). 4. haftada OG+Ozon ve KG+Ozon grupları, OG ve KG gruplarından daha fazla defekt dolum alanına sahipti ($p<0.05$). İmmünohistokimyasal analizlerin sonuçlarına göre, 4. haftada OG+Ozon ve KG+Ozon gruplarındaki KMP-2 pozitif hücre yüzdesi diğer gruplardan daha yüksekti. Ayrıca tüm gruplarda osteokalsin pozitif hücre miktarı Kontrol gruplarından daha yüksekti. 8. hafta analizlerinde ise defekt dolum miktarı ozon uygulanan greft gruplarında daha fazla olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı değildi.

Bu çalışmanın sınırları dahilinde, diyabetik ratlarda oluşturulan kalvaryal defektlere uygulanan ozon, özellikle erken iyileşme döneminde otojen greft ve ksenogreft rejenerasyonunu hızlandırmıştır. Bununla beraber, diyabete bağlı olumsuz etkileri elimine etmede farklı doz ve sürelerde ozon uygulamasının sonuçları araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: diyabet, kalvaryal defekt, kemik rejenerasyonu, ksenogreft, otogreft, ozon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFICIENCY OF OZONE APPLICATION COMBINED WITH DIFFERENT GRAFT MATERIALS ON BONE REGENERATION IN CALVARIAL DEFECTS OF DIABETIC RATS

Aysan LEKTEMÜR ALPAN

Ph.D. Thesis

Department of Periodontology

Supervisor: Prof. Dr. Hülya TOKER

2015, 92 pages

The aim of this study is to investigate the effect of gaseous ozone on bone healing in diabetic rat calvarial defects that restored with different type of graft materials morphometrically and immunohistochemically.

Diabetes was induced by using 50mg/kg streptozotocin (STZ) on 84 male Wistar rats intraperitoneally. Rats were randomly divided into 6 groups after induction of diabetes: Empty defect (Control, n=14) group, Autogenous bone graft (AG, n=14) group, Xenograft (XG, n=14) group, Ozone application to empty defect (Control+Ozone, n=14) group, Autogenous bone graft combination with ozone application (AG+Ozone, n=14) group, Xenograft combination with ozone application (XG+Ozone, n=14) group. 5mm diameter calvarial defects were created in the rats. Autogenous bone was applied to AG groups and bovine derived xenograft was applied to XG groups. Gaseous ozone was applied to defect area on the operation day and the following 2 weeks daily. Resorptive lacunae, osteoblast and osteoclast were analyzed histologically. Total bone area, newly formed bone and residual graft material were measured using by image analysis program. Osteocalcin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) analyses were carried out immunohistochemically.

Hyperglycemia with high blood glucose values were observed in the rats during the experimental process. In XG groups at 4th week resorptive lacunae numbers were higher than the other groups ($p<0.05$). Osteoclast numbers at 4th week in XG+Ozone group were higher than the all other groups ($p<0.05$). Osteoclasts in AG+Ozone group increased at 8th week comparing to at 4th week ($p<0.05$). AG+Ozone and XG+Ozone groups revealed more total bone area than the AG and XG groups at 4th week ($p<0.05$). AG+Ozone and XG+Ozone groups revealed more BMP-2 positive cell percentage than the other groups at 4th week according to immunohistochemical analysis. Also osteocalcin positive cell percentage in all groups was higher than the Control group ($p<0.05$). Although total bone area in ozone applied grafted groups was higher at 8th week, this result was not statistically significant.

Within the limits of this study, ozone application to calvarial defects in diabetic rats increased autogenous bone and xenograft regeneration, especially, at early healing phase. In addition to further studies should investigate different dosages and application times of ozone to elimination of diabetic complications.

Key words: diabetes, calvarial defect, bone regeneration, xenograft, autograft, ozone

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime devam etmeme vesile olan ve eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, çalışkanlığı, özverisi, disiplini ve adaletini örnek aldığım, beni destekleyen, hayata ve eğitimime dair tüm deneyimlerini paylaşan değerli hocam *Prof. Dr. Hülya TOKER*'e

Tez çalışmamda histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelerde yardımlarından dolayı *Doç. Dr. Hatice ÖZER*'e

Tez çalışmamı destekleyen *Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı*'na (CÜBAP),

Doktora öğrenimim süresince desteklerini esirgemeyen bölüm öğretim üyeleri *Yrd. Doç Dr. Aysun AKPINAR*, *Doç. Dr. Hakan DEVELİOĞLU*, *Yrd. Doç. Dr. Vildan BOSTANCI*, *Yrd. Doç. Dr. Emine PİRİM GÖRGÜN*'e, asistan arkadaşlarıma ve tüm personele,

Doktora eğitimim süresince beni özveriyle ve içtenlikle destekleyen biricik eşim *Mehmet ALPAN*'a, canım oğlum *Kerim ALPAN*'a ve tüm aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK.....	i
ONAY.....	ii
YÖNERGE.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Diabetes Mellitus	5
2.1.1 Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)	5
2.1.2 Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)	6
2.1.3 Gestasyonel Diyabet.....	6
2.1.4 Diyabetin Tanısı	7
2.2 Diyabetik Hastalarda Periodontitis Gelişimiyle İlgili Potansiyel Faktörler.....	8
2.2.1 Değişmiş İmmün Hücre Fonksiyonu ve Sitokin Üretimi.....	9
2.2.2 Kollajen ve İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE)	10
2.2.3 Vasküler Değişiklikler ve Yara İyileşmesindeki Değişiklikler	11
2.2.4 Lipit Metabolizmasına Etkileri	12
2.2.5 Kemik Metabolizmasına Etkileri	13
2.3 Periodontal Tedavinin Diyabet ve Glisemik Kontrol Üzerine Etkileri.....	15
2.4 Deneysel Diyabet Modeli.....	16
2.5 Periodontal Rejenerasyon.....	17
2.5.1 Otojen Greftler	20
2.5.2 Allogreftler	22
2.5.3 Ksenogreftler	23
2.5.4 Sentetik (Alloplastik) Kemik Ürünleri.....	27
2.6 Kemik Yapımı ve Yıkımının Mekanizması ve Biyokimyasal Belirteçleri.....	28
2.6.1 Osteokalsin.....	31
2.6.2 Kemik Morfojenik Protein (KMP)	32
2.6.2.1 Kemik Morfojenik Protein-2 (KMP-2)	32
2.7 Kalvaryal Defekt Modeli.....	33

2.8 Ozon	35
2.8.1 Yapay Ozon Üretimi ve Ozon Jeneratörleri.....	37
2.8.2 Ozonun Biyolojik Etkileri	38
2.8.3 Ozon Toksisitesi.....	39
2.8.4 Ozon Tedavisinin Diş Hekimliği Alanında Kullanımı.....	39
2.8.5 Ozon Tedavisinin Periodontolojide Kullanımı	40
3. GEREÇ ve YÖNTEM	43
3.1 Deneysel Diyabet Oluşturulması.....	43
3.2 Kalvaryal Defekt Modeli.....	44
3.3 Ozon Uygulanması.....	45
3.4 Ratların Sakrifiye Edilmesi	45
3.5 Histopatolojik İşlemler	46
3.6 Histomorfometrik Değerlendirmeler.....	47
3.7 İmmünohistokimyasal İşlemler	47
3.8 İstatistiksel Değerlendirmeler	47
4. BULGULAR.....	48
4.1 Klinik Bulgular.....	48
4.2 Histopatolojik Bulgular	50
4.3 Histomorfometrik Değerlendirmeler.....	55
4.4 İmmünohistokimyasal Analizler	58
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	72
7. KAYNAKLAR	73
İZİNLER.....	91
EK 1. Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	
ÖZGEÇMİŞ	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1	Diyabetik periodontitisin patogenezi yolları	12
Şekil 2.2	Diyabetin osteoklastogenezisi artırma mekanizması	13
Şekil 2.3	Diyabetin kemik formasyonunu azaltma mekanizması	14
Şekil 2.4	Kemik remodelasyon döngüsü	30
Şekil 2.5	Ozon gazının oluşumu	36
Şekil 3.1	A-Duramater korunarak oluşturulmuş defekt. B-Ksenogreft üzerine ozon uygulanması	45
Şekil 3.2	Prozone Ozon Jeneratörü	45
Şekil 4.1	Gruplara ait 4. hafta histopatolojik görüntüler (HE, 40x)	50
Şekil 4.2	Gruplara ait 8. hafta histopatolojik görüntüler (HE, 40x)	51
Şekil 4.3	Deney gruplarına ait 4. ve 8. hafta rezorptif lakün sayısı ortalamaları	52
Şekil 4.4	Deney gruplarına ait 4. ve 8. hafta osteoklast sayısı ortalamaları	53
Şekil 4.5	Deney gruplarına ait 4. ve 8. hafta osteoblast sayısı ortalamaları	54
Şekil 4.6	Deney gruplarına ait 4. ve 8. hafta ortalama defekt dolmuş alanı	55
Şekil 4.7	Gruplara ait 4. hafta histopatolojik görüntüler (HE)	56
Şekil 4.8	4. ve 8. haftada gruplara ait KMP-2 pozitif hücre yüzdeleri	58
Şekil 4.9	OG ve KG gruplarına ait 4. hafta KMP-2 immünohistokimyasal boyama görüntüleri (x100)	59
Şekil 4.10	4. ve 8 haftada gruplara ait osteokalsin pozitif hücre yüzdeleri	60
Şekil 4.11	OG ve KG gruplarına ait 4. hafta osteokalsin immünohistokimyasal boyama görüntüleri (x100)	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1 Periodontal hastalığın risk faktörleri	4
Çizelge 4.1 Deney sonunda gruplarda kalan rat sayıları	48
Çizelge 4.2 Deney gruplarındaki ratların 4. haftadaki kan glikoz düzeyleri ve kilolarının ortalama değerleri	49
Çizelge 4.3 Deney gruplarındaki ratların 8. haftadaki kan glikoz düzeyleri ve kilolarının ortalama değerleri.	49
Çizelge 4.4 KG gruplarına ait kalan greft miktarı ve yeni oluşan kemik miktarının ortalamaları (ort±standart sapma).	57

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGE	İleri glikasyon son ürünleri
Fra-1	Fos ilişkili antijen-1
HbA1c	Glikolizlenmiş hemoglobin
HE	Hematoksilen-Eosin
KG	Ksenogreft
KMP	Kemik Morfojenik Protein
OG	Otojen greft
OPG	Osteoprotegerin
PKC-α	Protein kinaz C alfa
PKC-β	Protein kinaz C beta
RANK	Nükleer faktör kappa B reseptör aktivatörü
RANKL	Nükleer faktör kappa B ligandının reseptör aktivatörü
Runx2	Runt ilişkili transkripsiyon faktörü
ROS	Reaktif oksijen türleri
STZ	Streptozotosin
T1DM	Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Tip 2 Diabetes Mellitus
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör- Alfa

1.GİRİŞ

Periodontal hastalık, etiolojisinde lokal etkenler, konak cevabı, çevresel faktörler, genetik yatkınlıkların ve alınan medikal tedavilerin önemli rol oynadığı, karmaşık bir patogeneze sahip olan “eko-genetik” bir hastalıktır. Periodontitis gelişimi bakteriler ile konağın etkileşimi ve bireyin genetik yatkınlıklarının eşlik ettiği bir seri olaylar dizisini kapsamaktadır. Periodontal hastalığın oluşması için dental plak varlığı gerekli olsa da hastalığın şiddeti ve ilerleme şekli sadece dental plak varlığı ve miktarı ile ilişkilendirilemez. Konak yanıtının dental plaktaki patojenlere verdiği cevap, periodontal hastalıktaki bağ doku ve alveol kemiği yıkımından sorumludur [1].

Konağın koruyucu etkisi, popülasyonun çoğunu periodontal yıkımdan koruyabilmektedir fakat mevcut sistemik hastalıklar ve durumlar; konak cevabını değiştirebilmekte ve sonuçta yetersiz ya da aşırı cevap ile periodontal hastalıkların şiddetli formlarına yatkınlığını arttırabilmektedir [2].

1999 yılında Amerikan Periodontoloji Akademisi tarafından hazırlanan ve günümüzde de kullanılan periodontal hastalıkların sınıflandırılmasında hem gingivitis hem de periodontitis için birçok sistemik hastalık ve durum risk faktörü ve/veya risk indikatörü olarak kabul edilmiştir [2]. Bu sistemik hastalıklardan biri Diabetes Mellitus'tur [3-5].

Diyabet insülin salınımı, insülin etkisi veya bu faktörlerin her ikisinde de bozukluk olması sonucunda ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır [6]. Diyabete bağlı kronik komplikasyonlar diyabetin ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkar ve ciddi problemlere neden olur. Genellikle hipergliseminin neden olduğu komplikasyonlar, koroner arter hastalığı, periferal arter hastalığı ve felci içeren makrovasküler hastalıklar ve diyabetik nefropati, diyabetik nöropati ve diyabetik retinopatiyi içeren mikrovasküler komplikasyonlardır. Periodontitis ise diyabetin 6. komplikasyonu olarak tanımlanmıştır [7].

Diyabetlilerde periodontal hastalık gelişimine katkıda bulunan faktörler arasında; değişmiş polimorfonükleer lökosit fonksiyonları, artmış oksidasyon, immün cevapta değişiklik, düşük yoğunluklu lipoprotein seviyelerinde artış ile aterom oluşumu, periodontal ligamentin kollajeni ve dişeti kapillerlerinde ileri glikasyon son ürünleri (AGE) birikimi sayılmaktadır [8].

Diyabetin zaman içinde normalden 4 kata kadar artan bir oranda periodontal doku yıkımına neden olduğu çalışmalarca gösterilmiştir [8]. Kötü kontrollü diyabetik

hastaların periodontal tedaviye, kontrollü diyabetiklere göre daha yetersiz cevap verdiği de literatürde yer almaktadır [9-11]. Bunun yanı sıra periodontal tedavinin glisemik kontrolü geliştirip diyabetin şiddetini azaltabileceğini bildiren çalışmalar [11-13] ve periodontal tedavinin diyabetin metabolik kontrolünü etkilemediği sonucuna varan birçok çalışma da literatürde yer almaktadır [14-16].

Periodontal tedavinin asıl amacı; hastanın doğal dişleriyle fonksiyonunu, rahatını ve estetiğini en uygun sağlık koşullarında yaşam boyu sürdürmesini sağlamaktır. Bu amaca en yakın yaklaşım ise rejeneratif yaklaşımlarla elde edilir [1]. Periodontal rejenerasyon, periodonsiyumun periodontal hastalık nedeniyle yıkıma uğramış dokularının yeniden yapılandırılması, bölgedeki dokuların hastalanmadan önceki yapısına benzer şekilde oluşumunun sağlanması sert ve yumuşak dokular arasındaki yapısal ve fonksiyonel uyumun yeniden kazandırılmasıdır [17, 18].

Rejenerasyonun sağlanması amacıyla; kemik greftleri [19, 20], biyomateryaller [21], biyolojik ürünler [22], yönlendirilmiş doku rejenerasyonu [23, 24] ve bunların kombinasyonları [25-27] kullanılmaktadır [28]. Ayrıca birçok materyal ve yöntem de periodontal rejenerasyon için araştırılmaktadır [29, 30].

Günümüzde kemik defektlerinin rejenerasyon için kullanılan greft materyalleri arasında otojen kemik grefti altın standart olarak kabul edilmiş olmasına rağmen, ikinci yara bölgesi oluşturması, elde edilen greft miktarının sınırlı olması gibi nedenlerden dolayı ksenogreftler, allogreftler ve alloplastlar geliştirilmiştir [31]. Tüm araştırılmış ksenogreftler içinde; kolay elde edilebilirliği, sınırsız kaynağa sahip olmaları ve kullanışlarına dair etik olarak sıkıntı yaratmamaları açısından, sığır kaynaklı olanlar en çok tercih edilendir [32, 33].

Doku rejenerasyonu 3 ana eleman içermelidir. Bu elemanlar; hücre, yapı iskeleti ve hücre büyüme faktörleridir [34]. Sadece yapı iskeleti olarak greft materyallerinin kullanıldığı durumlarda, greftin öngörülemez rezorpsiyonu, enkapsülasyonu ya da rejenerasyonun sağlanamaması görülebilmektedir. Bu tip komplikasyonların önüne geçmek ve greft materyallerinin rejeneratif kapasitelerini arttırmak için literatürde hücre oluşumunu ve büyüme faktörlerini rejenerasyon yapılacak alanda arttırmaya yönelik birçok uygulama mevcuttur. Bunlardan bazıları, trombositten zengin plazma [34], trombositten zengin fibrin [35], düşük doz lazer uygulamaları [36], alendronat uygulamaları [37], hiperbarik oksijen tedavisi [38, 39] ve ilaç uygulamalarıdır [40, 41].

Ozon, molekülü üç oksijen atomundan oluşan, doğada gaz halinde bulunan antimikrobiyal özelliği olan, gaz, sıvı ve yağ formlarında kullanımlarıyla diş hekimliği

alanında farklı bir tedavi yaklaşımı oluşturmaktadır [42]. Güçlü bir oksidatif etkiye sahip olan ozon, bakterilerin hücre duvarı ve membranlarını okside ederek parçalamakta ve bakterileri elimine etmektedir [42].

Ozonun, virüs ve mantar dezenfeksiyonu yapması [42], dokuların oksijenlenmesini arttırarak iyileşmeyi desteklemesi [43], oksijeni ve diğer metabolik reaksiyonları dengelemesi, krebs döngüsünü stimüle ederek adenozin trifosfat oluşumunu indüklemesi [44], doğal immüneyi destekleyerek tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve interlökin-2 gibi sitokinlerin üretimini stimüle edip ve kan akışı ile eritrositlerin elastikliğini arttırması [45] gibi birçok medikal etkisi bulunmaktadır.

Diş hekimliğinde ozon, diş çürüklerinin önlenmesinde, kavite dezenfeksiyonu sağlamada, dentin hassasiyetini gidermede, kanal dezenfeksiyonunda, aftöz ülser ve herpes lezyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Oral cerrahide, diş çekimi sonrası iyileşmeyi arttırmak için, bifosfanatlara bağlı alveoler kemik nekrozlarında tedaviye yardımcı olmak amacıyla, osteotomilerden sonra enfeksiyonu önlemekte önerilmiştir [46]. Ozon, mikrobiyal dental plaktaki bakteri eliminasyonu, cerrahi yaraların dezenfeksiyonu, gingivitis, periodontitis ve periimplantitis tedavisine katkı sağlamak amacıyla da kullanılır [47].

Kemik iyileşmesi değişik hücre tipleri ve birçok sitokin koordinasyonlu etkileşimini içerir. Oksijen ise doku tamirinde, lokal anjiogenezisi geliştirmesi ve birçok hücrenin migrasyonunu stimüle etmesi açısından önemli yer almaktadır. Diyabete bağlı hiperglisemi reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretimindeki dengesizlik yüzünden yara iyileşmesini bozmakta, osteopeniye yol açmaktadır. Ayrıca enflamatuvar yanıtı ve osteoklastik aktiviteyi arttırarak kemik tamiri esnasında kemik neoformasyonunu etkilemektedir [48]. Diyabetli hastalarda gelişen ayak ülserlerinin tedavisinde ozonun etkinliği gösterilmiştir [49, 50]. Ozonun diyabetli hastalardaki kemik iyileşmesine olan etkisi ile ilgili in vivo çalışmalar ise yetersizdir. Bu yüzden, bu çalışmanın amacı, diyabetik ratlarda oluşturulan kalvaryal defektlerde kemik greft materyallerinin iyileşmesi üzerine ozonun etkisinin morfolometrik ve immünohistokimyasal açıdan araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Multifaktoriyel bir hastalık olan periodontal hastalıkların başlaması için mikrobiyal dental plak varlığı gerekli olmasına rağmen; hastalığın şiddeti, kişiyi nasıl etkileyeceği ve hangi hızla ilerleyeceği bireyin sistemik faktörlerle düzenlenen immün ve enflamatuvar cevabına bağlıdır. Bireydeki mevcut sistemik hastalıklar ve durumlar konak cevabını değiştirebilmekte ve hastalığın prognozunu etkileyebilmektedir.

Amerikan Periodontoloji Akademisi tarafından 1999 yılında hazırlanan ve günümüzde geçerli olan sınıflamada diyabet dahil birçok sistemik durum periodontal hastalık için risk faktörü olarak kabul edilmiştir (Çizelge 2.1) [1]. Periodontitis 90'lı yılların başında “diyabetin altıncı komplikasyonu” olarak tanımlanmıştır [51]. Diyabet ile periodontal hastalık arasında iki yönlü bir ilişki vardır bu ilişki, aynı kişide bir kısır döngü oluşturarak iki hastalığında şiddetlenmesini sağlar [52].

Diyabetin periodonsiyum üzerine olan etkileri hakkında kesin sonuçlara varmak güç olmasına rağmen, kötü ağız hijyeni olan diyabetik hastalarda şiddetli gingival enflamasyon, derin periodontal cepler, hızlı kemik kayıpları ve periodontal apseler sıklıkla meydana gelir [53].

Çizelge 2.1 Periodontal hastalığın risk faktörleri [54]

PERİODONTAL HASTALIK İÇİN RİSK FAKTÖRLERİ	
Modifiye edilebilen risk faktörleri	Modifiye edilemeyen risk faktörleri
Mikroorganizmalar ve periodontal hastalık	Osteoporöz
Sigara	Hematolojik bozukluklar
Diyabet	Konak yanıtı
Kardiyovasküler hastalık	Kadın hormonal değişiklikleri
İlaç kaynaklı bozukluklar	Hamilelik
Stres	
Obezite	

2.1 Diabetes Mellitus (Diyabet)

Diyabet, ‘pankreatik bir hormon olan insülin hormonunun yetersiz salınması, hiç salınmaması veya etkisinin azalmasıyla görülen metabolik bozukluklar ve multi sistemik rahatsızlıklara neden olan endokrin bir hastalık’ olarak tanımlanmaktadır [55]. Hipergliseminin neden olduğu semptomlar vardır. Bunlar; poliüri, polidipsi, kilo kaybı ve bazen polifaji ve görüş bulanıklığıdır [55].

Etiyolojisi ve patofizyolojisine göre diyabet aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır [56].

I. Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)

II. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)

III. Diğer spesifik tipler

- a. Beta hücrelerin fonksiyonunda genetik defektler
- b. İnsülin etkisinin genetik defektleri
- c. Ekzokrin pankreas hastalıkları
- d. Endokrinopatiler
- e. İlaç veya kimyasalların neden olduğu diyabet
- f. Enfeksiyonlar
- g. İmmün ilişkili diyabetin yaygın olmayan türleri
- h. Diyabetle birlikte görülebilen diğer genetik sendromlar

IV. Gestasyonel diyabet: Hamilelikte görülen diyabet türüdür.

Diyabetin en çok görülen türleri tip 1 diabetes mellitus, tip 2 diabetes mellitus ve gestasyonel diyabettir.

2.1.1 Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)

Diyabet vakalarının %5-10’u bu gruba girmektedir. Önceleri insüline bağımlı diyabet, tip I diyabet veya erken başlayan diyabet olarak adlandırılmıştır [55, 57]. T1DM kronik metabolik bir hastalık olup, çocuklarda (7-15 yaş) sık görülen ve T-hücrelerinin aracılık ettiği, pankreasa ait beta hücrelerinin harap olması sonucunda gelişir. Bu harabiyet oto immün kaynaklı olabilir veya olmayabilir. İnsülopeni ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. Duyarlı bireylerde T ve B hücrelerinin aracılık ettiği immün sistemin anormal aktivasyonu sonucu gelişen bir insulitis tablosudur. Dünyada, beş yaş civarındaki genel prevalansın 1/1430 olduğu saptanırken 16 yaşlarındaki prevalansın 1/360 olduğu saptanmıştır. Ülkemizdeki prevalansı yaklaşık 1/2000’dir [58].

2.1.2 Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)

Diyabet vakalarının yaklaşık olarak %90-95'inden sorumlu olan T2DM önceleri insülininden bağımsız diyabet veya erişkin tip diyabet olarak adlandırılmakta idi. T2DM göreceli olarak daha az insülin eksikliğinin eşlik ettiği, genellikle insülin direnci gelişmesiyle veya insülin direnciyle birlikte daha çok insülin salınım defekti gelişmesiyle gözlenir. İnsülin direnci vücutta üretilen insülinin hedef dokularca kullanımını bozar [57]. T2DM'lu bireyler yaşamlarına devam etmek için insülin tedavisine gereksinim duymazlar.

T2DM'nin çok farklı sebepleri vardır ancak özellikli etiyojiler henüz yeterince bilinmemektedir. Hastaların çoğu obezdir ve obeziteden kaynaklanan bir insülin direnci mevcuttur [59]. Obez olmayan hastalarda ise abdominal bölgede vücut yağ oranında bir artış olabilir. Yağ dokusu insülin direncinin gelişmesinde büyük bir rol oynar [57]. Ketoasidoz durumu nadiren kendiliğinden gelişir ve görüldüğünde genellikle stres veya enfeksiyonla ilişkilidir [55]. T2DM'da beta hücre yıkımı yoktur ve diyabetin bilinen diğer sebeplerinden herhangi biri de gözlenmez. Ancak genetik komponent tip 1 diyabete oranla daha fazladır. T2DM gelişmesi riski yaş, obezite, önceden geçirilmiş gestasyonel diyabet hikayesi ve fiziksel aktivite eksikliği ile artar [59].

2.1.3 Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel diyabet ilk defa hamilelikte fark edilen veya teşhis konulan glikoz tolerans bozukluğu olarak tanımlanmaktadır [55]. Tedavi için insülin veya sadece diyet uygulaması yapıp yapılmamasına ve glikoz tolerans bozukluğunun doğum sonrası devam edip etmeme durumuna bakılmaksızın bu tanım kullanılır. T2DM'ta olduğu gibi insülin direncinin artması sonucu hastalık meydana gelir.

Genellikle hamileliğin üçüncü trimesterinde başlar ve yeterli tedavi uygulanmasıyla perinatal morbidite azalır [59]. Hastaların çoğunda doğum sonrası glisemik durum normale dönerken, %35'inde 5-10 sene içinde T2DM gelişmektedir. Normal kiloda ve T2DM görülme riski yüksek etnik gruplara mensup olmayan, ailesinde diyabet geçmişi olmayan, hamilelik öncesinde anormal glikoz metabolizması olmayan ve 25 yaşın altındaki kadınlarda gestasyonel diyabet görülme riski daha azdır [59].

2.1.4 Diyabetin Tanısı

Diyabet teşhisi konulurken venöz kan glikoz seviyesi dikkate alınmaktadır. Aşağıda belirtilen testlerden herhangi biri veya birkaçının sonucunun pozitif çıkması durumunda, hastaya diyabet teşhisi konulur. Ancak test veya testler takip eden günlerde tekrarlanmalıdır [55] .

Diyabetin tanı kriterleri:

- Diyabet semptomları ile birlikte günün herhangi bir saatinde en son öğünden sonra geçen zaman dikkate alınmaksızın ölçülen glikoz seviyesinin ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) olması,
- En az sekiz saatlik açlık sonrası glikoz seviyesinin ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l) olması,
- Glikoz yüklemesi (75g) ile yapılan oral glikoz tolerans testi sonrasında ikinci saat glikoz seviyesi değerinin ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) olması [55, 59].

Açlık plazma glikoz seviyeleri:

- Normal < 100 mg/dl (5,6 mmol/l)
- Bozulmuş açlık glikoz seviyesi = 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l)
- Diyabet ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l).

Ancak oral glikoz tolerans testi ile bu sonuçlar desteklenmelidir. Oral glikoz tolerans testi ikinci saat plazma glikoz seviyesine bakılarak;

- Normal < 140 mg/dl (7,8 mmol/l)
- Bozulmuş glikoz toleransı = 140-199 mg/dl (7,8-11,1 mmol/l)
- Diyabet ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) değerlendirilir [55].

Yeniden değerlendirme testleri üç yılda bir yapılmalıdır. Kırk beş yaş üzeri ve ek risk faktörü taşıyan kişilerde daha sık tekrarlanmalıdır [55]. Diyabet tanısının konulmasında kullanılan ve hastanın kısa dönemde kontrol altında olup olmadığını gösteren bu testlerin yanı sıra son 30-90 gün içindeki metabolik kontrol seviyesini belirlemek amacıyla glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) seviyesi testi de kullanılmaktadır. Bu testle kandaki hemoglobine geri dönüşümsüz olarak bağlanan glikoz seviyesi belirlenir [57]. Bu test teşhis için kullanılmaz çünkü HbA1c için 'altın standart' bir değerlendirme yoktur ve halihazırda bazı ülkelerin teste erişimi yoktur [59].

Diyabet kronik hiperglisemi ile seyrederek özellikle gözler, böbrek, kalp, sinirler ve kan damarları olmak üzere çeşitli organlarda organ yetmezlikleri, disfonksiyon ve uzun süreli hasara yol açar [55]. Diyabete bağlı makrovasküler değişikliklerinden biri olan aterosklerozun sonucu olarak; artmış kalp krizi ve felç riski de önemli komplikasyonlar arasında yer almaktadır [60]. Diğer yandan diyabetik mikrovasküler patolojiler ise retinopati, nöropati, zayıf yara iyileşmesi, enfeksiyon riskinde artış ve periodontal hastalıktır [51].

Diyabet dünya çapında en büyük sağlık problemlerinden biridir. Sadece Hindistan'da 2000 yılında 31.7 milyon olan diyabet hastası sayısının 2030 yılında 79.4 milyon olacağı düşünülmektedir. Hindistan “diyabetin dünyadaki başkenti” olarak bilinmektedir [61]. Ülkemizde yapılan Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışmasında, 2000 yılı nüfus sayısına göre 4.9 milyon diyabet hastası olduğu, T2DM prevalansının %7.2 olduğu ve 1.6 milyon prediyabetli birey olduğu belirtilmiştir. Yani kişilerin 1/3'ü diyabetli olduğunu bilmemektedir. Ülkemizde diyabet oranı her geçen yıl artmaktadır [62].

2.2 Diyabetik Hastalarda Periodontitis Gelişimiyle İlgili Potansiyel Faktörler

Periodontal hastalıklar bakteriyel atağa karşı geliştirilmiş kronik enflamatuvar yanıtlardır. Diyabetin de bakteriyel atağa karşı konak yanıtını modifiye ettiği ve periodontal hastalık riskini arttırdığı gösterilmiştir [57, 63].

Diyabet ve periodontal hastalık arasındaki ilişkiyi kesinleştirmek için birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen sonuçlar çelişkilidir. Diagnostik parametreler ve metodolojiler evrensel olarak kabul görmüş değildir ve bu da mevcut verileri karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Diyabetik hastalarda hastalık başlangıcı ve süresi, glisemik kontrol seviyesi, tedavi tipi ve süresi ve de sistemik komplikasyon varlığı çok farklılık göstermektedir. Diyabetik hastalarda diyabetin bir komplikasyonu olarak farklı şiddet ve yayılımda periodontal hastalık gözlenmesi bu heterojeniteden kaynaklanıyor olabilir [59, 64]. Diyabetin periodontal hastalık patogenezinde rol aldığı mekanizmalar aşağıda belirtilmiştir.

2.2.1 Değişmiş İmmün Hücre Fonksiyonu ve Sitokin Üretimi

Diyabete bağlı kronik hiperglisemi enflamatuvar mediyatörlerin artışına neden olur. Bu mediyatörlerden biri olan, aynı zamanda bir adipokin olan TNF- α hem bu ilişkiden hem de insülin direncinden sorumludur [65]. Serum TNF- α konsantrasyonları obez T2DM hastalarında artmıştır [66]. Proenflamatuvar sitokinlerden biri olan TNF- α , insülin reseptörü tirozin kinaz substrat-1'in fosforilasyonunu, insülin reseptör aktivasyonunu baskılayarak engeller ve böylece glikoz taşıyıcı proteinlerin translokasyonunu bloke ederek insülin direncine katkı sağlar [67].

Artmış TNF- α seviyeleri var olan periodontal hastalığın şiddetini birçok mekanizma ile şiddetlendirir. Bu mekanizmalar arasında; fibroblastları aktive ederek matriks degradasyonuna neden olan enzimleri salgılanmasına neden olması [68, 69] osteoklastları stimüle ederek aktif kemik yıkımına neden olması [70] ve adipozitlerden serbest yağ asitleri salınımını artırarak insülin direncini indüklemesi [71] bulunmaktadır.

İnterlökin-1beta reseptör antagonisti ve interlökin-1beta arasındaki denge de diyabet patogenezinde önemlidir. Beta hücrelerinden alınan biyopsi örneklerinde, interlökin-1beta reseptör antagonisti sağlıklı bireylere kıyasla T2DM bireylerde azaldığı gösterilmiştir. Dahası in vitro olarak leptine maruz bırakılmış insan pankreas hücrelerinde, interlökin-1beta reseptör antagonisti azalarak, interlökin-1beta salınımı artmıştır, bunu takiben beta hücre fonksiyonu bozularak hücreler apoptoza uğramıştır [72].

Diyabet hastalarında periodontal patojenlere karşı bağışıklık yanıtının bozulabileceği öne sürülmüştür [73]. Salvi ve ark [74], T1DM hastalarının monosit hücrelerinden diyabetik olmayanlara oranla lipopolisakkaritlere yanıt olarak daha yüksek miktarda interlökin-1beta, TNF- α ve prostoglandin E₂ salgılandığını göstermiştir. Kronik periodontitisli diyabet hastalarında periodontal tedavi sonucunda dişeti oluşu sırasında interlökin-6 düzeyinin düştüğü, ancak interlökin-18 seviyesinin değişmediği rapor edilmiştir [75].

Diyabette, nötrofillerin; kemotaksis, yapışma ve fagositoz özellikleri bozulmuştur [76]. Periodontitisin şiddeti defektif kemotaksis ile korelasyon gösterir. Şiddetli periodontitise sahip diyabetik bir hastada, orta şiddetli periodontitis ya da diyabet

olmayan şiddetli ve orta şiddetli periodontitise göre azalmış polimorfonükleer lökosit kemotaksisi bulunmuştur [77].

Bissada ve ark [78], şiddetli periodontitisli diyabetik hastaların periferik kan polimorfonükleer lökositlerinin fagositik aktivitesini, lokalize kronik periodontitisli diyabetik olmayan bireylere göre daha az bulmuşlar, ayrıca gingival sulkustaki polimorfonükleer lökositlerin fagositik aktivitesinin periferik kan polimorfonükleer lökositlerinkinden daha az olduğunu bildirmişlerdir.

2.2.2 Kollajen ve İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE)

Diyabetik durumda dolaşımdaki ve hareketsiz haldeki proteinlerde değişiklikler oluşmaktadır. Glikozun proteinlerdeki lizin ve arjinin aminoasitleriyle non-enzimatik etkileşimi hücre dışı ve hücreler arası geri dönüşümsüz AGE birikimine yol açar. AGE'ler hücre yüzeyindeki polipeptit reseptörler ile tanınırlar bu reseptörlerin adı ileri glikasyon son ürünleri reseptörü olup immünglobülin ailesinin multi-ligand üyesi olan hücre yüzey molekülüdür [79]. AGE normal koşullarda da metabolizmada bulunmaktadır fakat yaşla ve diyabet gibi hiperglisemik koşullarda aşırı birikimi olur ve sonuç olarak hücre fonksiyonu değiştirerek doku yapısını bozar (Şekil 2.1) [80].

AGE ve AGE reseptörü etkileşimi, diyabetik gingivada ve diğer birçok hücrede (endotel, infiltrat mononükleer fagositler gibi) görülmektedir. Diyabetli hastaların gingival dokularında artmış AGE seviyeleri, oksidatif stres artışına neden olarak, doku zararının potansiyel sorumlusu olmaktadır [81].

Kollajen alveoler kemiğin organik matriksi ve gingival bağ dokunun birincil yapı taşıdır [82]. Kollajenin sentezlenmesi, olgunlaşması ve homeostazı, glikoz seviyelerinden etkilenmektedir [83]. Diyabette AGE, kollajen oluşumunda rol alarak yüksek kararlı kollajen makro moleküllerini oluşturur. AGE ile modifiye olmuş kollajen büyük kan damarlarında birikir ve bu damarların duvarını kalınlaştırarak damar lümenini daraltır buna ek olarak AGE ile modifiye olmuş kollajenin düşük yoğunluklu lipoproteine afinitesi vardır. Bu afinite düşük yoğunluklu lipoprotein damar lümeninde birikmesine ve lümeninde aterosklerotik değişikliklere yol açarak diyabetin makrovasküler komplikasyonunu oluşturmasına neden olur [79].

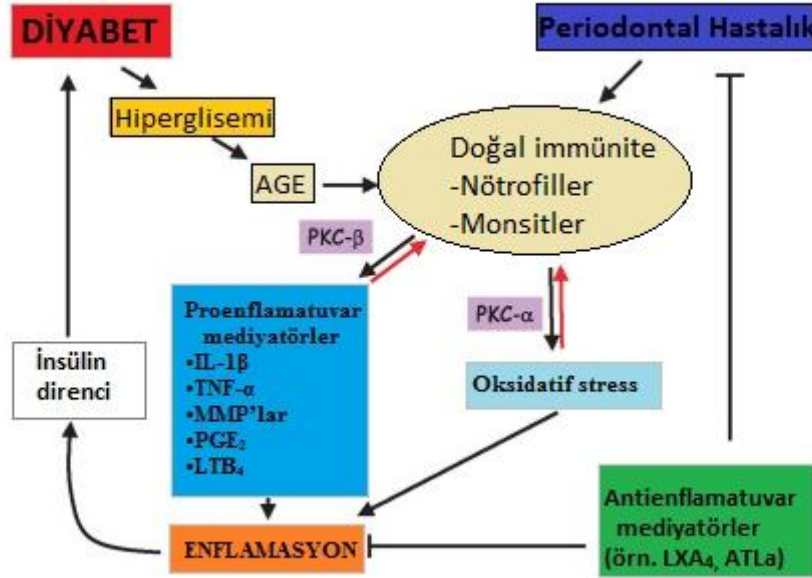
Enflamatuvar yanıt sonucunda oluşan insülin direnci glisemik kontrolü zorlaştırmaktadır. Periodontal hastalığın kronik enflamatuvar değişiklikler sayesinde

diyabetik durumun bozulmasına direk etkisi vardır. Tüm bu süreç potansiyel olarak antienflamatuvar mediyatörlerin kullanımı ile bloke edilebilir [84].

2.2.3 Vasküler Değişiklikler ve Yara İyileşmesindeki Değişiklikler

Diyabetiklerde değişmiş yara iyileşmesinin nedenleri tam olarak aydınlatılamamış olsa da bazı mevcut mekanizmalar bulunmaktadır. Değişmiş hücrel aktiviteler, azalmış kollajen sentezi ve artmış kollajenaz üretimi kötü yara iyileşmesi ile ilişkilendirilebilir. Yara kenarlarından AGE sentezlenmesi, çözünürlüğü azaltıp yara iyileşmesini olumsuz etkileyebilir. Artmış kollajenaz yeni oluşmuş ve daha tamamlanmamış çapraz bağlı kollajeni yıkararak defektif yara iyileşmesine neden olabilir [85]. AGE'ler dolaşımdaki proteinlere, büyüme faktörlerine ve vazodilatasyonda kritik önemi olan nitrik oksit sentazına bağlanır, ayrıca AGE formasyonu reaktif oksijen türlerinin ve oksidatif stresin artarak endotel hücre zararına ve vasküler düz kaslarda hasara neden olmaktadır [86].

Damar tamir mekanizması için, endotelyal progenitör hücreleri gereklidir. Bu hücrelerin çoğalma ve migrasyon yetenekleri diyabetiklerde azalmıştır. Hipoksiyle indüklenen faktör-1, anjiogenezisi indükleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi durumunda bu faktörün oluşumunu sağlayan gen ekspresyonu hiperglisemiden etkilenerek azalmaktadır [86]. Diyabet ile gelişen vasküler değişiklikler besin öğelerinin ve lökositlerin periodontal dokulara migrasyonunu engelleyerek, oksijen difüzyonunu azaltır ve metabolik artıkların temizlenmesini azaltarak periodontitisin şiddetini artırır. Bu vasküler değişiklikler hastalığın görülme süresi ve kötü metabolik kontrol ile artmaktadır [85, 87].



Şekil 2.1 Diyabetik periodontitisin patogenez yolları. Hiperglisemiye bağlı AGE oluşumunu takiben doğal immün cevap serisi başlar. Nötrofil ve monositlerin öncülük ettiği doğal immün yanıt, proenflamatuvar sitokin üretimine ve protein kinaz C beta (PKC-β) ve protein kinaz C alfa (PKC-α) aktivitesiyle oksidatif stresin artmasına neden olur [84].

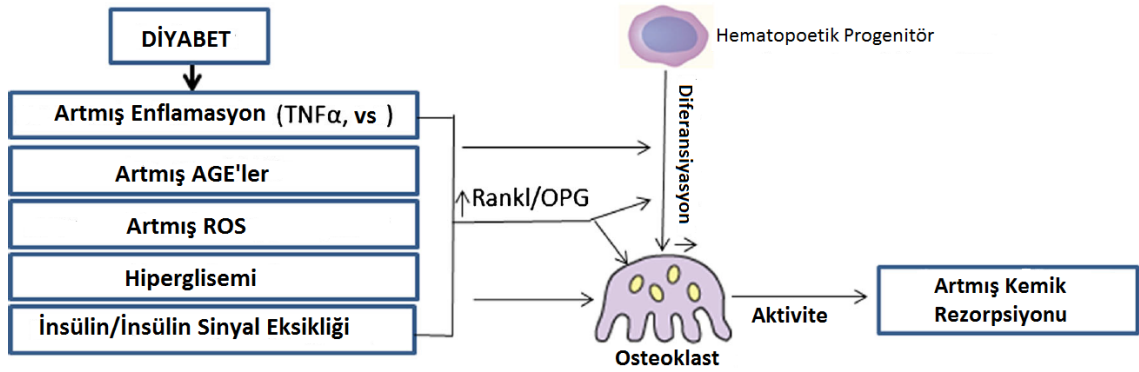
2.2.4 Lipit Metabolizmasına Etkileri

Diyabet komplikasyonlarından çoğu hiperglisemi ile seyretmektedir. Bu durum serum düşük yoğunluklu lipoproteinler, trigliserit ve yağ asitlerinin artmasıyla birlikte görülen lipit metabolizmasında bozukluklara neden olabilmektedir. Serum lipitlerine maruz kalan makrofajlar, endotoksinlerle uyarılınca onarıcı veya koruyucu immün hücre yerine enflamasyonu daha da artırarak doku hasarına neden olur [85].

Adiponektin, osteoblastlarda reseptörü olan ve yağ dokudan salgılanan adipokindir. Osteoblast çoğalması, dönüşümü ve mineralizasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. İnsülin hassasiyetini artırarak, endojen glikoz üretimini azaltır. Adiponektinler, nükleer faktör kappa B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) sisteminde, osteoblastlardaki osteoprotegerin üretimini engelleyerek, böylece osteoklast oluşumunu uyarır ve kemik rezorpsiyonuna neden olur [88].

2.2.5 Kemik Metabolizmasına Etkileri

Diyabet, periodontal hastalık, kırık iyileşmesi ve osteoporöz durumlarında osteoklast formasyonunu arttırmaktadır. Diyabet indüklü osteoklastogenezis, kemikte yaralanma ya da enflamasyon varlığında daha şiddetlenir. Periodontitisli diyabetik hayvanlarda, yüksek seviyelerde interlökin 1 beta, TNF- α , ve prostoglandin E₂ gözlenerek osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunun devam ettiği belirtilmiştir [89]. Periodontitis olan diyabetik ratlarda osteoklast sayıları 3 kata kadar artış göstermiş ve T1DM'lu bireylerde RANKL aracılı osteoklast formasyonunu aktive edecek şekilde yükselmiş interlökin 17 ve interlökin 23 seviyeleri tespit edilmiştir [90]. Diyabetin neden olduğu hiperglisemi ve insülin ya da insülin sinyal eksikliği enflamasyonun, AGE'lerin ve ROS'nin artmasına neden olarak RANKL/OPG oranını değiştirir ve hematopoetik progenitör hücrelerin osteoklasta dönüşümünü uyararak kemik rezorpsiyonunu artırır [91] (Şekil 2.2).



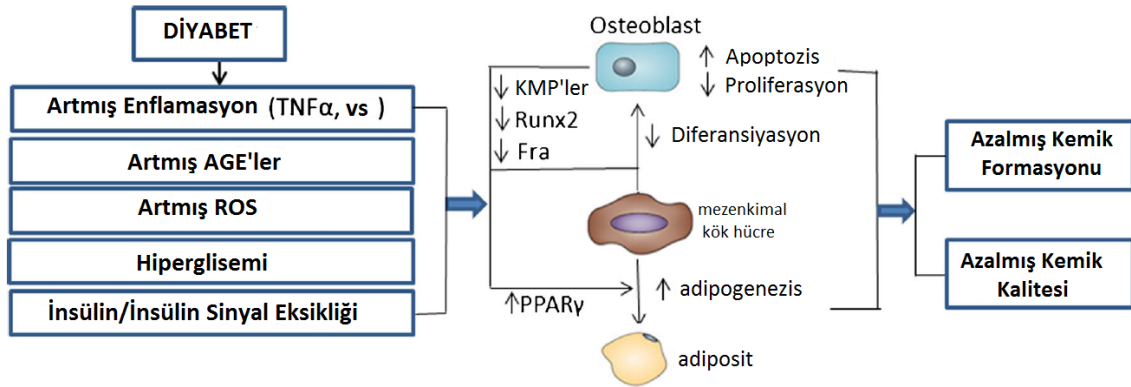
Şekil 2.2 Diyabetin osteoklastogenezisi artırma mekanizması [91].

Birçok çalışma osteoklast sayılarının, rezorptif belirteçlerin ve kemik rezorpsiyonunun diyabetin her iki tipi ile arttığını göstermişse de [92, 93] başka çalışmalarda kemik rezorpsiyonunun T2DM ile azaldığını öne sürmüştür [94, 95].

Diyabetin kemik rezorpsiyonu üzerine etkileri olduğu gibi kemik formasyonuna da etkileri bulunmaktadır. Osteoblast formasyonu, sayısı ve fonksiyonları diyabet ile birlikte düşüş göstermektedir [91]. T2DM hastalarının, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığı bir çalışmada interlökin 6 ve C- reaktif protein ile ilişkili olarak azalmış

osteokalsin seviyeleri ve buna bağlı olarak azalmış kemik formasyonu gerçekleştiği gösterilmiştir [96]. T2DM'lu ratlarda yapılan bir çalışmada ise KMP, fibroblast büyüme faktörü ve osteokalsin seviyelerinin azalarak kemik remodelasyonunun etkilendiği vurgulanmıştır. Bu etkinin şiddeti enflamasyonun varlığında daha belirgin olmaktadır [97]. Diyabetiklerde enflamasyon veya yaralanma durumunda, TNF'lerin artmış ve uzamış salınımı, nükleer faktör kappa B aktivitesinin artmasına ve fos ilişkili antijen 1 (Fra-1) ile runt ilişkili transkripsiyon faktörünün (Runx2) azalarak osteoblast diferansiyasyonunun azalmasına neden olmaktadır [91] (Şekil 2.3). Hiperglisemi ayrıca fosfor ve kalsiyum metabolizmasından sorumlu paratiroid hormonun yanıtını değiştirmektedir. Bunun yanı sıra hiperglisemi ekstrasellüler matriksin gelişimini, adherensini ve akümülesyonunu da etkilemektedir [98].

T2DM modellerinde, Zucker ve Torii (obez olmayan T2DM rat) ratlarla yapılan iki çalışmada azalmış kemik formasyonu görülmüştür [99, 100]. Santana ve ark [101], diyabetik olmayan ratlarda kalvaryal kemiklere AGE uygulaması yaparak sonuçları değerlendirmiştir. AGE uygulamasının kemik oluşumunu azaltıp, ratlarda ekstrasellüler matriks üretiminde azalma ve osteoblast farklılaşmasında bozulma gibi hücrel değişikliklere neden olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.3 Diyabetin kemik formasyonunu azaltma mekanizması [91].

Liu ve ark. [102], diyabetin, ligatürle oluşturdukları periodontal kemik rezorpsiyonu sonrasında, kemik dokusunda tamiri önemli ölçüde azalttığını gösterdiler. Ratlara yerleştirilen ligatürler çalışmanın 8. gününde çıkarılmasına rağmen diyabetik ratlarda enflamasyon şiddeti artmaya devam ederken, diyabetik olmayan ratlarda azalmıştır. Aynı zamanda diyabete bağlı olarak kemik dokusunu döşeyen periosteal hücreler, osteoblast, preosteoblast ve periodontal ligament hücrelerinde yüksek oranda

apoptoz tespit ettiler. Apoptozdaki bu artışa enflamasyon şiddetini ve süresini arttıran TNF- α ve AGE gibi sitokin ve son ürünler neden olarak gösterilmiştir.

Linde-Starup'un [88] 2013 yılında yayınlanan meta-analizinin sonucuna göre; T1DM ve T2DM'lu hastaların kemik metabolizmaları farklı belirteçler tarafından yönetilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, T1DM'da; serum kalsiyum ve üriner kalsiyum açısından diyabetik olmayan bireyler arasında fark bulunmamasına rağmen, bazılarında ise T1DM'da daha düşük serum kalsiyum seviyeleri ile de karşılaşılmıştır. Bu durum düşük kemik yoğunluğuna ve artmış kırık riskine neden olabilmektedir. T1DM'ta kalsiyum seviyeleri normal olsa bile erişkinlikte kemik kırılabilirliği artmaktadır. Serum alkalen fosfataz ve serum tartarat dirençli asit fosfataz seviyeleri normal seviyede olmasına rağmen, serum osteokalsin seviyeleri T1DM ve T2DM'da diyabetik olmayan bireylere göre daha düşük bulunmuştur. T2DM ise tip 1 kollajenin karboksi terminal çapraz bağlı telopeptidi ve tartarat dirençli asit fosfataz gibi rezorpsiyon belirteçleri daha fazla bulunmuştur.

2.3 Periodontal Tedavinin Diyabet ve Glisemik Kontrol Üzerine Etkileri

Bu konudaki ilk çalışmalardan biri Grossi ve ark.'dır. Diyabet olan 113 Pima Hintlisi ile yaptıkları çalışmada periodontitisin tedavi edilmesi ile normal kan glikoz seviyelerine ulaşılabileceği sonucuna varmışlardır [103].

Kıran ve ark.'ı [104], Türk popülasyonunda gerçekleştirdikleri bir çalışmada, periodontal hastalığı olan T2DM'lu 44 hastaya mekanik tedavi uygulayarak, HbA1c seviyesinde başlangıca göre %10.94 azalma tespit ettiklerini ifade etmişlerdir. Benzer olarak yapılan birçok tedavide mekanik tedaviyi takiben HbA1c oranlarında azalma tespit edilmiştir [105, 106].

Bu çalışmaların aksine bazı araştırmacılar, yalnızca yapılan mekanik periodontal tedavi ile T1DM veya T2DM hastalarının glisemik kontrolünde istatistiksel bir düşüşe rastlamamıştır [107-109].

Correa ve ark., T2DM hastalarında periodontal tedavi öncesi ve sonrası plazmadaki HbA1c, fibrinojen, TNF- α , yüksek sensivite C reaktif protein, interlökin-4, interlökin-6, interlökin-8 ve interlökin-10 seviyelerini karşılaştırmışlar. Cerrahi olmayan periodontal tedavi fibrinojen ve TNF- α seviyelerinde anlamlı bir azalma sağlarken, diğer parametrelerde fark bulunmadığı belirtilmiştir [110].

Buna ek olarak, dolaşımdaki TNF- α 'nın azalması insülin direncini etkileyerek diyabetin metabolik kontrolünü iyileştirdiği düşünülmektedir [10]. Zinman ve ark [111], Kanada popülasyonunda gerçekleştirdikleri çalışmalarında dolaşımdaki TNF- α ile insülin direnci arasında anlamlı ve bağımsız bir ilişki gösterdiler. Bununla birlikte T2DM hastalarda periodontal tedavi sonrasında lokal antibiyotik uygulamasının dolaşımdaki TNF- α seviyesini azalttığı ve buna paralel olarak insülin konsantrasyonu ve HbA1c seviyesinde azalma olduğu bildirilmiştir [112].

2.4 Deneysel Diyabet Modeli

Diyabetik hayvan modeli oluşturmanın birkaç yolu vardır. Bunlar [113];

- 1- Farmakolojik olarak indüklenmesi
- 2- Cerrahi model olarak oluşturulması
- 3- Genetik model olarak oluşturulması şeklinde gerçekleştirilir.

Farmakolojik indükleme amacıyla streptozotosin (STZ) ve alloksan en yaygın kullanılan ilaçlardır. Her iki ilaç da etkilerini parenteral, intravenöz, intraperitoneal ve subkütanöz uygulamalarla gösterebilir. Bu ilaçların veriliş dozları hayvan türüne, uygulama yoluna ve beslenme durumuna bağlıdır [113]. Bu ajanların uygulanması hem T1DM ve T2DM hem de glikoz intoleransına benzer sendromlar oluşturmaktadır [114].

Alloksan intravenöz, intraperitoneal veya subkütanöz olarak alındığında diyabet oluşturuucu etki gösterir. Diyabet oluşturmak için kullanılan dozu ise kullanılan hayvan türü, alım yolu ve beslenme durumuna göre farklılık gösterir. Ratlarda en çok kullanılan intravenöz doz 65mg/kg'dır [115]. İntraperitoneal veya subkütanöz uygulama dozu intravenöz dozun en az 2-3 katı olmalıdır. Alloksan uygulamadan sonra, ratlarda kısa süreli ve hızlı bir insülin salınımına yol açar. Sonrasında ise beta hücrelerinin glikoza yanıtı tamamen baskılanır. Alloksan'ın pankreatik beta hücrelerindeki toksik aktivitesi, SH gruplarının oksidasyonu, glikokinaz inhibisyonu, serbest radikal üretimi ve hücrelerarası kalsiyum homeostazının bozulması gibi belirli süreçlere bağlı olarak gelişir [115].

STZ, *Streptomyces achromogenes* suşundan elde edilen, pankreas beta hücrelerini seçici olarak etkileyen bir antibiyotiktir. STZ, -20°C'de ışıktan korunarak saklanmalıdır. Çözeltisi uygulanmadan hemen önce taze olarak ve pH'sı 4 olan sitrat tampon içinde

çözülerek hazırlanmalı ve 4°C’de ışıktan korunarak hemen kullanılmalıdır. Sıçanlarda tek doz 50-100 mg/kg aralığında intravenöz veya intraperitoneal uygulanabilir. Ayrıca, birbirini izleyen 5-6 gün boyunca çok kez ve ufak dozlar halinde (5 mg/kg/gün) de uygulanabilir, buna subdiyabetojenik doz uygulaması denir. Bu modelde adacık hücrelerinde hücrel immün yanıtın artışını düşündüren ağır bir mononükleer hücre infiltrasyonu oluşur [116]. Genel olarak ratlar, enjeksiyondan 2 gün sonra kan şekerleri 200-300 mg/dl olduğunda diyabetik olarak kabul edilir. Pankreatik beta hücrelerinin yıkımı, hayvanlarda fazla insülin salınımına ve ölümcül olabilecek hipoglisemiye yatkınlığı artırmaktadır bu sebepten dolayı hayvanlar glikoz solüsyonu (%5) ile 12-24 saat beslenmelidir [113].

STZ, kemoterapötik alkilasyon ajanı olarak da kullanılan bir antimikrobiyal ilaçtır [117]. STZ’ nin oluşturduğu insülinopeni sendromuna “streptozotosin diyabeti “ denilir [118]. STZ, glikoz transporter-GLUT2 yoluyla pankreatik beta hücrelerine girer ve deoksiribonükleik asit alkilasyonuna neden olur. Bununla beraber, poliadenozin difosfat ribozilasyonunun aktivasyonunu ve nitrik oksit salınımını indükler. Bu aktiviteler sonucunda pankreatik beta hücreleri nekroza uğrayarak yok olur [114]. Bunun sonucunda beta hücrelerinde, glikoza karşı geçici bir duyarsızlık oluşur ve bu hücrelerin kaybıyla glikoza olan bu duyarsızlık kalıcı hale gelir [114]

STZ uygulaması günümüzde daha çok tercih edilen bir yöntemdir çünkü hem alloksana oranla daha spesifiktir, bu da hayvanda daha az ketozise yol açar ve efektif doz açısından deney hayvanları arasındaki farklılık daha azdır. Bunların dışında, STZ insanlara nefrotoksik olduğu halde hayvanlarda renal morfolojide meydana gelecek olan değişiklikler ilacın kimyasal toksisitesinden çok diyabete bağlı yavaş gelişen komplikasyonlardan dolayıdır [119-121].

2.5 Periodontal Rejenerasyon

Hastalık sonucu yıkıma uğramış diş destek dokularının, sağlıklı yapısına benzer şekilde rekonstrüksiyonu ve rejenerasyonu, periodontal tedavinin temel amaçlarından biridir. Periodontal rejenerasyon, yara iyileşmesi sırasında istenilen hücrelerin repopülasyonu ve organizasyonu yoluyla yeni sement, yeni periodontal ligament ve yeni alveol kemiğini içeren sağlıklı bir periodonsiyumun yapılandırılması ile oluşan yeni dokular arasındaki fonksiyonel ve yapısal uyumun tekrar kazandırılmasıdır [122].

Periodontal rejenerasyonun başarıya ulaşabilmesi için yara iyileşmesi sırasında bir takım hücresel ve moleküler olaylar gereklidir [123]. Periodontal yara iyileşmesinde görülen bu olaylar, periodonsiyumun hem yumuşak hem de sert dokuları içeren bir ünite olması dolayısıyla vücudun diğer bölgelerinden farklıdır [17, 123].

Periodontal rejenerasyonun biyolojik yönünün daha anlaşılır hale gelmesi ve gelişen teknoloji ile çeşitli teknikler ve materyaller rejenerasyon amacıyla kullanılmaya başlanmış ve doku mühendisliği anlam kazanmıştır. Doku mühendisliği; hasara uğramış olan dokuların yerine çeşitli prosedürler kullanılarak yeni dokuların inşa edilmesini amaçlayan ve hücre biyolojisine, gelişimsel biyolojiye ve biyomateryal kullanımına dayanan biyomedikal bir bilim ve araştırma alanıdır. Bir dokunun yeniden inşa edilebilmesi için uygun düzeyde ve düzenli sinyallere, yeterli sayıda progenitör hücrelere, uygun bir ekstrasellüler matriks veya taşıyıcı bir iskelete ve yeterli kan desteğine ihtiyaç vardır [124]. Bu amaç doğrultusunda kemik ve kemik benzeri materyallerin osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif etkilerinden yararlanılmasına [125-128], defekt bölgesinde hücre yönlendirici membranların yönlendirilmiş doku rejenerasyonu prensipleri doğrultusunda kullanılmasına [129-131], biyolojik mediyatörlerin genel etki mekanizmalarına dayanan hücre-hücre ilişkilerinin düzenlendiği (örn. trombositten zengin plazma, kemik morfojenik proteinler) [132-134] ve diş oluşumunun taklit edildiği tekniklerin (örn. mine matriks türevleri) uygulamasına başlanılmıştır [135, 136]. Günümüzde rejenerasyon için kullanılan materyaller aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır [28];

1-GREFTLER

a-Otojen kemik; taze/dondurulmuş

b-Allojenik kemik; taze/dondurulmuş (diş hekimliğinde kullanılmamaktadır)

c-Ksenojenik kemik; taze/dondurulmuş (diş hekimliğinde kullanılmamaktadır)

d-Hücre yapıları (deney aşamasında)

2-BİYOMATERYALLER

a-Kemik ürünleri (kadavra kemiği)

b-Allojenik kemik ürünleri

- Dekalsifiye dondurulmuş kurutulmuş allojenik kemik
- Deminerale dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
- Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti

c-Ksenojenik kemik ürünleri

- Deproteinize sığır/at kemik minerali
- Kalsiyum karbonat mercan iskeleti

d- Sentetik (Alloplastik) ürünler

1-Seramikler

- Beta trikalsiyum fosfat
- Hidroksiapatit
- Paris alçısı (Ca_2SO_4)
- Kalsiyum fosfat
- Biyoaktif cam

2-Polimerler

- Metilmetakrilat
- Poli-x-hidroksi asit (poli laktik asit, poli laktik-co-glikolik asit)

3-BİYOLOJİK ÜRÜNLER

a-Matriks faktörleri (fibronektin, vitronektin, trombospondin-1, amelogenin)

b-Büyüme faktörleri (trombosit kaynaklı büyüme faktörü, dönüştürücü büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü-1, fibroblast büyüme faktörü)

C-Farklılaştırma faktörleri (kemik morfojenik protein-2,-3, -6, -7 ve büyüme/dönüşüm faktörü -5)

d-Peptitler (trombin peptit TP058, hücre bağlayıcı P-15)

e-Küçük moleküller (prostoglandin E2 reseptör antagonistleri)

f-Trombositten zengin plazma

4-YÖNLENDİRİLMİŞ DOKU REJENERASYONU ÜRÜNLERİ

a-Rezorbe olmayan ürünler (genişletilmiş politetrafloroetilen)

b-Biyolojik olarak rezorbe olan ürünler (polilaktik asit, polilaktik ko-glikolik asit, kollajen, hyaluronan)

5-KOMBİNASYONLAR

2.5.1 Otojen Greftler

Kemik greftlerinin sınıflaması birçok şekilde olabileceği gibi, bu greftlerin osteojenik, osteoindüktif ya da osteokondüktif potansiyellerine göre de sınıflama yapılabilmektedir. Osteojenite; greft materyalinin içerisindeki osteoprogenitör hücreler ve osteojenik prekürsör hücrelerin yeni kemik oluşturmasıdır. Osteoindüksiyon; kök hücrelerin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ya da dönüştürücü büyüme faktörü gibi lokal büyüme faktörlerinin stimülasyonu ile olgun hücrelere dönüşmesidir. Osteokondüksiyon ise greft materyalinin bir iskelet oluşturarak, vasküler ve hücrel migrasyona izin vermesidir [137].

“Altın standart” olarak tanımlanan ve hastanın kendisinden elde edilen otojen kemik greftleri her zaman en ideal materyal olarak tanımlanmıştır [138]. Taze otojen greft; osteojenik özellikte hücreler bulundurması ayrıca immünolojik reaksiyona neden olmamasından dolayı en avantajlı greft maddesi olarak kabul edilir. Fakat verici bölgede ikinci bir operasyona ihtiyaç duyulması, morbidite, postoperatif analjezi, postoperatif bakım süresinin uzaması, öngörülemez rezorpsiyon süresi [139] bu materyalin dezavantajlarını oluşturur.

Otojen kemik greftleri pratik olarak; kortikal ve kansellöz kemik şeklinde ayrılabilir. Bu greftler değişik bölgelerden, değişik şekillerde elde edilebilirler [140]:

-Kortikal kemik: Bir dayanıklı ve sert bir yapıya oluştururken, osteogenezisi artıracak özellikleri yoktur.

-Süngerimsi (kansellöz) kemik: Kemik iliği, osteoblast prekürsörleri ve canlı osteoblast içerdiğinden osteogenezisi arttırırlar fakat mekanik dayanıklılıkları azdır.

-Kortiko-kansellöz kemik: Bu kombinasyonun kullanılması son yıllarda yaygınlaşmıştır [141].

Otojen greft elde etmek için en sık kullanılan ağız dışı kaynak iliak kemiktir, ağız içinden ise mandibular simfiz ve ramus, maksiller tüber ya da ekzostozlardır. En uygun donör sahası, alınacak greftin miktarına ve vakanın durumunda istenen rejenerasyon tipine bağlıdır [141]. Partikül şeklindeki greftlerin daha fazla osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon potansiyeli vardır çünkü bu tür greftlerin büyüme faktörü salınımı için daha geniş alanı vardır [19].

İskelet sistemindeki birçok kemik endokondral kaynaklıdır. Alveoler kemikte, maksilla ve mandibulada ise intramembranöz kemik oluşumu gözlenir. Membranöz kaynaklı kemiklerde endokondral kemiklere kıyasla daha az rezorpsiyon gözlenir [142]. Serbest otojen kemik grefti, yerleştirilmesini takiben ilk 2 haftalık sürede osteojenik etki gösterir. Greftlemeden 2-6 hafta sonra osteoindüktif etkisi başlar ve 6 ay kadar sürer. Son olarak osteokondüktif etki ile apozisyonel kemik oluşumu gerçekleşir. Greftin organik komponenti olan kollajen; grefte esneklik, dayanıklılık ve stabilite kazandırırken; inorganik komponent olan hidroksiapatit, greftin rijitliğine katkıda bulunur [143].

Otojen greftin periodontal cerrahide kullanım alanları; Periodontal cep tedavisi, alveoler kemik ogmentasyonları, sinüs lift prosedürleri, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu, implant cerrahisidir.

Rocchietta ve ark. [19] posterior mandibular bölgede vertikal kemik ogmentasyonu için aynı hastaya, titanyumla güçlendirilmiş politetrafloroetilen membran ile otojen blok ve partikül şeklinde otojen greft uygulaması yapmışlardır. Toplamda 10 hastada 12 bölge çalışmaya dahil edilmiştir. Ramus mandibuladan 10mmx10mmx5mm boyutlarında greft elde edilerek, atrofik mandibular kretin tepesine uygulanmıştır. 6-10 ay sonra uygulama bölgesi tekrar açıldığında, titanyum vidalar trepan frezle çıkarılıp histolojik analizler gerçekleştirilmiş. Ortalama kemik kazancı her iki greftte de başlangıca göre artmışken, blok greftte, partikül şeklindeki grefte göre istatistiksel olarak daha fazla bulunmuş ayrıca kemik implant kontağı da blok greftte, partikül şeklindeki grefte göre daha fazla bulunmuş.

Otojen greft kullanılması ile her ne kadar öngörülebilir sonuçlar elde edilse de greft rezorpsiyonu başarıyı etkileyebilmektedir. Gorla ve ark. yapmış oldukları çalışmada, maksiler sinüs ogmentasyonu işlemini otojen kemik, 1:1 oranında otojen greft ve beta trikalsiyum fosfat ve sadece beta trikalsiyum fosfat ile gerçekleştirip, kemik volümündeki değişiklikleri bilgisayarlı tomografi ile karşılaştırmışlardır.

Çalışmanın sonunda % 45.7±18.6 ile en fazla rezorpsiyonu otojen kemik göstermiştir [21].

Lutz ve ark. [20] otojen greft ve ksenogreft ile yapılan sinüs augmentasyonu işlemini 5 yıllık takip ile karşılaştırmışlar. Otojen kemik grefti toplam 23 hastada ve 70 implant için uygulanmış. Ksenojen greft ise 24 hastada ve 98 implant için uygulanmış. İmplant sağkalım oranları gruplar arasında farklılık göstermemiş. Vakaların %25'inde, otojen greft % 47.8, ksenojen greft ise % 45.8 oranında rezorpsiyon göstermiş. Bu çalışmalara benzer başka çalışmalarda da otojen greftin iyileşme döneminde belli miktarlarda rezorbe olduğundan bahsedilmiştir [144, 145].

Otojen kemiğin rezorpsiyonu önlemek ve biyolojik aktivitesini ile rejenerasyonu arttırmak için yapılan çalışmalar birçok uygulamanın (mine matriks türevleri, düşük doz lazer uygulamaları, trombosit zengin plazma, trombosit zengin fibrin, kemik morfojenik protein, bariyer membranlar v.b.) kombinasyonu şeklindedir [34-36, 133].

2.5.2 Allogreftler

Allogreftler, aynı türe ait ancak aralarında genetik benzerlik bulunmayan vericiden elde edilen kemik greftleridir ve canlı hücre içermezler. Allogreftler değişik genotipe sahip kadavralardan elde edilir [146].

Tabii tutulan işlemlere göre 3 gruba ayrılırlar:

- Taze dondurulmuş kemik
- Dondurulmuş kurutulmuş kemik
- Demineralize dondurulmuş-kurutulmuş kemik

Dondurma-kurutma ya da radyasyon uygulama, greftlerin uygulanması sırasında meydana gelebilecek enfeksiyon ya da immün reaksiyon gibi riskleri önemli derecede azaltır. Amerikan Periodontoloji Akademisi, kansellöz allogreftlerin daha fazla kemik iliği içerdiği ve daha fazla antijenik olacağından ötürü, kortikal allogreftlerin kullanımını önermektedir [147].

Demineralizasyon işlemi hidroklorik asit ile gerçekleştirilir ve kemik morfojenik proteinleri de içeren kemik matriks içerisindeki kemik büyümesini uyaracak faktörlerin ortaya çıkarılması amacıyla yapılmaktadır [148] ancak demineralize greftlerin osteoindüktif kapasitesi kesin olarak kanıtlanmamıştır. Farklı doku bankalarından elde

edilen demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik örnekleri fareler üzerinde uygulanmış ve bazılarının osteoindüktif bazılarının ise osteokondüktif olduğu bulunmuştur [149].

Allogreftlerin en temel avantajı donör bölge gereksinimini ortadan kaldırmalarıdır. Ek olarak, sınırsız mevcudiyetleri, gerektiğinde geniş hacimlerce kullanılabilmesidir fakat bu tür kullanımlarda kemik oluşumunu öngörebilmek için farklı materyaller grefte eklenmelidir. Dondurulmuş kurutulmuş kemiğin rezorpsiyon süresi yaklaşık 1 yıl ve daha fazla iken, demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemiğin rezorpsiyon süresi ise yaklaşık 6 ay kadardır [150, 151]. Kemik rejenerasyonu için demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik kullanan çalışmaların sonuçları tartışmalıdır. Bazı çalışmalar bu kemiğin osteopromotif özelliklere sahip olduğu gösterirken [35, 152], diğerleri de bu yararı sorgulamaktadır [153, 154].

2.5.3 Ksenogreftler

Ksenogreft terimi yunanca kelime "xeno(s)" (=yabancı)' dan gelmektedir ve bunun anlamı bir türden alınan greft dokusunun, başka bir türe transplante edilmesidir. Geçmişte bu terim heterogreft olarak literatürde yer almaktaydı. İlk başarılı ksenogreft uygulaması 1668 yılında cerrah Job Janszoon van Meekeren tarafından gerçekleştirilmiştir [32]. Ksenogreftler, insan dışında, hayvanlardan elde edilen kemiğin inorganik kısmından üretilirler ve osteokondüktiftirler. Günümüzde kullanılmakta olan iki tip ksenogreft vardır [148].

a. Mercan kaynaklı kalsiyum karbonatlar

b. Sığır/at kaynaklı hidroksiapatitler

Mercan kaynaklı greftler ortopedik, kraniofasyal, oral ve periodontal cerrahide kemik defektlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Biyouyumunun çok iyi olması, osteokondüktif özelliği, kolay hazırlanması, kolay şekillenmesi ve maliyetinin düşük olması bu türün avantajlarıdır. Mercan, kemiğe yapısal olarak yakınlığı ve biyolojik olarak da inert bir madde olması nedeni ile ideal bir greft materyalidir [155].

Mercanlar yumuşak ve sert formlarda bulunur. Sert mercanlar kemik ogmentasyonu için tek uygun mercan tipidir. Kalsiyum fosfat ve kalsiyum karbonat kaynaklıdır. Materyal çoğunlukla poröz kalsiyum karbonattan oluşurken tüm iç ve dış

yüzeyleer çoğunlukla hidroksiapatit olan ince kalsiyum fosfat tabakasıyla kaplıdır. Bu kalınlık değiştirilerek değişik rezorpsiyon hızları olan başka bir grup oluşturulabilir [156].

Mercan kaynaklı hidroksiapatitin yavaş emilmesi birçok klinik uygulamada dezavantaj olarak görülmektedir. Emilim hızını artırmak için mercan kaynaklı greftlerin hazırlanmasında bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu gelişmelerden biri hidroksiapatitin, kalsiyum karbonat ile birleştirilmesidir. Bu kompozit birleşik, kalsiyum karbonatın hidrotermal yolla kısmi olarak hidroksiapatite çevrilmesiyle elde edilir. Bu işlem sonucu üstü ince bir tabaka hidroksiapatit kaplı bir kalsiyum karbonat ana yapısı ortaya çıkar. Sonuç olarak bu kompozit implantın erken dönemdeki biyolojik davranışı, saf bir mercan kaynaklı hidroksiapatit implantı gibidir. Birkaç ay içinde hidroksiapatit tabakası erir, kalsiyum karbonat yapı açığa çıkar ve kısa zamanda rezorbe edilerek, yerini yeni oluşan kemiğe bırakır [157].

Biocoral (Inoteb, Saint Gonny, Fransa) piyasa adıyla mercan kaynaklı greft piyasada mevcuttur. %97-98 oranında kalsiyum karbonattan oluşur ayrıca stronsiyum, florim, magnezyum, sodyum ve potasyum içerir [158]. Porözite oranı %45' den fazladır ve 250µm (150-400 arasında) çapında porlara sahiptir bu yapı spongiöz kemiği taklit eder. Bu madde yüksek osteokondüktif potansiyele sahiptir çünkü herhangi bir fibröz enkapsülasyon rapor edilmemiştir. Kısmen rezorbe olabilmektedir fakat rezorpsiyon yılı 5-7 yıl civarındadır [151]. Literatürde diğer greft materyalleri ile karşılaştırılabilecek olumlu sonuçları mevcuttur. Yapılan klinik çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı klinik ataşman kazancı, defekt dolumu ve sondalama cep derinliğinde azalma oranları gösterilmiştir [159-161].

Piyasada bulunan sığır kemiği materyalleri doğal kemik minerali ve azaltılmış organik komponent şeklinde üretilmektedir. Biyokimyasal, histokimyasal ve biyofiziksel analizler sonucu, sığır kaynaklı ksenogreftte kollajen ya da herhangi başka bir protein varlığına rastlanılmamıştır. Kimyasal tepkimelerle tüm organik yapı arındırılır ancak mikro yapı korunur. Bu yapı doğal kemikteki poröz yapıyı taklit etmesi sayesinde yeni kemik oluşumu için iskelet görevi görür [162]. Bu materyalin avantajı, insan kemiğinin yapısına yakın olması ve sentetik kemik materyallerinden daha fazla osteokondüktif özelliğe sahip olmasıdır [148].

Şu an piyasada bulunan sığır kaynaklı hidroksiapatit deproteinize, hücre aracılı rezorpsiyona uğrayan doğal mikroporöz yapıdadır ki bu yapı yeni kemikle yer değiştirmeyi sağlamaktadır. Bu greftlerin artırılmış yüzey yapılar, osteokondüktif bir çatı oluşturur, poröziteleri ve mineral yapıları da insan kemiği ile kıyaslanabilecek ölçüdedir. Periodontolojide, kemik içi defekt tedavisinde ve alveoler kemik ogmentasyonunda başarı ile kullanılmaktadır [33, 163, 164].

Biodegradasyon olarak adlandırılan rezorpsiyon, kemik greftinin başarısını etkileyen önemli bir faktördür. İyileşme sürecinde rezorbe olan greft materyalinin yerini yeni oluşan kemiğe bırakırken, greft materyali bütünlüğünün kaybolmaması istenmektedir [165]. Sığır kaynaklı ksenogreftin yavaş rezorbe olduğu ve enkapsüle olduğu bazı çalışmalarca gösterilmiştir [25, 165, 166].

Schlegel ve Donath [167] yaptıkları klinik çalışmada mandibuladaki kemik defektlerini %100 sığır kaynaklı hidroksiapatit ile doldurmuşlardır ve greftleme işleminden 6 yıl sonra bile greft materyallerinin önemli ölçüde var olduğunu göstermişlerdir.

Sartori ve ark. [168] ise sığır kaynaklı hidroksiapatit ile maksiler sinüs tabanı greftlenmesi yapılan bir hastayı 10 yıl boyunca takip etmişler. Rezorpsiyon hızını ikinci yıla kadar aylık %3.55 olarak gözlemlemişler. Bunu takip eden 8 yıl boyunca bu değer düşüşe uğramış ve aylık %0.58' e kadar gerilemiştir

Paknejad ve ark. [169] tavşanlarda oluşturdukları 6mm'lik kritik boyutlu defektlerde iki değişik sığır kaynaklı greft materyalinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Kalvaryalarda açılan 3'er adet kritik boyuttaki defektlerin ilkine Bio-Oss, ikincisine NuOss ve üçüncü defektini boş bırakılmıştır. Birinci ve ikinci aylık incelemenin sonucuna göre Bio-Oss grubunda yeni kemik oluşumu yüzdesi 4. haftada %16.12, 8. haftada %22.91, NuOss grubunda yeni kemik oluşumu yüzdesi 4. haftada %16.17, 8. haftada %25.5 bulunurken, kontrol grubunda ise 4. haftada %13.7, 8. haftada ise %18.7 bulunmuştur. Reziduel greft materyali yüzdesinin 4. haftadan, 8. haftaya azaldığı, fakat gruplar arası farklılık olmadığı vurgulanmış. Yazarlar her iki materyalin de kemik rejenerasyonu amacıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Kürkcü ve ark. [170] yaptıkları çalışmada sinüs ogmentasyonu operasyonunda sığır kaynaklı hidroskiapatit ile beta trikalsiyum fosfat kullanımını karşılaştırmışlardır.

23 hastanın 13'ünde sığır kaynaklı hidroksiapatit, 10'unda beta trikalsiyum fosfat kullanmışlardır. Operasyon sonrası ortalama 6,5 ay bekleyip greftlenen bölgelerden kemik biyopsisi almışlardır. Histomorfometrik analizlerde, iki greft materyalinde osteokondüksiyon ve biyouyumluluk bakımından sinüs tabanı yükseltme işlemlerinde başarılı bir şekilde uygulanabileceği bildirilmiştir. Ancak osteokondüksiyon açısından sığır kaynaklı hidroksiapatitin daha etkili olduğu görülmüştür.

Lambert ve ark.'nın [171] hayvan çalışmasında, sinüs ogmentasyonunda sığır kaynaklı ksenogreft ve otojen greft kullanımının karşılaştırılması amaçlanmıştır. 15 tavşanın maksiller sinüslerinin üst kemik duvarında açılan defektlere greft uygulanmasını takiben 7. gün, 5. hafta ve 6. ayda alınan örnekler histolojik ve histomorfometrik olarak değerlendirilmiştir. 6. ayda otojen greft uygulanan bölgede kemik dansitesinin 5. haftaya göre daha düşük olduğu görülmüştür. Sinüs membranı ve osteoid dokunun altında osteoklastların varlığı saptanmıştır. 6. ayda sığır kaynaklı ksenogreft uygulanan bölgede 5. haftaya göre daha çok sıklıkta kemik iliği görülmüş, çok çekirdekli dev hücrelere rastlanılmamıştır. Partiküllerin sadece lameller kemikle temasta olduğu gözlenmiştir. 6. ayda yeni kemik oluşumu otojen greft ve sığır kaynaklı ksenogreft uygulanan bölgelerde sırasıyla %18.7 ve %16 olarak hesaplanmıştır. Otojen greft uygulanan bölgede greft hacminde 6. ayda %27 azalma, sığır kaynaklı ksenogreft uygulanan bölgede ise %7 azalma olduğu rapor edilmiş ve sığır kaynaklı ksenogreftin yavaş rezorbe olan osteokondüktif bir materyal olduğu bildirilmiştir.

Sığır kaynaklı ksenogreft ve mine matriks proteini kombinasyonu ile yapılan bir çalışmada Velasquez-Plata ve ark. [22], bu kombinasyonunun, sadece mine matriks proteinine göre 0.99mm daha fazla kemik dolumu gerçekleştirdiğini rapor etmiş. Yine aynı araştırmacıların yaptıkları başka bir çalışmada ise, ksenogreft ve mine matriks proteini kombinasyonunun etkinliğini, sadece ksenogreft ile karşılaştırmışlar, iki teknikte de, %63'den %67'ye kadar eşit kemik dolumu elde etmişlerdir. Otörler bu çalışmaların sonucunda sığır kaynaklı ksenogreftin sert doku rejenerasyonunda mine matriks proteini kadar etkin olduğunu savunmuşlardır [172].

Yukarıda bahsedilen çalışmalara zıt olarak, sığır kaynaklı greft materyallerinin kemik iyileşmesine katkısının olmadığını belirten çalışmalar da literatürde yer almıştır [173-175]. Bu çalışmalarda greft partiküllerinin kemikten ayrı bir şekilde ve bağ doku tarafından enkapsüle olduğu ayrıca osteokondüktif etki göstermediği vurgulanmıştır.

2.5.4 Sentetik (Alloplastik) Kemik Ürünleri

Alloplastlar; seramikler ve polimerler olarak iki gruba ayrılır. Seramikler grubundaki ürünler kemik yapısına benzer özellikler taşır, en sık kullanılanları kalsiyum fosfat ve hidroksiapatittir [148].

Beta trikalsiyum fosfat, kalsiyum fosfatın poröz formudur, biyolojik olarak defekti doldurur ve kemikle yer değiştirmeye izin verir, kemik gelişimi için bir çatı oluşturur [176].

Hidroksiapatit; yoğun, poröz veya kristalin şeklinde bulunmaktadır. Yoğun hidroksiapatit inorganiktir ve böyle olduğu için de bir implant yüzeyine büyüyemez. Kortikal kemikten 3 kat daha ve kemikten ziyade dentine benzer. Dolayısıyla, kemik içine yerleştirildiğinde prime amaç bir boşluk oluşturmak ve kemiğin konturunu veya hacmini korumaktır. Yoğun hidroksiapatitin daha yaygın kullanımı, yumuşak doku konturunu geliştirmek için implant çevresinde kullanılması ve kret ogmentasyonu şeklindedir. Yüksek kristalin hidroksiapatit, amorf formuna göre hücresel yıkıma daha dirençlidir. Daha poröz veya amorf formlar ise kemiğe ve yumuşak doku içine yerleştirildiğinde rezorbe olabilmektedir [151].

Klinik olarak hidroksiapatitin emilimini hızlandırmak için çeşitli uygulamalar geliştirilmiştir. Bunlar; kalsiyum karbonatın dış kabuğunun hidrotermal olarak hidroksiapatite çevrildiği implantlar, hidroksiapatitten elde edilen bifazik kalsiyum fosfat seramikler ve hidroksiapatit ile trikalsiyum fosfat karışımı olan kompozit materyaller olarak sayılabilirler [177]. Bifazik kalsiyum fosfatlar, %99'dan fazla kristalliğe sahiptir ve %60 hidroksiapatit ve %40 trikalsiyum fosfat içerir. Klinik görüşler hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat oranının 60/40 şekilde olmasının, materyalin biyoabsorbsiyonunun daha iyi kontrol edildiğine ve sonuç olarak kemik oluşumunun etkinliğinin arttığı yönündedir [178].

Biyoaktif camlar temelde silikon dioksit, soda, kalsiyum oksit ve fosfor oksit içerir. Yüzey reaksiyonu, doku sıvılarıyla bir araya gelince başlar ve hidroksi-karbonat apatit tabakası oluşur bu tabaka kollajen, büyüme faktörleri ve fibrine bağlanarak osteojenik hücrelerin ilerlemesini sağlayan poröz matriks oluşturur. Antibiyotikler ile ve kemik yapımını arttıran maddeler ile karışım halinde kullanılamazlar. Hidroksiapatitten daha dayanıklıdır [177].

Alloplastların diğeri bir formu polimetilmetakrilat ve hidroksimetilmetakrilat polimerleri; kalsiyum hidroksitle kaplanmış rezorbe olmayan mikroporöz polimerik boncuklar şeklinde bulunur. Bunun piyasadaki adı Hard Tissue Replacement Polymer şeklindedir [179]. Bu madde alveoler kemikle kontak halinde olduğunda, yeni kemik formasyonu için çatı görevi yapar. Osteokondüktif etkilidir ve rezorbe olmaz partiküller negatif enerji ile yüklendiğinde kemiğe yaklaşır, ürünün hidrofilik özelliği pıhtı formasyonunu kolaylaştırır fakat doku dostu bir ürün değildir [141].

2.6 Kemiğin Yapım ve Yıkımının Mekanizması ve Biyokimyasal Belirteçleri

Kemik sürekli değişime uğrayan dinamik bir doku olup, %30'u organik matriks, %70'i inorganik matriks ve hücrelerden oluşur [180]. Bunun yanı sıra kemik, çok sayıda madde ve faktörün katıldığı yapım ve yıkım işlemlerinin birbirini takip ettiği dinamik ve karmaşık bir dokudur.

İskeletin yapısını koruması için, kemik yapımının ve yıkımının koordineli bir şekilde hayat boyu devam etmesine “Kemik Remodelasyonu” denir [181]. Kemik remodelasyonu lokal veya sistemik birçok faktör tarafından kontrol edilir. Lokal faktörler; büyüme faktörleri, sitokinler, prostoglandinler gibi otokrin veya parakrin etki gösteren moleküllerden oluşurken, sistemik faktörler ise paratiroid hormon, kalsitonin, 1,25 dihidroksivitamin D₃, glikokortikoidler, androjenler ve östrojenlerdir [182, 183]. Kemik remodelasyonu, farklı hücrelerin rol aldığı ve birçok fazı içeren bir süreçtir. Dinlenme, aktivasyon, rezorpsiyon, dönüş ve formasyon evrelerini içeren bu döngüde temel birçok hücreli birim için rezorpsiyon fazı 3-4 haftalık bir süreçte oluşur fakat formasyon fazı 3-4 ayda tamamlanır [182]. (Şekil 2.3)

Dinlenme evresinde kemik, ince ve yassı şekilli osteoblast olan astar hücreleriyle kaplıdır. Bu hücreler kemik matriksini direk osteoklast etkileşiminden korur ayrıca rezorpsiyon olmadığı zaman, OPG ve RANKL salgılayarak osteoklast dönüşümüne katkıda bulunur [184].

Rezorpsiyon fazının ana elemanları olan osteoklastlar, hematopoetik hücrelerden köken alırlar ve ilgili alana kan desteği ile gelirler. Çok çekirdeklidir ve monosit ve makrofajların bazı özelliklerini gösterirler. Dalgalı görünümlü membranları vardır ve kemik matriksindeki kollajeni yıkmak için katepsin, kemik hidroksiapatitini yıkmak için de proton pompası salgırlar. Aktivasyonları için makrofaj koloni stimüle edici faktör, osteoblastlar, stromal hücreler ve osteositlerden salgılanan RANKL gereklidir. Bu

aktivatör osteoklast üzerindeki RANK ile bağlanarak, osteoklast formasyonunu indükler [183].

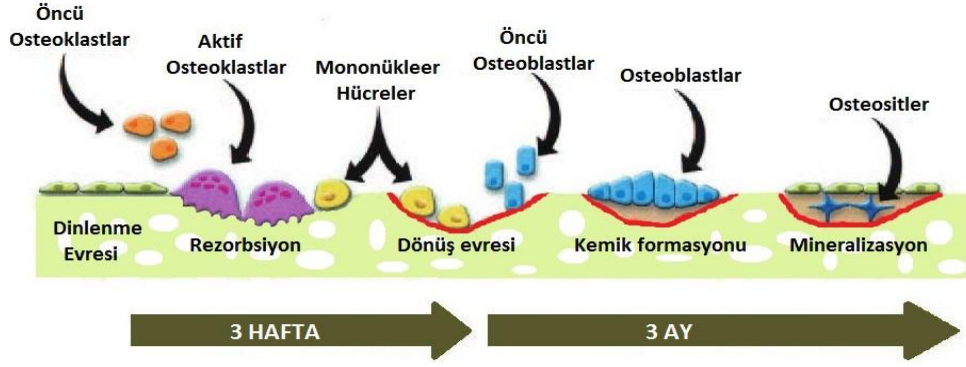
Osteoblastlar, RANKL' ek olarak OPG denilen bir faktör salgırlar. Bu faktör, RANK' a bağlanarak RANKL ile bağlanmasını engeller, böylece osteoklastogenesis engellenir [183]. Bu aktivasyonun engellenmediği durumlarda, aktive olmuş osteoklastlar kemiği rezorbe ederek trabeküler kemikte çukurlar, kortikal kemikte ise silindirik boşluklar oluşturur [185]. Rezorpsiyon boşluğu belli bir seviyeye ulaştığında osteoklastlar bölgeyi terk eder. Bu alana mononükleer hücreler gelir ve osteoklastların geride bıraktığı organik matriksi temizler ve glikoproteinden zengin bir protein tabakası salgılayarak kavite yüzeyinde ince bir tabaka oluşturarak, kemik rezorpsiyonunun daha derinlere gitmesini engeller ve osteoblastların buraya tutunarak kemik yapımına zemin hazırlarlar [186].

Osteoblastlar, mezenkimal prekürsör hücrelerden köken alır ve karmaşık bir yapılanmaya uğrar. Mevcut veriler osteoblastların kemik iliği progenitörlerinden ve damarların endoteline tutunan mezenkimal hücreler olan perisitlerden geliştiğini öne sürer [187]. Runx2, osteriks ve kemik morfojenik proteinler (KMP) osteoblastogenesisi artırarak, preosteoblastların osteoblastlara farklılaşmasını sağlarlar [183, 186].

Aktif osteoblastlar kemiğin ekstrasellüler matriksindeki kollajen olmayan proteinlerden; osteokalsin, osteonektin, osteopontin, kemik sialoprotein I/II, proteoglikanlardan; dekorin, biglikan ve tip I kollajen salgırlar ve büyük kübik yapılı hücrelere dönüşürler.

Mineralizasyon ise, proteoglikanların parçalanması ile ortaya çıkan kalsiyum iyonlarının ve osteoblastlardan salgılanan alkalin fosfatın etkisi ile organik yapının üzerine kalsiyum ve fosfor iyonlarının çökmesi ile gerçekleşir [184].

Kemiğin aktif siklusunu yakından izleyebilmek için, yapım ve yıkım sırasında ortaya çıkan birtakım protein ürünleri ve enzim ölçümlerinden faydalanılır ve bunların tümüne kemiğin biyokimyasal belirteçleri denir [188].



Şekil 2.4 Kemik remodelasyon döngüsü [183].

Kemik remodelasyonu ile ilgili belirteçler; kemik rezorpsiyon belirteçleri ve kemik formasyon belirteçleri olarak iki ayrı grupta tanımlanabilir. Bu belirteçler aşağıda sıralanmıştır [189];

A-Kemik yapım belirteçleri

- 1-Total alkalen fosfataz
- 2-Kemik alkalen fosfataz
- 3-Osteokalsin
- 4-Tip 1 prokollajenin C- terminal propeptiti
- 5-Tip 1 prokollajenin N- terminal propeptiti

B-Kemik yıkım belirteçleri

- 1-Hidroksiprolin
- 2-Hidroksilizin-glikozidleri
- 3-Pridinolin
- 4-Deoksiprinidolin
- 5-Tip 1 kollajenin çapraz bağlı C-terminal telopeptiti
- 6-Tip 1 kollajenin çapraz bağlı N-terminal telopeptiti
- 7-Tip-1 kollajenin çapraz bağlı C-terminal bölgesi

8-Kemik sialoprotein

9-Tartarat dirençli asit fosfataz

10-Serbest gamma karboksiglutamikasit

2.6.1 Osteokalsin

Osteokalsin, kemik glutamik asit protein olarak da adlandırılır. Küçük kütleli (5.4kDa), mineralize dokuların majör nonkollajen proteinidir. Kemik yapımını gösteren duyarlı ve özgün bir belirteç olarak kabul edilir. Serum osteokalsin hem kemik remodelasyonunun hem de kemik formasyonunun spesifik belirtecidir [189]. Sentezi için aktif D-vitaminine, karboksilasyonu için K-vitaminine ihtiyaç duymaktadır [188]. Osteokalsin genel olarak osteoblastlardan, odontoblastlardan ve hipertropik kondrositlerden sentezlenir ve hem kemik rezorpsiyonunda hem de mineralizasyonunda önemli rolü vardır. Yükselmiş osteokalsin seviyeleri hızlı kemik turnoverını gösterir [189].

Kritik boyutlu rat kalvaryal defektlerde, adipoz kaynaklı kök hücre ve demineralize kemik matriksinin kemik rejenerasyonuna etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yeni oluşan dokunun, fibröz bağ doku olmayıp, kemik dokusu olduğunun tespiti için ise anti-osteokalsin antikoru kullanılmıştır [190].

Yapılan bir çapraz kesitli çalışmada periodontal hastalık olan bölgelerde, sağlıklı alanlara kıyasla daha yüksek seviyelerde bulunan osteokalsin konsantrasyonunun normal serum seviyelerinden 10 kat fazla olduğu bulunmuştur. Bu seviyeler, gingival indeks gibi klinik parametrelerle korelasyon gösterirken, cep derinliği ile ilişkilendirilmemiştir [191].

Guo ve ark. [192], 48 Sprague-Dawley ratta, kemik iliği mononükleer hücre transplantasyonunun, hızlı midpalatal ekspansiyondaki kemik oluşumuna etkilerini araştırmışlar. 2 hafta sonunda transplantasyon yapılan gruptaki örneklerde, midpalatal sütür bölgesindeki ekstrasellüler matriks ve işsi hücrelerde güçlü osteokalsin ekspresyonu görülmüştür. Bu sonuç hemotoksilen-eosin boyamalarında yeni oluşmuş kemikle desteklenmiştir.

2.6.2 Kemik Morfojenik Protein (KMP)

KMP'ler, dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) ailesinin bir üyesi olup; kemik yapımı, onarımı ve devamlılığının düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. Otokrin veya parakrin mekanizmalarla hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar ve farklı hücre türleri üzerinde etkili olacak bir dizi olayı başlatırlar [193]. KMP, hem embriyolojik hem de kırık tamiri aşamasında osteogenesizin potansiyel indükleyicisidir [194].

Dr. Marshall Urist 1965 yılında KMP'leri ilk kez tanımlamış ve demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti ile ektopik kemik oluşumunu indüklemedeki rollerini göstermiştir. KMP şu anda çoğu saflaştırılmış ve klonlanmış olan 15'ten fazla proteini (KMP-1'den KMP-15'e) yeniden gruplandırılan kolektif bir terimi temsil eder. Büyük KMP ailesi içerisinde özellikle KMP-2, KMP-4 ve KMP-7 osteogeneziste önemli rolleri bulunmaktadır [194, 195].

2.6.2.1 Kemik Morfojenik Protein-2 (KMP-2)

KMP-2, diğer KMP'ler gibi kemik ve kırıkta gelişiminde önemli rol oynar. Hedgehog sinyal yolu, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) sinyal yolu ve sitokin-sitokin reseptör etkileşimine katılır [196]. KMP-2 osteoindüktiftir, birçok hücrede osteoblast diferansiyasyonunu indüklediği gösterilmiştir [197]. Kemik tamiri sırasında, KMP ekspresyonu osteogenezis için gereklidir. Endojen KMP-2'nin kemik iyileşmesinin erken safhalarında, ektopik kemik formasyonunda ve erişkin ossifikasyonunda önemli rolleri bulunmaktadır [198]. KMP-2 osteokalsin miktarında da artışa neden olur ve KMP-2'nin kısa süre ekspresyonu bile geri dönüşümsüz kemik formasyonunu indüklemek için gerekli ve yeterlidir.

KMP-2'nin eksikliği osteogeneziste şiddetli bozukluklara neden olmaktadır. KMP-2 eksikliği olan farelerin ekstremitelerinde, diğer osteojenik stimulanların kompanse edemeyeceği şekilde spontan kırıklar meydana gelmiştir. KMP-2 aynı zamanda endokondral kemik gelişiminde kondrosit proliferasyonu ve matürasyonu aşamasında da kritik rol oynamaktadır [199].

Spector ve ark. ratlarda yaptıkları bir çalışmada, kırık iyileşmesinde KMP ekspresyonunu araştırmıştır. KMP-2,-4 ve -7'nin, iyileşmenin erken safhalarında, kırık kallusunun içinde osteoblastlar, osteoklastlar ve primitif mezankimal hücrelerden ekspresyonları gösterilmiştir. Ayrıca bu proteinlerin ekspresyonunun kemik

remodelasyonu süreci boyunca da salgılandığı, fakat daha az belirlendiği gözlenmiştir. Bu proteinlerin immün boyanmaları, histolojik olarak olgun lameller kemik ile örtüşmüştür. KMP'lerin membranöz kemik tamirinde kritik rol oynayan düzenleyiciler olduğu sonucuna varılmıştır [200].

Tavşanlarda, distraksiyon osteogenez esnasındaki kemik oluşumunu belirlemek için araştırmacılar immün boyama ile KMP-2, -4 ve -7 aktivitesini incelemişler. Cerrahiden 1 hafta sonra boyanan bölümler, kallus yapısında mezenkimal hücreler ile preosteoblastlar olmuştur. 3 haftalık distraksiyon periyodunda, KMP artışı devam etmiş ve fibroblastlar ve kondrositlerde yoğun bir şekilde KMP ile boyanmıştır. Olgun osteoblastlar boya aktivitesi göstermezken, preosteoblastlar ve erken osteoblastlar KMP ile boyanmıştır [201].

Rasubala ve ark. ratlardaki mandibular kırık iyileşmesinde trombosit kaynaklı büyüme faktörü-B ve KMP-2'nin etkilerini değerlendirmiştir. Ratların sağ mandibulaları klemp ile kırılmış ve 3. , 7., 14. ve 21. günde sakrifiye edilmiştir. İmmünohistokimyasal analizlerde, kırıktan 3 gün sonra periostun etrafındaki hücreler hariç, proliferasyona uğramış birçok periost hücresi sitoplazmalarında KMP-2 boyanması göstermiştir. Kırığa komşu bazı primitif mezenkimal hücreler de KMP-2 ile boyanmışlardır. 14. günde ise kalsifiye kırıkta matriksi ve örgü kemiği çevreleyen osteoblastlar en yoğun boyanmayı göstermiştir. 21. günde ise trabeküler kemik etrafındaki osteoblastlar KMP-2 boyanması göstermiştir [202].

2.7 Kalvaryal Defekt Modeli

Hayvan modellerinde kemik dokunun 5 biyolojik aktivitesi araştırılabilir; osteogenez, osteokondüksiyon, osteoindüksiyon, kütle transferi ve biyofiziksel etki. Hayvan modelleri arasında kemirgenlerle yapılan çalışmalar, kemik doku rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda ağırlıklı olarak kullanılır [203].

Kalvaryaya, vücudun önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Çok çeşitli ve genellikle çift ve simetrik olan kemiklerden oluşur. Vücuttaki diğer kemiklerle karşılaştırıldığında biyolojik inerttir. Bu özellik yetersiz kanlanma ve miktar olarak azalmış kemik ilişkisiyle ilişkilidir. Kanlanması da özel bir yapı gösterir. Deney hayvanlarındaki kalvaryal defektlerin rejeneratif kapasiteleri insanlarındakinden daha iyidir. Kalvaryanın gelişimi morfolojik ve embriyolojik olarak membran sürecinden gerçekleşir dolayısıyla çene ve

yüz bölgesinde yer alan membranöz yolla gelişmiş kemiklerle benzerlik gösterir. Anatomik olarak kalvaryaya iki kortikal tabaka içerir ve bu açıdan da mandibulaya benzerlik gösterir. Fizyolojik olarak da kalvaryal kortikal kemik atrofik bir mandibulaya benzerlik gösterir [204].

Kalvaryal defekt modeli araştırmacılar arasında; kalvaryanın kemik yapısından dolayı standart defektlerin tek tip ve tekrar oluşturulabilmesinin kolaylığı ve bu defektlerin histolojik, radyografik analizlerinin kolay olması, cerrahi işlem boyutu için gerekli anatomik lokasyonun kolay ulaşılabilir olması, ameliyat sırasında işlem kolaylığı, duranın ve alttaki cilt yapısının implant materyali için eksternal ve internal fiksasyon gerekmeden yeterli desteği sağlaması, greftlenmiş bölümlerin kontrolle karşılaştırabilmesinin mümkün olması açısından çok yaygındır [205-207].

Schmitz ve Hollinger [208] kritik boyutlu defekti, bir hayvanda herhangi bir osteopromotif bir materyal kullanılmadan yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı (dolumu) ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak tanımlamıştır. Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibröz bağ dokusuyla iyileşme eğilimi göstermektedirler.

Literatürde, kemik rejenerasyonu açısından biyomateryal uygulanan birçok çalışmada 5 veya 8mm çapındaki defektler kritik boyutta defekt olarak adlandırılmıştır [209-212].

Honma ve ark. [213] rejenerasyon sürecini Wistar ratlarda oluşturulan, subkritik (3.8mm çapında) ve kritik (8.8mm çapında) boyutta defektlerde araştırmışlar. İki defekte de rejenerasyon görülmüştür, bunun yanısıra küçük defekt 24 ayda tamamen kapansa da, büyük defekte fibröz bağ doku oluşumu görülerek kemik oluşumu gerçekleşmemiştir.

Bosch ve ark. erişkin ratlarda 5mm'lik defekti kritik boyutta defekt olarak tanımlamışlar ve 12 ayın sonunda defekt marjinlerinde kemik rejenerasyonu görülse de, spontan iyileşme gerçekleşmemiştir. 5mm çapındaki defektlerin avantajı midsagittal sinüs lezyon riskini azaltarak sagittal sütürün iki tarafına da tek hayvanda defekt açılabilmesidir [214].

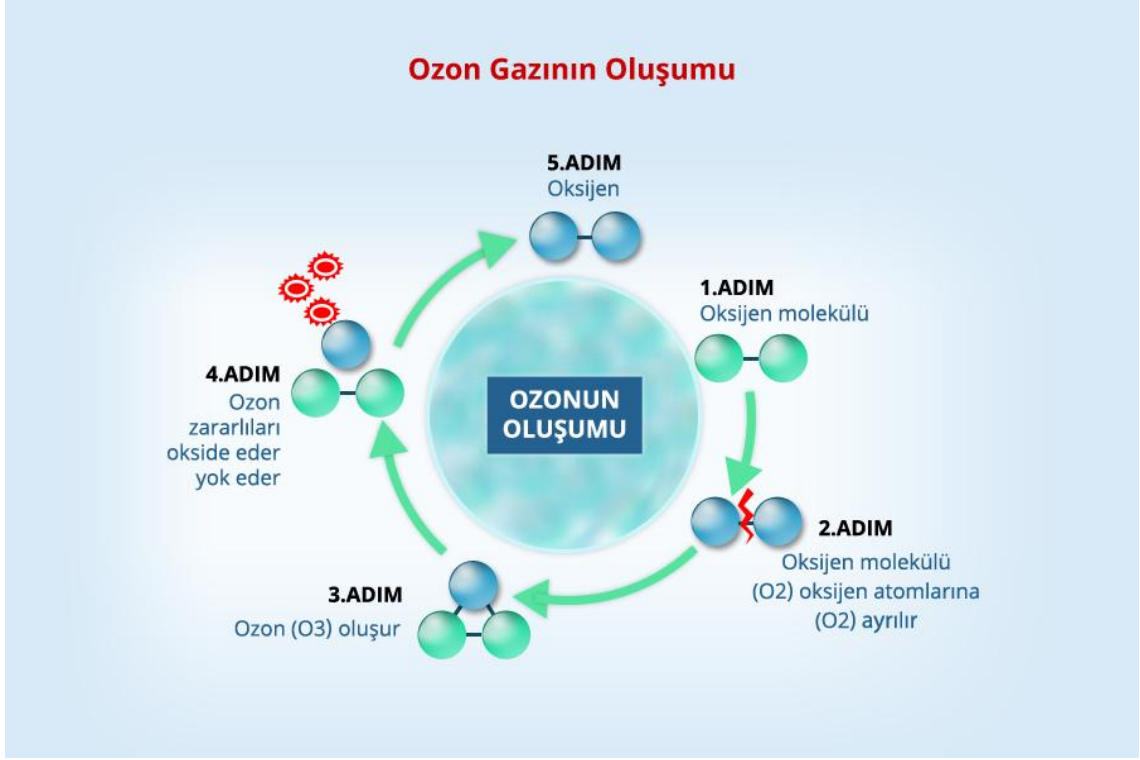
2.8 Ozon

Ozon, (triatomik oksijen veya trioksijen) doğal olarak oluşan üç oksijen atomunun bileşimidir. Ozon doğada stratosferde 1-10 ppm konsantrasyonlarında gaz formunda bulunur. Molekül ağırlığı 47,98 g/mol, endotermik ve termodinamik olarak oldukça kararsız bir oksijen bileşiğidir. Kısa yarılanma ömrü ile basınç ve ısı gibi çevre koşullarına bağlı olarak kısa süre içinde moleküler oksijenden atomik oksijene dönüşür [215].

Ozon güneşin ultraviyole ışınları ya da yıldırım esnasında havadan ayrışma ile oluşan doğadaki en önemli dezenfektandır. Ozon çok aktif yapıdadır. Bir süre sonra kendiliğinden bir fazla oksijen atomu yapıdan ayrılır ve oksijen formuna geri döner. Ayrılan tek oksijen atomu ise hava veya suya karışır. Ozon kesinlikle depolanamaz yerinde üretilir ve kullanılır.

Ozon molekülleri oksijen haline sürekli yıkılır ve oluşturulur. Bu kimyasal reaksiyonların her ikisi de güneşin yüksek frekanstaki ultraviyole ışığı tarafından katalize edilir. Sonuç olarak, atmosfer yüzeyine ulaşan stratosferdeki zararlı olan B ve C ultraviyole radyasyonları ozon tarafından emilir. Bu nedenle stratosferdeki ozon, hem stratosferin termal yapısında hem de dünyanın yüzeyindeki yaşam için ekolojik çerçevede kritik öneme sahiptir (Şekil 2.4) [42].

Ozon kimyasal yapısı itibariyle radikal özelliği taşımamakla birlikte, bilinen en güçlü 3. oksidan maddedir [43]. Atmosferik oksijenden daha yüksek bir enerjiye sahiptir. Ozon su içerisinde oksijene göre 1.6 kat daha yoğun ve 10 kat daha çözünbilir özelliktedir [215].



Şekil 2.5 Ozon gazının oluşumu [216]

1785'te Van Marum elektrostatik makinesinde kıvılcımlar oluştuğunda etrafındaki havanın kendine özgü bir kokusunun olduğunu fark etmiştir. 1801'de Cruickshank aynı kokuyu suyun elektrolizi sırasında anot kısmında duymuştur. Sconbein 1840'ta bu maddeyi, Yunancada koklamak anlamına gelen "Ozein" olarak tanımlamıştır. 1856'da ameliyathanelerin dezenfeksiyonunda kullanılırken, 1857'de Werner Von Siemens bir ozon jeneratörü tasarlamıştır. Daha sonraki bu tip jeneratörlerin öncüsü olduğundan piyasadaki bu tip jeneratörlere "Siemens tipi" ozon jeneratörü denilmiştir. 1860'ta ilk olarak Monako'da ozon jeneratörü bitki tedavisinde kullanılmıştır. 1870'te ise medikal tedavide ilk olarak Dr. C. Lender tarafından kullanılmıştır [217].

I. Dünya Savaşı boyunca ozon gazı, Alman askerlerinde gazlı post travmatik kangreni, enfekte yaraları, yanıkları ve fistülleri tedavi etmek için kullanılmıştır [218]. Ozonun kullanımı oküler hastalıklarının tedavisinde (optik nöropati, glokoma, santral retinal ven obstrüksiyonu ve dejeneratif retinal hastalıklar gibi), akut ve kronik bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlarda, iskemik hastalıklarda, yaş ile ilgili maküler dejenerasyonda, ortopedik hastalıklarda ve dermatolojik, pulmoner, renal, hematolojik ve nörodejeneratif hastalıklarda araştırılmıştır [42, 218, 219].

19. yy'da Dr. Fisch, diş hekimliğinde ilk kez ozonlanmış suyu pratikte kullanmıştır ve Alman cerrah Dr. Erwin Payr'e tanıtmıştır. Dr. Erwin Payr bu tarihten itibaren ozonu cerrahide kullanmış ve Berlin'de 59. Alman Cerrahi Topluluğu Kongresinde sonuçlarını raporlamıştır (1935). Dental cerrahide, ozonlanmış su hemostazı desteklemek, lokal olarak oksijen beslenmesini geliştirmek ve bakteri proliferasyonunu engellemek için kullanılmıştır [42].

Ozon uygulaması için birçok yöntem mevcuttur [220];

- A- Ozon Gazı: Ozon üreten ekipmanlar, oksijeni ozona çevirir. Bunun akabinde silikon başlıklı el parçası ile ilgili bölgeye uygulanır. Değişik dişlere ve bölgelere uygun, silikon başlıklar mevcuttur.
- B- Ozonlu su: Ozon üreten jeneratörlerden, suya ozon gazının verilmesiyle oluşturulur. Suyun arıtılmak istenilen içeriklerine göre ham suya ya da sedimantasyon sonrası suya belirli konsantrasyonlarda ozon gazı uygulanır.
- C- Ozon yağı: Saf bitki ekstraktından saf oksijen ve ozonun geçmesiyle oluşturulur. Bu bitki ekstraktı bir kimyasal reaksiyona girer ve kalın viskoz yağ kıvamını alır bazı durumlarda jel kıvamında dahi olabilir. Bu yöntemin vücut dışı uygulanmasında herhangi bir zarar yoktur.

2.8.1 Yapay Ozon Üretimi ve Ozon Jeneratörleri

Yapay ozon üretimi; oksijen molekülünün parçalanmasını sağlayarak elde edilen oksijen atomlarından birini başka bir oksijen molekülüne bağlayarak ozon gazı elde edilmesini amaçlamaktadır. Bu yöntem ile ozon gazı elde edilen makinelere ozon jeneratörleri adı verilmektedir. Ozon jeneratörlerinin çalışma prensipleri 3 ana yönetime bağlı olarak gerçekleşir;

1-UV ozon jeneratörleri: 254 nm'den kısa dalga boyunda ışın veren ultraviyole lambalarının etrafından hava geçirilerek ozon gazı üretilir. UV tekniği ile ozon gazı düşük miktarlarda üretildiğinden bu yöntemde kullanım alanları sınırlıdır. Bu tip jeneratörlerinden elde edilen ozon miktarı, su dezenfeksiyonunda ya da arıtma işlemlerinde kullanılmak için yeterli etkinliğe sahip değildir.

2-Kıvılcımsız boşalma esaslı ozon jeneratörleri: Yüksek konsantrasyonda ve daha fazla ozon gazı üretimi için kıvılcımsız boşalma teknolojisinin kullanılması gerekmektedir. Kıvılcımsız boşalma, tüp vasıtasıyla sabit elektrik akımı kullanılarak

elde edilen kinetik enerji ile elektronları hızlandırarak oksijen molekülündeki oksijen oksijen bağını parçalarlar. Bu işlem sonucunda açığa çıkan oksijen atomu ozon gazını oluşturmak üzere oksijen molekülü ile reaksiyona girmektedir. Tıp ve diş hekimliği alanlarında en çok kullanılan jeneratör tipidir.

3- Düşük frekans ozon jeneratörleri: Bu tip jeneratörlerin ozon gazı üretimi için daha fazla elektrik enerjisi harcarlar, bu da onların en büyük dezavantajını oluşturur [221, 222].

2.8.2 Ozonun Biyolojik Etkileri

Gaz ya da sulu fazdaki ozonun bakteri, virüs, parazit ve mantarlara karşı güçlü ve güvenilir bir antimikrobiyal ajan olduğu gösterilmiştir. Etkisini bakteri ve mantarların hücre duvarı ve sitoplazmik membranların yıkımını indükleyerek gerçekleştirir. Bu süreç boyunca ozon, glikoproteinleri, glikolipitleri, diğer aminoasitleri tahrip eder ve hücrenin enzimatik kontrol sistemini engeller. Bunların sonucunda membranın permeabilitesi artar, daha sonra ozon molekülleri hücre içerisine girer ve mikroorganizmanın ölümüne sebep olur [223].

Yüksek konsantrasyonlardaki ozon immün sistemi baskımlarken, düşük konsantrasyonlarda ozon immün sistemi stimüle etmektedir. Ozon, oksijenin dolaşımını artırarak hücresel metabolizmada aerobik sistemin (glikoliz, Krebs döngüsü, yağ asitlerinin beta-oksidasyonu) aktivasyonuna ve enerji kaynaklarının kullanımına neden olur. Enflamasyonlu dokuda, dokunun oksijenlenmesini artırarak metabolizmasını geliştirir ve toplam enflamatuvar süreci azaltır [42, 224].

Ozon hücresel ve humoral bağışıklık sistemi üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Savunma hücrelerinin proliferasyonuna, immünglobulin sentezine ve ayrıca makrofajların fagositoz fonksiyonuna katkı sağlamaktadır. Prostaglandin, lökotrien ve interlökinlerin sentezini arttırarak, yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Süperoksit dismutaz, katalaz, dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler düşük dozdaki ozonla aktive olmaktadır. Bu enzimler organizmayı serbest oksijen radikallerinden korumaktadır. Nitrik oksit gibi vazodilatörlerin miktarını arttırarak anjiyogeneziste artışa yol açmaktadır [44].

Bocci [219, 225] tarafından yapılan yayınlarda ozonun ana etkisinin toksik değil terapötik olması için uygulamanın mutlaka doğru konsantrasyon ve doğru zaman aralıklarıyla yapılması gerektiği vurgulanmaktadır.

2.8.3 Ozon Toksisitesi

Ozonun inhalasyonu pulmoner sistem ve diğer organlar için toksik olabilmektedir. Epifora, üst solunum yolu irritasyonu, rinit, öksürük, baş ağrısı, nadiren mide bulantısı, kusma, solunum yetmezliği, kan damarlarında ödem, dolaşımın zayıflaması, kalp sorunları ve felç bilinen yan etkilerdir. Fakat bu yan etkiler seyrek görülmekle beraber her uygulama için risk % 0.0007'dir. Ozonun yüksek oksidatif etkisinden dolayı gazla temas halinde olan tüm materyaller ozona dirençli olmalıdır (cam, silikon, teflon vb.). Bununla birlikte toksikasyon durumunda hasta supin pozisyona getirilir, E vitamini ve N-asetilsistein ile tedavi edilir [226].

Ozon tedavisi kontraendikasyonları;

- Hamilelik
- Glikoz-6-fosfat-dehidrogenaz eksikliği(favizm)
- Hipertroidizm
- Şiddetli anemi
- Şiddetli myasteni
- Aktif hemoraji
- Yakınlarda geçirilmiş miyokard enfarktüsü [226]

2.8.4 Ozon Tedavisinin Diş Hekimliği Alanında Kullanımı

Diş hekimliğinde ozon kullanımı antimikrobiyal, dezenfektan ve doku iyileştirici özellikleri nedeniyle gündemdedir. Aşağıdaki alanlar ozonun diş hekimliğinde kullanım alanlarıdır [224, 227];

- Pit, fissür, kök ve düz yüzey çürüklerinin remineralizasyonu
- Geleneksel koruyucu önlemler ile birlikte açık kavitelelerin dezenfeksiyonu
- Renklenmiş kök kanal tedavili dişlerin ağartılması
- Endodontide kanal dezenfeksiyonu
- Kole hassasiyetinin giderilmesi
- Yumuşak doku patolojilerinin rehabilitasyonu
- Avülse dişlerde reimplantasyon öncesi yıkama solüsyonu olarak
- Ağız içi ülser ve yara iyileşmesinin artırılması

- Zor iyileşen enfekte yaralar ve iltihabi sürecin tedavisi, herpetik lezyonların dezenfeksiyonu
- Plak kontrolü
- Cerrahi yapılacak bölgelerin operasyon öncesi dezenfeksiyonu
- Periodontal cep dezenfeksiyonu

2.8.5 Ozon Tedavisinin Periodontolojide Kullanımı

Periodontolojide ozon tedavisinin geleneksel antiseptiklere alternatif olarak kullanımı ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır [228-230].

Nagayoshi ve ark. 2004'te, ozonlanmış suyun, mikroorganizmaların hücre geçirgenliğine ve canlılığına etkisini araştırmışlardır. *Porphyromonas gingivalis* ve *Porphyromonas endotalis* gibi gram negatif bakteriler ozona, streptokoklar ve *Candida albicans*'tan daha duyarlı bulunmuştur. Ayrıca ozonlanmış su plak biyofilmindeki *Streptococcus mutans* bakterilerine karşı güçlü bakterisidal etkiye sahiptir. Buna ek olarak ozonlanmış suyun deneysel bakteri plağını in vitro olarak inhibe ettiği belirtilmiştir [231].

Başka bir çalışmada ise yüksek konsantrasyonlardaki ozonlu suyun ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$), klorheksidin %0.2'lik konsantrasyonuna eşit bir antibakteriyel etkisi olduğu, yüksek konsantrasyonlu gaz ozonun ($\geq 4 \text{ g m}^{-3}$) ise % 2'lik klorheksidin kadar antibakteriyel etkili olup % 0.2'lik klorheksidinden ise daha da etkili olduğu gösterilmiştir [229].

Zit olarak, Eltaş ve Yavuzer [232] yaptıkları araştırmada, akut gingivitisli hastalarda diş yüzeyi temizliğine ek olarak ozon gazı uygulaması yapmışlardır. Tedaviden 4 hafta sonraki ölçümlerde plak indeksi, sondalama cep derinliği ve klinik ataşman düzeyindeki değişimler gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemiştir.

Yılmaz ve ark. [233] kronik periodontitis hastalarında, mekanik tedavi, mekanik tedavi+ erbiyum: yttrium-alüminyum-garnet lazer ve mekanik tedavi+gaz ozon uygulamasının, klinik ve mikrobiyolojik parametrelerdeki değişimi araştırmıştır. Ataşman kazancı ve sondalamada cep derinliğindeki azalma lazer grubunda diğer gruplara göre daha fazla bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da zorunlu anaerobik floradaki düşüş hem lazer hem de ozon grubunda gözlenmiştir.

Son yıllarda ozonun antiseptik ve dezenfektan özelliklerinin yanı sıra, kemik üzerine olan etkileri de araştırılmaktadır. Bu konuda ilk yapılan çalışmalardan biri de Özdemir ve ark. [207] aittir. Ratlarda kafatası defekt modelini kullandıkları

çalışmalarında otojen greft ile kombine ozon uygulamasının kemik alanı miktarı ile osteoblast sayısında artış sağladığını göstermiştir.

Kazancıoglu ve ark. [234] da ratlardaki 5mm'lik kritik boyutlu defektlerde düşük doz lazer tedavisi ve ozon tedavisini, kemik rejenerasyonu üzerine etkilerini karşılaştırmışlar ve tüm defektlere bifazik kalsiyum fosfat grefti ile restore edilmiştir. Histomorfometrik ölçümlere göre, ozon grubundaki yeni kemik alanı, kontrol ve düşük doz lazer grubundan istatistiksel olarak fazla bulunmuştur.

Hiperbarik oksijen ve sistemik ozon uygulamasının etkilerinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ise cerrahi sonrası 5., 15. ve 30. günde ratlar sakrifiye edilmiş. Histolojik ve mikrotomografik verilerde tüm çalışma gruplarında, kontrol grubuna göre defektlerde kemik yapımının arttığı gözlenmiştir. Hiperbarik oksijen ile ozon arasında ise kemik yapımı açısından fark bulunmamıştır [235].

Literatüre baktığımızda diyabetli hastalarda ozonun yara iyileşmesini desteklemek amacıyla kullanıldığını görmekteyiz. Bazı araştırmacılar diyabetik bireylerde artmış ROS artması ve antioksidan sisteminin aktivitesinin düşmesinden kaynaklanan diyabete bağlı komplikasyonları önlemek amacıyla, ozon terapisinin rutin diyabet tedavisine ek olarak kullanılmasını önermişlerdir [236].

Yapılan bir çalışmada diyabetik ayak ülserlerinin tedavisinde antibiyotik tedavisi ve ozon tedavisinin etkileri karşılaştırılmıştır. 49 hastaya sistemik ve topikal antibiyotik uygulaması yapılmıştır. 51 hastaya ise toplam 20 seans ozon gazı uygulanmıştır. 20 günün sonunda ozon uygulanan gruptaki hastaların kan glikoz seviyeleri antibiyotik kullanan gruptan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Ayrıca yara bölgesinin alanı ozonlu grupta anlamlı olarak düşüş göstermiştir. Katalaz/süperoksit dismutaz oranı ozonlu grupta daha düşük bulunmuştur [49]. Aynı araştırmacıların yaptıkları başka bir çalışmada STZ ile diyabet indüklenmiş ratlarda ozonun ve oksijenin etkisi araştırılmıştır. Ozon tedavisi hiperglisemiye %40 oranında sadece diyabetik kontrole oranla azaltmıştır. Antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri de ozon tedavisi ile yükselmiştir [237].

Zhang ve ark. [50] standart diyabetik ayak ülser tedavisini, bir ozon jeneratörünün ürettiği gaz ozonun ayağa uygulanması ile karşılaştırmıştır. Ozon grubunun iyileşme değerleri, standart tedaviye göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ozon grubunda bulunan kollajen fibrilleri, kontrolden anlamlı şekilde fazla bulunmuştur ayrıca yapılan analizlerin sonucunda yara eksudasındaki ve dokudaki, vasküler endotelial büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve TGF- β düzeyleri ozonlu grupta artmıştır.

Ozonun mineralize dokularla olan etkisindeki hücrel mekanizmalar ve güvenli doz aralığı hakkında yapılan in vivo çalışmalar ise yetersizdir. Ayrıca diyabetik rat modelinde ozon gazının kemik ve greft rejenerasyonuna olan etkisini araştıran çalışmaya rastlanılmamıştır.

Ozonun tüm bu potansiyel biyolojik etkilerine dayanarak, özellikle diyabetik yara iyileşmesindeki komplikasyonları azaltarak, kemik rejenerasyonu için ek fayda sağlayacağı hipotezi ile tasarladığımız çalışmamızın amacı; streptozotosin ile diyabet indüklenmiş ratlarda, oluşturulan kalvaryal defektlerin farklı greft materyalleri ile restorasyonu sonrası uygulanan ozon gazının kemik iyileşmesi üzerine etkisinin morfolometrik ve immünohistokimyasal açıdan araştırılmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın onayı, Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul 16.07.2014 tarihli ve 65202830/130 sayılı karar ile alındı. Denek olarak 12 haftalık, ortalama ağırlıkları 320-370gr olan 84 adet erkek Wistar rat kullanıldı.

Hayvanların genel sağlığının iyi olması önceden deney işlemine maruz kalmamış olmalarına özen gösterildi. Ayrılan ratlar $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde ve %40-60 nem oranı standardını sağlayacak şekilde ayarlanmış ortamda ayrı tip 3 kafeslerde tutuldu. Çalışmanın tüm deneysel aşamaları Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1 Deneysel Diyabet Oluşturulması

Çalışmaya alınan tüm ratlara deneysel diyabet modeli uygulandı. Deneysel diyabet oluşturmak için; $\geq 99\%$ saflıkta, 50mg/kg Streptozotosin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Almanya) kimyasal adıyla (2-Deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose(U-9889)) firmanın talimatlarına göre $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saf su ile karıştırılarak tek doz halinde intraperitoneal şekilde ratlara verildi. Olası bir hipoglisemiye önlemek amacıyla hayvanlar glikoz solüsyonu (%5) ile 12-24 saat beslendi.

3 gün sonra ratların kan şekeri düzeyleri kuyruk veninden alınan kandan glukometre (CareSens II, Pharmaco (NZ) Ltd, Auckland, Yeni Zelanda) cihazı kullanılarak ölçüldü. 300mg/dl'nin üzerindeki ölçümlere sahip ratlar diyabetik olarak kabul edildi. Ratların kan şekeri seviyeleri deney süresince 10 günde bir ölçüldü. Kilo ölçümleri ise başlangıçta, 30. ve 60. günde tekrarlandı.

Deneysel diyabet sonrası ratlar rastgele 6 gruba ayrıldı;

1-Boş defekt (Kontrol) grubu (n=14)

2-Otojen greft (OG) grubu (n=14)

3-Ksenogreft (KG) grubu (n=14)

4-Boş defekte ozon uygulaması (Kontrol+Ozon) grubu (n=14)

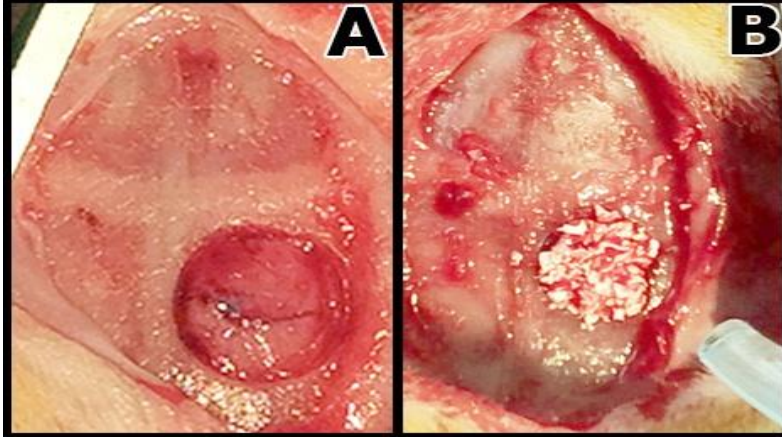
5-Otojen greftle kombine ozon uygulaması (OG+Ozon) grubu (n=14)

6-Ksenogreftle kombine ozon uygulaması (KG+Ozon) grubu (n=14)

3.2 Kalvaryal Defekt Modeli

Çalışmaya alınan tüm ratlara kalvaryal defekt modeli uygulandı. Kalvaryal defekt oluşturmak için diyabetik ratlar anestezi altına alındı (Ketamin 30mg/kg IM(Pfizer, New York, ABD) ve Rompun 5mg/kg IM (Bayer, İstanbul, Türkiye)). Ratların kafa bölgesi tıraşlanarak, antiseptik solüsyon olan Poviodoks antiseptik çözelti (Kim-pa İlaç, İstanbul, Türkiye) ile silindi. Kafa bölgesinde frontal bölgeden başlayan bir insizyon deri ve periost kalvaryadan ayrıldı. Kalvaryal bölgedeki sagittal sütür alanının sağ tarafında bir adet 5mm çapında kritik boyutlu defekt, operasyon alanına ısınmaması için 5-6mm'lik trepan frez (Mega-Gen, Seoul, Kore) üzerine steril salin solüsyonu ile sürekli irrigasyon uygulanarak oluşturuldu. Defekt bölgesindeki kemik duramatere zarar verilmemeye özen gösterilerek çıkarıldı (Şekil 3.1).

OG ve OG+Ozon gruplarında çıkarılan kemik, dental kemik öğütücüsü (Schwert, Seitingen/Oberflacht, Almanya) ile öğütülüp defekt bölgesine yerleştirildi. KG ve KG+Ozon gruplarındaki defektler 0.25-0.5mm partikül boyutları olan sığır kaynaklı inorganik kortiko kansellöz yapıda greft materyali (Mega-Oss Bovine/Mega-Gen, Seoul, Kore) ile dolduruldu. Kontrol gruplarında ise defektler boş bırakıldı. Periost, uygulanmış greft materyaline dikkat edilerek rezorbe olabilen sentetik poliglaktin esaslı sütür (Ecosorb, Vigilenz, Penang, Malezya) ile kapatıldı. Kafa derisi ise 4/0 ipek sütür (Doğsan İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) ile sütüre edildi. Postoperatif enfeksiyonu önlemek için 3 gün boyunca 30mg/kg intramuskuler antibiyotik seftriakson (Yavuz İlaç, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu yapıldı. Ayrıca 4 mg/kg antienflamatuvar ilaç olan rimadyl (Pfizer, New York, NY, ABD) operasyonun hemen sonrasında başlayarak 3 gün boyunca her 24 saate bir intramuskuler olarak yapıldı. Sütürler 1 hafta sonra alındı.



Şekil 3.1 A- Duramater korunarak oluşturulmuş kalvaryal defekt. B- Ksenogreft üzerine ozon uygulanması

3.3 Ozon Uygulanması

Ozon bir jeneratör (Prozone, W&H, Bürmoos, Avusturya) ve bu jeneratöre bağlı coro tip uç ile ratlara uygulandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Prozone Ozon Jeneratörü

Kontrol+Ozon, OG+Ozon, KG+Ozon gruplarına periost kapatılmadan 30sn boyunca 140ppm @ 2L/dk, 2.24 mg ozon uygulandı. (Şekil 3.2) Bu uygulamayı takiben 14 gün boyunca kafa derisinin üzerinden defekt bölgesine gelecek şekilde 90sn boyunca ozon gazı uygulandı (Şekil 3.3).

3.4 Ratların Sakrifiye Edilmesi

Her gruba ait ratların yarısı 4. haftada, diğer yarısı 8. haftada sakrifiye edildi. İşlem intraperitoneal olarak verilen 200 mg/kg pentotal sodyum (Ekipental, Tümeqip İlaç

Sanayi, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. Çıkarılan kalvaryalar fikse olması için %10'luk formaldehit solüsyonuna konuldu.

3.5 Histopatolojik İşlemler

Elde edilen kalvarya örnekleri histopatolojik analizler için 24 saat boyunca %10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra %10'luk EDTA solüsyonu ile dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrası defekt bölgesi, 2mm uzağından kare şeklinde kesilerek çıkarıldı. Çıkarılan bu kesit defekt bölgesinin tam ortasından bisturi ile kesildi ve örnekler ikiye ayrılarak dik şekilde ve kasetlere konuldu. Kasetlenen örnekler 24 saat boyunca doku takip cihazında önce dehidratasyon (%70, %95, %100'lük artan konsantrasyonlarda alkole tabi tutuldu), sonra şeffaflaştırma (ksilen ile gerçekleştirildi) en sonunda sertleştirme ve parafin infiltrasyonu ile doku örnekleri kesit alınabilecek dirence getirildi. Bu işlemin devamında örnekler parafine gömüldü ve bu bloklardan 5µm kalınlığında seri kesitler alınarak 1 gece 60 C⁰'de etüvde bekletildi. Alınan kesitler, ksilen ile deparafinize edildi ve Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japonya) altında farklı büyütmelemler ile değerlendirildi. Değerlendirmeler tek bir araştırmacı tarafından yapıldı. Boyanan kesitlerde, tüm defekt alanı içindeki rezorptif lakünler, defekt kenarında ve greft komşuluğunda oluşan yeni kemik alanlarındaki osteoklast ve osteoblast sayıları incelendi. Tüm defekt alanı içerisinde yer alan osteoblastlar ve osteoklastlar morfolojileri dikkate alınarak sayıldı.

3.6 Histomorfometrik Değerlendirmeler

Elde edilen histolojik kesitlerden 4X büyütmede ışık mikroskobu (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflar çekilerek bilgisayara aktarıldı ve çekilen bu fotoğraflar üzerinden bir görüntü analiz programı (Clemex Vision Lite, Quabec, Kanada) ile toplam kemik alanı (mm²), tüm cerrahi defekt alanı üzerinden analiz edildi. Histomorfometrik analizler tek bir araştırmacı tarafından yapıldı. Toplam defekt dolum alanı içinde, yeni oluşan kemik ve iliği ile uygulanan greftlerin tamamının ölçümü olarak hesaplandı. Ayrıca ksenogreft uygulanan gruplarda, kalan greft materyali (mm²), orijinal cerrahi defekt sınırları içinde rezorbe olmamış greft materyali olarak da hesaplandı.

3.7 İmmünohistokimyasal İşlemler

Parafine alınmış dokulardan 3µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler tam otomatik slayt hazırlama sistemi cihazında (Ventana Benchmark XT, Roche, Tuscon, ABD) 32 dakika boyunca 1/50 oranında dilue edilmiş anti-BMP-2 antikoru (Millipore, Massachusetts, ABD) ile inkübe edildi. Yaklaşık 4 saat cihazda bekleyen slaytlar işlem sonrası çeşme suyunda yıkandı. %80, %90, %100 alkol serisinden geçirilerek etüvde 65 C°de 1.5 saat boyunca kurutuldu. Son olarak ksilen ile şeffaflandırılarak entellan yardımıyla üzerileri kapatıldı ve ışık mikroskobu kullanılarak analiz edildi. Aynı işlemler farklı kesitler ile anti-osteokalsin antikoru (Millipore, Massachusetts, ABD) ile yapıldı ve ışık mikroskobu kullanılarak analiz edildi.

İmmünohistokimyasal analizleri değerlendirmek için semi-kantatif skorlama kullanıldı [238]. Bu skorlamaya göre gruplardaki immün boya aktivitelerine %10'a kadar olan immün pozitiflik; “-”, %10 ile %25 arası immün pozitiflik; “+”, %25 ile %50 arası immün pozitiflik; “++”, %50 ile %70 arası immün pozitiflik; “+++”, %75 ve üzeri immün pozitiflik; “++++” şeklinde değerler verildi.

3.8 İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler SPSS Ver.22 (IBM Corporation, New York, ABD) programı ile değerlendirildi. Verilerin dağılımının normalliğini test etmek için Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı. Veri dağılımları normal çıktığından tüm parametreler için tek yönlü varyans analizi ve ikili grup karşılaştırmaları için bağımsız gruplar t testi uygulandı. Verilerimiz yüzde, ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Yanılma düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Deneysel çalışma süresince genel olarak ratların uygulanan cerrahi işlemi iyi tolere ettiği, beslenmeleri açısından herhangi bir olumsuzluk gelişmediği gözlemlendi. Bununla beraber, 4. haftanın sonunda Kontrol, Kontrol+Ozon, OG+Ozon ve KG+Ozon gruplarından birer rat ve 8. haftada ise tüm gruplardan birer rat enfeksiyondan dolayı kaybedildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Deney sonunda gruplarda kalan rat sayıları

Çalışma Grupları	4. hafta	8. hafta
Kontrol	6	6
OG	7	6
KG	7	6
Kontrol+Ozon	6	6
OG+Ozon	6	6
KG+Ozon	6	6

Deney gruplarında bulunan ratların kilo ölçümleri başlangıç, 30. ve 60. günde tekrarlandı. Ratların kiloları diyabet gelişmesi ile birlikte düşüş gösterdi ve başlangıç kiloları ile 30. ve 60. günde ölçülen kiloları arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$) (Çizelge 4.2, 4.3).

Çalışmaya alınan tüm ratların diyabet indüklenmeden önce yapılan kan şekeri ölçümleri ortalaması 89.72 ± 12.38 mg/dl olarak bulundu. 50mg/kg STZ uygulamasından 72 saat sonra yapılan kan şekeri ölçümleri diyabet indüklenmeden önceki kan şekeri ölçümlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.05$). Kan şekeri ölçümleri 10., 20., 30., 40. ve 55. günde yinelendi ve deney başlangıcında yapılan kan şekeri ölçümleriyle farklılık oluşturmadı ($p>0.05$). Deney süresince alınan ölçümlerde tüm gruplarda hiperglisemi tablosu mevcuttu (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2 Deney gruplarındaki ratların 4. haftadaki kan glikoz düzeyleri ve kilolarının ortalama değerleri. *p<0.05, başlangıç kilo düzeyinden farklı

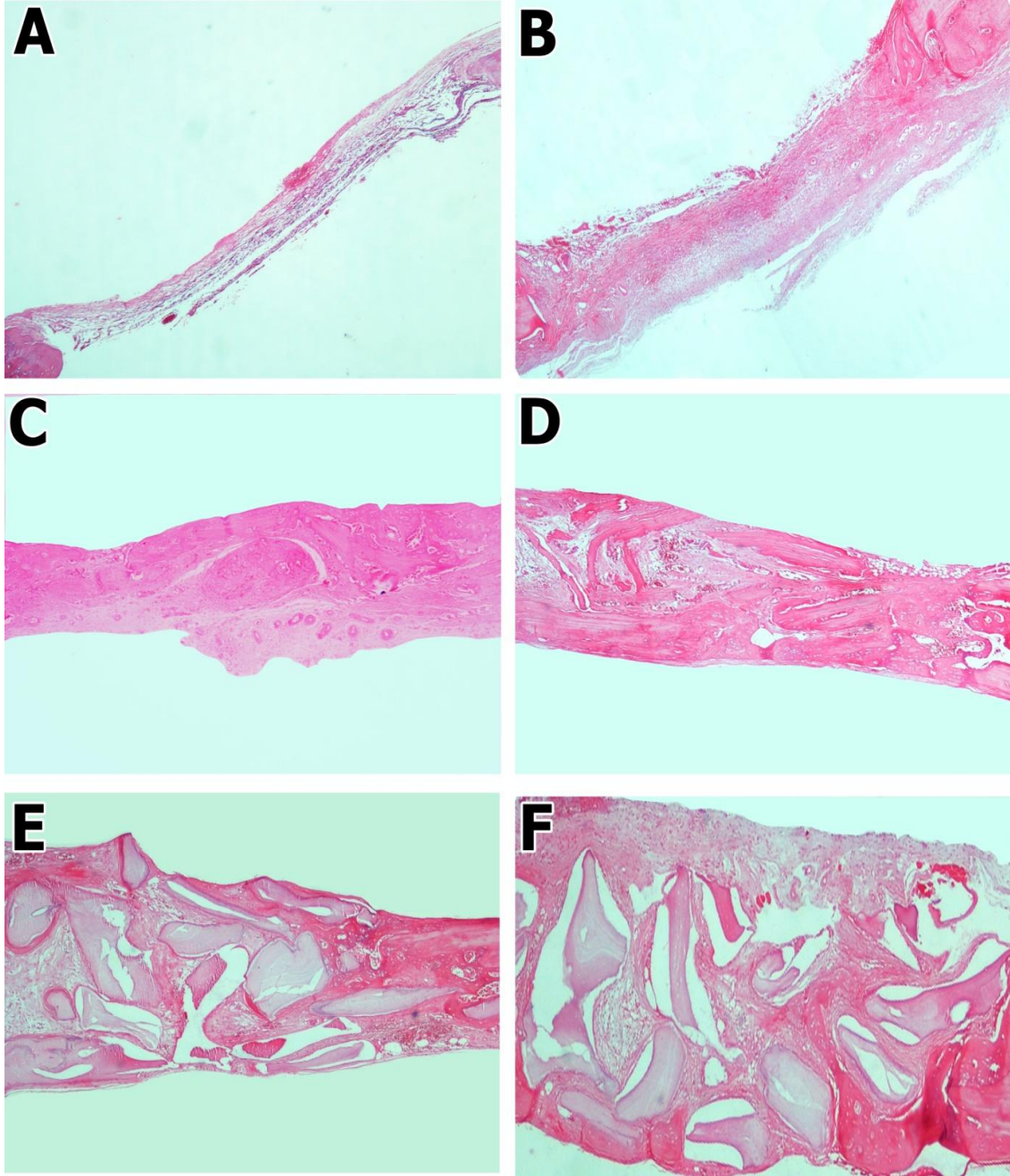
Parametre	Ölçüm zamanı (gün)	Ölçüm			Kontrol	OG	KG
		Kontrol	OG	KG	+ Ozon	+ Ozon	+ Ozon
Kilo (gr)	Başlangıç	370	370	366	365	354	369
	30.	250*	300*	273*	281*	242*	285*
Kan glikoz seviyesi (mg/dl)	Başlangıç	400	409	389	407	397	418
	10.	396	418	453	438	451	426
	20.	426	457	448	461	480	411
	30.	417	447	451	463	449	465

Çizelge 4.3 Deney gruplarındaki ratların 8. haftadaki kan glikoz düzeyleri ve kilolarının ortalama değerleri. *p<0.05, başlangıç kilo düzeylerinden farklı.

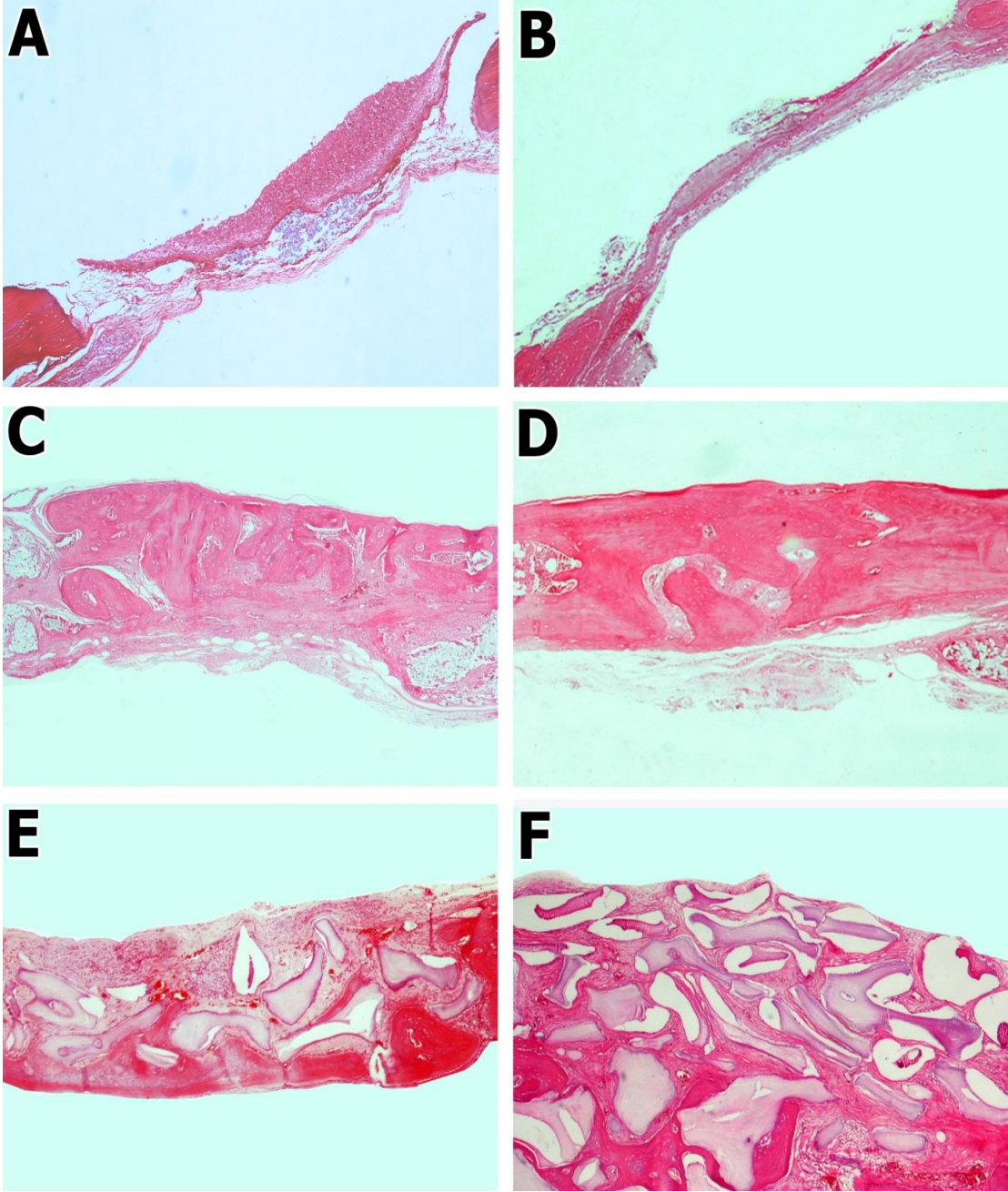
Parametre	Ölçüm zamanı (gün)	Ölçüm			Kontrol	OG	KG
		Kontrol	OG	KG	+ Ozon	+ Ozon	+ Ozon
Kilo (gr)	Başlangıç	370	350	366	365	354	354
	30.	250*	243*	273*	281*	242*	258*
	60.	178*	209*	190*	195*	193*	196*
Kan glikoz seviyesi (mg/dl)	Başlangıç	400	409	389	407	397	418
	10.	396	418	453	438	451	426
	20.	426	457	448	461	480	411
	30.	417	447	451	463	449	465
	40.	451	450	444	421	467	419
55.	463	473	457	435	462	448	

4.2 Histopatolojik Bulgular

Örneklerin analizlerinde tüm gruplarda yeni kemik formasyonu görüldü. Kontrol grubularında 4 ve 8. haftalarda kemik formasyonu defekt kenarları ile sınırlıyken, defektin orta kısmı fibröz bağ doku ile dolmuştu (Şekil 4.1-A,B, 4.2-A,B).



Şekil 4.1 Gruplara ait 4. hafta histopatolojik görüntüler (HE, 40x). A: Kontrol grubu, B: Kontrol+Ozon grubu, C: OG grubu, D: OG+Ozon grubu, E: KG grubu, F: KG+Ozon grubu

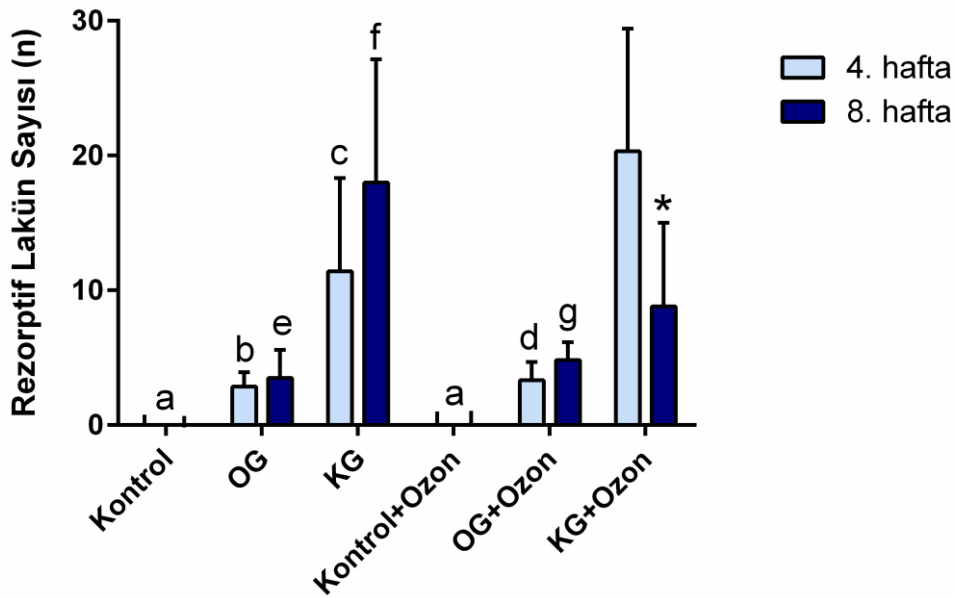


Şekil 4.2 Gruplara ait 8. hafta histopatolojik görüntüler (HE, 40x). A: Kontrol grubu, B: Kontrol+Ozon grubu, C: OG grubu, D: OG+Ozon grubu, E: KG grubu, F: KG+Ozon grubu

Rezorptif Lakün Sayısı

Kontrol gruplarına ait histolojik kesitler analiz edildiğinde her iki çalışma periyodunda da rezorptif lakün saptanmadı. KG gruplarındaki (KG, KG+Ozon) rezorptif lakün sayısı diğer gruplardan daha yüksek bulundu ($p<0.05$). KG ve KG+Ozon grubu arasında 4. ve 8. hafta karşılaştırmalarında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Gruplara ait değerler zamanlarına göre ikili karşılaştırıldığında KG+Ozon grubundaki rezorptif lakün sayısı 8. haftada, 4. haftaya göre anlamlı şekilde düşüş gösterdi ($p<0.05$).

OG ve OG+Ozon grupları arasında rezorptif lakün sayısı miktarı 4. ve 8. haftada anlamlı değişiklik göstermedi ($p>0.05$) (Şekil 4.3).

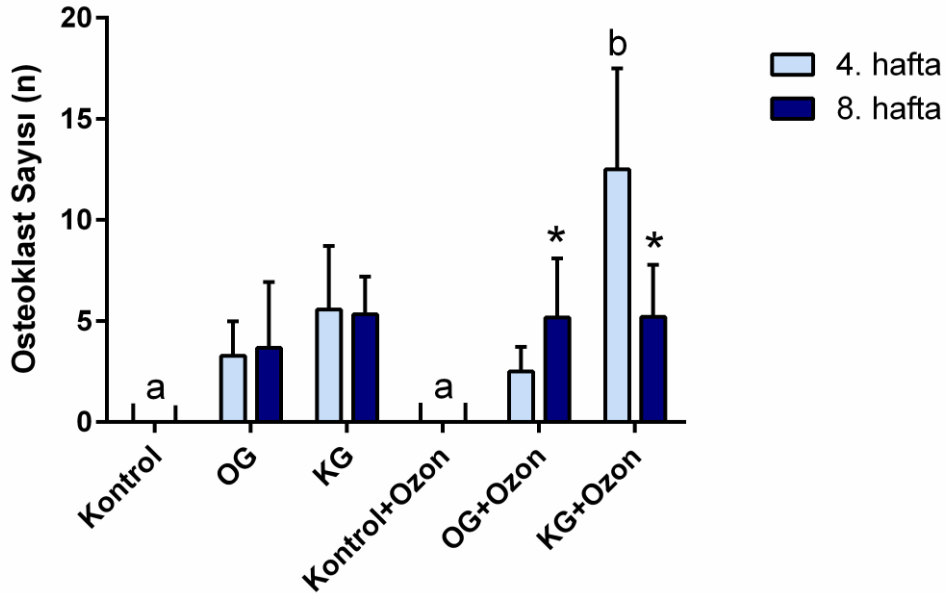


Şekil 4.3 Deney gruplarına ait 4. ve 8. hafta rezorptif lakün sayısı ortalamaları. ^a $p<0.05$, 4. hafta ve 8. haftada diğer tüm gruplardan farklı; ^b $p<0.05$, 4.hafta KG ve KG+Ozon gruplarından farklı; ^c $p<0.05$, 4. hafta OG+Ozon grubundan farklı; ^d $p<0.05$, 4. hafta KG+Ozon grubundan farklı; ^e $p<0.05$, 8. hafta KG ve KG+Ozon gruplarından farklı; ^f $p<0.05$, 8. hafta OG+Ozon grubundan farklı; ^g $p<0.05$, 8. hafta KG+Ozon grubundan farklı ($p<0.05$). * $p<0.05$, 4 haftadan farklı.

Osteoklast Sayısı

Işık mikroskopundaki değerlendirmelerde ozon uygulanan ve uygulanmayan kontrol gruplarında osteoklastlara rastlanılmadı (Şekil 4.7-A,B). Ayrıca KG ve OG gruplarında, osteoklast sayıları 4. ve 8. hafta arasında benzerdi ($p>0.05$). KG+Ozon grubunda osteoklast sayıları 8. haftada, 4. haftaya göre anlamlı şekilde düşüktü ($p<0.05$), OG+Ozon grubunda ise osteoklast sayıları 8. haftada artış gösterdi ($p<0.05$).

KG+Ozon grubundaki osteoklast sayıları 4. haftada diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$) (Şekil 4.7-F). 8. haftada greft kullanılan gruplar arasında osteoklast sayısı açısından anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.4).



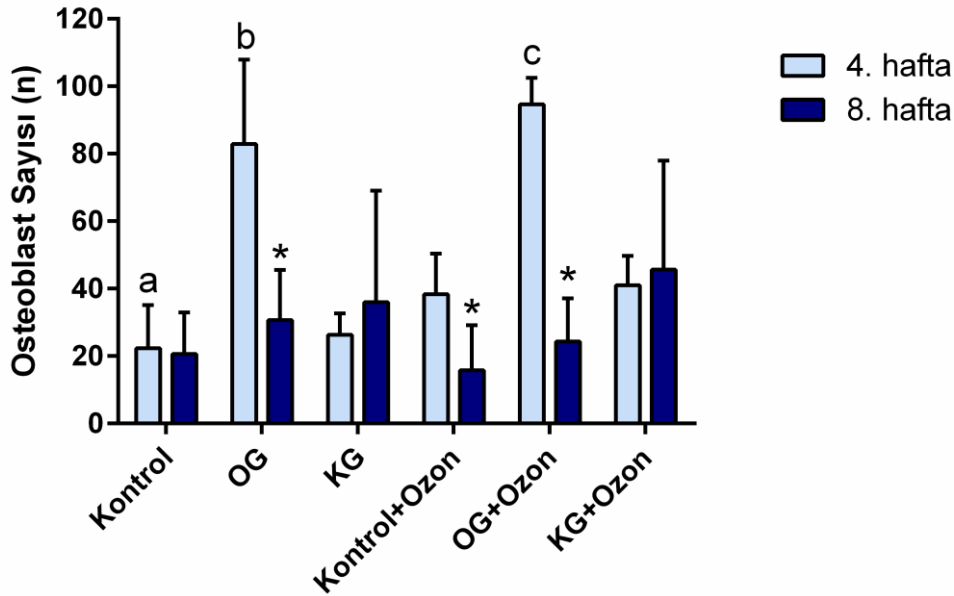
Şekil 4.4 Deney gruplarına ait 4. ve 8. hafta osteoklast sayısı ortalamaları. ^a $p<0.05$, 4. ve 8. haftada diğer tüm gruplardan farklı; ^b $p<0.05$, 4 haftada diğer tüm gruplardan farklı; * $p<0.05$, 4. haftadan farklı.

Osteoblast Sayısı

Gruplardaki osteoblast sayıları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, sadece OG, OG+Ozon ve Kontrol+Ozon gruplarında 8. haftada, 4. haftaya göre anlamlı azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca KG ve KG+Ozon gruplarında osteoblast sayıları açısından 4 ve 8 hafta arasında anlamlı değişiklik saptanmadı ($p>0.05$).

4. haftada osteoblast sayısı OG ve OG+Ozon gruplarında diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel açıdan daha yüksekti ($p<0.05$) (Şekil 4.7-C,D). Fakat OG+Ozon grubunda osteoblast sayısı OG grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p>0.05$). Ayrıca 4. haftanın sonunda boş defekte ozon uygulanması, ozon uygulanmayan kontrolüne göre osteoblast sayısında artış sağladı ($p<0.05$).

Ayrıca, 8. haftada osteoblast sayıları açısından gruplar arasında farklılık oluşmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Deney gruplarına ait 4. ve 8. hafta osteoblast sayısı ortalamaları. ^a $p<0.05$, OG, Kontrol+Ozon, OG+Ozon ve KG+Ozon gruplarından farklı; ^b $p<0.05$, 4. hafta KG, Kontrol+Ozon ve KG+Ozon gruplarından farklı; ^c $p<0.05$, 4. hafta KG, Kontrol+Ozon ve KG+Ozon gruplarından farklı; * $p<0.05$, 4. haftadan farklı.

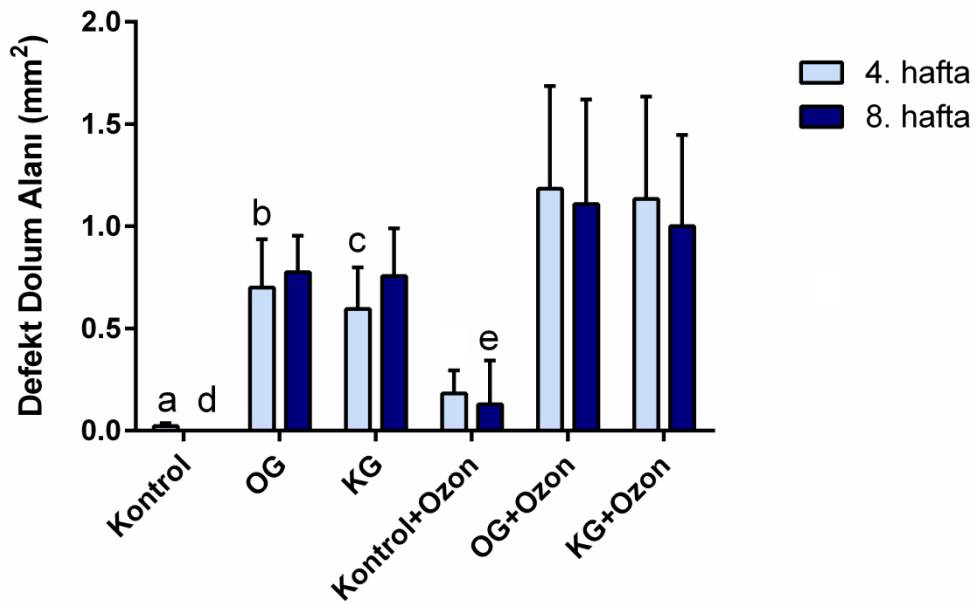
4.3 Histomorfometrik Değerlendirmeler

Defekt dolum alanı

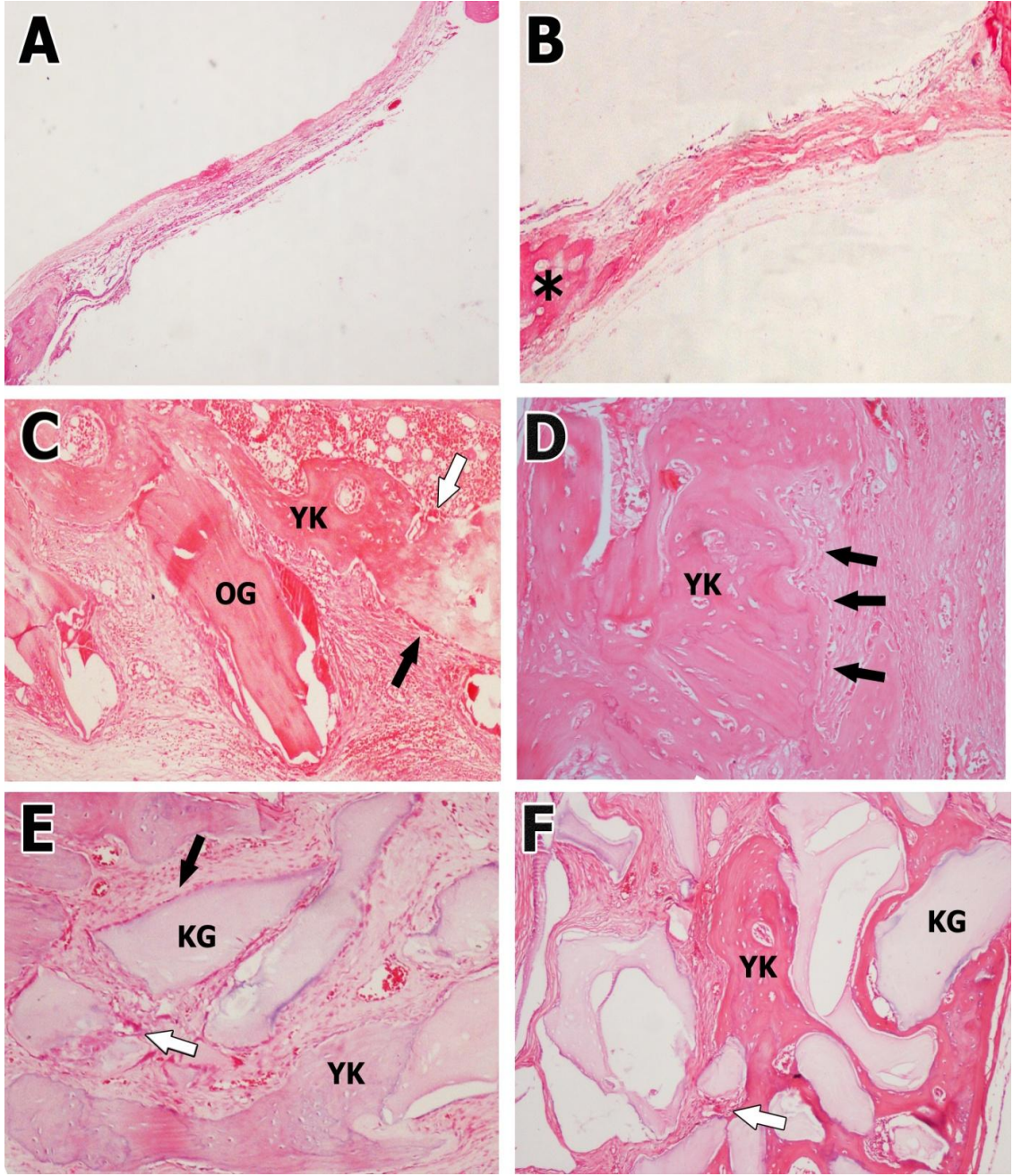
Histomorfometrik analizlerin sonuçlarına göre defekt dolum miktarı, grupların zamana göre (4. ile 8. hafta arasında) yapılan ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermedi ($p>0.05$) (Şekil 4.1,4.2).

Beklenildiği üzere 4. ve 8. haftada greft kullanılan gruplarda kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde fazla defekt dolumu gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.1,4.2). Defekt dolum miktarı OG grubu ile KG grubu arasında 4. haftada anlamlı fark oluşturmazken (Şekil 4.1-C,E), OG+Ozon ve KG+Ozon grupları, OG ve KG gruplarından daha fazla defekt dolum alanına sahipti ($p<0.05$) (Şekil 4.1-D,F).

8. hafta yine greft kullanılan gruplar Kontrol gruplarından daha fazla yeni kemik alanı gösterdi ($p<0.05$). Bununla beraber, defekt dolum miktarı diğer gruplar arasında benzerdi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Deney gruplarına ait 4. ve 8. hafta ortalama defekt dolum alanı. ^a $p<0.05$, 4. haftada diğer tüm gruplardan farklı; ^b $p<0.05$, 4. hafta OG+Ozon ve KG+Ozon grubundan farklı; ^c $p<0.05$, 4. hafta OG+Ozon ve KG+Ozon gruplarından farklı; ^d $p<0.05$, 8. haftada diğer tüm gruplardan farklı; ^e $p<0.05$, 8. hafta OG, KG, OG+Ozon ve KG+Ozon gruplarından farklı.



Şekil 4.7 Gruplara ait 4. hafta histopatolojik görüntüler (HE).

A: Kontrol grubuna ait örnekte defekt dolumu fibröz bağ doku ile gerçekleşmiştir. Defekt kenarlarından merkeze doğru az miktarda yeni kemik oluşumu görülmektedir (40x).

B: Kontrol+Ozon grubuna ait örnekte defekt kenarında yeni kemik oluşumu (*) gözlenmektedir (40x).

C: OG grubuna ait örnekte, otojen greft partikülleri (OG) etrafında artmış osteoblastik aktivite (siyah ok) ve rezorpsiyon lakünü etrafında osteoklastik aktivite (beyaz ok) ile yeni kemik oluşumu (YK) görülmektedir (200x).

D: OG+Ozon grubuna ait kesitte artmış osteoblastik aktivite (siyah ok) ile yeni kemik oluşumu gözlenmektedir (x100).

E: KG grubuna ait görüntüde ksenogreftlerin (KG) etrafında artmış osteoblastik aktivite (siyah ok) ve rezorpsiyon lakünü çevresinde oluşan osteoklastik aktivite (beyaz ok) ile yeni kemik formasyonu (YK) mevcuttur (x100).

F: KG+Ozon grubuna ait kesitte rezorbe olmuş ksenogreft partikülleri etrafında oluşmuş kemik (YK) ve rezorpsiyon lakünü etrafında osteoklast (beyaz ok) gözlenmektedir (x100).

Kalan Greft Miktarı

Kalan greft ile yeni oluşan kemik miktarı KG grupları için analiz edildi. Her iki grupta kalan greft miktarı değerlendirilen iki zaman periyodunda benzerdi ($p>0.05$) (Çizelge 4.4). Ayrıca her iki grupta kalan greft miktarında 8. haftada istatistiksel açıdan anlamlı bulunmayan azalma gözlemlendi.

Ksenogreftlerin etrafındaki yeni oluşan kemik ölçümlerinin sonucunda ise KG+Ozon grubu, KG grubuna göre 4. haftada anlamlı derecede yüksek yeni kemik oluşumu gösterdi ($p<0.05$).

Çizelge 4.4 KG gruplarına ait kalan greft miktarı ve yeni oluşan kemik miktarının ortalamaları (ort±standart sapma). * $p<0.05$, 4. haftada KG grubundan farklı.

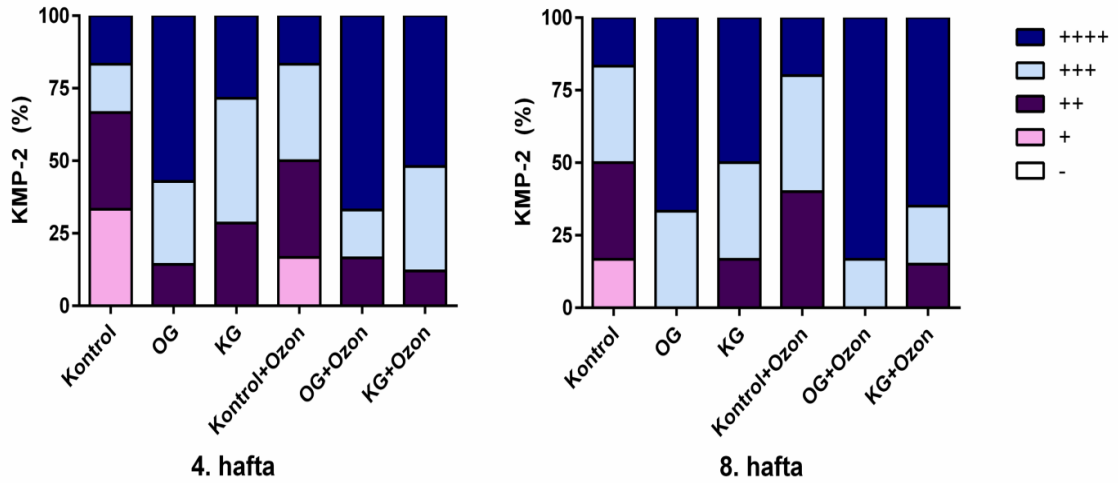
		KG	KG+Ozon
Kalan greft miktarı (mm ²)	4. hafta	0.34±0.22	0.16±0.81
	8. hafta	0.20±0.13	0.14±0.06
Yeni oluşan kemik miktarı (mm ²)	4. hafta	0.35±0.26	0.96±0.52*
	8. hafta	0.54±0.24	0.85±0.47

4.4 İmmünohistokimyasal Analizler

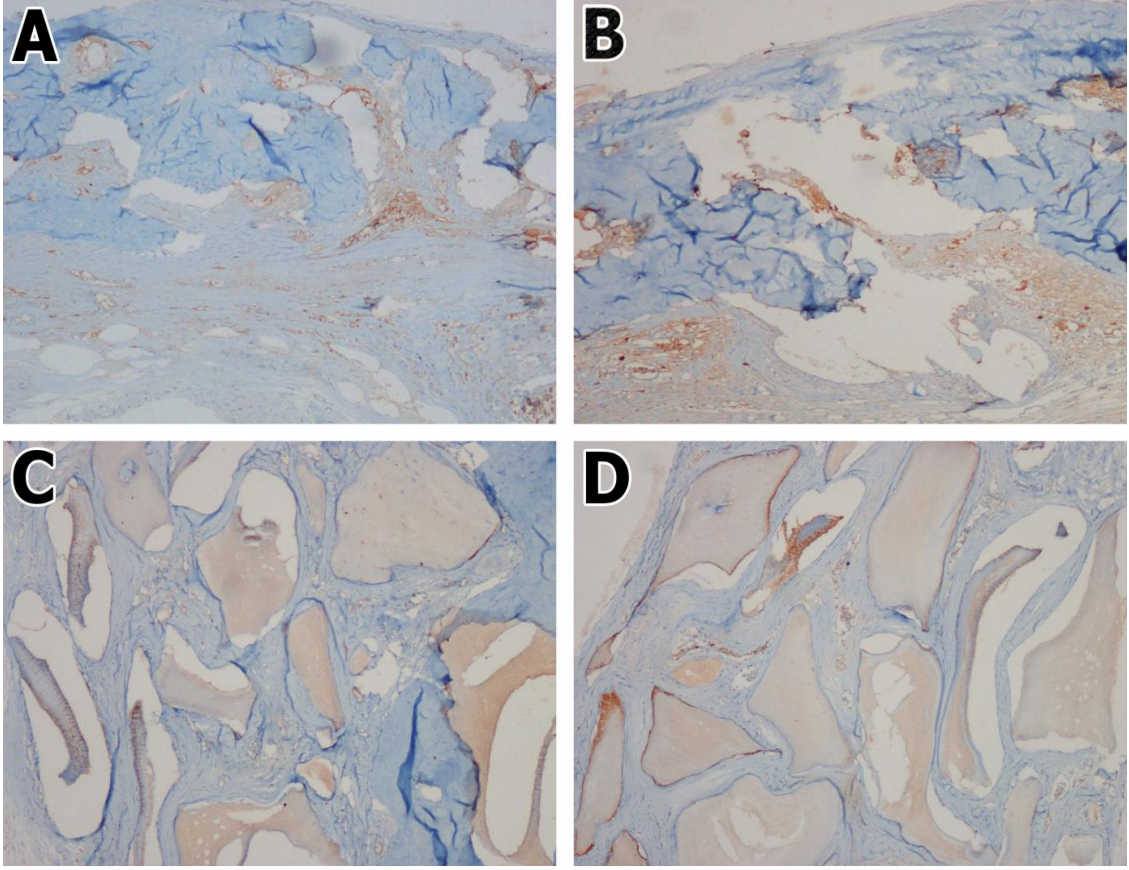
KMP-2 ekspresyonu ve lokalizasyonu

4. ve 8. haftada tüm gruplardaki örneklerde KMP-2 antikoru ile immün boyanma gözlemlendi. 4. haftada OG+Ozon ve KG+Ozon gruplarındaki KMP-2 pozitif hücre yüzdesi diğer gruplardan daha yüksekti ve çoğunluğu osteoblast ve defekt alanının genelindeki mezenkimal dokuda saptandı (Şekil 4.9-B,D). Kontrol grubundaki ise KMP-2 pozitif alanlar osteosit ve osteoblastların bulunduğu çevrede ve daha düşük miktarlarda gözlemlendi (Şekil 4.8).

8. haftada KMP-2 antikoru boyanma yüzdesi Kontrol gruplarında azalma gösterirken, lokalizasyonları defekt kenarındaki mezenkimal doku ile sınırlı idi. Diğer gruplar arasında KMP-2 pozitif hücre boyanması benzerdi ve çoğunluğu osteoblastlar ve mezenkimal dokuda saptandı.



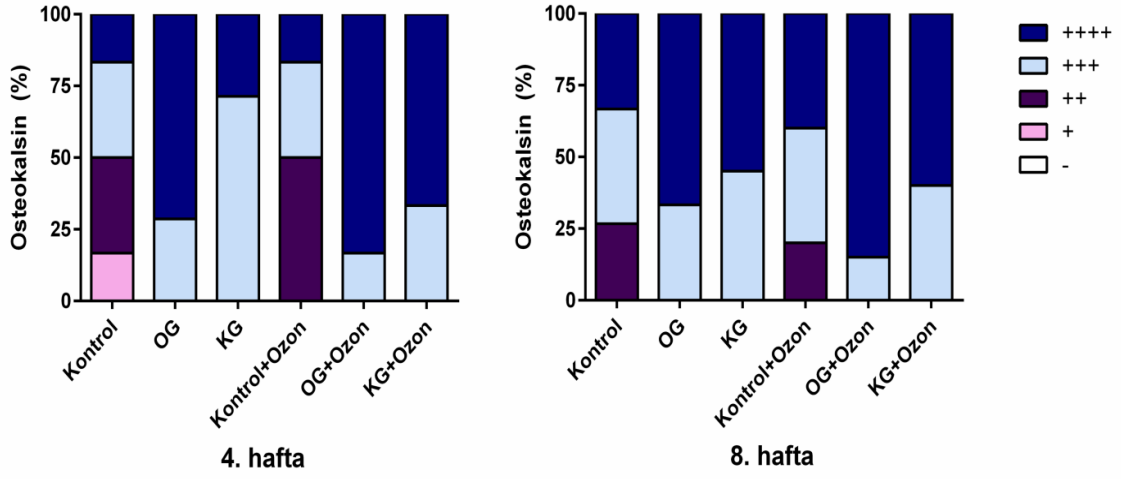
Şekil 4.8 4. ve 8. haftada gruplara ait KMP-2 pozitif hücre yüzdeleri



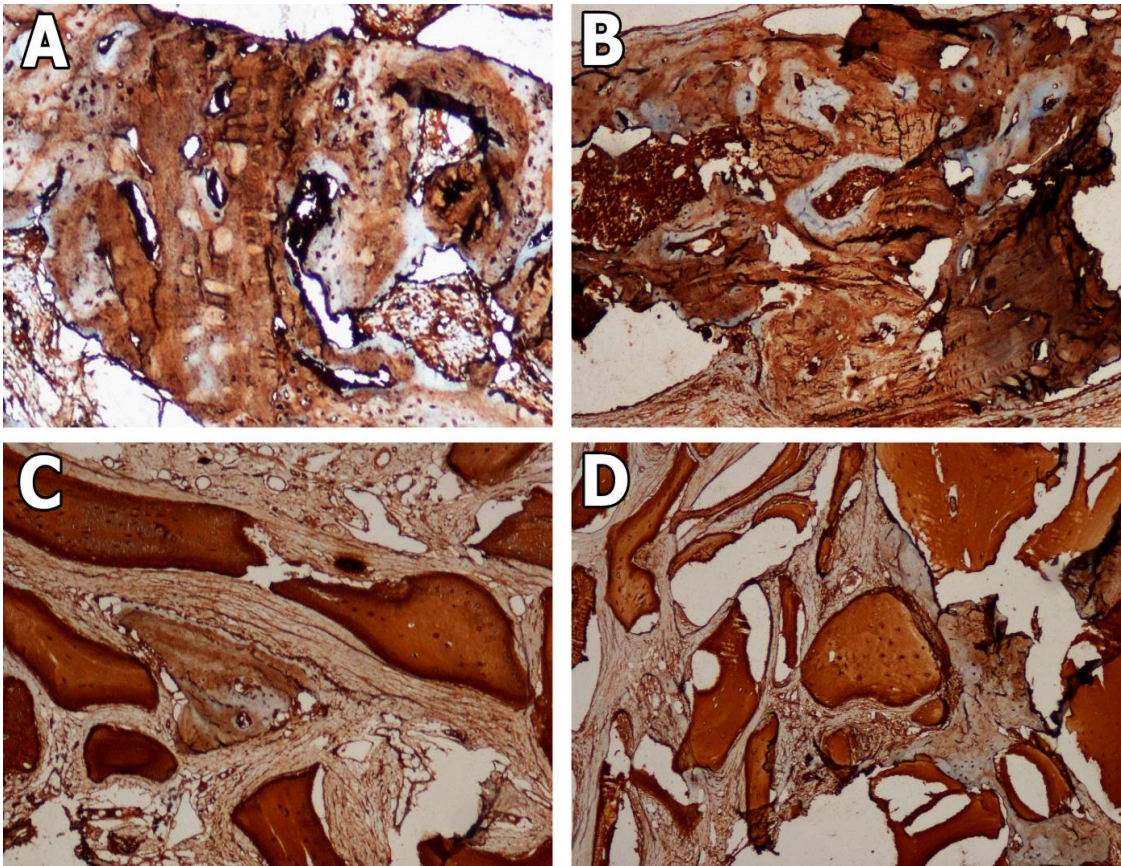
Şekil 4.9 OG ve KG gruplarına ait 4. hafta KMP-2 immünohistokimyasal boyama görüntüleri (x100). A: OG grubu, B: OG +Ozon grubu , C: KG grubu , D: KG+Ozon grubu.

Osteokalsin ekspresyonu ve lokalizasyonu

4. haftada greft kullanılan tüm gruplarda osteokalsin pozitif hücre miktarı Kontrol gruplarından belirgin şekilde daha yüksekti (Şekil 4.10). Ayrıca 4. ve 8. hafta için tüm gruplarda değerlendirilen tüm örneklerde osteokalsin antikoru ile pozitif boyanma saptandı. 4. haftada OG+Ozon grubunda osteokalsin pozitif miktarı yeni kemik matriksi ve rezorptif lakün çevresinde yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 4.11-B). KG+Ozon grubunda ise yeni kemik matriksinde orta, rezorptif lakün çevresi ve grefte komşu kemikte daha yüksek miktarlarda osteokalsin pozitif hücre izlendi (Şekil 4.11-D). 8. haftada osteokalsin pozitif hücre prevalansı 4. haftadakine benzer düzeyde saptandı (Şekil 4.10). Osteokalsin pozitif hücreler tüm gruplarda, osteosit, osteoblast ve yumuşak doku ekstrasellüler matriksinde gözlemlendi.



Şekil 4.10 4. ve 8 haftada gruplara ait osteokalsin pozitif hücre yüzdeleri



Şekil 4.11 OG ve KG gruplarına ait 4. hafta osteokalsin immünohistokimyasal boyama görüntüleri(x100). A: OG grubu, B: OG +Ozon grubu, C: KG grubu, D: KG+Ozon grubu.

5. TARTIŞMA

Periodontitis, kronik enflamatuvar bir hastalık olup alveoler kemikteki yıkımla diş kaybına neden olabilir [239]. Periodontal hastalığın bir risk faktörü olan diyabette konak savunma hücrelerinde kemotaksis ve fagositoz defektlerinin görülmesi, enflamatuvar sitokinlerdeki ve reaktif oksijen ürünlerinde artış, bunun yanında kollajen üretimindeki azalma ve kollajenaz aktivitesinde artışla birlikte periodontal hastalığın şiddetini arttırmaktadır [81, 240, 241]. Buna ek olarak, yapılan cerrahi ve cerrahi olmayan periodontal tedavilerin sonuçları diyabetten etkilenmektedir ve tedavi başarı oranlarını düşürebilmektedir. Bu yüzden risk faktörlerinin bulunduğu durumlarda konak modülasyonu ile hastalarda başarı sağlanması hedeflenmiştir. Bu çalışmada ise diyabetik ratlarda farklı greft materyalleri ile tedavi edilen defektlere topikal gaz ozon uygulaması yapılmış ve iyileşmeyi takiben kemik rejenerasyonu üzerine ozonun etkileri histomorfometrik ve immünohistokimyasal açıdan araştırılmıştır.

Literatürde, diyabet oluşturmak için farklı yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir [242-244]. Bu çalışmada ise diyabet oluşturmak için sık kullanılan bir ajan olan STZ tercih edildi. Diyabet oluşturulmasında özellikle farelerde, glikoz transporter 2 anahtar bir molekül olarak bulunmuştur [245]. Alloksan ise redoks-siklus potansiyeli ile düzenlenen reaktif oksijen ürünleri tarafından toksisite oluşturur. Bu yüzden diğer dokularda da toksik etki oluşturabilmektedir. STZ ise redoks-siklus ajanı değildir [246, 247]. Literatürde, ratlarda diyabeti indüklemek için STZ çeşitli doz aralıklarında (min-maks: 50-100mg/kg) kullanılmıştır [248-250]. Çalışmamızda ratlara diyabet oluşturmak için intraperitoneal tek doz 50mg/kg STZ uygulandı. STZ uygulanmasından 3 gün sonra tüm ratların kan glikoz düzeyleri 300mg/dl'nin üzerinde ölçüldü. Ayrıca deney süresince de ratların kan şekeri seviyeleri 300mg/dl'nin üzerinde seyretti. Bununla beraber, hiperglisemiye bağlı olarak tüm gruptaki ratlarda kilo kaybı gözlemlendi.

Yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak olan deney hayvanının immünitesi ile insan immünitesinin benzerlik göstermesi gerekmektedir. Deney hayvanlarından köpek, tavşan, domuz ve ratların immünitesi insanla benzerlik göstermektedir [251, 252]. Buna karşın kolay bulunması, barınma ve beslenmesinin kolay olması ve ucuz olması nedeniyle çalışmamız ratlar üzerinde gerçekleştirildi.

Kalvaryal defekt modeli kemik defektlerinin rejenerasyonunu incelemek üzere birçok araştırmada kullanılmıştır [207, 212, 213]. Rat kalvaryasındaki cerrahi

prosedürler nispeten daha basittir. Kalvarya etrafında majör sinir ve damar yapıları olmadığından gözlemler direk kemik oluşumuna yoğunlaşabilir. Rat kalvaryası atrofik mandibulaya benzer, iki kortikal tabaka arasında spongioz kemik mevcuttur. Bu modelde doku örneği hazırlamak daha kolaydır. Her bir örnek için parametreler basit olabilir ölçümler daha kolay yapılır ve spontan iyileşme olmamaktadır [207]. Bu yüzden çalışmamızda bu model tercih edilmiştir.

Kritik boyutlu defekt bir hayvanda herhangi bir osteopromotif materyal kullanılmadan yaşam boyu spontan olarak kemik dolumu göstermeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak tanımlanmıştır [208]. Literatürde ratlar için kritik boyutlu defekt 5 veya 8mm olarak yer almaktadır [212, 253, 254]. Bu çalışmada, ratların kalvaryalarında 5mm çapında kritik boyutta defektler açıldı. Ayrıca ozon gazının diğer defekt bölgesini etkilememesi açısından, defektler tek taraflı oluşturuldu.

Ozon su, yağ ya da gaz şeklinde uygulanmaktadır. Oral dokularda uygulanması gündeme gelince ya bir jeneratör ile gaz şeklinde ya da ozonlu su şeklinde uygulama yapılmaktadır. Bazı çalışmalarda ise gaz ozonun intravenöz veya intraperitoneal kullanımı söz konusu olmuştur. Bizim çalışmamızda gaz ozon bir jeneratör (Prozone, W&H, Bürmoos, Avusturya) ve bu jeneratöre bağlı coro tip uç ile ratlara uygulandı. Gaz ozon uygulaması ratlarda herhangi bir yan etkiye neden olmadı. Ozon gruplarına, periost kapatılmadan 30sn boyunca 140ppm @ 2L/dk, 2.24mg ozon uygulandı. Bu uygulamayı takiben 14 gün boyunca kafa derisinin üzerinden defekt bölgesine gelecek şekilde 90sn boyunca ozon gazı uygulandı. Firma tarafından belirlenmiş bazı protokoller bulunsa da gaz ozon uygulamasının kemik rejenerasyonu üzerine etkisi için literatürde kesin bir protokol bulunmamaktadır. Literatürde ozon gazının uygulandığı çalışmalarda farklı ozon jeneratörleri kullanılmıştır [207, 255, 256]. Bu jeneratörlerin ürettiği ozonun dozu, saflığı birbirinden farklılık göstermektedir [207, 255-257].

Periodontitisin tedavisinde öncelikli amaç periodonsiyumun rejenerasyonudur. Periodontal rejenerasyonda olumlu sonuçlar elde edebilmek için, değişik cerrahi tekniklerle birlikte uygulanan greft materyalleri [169, 170], yönlendirilmiş doku rejenerasyonu [258], büyüme ve diferansiyasyon faktörleri [202], mine matriks proteinleri [22] ya da bunların kombinasyonları uygulanabilmektedir [259]. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonunun öngörülebilir sonuçları pek çok araştırmada gösterilmişse de, ikinci cerrahi gereksinimi, erken membran ekspozürü, erken membran

degradasyonu, membranın defekt bölgesine çökmesi gibi birçok dezavantajları da bulunmaktadır [258]. Mokbel ve ark. [260] ratlarda oluşturdukları 8mm'lik kalvaryal defektlerde değişik greft materyallerinin iyileşme paternlerini araştırmışlardır. Çalışmadaki analizlerin sonucunda, ksenogreft kullanılan grup 1.97 mm^2 , ksenogreft+kollajen membran kullanılan grup ise 1.87 mm^2 yeni kemik oluşumu göstererek bu iki değer arasında istatistiksel anlam oluşmadığı belirtilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada kritik boyutlu kalvaryal defektlerde yönlendirilmiş kemik rejenerasyonun etkisi araştırılmış ve rezorbe olmayan membran ve perforasyon oluşturulmuş rezorbe olmayan membran kullanılmıştır. Yapılan mikro bilgisayarlı tomografi analizlerinin sonucunda, yeni kemik formasyonu açısından 4. haftada gruplar arasında farklılığa rastlanılmamıştır [261]. Bunun yanı sıra greft materyallerinin membranla örtülmesi gerekliliğini savunan araştırmacılar da literatürde bulunmaktadır [23, 262]. Bu çalışmada ise defektlere uygulanan farklı greft materyalleri üzerine membran kullanımı tercih edilmedi. Ozon gazının defekt bölgesine ve çevresindeki dokulara direkt etki etmesi sağlandı.

Yüksek osteojenitesi, minimal antikor cevabı geliştirmesi, kısa sürede en mükemmel damarlanma ve primer kallus oluşumu sağlaması gibi özellikleriyle otojen greftler kemik greftlerinde altın standardı oluştururlar [263] fakat bu greftin en önemli dezavantajlarından biri olan rezorpsiyon ise klinik sonuçları etkileyebilmektedir [20, 21, 144]. Otojen kemik grefti ile yapılan bukkal kemik ogmentasyonunda, uzun dönemde bukkal doku volümünün azaldığı belirtilmiştir [264]. Ayrıca otojen blok greft ile yapılan kemik ogmentasyonunda, ogmente bölgede 10 ay sonra greft yüksekliği %60 oranında azaldığı bulunmuştur.[265]. Rezorpsiyonun oluşması özellikle estetiğin önemli olduğu anterior bölgelerde önem kazanmaktadır. Bu bölgelerde kemik volümünün azalması doku volümünü de azaltarak estetik sorunlara neden olmaktadır. Ayrıca, greft rezorpsiyonunun mekanizması kesin olarak aydınlatılmamış olsa da, kemik remodelasyonu sırasında, enflamatuvar reaksiyonlar serisinin osteoklastik aktiviteyi artırması, greftin kortikal ya da kansellöz yapısından dolayı içerdiği KMP miktarı, greft bölgesine gelen basınç miktarı, ya da greft üzerinde fonksiyonel stimülasyon olmaması ve greft toplanırken oluşturulan travmanın şiddetinin rezorpsiyon oranını etkilediği düşünülmektedir [37, 265].

Ozonun immünomodülatör etkisi, kan hücreleriyle etkileşimi, oksijen metabolizmasına ve hücre enerjisine pozitif etkilerinden dolayı, topikal gaz ozon tedavisinin rat kalvaryal defekt modelinde otojen greftin rejenerasyonunu arttırdığı Özdemir ve ark. [207] gerçekleştirdiği bir çalışmada gösterilmiştir. Çalışmalarında otojen greft uygulanan bölgeye 2100ppm gaz ozon uygulaması Ozonix (Biozonix GmbH, Münih, Almanya) adlı ozon jeneratörü ile, 2 hafta boyunca haftada 3 gün 30sn şeklinde gerçekleştirilmiştir. 8 hafta sonuçlarına göre, otojen greft+ozon uygulanan grupta, osteoblast sayısı, toplam kemik alanı daha fazla bulunmuş, boş defektlerde iyileşme fibröz bağ dokusu ile gerçekleşmiştir.

Erdemci ve ark. [257] yapmış oldukları çalışmada ise, sistemik ozon (intraperitoneal 0.7mg/kg ozon enjeksiyonu) uygulaması ve Ozonytron-X ozon jeneratörü (Biozonix, Almanya) ile uygulanan topikal ozonun ratların çekim soketlerindeki kemik iyileşmesi üzerine olan etkinliğini araştırılmıştır. Uzun dönem sistemik ozon uygulaması, sadece preoperatif sistemik ozon uygulamasından ve topikal ozon uygulamasından daha fazla trabeküler kemik formasyonu gözlenmiştir. Bu çalışmaya benzer bir şekilde sistemik ozon uygulanan başka bir çalışmada ratlar 4 gruba ayrılmış; Grup 1- Kontrol, Grup 2- Hiperbarik oksijen tedavisi (operasyon sonrası 5 gün 2,8 atmosfer basıncında %100 oksijen), Grup 3-Sistemik ozon uygulaması (operasyon sonrası 5 gün intraperitoneal 0.7 mg/kg (%97 ozon+ %3 oksijen) gaz karışımı enjeksiyonu), Grup 4- Hiperbarik oksijen tedavisi+sistemik ozon uygulaması. Mikro bilgisayarlı tomografi analizlerinde, 5. 30. günde yeni kemik formasyonu açısından, hiperbarik oksijen ve ozon grubu, hiperbarik oksijen+ozon grubundan daha iyi sonuçlar vermiştir. Otörler hiperbarik oksijen tedavisi ve ozon uygulamasının kemik iyileşmesi üzerine eşit şekilde etkili olduğu fakat bu ikisinin kombinasyonunun tek başlarına olduklarından daha az etkili olduğu ayrıca ozonun doku gelişimini geliştirmesi, oksijen metabolizmasını etkilemesi, hücre enerjisini arttırması ve antioksidan sistemi düzenlemesi ile kemikte iyileşmeyi sağladığı sonucuna varmışlardır [235].

Diyabetik ratlar üzerinde gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada da yukarıdaki çalışmalara benzer olarak kontrol gruplarında 4. ve 8. haftada defekt dolumu fibröz bağ doku şeklinde iyileşme gösterdi fakat defekt kenarlarından merkeze doğru kısmi kemik oluşumu da saptandı. Ayrıca defekt dolum alanı 4. haftada OG+Ozon grubunda, OG grubuna göre anlamlı derecede artmıştı fakat bu fark 8. haftada görülmedi. Diyabette değişen yara iyileşmesi için birçok neden gösterilmiştir. Bu nedenlerden; değişmiş

hücrel aktiviter, azalmış kollajen sentezi, artmış kollajenaz üretimi ve yara kenarlarından AGE sentezlenmesi ve artan oksidatif stres yara iyileşmesini olumsuz etkileyebilir ayrıca artmış olan kollajenaz yeni oluşmuş ve tamamlanmamış kollajeni yıkarak yara iyileşmesinde defektler oluşturabilir. Bunların yanı sıra diyabette oluşan vasküler değişiklikler, oksijen difüzyonunu azaltır [85]. Ayrıca hiperglisemi varlığında hücreler arası matriks yapımından sorumlu olan fibroblast ve osteoblast gibi hücrelerin apoptozu artmaktadır. Topping ve ark. yaptığı çalışmada, normal hayvanlar ile karşılaştırıldığında kemik formasyonunun endokondral periyodu boyunca matriks proteinlerinin yapımı özellikle de tip 10 kollajen üretiminin diyabetiklerde %60-70 oranında azaldığı gösterilmiştir [266]. Santana ve ark., T1DM'un kemik iyileşmesi ve kemik formasyonu üzerine etkisini incelemek için yaptıkları çalışmada streptozotosin ile diyabet modeli oluşturulmuş farelerde kafatasında standart defektler hazırlamışlardır. Çalışma sonucunda T1DM'un intramembranöz kemik iyileşmesini bozduğunu ve diyabetik hayvanların diyabetik olmayan hayvanlara oranla %40 oranında daha az iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir [101]. Çalışmamızda İlk 4 haftada ozonun immünomodülatör etkileri ile dokudaki oksijeni arttırmasına bağlı olarak greft gruplarında kemik rejenerasyonu hızlanmıştır. Fakat 8. hafta sonuçlarında gruplar arasında greft rejenerasyonları açısından fark gözlenmemiştir. Bunun için muhtemel sebepler ozonun ilk 2 hafta süreyle uygulanması ve ratlarda hiperglisemi tablosunun devamı olabilir.

Kemik remodelasyonu döngüsünde osteoblastlar kemik formasyonu aşamasında aktif rol oynarlar fakat mineralizasyon aşamasında ise kemiğin içinde kalarak osteositlere dönüşürler ve matür kemik içinde çoğalamazlar [183]. Bizim çalışmamızda osteoblastik aktivite, OG grubunda 8. haftada azalma gösterdi. Bu durum kemiğin normal remodelasyon süreci ile uyumludur ve histolojik olarak da matür kemik oluşumu ile desteklenmiştir. Bununla beraber osteoblast sayıları KG grubunda 4. haftada OG grubundan daha az fakat greft partiküllerinin rezopsiyonuna devam etmesine bağlı olarak 8. haftada, 4. haftaya göre artış gösterdi.

Ticari olarak bulunan sığır kemiği, organik komponentlerinden ayrılmış olarak piyasada mevcuttur. Bu ürünün avantajı insan kemiğine yakın yapısal içerikte olması ve sentetik greftlerle karşılaştırıldığında yüksek osteokondüktif etkisinin bulunmasıdır. Bu grefte ait hidroksiapatit iskelet kortikal ve kansellöz kemik yapısındaki mikroporözlük ve makroporözlük özelliklerini sağlar [148].

Yapılan bir meta analizde, kemik ogmentasyonu açısından sığır kaynaklı ksenogreftlerin, otojen greftlerle arasında bir fark olmadığı ayrıca sığır kaynaklı ksenogreftlerin yeni bir cerrahi saha oluşturmamaları, komplikasyonlarının ve donör saha morbiditesinin bulunmaması nedeniyle otojen greftlerden daha da avantajlı olduğu belirtilmiştir [267]. Sığır kaynaklı ksenogreft, kemik ogmentasyonu açısından birçok çalışmada kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [22, 169, 172].

Sığır kaynaklı ksenogreftlerin rezorpsiyon süreleri ile ilgili literatürde çelişkili sonuçlar bulunmuştur. Bazı çalışmalar ksenogreftin rezorbe olmayıp, greft etrafında yeni kemik oluşumu meydana geldiği tespit edilirken, bazı çalışmalarda ise aylar sonra bile osteoklast varlığı bulunmuştur [25, 168, 169]. Bulunan osteoklastların grefti rezorbe ederek, aktif kemik remodelasyonunu devam ettirdiği savunulmuştur [268]. DeNicolò ve ark. [269] ratlarda oluşturdukları kritik boyutlu kalvaryal defektlerde trombositten zengin plazma ve sığır kaynaklı ksenogreftin kemik rejenerasyonu üzerine olan etkisini araştırmışlardır. 8 hafta sonra yapılan analizlerin sonucunda kontrol grubu ile trombositten zengin plazma grubunda, kemik oluşumu defekt kenarları ile sınırlı iken, ksenogreft grubunda, defekt kenarında yoğun kemik oluşumu görülmüştür. Defekt içinde greftlerin etrafında yeni kemik oluşumu ile artmış osteoblastik aktivite görülmüştür. Osteoklastik aktivitenin de arttığı görülse de greft parçaları rezorbe olmamış ve yer tutucu özelliğine devam etmiştir. Ksenogreft uygulanmış gruplarda defekt yoğun bir şekilde dolmuş göstermiştir.

NuOss ve Bio-Oss marka ksenogreftlerin kemik rejenerasyonuna etkisi üzerine yapılan bir çalışmada; 4. haftanın sonunda yapılan histolojik analizlerde her iki greft tipinde de örgü kemik oluşumu gerçekleşmiştir. Ayrıca 8. haftada oluşan yeni kemik miktarı 4. haftadan fazla bulunmuştur. Her iki grupta da kalan greft materyali 8. haftada, 4. haftaya göre istatistiksel olarak azalmışken, bu azalma Bio-Oss grubunda anlamlılık kazanmıştır. Çalışmacılara göre anorganik sığır kaynaklı greft materyali osteokondüktif bir materyal olup rezorbe olarak yerini yeni kemiğe bırakmıştır [169].

Yapılan son çalışmaların birinde de ratlarda oluşturulan 5mm kalvaryal defektlere otojenik, allojenik ve ksenojenik greftler ile bu greftlerin rekombinant KMP ile karıştırılmış şekli doldurulmuştur. 6. haftanın sonunda histolojik kesitlerin analizlerinde, tüm greftli gruplardaki doku yanıtı benzer görülmüştür. Defekt ortasında kalan greft materyalleri ve matür olmayan kemik oluşumu gözlenmiştir. Rezorpsiyon lakünü ile

osteoklastlar özellikle ksenogreft grubunda diğer gruplara göre fazla saptanmıştır. KMP ile kombine olarak uygulanan greft grupları ise KMP'siz kontrollerine göre daha fazla yeni kemik oluşumu sağlamıştır [270]. Rezorptif lakün, osteoklast ve osteoblast temel multinükleer üniteyi oluştururlar ki bu ünite kemik remodelasyonunda önemli yere sahiptir [271]. Çalışmamızda KG partikülleri deney süresince rezorpsiyon gösterdi. Özellikle KG grubunda rezorptif lakün ve osteoklast sayısı OG grubundan yüksekti. Ayrıca ozon uygulaması KG grubunda greft partiküllerinin rezorpsiyonunu hızlandırıcı etki gösterdi. Ksenogreft kullanılan gruplarda hem 4. hem de 8. haftada greft komşuluğunda yeni kemik oluşumunda artış gözlemlendi.

Kazancıoğlu ve ark. [234], düşük doz lazer ile ozon tedavisinin kemik rejenerasyonu üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Toplamda 30 adet Wistar ratın kullanıldığı çalışmada, 5mm'lik kalvaryal defektler sentetik bifazik kalsiyum fosfat greft materyali ile doldurulmuş, sonrasında ratlar 3 gruba ayrılmış ve 4 hafta sonra sakrifiye edilmiştir. Kontrol grubuna; herhangi bir ek uygulama yapılmamış, düşük doz lazer grubuna; 2 hafta boyunca haftada 3 kez 120 sn, 808nm 4j/cm² diod lazer uygulanmış, ozon grubuna; 2 hafta boyunca haftada 3 kez 120sn ozon bir jeneratör (Biozonix GmbH, Münih, Almanya) ve uçları sayesinde uygulanmıştır. Yapılan histolojik analizlerde, kontrol grubunda defekt kenarlarından yeni kemik oluşumu gerçekleşerek defektin ortasını kalan greft materyali ile gevşek bağ doku doldurmuştur. Tüm gruplarda greft kenarlarında yeni oluşan kemik gözlenirken, çalışma gruplarındaki yeni oluşmuş kemik dokusu, kontrol grubundan daha fazla bulunmuştur. Histomorfometrik analizlerde, ozon grubunda oluşan yeni kemik alanı, lazer ve kontrol gruplarından anlamlı derecede fazla bulunmuştur fakat greft rezorpsiyonu hakkında bilgi verilmemiştir. Çalışmada, ozon ve düşük doz lazer uygulamasının kemik rejenerasyonuna ek katkı sağladığı ayrıca ozon uygulamasının düşük doz lazerden daha etkin olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamıza benzer şekilde diyabetik ratlarda gerçekleştirilmiş bir çalışmada, tüm ratların femurlarında 2mm çapında monokortikal defektler oluşturulmuştur. Defektler saf su veya ozonlu su (0.004 mg/ml ozon konsantrasyonunda saf su) ile irrig edilmiştir. Hayvanlar 7., 14. ve 21. günde sakrifiye edilmiştir. Histolojik kesitler alınmış ve histomorfometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Ozonlu gruplarda, diğer gruplara göre enflamatuvar infiltrat, ödem ve damar formasyonu daha fazla görülmüş. 7. ve 14. günlerde ozon uygulanan kontrol grubundaki osteoklast sayıları diğer gruplara göre

istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla bulunmuştur. Su uygulanan hiperglisemik grupta 7. günde, osteoklast sayılarının ozon uygulanan hiperglisemik gruba göre fazla olduğu belirtilmiştir. Yeni oluşmuş kemik yüzdesi açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır. Çalışmacılar ozonun, kapiller oluşumunu ve osteoklast migrasyonunu arttırdığı fakat kemik iyileşmesi üzerine ek fayda sağlamadığı, ozon dozunun, uygulama süresinin ve denek sayısının artırılarak başarılı klinik sonuçlara ulaşılabileceğini belirtmişlerdir [48].

KMP'ler kemik formasyonu ve remodelasyonu açısından önemli role sahiptir [272]. KMP-2, -6 ve -9 diferansiyasyonun erken safhalarında, mezenkimal progenitör hücrelerin preosteoblastlara dönüşümünde önemli rol oynar [272]. Ayrıca yapılan çalışmalarda yeni kemik formasyonunu belirlemek amacıyla da KMP-2 protein ekspresyonunun analizleri yapılmaktadır [273]. KMP-2 immünopozitifliği, mezenkimal hücrelerde, osteoprogenitör hücrelerde, fibroblastlarda, kondrositlerde, osteoblastlarda görülmüştür [274-276]. Kronik enflamatuvar durumların KMP-2 ekspresyonunu arttırdığı, diyabette de metabolik dokularda görülen enflamasyondan dolayı KMP-2 ekspresyonunun artacağı savunulmaktadır [277]. Bunun yanı sıra yüksek glikoz seviyelerinin KMP-2 ekspresyonunu artırarak nükleer faktor kappa B aktivasyonu sağladığı ve plazma KMP-2 seviyelerinin HbA1c seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdiği çalışmalarda gösterilmiştir [278, 279]. Bu çalışmaların aksine bazı çalışmalarda ise diyabetin osteoblast diferansiyasyonuna neden olabilecek ürünleri azalttığı belirtilmiştir. T2DM rat modelinde yapılan bir çalışmada, enflamasyon varlığında KMP, fibroblast büyüme faktöründe ve osteokalsin ekspresyonunda azalma ile kemik remodelinginin azaldığı tespit edilmiştir [97]. Diyabetik hastalarda kemikte oluşan enflamasyon ve yaralanma sonucu uzun süre TNF'lerin salınımı, nükleer faktör kappa B aktivasyonu ile KMP, runt ilişkili transkripsiyon faktörü ve fos ilişkili antijen 1 gibi osteoblast diferansiyasyonu sağlayan proteinlerde azalmaya neden olur [91].

Bu çalışmada tüm zaman periyotlarında ve tüm gruplarda KMP-2 pozitif hücre tespit edildi fakat 4. haftada Kontrol grubunda diğer gruplardan daha düşük miktarda idi. Antikor aracılı kemik rejenerasyonu uygulamasının etkinliğini araştıran bir çalışmada, 6. haftanın sonunda yapılan immünohistokimyasal analizlerin sonucunda monoklonal antikor uygulanmış defektlerde, ossifikasyon alanlarında diğer gruplardan daha yoğun KMP-2 ekspresyonu gözlenmiştir.

Bu sonuçlar ise artmış kemik rejenerasyonu ile korelasyon göstermiştir ayrıca mikro bilgisayarlı tomografi sonuçlarıyla ise bu gruplarda erken radyoopak alanlar tespit edilmiştir [198].

Rauch ve ark. [201] tavşanlarda uyguladıkları distraksiyon osteogenezinin sonuçlarını immünohistokimyasal ve histopatolojik olarak araştırmışlardır. 1. haftada KMP-2 ekspresyonu genellikle kallus içindeki mezenkimal dokuda ve preosteoblastlarda rastlanılmışken distraksiyon periyodunda artan miktarlarda KMP-2 ekspresyonu kallus bölümünde ve defekt ortasındaki fibröz bölümde de gözlenmiştir. Fibroblastlarda ve kondrositlerde yoğun KMP-2 boyanması görülmüştür. Matür osteoblastlar boyanma göstermemişken, preosteoblastlar KMP-2 boyanması göstermişlerdir. Distraksiyon işlemi sona erdiğinde bu proteinin ekspresyonu da durmuştur.

Çalışmamızın sonucunda KMP-2 pozitif hücrelerin yüzdesi OG+Ozon ve KG+Ozon gruplarında 4. haftada diğer gruplara göre daha yüksek bulundu ve yoğun olarak osteoblastlarda ve mezenkimal dokuda tespit edildi. Mezenkimal dokudaki hücrelerin istenilen doku yönünde farklılaşmasını sağlamak için de gerekli büyüme faktörleri veya diğer uyarıların ortama eklenmesi gerekmektedir. Bu hücreler uyarılara göre kemik, kıkırdak ya da bağ doku hücrelerine dönüşür [280]. Osteoblastlar ise kemik yapımının kesin ve ana elemanları olduğundan, KMP-2'nin osteoblastlarda görülmesi kemiğin yapım potansiyelini arttırmaktadır. Sonuçlarımızda ozon kullanılan gruplarda KMP-2 pozitif hücreler yoğun olarak osteoblastlarda bulunmaktaydı. Histomorfometrik analizler sonuçlarıyla uyumlu olarak, 8. haftada KMP-2 pozitif hücre boyanması gruplar arasında benzerlik gösterdi.

Osteokalsin, kemik formasyonu ile görülen ekstrasellüler matriks proteindir. Gelişen kemikte mevcuttur ve kemik oluşumuna katkıda bulunur ayrıca mineral depolanmasında ve kemiğin remodelasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Osteokalsin olgun osteoblastlar tarafından sentezlenir ve kalsifikasyonun erken safhalarında tespit edilmeyebilir fakat kalsifiye depozitler şekillenmeye başladığında ekspresyonu artar [281, 282]. Diyabet osteoblast formasyonu, fonksiyonu ve osteoblastlarda düşüşe neden olmaktadır[91]. T2DM hastaların, diyabetik olmayanlarla karşılaştırıldığı bir çalışmada interlökin 6 ve C-reaktif protein ile ters ilişkili olarak osteoblast aktivitesinde ve osteokalsin ekspresyonunda düşüş görülmüştür[96]. Kemik

formasyonu, osteokalsin seviyeleri ile korele biçimde Yapılan meta-analizlerin sonucunda diyabette, osteokalsin gibi kemik turnover belirteçlerinin serumda azaldığı belirtilse de bazı çalışmalarda bu düşüş gözlenmemiştir [283]. Çalışmamızda histopatolojik sonuçlar ile uyumlu olarak 4. ve 8. haftada tüm gruplarda osteokalsin immünpozitifliği benzer düzeydeydi tüm gruplarda, osteosit, osteoblast ve yumuşak doku ekstrasellüler matriksinde lokalizedi. Zıt olarak, Bessa ve ark. [284] yaptığı bir çalışmada KMP-2'nin değişik dozlarının kemik rejenerasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. İmmünohistokimyasal analizlerin sonuçlarına göre kontrol grubunda, osteokalsin ekspresyonu gözlenmemiştir.

Alan ve ark [285], gerçekleştirdiği çalışmada, tüm ratların sağ femurlarında monokortikal defektler oluşturularak, defektler nanohidroksiapatit greft materyali ile doldurulmuş 4. haftada ve 8. haftada sakrifiye edilmiştir. Histolojik ve histomorfometrik analizlerin sonucunda 4. haftada, düşük doz lazer (810 nm dalga boyunda toplam 144 J/cm², haftada 3 defa 4 hafta boyunca) grubunda az miktarda yeni kemik oluşumu gözlenirse de diğer gruplarla fark kazanmamıştır. Greft materyali bağ doku ile kaplanmış ve osteokalsin pozitif hücreler bağ doku ve kemik partiküllerinde görülmüş, ayrıca diğer gruplardan fazla bulunmuştur. Ozon grubunda % 80 konsantrasyonda ozon, ozon jeneratörü (Ozone DTA, Tayvan) ile cerrahi uygulamanın yapıldığı gün 30sn boyunca defekt bölgesine uygulanmıştır. Bu uygulama ile lazer grubuna göre daha fazla yeni kemik oluşumu görülse de bu fark anlamlılık kazanmamıştır. Osteokalsin pozitif hücreler ise bağ doku ve yeni kemik alanlarında saptanmıştır. Kontrol grubunda ise yeni kemik oluşumu görülmüş, osteokalsin yoğunluğu ise kemik iliğinde tespit edilmiştir. 8. hafta sonuçlarında ozon grubunda lazer grubuna göre daha fazla osteokalsin immünpozitiflik olmasına rağmen, yeni kemik alanı açısından ozon ile lazer grupları arasında anlamlı farklılık oluşmamıştır. Çalışmanın sonucunda, otörler lazer ile ozonun greftlenmiş defektlerde kemik rejenerasyonu açısından stimülasyon sağladığı ve lazer ile ozonun bu anlamda fark yaratmadığı sonucuna varmışlardır.

Sonuç olarak; günümüze kadar yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada kullanılan ozon cihazlarının ürettiği ozon miktarları ve uygulama protokolündeki farklılıklar bu çalışmaların sonuçlarını kendi bulgularımızla karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Bununla beraber, çalışmamız diyabetik ratlarda kemik greft iyileşmesi üzerine topikal ozonun etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışma olma niteliğindedir. Hayvan deneylerinin limitasyonları göz önünde bulundurulduğunda ise ozon diyabetik ratlarda erken dönem

iyileşmede olumlu etkiler göstermiştir. Fakat, diyabette kemik rejenerasyonu üzerine ozonun etki mekanizmasının araştırılması ve ozon için optimal doz ve sürenin belirlenmesi ile ilgili daha fazla in vivo çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

- Ratlarda diyabet STZ kullanılarak oluşturuldu ve tüm ratlarda deney sonuna kadar hiperglisemi tablosu mevcuttu. Tüm ratların kan şekeri seviyeleri deney süresince 300mg/dl'nin üzerindeydi.
- Hiperglisemiye bağlı olarak deney süresince tüm ratlarda kilo kaybı meydana geldi.
- 4. hafta histolojik sonuçlara göre ozon uygulaması ksenogreft uygulanan gruptaki rezorptif lakün ve osteoklast sayısını arttırdı.
- 4. haftada osteoblast sayısı otojen greft gruplarında diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksekti. Ozon uygulaması otojen greft grubunda osteoblast sayısını arttırdı.
- KG gruplarında 8. haftada greft miktarı azaldı ve yeni oluşan kemik miktarı 4. haftada KG+Ozon grubunda KG grubuna göre fazlaydı.
- İmmunohistokimyasal analizler sonucunda, OG+Ozon ve KG+Ozon gruplarındaki KMP-2 pozitif hücre yüzdesi 4. haftada diğer gruplardan daha yüksekti. Kontrol grubundaki KMP-2 pozitif alanlar ise daha düşük miktardaydı. 8. haftada KMP-2 antikoru boyanma yüzdesi Kontrol gruplarında azaldı fakat diğer gruplar arasında KMP-2 pozitif hücre boyanması benzerdi.
- 4. haftada greft kullanılan tüm gruplarda osteokalsin pozitif hücre miktarı Kontrol gruplarından belirgin şekilde daha yüksekti. 4. haftada OG+Ozon ve KG+Ozon gruplarında osteokalsin pozitif miktarı yeni kemik matriksi ve rezorptif lakün çevresinde gözlemlendi. 8. haftada osteokalsin pozitif hücre prevalansı 4. haftadakine benzer düzeyde saptandı.
- 4. haftada, ozon kullanılan greft gruplarında defekt dolununun arttığı bulundu. 8. hafta analiz sonuçlarına göre defekt dolun miktarları ozon uygulanan greft gruplarında artış göstermesine rağmen istatistiksel açıdan anlamlı değildi.
- Diyabetik durumun kemik rejenerasyonu üzerine olumsuz etkisini nötralize etmede ozonun katkısı ve kullanımının net olarak belirlenebilmesi için farklı doz ve sürelerde, klinik, histolojik ve biyokimyasal parametrelerin birlikte incelendiği daha fazla araştırmaya gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

- [1] Çağlayan, G. (2010). Periodontoloji. *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*.
- [2] Armitage, G.C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4.1: p. 1-6.
- [3] Pontes Andersen, C.C., A. Flyvbjerg, K. Buschard, P. Holmstrup (2007). Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodent studies. *J Periodontol*, 78.7: p. 1264-75.
- [4] Watanabe, K., B.J. Petro, A.E. Shlimon, T.G. Unterman (2008). Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. *J Periodontol*, 79.7: p. 1208-16.
- [5] Campus, G., A. Salem, S. Uzzau, E. Baldoni, G. Tonolo (2005). Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol*, 76.3: p. 418-25.
- [6] Şahin, E., Öncel, M. (2014). Diyabet Tanı ve Takibinde Geleneksel ve Yeni Biyokimyasal Belirteçler. *Eur J Basic Med Sci* 4(3).p. 66-73.
- [7] Fowler, M.J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*, 26.2: p. 77-82.
- [8] Tunalı, M., Erşahan, Ş., Aydınbelge, M. (2014). Periodontal Hastalık ile Diyabet Arasında Çift Yönlü İlişki. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 23.1: p. 28-38.
- [9] Lalla, E., B. Cheng, S. Lal, S. Tucker, E. Greenberg, R. Goland, I.B. Lamster (2006). Periodontal changes in children and adolescents with diabetes: a case-control study. *Diabetes Care*, 29.2: p. 295-9.
- [10] Nishimura, F., Y. Iwamoto, J. Mineshiba, A. Shimizu, Y. Soga, Y. Murayama (2003). Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor-alpha in a 2-way relationship. *J Periodontol*, 74.1: p. 97-102.
- [11] Garcia, R. (2009). Periodontal treatment could improve glycaemic control in diabetic patients. *Evid Based Dent*, 10.1: p. 20-1.
- [12] Saito, T., Y. Shimazaki, Y. Kiyohara, I. Kato, M. Kubo, M. Iida, T. Koga (2004). The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: the Hisayama study. *J Dent Res*, 83.6: p. 485-90.
- [13] Iwamoto, Y., F. Nishimura, M. Nakagawa, H. Sugimoto, K. Shikata, H. Makino, T. Fukuda, T. Tsuji, M. Iwamoto, Y. Murayama (2001). The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol*, 72.6: p. 774-8.
- [14] Seppala, B., J. Ainamo (1994). A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 21.3: p. 161-5.
- [15] Aldridge, J.P., V. Lester, T.L. Watts, A. Collins, G. Viberti, R.F. Wilson (1995). Single-blind studies of the effects of improved periodontal health on metabolic control in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 22.4: p. 271-5.
- [16] Smith, G.T., C.J. Greenbaum, B.D. Johnson, G.R. Persson (1996). Short-term responses to periodontal therapy in insulin-dependent diabetic patients. *J Periodontol*, 67.8: p. 794-802.
- [17] Becker, W., B.E. Becker (1999). Periodontal regeneration: a contemporary re-evaluation. *Periodontol 2000*, 19.p. 104-14.
- [18] Garrett, S. (1996). Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol*, 1.1: p. 621-66.

- [19] Rocchietta, I., M. Simion, M. Hoffmann, D. Trisciuglio, M. Benigni, C. Dahlin (2015). Vertical Bone Augmentation with an Autogenous Block or Particles in Combination with Guided Bone Regeneration: A Clinical and Histological Preliminary Study in Humans. *Clin Implant Dent Relat Res*.
- [20] Lutz, R., S. Berger-Fink, P. Stockmann, F.W. Neukam, K.A. Schlegel (2015). Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft - a 5-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res*, 26.6: p. 644-8.
- [21] Gorla, L.F., R. Spin-Neto, F.B. Boos, R.D. Pereira, I.R. Garcia-Junior, E. Hochuli-Vieira (2015). Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: a prospective, randomized, volumetric computed tomography study. *Int J Oral Maxillofac Surg*.
- [22] Velasquez-Plata, D., E.T. Scheyer, J.T. Mellonig (2002). Clinical comparison of an enamel matrix derivative used alone or in combination with a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol*, 73.4: p. 433-40.
- [23] Bartee, B.K., J.A. Carr (1995). Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol*, 21.2: p. 88-95.
- [24] Paolantonio, M. (2002). Combined periodontal regenerative technique in human intrabony defects by collagen membranes and anorganic bovine bone. A controlled clinical study. *J Periodontol*, 73.2: p. 158-66.
- [25] Poulias, E., H. Greenwell, M. Hill, D. Morton, R. Vidal, B. Shumway, T.L. Peterson (2013). Ridge preservation comparing socket allograft alone to socket allograft plus facial overlay xenograft: a clinical and histologic study in humans. *J Periodontol*, 84.11: p. 1567-75.
- [26] Wikesjo, U.M., A.V. Xiropaidis, R.C. Thomson, A.D. Cook, K.A. Selvig, W.R. Hardwick (2003). Periodontal repair in dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*, 30.8: p. 705-14.
- [27] Wikesjo, U.M., M. Qahash, R.C. Thomson, A.D. Cook, M.D. Rohrer, J.M. Wozney, W.R. Hardwick (2003). Space-providing expanded polytetrafluoroethylene devices define alveolar augmentation at dental implants induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2 in an absorbable collagen sponge carrier. *Clin Implant Dent Relat Res*, 5.2: p. 112-23.
- [28] Susin, C., U.M. Wikesjo (2013). Regenerative periodontal therapy: 30 years of lessons learned and unlearned. *Periodontol 2000*, 62.1: p. 232-42.
- [29] Lin, Z., H.F. Rios, D.L. Cochran (2015). Emerging regenerative approaches for periodontal reconstruction: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol*, 86.2 Suppl: p. S134-52.
- [30] Suarez-Lopez Del Amo, F., A. Monje, M. Padial-Molina, Z. Tang, H.L. Wang (2015). Biologic Agents for Periodontal Regeneration and Implant Site Development. *Biomed Res Int*, 2015.p. 957518.
- [31] Garcia-Gareta, E., M.J. Coathup, G.W. Blunn (2015). Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*, 81.p. 112-121.
- [32] Stavropoulos, A. (2008). Bölüm 7: Deproteinized Bovine Bone Xenograft. . *İçinde: Musculoskeletal Tissue Regeneration Orthopedic Biology and Medicine*, p. 119-151.
- [33] Bozyaka, S., Karaca, İ., Oygür, T., Barış, E. (2008). Deproteinize Kemik Grefti (BİO-OSS®)'nin Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisinin Deneysel Olarak İncelenmesi. *ADO Klinik Bilimler Dergisi*, 2.2: p. 87-97.

- [34] Nakajima, D., Y. Tabata, S. Sato (2015). Periodontal tissue regeneration with PRP incorporated gelatin hydrogel sponges. *Biomed Mater*, 10.5: p. 055016.
- [35] Agarwal, A., N.D. Gupta, A. Jain (2015). Platelet rich fibrin combined with decalcified freeze-dried bone allograft for the treatment of human intrabony periodontal defects: a randomized split mouth clinical trial. *Acta Odontol Scand*, p. 1-8.
- [36] de Almeida, A.L., I.L. Medeiros, M.J. Cunha, M.C. Sbrana, P.G. de Oliveira, L.A. Esper (2014). The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: an experimental study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*, 25.10: p. 1131-6.
- [37] Toker, H., H. Ozdemir, H. Ozer, K. Eren (2012). Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol*, 57.11: p. 1545-50.
- [38] Sirin, Y., V. Olgac, S. Dogru-Abbasoglu, L. Tapul, S. Aktas, S. Soley (2011). The influence of hyperbaric oxygen treatment on the healing of experimental defects filled with different bone graft substitutes. *Int J Med Sci*, 8.2: p. 114-25.
- [39] Jan, A., G.K. Sandor, B.B. Brkovic, S. Peel, Y.D. Kim, W.Z. Xiao, A.W. Evans, C.M. Clokie (2010). Effect of hyperbaric oxygen on demineralized bone matrix and biphasic calcium phosphate bone substitutes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 109.1: p. 59-66.
- [40] Pradeep, A.R., K. Nagpal, S. Karvekar, K. Patnaik, S.B. Naik, C.N. Guruprasad (2015). Platelet-rich fibrin with 1% metformin for the treatment of intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*, 86.6: p. 729-37.
- [41] Pradeep, A.R., S. Karvekar, K. Nagpal, K. Patnaik, A. Raju, P. Singh (2015). Rosuvastatin 1.2 mg in Situ Gel Combined With 1:1 Mixture of Autologous Platelet-Rich Fibrin and Porus- Hydroxyapatite Bone Graft in Surgical Treatment of Mandibular Degree II Furcation Defects: A Randomized Clinical Control Trial. *J Periodontol*, p. 1-15.
- [42] Azarpazhooh, A., H. Limeback (2008). The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent*, 36.2: p. 104-16.
- [43] Bocci, V.A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res*, 37.4: p. 425-35.
- [44] Seidler, V., I. Linetskiy, H. Hubalkova, H. Stankova, R. Smucler, J. Mazanek (2008). Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. *Prague Med Rep*, 109.1: p. 5-13.
- [45] Chowdhry, S., Chowdhry, P., Sood, S., Ahuja, V.R., Mahantesh, t (2013). O-Zone Dentistry: Minimally Invasive Dental Care for the Modern Practice. *International Journal of Oral&Maxillofacial Pathology*, 4.4: p. 3-8.
- [46] Sudarshan, R., Vijayabala, G.S. (2013). Ozone Therapy in Dentistry. *Archives Medical Review Journal*, 22.1: p. 45-54.
- [47] Gupta, G., B. Mansi (2012). Ozone therapy in periodontics. *J Med Life*, 5.1: p. 59-67.
- [48] Frascino, A.V., A. Mantesso, L. Correa, M.C. Deboni (2013). Aqueous-ozone irrigation of bone monocortical wounds in hyperglycemic rats. *Acta Cir Bras*, 28.5: p. 327-33.
- [49] Martinez-Sanchez, G., S.M. Al-Dalain, S. Menendez, L. Re, A. Giuliani, E. Candelario-Jalil, H. Alvarez, J.I. Fernandez-Montequin, O.S. Leon (2005). Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol*, 523.1-3: p. 151-61.

- [50] Zhang, J., M. Guan, C. Xie, X. Luo, Q. Zhang, Y. Xue (2014). Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. *Oxid Med Cell Longev*, 2014,p. 273475.
- [51] Loe, H. (1993). Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 16.1: p. 329-34.
- [52] Navarro-Sanchez, A.B., R. Faria-Almeida, A. Bascones-Martinez (2007). Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J Clin Periodontol*, 34.10: p. 835-43.
- [53] Llambes, F., S. Arias-Herrera, R. Caffesse (2015). Relationship between diabetes and periodontal infection. *World J Diabetes*, 6.7: p. 927-35.
- [54] AlJehani, Y.A. (2014). Risk factors of periodontal disease: review of the literature. *Int J Dent*, 2014,p. 182513.
- [55] American Diabetes Association (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33.p. S62-S69.
- [56] Türk Diyabet Vakfı (2013). Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi. *ULUSAL DİYABET KONGRESİ KONSENSUS GRUBU*.
- [57] Mealey, B.L. ,T.W. Oates (2006). Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of periodontology*, 77.8: p. 1289-303.
- [58] Abacı, A., Böber, E., Büyükgebiz, A. (2007). Tip 1 Diyabet. *Güncel Pediatri*, 5.p. 1-10.
- [59] Mealey, B.L. ,G.L. Ocampo (2007). Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology 2000*, 44.p. 127-53.
- [60] Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407.6801: p. 233-41.
- [61] Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27.5: p. 1047-53.
- [62] Satman, I., T. Yilmaz, A. Sengul, S. Salman, F. Salman, S. Uygur, I. Bastar, Y. Tutuncu, M. Sargin, N. Dincag, K. Karsidag, S. Kalaca, C. Ozcan, H. King (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*, 25.9: p. 1551-6.
- [63] Graves, D.T., R. Liu, T.W. Oates (2007). Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontology 2000*, 45.p. 128-37.
- [64] Preshaw, P.M., N. Foster, J.J. Taylor (2007). Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. *Periodontology 2000*, 45.p. 138-57.
- [65] Taylor, G.W. (2003). The effects of periodontal treatment on diabetes. *J Am Dent Assoc*, 134 Spec No.p. 41S-48S.
- [66] Dandona, P., R. Weinstock, K. Thusu, E. Abdel-Rahman, A. Aljada, T. Wadden (1998). Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 83.8: p. 2907-10.
- [67] Iacopino, A.M. (2001). Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol*, 6.1: p. 125-37.
- [68] Dayer, J.M., B. Beutler, A. Cerami (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med*, 162.6: p. 2163-8.

- [69] Brenner, D.A., M. O'Hara, P. Angel, M. Chojkier, M. Karin (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*, 337.6208: p. 661-3.
- [70] Thomson, B.M., G.R. Mundy, T.J. Chambers (1987). Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol*, 138.3: p. 775-9.
- [71] Feingold, K.R., W. Doerrler, C.A. Dinarello, W. Fiers, C. Grunfeld (1992). Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, interleukin-1, and the interferons is blocked by inhibition of prostaglandin synthesis. *Endocrinology*, 130.1: p. 10-6.
- [72] Preshaw, P.M., Foster, N., Taylor, J.J. (2007). Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. *Periodontology 2000*, 45.p. 138-157.
- [73] Ohlrich, E.J., M.P. Cullinan, J.W. Leichter (2010). Diabetes, periodontitis, and the subgingival microbiota. *Journal of oral microbiology*, 2.
- [74] Salvi, G.E., J.G. Collins, B. Yalda, R.R. Arnold, N.P. Lang, S. Offenbacher (1997). Monocytic TNF alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*, 24.1: p. 8-16.
- [75] Jimbo, R., G. Giro, C. Marin, R. Granato, M. Suzuki, N. Tovar, T. Lilin, M. Janal, P.G. Coelho (2013). Simplified drilling technique does not decrease dental implant osseointegration: a preliminary report. *J Periodontol*, 84.11: p. 1599-605.
- [76] Gurav, A. ,V. Jadhav (2011). Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *J Diabetes*, 3.1: p. 21-8.
- [77] Mealey, B.L. ,T.W. Oates (2006). Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*, 77.8: p. 1289-303.
- [78] Bissada, N.F., M. Manouchehr-Pour, M. Haddow, P.J. Spagnuolo (1982). Neutrophil functional activity in juvenile and adult onset diabetic patients with mild and severe periodontitis. *J Periodontal Res*, 17.5: p. 500-2.
- [79] Schmidt, A.M., S.D. Yan, J.L. Wautier, D. Stern (1999). Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*, 84.5: p. 489-97.
- [80] Nassar, H., A. Kantarci, T.E. van Dyke (2007). Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontology 2000*, 43.p. 233-44.
- [81] Preshaw, P.M., N. Foster, J.J. Taylor (2007). Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. *Periodontol 2000*, 45.p. 138-57.
- [82] Kurtiş, M.B. (2015). Diyabetin Periodontal Dokular Üzerindeki Etkisi. *Türkiye Klinikleri*, 1.1: p. 1-6.
- [83] Ficara, A.J., M.P. Levin, M.F. Grower, G.D. Kramer (1975). A comparison of the glucose and protein content of gingival fluid from diabetics and nondiabetics. *J Periodontal Res*, 10.3: p. 171-5.
- [84] Nassar, H., A. Kantarci, T.E. van Dyke (2007). Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol 2000*, 43.p. 233-44.
- [85] Kumar, M., L. Mishra, R. Mohanty, R. Nayak (2014). "Diabetes and gum disease: the diabolic duo". *Diabetes Metab Syndr*, 8.4: p. 255-8.

- [86] Forslund, J.M., M.T. Archdeacon (2015). The Pathobiology of Diabetes Mellitus in Bone Metabolism, Fracture Healing, and Complications. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 44.10: p. 453-7.
- [87] Bartold, P.M. (2006). The education and the digital revolution continues. *Aust Dent J*, 51.3: p. 211.
- [88] Starup-Linde, J. (2013). Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4.p. 21.
- [89] Alblowi, J., R.A. Kayal, M. Siqueira, E. McKenzie, N. Krothapalli, J. McLean, J. Conn, B. Nikolajczyk, T.A. Einhorn, L. Gerstenfeld, D.T. Graves (2009). High levels of tumor necrosis factor-alpha contribute to accelerated loss of cartilage in diabetic fracture healing. *Am J Pathol*, 175.4: p. 1574-85.
- [90] Silva, J.A., D.L. Ferrucci, L.A. Peroni, P.G. Abrahao, A.F. Salamene, C. Rossa-Junior, H.F. Carvalho, D.R. Stach-Machado (2012). Sequential IL-23 and IL-17 and increased Mmp8 and Mmp14 expression characterize the progression of an experimental model of periodontal disease in type 1 diabetes. *J Cell Physiol*, 227.6: p. 2441-50.
- [91] Jiao, H., E. Xiao, D.T. Graves (2015). Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*, 13.5: p. 327-35.
- [92] Li, J., W. He, B. Liao, J. Yang (2015). FFA-ROS-P53-mediated mitochondrial apoptosis contributes to reduction of osteoblastogenesis and bone mass in type 2 diabetes mellitus. *Sci Rep*, 5.p. 12724.
- [93] Retzepi, M., M.P. Lewis, N. Donos (2010). Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*, 21.1: p. 71-9.
- [94] van Daele, P.L., R.P. Stolk, H. Burger, D. Algra, D.E. Grobbee, A. Hofman, J.C. Birkenhager, H.A. Pols (1995). Bone density in non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Rotterdam Study. *Ann Intern Med*, 122.6: p. 409-14.
- [95] Hofbauer, L.C., C.C. Brueck, S.K. Singh, H. Dobnig (2007). Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J Bone Miner Res*, 22.9: p. 1317-28.
- [96] Sarkar, P.D., A.B. Choudhury (2013). Relationships between serum osteocalcin levels versus blood glucose, insulin resistance and markers of systemic inflammation in central Indian type 2 diabetic patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17.12: p. 1631-5.
- [97] Pacios, S., O. Andriankaja, J. Kang, M. Alnammary, J. Bae, B. de Brito Bezerra, H. Schreiner, D.H. Fine, D.T. Graves (2013). Bacterial infection increases periodontal bone loss in diabetic rats through enhanced apoptosis. *Am J Pathol*, 183.6: p. 1928-35.
- [98] Chang, P.C., Lim, L.P. (2012). Interrelationships of periodontitis and diabetes: A review of current literature. *J Dent Sci*, 7.3: p. 272-82.
- [99] Liu, Z., J. Aronson, E.C. Wahl, L. Liu, D.S. Perrien, P.A. Kern, J.L. Fowlkes, K.M. Thraikill, R.C. Bunn, G.E. Cockrell, R.A. Skinner, C.K. Lumpkin, Jr. (2007). A novel rat model for the study of deficits in bone formation in type-2 diabetes. *Acta Orthop*, 78.1: p. 46-55.
- [100] Fujii, H., Y. Hamada, M. Fukagawa (2008). Bone formation in spontaneously diabetic Torii-newly established model of non-obese type 2 diabetes rats. *Bone*, 42.2: p. 372-9.
- [101] Santana, R.B., L. Xu, H.B. Chase, S. Amar, D.T. Graves, P.C. Trackman (2003). A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes*, 52.6: p. 1502-10.

- [102] Liu, R., H.S. Bal, T. Desta, N. Krothapalli, M. Alyassi, Q. Luan, D.T. Graves (2006). Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *Journal of dental research*, 85.6: p. 510-4.
- [103] Grossi, S.G., F.B. Skrepcinski, T. DeCaro, D.C. Robertson, A.W. Ho, R.G. Dunford, R.J. Genco (1997). Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycosylated hemoglobin. *J Periodontol*, 68.8: p. 713-9.
- [104] Kiran, M., N. Arpak, E. Unsal, M.F. Erdogan (2005). The effect of improved periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 32.3: p. 266-72.
- [105] Stewart, J.E., K.A. Wager, A.H. Friedlander, H.H. Zadeh (2001). The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, 28.4: p. 306-10.
- [106] Yang, P.S., Y. Wang, X.M. Qi, J.M. Ren, S.H. Ge (2003). [The effect of periodontal initial therapy on circulating TNF-alpha and HbA1C in type 2 diabetes patients with periodontitis]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 38.5: p. 364-6.
- [107] Santos, V.R., F.V. Ribeiro, J.A. Lima, M.H. Napimoga, M.F. Bastos, P.M. Duarte (2010). Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *Journal of clinical periodontology*, 37.12: p. 1049-58.
- [108] Christgau, M., K.D. Palitzsch, G. Schmalz, U. Kreiner, S. Frenzel (1998). Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol*, 25.2: p. 112-24.
- [109] Herring, M.E., S.K. Shah (2006). Periodontal disease and control of diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc*, 106.7: p. 416-21.
- [110] Correa, F.O., D. Goncalves, C.M. Figueredo, A.S. Bastos, A. Gustafsson, S.R. Orrico (2010). Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. *Journal of clinical periodontology*, 37.1: p. 53-8.
- [111] Zinman, B., A.J. Hanley, S.B. Harris, J. Kwan, I.G. Fantus (1999). Circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84.1: p. 272-8.
- [112] Iwamoto, Y., F. Nishimura, M. Nakagawa, H. Sugimoto, K. Shikata, H. Makino, T. Fukuda, T. Tsuji, M. Iwamoto, Y. Murayama (2001). The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycosylated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *Journal of periodontology*, 72.6: p. 774-8.
- [113] Frode, T.S., Y.S. Medeiros (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J Ethnopharmacol*, 115.2: p. 173-83.
- [114] Mythili, M.D., R. Vyas, G. Akila, S. Gunasekaran (2004). Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. *Microsc Res Tech*, 63.5: p. 274-81.
- [115] Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50.6: p. 537-46.
- [116] İrer, S.V., Alper, G. (2004). Deneysel Diyabet Modelleri. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 2.3: p. 127-136.
- [117] Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51.2: p. 216-26.

- [118] Schein, P.S., D.A. Cooney, M.L. Vernon (1967). The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res*, 27.12: p. 2324-32.
- [119] Ishibashi, T., K. Tanaka, Y. Taniguchi (1981). Platelet aggregation and coagulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy in rats. *Diabetes*, 30.7: p. 601-6.
- [120] Valentovic, M.A., N. Alejandro, A. Betts Carpenter, P.I. Brown, K. Ramos (2006). Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(alpha)pyrene induced renal injury in Sprague Dawley rats. *Toxicol Lett*, 164.3: p. 214-20.
- [121] Lei, Y.C., J.S. Hwang, C.C. Chan, C.T. Lee, T.J. Cheng (2005). Enhanced oxidative stress and endothelial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats exposed to fine particles. *Environ Res*, 99.3: p. 335-43.
- [122] Ağralı, Ö.B., Kuru, B., Kuru, L. (2013). Periodontal Kemik İçi Defektlerin Tedavisinde Mine Matriks Proteini ve Otojen Kemik Grefti Kombinasyonu Kullanımı. *MÜSBED*, 3.1: p. 48-54.
- [123] MacNeil, R.L. ,M.J. Somerman (1999). Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontol 2000*, 19.p. 8-20.
- [124] Slavkin, H.C. ,P.M. Bartold (2006). Challenges and potential in tissue engineering. *Periodontol 2000*, 41.p. 9-15.
- [125] Froum, S.J., M.A. Weinberg, D. Tarnow (1998). Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. A clinical study. *J Periodontol*, 69.6: p. 698-709.
- [126] Froum, S.J., C. Gomez, M.R. Breault (2002). Current concepts of periodontal regeneration. A review of the literature. *N Y State Dent J*, 68.9: p. 14-22.
- [127] Richardson, C.R., J.T. Mellonig, M.A. Brunsvold, H.T. McDonnell, D.L. Cochran (1999). Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Clin Periodontol*, 26.7: p. 421-8.
- [128] Movin, S. ,G. Borring-Moller (1982). Regeneration of infrabony periodontal defects in humans after implantation of allogenic demineralized dentin. *J Clin Periodontol*, 9.2: p. 141-7.
- [129] Vouros, I., E. Aristodimou, A. Konstantinidis (2004). Guided tissue regeneration in intrabony periodontal defects following treatment with two bioabsorbable membranes in combination with bovine bone mineral graft. A clinical and radiographic study. *J Clin Periodontol*, 31.10: p. 908-17.
- [130] Stavropoulos, A., N. Mardas, F. Herrero, T. Karring (2004). Smoking affects the outcome of guided tissue regeneration with bioresorbable membranes: a retrospective analysis of intrabony defects. *J Clin Periodontol*, 31.11: p. 945-50.
- [131] Ehmke, B., S.G. Rudiger, A. Hommens, H. Karch, T.F. Flemmig (2003). Guided tissue regeneration using a polylactic acid barrier. *J Clin Periodontol*, 30.4: p. 368-74.
- [132] Gupta, G. (2014). Clinical and radiographic evaluation of intra-bony defects in localized aggressive periodontitis patients with platelet rich plasma/hydroxyapatite graft: A comparative controlled clinical trial. *Contemp Clin Dent*, 5.4: p. 445-51.
- [133] Sclar, A.G. ,S.P. Best (2013). The combined use of rhBMP-2/ACS, autogenous bone graft, a bovine bone mineral biomaterial, platelet-rich plasma, and guided bone regeneration at nonsubmerged implant placement for supracrestal bone augmentation. A case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 28.5: p. e272-6.

- [134] Dori, F., N. Arweiler, T. Huszar, I. Gera, R.J. Miron, A. Sculean (2013). Five-year results evaluating the effects of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with enamel matrix derivative and natural bone mineral. *J Periodontol*, 84.11: p. 1546-55.
- [135] Mitani, A., H. Takasu, T. Horibe, H. Furuta, T. Nagasaka, M. Aino, M. Fukuda, T. Fujimura, M. Mogi, T. Noguchi (2015). Five-year clinical results for treatment of intrabony defects with EMD, guided tissue regeneration and open-flap debridement: a case series. *J Periodontol Res*, 50.1: p. 123-30.
- [136] Yilmaz, S., B. Kuru, E. Altuna-Kirac (2003). Enamel matrix proteins in the treatment of periodontal sites with horizontal type of bone loss. *J Clin Periodontol*, 30.3: p. 197-206.
- [137] Everts, P.A., J.T. Knappe, G. Weibrich, J.P. Schonberger, J. Hoffmann, E.P. Overdevest, H.A. Box, A. van Zundert (2006). Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*, 38.2: p. 174-87.
- [138] Trombelli, L., L.J. Heitz-Mayfield, I. Needleman, D. Moles, A. Scabbia (2002). A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J Clin Periodontol*, 29 Suppl 3.p. 117-35; discussion 160-2.
- [139] Greenwald, A.S., S.D. Boden, V.M. Goldberg, Y. Khan, C.T. Laurencin, R.N. Rosier (2001). Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A Suppl 2 Pt 2.p. 98-103.
- [140] Kökden, A., Türker, M. (1999). ORAL ve MAKSİLLOFASİYAL CERRAHİDE KULLANILAN KEMİK GREFTLERİ ve BİYOMATERYALLER. *Cumhuriyet Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi* 2.2: p. 134-140.
- [141] Alan, H., Unlu, G. (2011). Graft Materials Used in Oral and Maxillofacial Surgery. *Journal of International Dental and Medical Research* 4.3: p. 150-154.
- [142] Misch, C.M., Misch, C.E. (1999). Intraoral autoegenous donor bone grafts for implant dentistry. In: Misch CE Ed., *Contemporary implant dentistry*, St. Louis: C.V. Mosby, p. 497-508.
- [143] Albrektsson, T., Sennerby, L., Tjellström, A. (2002). Advanced Bone Healing Concepts in Craniomaxillofacial Reconstructive and Corrective Bone Surgery. In *Greenberg AM, Prein J Eds Craniomaxillofacial Reconstructive and Corrective Bone Surgery. Principles of Internal Fixation Using the AO/ASIF technique*, London, Springe, p. 124-138.
- [144] Donovan, M.G., N.C. Dickerson, L.J. Hanson, R.B. Gustafson (1994). Maxillary and mandibular reconstruction using calvarial bone grafts and Branemark implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg*, 52.6: p. 588-94.
- [145] van Steenberghe, D., I. Naert, M. Bossuyt, G. De Mars, L. Calberson, J. Ghyselen, P.I. Branemark (1997). The rehabilitation of the severely resorbed maxilla by simultaneous placement of autogenous bone grafts and implants: a 10-year evaluation. *Clin Oral Investig*, 1.3: p. 102-8.
- [146] Grageda, E. (2004). Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*, 13.4: p. 301-9.
- [147] Periodontology, A.A.o. (1994). Tissue banking and periodontal bone allografts. *Chicago, IL: AAP*.
- [148] Nasr, H.F., M.E. Aichelmann-Reidy, R.A. Yukna (1999). Bone and bone substitutes. *Periodontol* 2000, 19.p. 74-86.

- [149] Schwartz, Z., J.T. Mellonig, D.L. Carnes, Jr., J. de la Fontaine, D.L. Cochran, D.D. Dean, B.D. Boyan (1996). Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol*, 67.9: p. 918-26.
- [150] Garg, A.K. (2004). Bone biology, harvesting, grafting for dental implants : rationale and clinical applications. *Chicago: Quintessence Pub. Co.*, 6th ed.
- [151] Misch, C.E. (2011). Günümüz Diş Hekimliğinde İmplantoloji Üçüncü Baskı. *Atlas Kitapçılık, Mosby Elsevier*, 36: p. 839-863.
- [152] Shigeyama, Y., J.A. D'Errico, R. Stone, M.J. Somerman (1995). Commercially-prepared allograft material has biological activity in vitro. *J Periodontol*, 66.6: p. 478-87.
- [153] Becker, W., B.E. Becker, R. Caffesse (1994). A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol*, 65.12: p. 1128-33.
- [154] Becker, W., S.E. Lynch, U. Lekholm, B.E. Becker, R. Caffesse, K. Donath, R. Sanchez (1992). A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol*, 63.11: p. 929-40.
- [155] Wiltfang, J., P. Kessler, M. Buchfelder, H.A. Merten, F.W. Neukam, S. Rupprecht (2004). Reconstruction of skull bone defects using the hydroxyapatite cement with calvarial split transplants. *J Oral Maxillofac Surg*, 62.1: p. 29-35.
- [156] Kömürçü, E., İnanmaz, M.E., Işık, C., Akan, B., Köse, K.Ç. (2011). Kemik Yerine Geçen Biyomateryaller 2. Kısım: Hayvansal ve Sentetik Greftler. *DÜZCE TIP DERGİSİ*, 13.3: p. 46-52.
- [157] Thorwarth, M., S. Schultze-Mosgau, P. Kessler, J. Wiltfang, K.A. Schlegel (2005). Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg*, 63.11: p. 1626-33.
- [158] Wikesjo, U.M., W.H. Lim, S.S. Razi, T.J. Sigurdsson, M.B. Lee, D.N. Tatakis, W.R. Hardwick (2003). Periodontal repair in dogs: a bioabsorbable calcium carbonate coral implant enhances space provision for alveolar bone regeneration in conjunction with guided tissue regeneration. *J Periodontol*, 74.7: p. 957-64.
- [159] Gao, T.J., T.K. Tuominen, T.S. Lindholm, B. Kommonen, T.C. Lindholm (1997). Morphological and biomechanical difference in healing in segmental tibial defects implanted with Biocoral or tricalcium phosphate cylinders. *Biomaterials*, 18.3: p. 219-23.
- [160] Kim, C.K., E.J. Choi, K.S. Cho, J.K. Chai, U.M. Wikesjo (1996). Periodontal repair in intrabony defects treated with a calcium carbonate implant and guided tissue regeneration. *J Periodontol*, 67.12: p. 1301-6.
- [161] Giuliani, A., A. Manescu, E. Larsson, G. Tromba, G. Luongo, A. Piattelli, F. Mangano, G. Iezzi, C. Mangano (2014). In vivo regenerative properties of coralline-derived (biocoral) scaffold grafts in human maxillary defects: demonstrative and comparative study with Beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate by synchrotron radiation x-ray microtomography. *Clin Implant Dent Relat Res*, 16.5: p. 736-50.
- [162] Benke, D., A. Olah, H. Mohler (2001). Protein-chemical analysis of Bio-Oss bone substitute and evidence on its carbonate content. *Biomaterials*, 22.9: p. 1005-12.

- [163] Scabbia, A., L. Trombelli (2004). A comparative study on the use of a HA/collagen/chondroitin sulphate biomaterial (Biostite) and a bovine-derived HA xenograft (Bio-Oss) in the treatment of deep intra-osseous defects. *J Clin Periodontol*, 31.5: p. 348-55.
- [164] Shao, S., B. Li, H.M. Xue, H.Y. Huang, G.L. Liu (2015). Effects of alveolar ridge preservation on delayed implant osseointegration. *Int J Clin Exp Med*, 8.7: p. 10773-8.
- [165] Yildirim, M., H. Spiekermann, S. Biesterfeld, D. Edelhoff (2000). Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. *Clin Oral Implants Res*, 11.3: p. 217-29.
- [166] Skoglund, A., P. Hising, C. Young (1997). A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 12.2: p. 194-9.
- [167] Schlegel, A.K., K. Donath (1998). BIO-OSS--a resorbable bone substitute?, *J Long Term Eff Med Implants*, 8.3-4: p. 201-9.
- [168] Sartori, S., M. Silvestri, F. Forni, A. Icaro Cornaglia, P. Tesei, V. Cattaneo (2003). Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res*, 14.3: p. 369-72.
- [169] Paknejad, M., A.R. Rokn, S. Yaghobee, P. Moradinejad, M. Heidari, A. Mehrfard (2014). Effects of two types of anorganic bovine bone on bone regeneration: a histological and histomorphometric study of rabbit calvaria. *J Dent (Tehran)*, 11.6: p. 687-95.
- [170] Kurkcu, M., M.E. Benlidayi, B. Cam, Y. Sertdemir (2012). Anorganic bovine-derived hydroxyapatite versus beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation. A comparative histomorphometric study. *J Oral Implantol*.
- [171] Lambert, F., A. Leonard, P. Drion, S. Sourice, P. Layrolle, E. Rompen (2011). Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. *Clin Oral Implants Res*, 22.5: p. 538-45.
- [172] Scheyer, E.T., D. Velasquez-Plata, M.A. Brunsvold, D.J. Lasho, J.T. Mellonig (2002). A clinical comparison of a bovine-derived xenograft used alone and in combination with enamel matrix derivative for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol*, 73.4: p. 423-32.
- [173] Carmagnola, D., T. Berglundh, M. Araujo, T. Albrektsson, J. Lindhe (2000). Bone healing around implants placed in a jaw defect augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*, 27.11: p. 799-805.
- [174] Merckx, M.A., J.C. Maltha, H.P. Freihofer, A.M. Kuijpers-Jagtman (1999). Incorporation of particulated bone implants in the facial skeleton. *Biomaterials*, 20.21: p. 2029-35.
- [175] Develioglu, H., S. Unver Saraydin, U. Kartal (2009). The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J*, 28.4: p. 396-400.
- [176] Hashimoto-Uoshima, M., I. Ishikawa, A. Kinoshita, H.T. Weng, S. Oda (1995). Clinical and histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 15.2: p. 205-13.
- [177] Şimşek, A., Çakmak, G., Cila, E. (2004). Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi*, 3.3-4.

- [178] Sculean, A., P. Windisch, D. Szendroi-Kiss, A. Horvath, P. Rosta, J. Becker, I. Gera, F. Schwarz (2008). Clinical and histologic evaluation of an enamel matrix derivative combined with a biphasic calcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects. *J Periodontol*, 79.10: p. 1991-9.
- [179] Hanes, P.J. (2007). Bone replacement grafts for the treatment of periodontal intrabony defects. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 19.4: p. 499-512, vi.
- [180] Downey, P.A. ,M.I. Siegel (2006). Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*, 86.1: p. 77-91.
- [181] Hofbauer, L.C. ,M. Schoppet (2004). Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*, 292.4: p. 490-5.
- [182] Manolagas, S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21.2: p. 115-37.
- [183] McCauley, L.K. ,R.M. Nohutcu (2002). Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol*, 73.11: p. 1377-91.
- [184] Florencio-Silva, R., G.R. Sasso, E. Sasso-Cerri, M.J. Simoes, P.S. Cerri (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*, 2015.p. 421746.
- [185] Biberoglu, S. (2005). Osteoporöz patogenzi. *İçinde: Kutsal, Y.G. ed. Osteoporöz. Ankara: G üneş Kitabevi*, p. 37-60.
- [186] McKee, M.D., Murshed, M., Kaartinen, M.T. (2012). Extracellular matrix and mineralization of craniofacial bone. *İçinde: Mineralized Tissues in Oral and Craniofacial Science Biological Principles and Clinical Correlates. Wiley-Blackwell*.
- [187] Ducy, P., T. Schinke, G. Karsenty (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289.5484: p. 1501-4.
- [188] Özgürtaş, T., Kutluay, T (2001). Yeni Kemik Markırları Ve Klinik Kullanımları. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 21.6: p. 523-7.
- [189] Ram, V.S., Parthiban, U. Sudhakar, N. Mithradas, R. Prabhakar (2015). Bonebiomarkers in periodontal disease: a review article. *J Clin Diagn Res*, 9.1: p. ZE07-10.
- [190] Rhee, S.C., Y.H. Ji, N.A. Gharibjanian, E.S. Dhong, S.H. Park, E.S. Yoon (2011). In vivo evaluation of mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect model. *Stem Cells Dev*, 20.2: p. 233-42.
- [191] Nakashima, K., N. Roehrich, G. Cimaioni (1994). Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol*, 21.5: p. 327-33.
- [192] Guo, J., L. Wang, H. Xu, X. Che (2015). Effect of heterologous bone marrow mononuclear cell transplantation on midpalatal expansion in rats. *Exp Ther Med*, 9.4: p. 1235-1240.
- [193] Hallman, M. ,A. Thor (2008). Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol 2000*, 47.p. 172-92.
- [194] Rauch, F., D. Lauzier, S. Croteau, R. Travers, F.H. Glorieux, R. Hamdy (2000). Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone*, 27.3: p. 453-9.

- [195] Özeç, İ., Yeler, H. (2003). Bone morphogenetic proteinler ve osteoindüksiyon. *CÜ Diş Hek Fak Derg* 6.p. 31-6.
- [196] Chen, D., M. Zhao, G.R. Mundy (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22.4: p. 233-41.
- [197] Marie, P.J., F. Debais, E. Hay (2002). Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling. *Histol Histopathol*, 17.3: p. 877-85.
- [198] Freire, M., J.H. Choi, A. Nguyen, Y.D. Chee, J.K. Kook, H.K. You, H.H. Zadeh (2015). Application of AMOR in craniofacial rabbit bone bioengineering. *Biomed Res Int*, 2015.p. 628769.
- [199] Chen, G., C. Deng, Y.P. Li (2012). TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*, 8.2: p. 272-88.
- [200] Spector, J.A., J.S. Luchs, B.J. Mehrara, J.A. Greenwald, L.P. Smith, M.T. Longaker (2001). Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg*, 107.1: p. 124-34.
- [201] Rauch, F., D. Lauzier, S. Croteau, R. Travers, F.H. Glorieux, R. Hamdy (2000). Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone*, 26.6: p. 611-7.
- [202] Rasubala, L., H. Yoshikawa, K. Nagata, T. Iijima, M. Ohishi (2003). Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 41.3: p. 173-8.
- [203] Gomes, P.S. ,M.H. Fernandes (2011). Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*, 45.1: p. 14-24.
- [204] Develioğlu, H. (2003). KRİTİK BOYUTLU VE KRİTİK BOYUTLU OLMAYAN DEFEKTLER. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 6.1: p. 60-63.
- [205] An, Y., Friedman, R. (1999). Animal models of bone defect repair. *İçinde; An, Y., Friedman, R editör. Animal models in Orthopaedic Research. Boca Raton: CRC Press, Inc*, p. 241-60.
- [206] Asutay, F., S. Polat, M. Gul, C. Subasi, S.A. Kahraman, E. Karaoz (2015). The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: Micro-computed tomography and histomorphometric analysis. *Arch Oral Biol*, 60.12: p. 1729-1735.
- [207] Ozdemir, H., H. Toker, H. Balci, H. Ozer (2013). Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *J Periodontal Res*, 48.6: p. 722-6.
- [208] Schmitz, J.P. ,J.O. Hollinger (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, 205: p. 299-308.
- [209] Petridis, X., E. Diamanti, G.C. Trigas, D. Kalyvas, E. Kittraki (2015). Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*.
- [210] Missana, L.R. ,M.V. Jammal (2014). Critical size defect regeneration by rhPTH-collagen membrane as a new tissue engineering tool. *J Biomed Mater Res A*, 102.12: p. 4358-64.
- [211] Garcia, V.G., A.S. Sahyon, M. Longo, L.A. Fernandes, E.C. Gualberto Junior, V.C. Novaes, E. Ervolino, J.M. de Almeida, L.H. Theodoro (2014). Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *J Craniomaxillofac Surg*, 42.7: p. 1196-202.

- [212] Vo, T.N., A.K. Ekenseair, P.P. Spicer, B.M. Watson, S.N. Tzouanas, T.T. Roh, A.G. Mikos (2015). In vitro and in vivo evaluation of self-mineralization and biocompatibility of injectable, dual-gelling hydrogels for bone tissue engineering. *J Control Release*, 205.p. 25-34.
- [213] Honma, T., T. Itagaki, M. Nakamura, S. Kamakura, I. Takahashi, S. Echigo, Y. Sasano (2008). Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis*, 14.5: p. 457-64.
- [214] Bosch, C., B. Melsen, K. Vargervik (1998). Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*, 9.4: p. 310-6.
- [215] Bocci, V. (2004). How ozone acts and how it exerts therapeutic effects. In: Lynch E (Eds). *Ozone: The revolution in dentistry*. Quintessence Publishing Co., p. 15-22.
- [216] <http://www.ozcanoglu.com/ozmagic/ozon-nedir.php>.
- [217] Sameer, M., Monika, M. (2011). Ozone- Treating Dental Infections. *Indian J Stomatol*, 2.4: p. 256-59.
- [218] Bocci, V. (2004). Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm*, 13.1: p. 3-11.
- [219] Bocci, V. (1999). Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine?, *Br J Biomed Sci*, 56.4: p. 270-9.
- [220] Pattanaik, B., Jetwa, D., Pattanaik, S., Manglekar, S., Naitam D.N., Dani, A. (2011). Ozone therapy in dentistry: A literature review. *J Interdis Dent*, 12.p. 87-99.
- [221] Rodrigues, K.L., C.C. Cardoso, L.R. Caputo, J.C. Carvalho, J.E. Fiorini, J.M. Schneedorf (2004). Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonised oil from sunflower seeds. *Inflammopharmacology*, 12.3: p. 261-70.
- [222] Bektaş, Ö. (2013). Kronik Periodontitis Hastalarında Başlangıç Periodontal Tedaviye Yardımcı Olarak Kullanılan Sistemik Antibiyotik ve Topikal Gaz Ozon Uygulamasının Klinik ve Mikrobiyolojik Etkinliğinin Değerlendirilmesi (Doktora Tezi). *Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- [223] Arita, M., M. Nagayoshi, T. Fukuizumi, T. Okinaga, S. Masumi, M. Morikawa, Y. Kakinoki, T. Nishihara (2005). Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiol Immunol*, 20.4: p. 206-10.
- [224] Srikanth, A., M. Sathish, A.V. Sri Harsha (2013). Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *J Pharm Bioallied Sci*, 5.Suppl 1: p. S89-94.
- [225] Bocci, V. (1992). Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiencies. A hypothesis. *Med Hypotheses*, 39.1: p. 30-4.
- [226] Nogales, C.G., P.H. Ferrari, E.O. Kantorovich, J.L. Lage-Marques (2008). Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract*, 9.4: p. 75-84.
- [227] Yeğin, Z., Tosun, G. (2013). Diş Hekimliğinde Ozon ve Kullanım Alanları. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Der.*, 23.1: p. 116-122.
- [228] Nagayoshi, M., C. Kitamura, T. Fukuizumi, T. Nishihara, M. Terashita (2004). Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod*, 30.11: p. 778-81.
- [229] Huth, K.C., M. Quirling, S. Lenzke, E. Paschos, K. Kamereck, K. Brand, R. Hickel, N. Ilie (2011). Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci*, 119.3: p. 204-10.
- [230] Thanomsub, B., V. Anupunpisit, S. Chanphetch, T. Watcharachaipong, R. Poonkhum, C. Srisukonth (2002). Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J Gen Appl Microbiol*, 48.4: p. 193-9.

- [231] Nagayoshi, M., T. Fukuizumi, C. Kitamura, J. Yano, M. Terashita, T. Nishihara (2004). Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*, 19.4: p. 240-6.
- [232] Eltas, A., Yavuzer, D. (2012). Dişeti Enflamasyonun Tedavisinde Gaz Ozonun Klinik Etkilerinin Değerlendirilmesi. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2.p. 29-33.
- [233] Yilmaz, S., S. Algan, H. Gursoy, U. Noyan, B.E. Kuru, T. Kadir (2013). Evaluation of the clinical and antimicrobial effects of the Er:YAG laser or topical gaseous ozone as adjuncts to initial periodontal therapy. *Photomed Laser Surg*, 31.6: p. 293-8.
- [234] Kazancioglu, H.O., S. Ezirganli, M.S. Aydin (2013). Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. *J Craniofac Surg*, 24.6: p. 2141-6.
- [235] Kan, B., M. Sencimen, G.R. Bayar, P. Korkusuz, A.T. Coskun, A. Korkmaz, E. Bahador, T. Zerener (2015). Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. *J Oral Maxillofac Surg*, 73.6: p. 1231 e1-10.
- [236] Bocci, V., I. Zanardi, M.S. Huijberts, V. Travagli (2014). It is time to integrate conventional therapy by ozone therapy in type-2 diabetes patients. *Ann Transl Med*, 2.12: p. 117.
- [237] Al-Dalain, S.M., G. Martinez, E. Candelario-Jalil, S. Menendez, L. Re, A. Giuliani, O.S. Leon (2001). Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res*, 44.5: p. 391-6.
- [238] Deliberador, T.M., A.F. Giovanini, T.R. Lopes, J.C. Zielak, A. Moro, F. Baratto Filho, F.R. Santos, C.L. Storrer (2014). Immunoexpression of PPAR-gamma and osteocalcin proteins for bone repair of critical-size defects treated with fragmented autogenous abdominal adipose tissue graft. *Braz Dent J*, 25.3: p. 179-85.
- [239] Newman, M.C., Takei, H.H., Klokkevold, P.R., Carranza, F.A. (2012). Bone Loss and Patterns of Bone Destruction. *içinde; Carranza's Clinical Periodontology 11th edition*, p. 140.
- [240] Firatli, E. (1997). The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. *J Periodontol*, 68.2: p. 136-40.
- [241] Graves, D.T., R. Liu, T.W. Oates (2007). Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontol 2000*, 45.p. 128-37.
- [242] Kumar, V., F. Mahdi, A.K. Khanna, R. Singh, R. Chander, J.K. Saxena, A.A. Mahdi, R.K. Singh (2013). Antidyslipidemic and Antioxidant Activities of Hibiscus rosa sinensis Root Extract in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Indian J Clin Biochem*, 28.1: p. 46-50.
- [243] Mohammadi Sartang, M., S.M. Mazloomi, N. Tanideh, A. Rezaian Zadeh (2015). The Effects of Probiotic Soymilk Fortified with Omega-3 on Blood Glucose, Lipid Profile, Haematological and Oxidative Stress, and Inflammatory Parameters in Streptozotocin Nicotinamide-Induced Diabetic Rats. *J Diabetes Res*, 2015.p. 696372.
- [244] Islam, M.S. ,T. Loots du (2009). Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 31.4: p. 249-61.

- [245] Wang, Z., H. Gleichmann (1998). GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes*, 47.1: p. 50-6.
- [246] Oberley, L.W. (1988). Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 5.2: p. 113-24.
- [247] Winterbourn, C.C., R. Munday (1989). Glutathione-mediated redox cycling of alloxan. Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH. formation. *Biochem Pharmacol*, 38.2: p. 271-7.
- [248] Silva Vde, O., R.V. Lobato, E.F. Andrade, C.G. de Macedo, J.T. Napimoga, M.H. Napimoga, M.R. Messori, R.M. Murata, L.J. Pereira (2015). beta-Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) Reduce Glucose Levels and Attenuate Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats with Periodontal Disease. *PLoS One*, 10.8: p. e0134742.
- [249] Wu, Y., W. Wang, L. Liu (2015). Effect of beta-anhydroicaritin on the expression levels of tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-3 in periodontal tissue of diabetic rats. *Mol Med Rep*, 12.2: p. 1829-37.
- [250] Bizenjima, T., F. Seshima, Y. Ishizuka, T. Takeuchi, T. Kinumatsu, A. Saito (2015). Fibroblast growth factor-2 promotes healing of surgically created periodontal defects in rats with early, streptozotocin-induced diabetes via increasing cell proliferation and regulating angiogenesis. *J Clin Periodontol*, 42.1: p. 62-71.
- [251] Sawada, M., N. Shimizu (1996). Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor-beta 1 in the rat. *Eur J Orthod*, 18.2: p. 169-79.
- [252] Ozturk, F., H. Babacan, C. Gumus (2012). Effects of zoledronic acid on sutural bone formation: a computed tomography study. *Eur J Orthod*, 34.2: p. 141-6.
- [253] Freeman, E., R.S. Turnbull (1973). The value of osseous coagulum as a graft material. *J Periodontal Res*, 8.4: p. 229-36.
- [254] Petridis, X., E. Diamanti, G. Trigas, D. Kalyvas, E. Kitraki (2015). Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*, 43.4: p. 483-90.
- [255] Kazancioglu, H.O., E. Kurklu, S. Ezirganli (2014). Effects of ozone therapy on pain, swelling, and trismus following third molar surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 43.5: p. 644-8.
- [256] Kazancioglu, H.O., S. Ezirganli, N. Demirtas (2014). Comparison of the influence of ozone and laser therapies on pain, swelling, and trismus following impacted third-molar surgery. *Lasers Med Sci*, 29.4: p. 1313-9.
- [257] Erdemci, F., Y. Gunaydin, M. Sencimen, I. Bassorgun, M. Ozler, S. Oter, A. Gulses, A. Gunal, S. Sezgin, G.R. Bayar, N. Dogan, I.K. Gider (2014). Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 43.6: p. 777-83.
- [258] Sam, G., B.R. Pillai (2014). Evolution of Barrier Membranes in Periodontal Regeneration-"Are the third Generation Membranes really here?". *J Clin Diagn Res*, 8.12: p. ZE14-7.
- [259] Sculean, A., D. Nikolidakis, G. Nikou, A. Ivanovic, I.L. Chapple, A. Stavropoulos (2015). Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontol 2000*, 68.1: p. 182-216.

- [260] Mokbel, N., C. Bou Serhal, G. Matni, N. Naaman (2008). Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg*, 12.2: p. 73-8.
- [261] Verna, C., M. Dalstra, U.M. Wikesjo, L. Trombelli (2002). Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol*, 29.9: p. 865-70.
- [262] Yen, C.C., Y.K. Tu, T.H. Chen, H.K. Lu (2014). Comparison of treatment effects of guided tissue regeneration on infrabony lesions between animal and human studies: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol Res*, 49.4: p. 415-24.
- [263] Çakır, M. (2009). Doktora Tezi: Maksillofasiyal Bölgedeki Kemik İçi Defektlerin Tedavisinde Plateletten Zengin Plazmanın Hidroksi Apatit Kemik Greftleri ile Birlikte Kullanımının Etkinliğinin Klinik ve Radyolojik Olarak İncelenmesi. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü* p. 87.
- [264] Jemt, T., U. Lekholm (2003). Measurements of buccal tissue volumes at single-implant restorations after local bone grafting in maxillas: a 3-year clinical prospective study case series. *Clin Implant Dent Relat Res*, 5.2: p. 63-70.
- [265] Widmark, G., B. Andersson, C.J. Ivanoff (1997). Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants. Presentation of surgical method. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 26.2: p. 106-9.
- [266] Topping, R.E., M.E. Bolander, G. Balian (1994). Type X collagen in fracture callus and the effects of experimental diabetes. *Clin Orthop Relat Res*, 308: p. 220-8.
- [267] Akbarzadeh Baghban, A., A. Dehghani, F. Ghanavati, F. Zayeri (2009). Comparing alveolar bone regeneration using Bio-Oss and autogenous bone grafts in humans: a systematic review and meta-analysis. *Iran Endod J*, 4.4: p. 125-30.
- [268] Cunha, M.J., L.A. Esper, M.C. Sbrana, P.G. de Oliveira, A.L. do Valle, A.L. de Almeida (2014). Effect of low-level laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts: in vivo study in rat calvaria. *Biomed Res Int*, 2014.p. 104230.
- [269] Denicolo, P.J., M.K. Guyton, M. Cuenin, S. Hokett, M. Sharawy, J.L. Borke, J.C. McPherson (2013). Histologic Evaluation of Osseous Regeneration Following Combination Therapy with Platelet-Rich Plasma and BioOss in a Calvarial Critical Size Defect Model. *J Oral Implantol*.
- [270] Issa, J.P., M. Gonzaga, B.G. Kotake, C. de Lucia, E. Ervolino, M. Iyomasa (2015). Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rhBMP-2. *Clin Oral Implants Res*.
- [271] Delaisse, J.M. (2014). The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep*, 3.p. 561.
- [272] Termaat, M.F., F.C. Den Boer, F.C. Bakker, P. Patka, H.J. Haarman (2005). Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, 87.6: p. 1367-78.
- [273] Suto, M., E. Nemoto, S. Kanaya, R. Suzuki, M. Tsuchiya, H. Shimauchi (2013). Nanohydroxyapatite increases BMP-2 expression via a p38 MAP kinase dependent pathway in periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*, 58.8: p. 1021-8.

- [274] Koerdt, S., O. Ristow, A. Wannhoff, A.C. Kubler, T. Reuther (2014). Expression of growth factors during the healing process of alveolar ridge augmentation procedures using autogenous bone grafts in combination with GTR and an anorganic bovine bone substitute: an immunohistochemical study in the sheep. *Clin Oral Investig*, 18.1: p. 179-88.
- [275] Shen, Y., S. Yang, J. Liu, H. Xu, Z. Shi, Z. Lin, X. Ying, P. Guo, T. Lin, S. Yan, Q. Huang, L. Peng (2014). Engineering scaffolds integrated with calcium sulfate and oyster shell for enhanced bone tissue regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*, 6.15: p. 12177-88.
- [276] Xie, Y.F., M.G. Wang, K.M. Chen, W.G. Shi, J. Zhou, Y.H. Gao (2015). [Icariin enhances differentiation and maturation of rat calvarial osteoblasts in collagen hydrogel three-dimensional culture]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 44.3: p. 301-7.
- [277] Ibarra Urizar, A., J. Friberg, D.P. Christensen, G. Lund Christensen, N. Billestrup (2015). Inflammatory Cytokines Stimulate Bone Morphogenetic Protein-2 Expression and Release from Pancreatic Beta Cells. *J Interferon Cytokine Res*.
- [278] Zhang, M., S.H. Zhou, S. Zhao, X.P. Li, L.P. Liu, X.Q. Shen (2008). Pioglitazone can downregulate bone morphogenetic protein-2 expression induced by high glucose in human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacology*, 81.4: p. 312-6.
- [279] Zhang, M., J.D. Sara, F.L. Wang, L.P. Liu, L.X. Su, J. Zhe, X. Wu, J.H. Liu (2015). Increased plasma BMP-2 levels are associated with atherosclerosis burden and coronary calcification in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*, 14.p. 64.
- [280] Kılıç, E., Ceyhan, T., Çetinkaya, D.U. (2007). İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin kırıkta ve kemik hücrelerine farklılaşma potansiyelinin değerlendirilmesi. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 41.4: p. 295-301.
- [281] Owen, T.A., M. Aronow, V. Shalhoub, L.M. Barone, L. Wilming, M.S. Tassinari, M.B. Kennedy, S. Pockwinse, J.B. Lian, G.S. Stein (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 143.3: p. 420-30.
- [282] Chung, Y.I., K.M. Ahn, S.H. Jeon, S.Y. Lee, J.H. Lee, G. Tae (2007). Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. *J Control Release*, 121.1-2: p. 91-9.
- [283] Starup-Linde, J., P. Vestergaard (2015). Biochemical bone turnover markers in diabetes mellitus - A systematic review. *Bone*.
- [284] Bessa, P.C., E.R. Balmayor, J. Hartinger, G. Zanoni, D. Dopler, A. Meinel, A. Banerjee, M. Casal, H. Redl, R.L. Reis, M. van Griensven (2010). Silk fibroin microparticles as carriers for delivery of human recombinant bone morphogenetic protein-2: in vitro and in vivo bioactivity. *Tissue Eng Part C Methods*, 16.5: p. 937-45.
- [285] Alan, H., N. Vardi, C. Ozgur, A. Huseyin, U. Yolcu, D.O. Dogan (2015). Comparison of the Effects of Low-Level Laser Therapy and Ozone Therapy on Bone Healing. *J Craniofac Surg*, 26.5: p. e396-400.

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı : 65202830/130
Konu : Etik Kurul Kararı.

16.07.2014

Sayın

Doç.Dr.Hülya TOKER
Diş Hekimliği
Periodontoloji

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 16.07.2014 tarihinde Prof.Dr.Haki KARA başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Doç.Dr.Hülya TOKER'in yürütücülüğünü yapmış olduğu 02.07.2014 tarih ve 40 sayılı "Diyabetik ratlarda oluşturulan kalvaryal defektlerde değişik greft materyalleri ile kombine olarak uygulanan ozonun kemik rejenerasyonu üzerine etkinliğinin araştırılması." isimli Doktora Tezi Projesi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Katılmadı
Prof.Dr.Eray BULUT
Üye

Katılmadı
Prof.Dr.Mustafa TURAN
Üye

H. H. H. H.
Doç.Dr.Ihsan H. H. H. H. ZOĞLU
Üye

A. O. P.
Doç.Dr.Zübeyda AKIN POLAT
Üye

B. S.
Doç.Dr.Bülent SARAÇ
Üye

Doç.Dr.Mehmet TUZGU
Üye

G. Y.
Yrd.Doç.Dr.Gülay YILDIRIM
Üye

H. İ.
Yrd.Doç.Dr.Hakan İŞİDAN
Üye

Y. Y.
Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN
Üye - Başkanvekili

Katılmadı
Semiha EKİNCİ
Sivil Üye

Katılmadı
Turhan DUYMUŞ
Sivil Üye

H. K.
Prof.Dr.Haki KARA
Başkan

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Aysan LEKTEMÜR ALPAN

Doğum Tarihi: 01 Ocak 1981

Medeni Durumu: Evli

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Diş hekimliği	İstanbul Üniversitesi	1998-2003
Doktora	Periodontoloji	Süleyman Demirel Üniversitesi	2003-2004
Doktora	Periodontoloji	Cumhuriyet Üniversitesi	2013

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Doktora Öğrencisi	Süleyman Demirel Üniversitesi	2003-2004
Diş Hekimi	Sivas ili özel muayenehane	2004-2007
Diş Hekimi	Sivas Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi	2007-2013
Doktora Öğrencisi	Cumhuriyet Üniversitesi	2013