

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



GİNGİVAL FİBROBLASTLARDA BİFOSFONAT UYGULAMASINA
BAĞLI OLUŞAN YARANIN İYİLEŞMESİNDE OZONUN ETKİLERİNİN
İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Dt. Esra ERSÖZ

ANKARA/ 2013

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



GİNGİVAL FİBROBLASTLARDA BİFOSFONAT UYGULAMASINA
BAĞLI OLUŞAN YARANIN İYİLEŞMESİNDE OZONUN ETKİLERİNİN
İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Dt. Esra ERSÖZ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Ufuk ATEŞ

ANKARA/ 2013

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ KAPAK KABUL TUTANAĞI

Sağlık Bilimleri, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02 /05 /2013

Öğrenci Adı: Esra ERSÖZ

Doktora Tez Konusu: “Gingival Fibroblastlarda Bifosfonat Uygulamasına Bağlı Oluşan Yaranın İyileşmesinde Ozonun Etkilerinin İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi”

TEZ DANIŞMANI: Yrd. Doç. Dr. Ufuk ATEŞ

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Sina UÇKAN

Prof. Dr. Şule BULUT

Prof. Dr. Mine CAMBAZOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Ufuk ATEŞ

Yrd. Doç. Dr. Burak BAYRAM

ONAY: Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu’nun / / 201... tarih ve SBE/..... kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Rengin ERDAL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübesini bizlerle paylaşan, Başkent Üniversitesi Rektörü Sayın Hocam **Prof. Dr. Kenan ARAZ**'a

Doktora eğitimime başladığım günden itibaren engin bilgisi ve deneyimiyle her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam **Prof. Dr. Sina UÇKAN**' a

Tüm doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince sevgi ve hoşgörüsü ile her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, sevgili hocam ve ağabeyim **Yrd. Doç. Dr. Ufuk ATEŞ**' e

Tezimin planlanma aşamasından itibaren bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, yoğun çalışma temposunda bana zaman ayıran, Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi **Prof. Dr. Feride ŞAHİN**' e

Tezimin laboratuvar aşamasında verdiği emek ve sağladığı yardımlarından ötürü Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi **Doç. Dr. Erkan YURTÇU**' ya,

Çalışmam süresince güleryüzüyle, verdiği önerilerle yardımlarını benden esirgemeyen Başkent Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi **Dr. Yunus Kasım TERZİ**'ye

Tezimde kullandığım ozon jeneratörünün temininde bana yardımcı olan sevgili meslektaşım ve arkadaşım **Dr. Dt. Bertan ARPAK**' a

Yardımları ve sevgileri ile bana destek veren, güzel bir doktora süreci geçirmemi sağlayan tüm **bölüm öğretim üyelerine ve asistan arkadaşlarıma**

Doktora eğitimim süresince sağladığı maddi destek ile çalışmalarımı yapmama imkân sağlayan **TÜBİTAK, Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)**'na

Attığım her adımda yanımda olan, beni destekleyen, yüreklendiren sevgili nişanlım **Faik Ercan KARAGÖZ**' e

Hayatımın her döneminde yanımda olan, maddi ve manevi her türlü desteğini her an hissettiğim sevgili annem **Cemile ERSÖZ** ve babam **Ahmet ERSÖZ**'e

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

ÖZET

Gingival Fibroblastlarda Bifosfonat Uygulamasına Bağlı Oluşan Yaranın İyileşmesinde Ozonun Etkilerinin İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi

Bifosfanat kullanımına bağlı çene kemiği nekrozu (BRONJ) uzun dönem bifosfonat terapisi altındaki hastalarda görülen, iyileşmeyen oral mukoza ve ekspozite çene kemiği ile karakterize bir komplikasyondur. Etiyopatogenizini açıklamak için önceleri kemik doku üzerinde durulurken günümüzde yumuşak doku çalışmaları önem kazanmıştır.

Hastaların yaşam kalitesini önemli derecede etkileyen BRONJ ‘un tedavisi oldukça karmaşık ve güçtür. Hiperbarik oksijen terapisi, lazer gibi birçok alternatif yöntem denenmiştir ancak kesin bir tedavi protokolü oluşturulamamıştır. Son dönemlerde BRONJ tedavisinde ozonun faydalı olduğunu bildiren vaka raporları literatürde yer almıştır.

Bu çalışmada, gingival fibroblastlarda bifosfonat uygulamasına bağlı oluşan yaranın iyileşmesinde ozonun etkilerinin in vitro olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

18-30 yaş arası, sağlıklı 6 hastadan sürmemiş dişlerin ortodontik tedavi ile sürdürülmesi için üzerinin açılması sırasında elde edilen gingival doku örneklerinden fibroblast kültürü elde edilmiştir. İstenilen miktarda hücreye 6 - 9. pasajda ulaşılmıştır.

Kültürlere yalnızca pamidronat, pamidronat + ozon veya yalnızca ozon uygulaması yapılarak 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir ve herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Pamidronat + ozon uygulaması yapılan grupta, 24 saat inkübe edilen kültürler pamidronat ve ozon eş zamanlı olarak uygulanırken, 48 ve 72 saat inkübe edilen kültürler pamidronat uygulaması sonrası 24. saatte ozon uygulanmıştır. 3ml besiyeri içindeki kültürler son konsantrasyon 10^{-4} M olacak

şekilde pamidronat uygulanmıştır. Ozon uygulaması Ozonytron X medikal ozon jeneratörü aracılığı ile uygulanmıştır.

İnkübasyon süresi dolan kültürler 1 ml *Tripure Isolation Reagent* içine alınarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir VE -20⁰C’de saklanmıştır. COL1A1 ve COL1A2 genlerinin ifadenme düzeyleri, housekeeping gen olarak GAPDH kullanılarak incelenmiştir. RT-PCR yöntemi ile COL1A1 ve COL1A2 genlerinin ifadenmeleri incelenmiştir.

Ozon uygulaması, yalnızca ozon uygulanan grupta ve ozon ve pamidronatın birlikte uygulandığı grupta COL1A1 ve COL1A2 gen ifadenme düzeylerini arttırmıştır. Ozon grubunda en anlamlı artış 48 saatte görülürken, ozon + pamidronat grubunda 72 saatte, yani ozonun 24. saatte uygulanarak, 48 saat ozona maruz kalma süresi sonunda gözlenmiştir. Ozon uygulaması sonrası 72 saatte ozonun etkisinin ortadan kalktığı belirlenmiştir ve COL1A1 ve COL1A2 ifadenmelerinde artış görülmemiştir.

Çalışmadan elde edilen bulgular ozon uygulamasının yara iyileşmesinin önemli bir basamağı olan kollajen sentezini arttırdığını ortaya koymaktadır. Ozonun kollajen sentezine olan maksimum etkisi uygulamadan 48 saat sonra görülmüştür ve 72 saat sonunda 48 saate göre düşüş gözlenmiştir. Bu bulgu doğrultusunda, oral mukozal yaralarda ozon uygulaması 48 saat aralıklar ile yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: BRONJ, Ozon, COL1A1, COL1A2, *in vitro*

ABSTRACT

Effect Of The Ozone On Healing Of Bisphosphonate Related Wounds Using Gingival Fibroblasts: An In-Vitro Study

Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) is a complication seen in patients undergoing long-term bisphosphonate therapy and characterized by non-healing oral mucosa and exposed necrotic jaw bone. Previously, bone tissue studies was commonly performed to explain the pathogenesis of BRONJ, recently soft tissue researches became more important.

Treatment of BRONJ is still complicated. Alternative modalities as hyperbaric oxygen and laser have been tried in BRONJ treatment, however; there has not been effective treatment protocol yet. Recently, some case reports have been published stating the effect of ozone therapy in BRONJ treatment have been published.

The purpose of this study was to evaluate the effect of the ozone on healing of bisphosphonate related wounds using gingival fibroblasts in-vitro.

6 healthy patients, with age range 18-30 included in this study. Human gingival fibroblasts obtained from gingiva excised above unerupted teeth for orthodontic traction. Sufficient cell number was achieved at passage 6-9.

Cultures were treated with only pamidronate, pamidronate + ozone or only ozone and incubated 24, 48 or 72 hours and compared with untreated group. Pamidronate and ozone were applied simultaneously to the cultures incubated 24 hours. The cultures, incubated 48 and 72 hours, treated with ozone 24 hours after pamidronate application. Final concentration of applied pamidronate was regulated as 10^{-4} M and ozone application was made by OzonytronX medical ozone generator.

Total RNA isolation was achieved by 1ml *Tripure Isolation Reagent* application to cultures at the end of the incubation period and freezed at -20⁰C. COL1A1 and COL1A2 gene expressions were evaluated with RT-PCR. GAPDH was used as housekeeping gene.

COL1A1 and COL1A2 expressions were higher in ozone group compared with control group at 48 hours. In pamidronat + ozone group, COL1A1and COL1A2 expressions was increased at 72 hours which means 48 hours after ozone application. After 72 hours of ozone application, there was no increase in COL1A1 and COL1A2 expressions.

The results of this study show that; ozone induced the collagen expression, an important phase of wound healing. Maximum effect of ozone on collagen expression was observed at 48 hours after application and collagen expression decreased at 72 hours. In oral mucosal wounds, ozone must be applied at 48 hours intervals to keep increased collagen expression.

Key words: BRONJ, Ozone, COL1A1, COL1A2, *in vitro*

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
RESİMLER	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Oral Mukoza.....	3
2.2. Yara İyileşmesi.....	4
2.2.1. Hemostatik ve Enflamatuar Faz (0-3 gün)	5
2.2.2. Proliferasyon veya fibroblastik faz (3-12 gün).....	6
2.2.3. Yeniden Şekillenme Fazı (6-14 gün).....	8
2.2.4. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	9
2.3. Bifosfonatların Tarihçesi.....	10
2.4. Bifosfonatların Kimyasal Yapısı.....	10
2.5. Bifosfonatların Sınıflandırılması.....	11
2.5.1. Nitrojen İçermeyen Bifosfonatlar:.....	12
2.5.2. Nitrojen İçeren Bifosfonatlar (Aminobifosfonatlar, N-BPs).....	12
2.6. Bifosfonatların Etki Mekanizması	14
2.7. Bifosfonatların Osteoklastlar Dışında Etkilediği Diğer Hücreler	16
2.7.1. Osteoblast	16
2.7.2. Endotel.....	17
2.7.3. Oral Epitel Hücreleri	17
2.8. Bifosfonatların Endikasyonları	19
2.9. Bifosfonatların Kontrendikasyonları.....	19
2.10. Bifosfonatların Yan Etkileri.....	20
2.11. BRONJ	21
2.11.1. Patofizyolojisi.....	21

2.11.2. Risk faktörleri.....	24
2.11.3. Ayırıcı Tanılar	26
2.11.4. BRONJ Evreleri ve Klinik Bulguları:	26
2.11.5. BRONJ'un Radyolojik Bulguları	29
2.11.6. BRONJ'un Histolojik Bulguları	31
2.11.7. BRONJ'un Hematolojik Bulguları	31
2.11.8. BRONJ Tedavi Seçenekleri.....	32
2.12. Ozon	34
2.12.1. Ozonun Etki Mekanizmaları	35
2.12.1.1. Antimikrobiyal Etki.....	35
2.12.1.2. Bağışıklık Sistemini Uyarıcı Etki	36
2.12.1.3. Antihipoksik Etki.....	36
2.12.1.4. Analjezik- Detox Etkisi	37
2.12.1.5. Biyoenerjik- Biyosentetik Etki	37
2.12.2. Dış Hekimliğinde Ozon Kullanımı.....	37
2.12.3. Ozon Terapisi Endikasyonları	41
2.12.4. Ozon Terapisi Kontrendikasyonları	42
2.12.5. Ozon Terapisinin Komplikasyonları	42
2.12.6. Ozon Uygulama Şekilleri	43
2.12.6.1. Sistemik Ozon Uygulaması	43
2.12.6.1. Topikal Ozon Uygulaması.....	43
2.12.7. Ozon Jeneratörleri	43
3. GEREÇ ve YÖNTEM	48
3.1. Kullanılan Cihazlar	48
3.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar	48
3.3. İlaçların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	49
3.3.1. Pamidronat disodyum tuz hidrat: $C_3H_9NO_7P_2Na_2 \cdot xH_2O$	49
3.4. Hasta Seçimi.....	50
3.5. Primer Fibroblast Kültürü	50
3.5.1. Primer Fibroblast Eldesi	50
3.5.2. Primer Fibroblastların Pasajı	51
3.6. Hücre Sayısının ve Canlılığının Belirlenmesi.....	51

3.7. Pamidronat Uygulaması.....	52
3.8. Ozon Uygulaması.....	52
4.9. Uygulama Grupları.....	53
3.10. RNA İzolasyonu.....	54
3.11. İstatistiksel Yöntem.....	54
4. BULGULAR.....	56
4.1. COL1A1 Bulguları.....	56
4.1.1. 24 Saat İnkübasyon Bulguları	56
4.1.2. 48 Saat İnkübasyon Bulguları	56
4.1.3. 72 Saat İnkübasyon Bulguları	57
4.2. COL1A2 Bulguları.....	60
4.2.1. 24 Saat İnkübasyon Bulguları	60
4.2.2. 48 Saat İnkübasyon Bulguları	61
4.2.3. 72 Saat İnkübasyon Bulguları	61
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
KAYNAKLAR	80

KISALTMALAR VE SİMGELER

AAOMS	: American Association of Oral and Maxillofacial Surgens
Ark.	: Arkadaşları
ATP	: Adenozin Trifosfat
BPs	: Bifosfonat
BRONJ	: Bifosfonata Bağlı Çene Kemigi Nekrozu
Ca⁺	: Kalsiyum
COL1A1	: Kollajen Tip 1 alfa 1
COL1A2	: Kollajen Tip 1 alfa 2
CRP	: Serum Reaktif Protein
CTX	: C Terminal Telopektid
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
FDA	: Food and Drug Administration
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: Fibroblastik Büyüme Faktörü
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IL-6	: İnterlökin-6
I.V	: İntravenöz
μM	: Mikromolar
M	: Molar
MMP2	: Matriks Metalloproteinaz-2
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
N-BPs	: Nitrojen İçeren Bifosfonatlar
NO	: Nitrik Oksit
O⁺²	: Aktif Atomik Oksijen
O₃	: Ozon
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme faktörü
RANK	: Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kb
RANKL	: Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kb Ligand
TGFβ	: Transforme Edici Büyüme faktörü beta
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor α
TSH	: Tiroid Stimulan Hormon
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Temel profosfat yapısı.....	11
Şekil 2.2. Merkezi karbon atomuna bağlanan R1 ve R2 zincirlerini gösteren temel bifosfonat yapısı.....	11
Şekil 2.3. Günümüzde kullanımı en çok tercih edilen nitrojen içeren ve içermeyen bifosfonatların kimyasal yapıları	13
Şekil 2.4. Nitrojen içeren bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi mevalonat yolu üzerinden inhibe etme mekanizması	15
Şekil 2.5. Osteoblastların salgıladığı ajanların rezorpsiyona olan etkisi	17
Şekil 4.1. 24 saat COL1A1 ortalama değerleri grafiği	56
Şekil 4.2. 48 saat COL1A1 ortalama değerleri grafiği	57
Şekil 4.3. 72 saat COL1A1 ortalama değerleri grafiği	57
Şekil 4.4. 24, 48 ve 72 saat COL1A1 ortalama değerlerinin değişim grafiği	58
Şekil 4.5. Pamidronat Uygulanan Grupta COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi	58
Şekil 4.6. Pamidronat + Ozon Uygulanan Grupta COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi	59
Şekil 4.7. Ozon Uygulanan Grupta COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi	59
Şekil 4.8. Kontrol Grubunda COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi	60
Şekil 4.9. Tüm grupların COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi	60
Şekil 4.10. 24 saat COL1A2 ortalama değerleri grafiği	61
Şekil 4.11. 48 saat COL1A2 ortalama değerleri grafiği	61
Şekil 4.12. 72 saat COL1A2 ortalama değerleri grafiği	62
Şekil 4.13. 24, 48 ve 72 saat COL1A1 ortalama değerlerinin değişim grafiği	62
Şekil 4.14. Pamidronat Uygulanan Grupta COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi ...	63
Şekil 4.15. Pamidronat + Ozon Uygulanan Grupta COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi	63
Şekil 4.16. Ozon Uygulanan Grupta COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi	64
Şekil 4.17. Kontrol Grubunda COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi	64
Şekil 4.18. Tüm Grupların COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi	64

TABLÖLAR

Tablo 2.1. OzonytronX ozon jeneratörü kademelerinin konsantrasyonu, uygulama süresi ve bu konsantrasyona göre uygulanan tedavi seçenekleri	47
Tablo 4.1. 24, 48 ve 72 saatteki COL1A1 ortalama değerleri	58
Tablo 4.2. 24, 48 ve 72 saatteki COL1A2 ortalama değerleri	63

RESİMLER

Resim 2.1. BRONJ'un klinik görünümü-ekspoze nekrotik kemik.	28
Resim 2.2. Osteokemonekroz nedeniyle trabekülasyonu bozulmuş alveolar kemiğin radyografik görüntüsü	30
Resim 2.3. OzonyTronX ozon jeneratörü	46
Resim 2.4. OzonyTronX ozon jeneratörü prob uçları	46
Resim 2.5. OzonyTronX-Biozonx ozon jeneratörü GI 90 ⁰ prob ucu	52
Resim 2.6. Hücre kültürüne ozon jeneratörü ile ozon uygulanması	53

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bifosfonatlar, endojen inorganik pirofosfat analoglarıdır ve kalsiyum kristallerine olan afiniteleri sayesinde, sistemik olarak kullanıldıklarında kemiğin yapısındaki hidroksiapatite, pirofosfonatların bağlanmasını sağlayarak osteoklastların yaptığı rezorpsiyonu durdururlar. Metabolize olmadıkları için kemik içerisinde çok uzun süre yüksek konsantrasyonda bulunurlar ve aktif remodelling bölgelerinde osteoklast gelişimini ve aktivitesini inhibe ederek kemik rezorpsiyonunu azaltırlar.

Bifosfonatlar, nitrojen içermeyen ve nitrojen içeren bifosfonatlar olmak üzere 2 ayrı gruba ve 3 jenerasyona ayrılmaktadırlar. Nitrojen içeren bifosfonatlar, nitrojen içermeyen bifosfonatlara göre çok daha etkilidirler.

Bifosfonatlar, osteoklastik aktivite ile ilişkili kemik kaybının görüldüğü osteoporoz, Paget hastalığı, multiple myeloma, metastatik meme ve prostat kanseri tedavisinde 1987 yılından bu yana yaygın olarak kullanılmaktadır.

Önceleri bifosfonatların yan etkileri akut faz reaksiyonları, gastrointestinal yan etkiler ve renal yan etkiler olarak bildirilken ilk kez 2003 yılında bu ilacın kullanımının bir komplikasyonu olarak çene kemiklerinde osteonekroz olduğu bir diş hekimi tarafından rapor edilmiştir ve bu komplikasyon giderek artan vaka sayısı ile literatürdeki yerini almıştır.

Bifosfonatlar ile ilişki osteonekroz vücutta çene kemiklerinden başka hiçbir iskeletsel bölgede görülmemektedir ve bu osteonekrozların tedavisi klinik olarak oldukça zor olup hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir.

İlacın neden olduğu osteonekrozun önelenmesi veya tedavi edilebilmesi için oral kavitede kemik ve yumuşak dokuya yönelik araştırmalar yapılmaktadır. Çene kemiği ile ilgili çok sayıda çalışma yapılsa da bifosfonat kullanımını takiben neden sadece çene kemiklerinde osteonekroz olduğu hala açıklanmamıştır. Bifosfonatların

oral yumuşak dokudaki etkilerine yönelik bilimsel araştırmalar sınırlıdır. Henüz olayın patogenezi tam açıklanamamıştır ve konservatif tedavi, cerrahi tedavi, hiperbarik oksijen tedavisi gibi çeşitli tedavi alternatifleri denenmiş ancak ideal bir tedavi protokolü oluşturulamamıştır. Son dönemlerde bisfosfonata bağlı osteonekroz vakalarının tedavisinde ozon terapisinin faydalı olduğuna ilişkin vaka raporları literatürde yer almış, ancak bu konuda yapılmış *in vitro* herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında;

- Bifosfonat ile muamele edilmiş gingival fibroblastlarda ozonun COL1A1 ve COL1A2 sentezine olan etkisini *in vitro* olarak değerlendirilmesi
- Literatürde henüz kesin bir tedavisi olmayan, tedavi süreci oldukça uzun ve sıkıntılı olan BRONJ lezyonlarında yumuşak doku iyileşmesinde ozon tedavisinin etkinliğini *in vitro* olarak ortaya koyarak, klinik uygulamalara ışık tutmak
- Bu çalışmanın verileri doğrultusunda aftöz lezyonlar, ülserasyonlar gibi ağız yaralarının tedavisinde ozonun klinik kullanımına ışık tutmak
- Oral ve maksillofasiyal cerrahide üzerinde çok sınırlı sayıda çalışma bulunan ozon tedavisi ile ilgili *in vivo* ve *in vitro* alışmalara nc olmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oral Mukoza

Müköz membran, vücutta dış ortamla ilişkiyi sağlayan, nazal pasaj, farenks, gastrointestinal kanal ve ürogenital bölge gibi alanlarda bulunan nemli yüzey örtüsüne verilen isimdir ve oral kavite de, oral müköz membran ile örtülüdür (Nanci, 2007).

Oral mukozanın başlıca doku komponentleri oral epitel adı verilen çok katlı yassı epitel ve altındaki lamina propria adı verilen kontekstif bağ dokudur. Oral epitel ve lamina propria ‘rete peg’ adı verilen epitelyal çıkıntılar ile birbirlerine bağlanırlar (Squier, 2011).

Epitel terimi Yunanca epi (üstte, üzerinde) ve theleos (örtü) sözcüklerinden oluşmuştur. Epitel hücreleri, gelişmekte olan embriyonun üç germinatif tabakasından köken alır. Epitel dilde endoderm, dudak, yanak, diş eti, vestibulum oris, damak ve ağız tabanında ise ektoderm orijinlidir. Lamina propria fibroblastlar ve bağ dokusu, küçük kan damarları, inflamatuvar hücreler ve ekstraselüler matriksi barındırır (Günhan, 2003).

Keratinosit: Keratinositler oral epitelde patojenik ajanlara, mekanik ve kimsayal uyarılara karşı koruma görevi üstlenen hücrelerdir. Ayrıca sitokin uyarıları sayesinde proinflamatuvar yanıtta direkt olarak görev alırlar.

Travmaya daha çok maruz kalan sert damak ve gingiva keratinosit yoğunluğunun daha fazla olması nedeniyle sert, periosta direk olarak yapışmış ve hareketlilik göstermeyen, lamina propriası 4 katlı orto ve parakeratinize epitel ile kaplıdır (Ruch, 1990).

Fibroblast: Fibroblast ekstraselüler matriks ve kollajen üreten, doku stromasını sağlayan, yara iyileşmesinde önemli rol oynayan ve bağdokuda en çok bulunan

hücrelerdir. Oral mukoza bağ dokusunda yaygın olarak bulunurlar ve turn overları çok yüksektir (Odelle, 1998).

Yanaklar, dudaklar ve sert damağın bazı bölümlerinde mukoza altında kan damarları ve sinirleri içeren ve mukozayı altındaki kemikten ayıran, submukoza adı verilen gevşek bağ doku bulunur ve submukoza, damarlar, yağ dokusu, tükürük bezlerini içerir. Gingiva ve sert damağın diğer bölümlerinde mukoza altındaki kemiğin periostuna submukoza olmaksızın direk olarak bağlanır ve bu sıkı, elastik olmayan yapıya mukoperiosteum adı verilir (Squier, 2011).

Yanaklar, dudakların iç kısmı, dilin alt yüzeyi, ağız tabanı ve yumuşak damak gibi hareketli kısımların epiteli non-keratinize iken dil sırtı, sert damak ve diş eti epiteli keratinizedir (Squier 2001.)

Oral mukoza, oral kavitenin çeşitli bölümlerinde önemli yapısal farklılıklar göstermektedir ve oral mukozanın yapısı çeşitli fonksiyonel adaptasyonları yansıtmaktadır. Oral kavitede, fonksiyonlarına göre çiğneyici mukoza, örtücü mukoza ve özelleşmiş mukoza olmak üzere başlıca üç çeşit mukoza mevcuttur (Squier, 2011; Nanci, 2007).

Oral mukoza ağız boşluğunu bir bariyer gibi kaplayarak tat alma, çiğneme, yıkama, enzimatik sindirim işlemlerini başlatma ve immün sisteme yardımcı olma gibi fonksiyonları görecekte şekilde özelleşmiştir.

2.2. Yara İyileşmesi

Doku yaralanmasıyla başlayıp dokunun normal durumuna dönmesine kadar geçen olaylar dizisi yara iyileşmesi olarak adlandırılır. Yara iyileşmesi birbiri ile iç içe seyreden programlı üç fazdan oluşan dinamik bir olaydır. Tüm bu fazlar matriks proteinleri, epitel hücreleri, sitokinler ve büyüme faktörleri arasındaki etkileşimler tarafından düzenlenir (Şenol, 1995). Bu fazların herhangi birinde meydana gelen

kesintiler ve aksaklıklar yara iyileşmesinin gecikmesine veya iyileşmeyen kronik yara oluşmasına sebep olur. İdeal yara iyileşmesi hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodelasyon fazlarını içerir.

2.2.1. Hemostatik ve Enflamatuvar Faz (0-3 gün)

Yaralanma sonrası ilk yanıt kanamanın kontrolü için vazokonstriksiyondur, yaralanmayı takiben yara bölgesindeki yıkıma uğramış damarlar hemen daralır. Bölgeye trombositlerin göçünü takiben hasarlı dokudan tromboplastik doku ürünleri dışarı salınır. Trombositler kümelenerek ilk hemostatik tıkaçı oluşturur. Pıhtılaşma ve kompleman sistemleri harekete geçer. İntrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma sistemleri protrombinin trombine aktivasyonunu sağlar. Aktive trombin, fibrinojeni daha sonra polimerize olarak kalıcı pıhtıyı oluşturacak olan fibrine çevirir (Robbins, 1994, Broughton, 2006). Pıhtının iki görevi vardır; açığa çıkan dokuların geçici olarak korunmasını sağlamak ve hücre göçü için geçici bir matriks oluşturmak (Siervo, 2008). Kan pıhtısında kanın hücresel elemanları olan alyuvarlar, akyuvarlar ve trombositler ayrıca plazma fibronektini, vitronektin ve trombosporin bir fibrin matriks içerisinde bulunur (Şenol, 1995).

Trombusun oluşumunu takiben hemostaz sağlanır. Pıhtı ve yara çevresindeki dokulardan proenflamatuvar sitokinler büyüme faktörleri salınarak enflamatuvar hücrelerin yara bölgesine göç etmesini sağlarlar. Enflamatuvar hücreler yara bölgesine göç ederler ve nötrofil, makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu ile karakterize olan enflamatuvar fazı indüklerler (Guo, 2010).

Yara bölgesine ilk gelen enflamatuvar hücreler arasında nötrofiller çoğunluktadır. Nötrofillerin görevi yara bölgesini istila eden mikroorganizmaları, proteaz ve reaktif oksijen ürünleri üreten debris hücrelerini ortamdan uzaklaştırmaktır (Guo, 2010).

2-3 gün içinde enflamatuar hücre sayısı monositlerin hakimiyetine geçer. Kanda dolaşan monositler yara bölgesine göç eder ve makrofajlara dönüşür. Makrofajların yara iyileşmesinde çeşitli görevleri vardır. Makrofajlar yara debridmanı, apoptotik hücrelerin temizlenmesinin yanı sıra yara iyileşmesi prosesinde görevli hücreleri hedef alan polipeptid medyatörleri salgırlar (Polimeni, 2006). Makrofajlar aracılığıyla sinyal gönderilen lenfositlerin cevabı antijene özgüdür, antijenin tanımlanmasıyla ona özgül lenfositler lenf düğümlelerinde çoğalır ve savaşmak için bölgeye transfer edilir. Apoptotik hücrelerin temizlenmesi ile fibroblast, keratinosit farklılaşması ve anjiogenezi indükleyerek iyileşmenin proliferatif fazına geçişi destekler (Peterson, 2003; Guo, 2010).

Bu safhada yara dayanıklılığında önemli bir kazanç meydana gelmez çünkü kollajen birikimi az miktardadır. Bu safhada yarayı bir bütün halinde tutan ve az da olsa gerilme dayanıklılığı sağlayan materyal fibrindir (Peterson, 2003).

2.2.2. Proliferasyon veya fibroblastik faz (3-12 gün)

Makrofajlarca salınan büyüme faktörleri, fibroblastların bölgeye göçünü artırır, çoğalmalarını hızlandırır ve kollajen sentezlemelerini sağlar. Doku bütünlüğünün kazanılması bu fazda gerçekleşir, damarlanmanın ve epitelizasyonun yeniden oluşumu sağlanır (Şenol, 1995).

Proliferatif faz ve enflamatuar faz birbirinden net olarak ayırt edilemez ve proliferatif faz epitelyal proliferasyon ve geçici matriks üzerine epitelyal hücre göçü ile karakterizedir. Yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra, geçici ekstraselüler matriks (ECM), granülasyon dokusuyla yer değiştirmeye başlar. Kapillerlerin invazyonuyla ilişkilendirilen bu morfolojik değişim aynı zamanda hücresele seviyede kalıcı elemanlarının bölgede oluşmasıyla kendini gösterir. Bunlar, fibroblastlar ve fibroblastlar tarafından oluşturulan kollajen ve kan damarlarıdır (Singer, 1999) .

Fibroblastlar ve endotelyal hücreler en baskın hücreler olup, fibroblastlar yara iyileşmesinde görev alan en önemli mezankimal hücrelerdir ve ekstraselüler matriksin (ECM) majör komponentleri olan kollajen, glikozaminoglukan ve proteaglukan üretiminden sorumlu hücrelerdir ve kontraktil özellikleri sayesinde yara kontraksiyonunu sağlarlar (Gosain, 2004).

Ekstraselüler Matriks: ECM dinamik, sabit olarak tekrarlanan ve lokal olarak yapılan ve hücreleri ağ şeklinde saran kompleks makromoleküldür. Her dokuda belli oranda bulunur. ECM hücre adezyonu için maddeler içermesi ve büyüme faktörleri deposu olması nedeni ile hücrelerin diferansiasyonları, hareket ve çoğalmalarına uygun, içinde yaşayabilecekleri ortamı sağlar. ECM yapım ve yıkımı morfogenez, yara iyileşmesine, kronik fibrozis olayına ve tümör invazyonu ve metastazına eşlik eder.

ECM'nin üç temel bileşeni vardır;

- Gerilme ve kasılma gücünü sağlayan kollajen ve elastin gibi fibröz yapısal proteinler
- Kayganlığı ve esnekliği sağlayan proteoglikanlar ve hyalüronan gibi sulu, hidrate jeller
- Matriks elementlerine birbirine ve hücrelere bağlayan adeziv glikoproteinler

Kollajen: Fibröz yapısal proteindir ve gerilme gücünü sağlar. Yaklaşık 30 kollajen tipi saptanmıştır, bazıları spesifik hücre ve dokulara özgüdür. Kollajen üretimi, doku hasarının yaklaşık 3-5. gününde başlar ve PDGF, TGF- β , EGF, IGF1, FGF-2, gibi büyüme faktörleri tarafından stimüle edilirler. TGF- β kollajen ve diğer matriks elemanlarının yapımını uyarır, fibrotik lezyonların gelişiminde rol oynar. Kollajen sentezini etkileyen birçok büyüme faktörü ve sitokin trombosit, makrofaj, keratinosit ve fibroblastlar tarafından enflamasyon alanında salınır ve bu hücrelerden oluşan enflamatuvar odaklar genellikle kollajen sentezindeki değişikliklerin yoğunlaştığı yerlerdir (Buduneli, 2001; Kumar, 2007; Bilezikian, 2008).

Elastin: Fiziksel gerilme sonrasında dokuların gevşeyerek eski durumlarına dönmesini sağlar.

Proteoglikanlar ve hyalüronan: Bağ doku yapı ve permaabilitesini düzenlemede görevlidirler. Proteoglikanlar, kayganlık ve esneklik sağlarlar ve hücre büyüme, farklılaşmasını ve adezyonunu düzenleyen integral membran proteinleridir. Hyalüronan, su bağlama gücünden ötürü akışkan jelatin benzeri matriksi oluşturur.

Adeziv glikoproteinler ve adezyon reseptörleri: Hücre-hücre adezyonu, hücreler arası ve ECM arasında bağlantı ile ECM komponentlerinin birbiri ile bağlantılarını sağlar. Adeziv glikoproteinler fibronektin ve laminin içerir (Buduneli, 2001; Kumar, 2007).

Proliferatif fazda gerçekleşen diğer bir olayda anjiogenezdır. Doku hasarının 2. gününde endotelial hücreler, geçici ECM üzerinde, fibroblastlara benzer şekilde göç ederler. Endotelial hücrelerin hareketi, VEGF, FGF, anjiopietin ve TGF- β tarafından stimüle edilir. Ayrıca ECM'nin kendisi de endotelial hücreler için bir stimülandır. Endotelial hücreler üzerlerinde bulunan integrin reseptörler sayesinde ECM yi tanırlar. VEGF, FGF ve TGF- β bu reseptörlerin hücre yüzeyindeki sayısını artırır (Baum, 2005; Broughton, 2006).

2.2.3. Yeniden Şekillenme Fazı (6-14 gün)

İyileşmenin en uzun süren safhasıdır, haftalar hatta aylar sürebilir (Şenol, 1995). Bu süre yaranın genişliğinden ziyade yapısal özelliğine bağlı olarak değişir.

Bu aşamada yeni oluşmuş kapillerlerin sayısı azalarak yara bölgesindeki damar yoğunluğu normale döner. Gevşek fibriler yapıdan kollajen ağına doğru bir değişim olur. Kollajen de kendi içinde değişime uğrar, başlangıçtaki baskın olan Tip III kollajen yerini Tip I kollajene bırakır. Bu da dokunun gerilme direncini ve esnekliğini artırır. Ancak yara dayanıklılığı, yaralanmamış doku dayanıklılığının %80-85'ini geçemez

(Siervo, 2008) Remodelasyon fazının en kritik olaylarından biri ekstraselüler matriks remodelasyonu ile normal doku yapısına dönmesidir.

2.2.4. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Birçok faktör yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu faktörler genel olarak lokal ve sistemik faktörler olarak sınıflandırılmaktadır. Lokal faktörler yaranın karakterini direk olarak etkilerken, sistemik faktörler kişinin yara iyileşme kapasitesini etkiler (Guo, 2010; Scardina, 2013).

Yara İyileşmesini Etkileyen Lokal Faktörler

- Oksijenlenme
- Enfeksiyon
- Yabancı cisim varlığı
- Kanlanma

Yara İyileşmesini Etkileyen Genel Faktörler

- Yaş ve cinsiyet
- Cinsiyet hormonları
- Stres
- İskemi
- Diabet, fibrozis, keloid gibi hastalıklar
- Obezite
- Kemoterapi ve kortikosteroidler gibi kullanılan ilaçlar
- Alkolizm ve sigara kullanımı
- AIDS, kanser ve radyoterapi gibi bağışıklık sisteminin zayıfladığı durumlar
- Beslenme (Guo, 2010; Scardina, 2013)

2.3. Bifosfonatların Tarihçesi

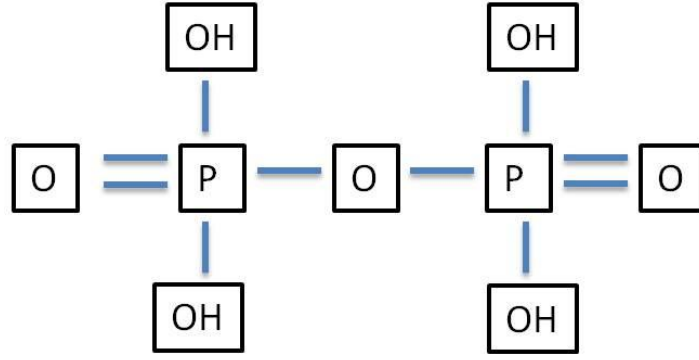
Bifosfonatlar 19. yüzyılın ortalarında Alman kimyagerler tarafından sentezlenmiştir. İlk olarak endüstride boru hatları üzerine kalsiyum karbonat çökmesini engellemek amacıyla kullanılmışlardır (Fonte, 2008).

Bifosfonatların biyolojik özellikleri 1968 'de Fleisch ve ark. tarafından rapor edilmiştir ve klinik kullanımları gündeme gelmiştir. İlk olarak böbrek taşı oluşumunu önlemek amacıyla kullanılan bifosfonatlar daha sonra diş macunlarında anti-tartar ajan olarak kullanılmışlardır (Reid, 2008; Fleisch, 1968). Osteoklastik aktiviteyi inhibe ederek sağladıkları antirezorptif etkilerinin keşfedilmesinden sonra osteoporoz, metastatik meme ve prostat kanseri, multiple myeloma, Paget hastalığı gibi birçok hastalığa bağlı oluşan komplikasyonları önlemede yaygın olarak kullanılmaya başlanılmıştır (Fonte, 2008; Fleisch, 1998).

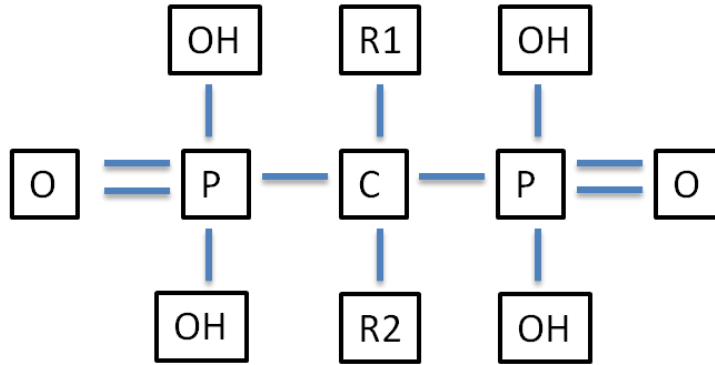
2.4. Bifosfonatların Kimyasal Yapısı

Bifosfonatlar, kemik matriksinde bol miktarda bulunan ve kemik mineralizasyonunun doğal düzenleyicisi olan inorganik pirofosfat analoglarıdır ve kimyasal yapıları benzerdir. Pirofosfonatta iki fosfatı bağlayan ajan oksijen iken, bifosfonatta iki fosfatı bağlayan merkezi eleman karbondur. Asidik ortamda kolay hidrolize olan P-O-P yapısı (Şekil 2.1) yerine daha stabil olan P-C-P yapısına eklenen R1 ve R2 yan zincirleri (Şekil 2.2) bifosfonat molekülüne karakteristik özelliklerini verir (Czuryszkiewicz 2005; Soydan, 2009).

Bu kimyasal farklılık sayesinde bifosfonatlar daha dirençli bir yapıya sahiptir ve asidik ortamlarda hidrolize olmazlar. Bifosfonatlar merkezi elemanları ile kemikteki hidroksiapatite bağlanırlar, periferel zincirleri ise değişkendir ve onlar sayesinde antirezorptif etkinliklerini gösterirler (Czuryszkiewicz, 2005).



Şekil 2.1. Temel profosfat yapısı



Şekil 2.2. Merkezi karbon atomuna bağlanan R1 ve R2 zincirlerini gösteren temel bifosfonat yapısı

R1 genellikle hidroksil grubudur ve bu grup, bileşiğe kemik mineraline ve kalsiyum kristallerine yüksek bağlanma özelliğini vererek kemik matriksine yapışmasını sağlar. R1 zincirinin antirezorptif mekanizmada etkinliği çok azdır. Antirezorptif mekanizmadan sorumlu major zincir azot grubu olan R2 zinciridir (Ashcroft, 2003).

2.5. Bifosfonatların Sınıflandırılması

Bifosfonatlar kimyasal olarak nitrojen içeren (aminobifosfonatlar) ve nitrojen içermeyenler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Nitrojen içermeyen bifosfonatlar, bifosfonatlar içerisinde en düşük etkinliğe sahiptirler.

2.5.1. Nitrojen İçermeyen Bifosfonatlar:

- Etidronate
- Tiludronate
- Clodronate

2.5.2. Nitrojen İçeren Bifosfonatlar (Aminobifosfonatlar, N-BPs)

- Alendronate
- Risedronate
- Pamidronate
- Zoledronate
- Ibandronate

Üç farklı Bifosfonat jenerasyonu bulunmaktadır;

1. Jenerasyon

- Etidronat
- Klodronat
- Tiludronat

1. Jenerasyon bifosfonatlar merkezi karbon atomuna bağlanan basit zincirlerden (medronat, klodronat, etidronat) veya klorofenil grubu içeren zincirlerden (tiludronat) oluşurlar ve en az potent olan bifosfonatlardır (Ashcroft, 2003).

2. Jenerasyon

- Alendronat
- Pamidronat

Nitrojen içeren bifosfonatlardan alendronat ve pamidronat 2. Jenerasyon bifosfonatlar olarak adlandırılırlar ve tek bir nitrojen atomu içeren basit alifatik zincirlere sahiptirler.

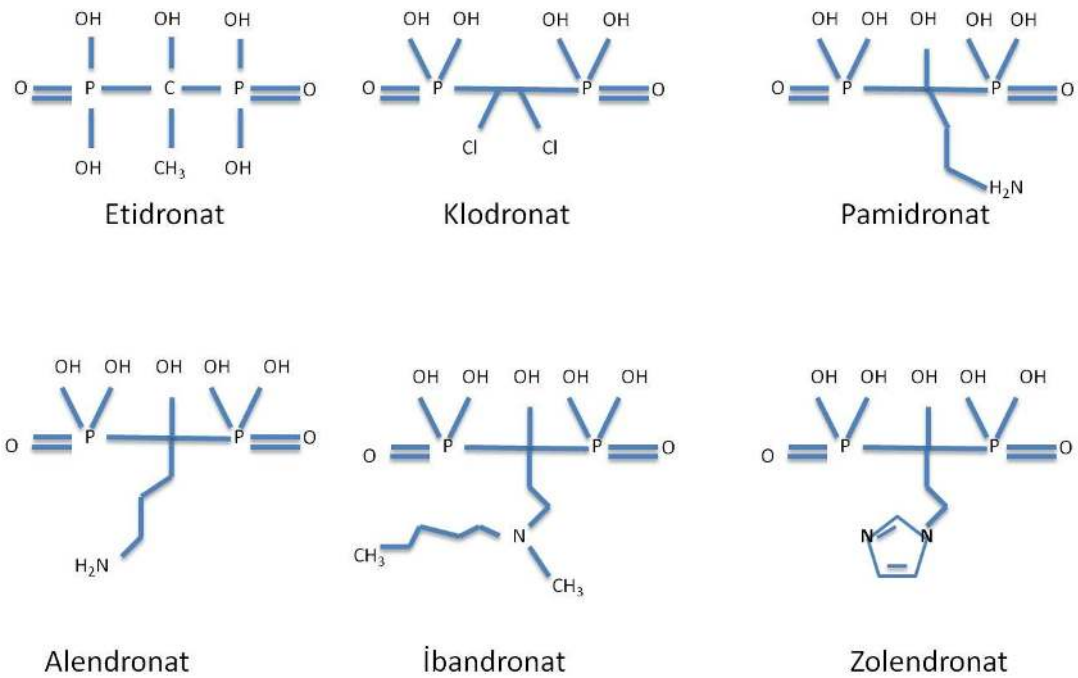
3. Jenerasyon

-Risedronat

-Zolendronat

Risedronat, ibandronat ve zolendronat ise 3. jenerasyon bifosfonatlar olarak adlandırılırlar. Risedronat heterosiklik halka yapısına, zolendronat ise 2 nitrojen atomu içeren 5 üyeli imidazol halka yapısına sahiptir ve bu yapı ilacı diğer bifosfonatlara göre daha potent bir hale getirmektedir (Ashcroft, 2003; Papapoulos, 2006).

Yaygın olarak kullanılan bifosfonatların kimyasal yapıları (Şekil 2.3);



Şekil 2.3. Günümüzde kullanımı en çok tercih edilen nitrojen içeren ve içermeyen bifosfonatların kimyasal yapıları

2.6. Bifosfonatların Etki Mekanizması

Bifosfonatların etki mekanizmaları tam olarak açıklanmamış olmasına karşın hidroksiapatit çözünmesini bloke ettikleri, kemik iliği öncül hücrelerinin osteoklastlara farklılaşmasını inhibe ettikleri, osteoklast inhibitör faktörü stimüle ettikleri, osteoklast apoptozisini ve anti-anjiojenik etki sağladıkları kesin olarak kanıtlanmıştır (Şenel, 2007; Leite, 2006; Naveau, 2006).

Bifosfonatlar merkezi ajanları ile kemikteki hidroksiapatite bağlanırlar. Antirezorptif yapıdan sorumlu esas yapı ise R2 zinciridir (Soydan, 2009; Czuryzkiewicz, 2005).

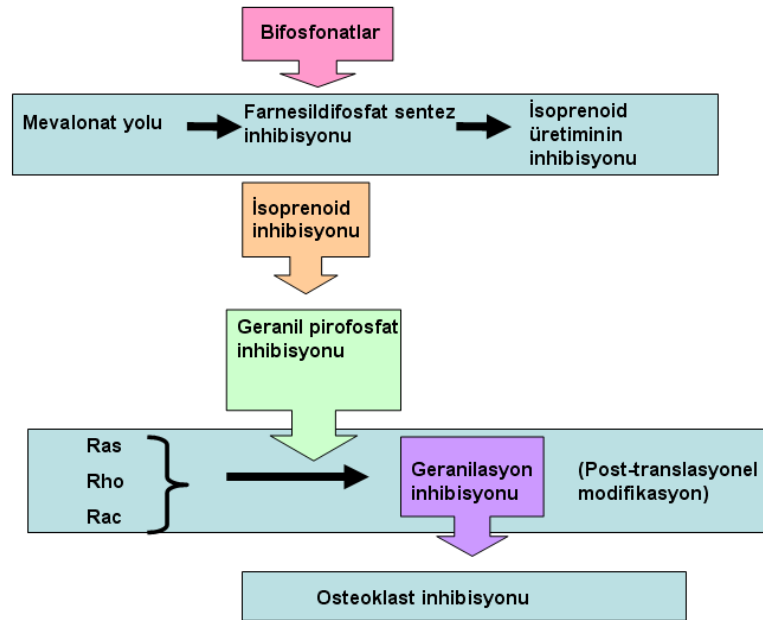
1. Jenerasyon bifosfonatlar en eski ve en zayıf bifosfonatlardır. R2 zincirleri kısadır. Kemik dokuya ulaştıkları zaman osteoklastlar tarafından yakalanarak hücre içinde Adenozin trifosfat (ATP) 'nin sitotoksik etkili analoglarına metabolize olurlar. Bu analoglar fonksiyonel olmadıklarından hücre metabolizmasını engelleyerek osteoklast apoptozuna neden olurlar. 1. jenerasyon bifosfonatlar vücutta çok hızlı metabolize edilirler (Şenel, 2007).

Nitrojen içeren bifosfonatlar, nitrojen içermeyen bifosfonatlardan 100-2000 kat daha güçlüdürler ve mevalonat biyosentetik yolu üzerinden antirezorptif etkilerini gösterirler. Kolesterol üreten mevalonat yolu üzerinde anahtar enzimlerinden biri olan farnesildifosfat sentetaz enzim aktivitesini inhibe ederler. Farnesildifosfatın inhibisyonu sonucu Guanozintrifosfat'ların translasyon sonrası lipit modifikasyonu (prenilasyon) için gereken isoprenoid yağları üretilemez ve Ras, Rho ve Rac proteinlerinin aktivasyonu gerçekleştirilemez. Bu proteinler, hücre proliferasyonu, hücre sağ kalımını ve hücre iskelet organizasyonunu düzenlerler (Şekil 2.4).

Protein prenilasyonunun inhibe olması ve Ras sinyal iletiminin buna bağlı olarak kesilmesi osteoklastlarda hücre içinde veziküler transportun bozulmasına yol açar. Bunun sonucunda da osteoklastın kemik rezorbsiyonunu oluşturabilmesi için gereken

yüzey özellikleri oluşamaz ve rezorbsiyon baskılanmış olur (Dannemann, 2006; Rogers, 2000; Gutta, 2007).

Nitrojen içermeyen bifosfonatlar ise mevalonat yoluna etki edemezler (Şenel, 2007). Osteoklast hücresi tarafından yakalandıktan sonra hücre içinde hidrolize olmayan ATP'nin sitotoksik etkili analoglarına metabolize olurlar. Bu analoglar fonksiyonel olmadıklarından hücre metabolizmasını engelleyerek osteoklast apoptozuna neden olurlar (Rogers, 2000; Gutta, 2007).



Şekil 2.4. Nitrojen içeren bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi mevalonat yolu üzerinden inhibe etme mekanizması

Bifosfonatlar özellikle aktif remodelasyon olan alanlarda kemik yüzeyinde yerleşmiş hidroksiapatit kristallerine çok kolay bir şekilde bağlanırlar ve uzunca bir süre de bağlı kalırlar, çünkü osseoz pirofosfatazlar tarafından enzimatik bozunmaya uğratılamazlar. Kemik yüzeyinde bağlı oldukları alanlardan salınarak osteoklastlar tarafından özümseirler. Olgun osteoklastlara olduğu gibi immatür, öncül osteoklast hücrelerine de etki gösterebilirler. Bu sayede kemikte rezorptif aktivite miktarında ve buna bağlı olarak yapım-yıkım oranında azalmaya neden olurlar (Naidu, 2008).

Bifosfonatların uzun süre kullanımı kemikteki remodelasyon metabolizmasını bozar ve ‘donmuş kemik’ olarak adlandırılan kemik yapının oluşmasına neden olur. Donmuş kemik yapısında kemiğin tamir mekanizması bozulur ve iskelette önce mikrolezyonlar oluşur, zaman içerisinde osteonekrozlar görülmeye başlar (Russell, 2008).

Bifosfonatlar tümör hücrelerinde apoptoza neden olurlar ve kemikteki tümör hücrelerinin intraselüler matrikse geçmesine engel olarak tümör invazyonunu engellerler (Smith, 2003; Coxon, 2004). Hastaların sağ kalım oranlarını artırır. Anti-angiogenik mekanizmaları, anti-tümoral etkilerine katkı sağlamaktadır (Font, 2008).

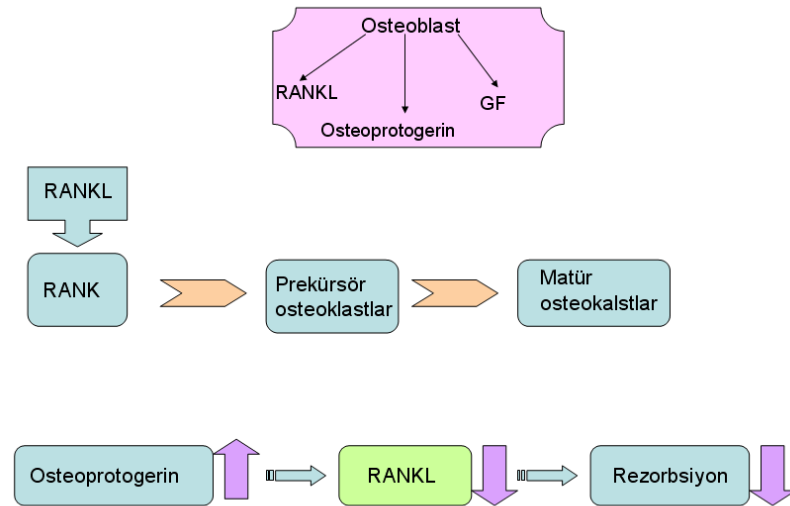
2.7. Bifosfonatların Osteoklastlar Dışında Etkilediği Diğer Hücreler

2.7.1. Osteoblast

Osteoblastlar, kemik hücresinin öncülü olan olgunlaşmamış hücrelerdir. Çoğalarak, olgunlaşmış kemik hücresine dönüşür ve kemik doku oluşum ve onarımında rol oynar. Aktif kemik oluşumunun devam ettiği tüm kemik yüzeylerinde yan yana dizilidirler ve matriks sentezinin başlaması ile kübik veya prizmatik şekilli hücrelere dönüşürler (Kierszenbaum 2006).

Bifosfonatların osteoblastlara olan etkisi osteoklastlara olan etkisi kadar iyi açıklanamamıştır. Aminobifosfonatlar terapötik dozlarda osteoblast farklılaşmasını ve kemik depozisyonunu uyarırlar. Osteoblastlar reseptör aktivatör nükleer faktör Kb ligand (RANKL), Transforming Growth Factor β -1 (TGF β -1) ve Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) ailesinden osteoprotegerin salgılayarak kemikteki yapım-yıkımı düzenlerler. Osteoblastların salgıladığı RANKL, osteoklastların prekürsör hücrelerden matür hücrelere diferansiasyonu için gereken stimülasyonu sağlar. RANKL prekürsör osteoklastlar üzerindeki RANK reseptörlerine RANK'ın bağlanmasını sağlar ve farklılaşma gerçekleşir (Şekil 2.5). Bu sayede kemikte rezorptif aktivite başlar. Osteoprotegerin ise RANKL antagonistidir ve rezorpsiyonu durdurmak için yine

osteoblastlar tarafından salgılanır. Kemikte rezorpsiyon olması osteoblastlardan büyüme faktörü salınımını uyarır. Yüksek dozlarda ise bifosfonatlar osteoblastlara sitotoksik etki göstererek apoptozislerine neden olurlar .(Naidu, 2008; Garcia-Moreno, 1998)



Şekil 2.5. Osteoblastların salgıladığı ajanların rezorpsiyona olan etkisi

2.7.2. Endotel

Dolaşım sistemindeki tüm yapıların i yüzünü örten çok ince, kaldırım taşı gibi dizilmiş hücre dizisidir. Bifosfonatlar endotelial hücre proliferasyonu, adezyonu ve migrasyonunu bozar ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) inhibisyonuna neden olur (Naidu, 2008). VEGF inhibisyonu yapması ile bifosfonatlar antianjiyogenik etki oluşturmaktadırlar (Maahs, 2011).

2.7.3. Oral Epitel Hücreleri

Epitel hücreleri, ektoderm, endoderm ve mezoderm olmak üzere gelişmekte olan embriyonun her üç germinatif tabakasından köken alırlar ve epitel doku, organizmada yaygın bir dağılış gösterir (Günhan, 2003).

Oral mukozanın epiteli keratinizedir ve bazal membran aracılığı ile altındaki bağ dokusuna bağlıdır. Oral mukoza genelde çok katlı yassı epitel ve bağ dokusundan oluşan lamina propria olarak iki tabakadan oluşur. Lamina proprianın altında damarlar, yağ dokusu, tükürük bezleri bulunur ve submukoza olarak isimlendirilir (Odell, 1998).

Bifosfonatlar kemikte yeterli konsantrasyona ulaştıkları zaman kemiğe komşu, kemik yüzeyini örten yumuşak dokuda toksik etki oluştururlar. Bifosfonatların mevalonat yolundaki farnesil difosfat sentetaz enzimini inhibe etmeleri nedeniyle epitelde hücre proliferasyonu da inhibe edilmiş olur. Buna bağlı olarak oral kavitede mukoza bütünlüğünün bozulmasına neden olan cerrahi girişim ya da dental travma sonrasında yara iyileşmesi gecikir.

Scheper ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda bifosfonatların keratinositlerde apoptoza neden olduğunu rapor etmişlerdir (Scheper, 2009). Landesberg ve ark. ise bifosfonatların keratinositlerde apoptoza neden olmadan hücre proliferasyonunda yavaşlamaya neden olduğunu bildirmişlerdir (Landesberg, 2008).

Aminobifosfonatlar, mürin oral keratinositlerin apoptozisine neden olmadan hücresel proliferasyonlarını ve yara iyileşmesini inhibe etmektedir (Landesberg, 2008). Keratinosit proliferasyonu olmadan oral mukozada yara iyileşmesi bozulur.

Aminobifosfonatların oral mukoza fibroblast hücrelerinde apoptoza neden olduğu *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (Sheper, 2009).

Bifosfonatların oral epitelyal hücreler ve fibroblastlarda proliferasyon, apoptoz ve göç kapasitelerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada, zometanın hem oral epitel hücrelerinde hem de fibroblastlarda proliferasyonu inhibe ettiği ve oral epitel hücrelerine kıyasla fibroblastlarda apoptoz oranının daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmada zometanın oral bifosfonatlarda kollajen sentezi ve depolanmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (Ravosa, 2011).

2.8. Bifosfonatların Endikasyonları

Oral bifosfonatlar, kadınlarda postmenapozal osteoporozun tedavisinde veya profilaksisinde, osteoporoza bağılı oluşan kemik kırıklarını önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu komplikasyonları %50 'ye kadar azalttığı rapor edilmektedir (Liebermann, 1994). Daha az yaygın olarak Paget hastalığı, fibröz displazi, heterotropik ossifikasyonlar, osteogenezis imperfekta gibi kemikle ilişkili hastalıkların tedavisinde tercih edilmektedir. Bu ajanlar ayrıca kortikosteroid kullanımına bağılı olarak kemikte oluşan kitlesel azalmayı engellemektedir (Ruggiero, 2009; Fleisher, 2010).

Anti-tümöral etkileri ile kemikte kontrolsüzce yıkıma neden olan tümör hücrelerini inhibe eden bifosfonatlar bu kanserlere bağılı metastazların tedavisinde standart haline gelmiştir (Lipton, 2000). İntravenöz bifosfonatlar kemik dokuya metastaz yapan kanser türlerinde görülen, malignensiye bağılı hiperkalsemi, patolojik kırıklar, spinal kord sıkışması, kemik ağrısı gibi kemik komplikasyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ruggiero, 2009; Fleisher, 2010).

Multiple myeloma'da osteoklastik aktivitenin stimule olması sonucu oluşan iskelet komplikasyonlarını önlemeye yönelik kullanılmaktadır (Shipman, 1998).

2.9. Bifosfonatların Kontrendikasyonları

Adölesanlarda ciddi beyin yaralanmalarından sonra heterotropik ossifikasyon oluşmasını önlemek amacıyla bifosfonat kullanımına bağılı Raşidik Sendrom oluştuğu rapor edilmiştir. Bu yaş grubunda kullanımı önlenmelidir (Silverman, 1994)

FDA tarafından henüz tanımlanmamış olmasına karşın özellikle kadınlarda %1-3 atrial fibrilasyon riski oluşturdukları düşünölmektedir. Kardiyolojik problemi olan hastalarda dikkat edilmelidir (Pazianas, 2011).

Özefagus darlığı ve akalazya gibi özefagal boşalmayı geciktiren özefagus anormalliklerinde uygulanmamalıdır. En az 30 dakika dik oturamayan ya da ayakta duramayan hastalarda kontrendikedir. Hipokalsemi de kontrendikedir (Shafer, 2008).

Ciddi böbrek yetmezliği olan hastalarda kreatinin klirensi nedeniyle kullanılmamalıdır (Pazianas, 2011).

Yüksek doz bifosfonat kullanımında plasenta geçiş ve fetus üzerinde olumsuz etkiler söz konusudur, bu nedenle hamilelerde kullanılmamaktadır. Anne sütüne geçip geçmediği kesin olarak bilinmemekle birlikte emzirmekte olan kadınlarda önerilmemektedir. Annenin ilacı kullanmasının önem derecesi göz önüne alınarak, ilacın kullanımına ara verilmesi ya da bebeğin anne sütüyle beslenmesine son verilmesi düşünülmelidir (Fleisch, 2000; Soydan, 2009).

2.10. Bifosfonatların Yan Etkileri

Bifosfonat kullanan hastalarda bulantı, kusma, dispepsi, mide ağrısı, diyare ve gastroözefagal reflü ve ülserler gibi gastrointestinal yan etkiler görülmektedir (Cryer, 2002).

İntravenöz bifosfonatlar %20 hastada grip benzeri halsizlik, akut ateş, kemik ağrısı, renal toksisite veya akut böbrek yetmezliği, geçici hipokalsemi ve IL-6, TNF α , CRP ve elastaz salınımına neden olmaktadır (Reid, 2008, Katz, 2005). Bifosfonat kullananlarda böbrek fonksiyonlarının bozulmasının sonucu olarak sklerit, orbital myozit ve üveit gibi oftalmolojik yan etkiler de bildirilmiştir. Bu nedenle böbrek yetmezliği olan hastalar da kreatinin klirensi, serum elektrolit düzeyi ve albuminüri değerleri takip edilmelidir. Bu hastalarda optimal böbrek toleransına sahip bifosfonatların tercih edilmesi önerilmektedir (Banzragch, 2010).

Başlangıçta ilacın kullanımına bağlı olarak oluşan yan etkiler bu şekilde bilinirken, ilk kez 2003 yılında maksillofasiyal bölgeye özgü bir komplikasyon olan

bifosfanatlar ile ilişkili çene kemiği nekrozunu (BRONJ: *Bisphosphonate Related Osteonecrosis of Jaws*) tanımlanmıştır. BRONJ, her geçen gün artan vaka sayısı ile nadir görülen ancak tedavisi güç olan ciddi bir komplikasyon olarak dikkat çekmektedir (Marx, 2005).

2.11. BRONJ

Bifosfonata bağlı çene kemiği nekrozu (BRONJ) ilk kez 2003 yılında Marx ve ark. tarafından yayınlanan raporda tanımlanmıştır. Bu tarihten itibaren giderek artan vaka raporları ilacın kronik kullanımında oluşan kümülatif etkisinin nekroz oluşumunda etkili olduğunu göstermiştir (Marx, 2003).

AAOMS (American Association of Oral and Maxillofacial Surgens), BRONJ’u başboyun bölgesinde radyoterapi hikayesi olmayan, bifosfonat tedavisi görmüş yada görmekte olan hastada maksillofasial bölgede, bir doktor tarafından teşhis edildikten sonra 8 hafta veya daha uzun süredir iyileşmeyen ekspoze kemik varlığı olarak tanımlamaktadır (Ruggiero, 2009).

2.11.1. Patofizyolojisi

BRONJ gelişiminin patogenezi tam olarak açıklanamamıştır ve konuyu tek başına açıklayabilen bir görüş bulunmamaktadır. Kemik remodelinginin bozulması, daha önceden var olan dental problemler, lokal travma, kanser tedavileri, azalmış anjiyogenez ve bozulmuş kemik mikroçerçevesinin yol açtığı enfeksiyon gibi multifaktöriyel etyoloji bir çok çalışma tarafından desteklenmektedir (Migliorati, 2005). BRONJ’un patogenizini anlamada en önemli nokta patolojinin çıkış noktasının kemik mi yumuşak doku mu olduğudur.

Osteokemonekrozun Patogenezinine Yönelik Teoriler:

1. Kemik doku: Bifosfonatların kemik hücreleri olan osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler üzerine olan fizyolojik etkileri kapsamlı olarak araştırılmaktadır. Bifosfonatların başlıca hedef hücreleri osteoklastlardır (Rodan, 1996). Özellikle intraselüler olayları etkileyerek osteoklastların uyardığı kemik remodelingini engellemektedir. Bifosfonatların osteositler üzerine olan etkilerine dair henüz oldukça az bilgi mevcut olup, hücre canlılığı ve bütünlüğüne ilişkin hem direkt hem de indirekt etkilerinin bulunduğu bilinmektedir (Allen, 2008; Plotkin, 2005).

Bifosfonatların kemik dokuda birikerek uzun yıllar kalabildiği bilinmektedir. Son zamanlarda da osteosit lakünleri içinde biriktiği bildirilmiştir ve zaman içinde yüksek doz bifosfonat ile karşı karşıya kalan osteositlerin hücre canlılıklarının etkilendiği düşünülmektedir (Roelofs, 2008).

Osteoblastlar bifosfonatlardan en az etkilenen kemik doku hücreleri olarak görülmektedir. Bifosfonat varlığında kemik formasyonunda meydana gelen azalma, osteoklast inhibisyonuna bağlı kemik remodelinginin baskılanması nedeniyle kemik rezorpsiyonu ve formasyonu arasındaki ilişkinin bozulmasının sonucudur (Boyce, 1995; Eriksen, 2002).

Kemik apozisyonu ve rezorpsiyonu normal kemik homeostazisinin sağlanabilmesinde önemli rol almaktadır. Osteoklastik aktivite başladığı zaman, oluşan yeni kemik matriksinin matürasyonu için sitokinler ve büyüme faktörleri salgılanır. Kemikte rezorpsiyonun azalmasıyla birlikte apozisyonunda azalmaya başlar, kemik tamir metabolizması, kemik büyüme-gelişme kapasitesi ve kemik kalitesi bozulur. Travma, periodontal hastalık, periradiküler lezyon ya da dental işleme bağlı olarak nekroz olduğu takdirde osteoklastlar nekrotik kemiği ortadan kaldırmak için gerekli aktivasyonu gösteremezler. Nekrotik doku hacmi yeterli seviyeye ulaştığı zaman lokal değişiklikler başlar (Montebugnolo, 2007).

Bifosfonatlar düşük dozlarda kullanıldığı zaman mevalonat yolu üzerinden osteoklastların rezorptif aktivitesini inhibe ederler fakat osteoblastları stimule ederler ve osteoblastların RANKL üreterek uyardığı rezorpsiyonu engellemezler. Bu sayede kemik metabolizmasına daha az sitotoksik etki oluştururlar. Bifosfonatların yüksek dozda kullanılması hem osteoblastlar hem de osteoklastlarda hücre içi Ca^{+} birikmesine neden olarak sitotoksik etki oluşturur. Buna bağlı olarak kemik turn-overı bozulur ve gereken remodelasyon gerçekleşemez (Naidu, 2008). Çene kemiklerinin remodeling kapasitesi uzun kemiklere oranla oldukça yüksektir ve remodeling baskılanmasına bağlı BRONJ gelişimi hipotezi patogenezin açıklanmasında oldukça kabul görmektedir (Allen, 2009a).

AAOMS tarafından belirlenen kemik turn overı ile ilişkili serum işaretleyicileri kalsitonin, TSH, T4, T3, N-Telopeptit, C-Telopeptit, 25 Hidroksi vitamin D, kemiğe özgü alkalin fosfoataz, osteokalsin ve PTH'dur (Lehrer, 2008). Bu işaretleyiciler kemikteki osteopeniyi değerlendirmek için kullanılırlar. Bifosfonat kullanan hastalarda kemikte remodelasyon ve rezorptif aktiviteyle ilgili değerler önemli ölçüde düşmektedir (Lehrer, 2008).

2. Yumuşak doku: Kemikte birikerek yüksek konsantrasyona ulaşan bifosfonatların oral epitel hücreleri üzerine direk toksik etkisi bulunmaktadır ve dental işlemler veya herhangi bir travma sonrası normal yumuşak doku iyileşmesini bozmaktadır (Reid, 2007; Reid, 2009). Alveol kemiğinde biriken bifosfonatın oral mukozada sitotoksik etki oluşturmaya bağlı olarak mukoza bütünlüğünün bozulması halinde yara iyileşmesinin gerçekleşmediği ve buna bağlı olarak açıkta kalan çene kemiklerinde sekonder infeksiyonların geliştiği, ilerleyen dönemde de ekspozite osteonekroza dönüştüğü düşünülmektedir (Landesberg, 2008; Reid, 2007).

3. Antianjiyogenezis: Bifosfonatlar kanser hastalarında antianjiyogenetik özellikleri sayesinde tümör hücresinin proliferasyonunu baskılayarak tümöral hücrelerin yayılmasını önlemede kullanılırlar (Santini, 2003). Kemik remodelasyonu ile anjiyogenez arasında oldukça yakın ilişki vardır. Bifosfonatların kemikte remodelasyonu baskılaması kemikte anjiyogenezin bozulmasına neden olmaktadır.

Vaskülarizasyonun bozulması sonucu en ufak travmayı takiben yara iyileşmesinde aksaklık meydana gelmektedir (Santini, 2006).

4. İnfeksiyon: BRONJ lezyonlarında çok sayıda bakteri rapor edilmiş olup, aktinomiçes en yüksek oranda izole edilen mikroorganizmadır (Hansen, 2006; Hansen, 2007; Hellstein, 2005). Mukozanın bütünlüğünün bozulduğu durumlarda aktinomiçesler kemik üzerinde biyofilm tabaka oluşturur ve bu tabakaya başka mikroorganizmaların da tutunması sonucu heterojenik bir floraya neden olurlar. Bunun sonucunda da kemikte osteomiyelit benzeri klinik bir tabloyla enfeksiyona bağlı nekroz oluşturduğu düşünülmektedir (Yeung, 1999). BRONJ’lu bir çok hastada bu mikroorganizmaların izole edilmesine rağmen, enfeksiyonun BRONJ oluşumunda primer etken mi yoksa sekonder bir olay mı olduğuna dair kesin bir kanıt bulunmamaktadır (Allen, 2009a).

5. Genetik Teori: Lehrer ve arkadaşları bifosfonatlarla ilişkili çene kemiklerinde oluşan osteonekrozun genetik mutasyona bağlı olarak hassas bireylerde olduğu hipotezini savunmuşlardır. Matriks metalloproteinaz ailesinden MMP2 genindeki mutasyonun bifosfonatın yarattığı osteonekrozla ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir. MMP2 genindeki mutasyonlar daha önce kemik matriksindeki bozukluklarla birlikte görülen Winchester Sendromu gibi sendromlarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca zolendronat ve alendronatın neden olduğu atrial fibrilasyonla vücutta ilişkili tek genin MMP2 olduğu belirlenmiştir (Lehrer, 2009).

6. Diğer Teoriler: Diabet gibi eş zamanlı olarak bulunan hastalıklar (Khamaisi, 2007), obezite ve sigara gibi yaşam tarzı ile ilişkili faktörler (Wessel, 2008), diş çekimi gibi müdahaleler (Mavrokokki, 2007), kortikosteroidler gibi eş zamanlı kullanılan ilaçlar (AAOMS, 2007) BRONJ ile ilişkilendirilen diğer etkenlerdir.

2.11.2. Risk faktörleri

AAOMS, BRONJ gelişimine neden olan risk faktörlerini; ilaç ile ilişkili, lokal, demografik, sistemik ve genetik faktörler olarak sınıflandırmıştır (Ruggiero, 2009).

İlaç ile ilişkili risk faktörleri kullanılan bifosfonatın tedavi süresi, dozu ve potentlik derecesi ile ilişkilidir (Allen, 2009a). Zoledronatın pamidronattan daha potent olduğu ve i.v. kullanımın oral kullanımdan daha yüksek ilaç birikimine neden olduğu bilinmektedir. BRONJ gelişimi oral bifosfonatlarda sürekli kullanımın üçüncü yılından itibaren görülmeye başlarken, i.v. kullanımlarda 6 aydan daha kısa sürelerde bile görülebilmektedir (Durie, 2005).

İ.v BPs kullanımı BRONJ oluşumunda en önemli risk faktörüdür. Oral bifosfonat tedavisi altındaki hastalar intravenöz bifosfonat kullanmakta olan hastalara kıyasla BRONJ için oldukça düşük risk taşımaktadırlar (Ruggiero, 2009).

Dentoalveolar cerrahi işlemler, lokal anatomi ve eşlik eden oral problemler lokal risk faktörlerini oluşturmaktadır. Diş çekimi, dental implant uygulaması, periapikal cerrahi ve periodontal cerrahi işlemler gibi invaziv girişimlerin BRONJ riskini 5-21 kat artırttığı bildirilmiştir (Migliorati, 2005).

Maksilla ve mandibulada mevcut torus, kemik ekzositozları, keskin mylohyoid kenarlar gibi üzerindeki mukozanın incelendiği bölgelerde BRONJ ile daha sık karşılaşıldığı rapor edilmiştir (Almazrooa, 2009). Doku ile uyumsuz protez kullanan hastalarda, periapikal veya periodontal abse gibi enfeksiyonların varlığında da BRONJ riskinin yedi kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Silverman, 2009).

Demografik faktörler olarak yaş, ırk ve kanser diagnozu bulunması BRONJ gelişimi açısından risk faktörleri arasında belirtilmiştir (McLeod, 2007). Hoff ve ark. i.v. bifosfonat tedavisi gören hastalarda yaptıkları çalışmalarda artan yaş ile BRONJ arasında ilişki olduğunu tespit etmişlerdir (Hoff ve ark., 2008). Bardos ve ark. beyaz ırktan olan hastaların siyah ırktan olanlara göre daha yüksek BRONJ riskiyle karşı karşıya olduklarını bildirmişlerdir (Bardos ve ark., 2006). Metastatik bir odak varlığı ile BRONJ arasında anlamlıya yakın değerler olduğu bildirilmiştir (Wessel, 2008). Bu durum BRONJ'un ayırıcı tanısında çene kemiği metastazlarının göz önünde bulundurulması gerekliliğini ortaya koymaktadır. BRONJ olduğu düşünülen bir tablo

kemik metastazını perdeleyerek tedavinin prognozunu olumsuz yönde etkileyebilir ya da hem osteonekroz hem de metastaz birlikte görülebilir (Bedogni, 2007).

Genetik düzensizliklerin BRONJ gelişiminde önemli risk faktörlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Multiple myeloma hastalarında Sitokrom P450-2C genindeki tek nükleotid polimorfizminin (CYP2C8), i.v. bifosfonat kullanımında Bronj riskini yükselttiği bildirilmiştir (Sarasquete, 2008). Katz ve ark. multiple myeloma hastalarında kollajen tip 1, alfa 1(COL1A1), Matriks metalloproteinaz 2(MMP 2), Reseptör aktivatör nükleer faktör K B (RANK), Osteoprotegerin (OPG), ve Osteopontin (OPN)'deki tek nükleotid polimorfizmlerinin de BRONJ riskini yükselttiğini bildirmişlerdir (Katz ve ark., 2011).

2.11.3. Ayırıcı Tanılar

BRONJ'un ayırıcı tanılarında periodontal hastalıklar, gingivitis, mukozitis, enfeksiyöz osteomyelit, temporomandibuler eklem hastalıkları, çürüklerin oluşturduğu periapikal patolojiler, osteoradyonekroz, nevralji ile görülen kavitasyonel osteonekroz ve kemik tümörleri veya metastazları göz önünde bulundurulmalıdır (Van Den Wyngaert, 2007).

2.11.4. BRONJ Evreleri ve Klinik Bulguları:

AAOMS, bifosfonata bağlı çene kemiklerin osteonekrozunun kesin tanısı için 3 karakteristik özellik belirlemiştir;

1. Devam eden ya da geçmişte uygulanmış bifosfonat terapisi
2. Baş-boyun bölgesinde radyoterapi hikayesi olmaması
3. Maksilla veya mandibulada ekspozite nekrotik kemiğin en az 8 haftadır var olması

Günümüzde en yaygın kullanılan BRONJ evreleme protokolü AAOMS tarafından 2009 yılında yayınlanmıştır. Bu rapora göre bifosfonat kullanmakta olan hastalar BRONJ gelişim riski ve BRONJ'un şiddetine göre evrelenmiş ve bu evrelere göre tedavi protokolleri belirtilmiştir (Ruggiero 2009). Bu sisteme göre 5 grup tanımlanmıştır;

Risk grubu: Bifosfonat tedavisine başlayacak veya başlamış olup BRONJ bulgusu mevcut olmayan hastalar bu grupta yer almaktadır.

Evre 0: Oral yada i.v. bifosfonat tedavisine başlamış olup klinik olarak teşhis edilen nekrotik kemik alanı bulunmadan ve odontojenik bir neden olmadan dental ağrı, TME bölgesine yansıyan künt ağrı, sinüs ağrısı gibi nonspesifik semptomların görüldüğü gruptur. Kronik periodontal problem olmaksızın diş kayıpları görülebilir ve pulpal bir neden olmadan periapikal ya da periodontal fistüller görülebilir.

Evre 1: Bu gruptaki hastalarda ekspozite kemik mevcuttur ancak herhangi bir enfeksiyon bulgusu mevcut değildir.

Evre 2: Ekspozite kemik ile birlikte ağrı ve enfeksiyon bulguları da mevcuttur.

Evre 3: Ekspozite ve nekrotik kemiğin bulunduğu tabloya aşağıdaki bulgulardan bir yada birkaçının eşlik ettiği gruptur;

- Ekstraoral fistül
- Oroantral yada oronazal açıklık
- Ekspozite alanın alveol kemiğini aştığı durumlar (zigomatik kemik, mandibula inferior border gibi)
- Osteolizis varlığı
- Patolojik fraktür

Bifosfonata bağlı oluşan osteonekrozun tipik klinik görüntüsünde inflame olmuş dişeti veya ağız mukozası ile çevrili, devital, ekspoze kemik yüzeyi vardır (Resim 2.1) (Montebugno 2007). Vakaların %82'sinde çene kemiğinde spontan ağrı ilk bulgudur (Limonta, 2007).



Resim 2.1. BRONJ'un klinik görünümü-ekspoze nekrotik kemik.

Bifosfonata bağlı oluşan osteonekrozun ağızda birçok patoloji ile karışabilen spesifik olmayan bulguları vardır (Bianchi, 2007; Naveau, 2006). Bunlar;

- Dişlerde hassasiyet
- Mukozada lserasyon
- Yumuşak dokuda şişlik
- Spontan olabileceği gibi özellikle çiğnerken veya diş fırçalarken görülen şiddetli ağrı
- Maksiller sinüs bölgesi tutulumunda sinüzit, oroantral fistül, mukoperiosteal genişleme, Schneider müköz mebranında yeni kemik formasyonu görülebilir
- İnfiamasyonun tüm bulguları
- İltihabik drenaj
- Akut abse
- Alveol kemikte ekpoz

- Osteomiyelit
- Trismus
- Halitozis
- Deride fistülizasyon
- Parestezi/Anestezi
- Aktinomiçes infeksiyonu

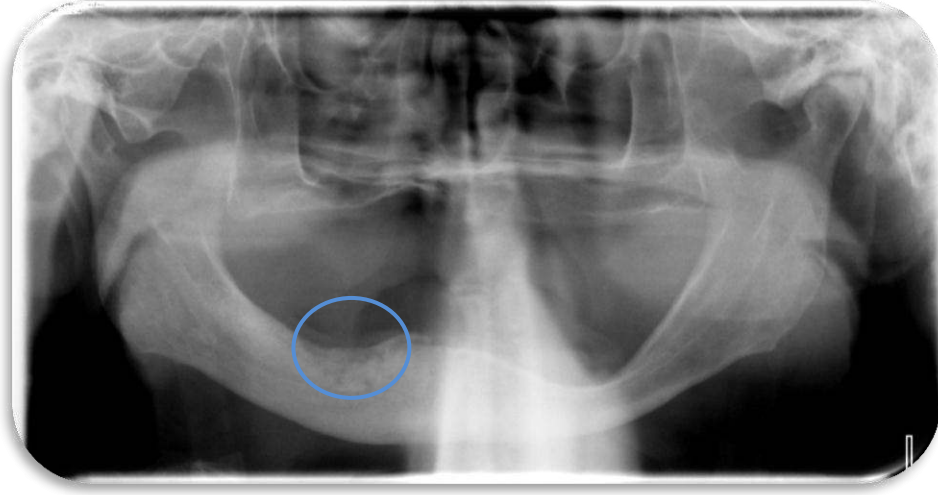
Bifosfonata bağlı oluşan ostekemonekroz semptomatik olabileceği gibi aylarca kemikte hiçbir ekspoz oluşturmada asemptomatik olarak da devam edebilir. Osteonekroz dental ya da periodontal bir rahatsızlığın bulgularıyla kendini belli edebilir. Bu nedenle bifosfonat kullandığı bilinen hastada rutin dental tedavi yapıldığı takdirde semptomlarda düzelme olmuyorsa osteokemonekrozdan şüphe edilmelidir (Expert panel recommendations of American Dental Association, 2008).

2.11.5. BRONJ'un Radyolojik Bulguları

BRONJ'un radyolojik bulguları spesifik değildir ve osteomiyelit, osteoradyonekroz, kanser metastazı ve Paget's hastalığı gibi durumlarda da görülebilecek semptomlardır (Arce, 2009). BRONJ tespitinde radyolojik olarak en sık başvuru görüntüleme yöntemleri periapikal ve panoramik grafilerdir. Osteonekrozun başlangıç fazlarında periodontal infeksiyonlarda olduğu gibi periodontal aralıkta genişleme görülür. Lezyon ilerledikçe geniş radyolüsent alanlar görülür ve bazen klinik çene kemiği fraktürleri ile sonuçlanabilir. Olası bulgular;

- Trabeküler yapının genişlik, mineral densitesi, lakünleri, trabekül formasyonunda değişiklikler meydana gelir (Resim 2.1) .
- Kortikal kemikte erozyon oluşur.
- Osteosklerozlar oluşur.
- Periosteal yeni kemik oluşumu izlenir.

- Küçük (15mm'den küçük) veya büyük (15mm'den büyük) sekestreler gözlenir (Bedogni, 2008).



Resim 2.2. Osteokemonekroz nedeniyle trabekülasyonu bozulmuş alveolar kemiğin radyografik görüntüsü

Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile kemik iliği, nörovasküler yapılar ve lenfadenopati ile birlikte enflamasyona bağlı değişimler takip edilir. Kemik iliğindeki ödem gözlenebilmektedir ve kemik iliğinde ödem kemikteki iskemi ve nekrozun erken bulgusudur (Ruggiero, 2007).

Radyonükleotid kemik taramaları kemikteki vaskülarizasyon değişikliklerini en iyi görüntüleyen tekniktir. Bu taramalar osteokemonekrozun erken tanısında yardımcı olabilir (Ruggiero, 2007).

Sintigrafi kemik yoğunluğundaki değişiklikleri göstererek nekroz başlangıcı, nekroza yatkın kemik metabolizmasında bozulmaların olduğu bölgeleri veya nekrozun subklinik safhalarını göstererek bifosfonatı düzenli kullanan hastalarda osteokemonekrozlar oluşmadan önce %66 gibi bir oranla erken tanıya yardımcı olabilmektedir (O'Ryan, 2009).

2.11.6. BRONJ'un Histolojik Bulguları

Kemik iliğinde fibrozisle birlikte akut-kronik enflamatuvar hücreler, plazma hücreleri ve çeşitli fungal-bakteriyel mikroorganizma kolonizasyonları BRONJ'un histolojik incelemesinde görülmektedir.

Mikrobiyolojik incelemede primer olarak aktinomiçesler olmak üzere, enterokoklar, kandida albicans, hemofilus influenza, alfa hemolitik streptokoklar, laktobasiller, enterobakterler ve klebsiella pnömonia türleri izole edilmiştir (Dannemann, 2006).

BRONJ'un infeksiyon kısmında baskın olarak rol aldığı bilinen aktinomiçesler normal ağız florasının elemanı olarak oral mukoza yüzeyinde yer alırlar fakat mukoza bütünlüğünün bozulduğu durumlarda kemiğe invaze olarak patojen hale gelirler. Uzun süren kronik enflamasyon sonucu kemikte destrüksiyon ve osteolizise neden olurlar (Kaplan, 2009).

2.11.7. BRONJ'un Hematolojik Bulguları

Hematolojik bulgular açısından günümüzde en çok kabul edilen bulgu serum C terminal telopeptid (CTX) düzeyinin değerlendirilmesidir (Marx, 2007). Organik kemik matriksinin %90'ından fazlası kemik içinde sentezlenen tip 1 kollajenden oluşur. Normal kemik metabolizması sırasında, tip 1 kollajen parçalanır ve küçük fragmanları seruma geçip idrar ile atılır. Fizyolojik veya patolojik olarak yükselmiş kemik metabolizmasında tip 1 kollajenin parçalanması artar ve kollajen fragmanlarının kandaki seviyesi de yükselir. Bu kollajen tip 1 fragmanları özellikle C terminal telopeptidlerdir (CTX). Serum CTX düzeyi kemik turnoverının güçlü bir belirteçidir. Bifosfonat kullanımı gibi kemik rezorpsiyonunun inhibe edildiği durumlarda serum CTX düzeyi çok düşük seviyelere inebilir (Lehrer, 2008).

Marx, serum CTX düzeyinin 100 pg/ml'nin altında olduğu durumlarda BRONJ riskinin yüksek, 100-150 pg/ml olduğunda orta ve 150 pg/ml seviyesinde iken düşük olduğunu belirtmiştir (Vescovi, 2010).

Kronik bifosfonat kullanımı mevcut olan hastalarda dentoalveoler cerrahi girişimlerden önce serum CTX seviyesinin tespiti hastanın BRONJ riskini belirlemek açısından önemlidir.

2.11.8. BRONJ Tedavi Seçenekleri

BRONJ vakalarının tedavisinde yayınlanmış olan pek çok tedavi alternatifi bulunmaktadır ancak bu yöntemlerin hiçbiri kesin tedavi şekli olarak kabul edilmemektedir. Bu vakalarda izlenen protokol BRONJ'un tedavisinden daha çok tablonun ilerlemesini engellemeye yönelik girişimleri içermektedir.

İ.v. bifosfonat tedavisine başlayacak olan hastaların ilaç kullanımına başlamadan önce detaylı ağız muayeneleri yapılarak, bütün invaziv dental girişimleri tamamlanmalı ve optimal periodontal sağlık sağlanmalıdır (Ruggiero, 2009).

AAOMS'un 2009 yılında yayınladığı bildiriye göre (Ruggiero, 2009);

Risk Grubu: Nekrotik kemik mevcut olmayan risk grubu hastalarda BRONJ gelişmesini önlemek için hasta eğitimi yeterlidir.

Evre-0: Klinik olarak nekrotik kemik görülmeyen ancak nonspesifik semptomların bulunduğu bu hastalara ağrı kesiciler ve antibiyotikler gibi semptomatik tedaviler uygundur.

Evre-1: Ekspozite nekrotik kemiğin görüldüğü asemptomatik bu hastalarda antibakteriyel ağız gargaraları, hastanın eğitimi ve düzenli takibi uygundur.

Evre-2: Ekspoze nekrotik kemik ve çevresinde eritem ve ağrı mevcut olan bu evrede antimikrobiyal gargara, oral antibiyotik, ağrı kesiciler ve yumuşak doku irritasyonunu engellemek için nekroze kemiğin yüzeyel debridmanı uygundur.

Evre 3: Ağrı ve enfeksiyonun mevcut olduğu, patolojik kırıklara veya ekstraoral fistüllere sebep olabilen ekspoze kemik varlığında ağrı ve enfeksiyonun kontrolü, antibiyotik tedavisi, debridman ve rezeksiyon önerilmektedir.

Evre-2 ve evre-3 vakalarda önerilen tedaviler tartışmalıdır. Debridman, rezeksiyon, antibiyotik tedavisi, ağrı ve enfeksiyonun kontrolü hasta kooperasyonunun zor olduğu ve hastaların yaşam kalitesinin düşmesine sebep olan ve maliyeti yüksek olan tedavilerdir.

Minimal invaziv tedavi alternatifleri hastaların yaşam kalitesini yükseltmeyi amaçlamaktadır. Denenmiş olan yöntemlerin hiç biri BRONJ tedavisinde yeterli etkinliği göstermemiştir ve hasta sayısının artışına rağmen etkin bir tedavi protokolünün bulunmayışı yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Trombositten zengin plazma (PRP) (Lee, 2007), hiperbarik oksijen (HBO) (Friberger, 2007), lazer (Rugani, 2010) ve pentoksifilin-alfa tokoferol (Delanian, 2005) uygulamaları gibi alternatif tedavi yöntemleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Günümüzde BRONJ tedavisinde farklı bir alternatif olarak ozon terapisinin çeşitli yöntemleri de uygulanmaya başlanmıştır.

Agrillo ve ark. (2006) BRONJ teşhisi konulmuş 30 hastada lokal minör küretaj içeren cerrahi tedavi, antibiyotik, antifungal, antiviral, askorbik asit ve %0,2 klorheksidin gargaraya ek olarak operasyon öncesi, sırasında ve sonrasında ozon uygulamışlardır. Ozon uygulamasına ozon jeneratörü (ozonytron) ile haftada iki kez 5'er dakika olmak üzere yirmi gün süre ile devam etmişlerdir ve lezyonların iyileşmesinin hızlandığını bildirmişlerdir.

Petrucchi ve ark. (2007) BRONJ'lu 12 multiple myeloma hastasında cerrahi tedavi ve antibiyotik tedavisine ek olarak cerrahi öncesi ve sonrası 7'şer gün ozon uygulaması sonrasında hastaların 8'inde tamamen iyileşme, 4'ünde ise lezyonlarda kısmi iyileşme gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

Ripamonti ve ark. (2012) BRONJ lezyonlarının ozon gazının etkinliği ve tolare edilebilirliğini değerlendirdikleri çalışmalarında 2,5 cm'den büyük BRONJ lezyonlarına her bir lezyon için en az 10 seans olmak üzere özel bir aperiyle ozon gazı uygulamışlar ve medikal ozon gazının BRONJ tedavisinde etkili ve güvenilir bir alternatif olduğunu belirtmişlerdir.

Ripamonti ve ark. (2011) yayınladıkları bir başka raporda konservatif tedaviye yanıt vermeyen 2,5 cm'den büyük BRONJ lezyonlarına 10 seans ve her seansta 10'ar dakika ozon yağı uygulaması sonrası 3 ila 10 uygulamada oral mukozada tamamen iyileşmenin gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

BRONJ tedavisinde de ozonun kullanıldığı ve tedavide olumlu etkileri olduğunu bildiren vaka raporları ve klinik çalışmalar mevcuttur ancak BRONJ tedavisinde ozonun kemik yada oral mukozaya olan etkisini değerlendiren herhangi bir *in vitro* çalışmaya yapılan literatür taramasında rastlanmamıştır.

2.12. Ozon

Ozon (O₃), triatomik oksijen veya trioksijen olarak bilinen ve 3 adet oksijen atomundan meydana gelen bir bileşiktir (Stopka, 2003). Ozon, oda sıcaklığında açık mavi renkte bulunan kendine has kokusu olan bir gazdır. Ozon kelimesi yunanca koku anlamındaki "ozein" kelimesinden köken alır ve 1840 yılında, ozon terapisinin babası olarak kabul edilen Alman kimyacı Christian Friedrich Schonbein tarafından verilmiştir (Bocci, 2004).

Ozon (O_3), oksijen molekülü (O_2) ve aktif atomik oksijen (O^{+2})'nin birleşmesinden meydana gelir. O_2 molekülünün aktif atomik oksijene (O^{+2}) dönüşmesi sırasında yüksek enerjiye ihtiyaç vardır ve bu reaksiyonu ultraviyole ışınları katalize etmektedir.

Ozonun molekül ağırlığı 4798 g/moldür (Stopka, 2003). Doğada atmosferin stratosfer tabakasında 1-10 ppm konsantrasyonunda bulunan ozon, stratosfer tabakasında B ve C türü ultraviyole ışınlarını absorbe ederek yeryüzünü zararlı ultraviyole ışınlarından koruyan bir filtre görevi görür (Seidler, 2008; Bocci, 2006).

Ozonun medikal alandaki ilk uygulaması 1. Dünya savaşı sırasında Alman askerlerinde gangren tedavisinde kullanılmasıdır (Bocci, 2009). Ozon terapisi, oksijen/ozonun gaz olarak, su veya yağ içinde çözünmüş şekilde kullanıldığı çok amaçlı bio-oksidatif tedavi olarak tanımlanabilir (Gopalakrishnan, 2012). Ozon terapisinin çeşitli hastalıklarda ve çalışmalarda başarılı uygulamalarına ilişkin raporlar ozon terapisine olan ilginin her geçen gün artmasına sebep olmaktadır (Seidler, 2008).

2.12.1. Ozonun Etki Mekanizmaları

Ozonun insan vücudunda immunomodülatör, immunostimülatör, analjezik, antienflamatuar, antihipoksik, antimikrobiyal, biyoenerjik, biyosentetik (karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması aktivasyonu), antihipoksik ve hemostatik etkileri olduğu bilinmektedir (Seidler, 2008; Sushma 2011; Gopalakrishnan, 2012).

2.12.1.1. Antimikrobiyal Etki

Ozonun üzerinde en çok çalışılan etkisi antimikrobiyal etkisidir. Ozonun gram pozitif ve gram negatif bakteriler, virüsler ve mantarlara etkisi bulunmaktadır. Çift bağların ozonolizisi ile stoplazmik membranın harabiyeti, hücre içi proteinlerin oksidasyonu ve organellerin fonksiyon kaybı sebebiyle hücre ölümüne neden olarak

antimikrobial etkisini sağlamaktadır. Saniyeler içerisinde mikrobiyal hücre duvarına zarar vererek hücre lizisine sebep olmaktadır (Seidler, 2008; Gopalakrishnan, 2012).

Bu etki mikrobiyal hücrelere karşı seçici olup, yüksek antioksidatif yeteneklerinden dolayı insan vücut hücrelerine zarar vermemektedir. Viral enfeksiyonlarda, viral proteinlerin sentezinde rol alan ters transkriptaz enziminin aktivitesini değiştirerek gösterir (Seidler, 2008).

2.12.1.2. Bağışıklık Sistemini Uyarıcı Etki

Ozon, hücresel ve humoral bağışıklık sistemini etkilemekte, immunokompetan hücrelerin çoğalması ve immünoglobulinlerin sentezini uyarmaktadır. Makrofaj fonksiyonunu aktive etmekte, mikroorganizmaların fagositozunu arttırmaktadır.

Ozon organizmada bağışıklık sistemini aktive ederek bağışıklık hücrelerinin sitokin üretimini indükler ve bu sitokinler de diğer bağışıklık sistemi hücrelerini aktive ederek dirençli hastalıklara karşı bağışıklık sisteminde bir kaskadın başlamasını sağlar. Dolayısıyla medikal ozon uygulaması immün yetmezliği olan hastalarda bağışıklık sistemini aktive etmede oldukça faydalıdır.

Ozon, interlökinler, lökotrenler ve prostoglandinler gibi yara iyileşmesinde yararlı ve enflamasyonu azaltmada etkili biyolojik olarak aktif maddelerin sentezini sağlamaktadır (Seidler, 2008).

2.12.1.3. Antihipoksik Etki

Ozon, kan ile oksijen taşınmasını ve dokulardaki oksijen basıncını artırarak hücre metabolizmasını etkileyen glikolizis, krebs döngüsü ve yağ asitlerinin oksidasyonu gibi aerobik süreçleri aktive etmektedir.

Eritrosit agregasyonunu önler ve eritrositlerin oksijen ile kontak yüzeylerini artırarak oksijen taşınmasını artırır. Dolaşımı uyarma özelliği, ozonu dolaşım bozukluğuna bağlı hastalıkların tedavisinde ve organ fonksiyonlarının yeniden sağlanmasında değerli kılmaktadır (Bhateja, 2012; Seidler, 2008).

2.12.1.4. Analjezik- Detox Etkisi

Arteriol ve venüllerin dilatasyonunu sağlayan NO (nitrik oksit) gibi vazodilatörlerin sekresyonuna sebep olmaktadır (Bhateja, 2012; Seidler, 2008).

2.12.1.5. Biyoenerjik- Biyosentetik Etki

Protein sentezi mekanizmasını aktive etmekte, hücrelerde ribozom ve mitokondri oranının artmasını sağlamakta ve böylece doku ve organlarda hücrese seviyede fonksiyon ve rejenerasyon potansiyelinin artmasına sebep olmaktadır (Seidler, 2008).

2.12.2. Diş Hekimliğinde Ozon Kullanımı

Optik nöropatiler, glokoma, dejeneratif retinal hastalıklar gibi göz hastalıkları, iskemik hastalıklar, ortopedik, dermatolojik, pulmoner, renal, hematolojik ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde ve çok çeşitli uzmanlık alanlarında kullanımı gerçekleştirilmiş olan ozonun diş hekimliğindeki kullanımı son zamanlarda artmıştır (Re, 2008; Arita, 2005; Bocci, 2004).

Diş hekimliğinde ozon, ilk olarak 1930'lu yıllarda Dr. E. A. Fish tarafından dezenfeksiyon ve yara iyileşmesini sağlamak amacıyla ozonlu su formunda kullanılmıştır (Gopalakrishnan, 2012).

Başlangıç çürükleri, çürük kavitelerinin sterilizasyonu, kök kanallarının sterilizasyonu, periodontal cepler, epitelyal yaraların iyileşmesi, kanal tedavisi yapılmış

renkleşmiş dişlerin beyazlatılması, periimplantitis tedavisi, avulse dişlerin yıkanması ve protez temizleyici olarak kullanılması ozonun diş hekimliğinde kullanıldığı alanlardır (Estrela, 2007; Arita, 2005; Baysan, 2000) .

Diş çürüklerinin birincil etkeni plak biyofilm tabakasıdır. Ozonlu su, dental plak birikimini, dolayısıyla çürük oluşumunu engellemektedir. Başlangıç çürüklerinde demineralize olmuş alana uygulanan ozon, çürük oluşturan bakterilerin ölmesini sağlar (Gopalakrishnan, 2012).

Ekspoze kök yüzeyini örten smear tabakası iyonik kalsiyum ve florun dentin tübüllerine penetrasyonunu engellemektedir. Ozon, smear tabakasını kaldırarak dentin tübüllerini açığa çıkarmakta, çaplarını genişletmekte, kalsiyum ve flor iyonlarının bu tübüllere kolayca girerek tübüllerini tıkamasını sağlamaktadır. Bu şekilde dentin hassasiyetini hızlı ve diğer geleneksel yöntemlere göre daha uzun süreli olarak ortadan kaldırmaktadır (Gopalakrishnan, 2012; Azarpazhooh, 2009; Dähnhardt, 2008).

Mikroorganizmalar kök kanal tedavisinde başarısızlığın en önemli sebeplerinden biridir. Ozon kök kanalında bulunan mikroorganizma sayısını azaltmada en güçlü ajanlardan biridir (Cardoso, 2008). Kök kanal yüzeyinde bulunan nekrotik debris tabakasını bakterisidal ve efervesan özellikleri sayesinde ortadan kaldıran ozon, kök kanallarının sterilizasyonu sağlar. Kanalların rutin temizliği, şekillendirilmesi ve irrigasyonu tamamlandıktan sonra uygun süre ve konsantrasyonda uygulanan ozon endodontik tedavinin başarısında etkilidir. Yapılan çalışmalar ozon gazı, ozonlu su ve ozonlanmış yağın endodontide kullanımını teşvik etmektedir (Valacchi, 2011).

Ozonun, herpes labialis, aftöz ülserasyonlar, akut nekrotizan ülseratif gingivitis gibi durumlarda yumuşak doku iyileşmesini hızlandığı bilinmektedir (Gopalakrishnan, 2012).

Ozonun kemik metabolizması ve kemiğin onarım süreci üzerine pozitif etkileri bulunmaktadır. Diş çekim soketlerine uygulandığında soket üzerinde psödomembran

oluşturarak soketi travmadan koruyarak iyileşme süresini kısaltmaktadır. Alveolit tedavisinde soketteki nekrotik dokular uzaklaştırıldıktan sonra soketin ozonlu su ile yıkanmasının iyileşmeyi hızlandırdığı rapor edilmiştir (Gopalakrishnan, 2012; Sushma, 2011, Filippi).

Baş ve boyun bölgesinde osteomiyelit tedavisinde cerrahi, antibiyotik ve hiperbarik oksijen tedavisine ek olarak ozon terapisi uygulandığında iyileşmenin daha hızlı olduğu bildirilmiştir (Gopalakrishnan, 2012; Sushma, 2011).

Multiple myeloma hastalarında osteoradyonekroz tedavisinde antibiyotik, cerrahi ve ozon terapisinin kombinasyonu uygulandığında hem osteoradyonekroz insidansında hem de lezyonların boyutlarında azalma olduğu bildirilmiştir (Gopalakrishnan, 2012).

Cardosa, herpes labialis ve mandibuler osteomiyelit tedavisinde ozonlanmış yağ uygulamasının geleneksel yöntemlere göre daha hızlı iyileşme sağladığını belirtmiştir (Macedo, 2005).

Ozonlu suyun epitelyal yara iyileşmesine olan etkisini palatinal mukozadaki defektlerde değerlendiren Filippi ve ark. ozonlu suyun oral mukozada yara iyileşmesini hızlandırdığını ve bu etkinin yara iyileşmesinin ilk iki gününde görüldüğünü belirtmişlerdir (Filippi).

Avülse dişlerin ozonlu su ile 2 dakika süre ile irrigasyonu mekanik temizlik ve kök yüzeyinin dekontaminasyonunu sağlarken kök yüzeyinde bulunan periodontal doku hücrelerine herhangi bir negatif etki göstermemektedir (Ebensberger, 2002).

Ebensberger ve ark. (2002) yeni çekilmiş ve ozonlu su ile irrig edilmiş üçüncü molar dişlerin kök yüzeyinde bulunan periodondal ligament hücrelerinin proliferasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada steril izotonik salin solusyonu ile

irrigate edilen dişlere göre ozonlu su ile irrigate edilen dişlerde proliferasyonun daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Ramzy ve ark. (2005) agresif periodontitisli hastalarda yalnızca diştaşı temizliği ve kök yüzeyi düzleştirme yapılan hastalara göre ilave olarak ozonlu su ile irrigate edilen periodontal ceplerde plak indeksi, gingival indeks ve bakteri sayısında daha belirgin iyileşme elde edildiğini bildirmişlerdir.

Huth ve ark. (2006) periodontal harabiyeti olan dişlerin kök yüzeylerindeki periodontal ligament hücrelerinde inflamasyon ile ilişkili NF-kappaB sistemini değerlendirdikleri çalışmalarında ozonlanmış medium ile inkübe edilen periodontal ligament hücrelerinde NF-kappaB aktivitesinin inhibe olduğunu ve ozonun antienflamatuar kapasitesi olduğunu rapor etmişlerdir.

Karapetian ve ark. (2007) periimplantitis tedavisinde geleneksel tedavi, cerrahi tedavi ve ozon terapisini değerlendirdikleri çalışmada bakteri sayısında en belirgin azalmanın ozon terapisi grubunda olduğunu bildirmişlerdir.

Kök kanal tedavisi yapılmış dişlerde kuron renkleşmesi özellikle anterior dişlerde estetik açıdan oldukça sıkıntılı bir durum yaratmaktadır. Ozon hem kanal tedavisi sonrası renkleşmiş hemde tetrasikline bağlı renkleşmelerde başarılı sonuçlar vermektedir (Tessier, 2010).

Ozon gazı asitleme ve fissür örtücü işlemlerinden önce profilaktik olarak uygulanabilir ve mine dokusunun fiziksel özelliklerine olumsuz bir etkisi bulunmamaktadır. Derin çürük kavitelerinin ozon gazına daha uzun süre maruz kalması dentin tübüllerinde daha güçlü bakterisidal etki oluşturarak restorasyonun klinik başarısını arttırmaktadır ve mine ve dentin dokularının adeziv restorasyon ile olan bağlantısını etkilememektedir (Gopalakrishnan, 2012; Sushma, 2011).

Protez stomatitini önlemede plak kontrolü esastır. Protezlerde biriken plak başta candida albicans olmak üzere çeşitli mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Ozonlu suyun akrilik protezlerde bulunan candida albicans'lar üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada, üzrinde candida albicans kültürü oluşturulan akrilik rezinler 1 dakika süre ile ozonlu suya maruz bırakıldığında üzerlerinde canlı candida albicans kalmadığı görülmüştür (Murakami, 2002). Ozonlu su protez materyalinin yapısına minimum zarar vererek kullanılabilecek etkin bir protez temizleme alternatifidir. Topikal ozon uygulaması da protez stomatitin kontrolünde faydalı olabilir (Gopalakrishnan, 2012; Seidler, 2008).

Diş fırçalama işleminden sonra diş fırçasının kollarında kalan mikroorganizmaları uzaklaştırarak dekontaminasyonu sağlamada da kullanımı önerilmektedir (Gopalakrishnan, 2012).

Dental ünit su tesisatlarından biyofilm tabakasının eliminasyonunda 10 dakika süre ile ozon uygulandığında canlı bakteri sayısında %65 azalma olduğu ancak tamamen eliminasyonunu sağlamada başarılı olmadığı bildirilmektedir (Walker, 2003).

2.12.3. Ozon Terapisi Endikasyonları

- Arterial dolaşım bozuklukları
- İmmün yetersizlik ve immün dengesizlik
 - ✓ Kanser hastalarında yardımcı terapi
 - ✓ Virüslerin sebep olduğu hastalıklar
- Enflamatuar durumlar
- Romatizmal hastalıklar
- Deri lezyonları ve ülserler
- Diş hekimliği (Noagles, 2008; Seidler, 2008; Garg, 2009).

2.12.4. Ozon Terapisi Kontrendikasyonları

- Hamilelik
- Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz eksikliği (favizm)
- Hipertiroidizm
- Şiddetli anemi
- Şiddetli myastenia
- Akut alkol zehirlenmesi
- Yeni geçirilmiş myokard infarktüsü
- Herhangi bir organda kanama
- Trombositopeni
- Ozon allerjisi

Uzun süre ozon gazı inhalasyonu akciğerler ve diğer organlar için zararlı olabilir. Avrupa Medikal Ozon Derneği, olası hava embolisi riski nedeniyle, ozon veya oksijen gazının direk olarak intravenöz enjeksiyonu konusunda hekimleri uyarmaktadır (Sushma, 2011; Noagles, 2008; Seidler, 2008; GARG 2009).

2.12.5. Ozon Terapisinin Komplikasyonları

Ozon terapisine bağlı komplikasyonlar 0,0007 oranı ile oldukça nadir görülmektedir. Epifora, üst solunum yolu irritasyonu, rinit, öksürük, baş ağrısı, nadiren mide bulantısı, kusma, nefes darlığı, hava embolisi ve kalp problemleri bilinen yan etkileridir (Noagles, 2008).

Psoriasis tedavisi sırasında ozona bağlı hava embolisi sonucu ölüm olduğu rapor edilmiştir.

Lumbar disk hernisyonu tedavisinde intradiskal ve peri-ganglionik O₃- O₂ karışımı enjeksiyonu sonucu akut bilateral görme kaybı gerçekleştiği bildirilmiştir.

Ozon otohemoterapisi sonrası hepatit C ve HIV enfeksiyonu rapor edilmiştir (Bhateja, 2012).

2.12.6. Ozon Uygulama Şekilleri

2.12.6.1. Sistemik Ozon Uygulaması

- Major otohemoterapi: O₃ ile ekstrakorporeal kan tedavisi ve aktive edilmiş kanın reinfüzyonu
- O₃ - O₂ karışımının rektal üfleme ile uygulanması
- Minör otohemoterapi: aktive edilmiş kanın intramüsküler enjeksiyonu (Noagles, 2008; Seidler, 2008; Garg, 2009).

2.12.6.1. Topikal Ozon Uygulaması

- Gaz sıkıştırılmış ozona dayanıklı plastik kaplar ile transkütanöz ozon uygulaması
- Ozonlu su
- Rektal O₃ - O₂ üfleme
- İntraartiküler enjeksiyon
- İntramüsküler enjeksiyon
- Ozonlanmış zeytin yağı

2.12.7. Ozon Jeneratörleri

Oksijen molekülünü parçalayıp, elde edilen atomlardan birini, başka bir oksijen molekülüne bağlayarak ozon elde eden makinelere ozon jeneratörü adı verilmektedir (Çetinkaya, 2011). Medikal ozon jeneratörleri ozonu yüksek voltaj gradyanndan (5-13mV) geçen saf oksijenden aşağıdaki reaksiyon ile üretmektedir (Bocci, 2006).



İlk medikal ozon jeneratörü Alman fizikçi Joachim Hansler ve Hans Wolff tarafından geliştirilmiştir (Bhateja, 2012; Gopalakrishnan, 2012). Medikal ozon, %95-99,95 oranında saf oksijen ve %0,05-5 oranında saf ozon karışımı şeklinde olmalıdır. Karışımdaki ozon oranı %5'ten yüksek olmamalıdır (Bocci, 2006; Gopalakrishnan, 2012). Jeneratörler ozona dayanıklı, paslanmaz çelik, teflon veya doğal cam gibi yüksek kaliteli materyallerden üretilmelidirler (Bocci, 2006; Gopalakrishnan, 2012; Bhateja, 2012).

Ozon jeneratörlerinin çalışması, prensip olarak 3 ana yönteme dayanmaktadır (Gopalakrishnan 2012; Bhateja, 2012):

- UV Ozon Jeneratörleri
- Soğuk Plazma Sistem Ozon Jeneratörleri
- Corona-Discharge Sistem Ozon Jeneratörleri

Ultraviyole sistem jeneratörler düşük konsantrasyonlarda ozon üretirler ve estetik amaçlı, saunalarda ve suların arıtılmasında kullanılmaktadır.

Soğuk Plazma Sistem Jeneratörler hava ve suyun arıtılmasında kullanılırlar.

Discharge Sistem Ozon Jeneratörleri ise yüksek konsantrasyonlarda ozon üretirler. Kullanımı kolay ve ozon dozunun kontrollü olarak uygulanmasını sağlar, tıp ve diş hekimliğinde en çok tercih edilen jeneratör tipleridirler (Gopalakrishnan 2012; Bhateja, 2012).

Bu tip jeneratörler, sabit elektrik akımı sayesinde elektronları hızlandırmakta ve böylece kinetik enerjiyi arttırarak, oksijen molekülündeki oksijen-oksijen çift bağını parçalamaktadır. Bu işlem sonunda ortama salınan iki oksijen atomu; diğer oksijen molekülü ile reaksiyona girerek ozon oluşmaktadır (Nogales 2008, Çetinkaya, 2011).

Ozi–Cure (Centurion, Güney Afrika), HealOzone (CurOzone ABD, Kavo, Almanya), Ozonytron X-Biozonix (Mymed, Almanya), Cytozon (Hansler, Almanya), Ozonasan (Fa. Hänsler), Neo Ozone Water–S (KORM Electronics, Japonya) ve Sander Ozonizer (Eltze, Almanya) dişhekimliğinde kullanılan ozon jeneratörleridir (Gopalakrishnan 2012; Çetinkaya, 2011).

OzonyTronX: OzonyTronX , 2005 yılında Almanya’da Mymed tarafından üretilmiştir. Cihazın probu dokuya temas ettiği anda ortamda bulunan oksijen molekülü (O_2) atomlarına ayrılmaktadır. Bu atomik oksijen (O^{+2}) geçici olarak ortamdaki oksijen (O_2) ile birleşerek yüksek derecede dezenfeksiyon etkisi yapan ozon (O_3) gazını oluşturur (Çetinkaya, 2011).

OzonyTronX, ana ünite, plazma probu ve aplikatörden oluşmaktadır (Resim 2.3). Ana ünite, bir konnektör üzerinden aplikatöre aktarılan yüksek frekans impulsları üretir. Özel cam problar soy gazlarla doludur ve elektro-manyetik enerjiyi iletir, probun ucundan salarak aktiflenmiş oksijen ve aktif bir madde olan ozonu üretir. Üretilen ozonun yüzeye uygulanması amacıyla yedi farklı prob ucu bulunmaktadır (Resim 2.4) (Çetinkaya, 2011).



Resim 2.3. OzonyTronX ozon jeneratörü



Resim 2.4. OzonyrTronX ozon jeneratörü prob uçları

Cihaz üzerindeki kontrol düğmesi vasıtasıyla beş kademeli olarak ozon gazının yoğunluğunun ayarlanabildiği konsantrasyon seviyeleri bulunmaktadır. Kademelerin konsantrasyonu, uygulama süresi ve bu konsantrasyona göre uygulanan tedavi seçenekleri tablo 2.1’ de gösterilmektedir (Çetinkaya, 2011).

Tablo 2.1. OzonytronX ozon jeneratörü kademelerinin konsantrasyonu, uygulama süresi ve bu konsantrasyona göre uygulanan tedavi seçenekleri

Kademe	Ozon Konsantrasyonu	Süre	Uygulama Alanları
1	0-5 ppm	120 sn	Hassasiyet testleri
2	10000-25000 ppm	90 sn	Yumuşak dokuların viral ve fungal enfeksiyonları, hassas dokuların (dil, dudak vs.) dezenfeksiyonu
3	25000-45000 ppm	40-60 sn	Gingivitis, periodontitis, hiperemi
4	45000-100000 ppm	30-40 sn	Reimplantasyon, çekim sonrası soket dezenfeksiyonu, mine ve dentin yüzeylerinin restorasyona hazırlanması, trismus
5	100000-300000 ppm	40-50 sn	Prob ucunun dezenfeksiyonu, kanama kontrolü, kök kanal dezenfeksiyonu

TÜV SÜD (Industrie Service GmbH kuruluşu/Technischer Überwachungs-Verein) tarafından OzonyTronX cihazının ürettiği ozon miktarı ve konsantrasyonu değerlendirilmiştir. Ozon tedavisinin diş hekimliğinde kısa sürelerde (20–120 s) uygulanması sonucu oluşabilecek maksimum ozon konsantrasyonunun, insanlar için zararlı ozon konsantrasyonu eşik değerinin (TLV) %37’de kalması nedeniyle, güvenli uygulanabilirliğine izin verilmiş ve herhangi bir toksik etki yaratmadığı “TÜV” belgesi ile kanıtlanmıştır (Çetinkaya, 2011).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı, Arçelik, Türkiye
- CO₂ inkübatör Heraus, HeraCell, Almanya
- Hava akım kabini, Cytobaby CB1204, Danimarka
- Işık mikroskobu, Leica DM500, Almanya
- İnvert mikroskop, Olympos CK40, Japonya
- Otomatik mikropipet (10, 100, 1000 µl skalasında), Costar, İtalya
- Otomatik mikropipet (10,100 ve 1000 µl skalasında), Eppendorf, ABD
- Santrifüj, Harrier 15/80, İngiltere
- Vorteks, Dragon Laboratory, Çin
- Ozon jeneratörü, OzonytronX - BIOZONX, Medentozone, Almanya
- LightCycler 480 II Real-Time PCR System, Roche Applied Science, Mannheim, Almanya
- Nanodrop 2000 Thermo Scientific, Wilmington, Amerika Birleşik Devletleri

3.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

- Besiyeri, DMEM-F12, F0455, Biochrom, Almanya
- Fetal Bovin serum, S0215, Biochrom, Almanya
- İyodin, Batticon Antiseptik Solüsyon, Türkiye
- Kloroheksidin diglukonat, Listerine Advanced Antiseptic Mouthwash, ABD
- L-Glutamin, K0282, Biochrom, Almanya
- Pamidronat disodyum Trihidrat, P2371, Sigma-Aldrich, ABD

- Penisilin-streptomisin-neomisin karışımı, A2212, Biochrom, Almanya
- TriPure Isolation Reagent (Katalog numarası:11667157001), Roche Applied Science, Mannheim, Almanya
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti (Katalog numarası:05081955001), Roche Applied Science, Mannheim, Almanya
- COL1A1 (collagen, type I, alpha 1), Real Time Ready Catalog Assay, Assay ID:100861, Roche Applied Science, Mannheim, Almanya
- COL1A2 (collagen, type I, alpha 2), Real Time Ready Catalog Assay, Assay ID:103048, Roche Applied Science, Mannheim, Almanya
- GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), Real Time Ready Catalog Assay, Assay ID:101128, Roche Applied Science, Mannheim, Almanya
- Roche 480® Probes Master (Katalog numarası: 04707494001), Roche Applied Science, Mannheim, Almanya

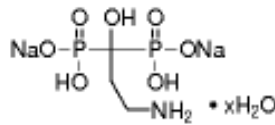
3.3. İlaçların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

3.3.1. Pamidronat disodyum tuz hidrat: $C_3H_9NO_7P_2Na_2 \cdot xH_2O$

Pamidronat disodyum tuz hidrat'ın molekül ağırlığı: 279,03g

Suda çözünürlüğü: 28 mg/ml

2,8 mg pamidronat disodyum tuz hidrat hassas terazide tartılarak 1 ml suda çözülerek 10^{-1} M stok çözelti elde edildi. Stok solüsyon steril distile su ile seyreltilerek 10^{-4} M'lık çözelti elde edildi.



Pamidronat disodyum tuz hidrat

3.4. Hasta Seçimi

Çalışmaya 18-30 yaş arası, sigara, alkol ve herhangi bir ilaç kullanmayan, sağlıklı, 3 erkek, 3 kadın, toplam 6 hasta dahil edildi. Hastaların tümü çalışma konusunda bilgilendirildi ve aydınlatılmış onam formunu okuyarak imzaladı.

3.5. Primer Fibroblast Kültürü

3.5.1. Primer Fibroblast Eldesi

Ortodontik tedavi amaçlı gömülü dişlerin yüzeyine braket yapıştırılması gereken durumlarda, gömülü dişin üzerindeki dişeti kesilerek çıkarılmaktadır ve bu işlem kapişon izolesi olarak adlandırılmaktadır. Çalışma için gereken dişeti örnekleri, rutin kapişon izolesi uygulamalarından sonra, zaten atılacak olan dişeti dokularından elde edilmiştir. Alınan örneklerle kod verilerek örnekler anonimize edilmiştir ve laboratuvara ulaştırılmıştır. Hastaların izniyle alınmış olan dişeti örneklerinden, fibroblast hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak ileri analizler yapılmıştır.

Kloroheksidin diglukonat ve iyodin ile ağız gargarası yaptırılan hastalardan, sterilizasyona özen gösterilerek alınan tam kalınlıktaki dişeti örnekleri transport medyum (3 ml DMEM-F12 içerisine 1 damla penisilin-streptomisin-neomisin karışımı) içerisinde 30 dakikada Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarına ulaştırılmıştır.

Laboratuvara ulaştırılan örnekler, hava akım kabininde, 3 cm çapında steril petri kutuları içerisinde bistüri ile mekanik olarak parçalandı. Bu parçalar daha sonra enzimatik parçalama için Tip I kollejenaz (5 mg/10 ml DMEM-F12) içerisinde 37⁰C’lık inkübatörde 60 dk bekletildi. Süre sonunda doku ve kollajenaz karışımı steril bir tüpe alınarak 500 g’de, 9 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Elde edilen çökeltiye, 3 ml hücre kültürü besiyeri (%10 FBS, %2 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin karışımı içerecek şekilde hazırlanmış +4⁰C’de bekletilen DMEM-

F12) eklenerek 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Kültür kapları %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37⁰C'lık inkübatöre kaldırıldı. Hücre gelişimi invert mikroskop ile takip edilerek 2-3 günde bir besi yeri değiştirildi. Ekim sonrası 7 ile 10 gün arasında hücrelerin kültür kaplarına yapışmaya başladığı gözlemlendi.

3.5.2. Primer Fibroblastların Pasajı

Hücrelerin kültür kabının %90' ını kapladığı invert mikroskop ile belirlendikten sonra, kültür kaplarındaki besi yerleri hava akım kabini içerisinde steril pipet aracılığıyla alındı ve kaplara 2 ml %0,05'lik Tripsin-EDTA karışımı eklendi. Kültür kapları 37⁰C'lık inkübatörde 8-10 dk bekletilerek yapışmış hücrelerin ayrılması sağlandı. Steril tüplere alınan tripsin-EDTA, hücre karışımı üzerine toplam hacim kadar DMEM-F12 besi yeri eklendi. Tüp içeriğinin iyice karışması sağlandı ve 500 g'de, 9 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Elde edilen çökeltiliye, 3 ml hücre kültürü besi yeri eklenerek tekrar 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Bu, hücrelerin 1. pasajı olarak etiketlendi. Tüm örneklerden 4 kez pasaj yapılarak, yaklaşık 15 günlük süre sonucunda deneyler için yeterli hücre sayısına ulaşıldı. Tüm hastalarda 6-9 pasaj sonunda elde edilen hücreler deneysel çalışmalarda kullanıldı.

3.6. Hücre Sayısının ve Canlılığının Belirlenmesi

Hücre sayıları Thoma lamı ile sayılarak belirlendi. Thoma lamının lameli kapatıldıktan sonra sayımı yapılacak sıvı bir pipet aracılığıyla lama damlatıldı. Işık mikroskopunda 10X büyütme ile alan sayıldı. Bu alandan elde edilen hücre sayısı 1 cm³'e normalize edilerek çözeltideki toplam hücre sayısına ulaşıldı.

Hücre canlılığı hücrelerin tripan mavisini alma testi ile belirlendi. Hücre süspansiyonu 9/1 oranında tripan mavisi boyası ile karıştırılarak Thoma lamına bir pipet aracılığıyla damlatıldı. Koyu mavi boyanan hücreler, zar geçirgenliğinin bozulması sebebiyle boyayı içerisine alan ölü hücreler olarak değerlendirildi. Hücre canlılığı %90'ın üzerinde olan kültürler çalışma kapsamına dahil edildi.

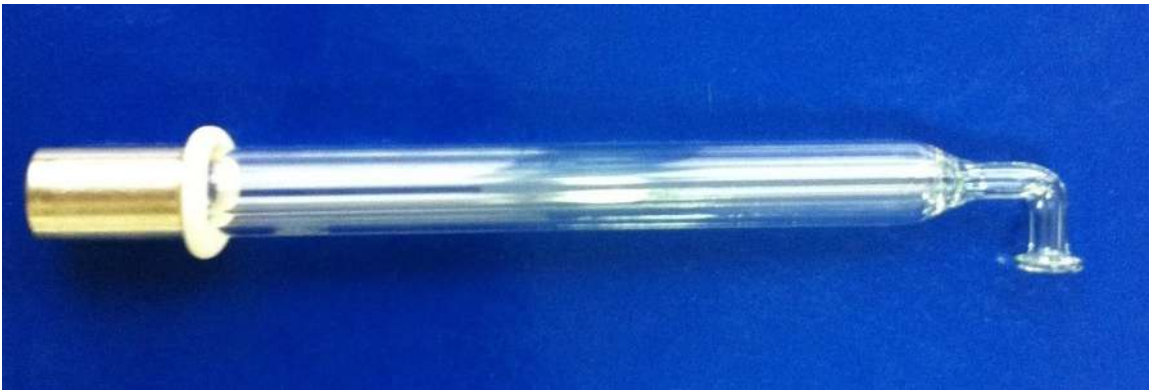
Her bir flaskta ortalama 1 milyon hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler flasklara ekildikten sonra bir gece bekletilerek yapışması sağlanmış ertesi gün besi yeri değiştirilmiş tüm uygulamalar bundan sonra yapılmıştır. Tüm uygulamalar iki kere tekrar edilmiştir.

3.7. Pamidronat Uygulaması

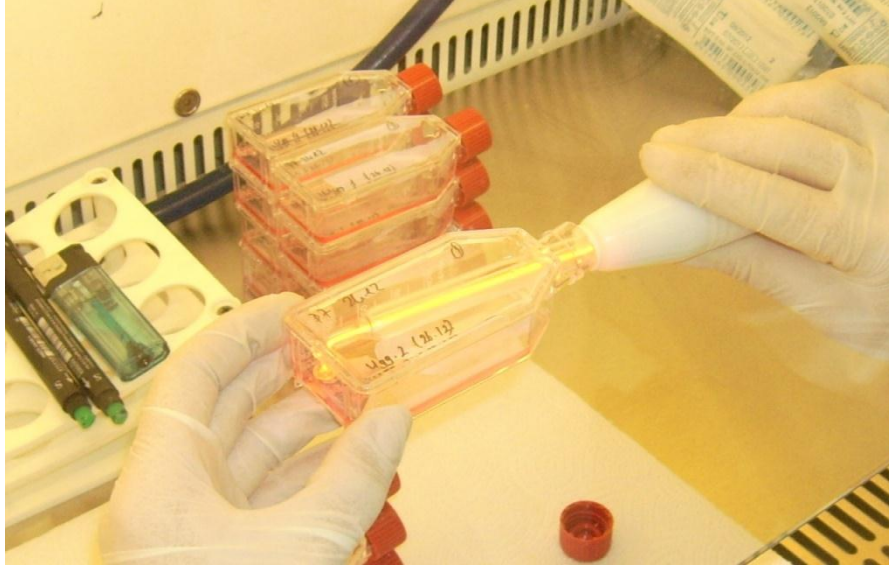
3 ml besi yeri içine otomatik mikropipet ile 1000 µl pamidronat çözeltisi, son konsantrasyon 10^{-4} M olacak şekilde uygulanmıştır. Uygulama dozu olan 10^{-4} M daha önce Başkent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde aynı hücre grubu ile yapılmış olan doktora tezi sonuçlarına göre belirlenmiştir.

3.8. Ozon Uygulaması

Çalışmada OzonyTronX-Biozonix®(Mymed, Almanya) marka medikal ozon jeneratörü kullanılmıştır. Üretici firmanın gingival tedavi için uygulama önerisi doğrultusunda 3. kademedeki 24 cm²'lik flaska 240 saniye (10 saniye / cm²) uygulama yapılmıştır. Uygulama GI 90⁰ probu kullanılarak ve prob ucu flask tabanına yapışmış hücrelerin yüzeyine paralel olarak medium yüzeyine değdirilerek yapılmıştır.



Resim 2.5. OzonytronX-Biozonx ozon jeneratörü GI 90⁰ prob ucu



Resim 2.6. Hücre kültürüne ozon jeneratörü ile ozon uygulanması

4.9. Uygulama Grupları

Grup 1: Pamidronat ve ozon uygulaması eş zamanlı olarak yapılarak 24 saat inkübe edilmiştir.

Grup 2 ve 3: Pamidronat uygulamasının 24. saatinde ozon uygulaması yapılarak sırasıyla 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir.

Grup 4, 5 ve 6: Yalnızca pamidronat uygulanarak sırasıyla 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir.

Grup 7, 8 ve 9: Yalnızca ozon uygulaması yapılarak sırasıyla 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir.

Grup 10, 11 ve 12: Herhangi bir uygulama yapılmaksızın sırasıyla 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir.

3.10. RNA İzolasyonu

İnkübasyon süresi dolan kültürlerin kültür ortamları alınarak hücreler 1 ml *Tripure Isolation Reagent* içine alınarak -20°C’de saklanmıştır. Sonrasında tüm örneklerden total RNA izolasyonu üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

TriPure; hücrelerden ve dokulardan total RNA izolasyonu için kullanılan bir reaktiftir ve fenol ve guanidin izotiosiyanattan meydana gelen tek fazlı bir solüsyondur. TriPure, örneğin homojenizasyonu veya lizisi sırasında hücreleri parçalayıp hücre bileşenlerini çözerken RNA bütünlüğünü sağlar.

Elde edilen RNA’ların kalitatif ve kantitatif analizi Nanodrop 2000 kullanılarak spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir.

cDNA sentezi, 1µg total RNA’dan, *random* hegzamerler kullanılarak *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit*’i ile gerçekleştirilmiştir.

COL1A1 ve COL1A2 genlerinin ifadenme düzeyleri, *housekeeping* gen olarak GAPDH kullanılarak incelenmiştir. Her bir örnekten elde edilen cDNA’lar Roche 480® *Probes Master* ve ilgili probelar kullanılarak semikantitatif RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda COL1A1 ve COL1A2 genlerinin ifadenmelerinde oluşan değişiklikler $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Pfaffl, 2001)

3.11. İstatistiksel Yöntem

Öncelikle sürekli değerlerin tanımlayıcı istatistikleri verilmiştir. Tanıtıcı istatistikler gösterilirken (ort±std.sapma) ve Medyan (Min.-Mak.) olarak belirtilmiştir. Veri analizi yapılırken iki faktörlü faktörlerden biri tekrarlanan varyans analizi kullanılmıştır. Tekrarlı ölçüm varyans analizi için gerekli olan önşartlardan **Mauchly’s küresellik Testi sonucu küresellik varsayımının sağlandığı belirlenmiştir. Çoklu**

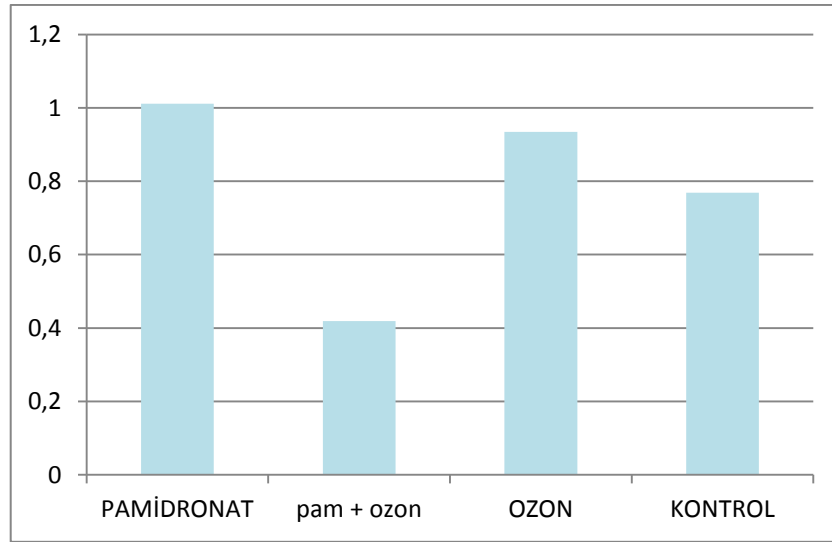
karşılaştırmalar Düzeltilmiş Bonferroni testi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $\alpha=0,05$ olarak gösterilmiştir. Veriler (SPSS, Chicago IL, Version 17) paket programında değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. COL1A1 Bulguları

4.1.1. 24 Saat İnkübasyon Bulguları

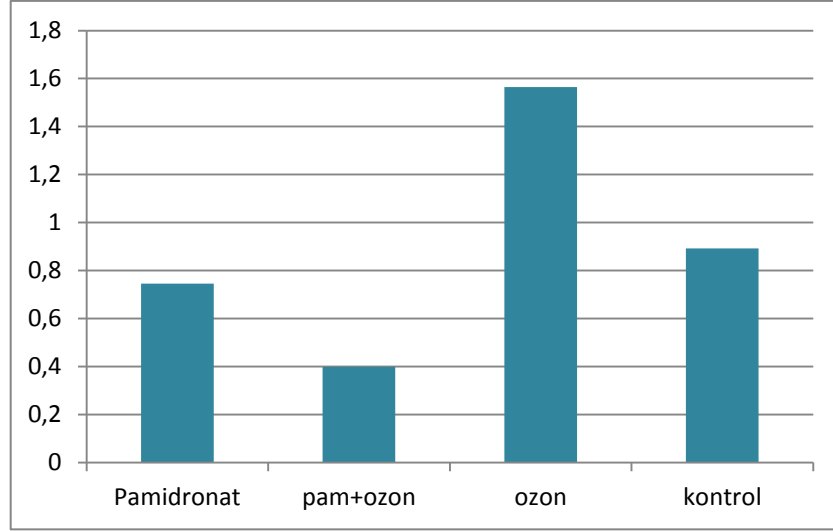
Yalnızca pamidronat uygulaması yapılan grupta ortalama COL1A1 değeri 1,011'dir. Pamidronat ve ozonun birlikte uygulandığı grupta ortalama COL1A1 değeri 0,419, yalnızca ozon uygulaması yapılan grupta 0,934, ve herhangi bir uygulama yapılmayan grupta da 0,769 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.1. 24 saat COL1A1 ortalama değerleri grafiği

4.1.2. 48 Saat İnkübasyon Bulguları

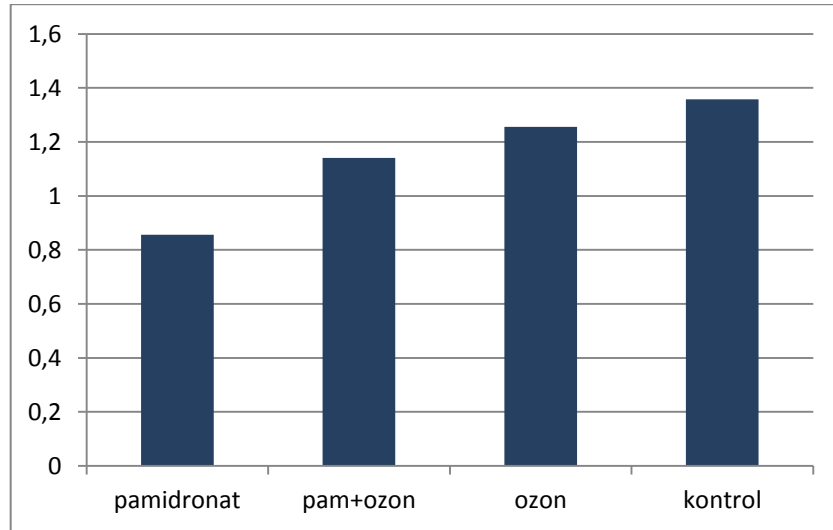
Yalnızca pamidronat uygulaması yapılan grupta ortalama COL1A1 değeri 0,746, Pamidronat ve ozonun birlikte uygulandığı grupta 0,399, yalnızca ozon uygulaması yapılan grupta 1,565 ve herhangi bir uygulama yapılmayan grupta da 0,893 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



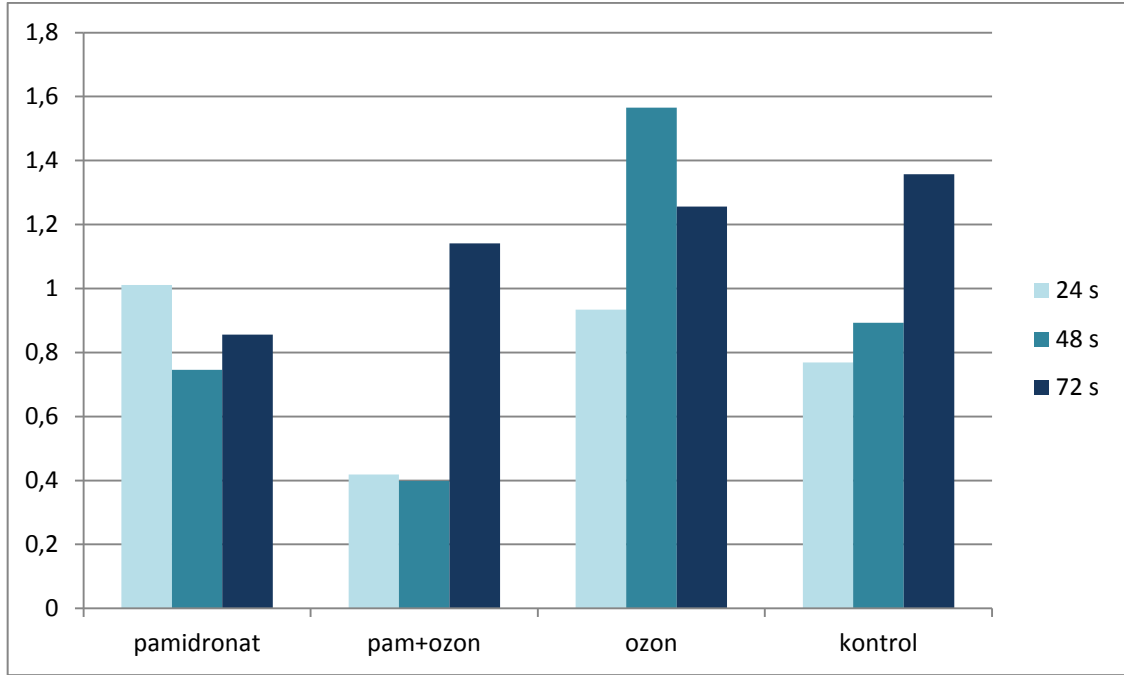
Şekil 4.2. 48 saat COL1A1 ortalama değerleri grafiği

4.1.3. 72 Saat İnkübasyon Bulguları

Yalnızca pamidronat uygulaması yapılan grupta ortalama COL1A1 değeri 0,856, Pamidronat ve ozonun birlikte uygulandığı grupta 1,141, yalnızca ozon uygulaması yapılan grupta 1,256 ve herhangi bir uygulama yapılmayan grupta da 1,357 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



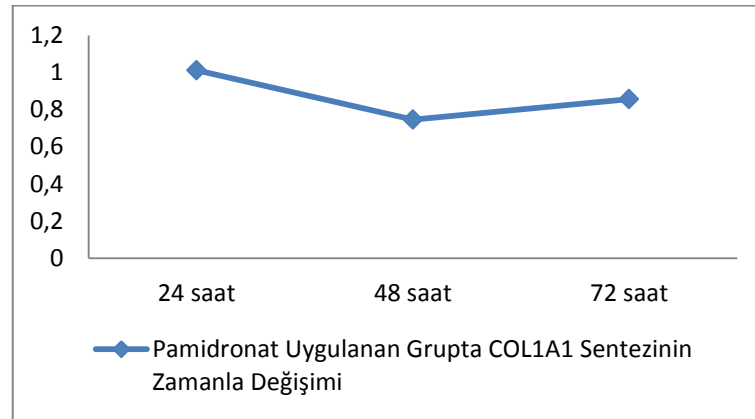
Şekil 4.3. 72 saat COL1A1 ortalama değerleri grafiği



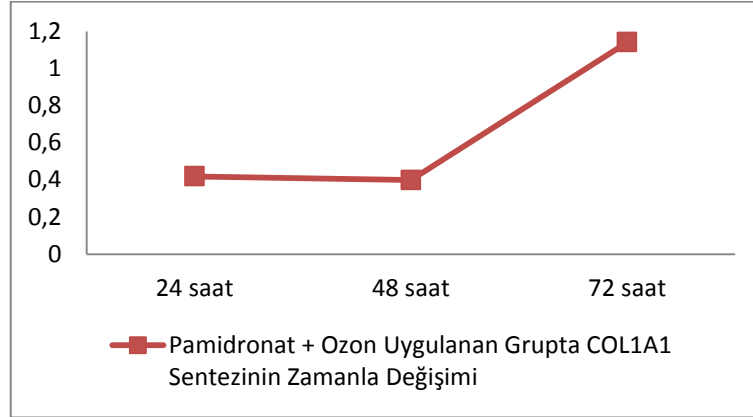
Şekil 4.4. 24, 48 ve 72 saat COL1A1 ortalama değerlerinin değişim grafiği

Tablo 4.1. 24, 48 ve 72 saatteki COL1A1 ortalama değerleri

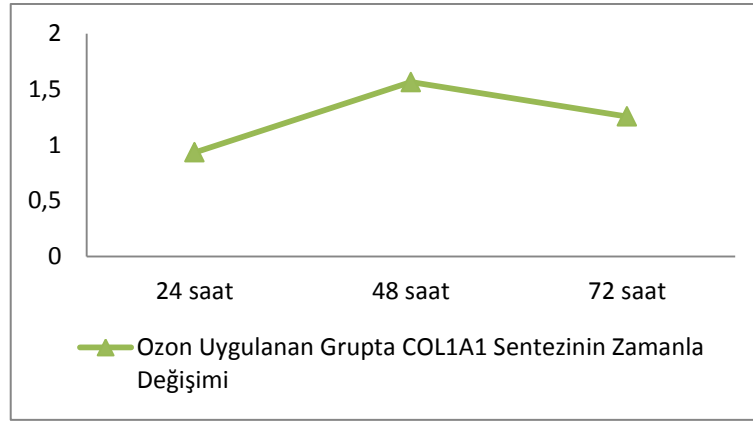
COL1A1	<i>pamidronat</i>	<i>Pamidronat+ozon</i>	<i>ozon</i>	<i>kontrol</i>
24 saat	1,011	0,419	0,934	0,769
48 saat	0,746	0,399	1,565	0,893
72 saat	0,856	1,141	1,256	1,357



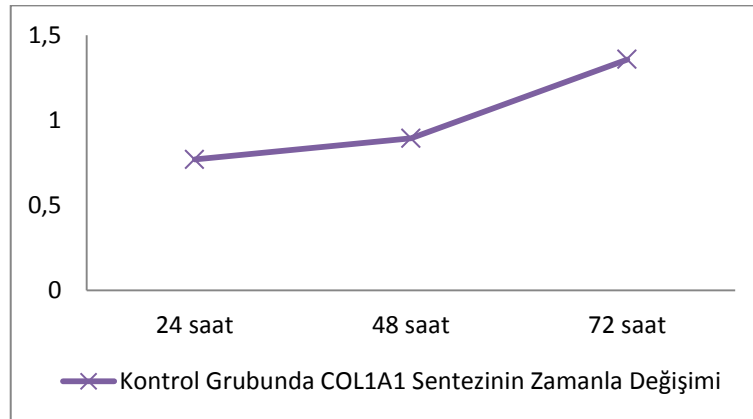
Şekil 4.5. Pamidronat Uygulanan Grupta COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi



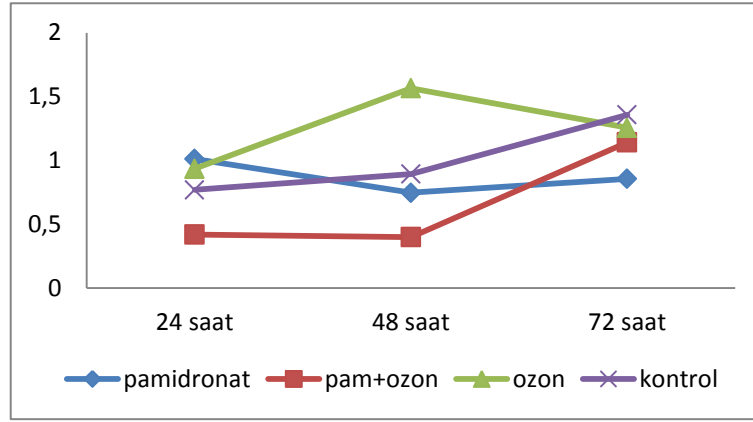
Şekil 4.6. Pamidronat + Ozon Uygulanan Grupta COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi



Şekil 4.7. Ozon Uygulanan Grupta COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi



Şekil 4.8. Kontrol Grubunda COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi

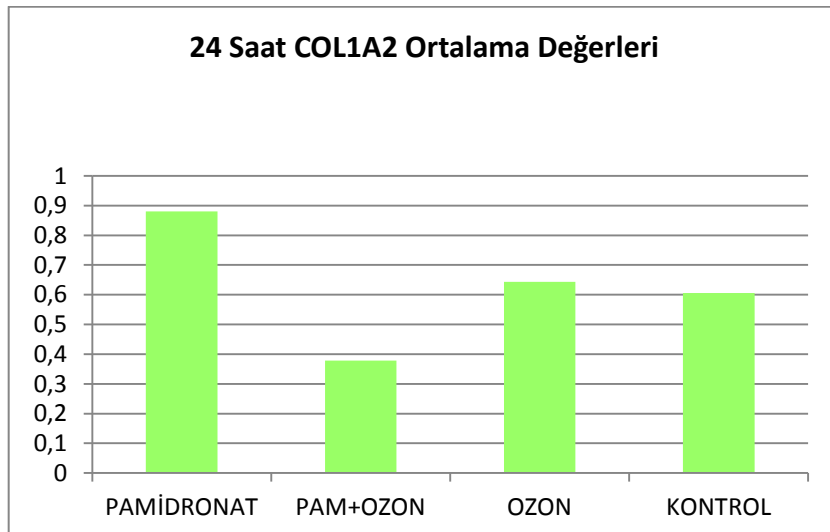


Şekil 4.9. Tüm grupların COL1A1 Sentezinin Zamanla Değişimi

4.2. COL1A2 Bulguları

4.2.1. 24 Saat İnkübasyon Bulguları

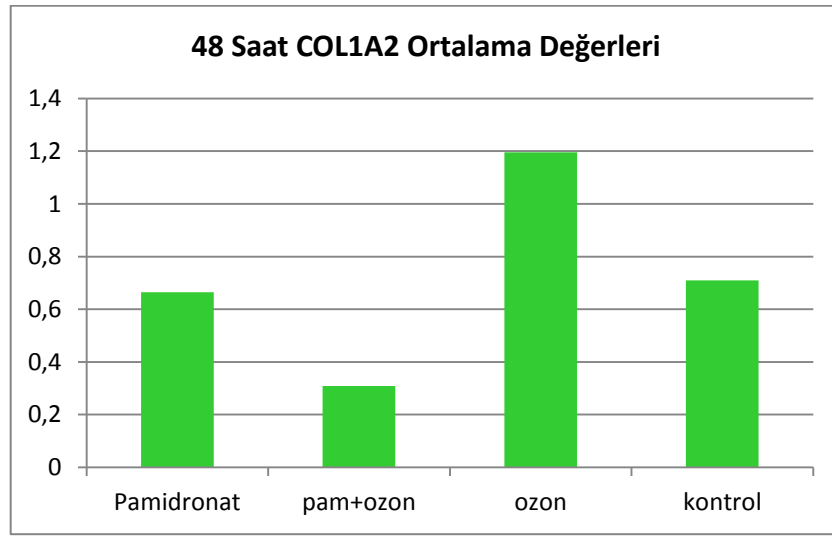
Yalnızca pamidronat uygulaması yapılan grupta ortalama COL1A2 değeri 0,880'dir. Pamidronat ve ozonun birlikte uygulandığı grupta ortalama COL1A2 değeri 0,378, yalnızca ozon uygulaması yapılan grupta 0,643, ve herhangi bir uygulama yapılmayan grupta da 0,606 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.10. 24 saat COL1A2 ortalama değerleri grafiği

4.2.2. 48 Saat İnkübasyon Bulguları

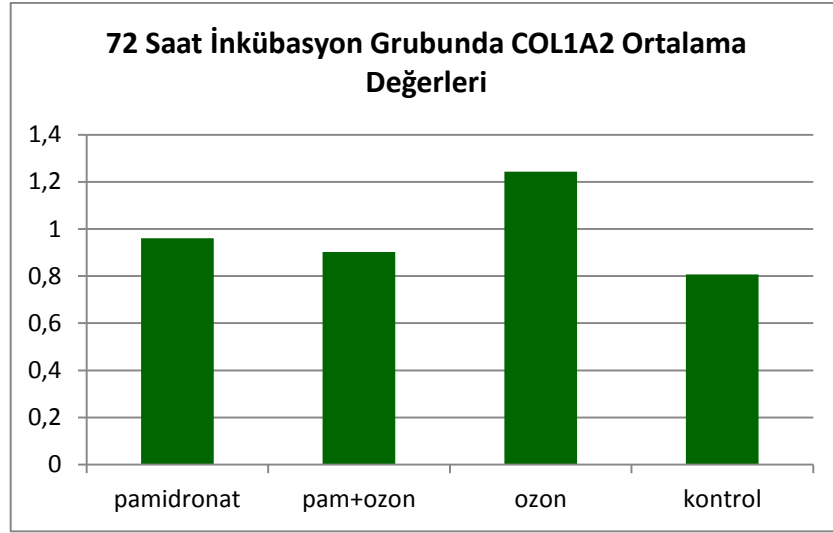
Yalnızca pamidronat uygulaması yapılan grupta ortalama COL1A2 değeri 0,665, Pamidronat ve ozonun birlikte uygulandığı grupta 0,309, yalnızca ozon uygulaması yapılan grupta 1,195 ve herhangi bir uygulama yapılmayan grupta da 0,709 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



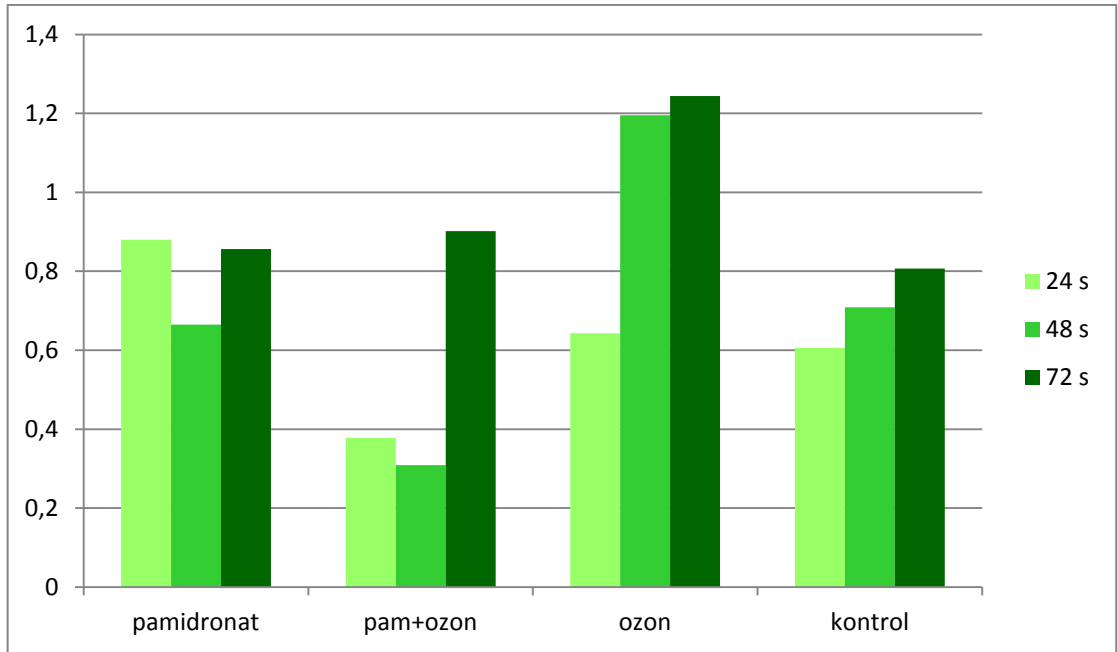
Şekil 4.11. 48 saat COL1A2 ortalama değerleri grafiği

4.2.3. 72 Saat İnkübasyon Bulguları

Yalnızca pamidronat uygulaması yapılan grupta ortalama COL1A2 değeri 0,961, Pamidronat ve ozonun birlikte uygulandığı grupta 0,902, yalnızca ozon uygulaması yapılan grupta 1,244 ve herhangi bir uygulama yapılmayan grupta da 0,807 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



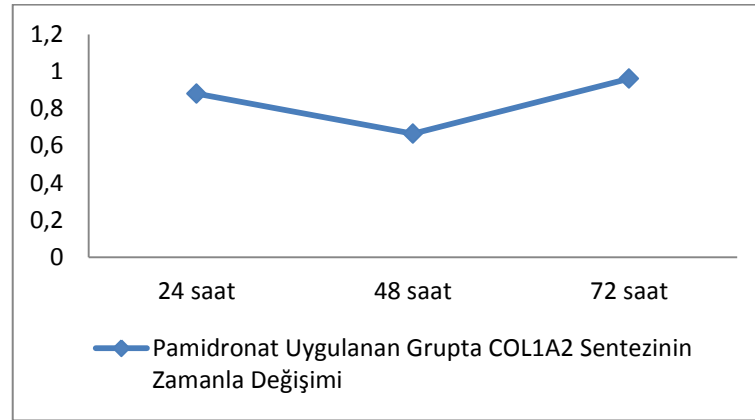
Şekil 4.12. 72 saat COL1A2 ortalama değerleri grafiği



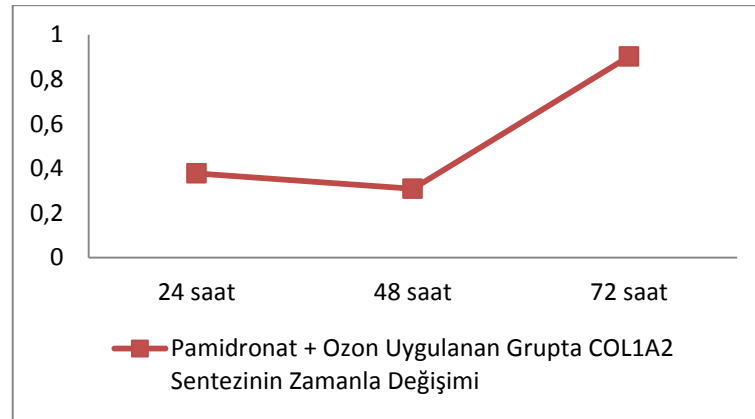
Şekil 4.13. 24, 48 ve 72 saat COL1A1 ortalama değerlerinin değişim grafiği

Tablo 4.2. 24, 48 ve 72 saatteki COL1A2 ortalama değerleri

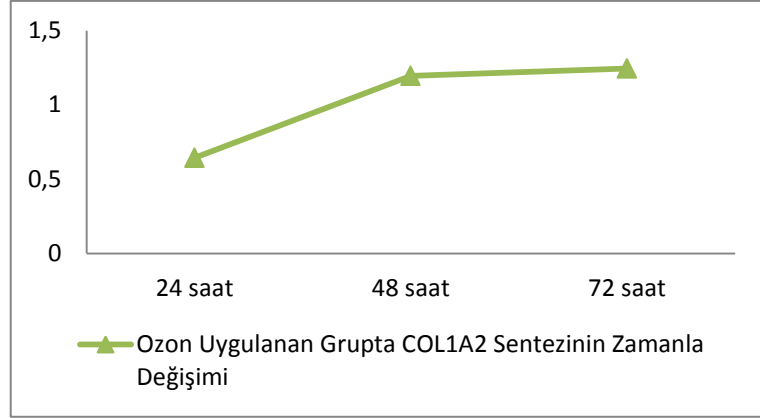
COL1A2	<i>pamidronat</i>	<i>Pamidronat+ozon</i>	<i>ozon</i>	<i>kontrol</i>
<i>24 saat</i>	0,880	0,378	0,643	0,606
<i>48 saat</i>	0,665	0,309	1,195	0,709
<i>72 saat</i>	0,961	0,902	1,244	0,807



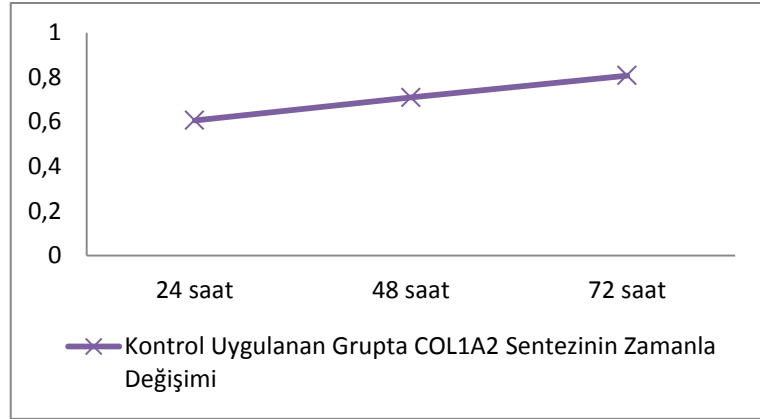
şekil 4.14. Pamidronat Uygulanan Grupta COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi



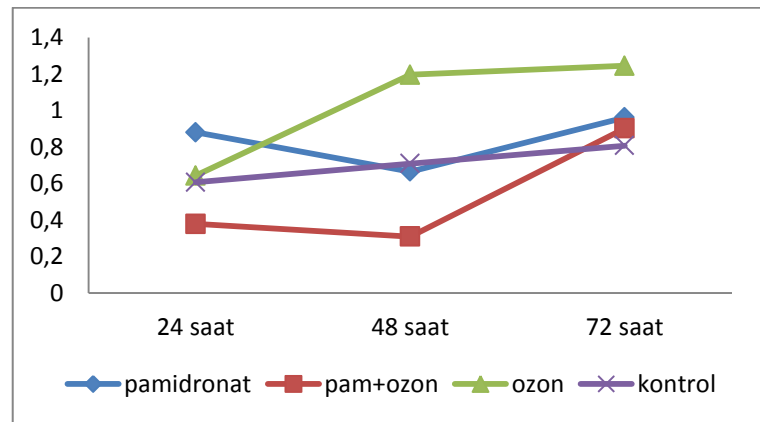
şekil 4.15. Pamidronat + Ozon Uygulanan Grupta COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi



Şekil 4.16. Ozon Uygulanan Grupta COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi



Şekil 4.17. Kontrol Grubunda COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi



Şekil 4.18. Tüm Grupların COL1A2 Sentezinin Zamanla Değişimi

5. TARTIŞMA

Bifosfonatlar, postmenopozal ve steroid kullanımına bağı osteoporozda, Paget hastalığında, maligniteye bağı hiperkalsemi, multiple myelomadaki osteolitik lezyonlarda, göğüs, prostat ve akciğer kanseri gibi yumuşak doku kanserlerine bağı kemik metastazlarının önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır (Landesberg, 2008).

Bifosfonatların etki mekanizmaları tam olarak açıklanmamış olmasına karşın hidroksiapatit çözünmesini engelledikleri, kemik iliği öncül hücrelerinin osteoklastlara farklılaşmasını inhibe ettikleri, osteoklast inhibitör faktörü uyardıkları, osteoklast apoptozisini ve anti-anjiyogenik etki sağladıkları kesin olarak kanıtlanmıştır (Şenel, 2007; Leite, 2006; Naveau, 2006).

Fournier ve ark. (2002) bifosfonatların endotelial hücre proliferasyonunu ve neo anjiyogenezi etkilemeleri nedeniyle antianjiyogenik etkileri olduğunu rapor etmişlerdir. Antiosteoklastik ve antianjiyogenik etkilerin sonucunda azalmış vasküler destek, düşük yapım-yıkım ve yetersiz remodelasyonun ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

BRONJ ilk kez Marx tarafından 2003 yılında tanımlanmıştır ve bu tarihten itibaren her geçen gün artan sayıda vaka raporu bildirilmiştir. Nadir görülen ama ciddi bir komplikasyon olan BRONJ en sık *i.v.* zolendronat kullanımına bağı olarak meydana gelmektedir (Marx, 2003).

Pamidronat ve alendronat bifosfonatlar arasında en sık kullanılan ilaçlardandır (Font, 2008; Ashcroft, 2003; Rogers, 2000). Popülasyonda görülen BRONJ'ların %27'si pamidronat, %4'ü alendronat kullanımı ile ilişkilidir (Reid, 2009). Aylık *i.v.* bifosfonat tedavisi gören kanser hastalarında osteokemonekroz oluşma riski %2-13 arasındayken, haftalık oral tablet formunu kullanan hastalarda bu oran 100,000-200,000'de 1 gibi çok düşük bir oran olarak bildirilmiştir (Manfredl, 2011).

Bizim çalışmamızda da *i.v.* olarak kullanılan, en çok kullanılan bifosfonat türlerinden biri olan ve kullanımı sonucu BRONJ insidansı yüksek olan pamidronat tercih edilmiştir.

Bifosfonatların neden olduğu BRONJ'un patogenezi doğru şekilde yorumlayabilmek için, hücre kültür çalışmalarında ilacın saf formunun kullanılması gerekmektedir. Bu çalışmada pamidronat disodyum tuz hidratın saf tuz formu çözelti haline getirilerek hücre kültürlerine belirlenen konsantrasyonda uygulanmıştır.

MTT, bir ilacın veya ajanın hücre üzerindeki sitotoksik etkisini renk değişikliğine bağlı yorumlamaya yarayan bir yöntemdir. Hücre canlılığı, proliferasyon miktarı ve ilacın IC₅₀ (%50 İnhibitör Konsantrasyon) değerini sayısal verilerle ifade etmeye yardımcı olur. Soydan ve ark. yaptıkları çalışmada pamidronatın gingival fibroblastlar için hücre çoğalmasını %50 oranında engelleyen inhibitör konsantrasyonunu (IC₅₀) 10⁻⁴M (100µM) olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da Soydan ve ark.'nın belirlemiş olduğu IC₅₀ dozu referans alınmıştır (Soydan, 2011).

BRONJ'un patofizyolojisi henüz tam olarak açıklanamamıştır ancak bifosfonat kullanmakta olan hastada diş çekimi, invaziv dental cerrahi işlemler, zayıf oral hijyen, diyabet gibi hastalıkların varlığı, kemoterapi, kortikosteroidler gibi kullanılmakta olan diğer ilaçlar BRONJ için ilave risk faktörlerini oluşturmaktadır (Woo, 2006). Hayvan çalışmalarında, bifosfonat uygulanan köpeklerde dental cerrahi müdahale olmaksızın BRONJ görülmesi, patogeneziye yönelik daha fazla çalışma yapılması gerektiğini ortaya koymuştur (Allen, 2009b).

Önceleri BRONJ'un patogeneziyi yorumlayabilmek için kemik doku çalışmaları yapılırken günümüzde yumuşak doku çalışmaları daha fazla önem kazanmıştır (Naidu, 2008; Walter, 2011; Badros, 2006). Kemik dokuda bifosfonatların osteoblast (Günül, 2004), osteoklast (Khosla, 2007) ve tümör hücrelerinde (Mackle, 2001) değişken faktörlere bağlı olarak neden oldukları etkiler çok sayıda çalışmada değerlendirilmiştir. Yumuşak dokuya yönelik olarak deneysel çalışmalarda ise mikromolar konsantrasyondaki bifosfonatların monosit, makrofaj (Hewlett, 2005), endotel (Moreau,

2007), oral epitel hücreleri (30,K2) ve periodontal ligamentlerdeki fibroblastlar (Correl, 2006; Agis, 2010 113) üzerinde oluşturduğu etkiler incelenmiştir.

Wallace ve ark. (1999)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, alendronat ve pamidronatın *in vitro* olarak sıçan gastrik mukoza dokusu üzerinde topikal uygulanmalarını takiben oluşturdukları etkiler incelenmiştir ve irritasyona neden oldukları görülmüştür. Bu irritasyonu gastrik mukoza yüzeyinde yer alan mukusun yapısındaki yüzey aktif fosfolipidlerin yapısını bozarak oluşturdukları düşünülmüştür.

Scheper ve ark. (2009) yaptıkları çalışma sonucunda bifosfonatların keratinositlerde apoptoza neden olduğunu rapor etmişlerdir. Landesberg ve ark. (2009) ise bifosfonatların keratinositlerde apoptoza neden olmadan hücre proliferasyonunda yavaşlamaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Simon ve ark. (2010) 28 gün süre ile zolendronat ve pamidronata maruz kalan insan gingival fibroblastları, osteoblastları ve osteosarkoma hücrelerinde tip I, II, III ve V kollajen üretimini araştırmışlardır. 4 hafta boyunca haftalık olarak kollajen üretimini takip etmişler ve zolendronat ve pamidronatın fibroblastlarda tip 1 kollajen üretimini devamlı olarak düşürürken, osteoblastlarda zolendronat ilk haftadan itibaren tip 1 kollajen sentezini azaltmada güçlü bir etki gösterirken pamidronatın en güçlü etkiyi 4. haftada gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Açıl ve ark. (2012) zolendronat, pamidronat, alendronat ve profosfatın 1, 5, 10, 20 μ M konstantrasyonlarda, insan gingival fibroblast, osteoblast ve osteojenik sarkoma hücrelerinde sitotoksik etkisini *in vitro* olarak değerlendirmişler. Kontrol grubunda hücre proliferasyonunu %100 olarak kabul etmişler ve diğer gruplarda buna göre değerlendirmişlerdir. 20 μ M konstantrasyonda zolendronat ve alendronat uygulanan fibroblast gruplarında uygulamanın 1. gününde %100' ün üzerindeyken, 7. günde %1,5 civarına düştüğü rapor edilmiştir. Pamidronat uygulanan grupta ise 20 μ M konsantrasyonda, uygulamanın 1. gününde %60 olan proliferasyon oranının 7. günde %37 civarına düştüğünü bildirmişlerdir. Fibroblastların tip I kollajen üretimini

değerlendirmişler ve her bir ilaç grubunda da kollajen üretiminin düştüğünü rapor etmişlerdir.

Ravosa ve ark. (2011)'nın bifosfonatların oral epitelyal hücreler ve fibroblastlarda proliferasyon, apoptoz ve göç kapasitelerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, zometanın hem oral epitel hücrelerinde hem de fibroblastlarda proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. Oral epitel hücrelerine kıyasla fibroblastlarda apoptoz oranının daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Hücre göç kapasitesini değerlendirmek için oluşturulan yaralarda kapanma oranını takip etmişler ve zometa ile muamele edilmiş fibroblastların göç kapasitesinin kontrol grubuna göre oldukça düşük ve yara kapanmasının bu grupta yavaş olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada zometanın oral fibroblastlarda COL1A1 ve COL1A2 sentezi ve depolanmasını belirgin şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir.

Bifosfonatların, yara iyileşmesinin önemli basamağı olan kollajen sentezini olumsuz etkilediği yapılan çalışmalar sonucu ortaya koyulmuştur (Açıl, 2012; Simon, 2010). Bifosfonatların dokuda oluşturduğu bu etkiyi tersine çevirecek, inhibe olmuş kollajen sentezini indükleyerek yara iyileşmesi basamaklarının normal şekilde devam etmesini sağlayacak bir mekanizmanın BRONJ'un önlenmesi ve tedavisinde faydalı olacağı düşünülebilir.

Bu çalışmalar ışığında, bu tez çalışmasında da bifosfonat ile muamele edilmiş gingival fibroblastlarda ozonun kollajen sentezine olan etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Dişeti bağ dokusunda kollajen total doku proteinin %60'ını yapar ve tip I en fazla bulunan kollajen tipidir (Narayanan, 1983, 1996; Bartold, 1998). Sağlıklı dişetinde ekstrakte edilebilen kollajenin %99' u tip I ve III, %1'den azı tip V'dir. Kollajenler, sitokinler ve büyüme faktörlerinin depolanması ve dağıtımı ile ilişkilidirler ve doku onarımı ve yara iyileşmesinde önemli rol oynarlar. Gelişim, enflamasyon ve yara iyileşmesi olaylarında çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler kollajen sentezini etkilerler (Buduneli, 2001).

Fibroblastlar, mezenkimal progenitör hücrelerden köken alan reepitelizasyon, kollajen sentezi, ekstraselüler matriks rejenerasyonu, yara remodelasyonu ve FGF, PDGF, TGF- β , VEGF gibi endojen büyüme faktörlerinin salınmasında önemli rol oynayan hücrelerdir. Genel olarak proliferasyon kapasitesi yüksek olan hücrelerdir ve bu nedenle üretilmeleri oldukça kolaydır (Kim, 2009). Bizim çalışmamızda da bifosfonatların olumsuz etkilediği, yara iyileşmesinde önemli bir basamak olan kollajen sentezi değerlendirileceği için insan primer gingival fibroblast kültürleri kullanılmıştır.

Sürmemiş dişlerin ortodontik tedavi ile sürdürülebilmesi için dişin üzerindeki dişeti dokusu eksize edilerek diş yüzeyi açığa çıkarılmaktadır. Bu çalışmada da, fibroblast elde etmek için ortodontik amaçla diş üzeri açılması işleminden eksize edilen, zaten atılacak olan dokular kullanılmıştır.

Hücre kültürlerinde pasaj sayısı arttıkça hücrelerin morfolojisi, hücre bölünme hızı ve canlılığı değişmektedir (Leigh, 1996). Bu çalışmada da bu durum göz önünde bulundurularak gingival fibroblast kültür eldesi için hastalardan elde edilen canlı dokular kullanılmıştır.

Yaş, genel sağlık durumu, kişisel alışkanlıklar ve kullanılmakta olan ilaçların oral mukoza hücreleri ve kollajen sentezi üzerindeki etkileri göz önünde bulundurularak, bu çalışmaya 18-30 yaş arası, herhangi bir sistemik hastalığı ve ilaç kullanımı olmayan, sigara ve alkol kullanmayan hastalar dahil edilmiştir (Cardelli, 1992; Johnson, 1986).

2003 yılından bu yana her geçen gün artan BRONJ vakalarına rağmen geçerli ve evrensel olarak kabul görmüş bir tedavi yöntemi henüz yoktur. Agresif cerrahi işlemlerden kaçınmak, profilaktik antibiyotik kullanımı, klorheksidinli ağız gargarları, yüzeysel küretaj gibi konservatif yaklaşımların yanı sıra, hiperbarik oksijen tedavisi (HBO) gibi alternatif yöntemler de BRONJ tedavisi için yetersiz kalmıştır (Ripamonti, 2011; Petrucci, 2007; Agrillo, 2007).

Antibakteriyel etkisi ve yara iyileştirici özellikleri sebebiyle yaklaşık 100 yıldır tıp ve diş hekimliğinde çeşitli alanlarda teröpatik olarak kullanılmakta olan ozonun BRONJ tedavisinde kullanımına ilişkin vaka raporları gündeme gelmiştir (Agrillo, 2006, 2007; Ripamonti, 2012). BRONJ tedavisinde ozon kullanımı ve sonuçlarının başarılı olduğuna dair literatürde vaka raporları mevcuttur ancak ozonun bifosfonatların hangi etkisini ne yönde değiştirerek BRONJ tedavisinde olumlu sonuçlar elde edilmesini sağladığına dair detaylı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ripamonti ve ark. (2011) konservatif tedaviye yanıt vermeyen 10 hastada, 2,5 cm ve daha küçük BRONJ lezyonlarında yağ süspansiyonu içinde medikal ozon uygulamasının etkinliğini değerlendirmişlerdir. Ozon terapisine başlamadan önce tüm hastalara 10 gün süre ile antibiyotik tedavisi uygulanmış ve ozon tedavisine başlamadan önce yara kenarları ultrasonik temizleyici ile temizlenmiş ve lezyonlara 10 dakikalık seanslar ile ozonlanmış yağ uygulaması yapılmıştır. Hastaların 3'ünde 3. seans sonunda, 4'ünde 4. seans sonunda ve 3'ünde de 10. seans sonunda tamamen iyileşme sağlandığını rapor etmişlerdir.

Agrillo ve ark. (2006) BRONJ tedavisinde ozon jeneratörü (OzonyTronX) kullanarak, 20 gün boyunca haftada 2 kez 5'er dk uygulama şeklini yeni bir tedavi protokolü olarak rapor etmişlerdir.

Agrillo ve ark. (2007) bir başka çalışmaları sonucunda, bifosfonat terapisi görmekte olan hastalarda işlem öncesi ve sonrasında antibiyotik tedavisi ile birlikte, haftada 3'er dakikalık 2 seans olmak üzere toplam 8 seans, ozon jeneratörü ile ozon uygulaması sonucunda diş çekimin mümkün olduğunu rapor etmişlerdir.

Ozon en iyi bakterisid, antiviral ve antifungal ajanlardan biri olarak bilinir ve ampirik olarak kronik yara tedavisi, trofik ülser, iskemik ülser ve diyabetik yara tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ozonun yara iyileşmesindeki etkisi bakteriyel enfeksiyonun azalması veya yara bölgesinde oksijenlenmenin artması ile bağdaştırılmaktadır (Kim, 2009).

O₃, hücre içi H₂O₂ artışına neden olur ve H₂O₂, enflamatuar olayları ve dolayısıyla bütün yara iyileşmesini düzenlemede etkili olan transkripsiyon faktör NFKB aktivasyonundan sorumludur. H₂O₂ insan keratinositlerinde VEGF ekspresyonunun indükleyicisi olarak yara iyileşmesini stimüle etmektedir (Lim, 2006; Bocci, 1999).

Lang ve ark., *in vitro* ozon uygulamasının insan bronkoepitelyal hücrelerinde prokollojen α_1 (I), α_1 (III) ve insan akciğer fibroblastlarında TGF β 1 gen ekspresyonunu arttırdığını rapor etmişlerdir. TGF β 'nın *in vitro* olarak fibroblast gen ekspresyonunu ve tip I ve tip III kollojen sentezini stimüle ettiğini bildirmişlerdir (Lang, 1998).

Kim ve ark. topikal ozonlanmış zeytinyağının akut kütanöz yara iyileşmesi üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, ozonlanmış yağın fibroblast sayısı ve kollajen sentezini uygulamanın 7. gününde diğer gruplara kıyasla belirgin şekilde attırdığını, PDGF, TGF- β , VEGF ekspresyonunda ve damarlanmada artış sağladığını böylece akut kütanöz yara iyileşmesini belirgin şekilde desteklediğini rapor etmişlerdir. Ozonun akut yara iyileşmesinde direkt ve indirekt olarak kollajen sentezi ve fibroblast proliferasyonuna etkili olduğunu belirtmişlerdir (Kim, 2009).

Yapılan çalışmalar, FGF, PDGF, TGF- β ve VEGF gibi endojen büyüme faktörlerinin yara iyileşme sürecini koordine eden önemli polipeptidler olduğunu rapor etmişlerdir. Bu faktörler yara bölgesindeki makrofajlar, fibroblastlar ve keratinositler tarafından salınarak reepitelizasyon, granülasyon dokusu oluşumu, kollajen sentezi ve yeniden damarlanma olaylarında görev alırlar (Kim, 2009).

TGF β ailesinin üyeleri hücre proliferasyon ve diferansiasyonunu, ekstraselüler matriks modifikasyonunu, anjiyogenez, apoptoz ve immunosupresyonu düzenleyen multifonksiyonel proteinlerdir. TGF β makrofaj/monosit, lenfosit, platelet, fibroblast, osteoblast ve osteoklast gibi pek çok hücre tipi tarafından sentezlenmektedir. Osteoblast ve fibroblast başta olmak üzere neredeyse tüm hücrelerde TGF β reseptörü bulunmaktadır. TGF β 'nın tip I kollajen sentezindeki rolü *in vivo* ve *in vitro* olarak çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Platelet kaynaklı TGF β 'nın subkütanöz enjeksiyonu

yeni doğmuş farelerde dermal fibroblastlar tarafından artmış tip I kollajen sentezi ve granülasyon dokusu formasyonu ile sonuçlanmıştır (Bilezikian, 2008).

OzonyTronX medikal ozon jeneratörü üretici firması, gingival doku için cihazın 3. kademesinde, $10\text{sn}/\text{cm}^2$ süre ile uygulama önermektedir. Bu çalışmada da üretici firmanın önerisi doğrultusunda GI prob ucu kullanılarak, 3. kademe, 25 cm^2 'lik flask için 250 sn ($10\text{sn}/\text{cm}^2$) uygulama yapılmıştır. Bu uygulama süresi ve dozu klinik uygulama içindir ancak *in vitro* uygulama için herhangi bir çalışma ve veri bulunmadığından, uygulama *in vivo* için önerilen doğrultuda yapılmıştır.

Çalışmamızda, yalnızca pamidronat uygulanan grupta 24 saat inkübe edilen kültürlerde ortalama COL1A1 ve COL1A2 ifadelenmeleri pamidronat uygulanarak 48 ve 72 saat inkübe edilen kültürlerle, yalnızca ozon uygulanan gruba ve kontrol grubuna göre bir miktar artış gösterirken, pamidronat + ozon uygulanan gruplara göre yaklaşık 2,5 kat artış göstermiştir.

Soydan (2011), pamidronat ve alendronatın gingival fibroblastlara etkisini inceledikleri *in vitro* çalışmalarında her iki ilaç uygulamasını takiben ilk 12 saat içinde kültürlerde proliferasyonda %2 oranında bir artış olurken 24 saatten itibaren hücrelerde apoptoz görüldüğünü ve apoptozun 72. Saatte en yüksek seviyeye ulaştığını belirtmişlerdir Soydan'ın bulguları da göz önünde bulundurulduğunda, hasarsız hücrelere uygulanan pamidronat sonrası ilk 24 saatte görülen kollajen sentezi artışının hücrelerin kendileri için toksik olan pamidronat karşısında ilk etapta savunmaya geçerek proliferasyon olması ve hasarlıymış gibi kollajen sentezleyerek pamidronat ile başa çıkma mücadelesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir.

Pamidronat grubunda 24. saatten sonra COL1A1 ifadelenmesinde azalma meydana gelmiş ve 72. saatte kontrol grubundaki ifadelenmenin pamidronat grubunun yaklaşık 1,6 katı olduğu görüşmüştür. İfadelenmedeki azalmanın, hücre savunmasının pamidronat karşısında etkisiz kalıp, pamidronatın toksik etkisinin ortaya çıkmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. COL1A2 ifadelenmesinin 72. saatteki değeri 24. saatteki

değeri ile yakın ve pamidronat+ozon ve kontrol grupları ile belirgin farklılık göstermezken ozon grubu ile farklılık göstermiştir.

Ozonun tek başına uygulandığı grupta 24. saatte COL1A1 ve COL1A2 ifadenmesinin kontrol grubu ile benzer değerlerde olduğu ancak 48. saatte belirgin bir artış ile COL1A1 ifadenmesinin, pamidronat + ozon grubunun yaklaşık 5 katı, kontrol ve pamidronat gruplarının yaklaşık 2 katı olduğu görülmüştür. COL1A2 ifadenmesi ise pamidronat + ozon grubunun yaklaşık 4 katı, pamidronat ve kontrol gruplarının ise yaklaşık 2 katı değerlerde bulunmuştur.

Ozonun tek başına uygulanması sonucu, COL1A1 ve COL1A2 gen ifadenmesinin ilk 24 saatte kontrol grubu ile eşit değerlerde görülürken, 48. saatte ifadenmenin kontrol grubuna göre belirgin artış göstermesinin, ozonun kollajen sentezine direk olarak etki göstermeyip, kollajen sentezinde etkili TGF β , PDGF gibi faktörler aracılığı ile etkili olmasından ve kollajen artışından önce bu faktörler ile ilgili yollarda etkili olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir. 72. saatte COL1A1 ifadenmesinde 48. saate göre çok az bir düşüş meydana gelirken, COL1A2 ifadenmesinde değerler 48. saat ile aynı değerlerde kalmıştır.

Ozon cihazının probu dokuya temas ettiği anda ortamda bulunan oksijen molekülü (O_2) atomlarına ayrılmaktadır. Bu atomik oksijen, geçici olarak ortamdaki oksijen molekülü (O_2) ile birleşerek ozon (O_3) gazını oluşturur (Çetinkaya, 2011). 72. saatte COL1A1 ifadenmesindeki düşüş ve COL1A2 ifadenmesinde artış olmaması ozon gazının geçici olarak oluşan bir molekül olması ve dolayısıyla zaman içinde kültür ortamından uzaklaşmasının ve kültürle yalnızca 1 kez ozon uygulanıp tekrarlayan uygulamaların yapılmamasının sonucu olarak yorumlanabilir. Tekrarlayan uygulamaların yapılmış olmasının ifadenmedeki düşüşü engelleyebileceği düşünülebilir.

COL1A2 ifadenmesinde, COL1A1 ifadenmesindeki azalmanın görülmeyip aynı seviyede devam etmesi ozonun etkilediği ve kollajen sentezinde görevli olan

faktörlerin COL1A1 ve COL1A2 transkripsiyonunun farklı aşamalarında devreye girmelerinden kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Bifosfonat kullanımına bağlı çene kemiklerinde görülen nekroz, ilaç kullanımına başlar başlamaz değil, uzun süre kullanımı sonucunda, dokuda toksik etkisini gösterip, hasar meydana getirmesi sonucunda görülen bir tablodur. Dolayısıyla klinik uygulamada ozon terapisi bifosfonatlar ile eş zamanlı değil, ilaçların uzun süre kullanımı sonrası, kümülatif etkisi sonucu rejenerasyon kapasitesi bozulmuş olan dokuya uygulanmaktadır. Bu nedenle çalışmamızdaki kültürlerle bifosfonat uygulaması ile eş zamanlı ozon uygulamasının yanı sıra bifosfonat uygulamasından 24 saat sonra ozon uygulaması yapılarak hem ozonun bifosfonatların kollajen sentezine olan etkisini engelleyip engelleyemediği, hem de bozulmuş olan kollajen sentezini tekrar normale döndürme yeteneğinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Pamidronat ve ozon birlikte uygulanarak 24 saat inkübe edilen kültürlerle pamidronat ve ozon 0. saatte eş zamanlı olarak uygulanmıştır. 48 ve 72 saat inkübe edilen kültürlerle ise pamidronat 0. saatte uygulanmış ve 24. saatte ozon uygulaması yapılmıştır. Dolayısıyla 48 saat inkübe edilen kültürlerin ozona maruz kalma süresi 24 saat iken, 72 saat inkübe edilen kültürlerin ozona maruz kalma süresi 48 saattir.

Pamidronat ve ozon birlikte uygulanarak 24 saat inkübe edilen ve bifosfonat uygulamasının 24. saatinde ozon uygulanarak 48 saat inkübe edilen gruplarda COL1A1 ve COL1A2 ifadelenmeleri, pamidronat ve ozonun tek başına uygulandığı gruplara ve kontrol grubuna göre belirgin şekilde düşük bulunmuştur. Yapılan literatür taramasında bu konu ile ilgili bir literatür bilgisine rastlanmamakla birlikte, bu gruplardaki her iki gen ifadelenmesinin de düşük çıkmasının, pamidronat ve ozon arasında meydana gelen etkileşim sonucu, birlikte uygulandıklarında antagonist etki göstermelerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Pamidronat ile ozonun birlikte uygulandığı kültürlerde 72. saatte yani ozon ile 48 saat muamale sonucunda hem COL1A1 hem de COL1A2 ifadelenmeleri artış göstererek 24 ve 48 saat inkübe edilen kültürlerdeki ifadelenmelerin yaklaşık 3,5 katı

görülmüştür. Bu bulgu yalnızca ozon uygulanan grupta uyumlu olup ozon hem COL1A1 hem de COL1A2 ifadenmesinde 48. saatte maksimum etkisini göstermiştir.

Kontrol grubunda, her iki gen ifadenmesinde de zaman ile artış görülmüştür. Kültür mediumları %10 FBS içermektedir ve FBS içinde bulunan büyüme faktörleri sebebiyle bu artışın meydana geldiği düşünülebilir.

Bu çalışmada her ne kadar sağlam dokuya pamidronat uygulanarak ozonun BRONJ tedavisindeki etkisi değerlendirilmiş olsa da, ozonun hem COL1A1 hem de COL1A2 ifadenmesini arttırdığı görülmüştür. Çalışmamızda ozonun COL1A1 ve COL1A2 ifadenmesine olan etkisini uygulanması sonrası 48 saat sonunda gösterdiği ve tekrarlayan ozon uygulamaları yapılmadığında, ozonun ortamdan uzaklaşmasıyla etkisinin ortadan kalktığı görüldü. Bu bulgular doğrultusunda 48 saat aralıklarla tekrarlayan ozon uygulamasının gerekli olduğu kanısına varılabilir.

Bulgularımıza göre COL1A1 ve COL1A2 gen ifadenmelerinde ozonun hem tek başına hem de pamidronat ile birlikte uygulandığında 48. saatte maksimum etkisi görülmektedir. Yalnızca ozon uygulanan grupta 48. saatte her iki gen ifadenmesinde de kontrol grubuna göre belirgin artış görülmüştür. Pamidronat ve ozonun birlikte uygulandığı grupta 72. Saatte, yani ozon uygulamasından sonra 48 saat inkübe edilen grupta 24 ve 48. saatlere göre COL1A1 ifadenmesi yaklaşık 3 kat, COL1A2 ifadenmesi ise yaklaşık 2,5 kat olarak görülmüştür. İfadenmelerdeki bu farklılıklar belirgin olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Örnek sayısının az ve örnekler arasındaki gen ifadenme düzeyi değerlerinin standart sapmalarının fazla olmasının istatistiksel olarak anlamlılık çıkmasını engellemiş olabileceği düşünülmektedir. Örnek sayısının daha fazla olmasının, bulguların istatistiksel olarak da anlamlı çıkmasını sağlayabileceği düşünülebilir.

Yaptığımız literatür taramasında BRONJ tedavisinde ozonun etkinliğinin değerlendirildiği *in vitro* bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile ozonun bifosfonatlar ile muamele edilmiş gingival fibroblastlar üzerindeki etkisi konusunda

fikir sahibi olarak, daha sonraki çalışmalara temel oluşturmak hedeflenmiştir ve bu nedenle az örnek sayısı ile çalışma planlanmıştır.

Daha önce pamidronatın fibroblastlarda kollajen sentezine etkisinin değerlendirildiği çalışmalarda en yüksek 20 µM konsantrasyon ile çalışılmıştır (Açıl, 2012; Simon, 2010). Bizim çalışmamızda kullanılan konsantrasyon, pamidronatın gingival fibroblastlarda hücre çoğalmasını %50 oranında engelleyen inhibitör konsantrasyonunu (IC₅₀) olan 10⁻⁴M (100 µM)'dır ve diğer çalışmalara göre oldukça yüksektir. Düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru değişen aralıkta pamidronat uygulamalarının yapılmasının kollajen sentezinin en fazla etkilendiği ilaç konsantrasyonunu görmemizi ve ileriki çalışmalarda bu konsantrasyon ile çalışarak daha anlamlı sonuçlar elde etmemizi sağlayacağı düşünülebilir.

Klinikte pamidronatın uzun süre kullanımı sonrası, ilacın metabolitlerinin dokuda birikimi sonucu oral mukozada etkilerini görürken, bu çalışmada hücre kültürüne ilacın saf formu ve toksik dozu bir anda uygulanarak değerlendirilmiştir. Hücre kültürlerine daha düşük doz pamidronatın uzun süre, yavaş yavaş uygulanmış olmasının daha farklı sonuçlar elde edilmesini sağlayacağı düşünülebilir.

Ozonun BRONJ tedavisindeki etkinliğine dair vaka raporları mevcuttur. Ancak ozonun bu lezyonlarda olumlu etkisini hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği net olarak bilinmemektedir. Ozonun yara iyileştirme etkisinin antimikrobiyal etkisi sebebiyle yara bölgesinde enfeksiyonu önlemesi ve yara bölgesinin oksijenlenmesinin artmasını sağlaması ile açıklanmaktadır (Kim, 2009). Bizim çalışmamız da vaka raporları ile uyumlu olarak ozonun, bifosfonatlara bağlı olarak yumuşak dokuda oluşan yaranın tedavisinde, bozulmuş olan kollajen sentezini indükleyerek etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürde ozonun BRONJ tedavisindeki etkinliğinin değerlendirildiği yumuşak dokuya ilişkin herhangi bir *in vitro* çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi ozonun, yara iyileşmesinde etkili farklı mekanizmalar üzerine olan etkisinin değerlendirildiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar gereklidir. Bu sayede etki ettiği olaylar ve

basamakları açıklanarak ozonun klinik kullanımının daha akılcı, yerinde olması ve sonuçlarının daha başarılı olması sağlanabilir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarının da desteklediği gibi bifosfonatların oral yumuşak dokuda oluşturdukları olumsuzlukların geri çevrilmesine yönelik, yara iyileşmesini hızlandıracak, proliferasyonu indükleyecek önlemler yumuşak doku ülserasyonu sonucu kemikteki ekspozu önleyerek, BRONJ'un tedavisinde faydalı olabilecektir. Bifosfonat kullanımına bağlı oral yumuşak dokuda meydana gelen yıkımları gidermeye yönelik daha ileri bilimsel araştırmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gingival fibroblastlarda bisfosfonat uygulamasına bağlı oluşan yaranın iyileşmesinde ozonun etkilerinin *in vitro* olarak değerlendirildiği çalışmamızın bulgularına göre;

1. Pamidronat, gingival fibroblast kültürlerinde uygulama sonrası ilk 24 saatten sonra COL1A1 ve COL1A2 gen ifadenmelerini azaltmaktadır
2. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olmasa da, ozon hem tek başına uygulandığında hem de pamidronat ile muamele edilmiş gingival fibroblast kültürlerine uygulandığında COL1A1 ve COL1A2 gen ifadenmelerini arttırmaktadır
3. Ozon COL1A1 ve COL1A2 ifadenmelerine olan maksimum etkisini uygulama sonrası 48. saatte göstermektedir
4. Tekrarlayan ozon uygulaması yapılmadığında ozon geçici olarak oluşan bir gaz olması sebebiyle ortamdan uzaklaşarak etkisini kaybetmektedir ve tekrarlayan uygulamaların yapılması gereklidir.

Çalışmamızın bulguları doğrultusunda, ozonun yara iyileşmesinin önemli bir basamağı olan kollajen sentezini arttırdığı görülmüştür. Hem BRONJ hemde oral mukozada iyileşmenin geciktiği durumlarda uygun aralıklarla ozon uygulaması faydalı olacaktır.

BRONJ'un önlenmesi ve tedavisinde gelişme sağlayabilmek için hem oral yumuşak doku hem de sert dokuya yönelik daha çok klinik ve laboratuvar çalışmasına ihtiyaç vardır. BRONJ'un patogeneğinde hem yumuşak hem de sert dokunun rolü düşünülerek, bu patolojinin oluşmasını önleyecek veya oluştuğu zaman geri çevirebilecek teröpatik yöntemler ile ilgili ileri *in vitro* çalışmalar planlanmalıdır.

Ozonun BRONJ tedavisinde oral yumuşak dokudaki etkilerinin aydınlatılması için yapılacak daha ileri çalışmalarda;

- rnek sayısı arttırılarak farklı ozon dozları ve farklı uygulama süreleri ile çalışmalar yapılarak en etkili ozon doz ve süresi belirlenmelidir
- Tekrarlayan ozon uygulamaları içeren, 48 saat aralıklar ile ozonun uygulandığı, kültürlerin daha uzun süre inkübe edildiği çalışmalar yapılarak ozonun uzun dönem etkileri değerlendirilmelidir
- Bifosfonatların ve ozonun, kollajen sentezinin önceki basamaklarında etkili TGFβ, PDGF gibi büyüme faktörleri üzerine olan etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar ile etki mekanizmaları ortaya koyulmalıdır.
- Ozonun oral mukozanın ve yara iyileşmesinin önemli hücreleri olan keratinositlere olan etkisi çalışılmalıdır.
- Bizim çalışmamız da dahil olmak üzere bundan önce yapılmış tüm bifosfonat-oral yumuşak doku ilişkisini inceleyen çalışmalar sağlıklı hücreler üzerinde yapılmıştır. Klinikte BRONJ'un uzun süre bifosfonat terapisi görmüş bireylerde oluştuğu göz önünde bulundurularak, bifosfonata belli süre maruz kalmış dişeti dokusunda ozonun etkileri çalışılmalıdır.

KAYNAKLAR

- ABBAS, K., MITCHELL, F. (2007). Robbins Basic Pathology, 8th Ed. PHILADELPHIA: Saunders Elsevier Publishing, Chapter 3.
- AÇİL, Y., MÖLLER, B., NIEHOFF P., RACHKO, K., GASSLING, V., WILTFANG, J., SIMON, M. J. K. (2012). The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg* **40**: 229-235.
- AGIS, H., BLEI, J., WATZEK, G., GRUBER, R. (2010). Is zoledronate toxic to human preiodontal fibroblasts? *J Dent Res.* **89**:40-45.
- AGRILLO, A., PETRUCCI, M. T., TEDALDI, M., MUSTAZZA, M. C, SİMONE MARİA FAUSTINO MARINO, S. M.F., GALLUCCI, C., IANNETTI, G. (2006). new therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaws. *The Journal of Craniofacial Surgery.* **17(6)**: 1080-1083.
- ALLEN, M. R., BURR, D. B. (2008). Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* **66**: 987-994.
- ALLEN, M. R., BURR, D. B. (2009a). The Pathogenesis of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: So Many Hypotheses, So Few Data. *J Oral Maxillofac Surg.* **67**: 61-70.
- ALLEN, M. R. (2009b). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: moving from the bedside to the bench. *Cells Tissues Organs.* **189**: 289–294.
- ALMAZROOA, S. A., WOO, S. B. (2009). Bisphosphonate and nonbisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review. *J Dent Assoc.* **140**: 864-875.
- American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. (2007) *J Oral Maxillofac Surg.* **65**: 369-376.
- ARCE, K., ASSAEL, L. A., WEISSMAN, J. L., MARKIEWICZ, M.R. (2009). Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* **67**: 75-84.

- ARITA M, NAGAYOSHI M, FUKUIZUMI T, OKINAGA, T., MASUMI, S., MORIKAWA M., KAKINOKI, Y., NISHIHARA, T. (2005). Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiology & Immunology*. **20**: 206-210.
- ASHCROFT, A. J., DAVIS F. E., MORGAQN G. J. (2003). Aetiology of bone disease and role of bisphosphonates in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. **4**: 284-292.
- AZARPAZHOOH, A., LIMEBACK, H. (2008). The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *Journal of Dentistry*. **36**: 104-116.
- AZARPAZHOOH, A., LIMEBACK, H., LAWRENCE, H. P., FILLERY, E. D. (2009). Evaluating the effect of an ozone delivery system on the reversal of dentin hypersensitivity: a randomized, doubleblinded clinical trial. *J Endod*. **35**: 1-9.
- BADROS, A., WEIKEL, D., SALAMA, A., GOLOUBEVA, O., SCHNEIDER, A., RAPOPORT, A., FENTON, R., GAHRES, N., SAUSVILLE, E., ORD, R., MEILLER, T. (2006). Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *Journal of Clinical Oncology*. **24**: 945-952.
- BANZRAGCH, M. (2010). Multipl myelom tanılı hastalarda serum ctx düzeyi ve kullanılan bifosfonat tedavisi sonrası oluşan çene nekrozu insidansı ile serum ctx düzeyinin ilişkisi. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul.
- BARTOLD, P.M., NARAYANAN, A. S. (1998). Biology of the periodontal connective tissues. CHICAGO: Quintessence Publishing. 73-92.
- BAUM, C., ARPEY, C. (2005). Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*. **31**(6): 674-686.
- BAYSAN, A., WHILEY, R. (2000). Anti microbial effects of a novel ozone generating device on microorganisms associated with primary root carious lesion in vitro. *Caries Res*. **34**: 498-501.
- BEDOJNI ,A., BLANDAMURA, S., LOKMIC, Z., PALUMBO, C., RAGAZZO, M., FERRARI, F., TREGNAGHI, A., PIETROGRANDE, F., PROCOPIO, O., SAIA, G., FERRETT, M., BEDOGNI, G., CHIARINI, L., FERRONATO, G.,
- BEDOJNI, A., SAIA, G., RAGAZZO, M., CAPELLI, P., D’ALESSANDRO, E., NOCINI, P. F., RUSSO, L., MOZIO, L., BLANDAMURA, S. (2007). Bisphosphonate-associated osteonecrosis can hide jaw metastases. *Bone* **41**: 942-945.

- BHATEJA S. (2012). The miraculous healing therapy- ‘‘Ozone therapy’’ in dentistry. *Indian Journal of Dentistry*. **3(3)**: 150-155.
- BIANCHI, S. D., SCOLETTA, M., CASSIONE, F. B., MIGLIARETTI, G., MOZZATI, M. (2007). Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. **104**: 249-258.
- BILEZIKIAN, J. P., LAWRENCE, G. R., MARTIN, J. T. (2008). Principles of Bone Biology, Vol 1, 3rd Ed. Elsevier Publishing, chapter 15.
- BOCCI, V. (1999). Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *British Journal of Biomedical Science*. **56**: 270-279.
- BOCCI, V. (2004). Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of Inflammation*. **13**: 3-11.
- BOCCI, V. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research*. **37**: 425-435.
- BOCCI, V., BORELLI, E.(2009). The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev*. **29**: 646-682.
- BOYCE, RW, PADDOCK, CL, GLEASON, JR, W.K. SLETSEMA, W. K., ERIKSEN, E. F. (1995). The effects of risedronate on canine cancellous bone remodeling: Threedimensional kinetic reconstruction of the remodeling site. *J Bone Miner Res* **10**: 211-221.
- BROUGHTON, G., JANIS, J., ATTINGER, C.(2006) Wound healing: An overview. *Plastic and Reconstructive Surg*. **117** (7): 1-32.
- BUDUNELİ, N. (2001). Dişetin ekstraselüler matriksi. *EÜ Dişhek Fak Derg*. **22**:1-12.
- CARDELLI, P., ZELLI, G., BOVE, E., MASSARI, F., MODESTI, M., SCARPA, S.(1992). The modification of the extracellular matrix synthesized in vitro by human gingival fibroblasts in relation to aging. *G Chir*.**13**:83-6.
- CARDOSO, M. G., DE OLIVEIRA, L. D., KOGA-ITO, C. Y., JORGE, A.O. (2008). Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. **105**: 85-91.

- CORREIA, V. D. , CALDEIRA, C. L., MARQUES, M. M. (2006). Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dental Traumatol.* **22**: 312–317.
- COXON, J. P., OADES, G. M., KIRBY, R. S., COLSTON, K. W. (2004). Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU Int.* **94**: 164-170.
- CRYER, B., BAUER, D. C. (2002). Oral bisphosphonates and upper gastrointestinal tract problems: what is the evidence? *Mayo Clin Proc.* **77**: 1031-1043.
- CZURYSZKIEWICZ, T., AREVA, S., HONKANEN, M., LINDEN, M. (2005). Synthesis of sol-gel silica materials providing a slow release of bisphosphonate: Colloids and Surfaces A Physicochem. *Eng Aspects.* **254**: 69-74.
- ÇETİNKAYA, M. (2011) Ozon Tedavisi Uygulanan Ve Uygulanmayan İki Fissür Örtücünün İn-Vivo, İn-Vitro Ve İn-Situ Koşullarda Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- DÄHNHARDT, J. E., GYGAX, M., MARTIGNONI, B., SUTER, P., LUSSI, A. (2008). Treating sensitive cervical areas with ozone. a prospective controlled clinical trial. *Am J Dent.* **21**: 74-76.
- DANNEMANN, C., ZWAHLEN, R., GRATZ, K. W. (2006). Clinical experiences with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *Swiss Med Wkly.* **136**: 504-9.
- DELANIAN, S., PORCHER, R., RUDANT, J., LEFAIX, J. L. (2005). Kinetics of response to longterm treatment combining pentoxifyline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol.* **23**: 8570-8579.
- Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy. 2008 Expert panel recommendations of American Dental Association Council on Scientific Affairs.
- DURIE, B. G., KATZ, M., CROWLEY, J. (2005). Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates. *N Engl J Med.* **353**: 99-102.
- EBENSBERGER, U., POHL, Y. (2002). PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. *Dent Traumatol* 2002; **18**: 262-266.

- ERIKSEN, E. F., MELSEN, F., SOD, E., BARTON, I., CHINES, A.(2002). Effects of long-term risedronate on bone quality and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone*. **31**: 620-625.
- ESTRELA, C., ESTRELA, CRA., DECURCIO, D. A., HOLLANDA, A. C. B., SILVA, J. A. (2007). Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J*. **40**: 85-93.
- FILIPPI, A. The influence of ozonised water on the epithelial wound healing process in the oral cavity. Clinic of Oral Surgery, Radiology and Oral Medicine, University of Basel, Switzerland. Available at: URL:<<http://www.OXYPLUS.NET>>
- FLEISCH, H. (2000). Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient. San Diego. Academic press. 4th Ed.178-179.
- FLEISCH, H.(1998). Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev*. **19**: 80-100.
- FLEISCH, H., BIZSAZ, S., CASEY, P. A., MÜHLBAUER, R. C. (1968). The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Res*. **2**: 10-10a.
- FLEISHER, K. E., WELCH, G., KOTTAL, S., CRAIG, R. G., SAXENA, D., GLICKMAN, R. S. (2010). Predicting risk for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: CTX versus radiographic markers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. **110**: 509-516.
- FONT, R. F., GARCIA M. L., MARTINEZ J. M. (2008). Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments: Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. **13**:318-324.
- FOURNIER, P., BOISSIER, S., FILLEUR, S., GUGLIELMI, J., CABON, F., COLOMBEL, M., CLEZARDIN, P. (2002). Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res*. **62**: 6538-6544.
- FREIBERGER, J. J., PADILLA-BURGOS, R., CHHOEU, A. H., KRAFT, K. H., BONETA, O., MOON, R. E., PIANTADOSI, C. A. (2007). Hyperbaric oxygen treatment and bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a case series. *J Oral Maxillofac Surg*. **65**: 1321-1327.

- GARCIA-MORENO, C., SERRANO, S., NACHER, M., FARRE, M., DIEZ, A., MARINOSO, M. L., CARBONELL, J., MELLIBOSKY, L., NOGUES, X., BALLESTER, J., AUBIA, J. (1998). Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone*. **22**:233-239.
- GARG, R., TANDON, S. (2009). Ozone: a new face of dentistry. *Int J Dent Sci*. **7**: 2.
- GARRETT-SINHA, L., RAGHAVAN, S. (2008). Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral and Maxillofac Surg*. **66**: 839-847.
- GOPALAKRISHNAN S., PARTHIBAN S. (2012). Ozone- A new revolution in dentistry. **1(3)**: 58-69.
- GOSAIN, A., DIPIETRO, L. A. (2004). Aging and wound healing. *World J Surg*. **28**: 321-326.
- GUNIL, I. M., QURESHI, S. A., KENNEY, J., RUBASH, H. E., SHANBHAG, A. S. (2004). Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*. **25**: 4105–4115.
- GUO, S., DIPIETRO, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *J Dent Res* **89** (3): 219-229.
- GUPTA, G., MANSI, B. (2012). Ozone therapy in periodontics. *Journal of Medicine and Life*. **5(1)**: 59-67.
- GUTTA, R., LOUIS, P.J. (2007). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. **104**: 186-193.
- GÜNHAN, O., YILDIZ, E., KARSLIOĞLU, Y., AYDINTUĞ, Y., DOĞAN, N., CELASUN, B. (2003). Nuclear morphometric features of epithelial cells lining keratocytes. *Anal Quant Cytol Histol*. **25**:85-89.
- HANSEN, T., KUNKEL, M., SPRINGER, E., WALTER, C., WEBER, A., SIEGEL, E., KIRKPATRICK, J. C. (2007). Actinomycosis of the jaws—Histopathological study of 45 patients shows significant involvement in bisphosphonate-associated osteonecrosis and infected osteoradionecrosis. *Virchows Arch*. **451**: 1009-1017.
- HANSEN, T., KUNKEL, M., WEBER, A., KIRKPATRICK, J. C. (2006). Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates—

- Histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med.* **35**: 155-160.
- HELLSTEIN, J. W., MAREK, C. L. (2005). Bisphosphonate osteochemonecrosis (bisphossy jaw): Is this phossy jaw of the 21st century? *J Oral Maxillofac Surg.* **63**: 682-689.
- HEWITT, R. E., LISSINA, A., GREEN, A. E., SLAY, E. S., PRICE, D. A., SEWELL, A. K. (2005). The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gamma delta T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins. *Clin Exp Immunol.* **139**:101–111.
- HOFF, A. O., TOTH, B. B., ALTUNDAG, K., JOHNSON, M. M.,WARNEKE, C. L., HU, M., NOOKA, A., SAYEGH, G., GUARNERI, V., DESROULEAUX, K., CUI J., ADAMUS, A., GAGEL, R. F., HORTOBAGYI, G. N. (2008). Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* **23**: 826-836.
- HUTH K, C., JAKOB, F.M., SAUGEL, B., CAPPELLO, C., PASCHOS, E., HOLLWECK, R., HICKEL, R., BRANK, K. (2006). Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci.* **114**: 435-440.
- JOHNSON, B. D., PAGE, R. C., NARAYANAN, A. S., PIETERS, H.P. (1986) Effects of donor age on protein and collagen synthesis in vitro by human diploid fibroblasts. *Lab Invest.* **55**: 490-496.
- KAPLAN, I., ANAVI, K., ANAVI, Y., CALDERON, S., SCHWARTZ-ARAD, D., TEICHER, S., HRSHBERG, A.,TIQVA, P., HASHARON, R., HASHOMER, T. (2009). The clinical spectrum of Actinomyces-associated lesions of the oral mucosa and jawbones: correlations with histomorphometric analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **108**: 738-746.
- KARAPETIAN, V.E., LOWDEN, E. (2007). The Use ofOzone in Periimplantitis-Treatment. *Das Deutsche Zahnärzteblatt.* **116**: 214- 218.
- KATZ, H. (2005). Endodontic Implications of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: a report of three cases. *J Endod.* **31**: 831-834.

- KATZ, H., GONG, Y., SALMASINIA, D., HOU, W., BURKLEY, B., FERREIRA, P., CASANOVA, O., LANGAEE, T. Y., MOREB, J. S. (2011). Genetic polymorphisms and other risk factors associated with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg.* **40**: 605-611.
- KENT, L. W., DYKEN, R. A., RAHEMTULLA, F., ALLISON, A. C., MICHALEK, S. M. (1996). Effect of *in vitro* passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression. *Archs oral Biol.* **41**: 263-270.
- KHAMAÏSİ, M., REGEV, E., YAROM, N., AVNI, B., LEITERSDORF, E., RAZ, I., ELAD, S. (2007). Possible association between diabetes and bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Clin Endocrinol Metab.* **92**: 1172-1175.
- KHOSLA, S., BURR, D., CAULEY, J., DEMPSTER, D. W., EBELING, P. R., FELSENBURG, D., GAGEL, R. F., GILSANZ, V., GUISE, T., KOKA, S., McCAULEY, L. K., McGOWAN, J., McKEE, M. D., MOHLA, S., PENDRYS, D. G., RAISZ, L. G., RUGGIERO, S. L., SHAFER, D. M., SHUM, I., SILVERMAN, S. L., POZNAK, C. H., WATTS, N., WOO, S. B., SHANE, E. (2007). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* **22**:1479–1491.
- KIERSZENBAUM, A. L. (2006). Histology and cell biology: An Introduction to Pathology, The CV Mosby Compony, New York; 126-127.
- KIM, H. SU., NOH, S. U., HAN, Y. W., KIM, K. M., KANG, H., KIM, H. O., PARK, Y. M. (2009). Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Med Sci.* **24**: 368–374.
- LANDESBURG, R., COZIN, M., CREMERS, S., WOO, V., KOUSTENI S., SINHA, S.,
- LANG, D.S., JÖRRES, R. A., MÜCKE, M., SIEGFRIED, W., MAGNUSSEN, H. (1998). Interactions between human bronchoepithelial cells and lung fibroblasts after ozone exposure in vitro. *Toxicology Letters.* **96** (97): 13-24.
- LEE C. Y., DAVID T., NISHIME M. (2007). Use of platelet-rich plasma in the management of oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a report of 2 cases. *J Oral Implantol* **33**:371-382.

- LEHRER S., MONTAZEM A., RAMANATHAN L., PESSIN-MINSLEY M., PFAIL J., STOCK R. G., KOGAN R. (2008). Normal serum bone markers in Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **106**:389-391.
- LEHRER S., MONTAZEM A., RAMANATHAN L., PESSIN-MINSLEY M., PFAIL J., STOCK R. G., KOGAN R. (2009). Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws, Bone markers, and a Hypothesized Candidate Gene. *J Oral Maxillofac Surg.* **67**:159-161.
- LEITE, A. F., FIGUEIREDO, P. T., MELO, N. S., ACEVEDO, A. C., CAVALCANTI, M. G., PAULA, L. M., PAULA, A. P., GUERRA, E. N. (2006). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. Report of a case and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **102**:14-21
- LIBERMANN U. A., WEISS S. R., BROLL J., MINNE H. W., QUAN H., BELL H. N., RODRIGUEZ-PORTALES J., DOWNS R. W., FAVUS M. (1994). Effect of oral alendronat on bone mineral density and incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronat Pahse III Osteoporosis Study Group. *N Engl J Med.* **333**:1437-1443.
- LIM, Y., PHUNG, A. D., CORBACHO, A. M., AUNG, H. H., MAIOLI, E., REZNICK, A. Z., CROSS, C. E., DAVIS, P. A., VALLACCHI, G. (2006). Modulation of cutaneous wound healing by ozone: Differences between young and aged mice. *Toxicology Letters.* **160**: 127-134.
- LIMONTA, C., VAIA S., BIGGIOGGEORA, M., BIANCHIA, M. L. (2007). Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate in children and adolescents. *Bone.* **40**: 61.
- LIPTON, A., THERIAULT, R. H., HORTOBAGYI, G. N. (2000). Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases: long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer.* **88**: 1082-1090.
- MAAHS, M.P., AZAMBUJA, A. A., CAMPOS, M. M., SALUM, F.G., CHERUBINI, K. (2011). Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck.* **33**: 199-207.

- MACEDO, S.B., CARDOSO, C. (2005). The use of ozone in Dentistry. 16⁰ Campinas International Conclave, 115.
- MACKIE, P. S., FISHER, J. L., ZHOU, H., CHOONG, P. F. (2001). Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *British Journal of Cancer*. **84**: 951–958.
- MARX, R. E. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. **61**: 1115-1117.
- MARX, R. E., CILLO, J. E., ULLOA, J. J. (2007). Oral Bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. **65**: 2397-2410.
- MARX, R. E., SAWATARI, Y., FORTIN, M., BROUMAND, V. (2005). Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. **63**: 1567- 1575.
- MAVROKOKKI , T., CHENG, A., STEIN, B., ALASTAIR, G. (2007). Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg*. **65**: 415-423.
- McLEOD, N. M., DAVIES, B. J., BRENNAN, P. A. (2007). Bisphosphonate osteonecrosis of the jaws; an increasing problem for the dental practitioner. *Br Dent J*. **203**: 641-644.
- MIGLIORATI, C. A., CASIGLIA, J., EPSTEIN, J., JACOBSEN, P. L., SIEGEL, M. A., WOO, S. B. (2005). Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an american academy of oral medicine position paper. *J Am Dent Assoc* **136**: 1658-1668.
- MONTEBUGNOLO, L., FELICETTI, L., GISSI, D. B., PIZZIGALLO, A., PELLICIONI, G. A., MARCHETTI, C. (2007). Bisphosphonate-associated osteonecrosis can be controlled by nonsurgical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. **104**: 473-477.
- MOREAU, M. F., GUILLET, C., MASSIN, P., CHEVALIER, S., GASCAN, H., BASLÉ, M. F., CHAPPARD, D. (2007). Comparative effects of five

- bisphosphonates on apoptosis of macrophage cells in vitro. *Biochem Pharmacol.* **73**: 718-723.
- MURAKAMI, H., MIZUGUCHI, M., HATTORI, M., ITO, Y., KAWAI, T., HASEGAVA, J. (2002). Effect of denture cleaner using ozone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *E. Coli* T1 phage. *Dental Materials Journal.* **21**: 53-60.
- NAIDU, A., DECHOW, P. C., SPEARS, R., WRIGHT, J. M., KESSLER, H. P., OPPERMAN, L. A. (2008). The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **106**: 5-13.
- NANCI, A. (2007). Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function, 7th Ed. Mosby Elsevier Publishing: 319-357.
- NARAYANAN, A. S., BARTOLD, P.M. (1996). Biochemistry of periodontal connective tissues and their regeneration: a current perspective. *Connect Tissue Res.* **34**: 191-201.
- NARAYANAN, A. S., PAGE, R. C. (1983). Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. *Collagen Rel Res.* **3**: 33-64.
- NAVEAU A., NAVEAU B. (2006). Osteonecrosis of the jaw in patients taking bisphosphonates. *Joint Bone Spine.* **73**: 7-9.
- NAVEAU, A., NAVEAU, B. (2006). Osteonecrosis of the jaw in patients taking bisphosphonates. *Joint Bone Spine.* **73**: 7-9.
- NINFO, V., RUSSO, L., MUZIO, L., NOCINI, P. F. (2008). Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **105**: 358-364.
- NOGALES, C.G., FERRARI, P.H., KANTOROVICH, E.O., LAGE-MARQUES, J.L. (2008). Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract*; **9**: 75-84.
- ODELL, E. W. M. P. (1998). Biopsy pathologies of the oral tissues, 1st Ed. LONDON: Chapman&Hall. Chapter 1.
- O'RYAN, F. S., KHOURY, S., LIAO, W., HAN, M. M., HUI, R. L., BAER, D., MARTIN, D., LIBERTY, D., LO, J. C. (2009). Intravenous bisphosphonate-

- related osteonecrosis of the jaw: bone scintigraphy as an early indicator. *J Oral Maxillofac Surg.* **67**: 1363-1372.
- PAPAPOULOS, S.E. (2006). Bisphosphonate actions: physical chemistry revisited. *Bone.* **38**: 613-616.
- PAZIANAS, M., COOPER, C., WANG, Y., LANGE, J. L., RUSSELL, R. G. (2011). Atrial fibrillation and the use of oral bisphosphonates. *Ther Clin Risk Manag.* **7**: 131-144.
- PETERSON, L.J., ELLIS, E., HUPP, J.R., TUCKER, M.R. (2003). Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery, 4th Ed. ST. LOUIS, Mosby: 49-60.
- PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.***29**(9): e45.
- PLOTKIN, L. I., AGUIRRE, J. I., KOUSTENI, S., MANOLAGAS, S. C., BELLIDO, T. (2005). Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem* **280**: 7317-7325.
- POLIMENI, G., XIROPAIDIS, A.V., WIKESJO, U.M.E. (2006). Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontology* 2000. **41**(1): 30-47.
- RAMZY, M. I., GOMAA, H. E., MOSTAFA, M. I., ZAKI, B. M. (2005). Management of aggressive periodontitis using ozonized water. *Egypt. Med. J. N R C.* **6**(1): 229-245.
- RAVOSA, M. J., NING, J., LIU Y., STACK, M. S. (2011). Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Archives of Oral Biology.* **56**: 491-498.
- REID, I. R. (2008). Anti-resorptive therapies for osteoporosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* **19**: 473-478.
- REID, I. R., BOLLAND, M. J., GREY, A. B. (2007). Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone.* **41**: 318-320.
- REID, I. R., CUNDY, T. (2009). Osteonecrosis of the jaw. *Skeletal Radiol.* **38**: 107.

- RIPAMONTI, C. I., CİSLAGHI, E., MARIANI, L., MANIEZZO, M. (2011). Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I–II study, *Oral Oncology*.
- RIPAMONTI, C.I., MANIEZZO, M., BOLDINI, S., PESSI, M. A., MARIANI, L., CİSLAGHI, E. (2012). Efficacy and tolerability of medical ozone gas insufflations in patients with osteonecrosis of the jaw treated with bisphosphonates—Preliminary data Medical ozone gas insufflation in treating ONJ lesions. *Journal of bone oncology*. **1**(3): 81-87.
- ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. (1994). Robbins Pathologic Basis of Disease, 5th Ed. PHILADELPHIA, W.B.Saunders Company: 52-92.
- RODAN, G. A., FLEISCH, H. A. (1996). Bisphosphonates: Mechanisms of action. *J Clin Invest*. **97**(12): 2692-2696.
- ROELOFS AJ, COXON FP, EBETINO FH et al. (2008). Use of a fluorescent analogue of risedronate to study localization and cellular uptake of bisphosphonates in vivo. *Bone*. **42**: 85.
- ROGERS, M. J., GORDON, S., BENFORD, H. L., COXON, F. P., LUCKMAN, S. P., MONKKONEN, J., FRITH, J. C. (2000). Cellular and molecular mechanism of action of bisphosphonates. *Cancer*. **88**: 2961-2978.
- RUCH, J. V. (1990). Patterned distribution of differentiating dental cells: facts and hypotheses. *J Biol Buccale*. **18**: 91-98.
- RUGANI P., ACHAM S., TRUSCHNENGG A., OBERMAYER-PIETSCH B, JAKSE N. (2010). bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: surgical treatment with ErCrYSGG-laser. Case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. **110**: 1-6.
- RUGGIEO, S. L., DREW, S. J. (2007). Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonate therapy. *J Dent Res*. **86**: 1013-1021.
- RUGGIERO S. L., DODSON D. B., ASSAEL L. A., LANDESBURG R., MARX R. E., MEHROTRA B. (2009). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update. *J Oral Maxillofac Surg*. **67**: 2-12.

- RUSSELL, R. G., WATTS, N. B., EBETINO, F. H., ROGERS, M. J. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* **19**: 733–759.
- SANTINI, D., VINCENZI, B., DICUONZO, G., AVVISATI, G., MASSACESI, C., BATTISTONI, F., GAVASCI, M., ROCCI, L., TIRINDELLI, M. C., ALTOMARE, V., TOCCHINI, M., BONSIGNORI, M., TONINI, G. (2003). Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res.* **9**:2893-2891.
- SANTINI, D., VINCEZI, B., HANNON, R. A., BROWN, J. E., DICUONZO, G., ANGLETTI, S., La CESA, A., COLEMAN, R., TONINI, G., BUDILLON, A., CARAGLIA, M., HOLEN, I. (2006). Changes in bone resorption and vascular endothelial growth factor after a single zoledronic acid infusion in cancer patients with bone metastases from solid tumours. *Oncol Rep.* **15**: 1351-1357.
- SARASQUETE, M. E., GARCIA-SANZ, R., MARIN, L., ALCOCEBA, M., CHILLON, M. C., BALANZATEGUI, A., SANTAMARIA, C., ROSINOL, L., DE LA RUBIA, J., HERNANDEZ, M. T., GARCIA-NAVARRO, I., LAHUERTA, J. J., SAN MIGUEL, J. F. (2008). Bisphosphonate –related osteonecrosis of the jaw is associated with polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: a genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Blood.* **112**: 2709-2712.
- SCARDINA, G.A., CARINI, F., NOTO, F., MESSINA, P. (2013). Microcirculation in the healing of surgical wounds in the oral cavity. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **42**: 31–35.
- SCHEPER, M. A., BADROS, A., CHAÏSUPARAT, R., CULLEN K. J., MEÏLLER, T. F. (2009). Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *British Journal of Haematology.* **144**: 667-676.
- SEIDLER, V., LINETSKIY, I., HUBÁLKOVÁ, H., STANKOVÁ H., SMUCLER R., MAZÁNEK. J. (2008). Ozone and its usage in general medicine and dentistry. *A review article, prague medical report.* **109**(1): 5-13.
- SHAHER, D. M., BAY, C., CARUSO, D. M., FOSTER, K. N. (2008). The use of eidronate disodium in the prevention of heteretropic ossification in burn patients. *Burns.* **34**: 355-360.

- SHIPMAN, C. M., CROUCHER, P. I., RUSSELL, R. G., HELFRICH, M. H., ROGERS, M. J. (1998). The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res.* **58**: 5294-5297.
- SIERVO, S. (2008). Suturing Techniques In Oral Surgery, 1st Ed. MILANO: Quintessence: 11-66.
- SILVERMAN, S. L., HURVITZ, E. S., NELSON, V. S., CHIODO, A. (1994). Rachitic Syndrome after disodium etidronate therapy in adolescent. *Arch Phys Med Rehabil.* **75**: 118-120.
- SILVERMAN, S. L., LANDESBURG, R. (2009). Osteonecrosis of the jaw and the role of bisphosphonates: a critical review. *Am J Med.* **122**: 33-45.
- SIMON, M. J. K., NIEHOFF, P., KIMMIG, B., WILTFANG, J., AÇIL, Y. (2010). Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Invest.* **14**: 51–58.
- SINGER, A. J., CLARK, R. A. F. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* **341**: 738–46.
- SMITH, M. R. (2003). Antitumor activity of bisphosphonates. *Clin Cancer Research.* **9**: 5433-5434.
- SOYDAN S. (2011). Nitrojen içeren bifosfonatların oral mukoza hücre kültürleri üzerine doza bağlı etkilerinin incelenmesi. Doktora tezi, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- SOYDAN S., ŞENEL F., ARAZ K. (2009). Bifosfonata bağlı olarak çene kemiklerinde gelişen nekrozun patogenezi ve tedavisi. *Hacettepe Diş Hek. Fak. Derg.* **33**(3): 61-69.
- SQUIER, C. A., BROGDEN, K. (2011). Human Oral Mucosa: Development, Structure and Function 1st Ed. Wiley blackwell: Chapter 2.
- SQUIER, C. A., KREMER, M. J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *Journal of the National Cancer Institute Monographs.* **29**: 7-15.
- STOPKA P. (2003). Ozon. *Progresdent.* **6**: 8-11.

- SUSHMA, D. (2011). Application of Ozone Therapy in Dentistry, *Indian Journal of Dental Advancements*. **3**(2): 538-542.
- ŞENEL, F. C., SARAÇOĞLU, T. U., DURMUŞ, A., BAĞIŞ, B. (2007). Severe osteomyelitis of the mandible associated with the use of non-nitrogen containing bisphosphonate (disodium clodronate): report of a case. *J Oral Maxillofac Surg*. **65**: 562-565.
- ŞENOL, M. (1995). Yara iyileşmesi. *T Klin J Dermatol*. **5**: 49-53.
- TESSIER, J., RODRIGUEZ, P. N. (2010). The use of ozone to lighten teeth. An experimental study. *Acta Odontol Latinoam*. **23**(2): 84-89.
- VALACCHI, G., LIM, Y. (2011). Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1mice. *Wound Repair Regen*. **19**(1): 107-115.
- VAN DEN WYNGAERT, T., HUIZING, M. T., VERMORKEN, J. B. (2007). Osteonecrosis of the jaw related to the use of bisphosphonates. *Curr Opin Oncol*. **19**(4): 315-322.
- VESCOVI, P., NAMMOUR, S. (2010). Bisphosphonate –related osteonecrosis of the jaw (BROBJ) therapy. A critical review. *Minerva stomatologica*. **59**: 181-213.
- WALKER, J.T., BRADSHAW, D. J, FULFORD, M.R., MARSH, P.D. (2003). Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol*. **69**: 3327-3332.
- WALLACE, J. L., DICAY, M., MCKNIGHT, W., BASTAKI, S., BLANK, M. A. (1999). N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. *Aliment Pharmacol Ther*. **13**:1675-1682.
- WALTER, C., PABST, A., ZIEBART, T., KLEIN, M. O., AL-NAWAS, B. (2011). Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblast and osteoblast in vitro. *Oral Disease*. **17**: 194-199.
- WESSEL JH, DODSON TB, ZAVRAS AI. (2008). Zoledronate, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: A case-control study. *J Oral Maxillofac Surg*. **66**: 625-631.
- WOO, J. W., HELLSTEIN, J. R. (2006). Kalmar Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*. **144**: 753–761.

YEUNG, M. K. (1999). Molecular and genetic analyses of *Actinomyces* spp. *Crit Rev Oral Biol Med.* **10**:120-138.