

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI



LAZERİN PLATELET ZENGİN FİBRİNLER ÜZERİNE
ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

UTKU BÖCÜOĞLU

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Esra Ateş Yıldırım

BOLU, NİSAN - 2024

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %15 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2023/231 sayısı ile etik izin alınmıştır.

UTKU BÖCÜOĞLU

ÖZET

**LAZERİN PLATELETTEN ZENGİN FİBRİNLER ÜZERİNE ETKİSİNİN
İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ
UTKU BÖCÜOĞLU
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ
FAKÜLTESİ PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ ESRA ATEŞ YILDIRIM)
BOLU, NİSAN - 2024**

Bu çalışmanın amacı, lazerin biyostimülatif etkisi kullanılarak, lazer uygulanan ve uygulanmayan L-PRF ve T-PRF membranların kimyasal bozunma miktarlarının, fibrin ağ yapılarının SEM ve ışık mikroskopuyla değerlendirilmesidir.

Çalışmamız sistemik olarak sağlıklı 15 birey ile her bir bireyden elde edilen dört adet L-PRF ve dört adet T-PRF membran üzerinde yapıldı. Elde edilen dört membrandan iki tanesine diyet lazer cihazıyla 980 nm dalga boyunda 0.5 W gücünde devamlı modda 3 dakika süre ile 1-2 mm mesafeden lazer uygulaması yapıldı. Diğer iki membrana lazer uygulaması yapılmadı. Lazer uygulanan L-PRF ve T-PRF membranlardan birer tanesi histolojik inceleme ve SEM analizi için ikiye bölünüp, uygun koşullar altında muhafaza edildi. Diğer membran degradasyon işlemi için ayrıldı. Aynı işlemler lazer uygulanmayan L-PRF ve T-PRF membranlar içinde yapıldı.

Çalışmamızın sonuçlarına göre lazer uygulanan L-PRF ve T-PRF membranlarda uygulanmayan membranlara kıyasla daha düşük degradasyon yüzdeleri görüldü, ancak bu fark istatistiksel anlamlılık göstermedi ($p>0,05$). Bununla birlikte lazer uygulanan L-PRF ve T-PRF membranlar karşılaştırıldığında degradasyon yüzdesi L-PRF membranda anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0,05$). Yapılan histolojik incelemede lazer uygulaması yapılan L-PRF ve T-PRF membran gruplarının fibrin ağ yapısının lazer uygulanmayan gruplara kıyasla anlamlı düzeyde daha yoğun olduğu görüldü ($p<0,05$). SEM analizi sonucunda lazer uygulanan L-PRF ve T-PRF membran gruplarında fibrin ağının daha yoğun, kalın ve kompleks yapıda olduğu bulundu.

Çalışmamızda lazerin biyostimülatif etkisinin L-PRF ve T-PRF membranların fibrin ağı kalınlığını, çapraz bağ yapısını ve yoğunluğunu artırdığı görüldü. Membranlar üzerinde degradasyon yüzdeleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

ANAHTAR KELİMELE: PRF, T-PRF, L-PRF, degradasyon, fotobiyomodülasyon, fibrin

ABSTRACT

**IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF LASER ON
PLATELET RICH FIBRIN
DEPARTMENT OF PERIODONTOLOGY SPECIALIZATION THESIS
UTKU BÖCÜOĞLU
BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY FCULTY OF DENTISTRY
DEPARTMENT OF PERIODONTOLOGY
(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. ESRA ATEŞ YILDIRIM)
BOLU, APRIL 2024**

The aim of this study was to evaluate the amount of chemical degradation and fibrin network structures of laser-treated and non-laser-treated L-PRF and T-PRF membranes by SEM and light microscopy using the biostimulative effect of laser.

Our study was performed on 15 systemically healthy individuals and four L-PRF and four T-PRF membranes obtained from each individual. Two of the four membranes was treated with a diode laser device at a wavelength of 980 nm and a power of 0.5 W in continuous mode for 3 minutes at a distance of 1-2 mm. The other two membranes were not lasered. One of the laser treated L-PRF and T-PRF membranes were cut in half and stored under appropriate conditions for histological examination and SEM analysis. The other membrane was separated for degradation. The same procedures were performed for L-PRF and T-PRF membranes without laser treatment.

According to the results of our study, laser treated L-PRF and T-PRF membranes showed lower degradation percentages compared to non-laser treated membranes, but this difference did not reach statistical significance ($p>0.05$). However, when laser treated L-PRF and T-PRF membranes were compared, the degradation percentage was significantly higher in L-PRF membrane ($p<0.05$). Histologic examination showed that the fibrin network structure of the laser-applied L-PRF and T-PRF membrane groups was significantly denser than the non-laser-applied groups ($p<0.05$). SEM analysis revealed that the fibrin network was denser, thicker and more complex in the laser-treated L-PRF and T-PRF membrane groups.

In our study, the biostimulative effect of laser increased the fibrin network thickness, cross-link structure and density of L-PRF and T-PRF membranes. When the degradation percentages on the membranes were evaluated, no significant difference was observed between the groups.

KEYWORDS: PRF, L-PRF, T-PRF, Photobiomodulation, Degredation, Fibrin

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK BEYAN.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	ix
FOTOĞRAF LİSTESİ	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Trombositten Zengin Ürünler	3
2.2 Trombositten Zengin Ürünlerin İçeriği	4
2.2.1 Trombositler	4
2.2.2 Lökositler.....	5
2.2.3 Büyüme Faktörleri.....	7
2.2.4 Sitokinler	8
2.2.5 Fibrinojen	10
2.2.6 Fibrin	11
2.3 Trombositten Zengin Ürünlerin Tarihsel Gelişimi	11
2.3.1 Trombositten Zengin Plazma (TZP/PRP)	13
2.3.2 Trombositten Zengin Fibrin (PRF/TZF/L-PRF/L-TZF)	13
2.3.3 Konsantre Büyüme Faktörü (CGF)	15
2.3.4 Titanyum Trombositten Zengin Fibrin (T-PRF/T-TZF)	16
2.3.5 İleri Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (A-PRF/A-TZF)	17
2.3.6 Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin (I-PRF/I-TZF).....	18
2.3.7 Trombositten Zengin Fibrinlerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri .	19
2.4 Trombositten Zengin Fibrinlerin Dış Hekimliğindeki Kullanım Alanları	20
2.5 Lazer Tanımı ve Tarihçesi	22
2.5.1 Lazer Cihazının Çalışma Prensibi	22
2.5.2 Lazer Işınının Özellikleri ve Lazer-Doku Etkileşimi	23
2.6 Lazer Sınıflaması	25
2.6.1 Enerji Düzeyine Göre Lazerler.....	25
2.6.2 Kullanılan Aktif Ortama Göre Lazerler.....	25
2.7 Dış Hekimliğinde Kullanılan Lazerler.....	26
2.7.1 Karbondioksit (CO ₂) Lazer.....	26
2.7.2 Neodymium: Yttrium-Aluminum-Garnet (Nd: YAG) Lazer	26
2.7.3 Erbium: Yttrium-Aluminum-Garnet (Er: YAG) Lazer	27

2.7.4 Erbium, Chromium: Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet (Er, Cr: YSGG) Lazer	27
2.7.5 Holmium: Yttrium-Aluminum-Garnet (Hol: YAG) Lazer	28
2.7.6 Argon Lazer	28
2.7.7 Diyot Lazer (InGaAs/Indium-Gallium-Arsenid)	28
2.8 Lazerlerin Diş Hekimliğinde Kullanım Alanları	29
2.8.1 Yumuşak Doku Tedavileri	29
2.8.2 Sert Doku Tedavileri	30
2.8.3 Diagnostik ve Tedavi Edici Girişimler	30
2.8.4 Lazerin Fotobiyomodülasyon Etkisi ve Mekanizması	31
2.8.5 Düşük Doz Lazerin İnflamasyon Üzerine Etkileri	33
2.8.6 Düşük Doz Lazerin Onarım Süreçleri Üzerine Etkisi	33
2.8.7 Düşük Doz Lazerin Ağrı Üzerine Etkileri	33
2.8.8 Lazer Dozunun Hesaplaması	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1 Çalışma Tasarımı ve Yönetimi	35
3.2 Trombosit ve Tam Kan Sayımı Yapılması	36
3.3 Bireylerden Kan Alınması	37
3.4 L-PRF Membranın Elde Edilmesi	37
3.5 T-PRF Membranın Elde Edilmesi	39
3.6 L-PRF Membranların Fotobiyomodülasyon ile Modifiye Edilmesi	39
3.7 T-PRF Membranların Fotobiyomodülasyon ile Modifiye Edilmesi	40
3.8 L-PRF ve T-PRF Membranların Histolojik İncelemesi	41
3.9 L-PRF ve T-PRF Membranların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	44
3.10 L-PRF ve T-PRF Membranların PBS Solüsyonunda Degredasyonu	45
3.11 İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR	47
4.1 Demografik Bulgular	47
4.2 Hastaların Kan Parametrelerinin Karşılaştırılması	47
4.3 Kimyasal Degredasyon Analizleri	48
4.4 Fibrin Ağ Deseni Skoru	50
4.4.1 Işık Mikroskobu Altında Histolojik İnceleme Sonuçları	51
4.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	51
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
7. KAYNAKLAR	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Santrifüj sonrası tüpteki katmanlar	14
Şekil 2.2. Lazer cihazının çalışma prensibi	23
Şekil 2.3. Lazer-doku etkileşimi	24



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Trombositten zengin kan ürünleri ve hazırlanış protokolleri	19
Tablo 2.2. Diş hekimliğinde kullanılan lazerler ve kullanım alanları	31
Tablo 4.1. Çalışmaya katılan bireylerin demografik bilgileri	47
Tablo 4.2. Bireylerin kan parametreleri	48
Tablo 4.3. L-PRF ve T-PRF gruplarının degradasyon önce ve sonrası ağırlık ortalamaları.....	49
Tablo 4.4. Tüm grupların kimyasal bozunma yüzdesi ortalaması	49
Tablo 4.5. Lazer uygulanmamış L-PRF ile lazer uygulanmış L-PRF gruplarının kimyasal bozunma yüzdeleri ortalaması	49
Tablo 4.6. L-PRF ve T-PRF grupların fibrin ağ deseni skoru ortalaması	50
Tablo 4.7. L-PRF ve T-PRF gruplarının fibrin ağ deseni skoru.....	50

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 3.1. Bireylerden kan alınması.....	37
Fotoğraf 3.2. IntraSpin™ santrifüj cihazı	38
Fotoğraf 3.3. L-PRF membran	38
Fotoğraf 3.4. Bireylerden T-PRF elde edilmesi.....	39
Fotoğraf 3.5. Sirona Laser Xtend cihazı	40
Fotoğraf 3.6. PRF membrana 1-2 mm mesafeden lazer uygulaması	40
Fotoğraf 3.7. Doku tespiti için kasetlere konulan örnekler	41
Fotoğraf 3.8. Doku takibinin yapıldığı Leica ASP 300S Cihazı.....	42
Fotoğraf 3.9. Parafine gömülmüş örnekler	43
Fotoğraf 3.10. Doku boyama işleminin yapıldığı Leica Autostainer XL cihazı.....	43
Fotoğraf 3.11. Hematoksilen-eozin boyaması yapılmış incelenmeye hazır örnekler	44
Fotoğraf 3.12. SEM incelemesinin yapıldığı Zeiss Gemini 500 cihazı	45
Fotoğraf 3.13. Sartorius CP225D Analytical Balances cihazı ve degradasyona uğrayan örnekler (Unimax 1010 Orbital Shaker).....	46
Fotoğraf 4.1. A: Lazer uygulanmayan L-PRF membranının x400'lük büyütmedeki görüntüsü, B: Lazer uygulanan L-PRF membranının x400'lük büyütmedeki görüntüsü, C: Lazer uygulanmayan T-PRF membranının x400'lük büyütmedeki görüntüsü, D: Lazer uygulanan T-PRF membranının x400'lük büyütmedeki görüntüsü	51
Fotoğraf 4.2. A: Lazer uygulanmayan L-PRF membranının x10000 büyütme görüntüsü, B: Lazer uygulanan L-PRF membranının x2000 büyütme görüntüsü, C: Lazer uygulanmayan T-PRF membranının x2000 büyütme görüntüsü, D: Lazer uygulanan T-PRF membranının x5000 büyütme görüntüsü.....	52

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

µm	: Mikrometre
5-HT	: 5-Hidroksitriptamin
ADP	: Adenozin difosfat
AlGaAs	: Aluminum-Gallium-Arsenid
APC	: Antijen sunucu hücreler
A-PRF	: İleri lökosit ve trombositte zengin fibrin
ATP	: Adenozin trifosfat
BEAI	: Kan elemanları yapışma indeksi
°C	: Santigrat derece
CcO	: Sitokrom c oksidaz
CGF	: Konsantre büyüme faktörü
cm²	: Santimetrekare
CO²	: Karbondioksit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
Er,Cr: YSGG	: Erbium, Chromium: Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet
Er: YAG	: Erbium: Yttrium-Aluminum-Garnet
FDP	: Fibrin ve fibrinojen yıkım ürünleri
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
GaAs	: Gallium Arsenid
HCT	: Hematokrit
He	: Helyum
Hol: YAG	: Holmium: Yttrium-Aluminum-Garnet
IgE	: İmmunoglobulin E
IGF-1	: İnsülin kaynaklı büyüme faktörü-1
IgG	: İmmunoglobulin G
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
IL-2	: İnterlökin 2
IL-3	: İnterlökin 3
IL-4	: İnterlökin 4
IL-6	: İnterlökin 6
InGaAs	: Indium-Gallium-Arsenid
I-PRF	: Enjekte edilebilir trombositte zengin fibrin

J	: Joule
LASER	: Uyarılmış radyasyon emisyonu ile ışık amplifikasyonu
L-PRF	: Lökosit ve trombosit zengin fibrin
L-PRP	: Lökosit ve trombosit zengin plazma
MASER	: Uyarılmış radyasyon emisyonu ile mikrodalga amplifikasyonu
Max.	: Maksimum
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
Min.	: Minimum
mJ	: Milijoule
mL	: Mililitre
mm	: Minimetre
MMP-8	: Matris metalloproteinaz 8
MPV	: Ortalama trombosit hacmi
mW	: Miliwatt
Nd,Cr: YAG	: Neodymium, Chromium: Yitrium-Aluminum-Garnet
Nd: YAG	: Neodymium: Yitrium-Aluminum-Garnet
Ne	: Neon
NK	: Doğal öldürücü hücreler
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
PAMPS	: Patojenle ilişkili moleküler paternler
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PDEGF	: Trombosit kaynaklı epitelyal büyüme faktörü
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PDW	: Trombosit dağılım genişliği
PLT	: Trombosit
P-PRF	: Saf trombosit zengin fibrin
P-PRP	: Saf trombosit zengin plazma
PRF	: Trombosit zengin fibrin
PRP	: Trombosit zengin plazma
RBC	: Kırmızı kan hücresi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu

TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü beta
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü alfa
T-PRF	: Titanyum trombositin zengin fibrin
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
W	: Watt
WBC	: Beyaz kan hücresi
YKR	: Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve bu çalışmanın oluşturulmasında bana karşı her konuda yardımcı olan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Esra ATEŞ YILDIRIM'a,

Bu çalışmayı yapmamızda her türlü bilgi ve yardımlarıyla destek veren Sayın Prof. Dr. Mustafa TUNALI, Prof. Dr. Esra ERCAN ve Doç. Dr. Selma ERDOĞAN DÜZCÜ'ye,

Bilgi ve deneyimleri hiç esirgmeden paylaşan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Nuray ERCAN ve Dr. Öğr. Üyesi Bilge MERACI YILDIRAN'a,

Uzmanlık eğitimine beraber başladığımız, beni destekleyen ve klinikte keyifle çalışmamı sağlayan, İlayda VAROL, Fatmanur Ezgi DOĞAN, Hatice Aysim LEYMUN ve Işıl YALÇIN'a,

Huzurlu ve sıkıntılı her anda yardımları ve dostluklarıyla yanımda olan, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum Tuğçe ÇAĞIRAN GÜRBÜZ'e, Tuğba BULUT'a, Hilal KECEL'e ve Senem FİLİZ'e,

Özveri ve gülüyle çalışmamı sağlayan, tez çalışma sürecinde yardımlarını esirgemeyen kliniğimizin değerli personeli Tuba ENGİN ERTUNÇ, Fatma BURAN, Hamiyet ÖZCAN ve Emre ÖZER ile kliniğimizin değerli hemşireleri Elif HEZENCİ ve Dilara GEÇER'e,

Her zaman ve her konuda yanımda bulunan, beni bugünlere getiren ve tüm hayatım üzerinde sonsuz emekleri bulunan canım annem Ayşe Pelin GENCE, babam Yusuf Cavit BÖCÜOĞLU ve kardeşim Bartu BÖCÜOĞLU'na,

Bu sürecin tüm zorluklarını benimle birlikte yaşayan ve desteğini hep hissettiğim, hayatın her anında yanımda olacağını bildiğim Başak BOZKUŞ'a bir teşekkürü borç bilirim.

1. GİRİŞ

Lazer terimi, uyarılmış ışık dağılımının güçlendirilmesi anlamına gelir. Fotonlar atomlar tarafından uyarılır ve bu daha fazla fotonun salınmasına ve sonuçta lazer olarak bilinen homolog, tek renkli, paralel bir ışık şeridinin oluşmasına sebep olur (1). Lazerler düşük ve yüksek seviyeli lazerler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Yüksek seviyeli lazerler daha çok cerrahi prosedürlerde kullanılırken düşük seviyeli lazerler aktif olarak biyostimülasyonda kullanılmaktadır (2, 3).

Lazerin biyostimülasyon mekanizması karmaşık olmakla birlikte temelde lazerin mitokondriyal ve hücre zarı fotoreseptör sentezini uyarak hücre canlılığını arttırmasına dayanır (4). Lazerin biyostimülasyon etkisinin bakterisidal özelliğe sahip olması, hücre stimülasyonu sağlaması, fibroblastların ve osteoblastik hücrelerin proliferasyonuna, farklılaşmasına neden olması gibi özellikleri sebebiyle diş hekimliğindeki hastalıklar için etkili bir tedavi olduğu düşünülmektedir (5).

Lazerin biyostimülasyon etkisi 700-770 nm aralığındaki dalga boylarında başlar. Tedavide optimum dalga boyu 810 nm olmakla birlikte dokunun derin bölgelerine ulaşmak için 950 nm'ye kadar olan dalga boyları gereklidir (6). Hanna ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 980 nm dalga boyundaki lazerin homojen enerji dağılımı nedeniyle kemik rejenerasyonunu hızlandırmaya yardımcı olacak hücrelerin farklılaşması üzerinde fotobiyomodülatör etkinliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır (7). Bir diyot lazer türü olan İndiyum-Galyum-Arsenit (InGaAs) lazerin miliwatt aralıklarındaki ışınlamıyla elde edilen biyostimülasyon etkisiyle gingival fibroblastların ve periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu arttırabileceği görülmüştür (8).

Fibrin, plazmada bulunan bir molekül olan fibrinojenin aktive edilmiş halidir (9). Bu molekül, hem plazmada hem de trombosit granüllerinde bol miktarda bulunur ve hemostaz sürecinde trombositlerin bir araya gelmesinde önemli bir rol oynar (10). Plateletten zengin fibrinler (PRF) Choukroun ve arkadaşları tarafından 2001 yılında geliştirilmiştir (11). Zengin lökosit içeriğinden dolayı L-PRF olarak adlandırılan bu PRF'ler antikoagülsüz cam tüpte 10 mL venöz kanın 2700 rpm 12

dakikada santrifüj edilmesiyle elde edilir (12). Bunun sonucunda trombositler teorik olarak fibrin ağlarında kitlesel olarak hapsolür (13).

L-PRF ile başarılı sonuçlar alınsa da yapılan çalışmalar cam tüplerdeki silikanın elde edilen fibrin matrisi kontamine edebileceği ve bu durumun hastalar için tehlikeli olabileceğini göstermiştir (14, 15). Bu nedenle Tunalı ve arkadaşları 2013 yılında L-PRF ile benzer şekilde antikoagülan içermeyen titanyum tüpte 2700 rpm 12 dakikada santrifüj ile elde edilen T-PRF'yi geliştirmişlerdir. T-PRF histolojik olarak L-PRF ile benzer yapıda olsa da fibrinin hem daha kalın hem de daha sıkı olması sebebiyle dokuda daha uzun süre kaldığı görülmüştür (16).

Diş hekimliğinde plateletten zengin fibrinlerin yara iyileşmesi başta olmak üzere kemik içi ve furkasyon defektleri, diş eti çekilmeleri, alveol socketin korunması gibi nedenler ile birden fazla alanda kullanımı mevcuttur (17, 18). Terapötik potansiyeli olan PRF'lerin yapısındaki hücresel elemanlar bu etkide önemli rol oynasa da yapılan çalışmalar PRF'lerin fibrin matrisinin terapötik potansiyelden sorumlu esas unsur olduğunu göstermiştir (19).

Lazerlerin biyostimülatif etkisi ve PRF'ler diş hekimliğinde ve tıpta sıklıkla kullanılan materyallerdir. Bu nedenle lazerin biyostimülatif etkisini kullanarak T-PRF ve L-PRF'lerin kimyasal bozunma miktarlarını ve fibrin ağ yapılarındaki değişiklikleri histolojik ve taramalı elektron mikroskopisi ile incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Trombositten Zengin Ürünler

Kan dolaşımında dolaşan elementlerin hücrel bir alt grubunu temsil eden trombositler, yetişkin bir insanda yaklaşık bir trilyon adet bulunur ve ömürleri 8-10 gündür (20). Bu hücrel dolaşım elemanları tromboz ve hemostazdaki kritik rollerinin yanı sıra bağışıklık, anjiyogenez, inflamasyon, yara iyileşmesi, hematolojik maligniteler ve metabolik bozukluklarda da rol oynamaktadır (21).

Trombositlerin rejeneratif potansiyeli, 1970'lerde keşfedilmiştir; bu potansiyel kolajen üretiminin artmasından, hücre mitozundan, kan damarlarının büyümesinden yaralanma bölgesine göç eden diğer hücrelerin toplanmasından ve hücre farklılaşmasını uyarıcı büyüme faktörlerini içermeleriyle belirlenmiştir (22, 23).

Yara iyileşmesi inflamasyon, proliferasyon, matürasyon ve remodelling olmak üzere dört ana aşamadan oluşan hücreler ve mediyatörlerin rol aldığı kompleks bir reaksiyonlar bütünüdür (24). İnflamasyon vazodilatasyona ve vasküler geçirgenliğin artmasına neden olur. Ancak meydana gelen bir yaralanmadan sonra vücudun gerçekleştirdiği ilk eylem kanamayı kontrol etmektir. Bu nedenle iyileşme sürecinin başlatıcı adımı hemostazdır (25, 26). Trombositler, hemostaz ve pıhtı oluşumunda aktif rol oynayarak, doku rejenerasyonunun başlangıç aşamalarını etkileyen temel faktör olarak tanımlanmıştır (27).

Otolog trombosit konsantreleri, trombositler ve lökositlerin yanı sıra transforme edici büyüme faktörü-beta 1 (TGF- β 1), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), interleukin (IL)-1 β , IL-4, ve IL-6 gibi sitokinler içermektedir (28). Pıhtılaşma kaskadının son aşamalarında oluşan fibrin, trombositler tarafından salgılanan sitokinlerle birleştiğinde, otolog trombosit konsantrelerini özellikle fibrin ağının doku büyüme faktörlerinin bir rezervuarı olarak da işlev gördüğü hasarlı bölgelerde oldukça biyouyumlu bir matris haline getirmektedir (29).

Bu özelliklerinden dolayı trombosit ve otolog büyüme faktörlerinin plazma solüsyonlarında toplanarak lokal iyileşmeyi desteklemek adına cerrahi ve cerrahi olmayan tedavilerde kullanılması amacıyla otolog trombosit konsantreleri geliştirilmiştir (30, 31).

2.2 Trombositten Zengin Ürünlerin İçeriği

2.2.1 Trombositler

Trombositler, hematopoetik soydan gelen megakaryositlerden türeyen küçük, çekirdeksiz hücrelerdir (32). İnsan trombositleri diskoid şekilli olup boyutları yaklaşık 2,0-4,0 x 0,5 μm 'dir. Sağlıklı bir bireyde 150-450 $10^9/\text{L}$ olacak şekilde kanda en çok bulunan ikinci cisimciktir (33).

Megakaryositlerden trombosit üretimi kemik iliğinde ve akciğerde meydana gelen sistematik ve düzenlenmiş bir süreçtir. Megakaryosit olgunlaşması, hücre bölünmesi olmadan nükleer çoğalma sürecini içerir ve dev boyutlu hücrelerin oluşumuna yol açar. Megakaryosit sitoplazmasının dolaşımdaki kanın kesme kuvvetleri ile parçalanması sonucunda trombositler oluşur (34).

Trombositlerin temel görevi, kan akışının korunmasına ve hemostaz sürecine katkıda bulunmaktır (35, 36). Bu amaca ulaşmak için trombositler, diskoid şekilleri ve damar içindeki akıştan kaynaklanan kesme kuvvetleri nedeniyle damar duvarına yakın bir konumda hareket eder. Damar duvarına bu yakınlık, vasküler bir yaralanma meydana geldiğinde hızlı bir tepki verilmesini sağlar (37).

Trombositler üç grup granül içermektedir (37). Birinci grup yoğun granül olarak bilinmekle birlikte her trombositin içinde yaklaşık 4-6 adet bulunmaktadır. Yoğun granül kalsiyum, ATP, ADP, 5-HT ve epinefrin dahil olmak üzere 200'den fazla küçük molekül içerir. İkinci grup granül alfa granül olarak bilinir ve her trombositin 60-80 arasında alfa granül içerdiği bildirilmiştir. Alfa granül von Willebrand faktör, platelet faktör 4, fibrinojen, albümin ve IgG gibi bir dizi büyük protein içerir (37, 38). Üçüncü grup granül ise lizozomal granül olup proteinlerin parçalanmasında önemli bir rol oynar (37). Bu granüllerin salınımı hemostaz,

tromboz, inflamasyon, aterogenez, antimikrobiyal konak savunması ve mitogeneze rol oynar (39).

Damar yaralanması sonrasında, trombositler yaralanma bölgesinde subendotelyal dokulara yapışır ve ardından birincil hemostatik tıkaçı oluşturmak üzere bir araya gelirler. Bununla birlikte trombositler plazma pıhtılaşma faktörlerinin yerel aktivasyonunu tetikler, bu da trombosit agregasyonunu artırarak daha güçlü bir fibrin pıhtısının oluşmasına yol açar (40). Trombositten zengin fibrin pıhtıları içerdikleri sitokinler ve büyüme faktörleri aracılığıyla yara iyileşmesinde önemli rolü olan biyoaktif bir rezervuardır (41).

2.2.2 Lökositler

Lökositler bakterilere, mantarlara, virüslere ve istilacı parazitlere karşı korunmadan sorumlu olan konak savunma sisteminin önemli bir bileşenidir (42). Lökositler çekirdek büyüklüğü ve şekli, sitoplazmik boyanmanın rengi ve çekirdeğin sitoplazmaya yüzde oranı açısından nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, monositler ve lenfositler olmak üzere beş ana tipte sınıflandırılırlar (43).

Beyaz kan hücresi popülasyonunun büyük bir kısmını oluşturan nötrofiller, sağlıklı yetişkinlerin dolaşımında dinlenme halindedirler. Bu dinlenme durumu, içerdikleri toksik maddelerin konak dokuya zarar verme riskini en aza indirir. Dinlenme halindeki nötrofiller, bakteriyel ürünler ve sitokinler veya kemokinler tarafından hazır hale getirilir. Hazır hale getirilen nötrofiller daha sonra enfeksiyon veya inflamasyon bölgesine mobilize edilir. Burada bakteriyel öldürme mekanizmasını harekete geçirici sinyallerle karşılaşılırlar (44).

Eozinofiller, parazitik helmint enfeksiyonları ve alerjik hastalıklar da dahil olmak üzere çok sayıda enflamatuvar sürecin patogenezinde rol oynayan çok işlevli lökositlerdir (45). Eozinofiller, antijen sunan hücreler (APC'ler) olarak hareket ederek antijene özgü immün yanıtları başlatır. Ayrıca, eozinofiller toksik granül proteinleri ve lipid mediyatörleri salgılayarak doku hasarına ve işlev bozukluğuna neden olan ana efektör hücreler olarak hizmet ederler (46).

Bazofiller sitoplazmasında bazofilik boyalarla boyanan granüller içeren küçük bir periferik kan lökosit popülasyonunu oluşturur. Dolaşımdaki lökositlerin %1'inden daha azını oluşturan bazofiller yüksek afiniteli immünoglobulin (Ig) E reseptörlerine sahiptir ve IgE aracılı alerjik reaksiyonların erken evresinde kilit bir rol oynarlar (47, 48).

Monositler, kemik iliğinden türeyen beyaz kan hücreleridir ve doğal bağışıklık tepkisinin bir parçasını oluştururlar. Özellikle enfeksiyon ve iltihaplanma sırasında hücresel homeostazı düzenleme görevi üstlenirler (49). Monositler normal yetişkin kanında dolaşımdaki çekirdekli hücrelerin yaklaşık %5'ini oluştururlar (50). Monositlerin yüzeyinde, mikrobiyal hücrelere özgü moleküler yapılar olan PAMPS (patojenle ilişkili moleküler paternler) ile etkileşime giren reseptörler bulunur (51). Bu tür uyarıcılara yanıt olarak, monositler kemik iliğinden kan dolaşımına geçer ve genellikle 12 ile 24 saat içinde dokulara göç eder (52). Periferik kana geçen monositler yabancı maddeleri ve ölü veya hasarlı hücreleri yutmak ve uzaklaştırmak için fagosit ve antijen sunan hücreler olarak görev yapar (49).

Lenfositler dolaşımdaki beyaz kan hücrelerinin %18 ila %42'sini oluşturur. Büyük çekirdekleri ile tanımlanan lenfositler T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar (53).

T ve B lenfositleri, organizmada her bir antijenik epitopu tanıyabilen ve spesifik olarak yanıt verebilen tek hücrelerdir. Bu nedenle edinilmiş veya antijene özgü bağışıklık yanıtında yer alırlar. B hücreleri, plazma hücrelerine dönüşme yeteneğine sahiptir ve antikör üretiminden sorumludur. Dolayısıyla, humoral bağışıklık B hücrelerine, hücresel bağışıklık T hücrelerine dayanır (54).

Doğal Öldürücü (NK) hücreler, bağışıklık sisteminin doğuştan büyük granüler lenfositleridir ve özellikle belirli mikrobiyal patojenlere ve tümör hücreleriyle mücadelede önemli bir rol oynarlar (55). Viral enfeksiyonlar, enflamasyon, tümör büyümesi ve istilası sırasında NK hücreleri hızla kandan toplanır ve ilgili organların dokularında birikir; bu noktada aktive olan NK hücreleri hedef hücreleri öldürme yeteneğine sahiptir ve aynı zamanda enflamatuar sitokinler ile kemokinler salgırlar. Bu süreç diğer lökositlerin toplanması ve aktivasyonunu tetikleyerek bağışıklık yanıtını güçlendirir (56, 57).

2.2.3 Büyüme Faktörleri

2.2.3.1 TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-B (TGF-B)

TGF- β , çeşitli işlevlere sahip çok yönlü bir sitokindir ve TGF- β süper ailesinin 30'dan fazla üyesinden biridir. Bu süper ailede üç izoform bulunur: TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3. Bu izoformlardan TGF- β 1 en yaygın bulunanıdır (28). Aktif haldeki TGF- β 1, trombositler tarafından salınır ve fibroblastların hareketini teşvik ederek dokuların onarımını destekler. Ayrıca fibronektin ve kolajen üretimini artırarak doku iyileşmesini sağlar ve kolajen yıkımını önler. Bununla birlikte TGF- β 1 anjiyogenezi uyarırken, immün hücrelerin belirli kimyasallara yanıt olarak hareket etmelerini teşvik eder (58). Son olarak osteoklast oluşumunun ve kemik dejenerasyonunun inhibisyonu ile birlikte osteoblast proliferasyonunu ve birikimini artırır (59).

2.2.3.2 TROMBOSİT KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ (PDGF)

PDGF, yaralanma yerinde bulunan ilk büyüme faktörlerinden biri olarak görünmektedir. İki alt birimden (A ve B) oluşur ve AA, BB ve AB olmak üzere üç farklı izoformu mevcuttur (60). Trombositlerden salınan PDGF, mezenkimatöz hücre soyunun göçünü, çoğalmasını ve hayatta kalmasını sağlar (28). Ayrıca bu büyüme faktörü anjiyogenez, makrofaj kemotaksisi ve aktivasyonunun yanı sıra makrofajlardan TGF- β salgılanmasını sağlar (60). Her bir trombosit yaklaşık 1.200 molekül PDGF içerdiğinden, PRF'deki bol miktarda PDGF konsantrasyonu PRF'nin yara iyileşmesi ve kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisini geliştirmektedir (59).

2.2.3.3 İNSÜLİN KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ-1 (IGF-1)

IGF-1 veya somatomedin C, kan dolaşımında yoğun olarak bulunan bir polipeptit hormondur ancak trombosit degranülasyonu sırasında da salınır (28). Mezenkimal hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını indükleyen IGF-1, hücrelere çeşitli apoptotik sinyallerden korunma ve hayatta kalma sinyallerini sağlar (28, 61). Ek olarak, IGF-1 kemotaksisi ve osteoblastların aktivasyonunu uyararak kemik oluşumunun artmasına neden olur (60).

2.2.3.4 VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

Doku hasarını takiben, VEGF aktive trombositler ve makrofajlar tarafından salınır. VEGF, damar oluşumu ile ilişkili süreçler için temel düzenleyici moleküldür ve endotel hücrelerin çoğalması ve göçünde kritik bir rol oynar (59, 62). Damar oluşumunda, IGF-1 ve IL-1 β gibi faktörler VEGF ekspresyonunu regüle ettikleri için önemli bir role sahiptir (63). Yapılan çalışmalar PDGF ve EGF'nin VEGF salgısını belirgin şekilde artırabileceğini göstermiştir (64).

2.2.3.5 EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (EGF)

EGF trombositler, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından salgılanır (64). Anjiyogenezi, endotel hücrelerin kemotaksisini ve epitelizasyonunu teşvik eder ve iyileşme süresini kısaltır (60). Ayrıca, epitelial ve mezenkimal hücreler tarafından sitokin salgılanmasını artırır (65).

2.2.3.6 FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ (FGF)

FGF'ler keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, kondrositler ve mast hücreleri tarafından üretilir (66). FGF, akut yarada artar ve granülasyon dokusu oluşumu, yeniden epitelizasyon ve doku yeniden şekillenmesinde rol oynar (67, 68). İn vitro çalışmalar, FGF'nin çeşitli ekstrasellüler matriks bileşenlerinin sentezini ve birikimini düzenlediğini, reepitelizasyon sırasında keratinosit hareketliliğini artırdığını, fibroblastların göçünü teşvik ettirerek onları kolajenaz üretmeye yönlendirdiğini göstermiştir (69, 70).

2.2.3.7 TROMBOSİT KAYNAKLI EPİTELİYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (PDEGF)

Trombosit kaynaklı epitelial büyüme faktörü (PDEGF) insan trombositlerinde ve plasentasında bulunur. Endotelial hücrelerin DNA sentezini, kemotaksisini ve anjiyogenezi uyaran bir polipeptittir. Kan damarlarının endotel hücre tabakasının bütünlüğünün korunmasında görev almaktadır. PDEGF, yara iyileşmesinin uyarılmasında ve damarların yeniden endotelializasyonunda önemli role sahiptir (71).

2.2.4 Sitokinler

2.2.4.1 İNTERLOKİN-1B (IL-1B)

IL-1 β inflamasyon kontrolünün önemli bir aracıdır. Başlıca işlevi yardımcı T lenfositlerin aktivasyonunu sağlamaktır. IL-1 β , TNF- α ile osteoklastları aktive ederek ve kemik oluşumunu inhibe eder. Bu mekanizma ile periodontal hastalıkların oluşumunda görev alırlar (62).

2.2.4.2 İNTERLOKİN-6 (IL-6)

IL-6, B hücrelerinin antikor üreten hücrelere olgunlaşmasını indükleyen bir B hücresi farklılaşma faktörü olarak tanımlanan çok işlevli bir sitokindir (72). IL-6, T hücrelerinin aktivasyonu ve çoğalması için önemli bir aksesuar faktördür. Ayrıca IL-2'nin varlığında dalak T hücrelerinden sitotoksik T hücrelerinin oluşumunu indükler (73). IL-6 ve IL-3 hematopoetik kök hücre proliferasyonunu teşvik etmek için sinerjik bir şekilde hareket eder (62, 73). Son olarak, IL-6 hepatosit uyarıcı bir faktör olarak işlev görür ve çeşitli akut faz genlerinin ekspresyonunu indükler (72). Bu nedenle bağışıklık hücrelerine iletilen sinyaller için önemli bir amplifikasyon yolu oluşturur. Bu şekilde inflamasyon, yıkım ve doku yenilenmesiyle ilgili reaksiyon zincirlerini destekler (62).

2.2.4.3 TÜMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ-A (TNF-A)

TNF adını tümör nekrozunu ve regresyonunu uyarma özelliğinden almaktadır (74). TNF- α , bakteriyel endotoksin saldırısına karşı inflamatuvar yanıt sırasında salınan ilk sitokinlerden biridir. TNF- α monositleri aktive eder ve fibroblastların yeniden şekillenme kapasitelerini uyarır. Ayrıca fagositozu, nötrofil sitotoksitesini artırır ve IL-1 ile IL-6 gibi anahtar aracılarda ekspresyonunu modüle eder (62).

2.2.4.4 İNTERLOKİN-4 (IL-4)

IL-4 yardımcı T hücrelerinin TH₂ hücrelerine farklılaşmasını indükler (75). Bu sitokin aynı zamanda aktive B hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını da destekler. İnflamasyon sürecinde, inflamasyonu hafifleterek iyileşmeyi kolaylaştırır (62). IL-4, IL-1'in biyolojik etkilerini nötralize ederek anti-inflamatuvar etkiye katkıda bulunur (76).

2.2.4.5 VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

VEGF, anjiyogenezle ilgili süreçler için ana düzenleyici molekül olarak kabul edilir. IGF-I ve IL-1 β gibi faktörler, VEGF'in ifadesini kontrol ederek anjiyogenezi düzenler (77). Ayrıca endotel hücrelerinin proliferasyon ve göç davranışlarının kontrolünde doğrudan rol oynar (62).

2.2.5 Fibrinojen

İnsan fibrinojeni hepatositler tarafından sentezlenen bir glikoproteindir. Her biri Aa, Bb ve g olarak adlandırılan üç farklı polipeptit zincirinden oluşan iki simetrik yarım molekülden oluştuğu için oldukça heterojendir. Ayrıca, Aa ve Bb zincirlerindeki polimorfik varyasyon sebebiyle, her bireyin kanında bir milyondan fazla özdeş olmayan fibrinojen molekülü bulunmaktadır (78).

Fibrinojen "pozitif" bir akut faz proteinidir, yani sistemik inflamasyon ve doku hasarı varlığında yanıt olarak kan seviyeleri yükselir. İnflamasyon ve doku hasarı varlığındaki yüksek fibrinojen seviyeleri, bu durumlara eşlik eden tromboz ve vasküler hasar sebebiyle oluşmaktadır (79). Fibrinojen doku ve damar hasarı sırasında, trombin tarafından enzimatik olarak fibrine ve ardından fibrin bazlı kan pıhtısına dönüştürülür (80).

Fibrinojen endotel hücreleri, fibroblastlar, mezotel hücreleri, düz kas hücreleri ve lenfositler gibi çeşitli hücre tiplerinde çoğalmayı teşvik eder (81). Ayrıca fibrinojenin proteolitik olarak parçalanmasıyla oluşan peptitler, vazokonstriksiyon, vazodilatasyon ve vasküler geçirgenliğin artışı gibi bir dizi vazoaaktif etkiye sahiptir (82). Doku onarımı sırasında, geçici fibrin matriks, çeşitli hücrelerin yara bölgesine göçü için önemli bir yapı oluşturur ve bu da daha sonra yeniden epitelizasyon, damarlanma ve kolajen birikimi ile sonuçlanır (83).

Fibrin matrisin yoğunluğu ve bileşimi, trombosit konsantrasyonunun önemli bir parametresidir (84). Trombositten zengin fibrin ürünlerinde fibrinojen konsantrasyonu farklı yöntemler arasında farklılıklar gösterir; örneğin P-PRP protokollerinde fibrinojen esas olarak aktivasyondan sonra trombosit alfa

granüllerinden kaynaklanır ve nihai fibrin konsantrasyonu düşüktür, oysa diğer protokollerde dolaşımdaki fibrinojen de toplanır ve nihai fibrin ağını güçlendirir (85).

2.2.6 Fibrin

Fibrin, plazmada bulunan fibrinojen adlı molekülün aktive edilmiş formudur (9). Bu çözünür fibrin molekülü plazmada olduğu kadar trombosit alfa granüllerinde de yoğun olarak bulunur. Hemostaz sırasında trombositlerin bir araya gelmesinde önemli bir rol oynarlar, bu da trombosit agregasyonunun belirleyici bir faktörüdür. Bu nedenle hemostaz sırasında ilk trombosit kümesini sağlamlaştıran bir tür biyolojik yapıştırıcıya dönüşür ve böylece pıhtılaşma sırasında vasküler hasar bölgelerinde koruyucu bir duvar oluşturur (12).

Çözünebilir bir protein olan fibrinojen, trombin tarafından çözünmeyen bir fibrine dönüştürülürken, polimerize fibrin jeli yaralı bölgenin ilk sikatrisyel matrisini oluşturur (86, 87). Fibrin matrisin yapısı biyolojik işlevini etkiler. Fibrin yapısı, liflerin kalınlığı, dallanma noktalarının sayısı, gözeneklilik ve geçirgenlik gibi değişkenlerle tanımlanır (9). Fibrin yapısındaki değişikliklerin yara iyileşmesi üzerinde de etkileri vardır (88).

2.3 Trombositten Zengin Ürünlerin Tarihsel Gelişimi

Otolog trombositlerin konsantreleri, trombositlerin ve otolog büyüme faktörlerinin plazma solüsyonlarında toplanıp, lokal iyileşmeyi desteklemek için cerrahi bir bölgede uygulanması konsepti üzerinden geliştirilmiştir (30, 31).

40 yıldan daha uzun bir süredir, iyileşme sürecini teşvik etmek için çeşitli kan kaynaklı ürünlerin kullanımı devam etmektedir. Başlangıçta trombosit konsantreleri sadece şiddetli trombopeni vakalarında kanamaları önlemek için kullanılmıştır (89). Trombosit konsantrelerinin kullanımı, doku onarımını teşvik etmek için fibrin yapıştırıcıları ile başlamıştır (90). Bu ilk biyoaktif madde, polimerizasyon sürecini başlatmak için trombin ve kalsiyum ilavesiyle birlikte donör plazması kullanılarak üretilmiştir. Ancak günümüzde hastalık bulaşma riski,

yüksek üretim maliyeti ve farklı fibrinojen konsantrasyonları nedeniyle, fibrin yapıştırıcıların modern rejeneratif tıpta kullanımı sınırlıdır (13, 59). Bu nedenle “Trombositten zengin plazma (TZP/PRP)” gibi yüksek trombosit konsantrasyonlarına sahip otolog kan ürünleri, fibrin yapıştırıcıların yerini almak ve iyileşme sürecini geliştirmek için bulunmuştur. PRP ilk nesil trombosit konsantresini temsil eder ve ilk kez 1997 yılında tanıtılmıştır (91).

PRP’nin hazırlanması ve uygulanmasındaki zorluklar, 2001 yılında Choukroun ve ark. tarafından sadece otolog kaynaklardan üretilen ve herhangi bir antikoagülan veya sığır trombini içermeyen “Trombositten zengin fibrin (TZF/PRF)” olarak adlandırılan ikinci nesil trombosit konsantresinin ortaya çıkmasına yol açmıştır (92, 93).

2006 yılında Sacco ve ark. büyüme faktörlerinin daha yavaş salınımını sağlayan, daha yoğun ve daha zengin bir fibrin matris elde etmek amacıyla antikoagülansız bir tüpte kanı santrifüj ederek “Konsantre büyüme faktörü (KBF/CGF)”nü geliştirmiştir (94). CGF, PRF’den farklı olarak büyüme faktörlerinin birbirine sıkı sıkıya bağlı olduğu bir fibrin matris içermektedir (95).

Dohan ve ark. 2009 yılında otolog trombosit konsantrelerini fibrin yoğunluğu, lökosit içeriği ve hazırlanma prosedürünü göz önünde bulundurarak dört gruba ayırmışlardır (85): “Saf trombosit zengin plazma (P-PRP/P-TZP), lökosit ve trombosit zengin plazma (L-PRP/L-TZP), saf trombosit zengin fibrin (P-PRF/P-TZF), lökosit ve trombosit zengin fibrin (L-PRF/L-TZF)”.

Silika aktivatörlü cam kan alma tüplerinin hasta için olası bir sağlık tehlikesi oluşturması üzerine Tunalı ve ark. 2013 yılında “Titanyum trombosit zengin fibrin (T-PRF/T-TZF)”i geliştirmişlerdir (96). Titanyum tüpte hazırlanan bu trombosit zengin fibrin cam tüpte hazırlananlara benzer histolojik yapı göstermiştir. Bununla birlikte fibrin yapısı daha sıkı dokunmuş ve daha kalın görülmüştür (97, 98).

2014 yılında Choukroun ve ark. santrifüj kuvvetinin (hız ve zaman) hücre dağılımı üzerine etkilerini araştırmak için yaptıkları çalışmada nötrofilik

granülositlerin daha yoğun olduğu “İleri lökosit ve trombosit zengin fibrin (A-PRF/A-TZF)”i geliştirmişlerdir (99).

2017 yılında Choukroun ve ark. tek başına kullanılabilen veya çeşitli biyomateryaller ile kolayca birleştirilebilen sıvı formülasyonda kullanımı kolay bir trombosit konsantresi olan “Enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (I-PRF/I-TZF)”i geliştirmişlerdir (100).

2.3.1 Trombosit Zengin Plazma (TZP/PRP)

Trombosit zengin plazma preparatlarının kullanım amacı büyüme faktörleri ve trombositleri izole edip doku iyileşmesi, rejenerasyon ve hücre proliferasyonunda yer alan hücre fonksiyonları destekleyen ve modüle eden kemotaktik ve mitojenik özellikleri aktive etmektir (101).

1997 yılında Whitman ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile ilk nesil otolog trombosit konsantreleri olan PRP'nin oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanımının önü açılmıştır (102). PRP'deki trombosit ve büyüme faktörü konsantrasyonları periferik kandan ortalama 3-5 kat daha yüksektir (103). Cerrahi bölgeye uygulandığı zaman ilgili bölgede kemik birikimini ve rejenerasyonunun kalitesini artırarak iyileşmeyi geliştirir (104).

PRP sık kullanılmasına rağmen farklı ve uzun hazırlama protokolleri bulundurması, hazırlanması sırasında ksenojenik trombin ve antikoagülan eklenmesi gibi sınırlamalara sahiptir (105). Mevcut sınırlamaları ve özellikle eksojen materyal kullanımı immünolojik ve enfeksiyöz yanıtı neden olabileceği için yeni otolog trombosit konsantreleri arayışına girilmiştir (12, 102).

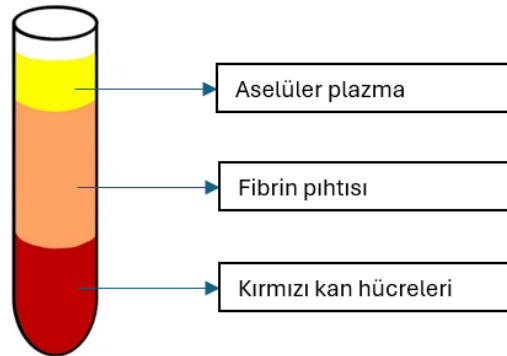
2.3.2 Trombosit Zengin Fibrin (PRF/TZF/L-PRF/L-TZF)

PRF, hazırlanması sırasında antikoagülan ya da sığır trombin gibi eksojen materyal içermeyen, hastanın kendi kanının santrifüjlenmesiyle hazırlanan trombosit konsantrelerinin ikinci nesli kabul edilen otolog bir materyaldir. İlk

olarak Fransa’da Choukroun ve ark. tarafından oral ve maksillofasiyal cerrahide özel kullanım için geliştirilmiştir (92).

PRF’nin hazırlanma protokolü PRP’ye göre daha basit olup hastanın kanının 2700 rpm 12 dakika boyunca santrifüjlenmesi ile elde edilir (106). Bu yöntemde trombositler ile lökositler yüksek verimlilikle toplanır ve lökositler baştan sona korunur. Bu sebeple Choukroun’un PRF’si L-PRF olarak da adlandırılır (13).

Santrifüj işleminden sonra tüpte kırmızı kan hücrelerinden oluşan alt katman, PRF pıhtısı içeren orta katman, aselüler plazmadan meydana gelen üst katman olmak üzere üç katman bulunur (Şekil 2.1). PRF pıhtısını trombositler ve lökositlerin yoğunlaştığı güçlü bir fibrin matris oluşturur. Antikoagülan yokluğu, tüp duvarlarıyla temas eden kan örneğindeki trombositlerin aktive olmasına ve bu da trombosit ve lökosit büyüme faktörleri ile sitokinlerinin fibrin matrisine gömülmesine yol açar (12, 28, 62).



Şekil 2.1. Santrifüj sonrası tüpteki katmanlar

L-PRF’nin fibrin matrisine gömülü olan transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insülin kaynaklı büyüme faktörü (IGF-1), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ile interlökin 1 (IL1- β), interlökin 6 (IL-6), interlökin 4 (IL-4) ve tümör nekroz faktörü (TNF- α) PRF’nin yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu etkilerinden sorumludur (59).

L-PRF üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada L-PRF’nin diş eti fibroblastları, periodontal ligament hücreleri ve oral epitel hücrelerinin proliferasyonlarını uyarak periodontal rejenerasyon için faydalı olabileceğini

göstermiştir (107). Bir başka araştırmada L-PRF'nin doku rejenerasyonu için bir biyoiskele ve büyüme faktörü rezervuarı olduğunu göstermiş ve alveolar kemik iliği kök hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü arttırdığı ve farklılaşmasını teşvik ettiği görülmüştür (29).

L-PRF'nin PRP ile kıyaslandığı bir çalışmada L-PRF'nin otolog büyüme faktörlerini PRP'ye göre kademeli olarak serbest bıraktığını ve osteoblastların proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde PRP'den daha güçlü ve kalıcı etki gösterdiğini belirtmişlerdir (58).

PRP'lerin aksine, Choukroun'un PRF'si uygulandıktan sonra hızla çözülmez bunun yerine, güçlü fibrin matrisi doğal kan pıhtısına benzer şekilde yavaşça yeniden şekillenir. PRF'nin bir diğer avantajı da düşük maliyeti ve birçok konsantrenin hızlı bir şekilde ve doğal yollarla, yani kimyasallar veya doğal olmayan koşullar kullanılmadan üretilmesine olanak tanıyan prosedürün büyük kolaylığıdır (13).

PRF ile tedavi edilen cerrahi bölgelerde önemli enflamatuvar düzenlemelerin olması, PRF'nin enfeksiyonlara karşı savunma kapasitesinin bulunmasından ötürü PRF sadece bir trombosit konsantresi değil savunma mekanizmalarını uyarabilen bağışıklık düzenleyici immün düğümdür (62, 90).

Yara iyileşmesi sürecini geliştiren PRF bu etkisini yapısındaki sitokinler, glikanik zincirler ve yapısal glikoproteinler aracılığıyla sağlamaktadır. Bununla birlikte PRF'nin yapısındaki fibrin anjiyogenezin doğal bir rehberi olup, bağışıklık için doğal bir destek oluştururken, epitel hücrelerinin ve fibroblastların metabolizmasını etkileyerek yaralı dokuların örtülmesine de rehberlik eder (19, 28, 90).

2.3.3 Konsantre Büyüme Faktörü (CGF)

2006 yılında Sacco ve arkadaşları tarafından geliştirilen CGF, PRF üretmek için kullanılan protokole benzer bir şekilde üretilir; ancak farklı santrifüj hızları içerir (94). Antikoagülan içermeyen cam kaplı plastik tüplere alınan kan, CGF

cihazında 30 saniye hızlandırma, 2700 rpm’de 2 dakika, 2400 rpm’de 4 dakika, 2700 rpm’de 4 dakika santrifüj ve sonunda cihazı durdurmak için 36 saniye yavaşlama aşamaları tabii tutulur (108).

Farklı santrifüj işlemleri uygulanan kan tüp içerisinde en üstte plateletten fakir serum tabakası, altında şeffaf ve geniş fibrin blok (buffy coat) tabakası, fibrin blok tabakasının altında büyüme faktörleri ve kök hücre tabakası (CGF) ve en altta kırmızı kan hücreleri tabakası olacak şekilde dört tabakaya ayrılır (103).

CGF, VEGF, PDGF, IGF-1 ve TGF- β gibi büyüme faktörleri içerir. CGF içerik olarak PRF ile benzer olsa da PRF ile karşılaştırıldığında, CGF daha yoğun ve daha zengin bir büyüme faktörü-fibrin matrisi içerir. Ayrıca CGF, büyüme faktörlerinin birbirine sıkı sıkıya bağlı olduğu 3 boyutlu bir fibrin ağına sahiptir. Bu durum yara iyileşmesine yardımcı olan büyüme faktörlerinin PRF’ye göre daha yavaş salınımını sağlar (95, 109). CGF’nin kemik içi defektler üzerine etkisini değerlendiren bir çalışmada, ksenograft ile kombine kullanılan CGF’nin üstün bir iskele materyali olarak görev yaptığı ve defekt derinliğini azalttığı sonucuna varılmıştır (110).

Mevcut avantajlarına rağmen CGF kullanımının sınırlamaları mevcuttur. CGF’deki trombosit sayısı kan pH’ından etkilenir; kan pH’ındaki değişiklikler hücre çoğalmasını bozabilir. Ayrıca CGF hazırlama süresi ve kan hacmi yara iyileşmesi üzerine olan sonuçları etkileyebilir (110).

2.3.4 Titanyum Trombositten Zengin Fibrin (T-PRF/T-TZF)

PRF ile bildirilen başarılı sonuçlara rağmen O’Connell ile arkadaşları cam tüplerdeki silikanın kan ile etkileşime girebileceğini ve potansiyel sağlık tehlikesi olduğunu bildirmiştir (12, 96, 111).

Tüpteki silika partikülleri, kırmızı kan hücreleriyle birlikte çökelme eğilimine sahip olmalarına rağmen, bazıları plazmanın buffy coat, fibrin ve trombositten fakir katmanlarında kolloidal olarak asılı kalacak kadar küçüktür. Bu nedenle PRF tedavi amacıyla kullanıldığında silika partikülleri hastaya ulaşabilir (15).

T-PRF, cam ve cam kaplı plastik tüplerin kısa veya uzun vadede ya da her ikisinde birden ortaya çıkabilecek olumsuz etkilerinden kaçınmak ve silika kontaminasyonunu engellemek amacıyla titanyum tüpler kullanılarak Tunalı ve arkadaşları tarafından 2013 yılında geliştirilmiştir (98).

T-PRF hazırlama protokolü Choukroun'un PRF protokolüne benzemektedir. Venöz kan antikoagülan olmadan 10 mL titanyum tüplerde toplanır ve vakit kaybetmeden 12 dakika boyunca 2700 rpm'de santrifüj edilir. Antikoagülan olmaması, kan örneğindeki trombositlerin çoğunun titanyum tüpün duvarıyla temas ettikten sonra birkaç dakika içinde aktive olmasına ve koagülasyon kaskadını başlatması anlamına gelir. Fibrinojen, dolaşımdaki trombin onu fibrine dönüştürmeden önce başlangıçta tüpün üst kısmında yoğunlaşır. Daha sonra tüpün ortasında, alttaki kırmızı cisimcikler ile üstteki aselüler plazma arasında bir fibrin pıhtısı oluşur (12, 16).

T-PRF ile L-PRF histolojik olarak benzer bir fibrin ağ yapısı ve hücresel bileşenler göstermekle birlikte T-PRF'nin daha kalın, organize ve belirgin bir fibrin ağı vardır (16). Bu yapısal özelliğinden dolayı T-PRF dokuda daha uzun süre kalmakta ve daha yavaş rezorbe olmaktadır (15).

2.3.5 İleri Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (A-PRF/A-TZF)

PRF hazırlama protokolünde santrifüj süresi ve hızına (santrifüj kuvveti) bağlı olarak fibrin matristeki hücre dağılımı değişmektedir (99). Yüksek santrifüj kuvveti varlığında hücreler tüpün dibine doğru toplanmaktadır. Santrifüj hızının azaltılarak hücre kaybını önlemek ve PRF matrisindeki lökosit sayısını artırmak amacıyla ileri lökosit ve trombosit zengin fibrin (A-PRF) Choukroun ve arkadaşları tarafından 2014 yılında geliştirilmiştir (112).

A-PRF, venöz kanın cam tabanlı vakumlu tüplere aktarıldıktan sonra 14 dakika boyunca 1500 rpm (230 g) azaltılmış santrifüj kuvveti uygulanması ile elde edilir (99). A-PRF aynı santrifüj süresi (14 dakika) kullanılarak 1.300 rpm (200 g) santrifüj hızıyla da elde edilebilir (94).

A-PRF santrifüj protokolü (1500 rpm, 14 dakika) ile oluşturulan PRF pıhtıları, daha fazla interfibröz boşluk ile daha gevşek bir yapı göstermiş ve fibrinden zengin pıhtıda daha fazla hücre görülmüştür. Ayrıca, hücreler L-PRF'ye kıyasla pıhtı boyunca daha eşit bir şekilde dağılmış ve pıhtının daha distal kısımlarında bile bazı hücreler bulunmuştur (99).

Bu duruma uyacak şekilde A-PRF, L-PRF'ye kıyasla daha fazla canlı hücre içerir. Özellikle nötrofil, lenfosit ve trombosit sayısında belirgin bir artış gözlenmiştir (99). Ayrıca, salınan büyüme faktörlerinin (TGF- β , VEGF, PDGF, EGF ve IGF-1) toplam miktarı A-PRF'de L-PRF'ye kıyasla belirgin şekilde daha yüksektir (113).

2.3.6 Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin (I-PRF/I-TZF)

PRF'nin yalnızca enjekte edilmeye uygun olmayan jel formunda elde edilebilmesi, PRP ile kıyaslandığında PRF'nin temel sınırlamalarından biridir. PRP sıvı formda uygulanabildiğinden, rejeneratif tıbbın farklı alanlarında tek başına veya çeşitli biyomateryallerle birlikte kullanılabilir. PRF'nin bu sınırlamasının önüne geçmek ve biyomateryallerle kolayca birleştirilebilen sıvı formülasyonda, kullanımı kolay bir trombosit konsantrisi sunmak amacıyla enjekte edilebilir bir PRF formülasyonu (I-PRF) 2017 yılında Choukroun ve ark. tarafından geliştirilmiştir (114).

I-PRF, antikoagülan içermeyen plastik tüplere alınan venöz kanın 3 dakika boyunca 700 rpm'de santrifüj edilerek üretilir (100). Bu protokolda kullanılan plastik tüpler hidrofobik yüzeye sahip olduklarından pıhtılaşma sürecini etkili bir şekilde aktive etmezler (115). Bu nedenle, bu prosedür santrifüjün ilk birkaç dakikasında kan bileşenlerinin ayrılmasına ve sarı tabakanın (plazma, pıhtılaşma faktörleri ve trombositler) tüpün üst kısmına yerleştirilmesine olanak tanır. Elde edilen tabaka kolayca aspire edilir ve enjekte edilebilir formda uygulanmaya hazırdır (114).

I-PRF üzerine yapılan çalışmalar büyüme faktörlerinin erken salınımının daha yüksek olduğunu gösterirken, I-PRF, PDGF-AA, PDGF-AB, EGF ve IGF-1'in

uzun vadeli salınımını da artırmıştır (100). Buna ek olarak, I-PRF enjekte edilebilirliği sayesinde diğer osteoindüktif ve osteokondüktif biyomateryallerle daha iyi kombine edilmektedir (116).

Tablo 2.1. Trombositten zengin kan ürünleri ve hazırlanış protokolleri

	Yıl	Hazırlanış Protokolü
PRF (L-PRF)	2001	2700 rpm 12 dakika
CGF	2006	30 saniye hızlandırma 2700 rpm 2 dakika 2400 rpm 4 dakika 2700 rpm 4 dakika 36 saniye yavaşlama
T-PRF	2013	2700 rpm 12 dakika
A-PRF	2014	1500 rpm 14 dakika veya 1300 rpm 14 dakika
I-PRF	2017	700 rpm 3 dakika

2.3.7 Trombositten Zengin Fibrinlerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

İyileşme ve yumuşak doku olgunlaşmasının anahtarları anjiyogenez, bağışıklık kontrolü, dolaşımdaki kök hücrelerin kullanılması ve epitelial örtü ile yara korumasıdır. Fibrin jelin 3 boyutlu yapısı, içinde hapsolmuş sitokinlerin etkisi ve anjiyogenezde rol oynayan faktörlerin varlığı ile PRF'nin anjiyogenez özelliği açıklanmaktadır. Fibrin, integrin ekspresyonunu uyararak hücrelerin fibronektin ve vitronektine bağlanmasını sağlar, bu da anjiyogenezde önemli bir aşamadır (19).

Fibrin ve fibrinojen yıkım ürünleri (FDP) nötrofil aktivasyonunu artırır ve nötrofil proteazlarının salınımını indükler. Yara bölgesindeki nötrofiller, toksik oksijen radikali üretimi ve enzim sindirimi ile birlikte fagositoz yoluyla kontamine edici bakterileri yok eder (10).

Monositler yaralanma bölgesine nötrofillerden daha geç ulaşır. Makrofajlar tarafından yara kolonizasyonunun, fibrinin kimyasal ve fiziksel özellikleri aracılığıyla fibronektin ve ağlarında hapsolmuş kemotaktik ajanlar tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (19). Bununla birlikte monosit/makrofajlarla fibrin etkileşimi fagositozu modüle eder. Dolayısıyla makrofajlar, fibrin tarafından modüle edilen yara iltihabı ve onarımı arasındaki geçişte çok önemli bir rol

oynamaktadır (10). Böylece, fibrin bağışıklık için doğal bir destek oluşturmaktadır (19).

Fibrin matrisi, epitel hücrelerinin ve fibroblastların metabolizmasını etkileyerek yaralı dokuların örtülmesine rehberlik eder. Hücreler fibrinojen, fibronektin, tenascin ve vitronektinden oluşan geçici matriks üzerinde göç eder. Büyüme faktörleri, özellikle PDGF ve TGF- β , pıhtı matriks proteinleri, fibrin ve fibronektin ile birlikte yara çevresi dokusunun fibroblastlarını çoğalmaya ve yara boşluğuna göç etmeye teşvik eder (10). Fibrinin göçü ve parçalanmasından sonra fibroblastlar kolajen sentezine başlar (19).

Dolayısıyla PRF'nin iyileşme kapasitesinde lökosit ve trombositler önemli bir rol oynasada, terapötik potansiyelinden asıl sorumlu olan yapı bu unsurları destekleyen fibrin matristir (117).

2.4 Trombositten Zengin Fibrinlerin Diş Hekimliğindeki Kullanım Alanları

Trombositten zengin fibrinler diş hekimliği ve tıpta birden çok alanda kullanımı olan materyaller olup esas olarak yara iyileşmesine katkılarıyla ön plana çıkarlar. Soket koruma ve sinüs lift prosedürlerinde, dişeti çekilmelerinde, periodontal rejenerasyonda, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda, implant yerleştirmede ve alveolar kret ogmentasyonlarında, kemik içi ve furkasyon defektlerinde, kistlerin rejeneratif tedavileri gibi bir çok alanda trombositten zengin fibrinler sıklıkla kullanılmaktadır (59).

Çekim sonrası iyileşme döneminde kemik dokuda hem genişlikte hem de yükseklikte kayıp görülmektedir (118). Çekim sonrası sokete PRF yerleştirildiği zaman daha iyi osseöz rejenerasyon ve yumuşak doku iyileşmesi görülmüştür (119). Antikoagülan tedavi gören hastalarda diş çekimi sonrasında PRF'nin faydalarının değerlendirildiği bir çalışmada PRF uygulanan bireylerde daha az ağrı ve daha hızlı iyileşme görülmüştür (120). Bununla birlikte çekim sonrası PRF uygulaması potansiyel alveolit riskini azaltmaktadır (121).

PRF sinüs lift prosedürlerinde greftle kombine bir şekilde kullanıldığı zaman iyileşme süresini yarı yarıya azaltmaktadır. Grefte eklenen PRF

anjyogenezi geliştirerek, greftin revaskülarizasyonunu iyileştirmektedir (122). PRF, bir kemik grefti ile karıştırıldığında kök hücreleri çeken, osteoprogenitör hücrelerin greftin merkezine göçünü destekleyen ve neoanjyogenezi sağlayan bir "biyolojik bağlayıcı" olarak hareket etmektedir (123). PRF membranı ayrıca sinüs perforasyonu vakalarında, oroantral fistülün cerrahi olarak kapatılmasına ek bir katman olarak da kullanılmıştır (117, 124).

PRF, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR) için rezorbe olabilen bir membran işlevi görür. Bu membran, istenmeyen hücrelerin kemik defektine göçünü önler, aynı zamanda osteojenik ve anjiyojenik hücrelerin göçüne izin verir. Ayrıca, altta yatan kan pıhtısının mineralleşmesine yardımcı olarak, kemik defektinin iyileşmesine katkı sağlayacak bir ortam oluşturur (125, 126).

Osteojenik etkisi bulunan PRF kemik içi ve furkasyon defektlerinin tedavisinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, konvansiyonel flep cerrahisine ek olarak ksenogreftle kombine ya da tek başına PRF uygulanmasının daha fazla klinik ataçman kazanımı, daha fazla sondlama derinliğinde azalma ve daha fazla kemik dolumu ile sonuçlandığını göstermiştir (127, 128).

PRF ve PRF membranlarının dişeti çekilmesi tedavisindeki rolü üzerine birçok çalışma mevcuttur. Koronale pozisyone flep cerrahisine ek olarak PRF uygulandığında keratinize dişeti genişliğinde artış ve daha iyi kök yüzeyi kapaması elde edilmiştir (129). Bir başka çalışma periodontal cerrahide PRF kullanımının özellikle erken iyileşme aşamasında önemli bir iyileşme ile daha kalın ve stabil bir dişeti oluşumuna yol açtığı sonucuna varmıştır (130). Bütün bu çalışmaların sonucunda PRF kullanımı tek başına koronale pozisyone flep ile karşılaştırıldığında kök kapanmasında kazanç sağladığı ancak bağ doku grefti ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlara yol açmadığı gerçeğini göstermektedir (131).

Mandibula kırıklarının tedavisinde PRF etkisini değerlendiren bir çalışmada kırık hattına lokal olarak PRF uygulanan grupta kemik iyileşmesini hızlandırmada klinik avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır (132). Benzer şekilde radiküler kistlerin enükleasyonundan sonra PRF membran ve biyoaktif cam kombinasyonun etkili bir rejeneratif tedavi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (133).

Yukarıda bahsi geçen uygulamaları dışında PRF'nin serbest dişeti grefti veya bağ doku grefti alındıktan sonra donör bölgelerde palatal bandaj olarak, rejeneratif endodontide nekrotik olgunlaşmamış daimî dişlerde pulpa revaskülarizasyonu için iskele olarak, periferik sinir yaralanmalarında ve temporomandibuler eklem rahatsızlıklarında kullanımı mevcuttur (134-137).

2.5 Lazer Tanımı ve Tarihçesi

1917 yılında Einstein aynı dalga boyundaki ışık enerjisine sahip bir foton uyarılmış bir atoma çarptığında, bu foton ile salınan ışık fotonunun eş zamanlı olarak boşalacağını ve dolayısıyla frekans ve faz bakımından aynı olacağını gösteren uyarılmış emisyon kavramını keşfetmiştir (138). Daha sonra amonyak buharının mikrodalga ışınları ile uyarılması sonucunda MASER (Uyarılmış Radyasyon Emisyonu ile Mikrodalga Amplifikasyonu) prensibi doğmuştur (139).

Schawlow ve Townes MASER prensibinin bütün elektromanyetik dalgalara uygulanabileceğini öne sürerek 1958'de LASER (Uyarılmış Radyasyon Emisyonu ile Işık Amplifikasyonu) kavramını ortaya koymuşlardır (140).

1960 yılında Maiman flaş tüpü ile çevrili gümüş kaplı uçları olan sentetik bir yakut kristali kullanarak ilk görünür ışık lazerini üretmiştir (141). 1960'ların ortalarına doğru lazer göz doktorları tarafından retinadaki pıhtılaştırıcı etkilerinden faydalanmak için tıp hekimliğinde kullanılmaya başlanmıştır. 1964 yılında Goldman ilk kez diş çürüklerinin tedavisi için diş hekimliğinde lazer kullanmıştır (142). Daha sonraki süreçte araştırmacılar farklı dalga boylarındaki lazer enerjisinin ağız dokuları üzerindeki etkilerini incelemeye başlamıştır. Yumuşak doku cerrahisinden, restoratif diş hekimliğine, rutin prosedürlerden deneysel uygulamalara kadar araştırmacılar ve klinisyenler diş hekimliğinde lazer kullanımının sınırlarını tanımlamış ve avantajlarını göstermişlerdir (143).

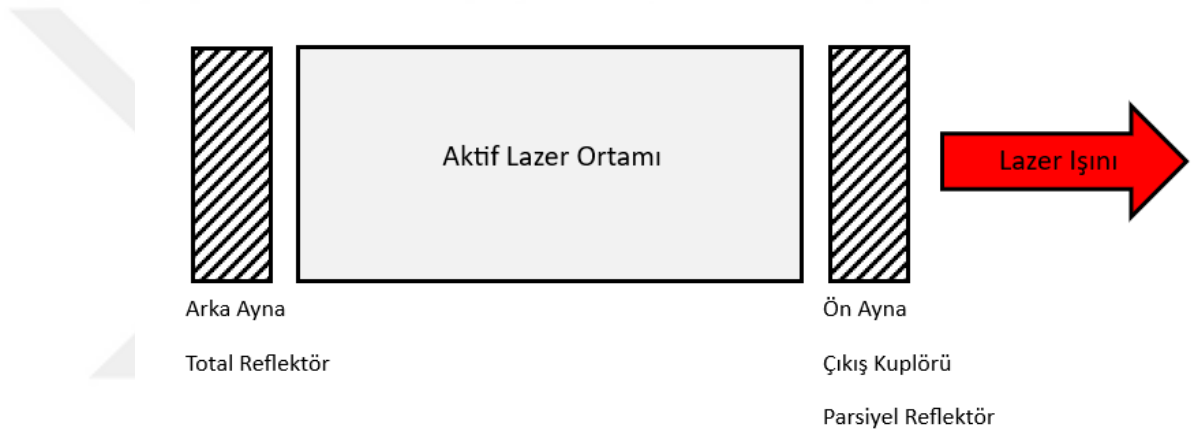
2.5.1 Lazer Cihazının Çalışma Prensibi

Lazer cihazı, bir enerji kaynağı, aktif bir lazer ortamı ile optik boşluk veya rezonatör oluşturan iki veya daha fazla ayna olmak üzere üç ana bölümden oluşur.

Amplifikasyonun gerçekleşmesi için enerji flaş cihazı, elektrik akımı veya elektrik bobini gibi bir pompalama mekanizması tarafından lazer sistemine sağlanır.

Bu enerji optik rezonatörün içindeki aktif ortama pompalanarak kendiliğinden foton emisyonu üretilir. Daha sonra fotonlar çıkış kuplörü yoluyla boşluktan dışarı çıkmadan önce optik rezonatörün yansıtıcı yüzeyleri tarafından ortam boyunca ileri geri yansıtıldığında uyarılmış emisyon yoluyla amplifikasyon gerçekleşir. Lazerin dalga boyu ve diğer özellikleri gaz, katı veya yarı iletkeni olabilen aktif bir ortamın bileşimi tarafından belirlenir (Şekil 2.2).

Dental lazerlerde lazer ışığı hedef dokuya fiberoptik kablo aracılığıyla iletilir. Odaklama lensleri ve soğutma sistemi ile cihaz tamamlanır (144).



Şekil 2.2. Lazer cihazının çalışma prensibi

2.5.2 Lazer Işınının Özellikleri ve Lazer-Doku Etkileşimi

Lazerler elektromanyetik spektrumun kızılötesi, görünür ve ultraviyole kısımlarında yer alır ve farklı dalga boylarında mevcuttur (145). Lazer ışığının üç temel özelliği bulunmaktadır; monokromite (tek renk), koherans (tüm ışık dalgaları hem uzamsal hem de zamansal olarak aynı fazdadır), kolimasyon (tüm ışınlar birbirine paraleldir ve uzun mesafelerde bile önemli ölçüde sapmaz) (146).

Her lazerin dalga boyu, doku üzerinde yaratacağı etkiyi belirler (146). Bununla birlikte lazer ışını dokuyla etkileştiğinde dört temel olay meydana gelir; transmisyon (derin dokulara geçiş), scattering (saçılma), refleksiyon (yansıma) ve absorpsiyon (emilim) (147).

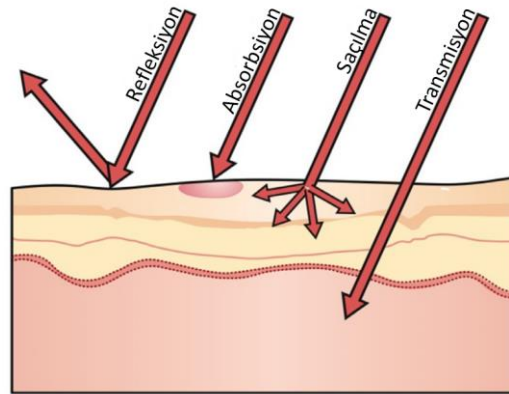
Transmisyon (Derin dokulara geçiş); ışının ortama girdiğı ancak gelen ışın ile ortam arasında herhangi bir etkileşim olmadığı, ışının değışmeden veya kısmen kırılmış şekilde dokudan çıkmasıdır.

Scattering (Saçılma); ışınla doku arasında bir miktar etkileşim olduğu ancak etkileşimin ışının tamamen zayıflamasına neden olmadığı durumdur. Saçılma, ışınların ortam boyunca kontrolsüz bir yönde ilerlemesi sebebiyle lazer ışınında bozulmayla birlikte ışık enerjisinin mesafeyle birlikte bir miktar azalmasına neden olacaktır. Bu durum en çok kısa dalga boylarında görülür.

Refleksiyon (Yansıma); ortamın yoğunluğu veya geliş açısı kırılma açısından küçük olması ışının yansımaya neden olur. Gerçek yansımada gelen ve çıkan açılar aynı olacaktır ancak ortam pürüzlü ya da homojen değılse bir miktar saçılma meydana gelebilir.

Absorbisyon (Emilim); ışının enerjisinin ortam tarafından zayıflatılıp, başlangıç enerjisinin büyüklüğüne göre termal ya da termal olmayan etkiler yaratacak şekilde doku içerisine geçmesidir (Şekil 2.3) (147, 148).

Bir lazer absorbe edildiğinde, sıcaklığı yükseltir ve dokuların su içeriğine bağılı olarak fotokimyasal etkiler üretir. 100°C'lik bir sıcaklığa ulaşıldığında, doku içindeki suyun buharlaşması gerçekleşir ve bu süreç ablasyon olarak adlandırılır. 100°C'nin altındaki, ancak yaklaşık 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, proteinler alttaki dokuda buharlaşma olmaksızın denatüre olmaya başlar. Tersine, 200°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda doku susuz kalır ve ardından yanarak karbonizasyon adı verilen istenmeyen bir etkiye neden olur (144).



Şekil 2.3. Lazer-doku etkileşimi

2.6 Lazer Sınıflaması

2.6.1 Enerji Düzeyine Göre Lazerler

Düşük ve yüksek seviyeli olmak üzere iki ana gruba ayrılır. CO₂ (10600 nm), Nd: YAG (1064 nm), Er: YAG (2940 nm) ve Er, Cr: YSGG (2780 nm) gibi yüksek seviyeli lazerler hemostazı sağlaması ve ortam ısınısını arttırarak mikrobiyal seviyeyi azaltmalarından dolayı daha çok cerrahi prosedürlerde kullanılmaktadırlar (2). Diyot lazer (InGaAs) gibi düşük seviyeli lazerler (780-980 nm) ise aktif olarak biyostimülasyonda kullanılmaktadırlar (3).

2.6.2 Kullanılan Aktif Ortama Göre Lazerler

2.6.2.1 KATI AKTİF ORTAM KULLANILAN LAZERLER

- Nd: YAG lazer
- Er: YAG lazer
- Hol: YAG lazer
- Er, Cr: YSGG lazer
- Ruby lazer
- Nd, Cr: YAG lazer

2.6.2.2 SIVI AKTİF ORTAM KULLANILAN LAZERLER

- Dye lazer
- Rhodamine lazer

2.6.2.3 GAZ AKTİF ORTAM KULLANILAN LAZERLER

- He-Ne lazer
- Argon lazer
- CO₂ lazer

2.6.2.4 YARI İLETKEN ORTAM KULLANILAN LAZERLER

- GaAs lazer

- Diyot lazer
- AlGaAs lazer (149)

2.7 Diş Hekimliğinde Kullanılan Lazerler

2.7.1 Karbondioksit (CO₂) Lazer

Kapalı bir tüpün içerisinde elektrik deşarj akımı yoluyla pompalanan karbondioksit molekülleri ile gaz halindeki bir karışımı bulunduran, gaz aktif ortamlı bir lazerdir. Dalga boyu 10600 nm olup su tarafından kolayca absorbe edilebilir (150).

Sığ penetrasyon derinliğine sahip olduğu için mukozal lezyonların tedavisinde kullanılan karbondioksit lazer, yumuşak dokuyu kolayca kesip pıhtılaştırır. Bu nedenle açık ve rahat bir çalışma alanı sağlar. Post-op ağrı genellikle minimal düzeydedir veya hiç yoktur (151).

Avantajlarının yanı sıra CO₂ lazerin dezavantajları bulunmaktadır. Uygulandığı bölgede yara iyileşmesi daha geç olur ve tedavi edilen doku siyah/kahverengi bir görünüme sahiptir. Oluşan bu görünüm tedavi sonrasında meydana gelen karbon kalıntılarından kaynaklanmaktadır. Tedavi edilen bölge 10 ile 14 gün sonra doğal ve sağlıklı görünümüne kavuşur (152).

2.7.2 Neodymium: Yttrium-Aluminum-Garnet (Nd: YAG) Lazer

Nd: YAG lazer 1064 nm dalga boyuna sahip olup gingivektomi, gingivoplasti, oral ülserler gibi yumuşak doku tedavileri ile Er: YAG veya Er, Cr: YSGG lazerler kadar etkili olmasa da yeni başlayan mine çürüklerini gidermek amacıyla kullanılmaktadır (153, 154). Nd: YAG lazer yumuşak doku prosedürlerinde iyi bir hemostaz sağladığı için net bir çalışma alanı sağlar (155).

Mevcut tüm dental cerrahi lazer sistemleri arasında en yüksek penetrasyon derinliğine sahiptir. Bundan dolayı yüzeyin altındaki dokular lazer enerjisine maruz

kalmaktadır. Bu durum özellikle altta yatan kemik ya da diş pulpasında istenmeyen yan hasar ve postoperatif mobiditeye neden olabilir (156).

Buna ek olarak enerjinin doku yüzeyindeki lokalizasyonunun azalmasıyla yumuşak dokunun buharlaştırılması, Nd: YAG lazer ile CO₂ lazer gibi daha iyi absorbe edilen dalga boylarına sahip lazerlere göre daha yavaş hale getirir (157).

2.7.3 Erbium: Yttrium-Aluminum-Garnet (Er: YAG) Lazer

Er: YAG lazer 2940 nm dalga boyuna, erbiyum katkılı katı bir itriyum alüminyum garnet kristalinden oluşan aktif ortama sahiptir (158). Bu dalga boyu lazerin hidroksiapatit ve su tarafından absorpsiyonu için ideal olup, mine ve dentin gibi sert dokularda kullanımını daha verimli hale getirir. Çürük giderme ve diş preparasyonu bu lazerle kolayca gerçekleştirilebilir. Er: YAG lazer mine ve dentinde temiz, keskin kenarlar oluşturur (159). Bununla birlikte yumuşak dokuları da kesebildiği için hem sert hemde yumuşak doku tedavilerinde kullanılan tek lazerdir (160).

Er: YAG lazerin dalga boyu suyun absorpsiyon katsayısına denk gelir. Bu nedenle dokularda suyun buharlaşmasına neden olarak sert dokunun mikro patlamasına yol açar. Bu ablasyon süreci alttaki dokularda çok az ısı oluşumuna ve pulpal sıcaklığın çok az yükselmesine neden olur (161).

Lazer, kök kanalları içinde ve kök yüzeylerinde kullanıldığında antimikrobiyal özellik göstererek ve kök yüzeylerinden endotoksinleri uzaklaştırır. Er: YAG lazerden kaynaklanan titreşim, geleneksel yüksek hızlı frezden kaynaklanan titreşimden daha az şiddetlidir bu yüzden hastada daha az rahatsızlık ve ağrı oluşturur (162).

Yapılan bir çalışma Er: YAG lazerin kök debridmanı sırasında diş taşlarının uzaklaştırılması için potansiyeli olduğu göstermiştir. Ancak kök yüzeylerindeki diş taşlarını seçici olarak temizlemediğini belirtmiştir (163).

2.7.4 Erbium, Chromium: Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet (Er, Cr: YSGG) Lazer

Er, Cr: YSGG lazer 2780 nm dalga boyunda olup erbiyum ve krom katkılı katı bir itriyum skandiyum galyum garnet kristalinden oluşan aktif bir ortama sahiptir. Er: YAG lazerle benzer şekilde sert dokuda uygulamaları bulunan Er, Cr: YSGG lazer mine ve dentinde önemli bir çatlama olmadan pürüzlü bir yüzey oluşturur. Uygulama sonrasında dentinde smear tabakası bırakmaz. Pulpa için güvenlidir (164).

Yapılan çalışmalarda Er, Cr: YSGG lazerle mine aşındırılması yapıldıktan sonra rezin uygulandığında sızıntının arttığı görülmüştür. Bu nedenle rezinlerdeki sızıntıyı minimize etmek için lazer ile kavite hazırlandıktan sonra minenin asitle aşındırılması gerekmektedir (165).

2.7.5 Holmium: Yttrium-Aluminum-Garnet (Hol: YAG) Lazer

Hol: YAG lazer katı hal lazerlerinden biridir. Dalga boyu yaklaşık 2100 nm'dir. CO₂ lazerle benzer kullanım alanı sahiptir ve yumuşak doku tedavilerinde kullanılır (166).

2.7.6 Argon Lazer

Argon lazer yüksek akımlı elektrik deşarjı ile enerjilendirilen argon gazından oluşan bir lazerdir. 488 nm ve 514 nm olmak üzere iki farklı dalga boyuna sahiptir. Hemanjiyom gibi vaskülerize lezyonların tedavisi için idealdir. Mine ve dentinde minimum absorpsiyona uğradığı için sert doku tedavilerinde kullanılmaz (167).

2.7.7 Diyot Lazer (InGaAs/Indium-Gallium-Arsenid)

Diyot lazer alüminyum veya indiyum, galyum ve arsenik kombinasyonu kullanılarak yarı iletken kristallerden üretilen katı hal lazeridir. Dental kullanım için mevcut dalga boyları alüminyum içeren aktif ortam için yaklaşık 800 nm ile indiyumdan oluşan aktif ortam için 980 nm arasında değişmektedir (168).

Tüm diyet dalga boyları pigmentli doku tarafından yüksek oranda emilir ve derinlemesine nüfuz eder. Bu durum diyet lazeri iyi bir hemostatik ajan haline getirir. Bu lazerler diş yapıları tarafından nispeten az emilir, böylece yumuşak doku cerrahisi mine dentin ve semente yakın yerlerde güvenle gerçekleştirilebilir (169).

Diş hekimliğinde 2 ile 10 watt civarında güç çıkışıyla kullanılan diyet lazer sürekli veya darbeli modda kullanılabilir. Ancak argon lazere benzer şekilde diyet lazerin sürekli dalga emisyon modu hedef dokuda hızlı bir sıcaklık artışına neden olabilir. Klinisyen cerrahi bölgeyi soğutmak için hava ve bazen de su kullanmalıdır (170).

Diyet lazer mükemmel bir yumuşak doku cerrahi lazeridir. Dişeti ile mukozanın kesilmesi, koagüle edilmesi ve sulküler debridman için endikedir. Son olarak belirli düşük enerji aralıklarında diyet lazer fibroblastların çoğalmasını uyarak fotobiyomodülatif etki göstermektedir (171).

2.8 Lazerlerin Diş Hekimliğinde Kullanım Alanları

Dental lazerler, hemostaz, sinir uçlarını ve lenfatik damarları kapatma yeteneği, ameliyat sonrası ağrı ve şişliğin azaltılması (böylece ameliyat sonrası analjezik/narkotik ihtiyacının azaltılması), bakteri sayısının azaltılması ve çoğu cerrahi prosedürde sütür ihtiyacının en aza indirilmesi gibi bir dizi klinik avantaj sunmasından dolayı belirli klinik senaryolarda tercih edilen bir tedavi yöntemidir (172).

Diş hekimliğinde lazerlerin klinik uygulamaları yumuşak doku tedavileri, sert doku tedavileri ile diagnostik ve tedavi edici girişimler olmak üzere üç ana grupta incelenir (Tablo 2.2) (173, 174).

2.8.1 Yumuşak Doku Tedavileri

- Gingivektomi/gingivoplasti
- Operkülektomi
- Epüls eksizyonu
- İnsizyon ve drenaj prosedürleri

- Frenektomi
- Vestibüloplasti
- Çekim bölgelerinin koagülasyonu
- Herpetik veya tekrarlayan aftöz lezyonların tedavisi
- İmplantın açığa çıkarılması
- Sulkuler retraksiyon
- Granülom veya apse ablasyonu
- Dudak, dil, damak ve bukkal mukozadaki benign lezyonların eksizyonu
- Kök kanal tedavisine ek olarak pulpanın çıkarılması
- Eksizyonel biyopsi
- Sulkuler debridman (175)

Diyot (810 nm, 940 nm, 980 nm), Nd: YAG (1064 nm), CO₂ (10600 nm), Er: YAG (2940 nm), Er, Cr: YSGG (2780 nm) lazerleri yumuşak doku için en yaygın kullanılan dalga boylarıdır (160).

2.8.2 Sert Doku Tedavileri

- Çürük lezyonların kaldırılması
- Kavite preparasyonu
- Defektif kompozit restorasyonların düzeltilmesi
- Kron boyu uzatılması
- Periimplantitis vakalarında implant çevresinin dezenfeksiyonunda
- Dentin hipersensitivitesi tedavilerinde (176)

Er: YAG (2940 nm) ve Er, Cr: YSGG (2780 nm) sert dokuda kullanılan dental lazerlerdir. Erbiyum lazer ailesi doğal diş yapısı ve kemiğin bir bileşeni olan karbonatlı hidroksiapatitte iyi absorbe edilirler. Bu doğal absorpsiyon nitelikleri erbiyum lazerlerin dişi ve kemiği ablate etmesine olanak tanır (173).

2.8.3 Diagnostik ve Tedavi Edici Girişimler

- Çürük ve diş taşı tespiti
- Optik ölçü alımı
- Fotodinamik terapi
- Post operatif ağrı kontrolü
- Fotoaktif dezenfeksiyon
- Sinir onarımı ve rejenerasyonu
- Fotobiyomodülasyon (144, 173)

Farklı dalga boyları ve çeşitli aparatlarla gerçekleştirilebilen lazerle yapılan diagnostik ve tedavi edici girişimler, subtermal doku etkileşimini sağlamak için terapötik pencerenin 1 ile 500 mW arasında olması gerektiği prensibi üzerine kuruludur. Cerrahi lazerler olarak da bilinen yüksek seviyeli lazerler odaklanamayacağı için düşük seviyeli lazerler diagnostik ve tedavi edici etkiler elde etmek amacıyla kullanılır (177, 178).

Tablo 2.2. Diş hekimliğinde kullanılan lazerler ve kullanım alanları

Lazer Tipi	Aktif Ortamı	Dalga Boyu	Kullanım Modu	Uygulama Alanları
CO ₂	Gaz	10.600 nm	Atımlı veya sürekli	Yumuşak doku ablastasyonu Gingival düzenleme Ülseratif lezyonların tedavisi Frenektomi ve gingivektomi
Nd: YAG	Katı	1064 nm	Atımlı	Kök kanal tedavisi: Kök kanalındaki patojenik mikroorganizma ve debrisin uzaklaştırılmasına yardımcı olur Çürük uzaklaştırma
Er: YAG	Katı	2940 nm	Atımlı	Çürük uzaklaştırma Kavite preparasyonu Kök kanal preparasyonu
Er, Cr: YSGG	Katı	2780 nm	Atımlı	Yüzey pürüleştirme Çürük uzaklaştırma Kavite preparasyonu Kemik ablastasyonu Kök kanal preparasyonu
Hol: YAG	Katı	2100 nm	Atımlı	Gingival düzenleme Oral lezyonların tedavisi Frenektomi ve gingivektomi
Argon	Gaz	488-514 nm	Atımlı veya sürekli	Restoratif rezin materyallerin polimerizasyonu Bleaching Gingival düzenleme Rekürrent aftöz ülserler veya herpetik lezyonların tedavisinde Frenektomi ve gingivektomi
Diyot	Katı	800-980 nm	Atımlı veya sürekli	Fotobiyomodülasyon Frenektomi ve gingivektomi Gingival düzenleme

2.8.4 Lazerin Fotobiyomodülasyon Etkisi ve Mekanizması

Fotobiyomodülasyon literatürü, 694 nm’lik dalga boyuna sahip lazer ile tedavi edilen farelerde saç uzatma etkilerini tanımlayan bir rapor yayınlayan Endre

Mester'in bulgularına dayanmaktadır. Daha sonra bu bulguları, insanlarda çeşitli ülserlerin iyileşmesini iyileştirebileceğini gösteren klinik çalışmalarla desteklemiştir (179, 180). Bu ilk gözlemler lazer ışığının kırmızı ve yakın kızılötesi dalga boylarının çeşitli hastalıkların tedavisindeki etkilerini araştıran ek bilimsel çalışmalara yol açarak bugüne kadar 3500'den fazla bilimsel makale yayınlanmasıyla sonuçlanmıştır. Bu araştırmaların %90'ında ışık kaynağı olarak lazerler kullanılmıştır (171).

Fotobiyostimülasyon mekanizması temelde absorbe edilen fotonların, fotoreseptör moleküler konfigürasyonunda kaymaya neden olmasına dayanmaktadır. Fotoreseptördeki reaksiyonlar, hücresel sinyalizasyonda değişikliğe ve bu durumda hücresel fonksiyonlarda değişimlere sebep olur (181).

Yapılan çalışmalar fotobiyostimülasyonun özellikle mitokondriyal solunum zincirindeki sitokrom c oksidaz (CcO) üzerinde etkili olduğunu ve elektron taşınımını kolaylaştırarak adenosin trifosfat (ATP) üretimini arttırdığını göstermektedir (182). ATP üretiminin artması hücresel metabolizmanın işlevlerini güçlendirerek biyoyararlanımı arttırmaktadır (183).

Buna ek olarak kırmızı ve yakın kızılötesi ışığın emilimi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve nitrik oksit (NO) salınımına neden olur (184). Bu moleküller ikinci haberci mekanizması yoluyla hücre çekirdeğindeki çeşitli genlerin aktivasyonunu indükler, büyüme faktörlerinin üretimini teşvik eder ve hücrenin canlılığı ile hareketliliğini artırır. Ayrıca hücre dışına salınan NO güçlü bir vazodilatör görevi görerek mikrosirkülasyonu iyileştirir ve yara onarım süreçlerinin daha iyi düzenlenmesini sağlar (185).

Absorbe edilen ışık enerjisi miktarı lazerin biyolojik süreçleri uyarma kabiliyetini etkiler. Enerji, lazerin penetrasyon derinliği, dalga boyu, optik ve sıcaklık özellikleri, gücü, enerji değerleri, saçılma katsayısı, dokunun lazere maruz kalma süresi dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır (181).

Fotobiyomodülasyon genellikle düşük dalga boylarında (düşük doz) yaklaşık 700-770 nm aralığında meydana gelir. Ancak kutanöz doku bölgelerine ve dokunun daha altına ulaşmak için 950 nm'ye kadar olan dalga boyları gereklidir. Bu nedenle optimum dalga boyu 810 nm olarak kabul edilir (186). Wang ve

arkadaşları 810 nm’lik dalga boyunun mitokondriyal aktiviteyi geliştirmek için sitokrom c oksidaz ve diğer kromofolar tarafından absorbe edilerek biyostimülatif etki gösterdiğini belirtmişlerdir (187).

2.8.5 Düşük Doz Lazerin İnflamasyon Üzerine Etkileri

Düşük doz lazer uygulaması matris metalloproteinaz 8’in (MMP-8) miktarını azaltarak, prostoglandin üretimi engelleyerek ve plazminojen aktivitesini arttırarak inflamasyon görünümünü minimize eder. Buna ek olarak yapılan çalışmalar lazerin fotobiyomodülasyon etkisinin IL-1 β ’yı azaltabileceği göstermiştir. Ayrıca fotobiyomodülasyon ile PDGF ve TGF- β üretimi uyarılırken interferonlar eşzamanlı olarak baskılanır. Bu nedenle geleneksel periodontal tedaviler ile birleştirilen düşük doz lazer uygulaması daha iyi tedavi sonuçlarına ve daha kısa tedavi sürelerine yol açmaktadır (188).

2.8.6 Düşük Doz Lazerin Onarım Süreçleri Üzerine Etkisi

Düşük doz lazer vazodilatasyona bu nedenle lokal kan dolaşımının artmasına neden olur. Vasküler genişleme artmış kan akışına ve dokulara bağışıklık hücresi göçüne neden olarak doku onarımını hızlandırır. Mevcut çalışmalar 660 nm, 820 nm ve 940 nm dalga boylarına sahip lazerlerin mast hücre degranülasyonuna ve bunun da dokuda lökosit dağılımını hızlandırmak üzere TNF salınmasını tetiklediğini göstermiştir. Öte yandan mast hücrelerinin oluşturduğu proteaz lökositlerin dokuya girişini de kolaylaştıracaktır (1).

Bunlara ek olarak lazerin fotobiyostimülatif etkisine maruz kalındığında lenfositler aktive olur ve daha hızlı çoğalırlar. Benzer şekilde lazer fibroblastların da çoğalmasına ve olgunlaşmasına, daha az prostoglandin E2 ve daha fazla FGF üretmesine neden olur (189).

2.8.7 Düşük Doz Lazerin Ağrı Üzerine Etkileri

Çok sayıda çalışma lazer ışığının farklı hücrelerle etkileşiminin neden olduğu fizyolojik değişikliklerin analjezik etkiye neden olmakla ilişkilendirmiştir.

Düşük doz lazer ATP sentezinin amplifikasyonu, çift katmanlı lipid membran ve proteinlerinin sıklığını arttırması gibi mekanizmalarla bu etkiye sebep olmaktadır. Düşük doz lazer, doza bağlı bir şekilde inflamatuvar süreci hafifleterek ağrıyı azaltır. En iyi sonuçlar lazerin ameliyattan sonraki ilk 72 saat içinde uygulanmasıyla elde edilmiş olup akut ağrıyı azalttığı görülmüştür (190).

2.8.8 Lazer Dozunun Hesaplaması

Lazer tedavisinde geniş bir terapötik pencere bulunsa da makul bir dozun uygulanması kritiktir.

Enerji yoğunluğu, verilen enerjinin mW saniye cinsinden çarpılmasıyla elde edilir (örneğin 100mW 10 saniye = 1000mJ = 1J). Doz enerjinin ışınlanan alana bölünmesiyle hesaplanır. Eğer ışınlanan alan 1 cm² ise hesaplama 1/1 = 1J/cm² olur, eğer ışınlanan alan 0.25 cm² ise hesaplama 1/0,25 = 4 J/cm² olur (191).

Biyolojik etkileri tetiklemek için belirli bir güç yoğunluğu (cm² başına mW) gereklidir. Bu nedenle düşük çıkış, daha uzun süreli ekspoz ile tam olarak telafi edilemez ve tedavi hedef bölgesinin derinliği dikkate alınmalıdır. Saniyeler veya dakikalar cinsinden doz önerileri, lazerin özellikleri bilindiğinde yapılabilir.

Lazer ışığı dokuya girdikten sonra absorbe edilir, yansıtılır iletilir ve saçılır. Bu nedenle lazer probu ve hedef doku arasındaki doku miktarı ve tipi dikkate alınmalıdır. Örneğin lazer enerjisi kas doku yerine mukozada daha kolay iletilir.

Hemoglobin ve diğer pigmentler lazer ışığını güçlü bir şekilde absorbe ederler, bu nedenle daha yüksek dozlar gerektirebilirler. Penetrasyon, basınç kullanılarak, lazeri hedefe yaklaştırarak veya bölgede kısmi iskemi oluşturarak iyileştirilebilir. Benzer şekilde cilt rengi melaninin ışığı iyi absorbe etmesinden dolayı dikkate alınmalıdır (192).

Tüm uygulamalar için bir istisna dışında kontakt mod gereklidir. Açık bir yaranın tedavisi için lazer ile hedef doku arasında 2 ile 4 mm'lik bir mesafe sağlanmalıdır. Diş yapılarına temas edildiğinde, enerji kaybını en aza indirmek amacıyla prob ile yüzey arasında tam temas sağlamak için bir miktar sıvıya ihtiyaç duyulabilir (192).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı. (Tarih 04.07.2023 Karar 2023/231) (EK-1)

3.1 Çalışma Tasarımı ve Yönetimi

Çalışmamıza Eylül 2023-Aralık 2023 tarihleri arasında, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'na periodontal muayene ve tedavi amacıyla başvurmuş, sistemik olarak sağlıklı ve doğal pıhtılaşma sürecine etki edecek ilaç kullanmayan kişiler dahil edilmiştir.

Çalışmanın amacı ve uygulanacak işlemler hastalara anlatılmış, hastalara çalışmaya kendi isteklerine göre katıldıklarına dair bilgilendirilmiş hasta onam formları imzalatılmıştır. (EK-2)

Çalışma için minimum örneklem sayısı G. Power-3.1.9.2 programı kullanılarak tip 1 hata 0,05 ve %80 power, etki büyüklüğü 0.5 olacak şekilde her bir grup için 12 hasta olarak kabul edilmiştir. Gözlemlerde oluşabilecek kayıplar düşünüldüğünde elde edilmesi gereken minimum örneklem hacminin %25'inden fazla gözlem elde edilmesi kararı alınmış ve minimum örneklem 15 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamız, 18-65 yaşları arasında kadın ve erkeklerden oluşan toplam 15 birey ile bu bireylerden alınan toplam 120 kan örneği üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız 15 adet lazer uygulanmamış L-PRF, 15 adet lazer uygulanmış L-PRF, 15 adet lazer uygulanmamış T-PRF, 15 adet lazer uygulanmış T-PRF olmak üzere 4 gruptan oluşmaktadır.

Çalışma grupları:

Grup 1: Sistemik olarak sağlıklı hastalardan elde edilen lazer uygulanmamış L-PRF membran (n=15)

Grup 2: Sistemik olarak sağlıklı hastalardan elde edilen lazer uygulanmış L-PRF membran (n=15)

Grup 3: Sistemik olarak sağlıklı hastalardan elde edilen lazer uygulanmamış T-PRF membran (n=15)

Grup 4: Sistemik olarak sağlıklı hastalardan elde edilen lazer uygulanmış T-PRF membran (n=15)

Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri:

- 18-65 yaşları arasında
- Sistemik olarak sağlıklı
- Düzenli olarak herhangi biri ilaç kullanmama

Çalışmaya Hariç Tutulma Kriterleri:

- Sigara (tütün) ve alkol kullananlar
- Bifosfonat kullanımı altında olanlar
- Trombosit fonksiyon ve pıhtılaşma bozukluklarına sahip olanlar
- Doğal pıhtılaşma sürecine etki eden ilaç kullananlar
- Hamilelik ve emzirme döneminde olanlar

Çalışmamızın amacı; lazerin biyostimülatif etkinliğinden yararlanarak diş hekimliğinde yaygın uygulama alanı olan T-PRF ve L-PRF fibrin yapılarının bozunma miktarları değişimlerinin ölçülmesi, histolojik ve taramalı elektron mikroskop görüntülerinin incelenmesidir.

3.2 Trombosit ve Tam Kan Sayımı Yapılması

Çalışmaya katılmayı kabul eden ve dahil etme kriterlerimize uyan hastalar herhangi bir işlem yapılmadan önce trombosit ve tam kan sayımı yapılması için kendi aile hekimlerine yönlendirildi.

3.3 Bireylerden Kan Alınması

Hastalardan kliniğimizde rutin olarak dikkat edilen asepsi ve antisepsi kurallarına uyularak antekübital veninden vacutainer seti aracılığıyla uzman kişiler tarafından 4 adet boş vakumlu tüpe kan alınıp santrifüj aşamasına geçilmiştir. Aynı hastalardan 2 hafta sonra asepsi ve antisepsi kurallarına uyularak 20 mL'lik enjektör aracılığıyla, sağ ve sol antekübital veninden uzman kişiler tarafından toplam 40 mL olacak şekilde kan alınıp 10 mL olarak 4 titanyum tüpe nakledilip santrifüj aşamasına geçilmiştir (Fotoğraf 3.1).

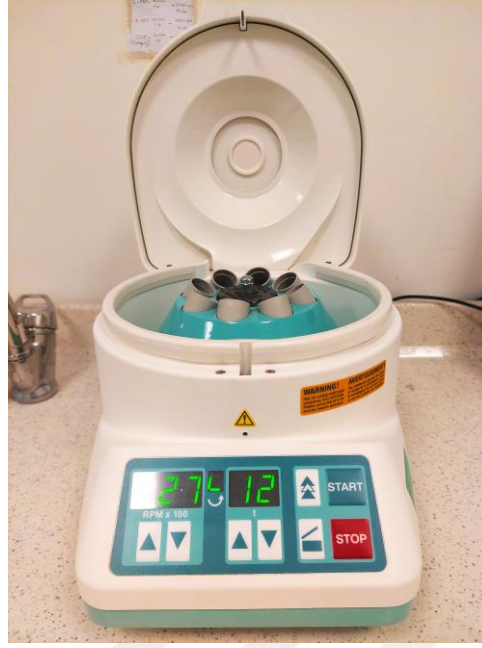


Fotoğraf 3.1. Bireylerden kan alınması

3.4 L-PRF Membranın Elde Edilmesi

Hastalardan alınan 40 mL kan, santrifüj cihazı olan IntraSpin™ (Intra-Lock International, ABD) masa üstü santrifüj cihazına denge sağlanacak şekilde karşılıklı olarak yerleştirilmiştir.

IntraSpin™ cihazında 2700 rpm santrifüj kuvvetinde 12 dakikalık santrifüj süresi L-PRF elde etmek için gereklidir. Bu nedenle tüm alınan örnekler için cihaz belirtilen süre ve rpm'e ayarlanmıştır (Fotoğraf 3.2).



Fotoğraf 3.2. IntraSpin™ santrifüj cihazı

Santrifüj sonrasında vakumlu boş tüp içerisinde oluşan 3 tabakanın ortasındaki fibrin bir presel aracılığı ile tutulup alınmıştır. Ardından fibrinin en alt katmanında yer alan eritrositlerin yoğun olduğu kırmızı tabakadan sarı renkli fibrin tabakası ayrılmıştır.

Elde edilen sarı renkteki fibrin tabakası membran elde edilmesi için PRF kutusuna (Xpression™ Box Kit) aktarılmıştır. Hazırlanacak membranların kalınlıklarını standartize etmek amacıyla 1 mm kalınlığında manyetik plakalar kullanılmış ve fibrinler PRF kutusunda 2 dakika boyunca bekletilmiştir (Fotoğraf 3.3).



Fotoğraf 3.3. L-PRF membran

3.5 T-PRF Membranının Elde Edilmesi

Hastalardan enjektörle alınan 40 mL kan, santrifüj cihazı olan IntraSpin™ (Intra-Lock International, ABD) masa üstü santrifüj cihazına denge sağlanacak şekilde karşılıklı olarak yerleştirilmiştir. IntraSpin™ cihazında 2700 rpm santrifüj kuvvetinde 12 dakikalık santrifüj süresi T-PRF elde etmek için gereklidir. Bu nedenle tüm alınan örnekler için cihaz belirtilen süre ve rpm'e ayarlanmıştır (Fotoğraf 3.4).



Fotoğraf 3.4. Bireylerden T-PRF elde edilmesi

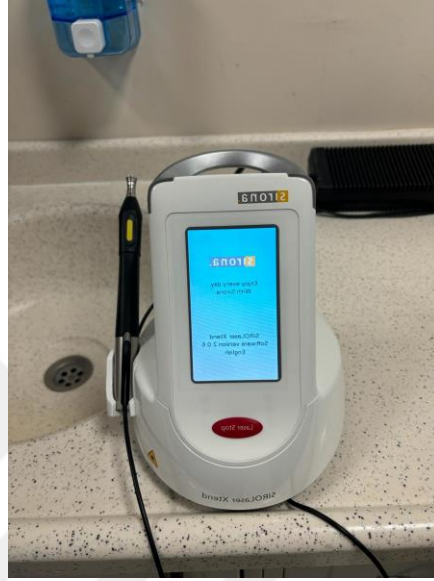
Santrifüj sonrasında titanyum tüp içerisinde oluşan 3 tabakanın ortasındaki fibrin bir presel aracılığıyla tutulup alınmıştır. Ardından fibrinin en alt katmanında yer alan eritrositlerin yoğun olduğu kırmızı tabakadan sarı renkli fibrin tabakası ayrılmıştır.

Elde edilen sarı renkteki fibrin tabakası membran elde edilmesi için PRF kutusuna (Xpression™ Box Kit) aktarılmıştır. Hazırlanacak membranların kalınlıklarını standartize etmek amacıyla 1 mm kalınlığında manyetik plakalar kullanılmış ve fibrinler PRF kutusunda 2 dakika boyunca bekletilmiştir.

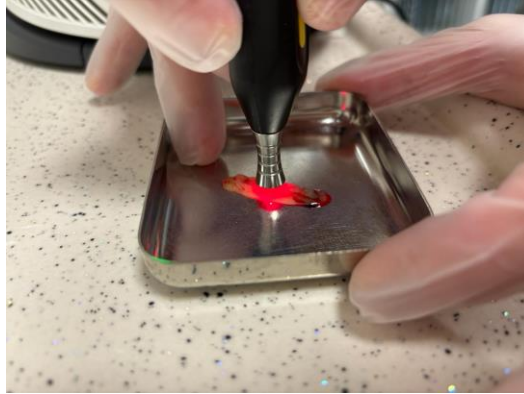
3.6 L-PRF Membranların Fotobiyomodülasyon ile Modifiye Edilmesi

Elde edilen L-PRF membranlardan 2 tanesine Sirona Laser Xtend isimli diyet lazer cihazıyla 980 nm dalga boyunda 0.5 W gücünde devamlı modda 3

1 dakika süreyle 1-2 mm mesafeden düşük doz lazer uygulanarak fotobiyomodüle edilmiştir (Fotoğraf 3.5, 3.6). Işınlanmış L-PRF'lerden bir tanesi histolojik inceleme ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi için makas yardımıyla dikey olarak ikiye bölünmüştür, diğer ışınlanmış L-PRF degradasyon işlemi için ayrılmıştır. Aynı işlemler kontrol grubunda olan ışınlanmamış L-PRF'lere de uygulanmıştır.



Fotoğraf 3.5. Sirona Laser Xtend cihazı



Fotoğraf 3.6. PRF membrana 1-2 mm mesafeden lazer uygulaması

3.7 T-PRF Membranların Fotobiyomodülasyon ile Modifiye Edilmesi

Elde edilen T-PRF membranlardan 2 tanesine Sirona Laser Xtend isimli diyet lazer cihazıyla 980 nm dalga boyunda 0.5 W gücünde devamlı modda 3

dakika süreyle 1-2 mm mesafeden düşük doz lazer uygulanarak fotobiyomodüle edilmiştir. Işınlanmış T-PRF'lerden bir tanesi histolojik inceleme ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi için makas yardımıyla dikey olarak ikiye bölünmüştür, diğer ışınlanmış T-PRF degradasyon işlemi için ayrılmıştır. Aynı işlemler kontrol grubunda olan ışınlanmamış T-PRF'lere de uygulanmıştır.

3.8 L-PRF ve T-PRF Membranların Histolojik İncelemesi

L-PRF ve T-PRF örnekleri histolojik inceleme için hücre bloğu sitolojisi yöntemiyle hazırlanmıştır.

Hücre bloğu sitolojisi yönteminde L-PRF ve T-PRF slaytlarını elde etmek için izlenen aşamalar aşağıdaki gibidir (193):

Doku tespiti: İzole edilen L-PRF ve T-PRF yapısı, küçük bez poşetlerin içine koyulduktan sonra hasta numarası ile numaralandırılıp kasetler içerisine yerleştirilmiştir. Bu kasetler, 24 saat boyunca formalin solüsyonunda sabitlenmiştir. Doku tespiti, patolojik inceleme amacıyla alınan doku parçasının alınışından incelenmesine kadar geçen süre içerisinde otolize uğramasını engellemek ve canlı organizmadaki en yakın şeklinde kalmasını sağlamak amacıyla yapılan kimyasal korumadır (Fotoğraf 3.7).



Fotoğraf 3.7. Doku tespiti için kasetlere konulan örnekler

Doku takibi: 24 saatin sonunda kasetler %10 formalin içeren kaptan alınıp delikli paslanmaz çelik başka bir kaba aktarılmıştır. Burada kasetler çeşitli derişimlerdeki formalinle, alkolle ve ksilenle işlenmiştir. Bunun sonucunda kasetlerin dehidratasyonu, temzilenmesi ve parafin infiltrasyonu sağlanmıştır. Doku takibinin amacı; suyun dokulardan uzaklaştırılması ve yerine ince bölümlerin kesilmesine imkân sağlayacak şekilde katı bir ortam oluşturmaktır. Doku takibi Leica ASP 300S ile gerçekleştirilmiştir (Fotoğraf 3.8).



Fotoğraf 3.8. Doku takibinin yapıldığı Leica ASP 300S Cihazı

Gömme: Leuchar blokları, parafin kullanılarak yapılacak olan gömme işleminde kalıp olarak kullanılmıştır. Bu aşama doku parçasına destek olarak slaytın kesilmesini ve üretilmesini kolaylaştırır (Fotoğraf 3.9).

Kesit alma: Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2255) ile 3 µm kalınlığında kesitler alınmıştır.

Parafinin uzaklaştırılması (Deparafinizasyon): Deparafinizasyon, slaytların 55°C’de ısıtılması ve ardından parafini ortadan kaldırmak için hemen ksilene daldırılmasıyla yapılmıştır. Deparafinizasyonun amacı, dokuyu hidrofobik ortamdan çıkararak alkol ve su bazlı boyalara hazır hale getirmektir.



Fotoğraf 3.9. Parafine gömülmüş örnekler

Doku boyama: Kesitler alınarak hematoksilen-eozin histokimyasal boyası ile boyanmıştır (Fotoğraf 3.10).



Fotoğraf 3.10. Doku boyama işleminin yapıldığı Leica Autostainer XL cihazı

Kesitler LEICA DM 2000 LED marka ışık mikroskopunda çeşitli büyütmeler altında patolog tarafından değerlendirilmiştir (Fotoğraf 3.11).



Fotoğraf 3.11. Hematoksilen-eozin boyaması yapılmış incelenmeye hazır örnekler

L-PRF ve T-PRF membranlar mikroskopik olarak kan elemanları yapışma indeksi (BEAI) kullanılarak analiz edilmiştir (194).

- Skor 0: Fibrin ağının olmaması
- Skor 1: Nadiren dağılmış fibrin ağı
- Skor 2: Birbiri içine zayıf bir şekilde geçen ince fibrin ağı
- Skor 3: Birbiri içine yoğun miktarda geçen kalın fibrin ağı
- Skor 4: Birbiri içine çok yoğun miktarda geçen kalın fibrin ağı

INFINITY 3 ANALYZE Release 6.5 görüntüleme sistemi ile hematoksilen eozin boyalı kesitler farklı büyütmelerde fotoğraflanmıştır.

3.9 L-PRF ve T-PRF Membranların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

L-PRF ve T-PRF örneklerinin morfolojik değerlendirilmesi için taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Gemini 500, Almanya) kullanılmıştır. L-PRF ve T-PRF örnekleri %2.5'luk glutaraldehit ile sabitlendikten sonra kurutma işlemine tabii tutulmuştur (Fotoğraf 3.12).

Örneklerdeki fibrin ağ yapısının görüntülenebilmesi için örnekler bir lam yüzeyine sabitlenmiştir. SEM’de örneklerin görüntülenmesi için yüzeyin elektronları yansıtacak bir madde ile kaplanması gereklidir. Bu nedenle örnekler 20 nm altın/paladyum püskürtmesiyle kaplanıp incelemeye alınmıştır.

İşlem sırasında x2000, x5000 ve x10000 büyütmeler altında fotoğraflar elde edilip kaydedilmiştir.



Fotoğraf 3.12. SEM
incelemesinin yapıldığı Zeiss
Gemini 500 cihazı

3.10 L-PRF ve T-PRF Membranların PBS Solüsyonunda Degredasyonu

L-PRF ve T-PRF membranların ağırlık ölçümleri hassas terazide (Sartorius CP225D Analytical Balances) gram cinsinden ölçülmüştür (Fotoğraf 3.13).

L-PRF ve T-PRF membranlar bozunma hızlarını değerlendirmek amacıyla %7.4’lük PBS solüsyonunda orbital çalkalama cihazına (Unimax 1010 Orbital Shaker) 1 hafta süresince yerleştirilmiştir. Membranlara bu süre boyunca devamlı çalkalama işlemi uygulanmıştır (Fotoğraf 3.13).

Membranlar 1 hafta sonunda distile su ile yıkanıp kurulanmış ve hassas terazide ağırlıkları gram cinsinden tekrar ölçülmüştür.

Bozunma miktarları: $\%bozunma = \frac{ilk\ ağırlık - son\ ağırlık}{ilk\ ağırlık} \times 100$ şeklinde hesaplanmıştır (195).



Fotoğraf 3.13. Sartorius CP225D Analytical Balances cihazı ve degradasyona uğrayan örnekler (Unimax 1010 Orbital Shaker)

3.11 İstatistiksel Analiz

Çalışma için gereken minimum örneklem sayısı tip 1 hata 0.05 ve %80 power, etki büyüklüğü 0.5 olacak şekilde her bir PRF grubu için 12 örnek olacak şekilde hesaplanmıştır. Gözlemlerde oluşabilecek kayıplar düşünüldüğünde elde edilmesi gereken minimum örneklem hacminin %25'inden fazla gözlem elde edilmesi kararı alınmış ve minimum örneklem miktarı 15 olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel analizler IBM SPSS 25 bilgisayar programı ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Kategorik değişkenlerin analizi için Ki-Kare testi uygulanmıştır. Gruplar arası normal dağılan veriler için One-Way Anova, normal dağılmayan veriler için Nonparametrik Permanova testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamız sistemik olarak sağlıklı bireylerden elde edilen T-PRF ve L-PRF membranlar üzerinde lazer uygulaması yapılmayan L-PRF ve T-PRF, lazer uygulaması yapılan L-PRF ve T-PRF membranlar olmak üzere 4 grup olarak planlandı. Çalışma sistemik olarak sağlıklı 15 birey ile bu bireylerden alınan toplam 120 kan örneği üzerinde tamamlandı. Bu bireylere ait lazer uygulanmış ve lazer uygulanmamış L-PRF ve T-PRF membranlarının fibrin ağ yapılarının histolojik olarak ışık mikroskopunda ve taramalı elektron mikroskopundaki (SEM) görüntüleri ve degradasyonla kimyasal bozulma miktarları değerlendirildi.

4.1 Demografik Bulgular

Çalışmamıza 18-65 yaşları arasında 15 hasta dahil edildi. Hastaların sayısı, yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 4.1’de gösterilmektedir. Çalışmayı tamamlayan bireylerin ortalama yaş±standart sapma değeri 33,33±12,01’dir. Çalışmaya katılan 15 bireyin 8’inin erkek (%53,3), 7’sinin kadın (%46,7) olduğu belirlendi. Çalışmaya katılan erkeklerin yaş ortalaması (34,37±16,01) ile kadınların yaş ortalaması (32,14±5,87) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Tablo 4.1. Çalışmaya katılan bireylerin demografik bilgileri

	Sayı	Yaş (Ortalama±Ss)	Ortanca	Min.	Max.
Toplam	15	33,33±12,01	32	21	65
Erkek	8 (%53,3)	34,37±16,01	28	21	65
Kadın	7 (%46,7)	32,14±5,87	32	23	41
P değeri	0,602				

Veriler, ortalama ± standard sapma (Ss) olarak ifade edilmektedir.

4.2 Hastaların Kan Parametrelerinin Karşılaştırılması

Çalışmamıza katılan bütün hastaların tam kan sayımı yapıldı. Hastaların kan parametrelerini ortalamaları Tablo 4.2’de gösterilmektedir. Hastaların bütün kan parametreleri normal değer aralıklarındaydı.

Tablo 4.2. Bireylerin kan parametreleri

	N	Ortalama±Ss	Ortanca	Min.	Max.
WBC	15	6,74±1,87	6,71	5,00	8,81
RBC	15	4,93±0,42	4,93	4,20	5,71
HCT	15	41,66±3,57	42,20	32,40	47,80
PLT	15	274,86±58,62	276	171	405
MCV	15	84,66±7,12	85,80	63,90	93,10
PDW	15	13,87±2,76	14,80	9,70	17,20
MPV	15	9,96±1,19	9,60	8,20	12,30

Veriler ortalama $\pm$ standard sapma (Ss) olarak ifade edilmektedir. (WBC: Lökosit sayısı, RBC: Eritrosit sayısı, HCT: Hematokrit, PLT: Trombosit sayısı, MCV: Ortalama eritrosit hacmi, PDW: Trombosit dağılım genişliği, MPV: Ortalama trombosit hacmi)

4.3 Kimyasal Degredasyon Analizleri

Hastalardan elde edilen L-PRF ve T-PRF membranların ağırlıkları degradasyon öncesi ve sonrası olacak şekilde gram cinsinden hesaplandı. L-PRF ve T-PRF membranların kimyasal bozunma miktarları ise başlangıç ağırlıklarından son ağırlıklarının çıkarılması ve bu sonucun başlangıç ağırlığına bölünerek yüzdesi ile elde edildi. Her bir grubun tek tek ve 60 örneğin tamamının kimyasal bozunma yüzdeleri ortalaması alındı.

Lazer uygulanan ve uygulanmayan L-PRF ve T-PRF membran gruplarının degradasyon önce ve sonrası ağırlık ortalamaları Tablo 4.3’te gösterilmektedir.

Tablo 4.3. L-PRF ve T-PRF gruplarının degradasyon önce ve sonrası ağırlık ortalamaları

	L-PRF-		L-PRF+		T-PRF-		T-PRF+	
	Ort±Ss	Ortanca	Ort±Ss	Ortanca	Ort±Ss	Ortanca	Ort±Ss	Ortanca
Degradasyon öncesi	0,264±0,057	0,241	0,256±0,087	0,240	0,323±0,156	0,378	0,326±0,133	0,296
Degradasyon sonrası	0,176±0,090	0,170	0,207±0,083	0,185	0,279±0,142	0,336	0,291±0,120	0,267

L-PRF-: Lazer uygulanmamış L-PRF grubu, L-PRF+: Lazer uygulanmış L-PRF grubu, T-PRF-: Lazer uygulanmamış T-PRF grubu, T-PRF+: Lazer uygulanmış T-PRF grubu, Ort: Ortalama, Ss: Standard sapma

Tüm grupların kimyasal bozunma yüzde ortalaması ve standart sapma değerleri Tablo 4.4'te gösterilmektedir.

Tablo 4.4. Tüm grupların kimyasal bozunma yüzdesi ortalaması

	N	Ortalama±Ss	Min.	Max
Degradasyon (%)	60	20,046±2,565	1,13	94,81

Dört grubun kimyasal bozunma yüzdeleri kıyaslandığında lazer uygulanan grupların daha az kimyasal degradasyona uğradığı görüldü. Lazer uygulaması yapılmayan L-PRF membranların, lazer uygulaması yapılmayan T-PRF membranlara kıyasla anlamlı düzeyde daha fazla degradasyona uğradığı tespit edildi ($p<0,05$). Bununla birlikte lazer uygulanmış T-PRF membranlar istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde lazer uygulanmış ve uygulanmamış L-PRF membranlara kıyasla daha az kimyasal degradasyona uğradı ($p<0,05$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Lazer uygulanmamış L-PRF ile lazer uygulanmış L-PRF gruplarının kimyasal bozunma yüzdeleri ortalaması

		Ortalama±Ss		P Değeri
L-PRF-	L-PRF+	34,808±7,117	19,740±3,667	0,099
L-PRF-	T-PRF-	34,808±7,117	16,203±4,337	0,007*
L-PRF-	T-PRF+	34,808±7,117	11,100±2,402	<0,001*
L-PRF+	T-PRF-	19,740±3,667	16,203±4,337	0,089
L-PRF+	T-PRF+	19,740±3,667	11,100±2,402	0,035*
T-PRF-	T-PRF+	16,203±4,337	11,100±2,402	0,367

L-PRF-: Lazer uygulanmamış L-PRF grubu, L-PRF+: Lazer uygulanmış L-PRF grubu, T-PRF-: Lazer uygulanmamış T-PRF grubu, T-PRF+: Lazer uygulanmış T-PRF grubu. * $p<0,05$

4.4 Fibrin Ağ Deseni Skoru

L-PRF ve T-PRF membranlar, hematoksilen-eozin boyalı lamlarda mikroskopik olarak kan elemanları yapışma indeksi (BEAI) kullanılarak analiz edildi. Bu analiz sonucunda membranlar fibrin yoğunluklarına göre 0 ile 4 arasında değişen rakamlarla skorlandırıldı.

Lazer uygulanmamış ve lazer uygulanmış L-PRF ile T-PRF gruplarının fibrin ağ desen skorlarının ortalaması Tablo 4.6’da gösterilmektedir.

Tablo 4.6. L-PRF ve T-PRF grupların fibrin ağ deseni skoru ortalaması

	N	Ortalama±Ss	Min.	Max.
Lazer uygulanmamış L-PRF fibrin ağ deseni skoru	15	1,933±0,593	1	3
Lazer uygulanmış L-PRF fibrin ağ deseni skoru	15	2,533±0,743	2	4
Lazer uygulanmamış T-PRF fibrin ağ deseni skoru	15	2,066±0,703	1	4
Lazer uygulanmış T-PRF fibrin ağ deseni skoru	15	2,866±0,777	2	4

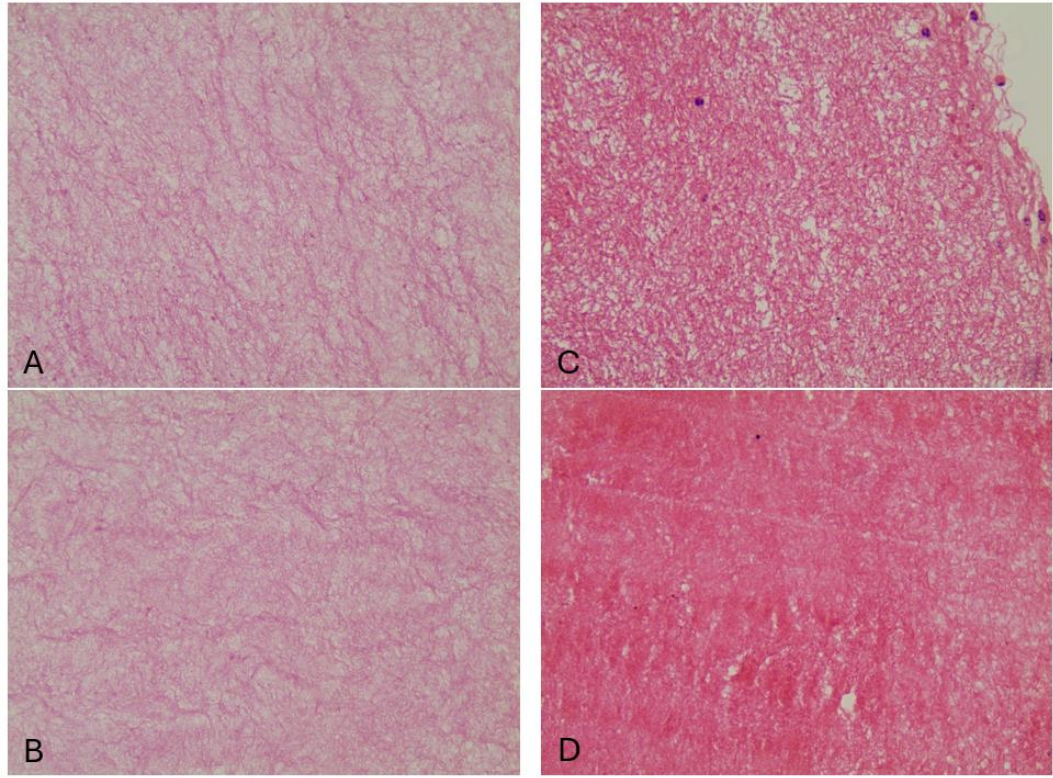
Lazer uygulanmış L-PRF ile T-PRF gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yoğun fibrin ağı gözlenirken ($p<0,05$), lazer uygulanmamış L-PRF ile T-PRF gruplarında daha dağınık ve ince fibrin ağı gözlemlendi (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. L-PRF ve T-PRF gruplarının fibrin ağ deseni skoru

		L-PRF-	L-PRF+	T-PRF-	T-PRF+	Toplam	P Değeri
Fibrin ağ skoru 1-2	Sayı	13 _a	9 _{a,b}	13 _a	5 _b	40	0,04*
	% dağılım	%86,7	%60,0	%86,7	%33,3	%66,7	
Fibrin ağ skoru 3-4	Sayı	2 _a	6 _{a,b}	2 _a	10 _b	20	
	% dağılım	%13,3	%40,0	%13,3	%66,7	%33,3	

L-PRF-: Lazer uygulanmamış L-PRF grubu, L-PRF+: Lazer uygulanmış L-PRF grubu, T-PRF-: Lazer uygulanmamış T-PRF grubu, T-PRF+: Lazer uygulanmış T-PRF grubu. * $p<0,05$

4.4.1 Işık Mikroskobu Altında Histolojik İnceleme Sonuçları

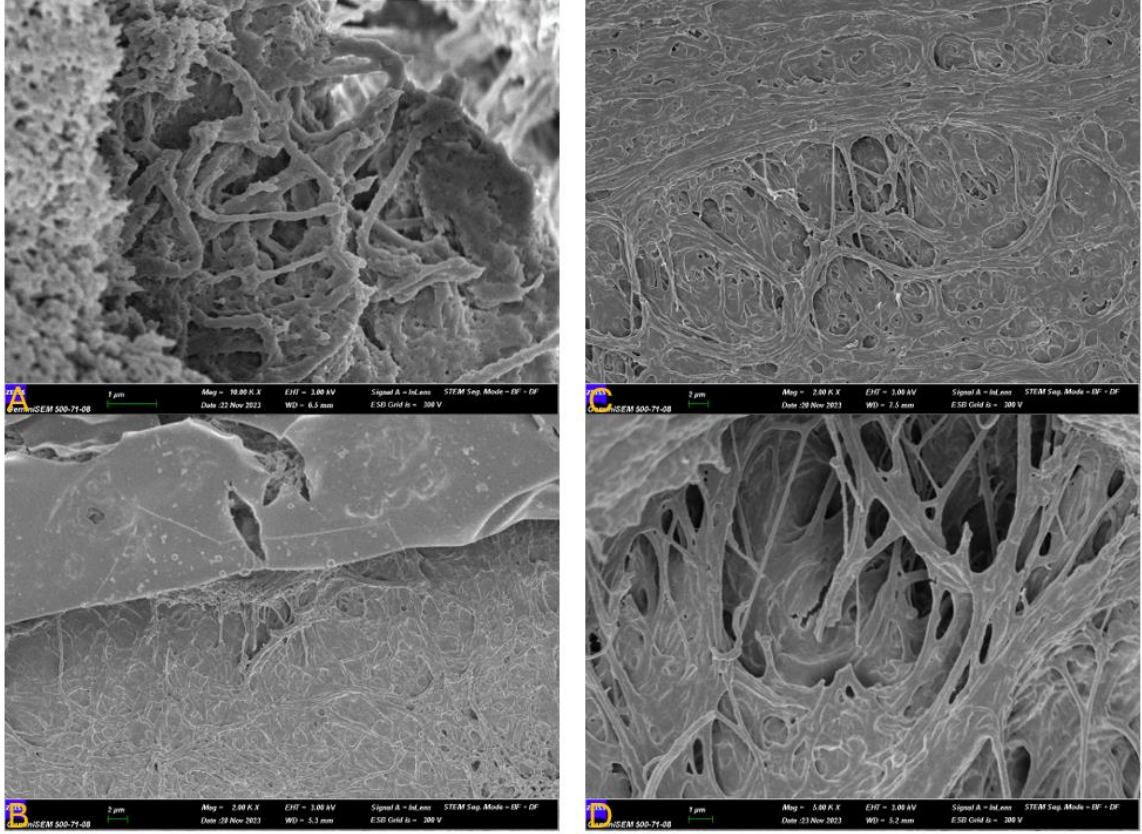


Fotoğraf 4.1. A: Lazer uygulanmayan L-PRF membranının x400'lük büyütmedeki görüntüsü, B: Lazer uygulanan L-PRF membranının x400'lük büyütmedeki görüntüsü, C: Lazer uygulanmayan T-PRF membranının x400'lük büyütmedeki görüntüsü, D: Lazer uygulanan T-PRF membranının x400'lük büyütmedeki görüntüsü

4.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Çalışmamızda yapılan SEM incelemesi sonucunda her dört grupta da matür bir fibrin ağı olduğu gözlemlendi. L-PRF membranlara kıyasla T-PRF membranların fibrin ağlarının daha kalın, fibrin ağ yapısının daha sıkı dokulu olduğu görüldü. Lazer uygulanan L-PRF membranların, lazer uygulanmayan L-PRF membranlara kıyasla ve lazer uygulanan T-PRF membranların, lazer uygulanmayan T-PRF membranlara kıyasla daha kompleks ağ yapılarına sahip oldukları gözlemlendi.

Bununla birlikte lazer uygulanan L-PRF membranların, lazer uygulaması yapılmayan L-PRF membranlara kıyasla ve lazer uygulanan T-PRF membranların, lazer uygulaması yapılmayan T-PRF membranlara kıyasla daha kalın primer ve sekonder fibrin iplikçiklere sahip oldukları görüldü (Fotoğraf 4.2).



Fotoğraf 4.2. A: Lazer uygulanmayan L-PRF membranin x10000 büyütme görüntüsü, B: Lazer uygulanan L-PRF membranin x2000 büyütme görüntüsü, C: Lazer uygulanmayan T-PRF membranin x2000 büyütme görüntüsü, D: Lazer uygulanan T-PRF membranin x5000 büyütme görüntüsü

5. TARTIŞMA

Işık dağılımının amplifikasyonu anlamına gelen lazer, homojen, monokromatik ve paralel ışık şeritleri bütünüdür (5, 196). Farklı dalga boyları bulunan lazerler, cerrahi işlemler, diagnostik ve terapötik uygulamalar başta olmak üzere birden çok alanda kullanılmaktadır (144). Lazerlerin biyostimülatif etkisi (fotobiyomodülasyon), düşük seviyeli lazerlerin tedavi amaçlı uygulandığı biyolojik dokulardaki etkilerin temeli kabul edilmiştir (197).

Fotobiyomodülasyon etkileri, moleküler ve hücresele seviyelerde fotofiziksel ve fotokimyasal olayları ortaya çıkaran kromoforlar tarafından, bir radyasyon enerjisinin emilmesine bağlıdır. Hücreler tarafından absorpsiyon dalga boyu, enerji yoğunluğu, emisyon modu (sürekli veya darbeli dalga) yanı sıra ışınlanan nokta sayısı, ışınlanan alan gibi klinik ışınlama parametrelerinden de etkilenir (198).

Lazerin biyostimülatif etki oluşturabilmesi için dalga boyunun önemli olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kısa dalga boylarındaki lazerlerin dokuda daha fazla saçılmaya sebep olduğu bu nedenle de emiliminin düşük olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte lazerin biyostimülatif etki oluşturabilmesi için en uygun aralığın “optik pencere” olarak da isimlendirilen 600 ile 1100 nm aralığındaki dalga boyları olduğu rapor edilmiştir (184). Diyot lazer ışımaları belirtilen dalga boyları aralığında olup görünür ışık spektrumunda yakın kızılötesi bölgesinde bulunmaktadır (144).

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında 980 nm dalga boyundaki diyot lazerler biyostimülasyonda kullanılmaktadır (199). Migliario ve ark. 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada 980 nm dalga boyunda diyot lazer uygulaması yaparak osteoblast hücrelerinin uyarılmasıyla kemik rejenerasyonunun arttığını göstermişlerdir (200). Skopin ve ark. ise insan fibroblastları üzerine 980 nm dalga boyundaki diyot lazer uygulaması ile hücrelerin proliferasyonunun arttığını ve yara iyileşmesini hızlandırdığını belirtmişlerdir (201). Wang ve ark. adipoz kök hücrelere uyguladıkları 980 nm dalga boyundaki diyot lazer ile kök hücrelerin proliferasyonunun arttığını rapor etmişlerdir (187). Ancak literatürdeki diyot

lazerin biyostimülatif etkisinin kullanıldığı birçok çalışmaya bakıldığında standartize edilmiş bir dalga boyunun olmadığı görülmektedir (5). Çalışmamızda etkin dalga boyu aralığında yer alan 980 nm diyot lazer tercih edilmiştir.

Lazerin biyostimülatif etkisi için diğer önemli parametre ise çıkış gücü aralığıdır ve bu değer 50 mW ile 0.5 W arasında olduğu literatürdeki çalışmalarda bildirilmiştir (5, 202, 203). Thalaimalai ve ark. 0.5 W çıkış gücü ile lazer uygulanan kemik içi defektlerde kemik rejenerasyonunun arttığını göstermişlerdir (204). Kara ve ark. fibroblastlar üzerine 0.5 W ve 1 W çıkış güçleriyle lazer uygulaması yapıldığında hücrelerin proliferasyonun arttığını tespit etmişlerdir (205). 980 nm diyot lazerin farklı çıkış güçlerinin hücreler üzerine etkisini inceleyen Amaroli ve ark. 0.1 W çıkış gücü uygulandığında oksidatif stresin arttığını ve ATP üretiminin inhibisyona uğradığını, 0.5 W ile 0.8 W aralığında çıkış gücü uygulandığında mitokondriyal aktivitenin arttığını ve düşük çıkış güçlerine göre daha minimal oksidatif stres oluştuğunu tespit etmişlerdir (206). İnsan fibroblastları üzerine yapılan bir başka çalışmada 940 nm diyot lazerin 1 W ve üzerindeki çıkış güçlerinde biyostimülatif bir etki oluşturmadığı, 0.2 ve 0.5 W çıkış güçleri uygulandığında fibroblastların proliferatif kapasitesinin belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir (207). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda lazerin rejeneratif ve proliferatif etkilerinden yararlanmak istediğimiz için 0.5 W çıkış gücü tercih edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda lazerin biyostimülatif etki oluşturması için çıkış gücü ve dalga boyuna ek olarak uygulanan doza dikkat edilmesini önerilmiştir (197). Hücreler üzerinde lazer irradyasyonun biyostimülatif bir etki oluşturması için 0.04 J/cm² ile 50 J/cm² arasında olması gerektiği Huang ve ark. tarafından yapılan bir çalışma ile belirtilmiştir (208). Tschon ve ark. lazerin doza bağlı yara iyileşmesini incelediği in vitro bir çalışmada 5, 10 ve 15 J/cm² dozluk lazer uygulaması sonrasında bütün dozlarda yara iyileşmesinin hızlandığını göstermişlerdir (209). Bourouni ve ark. prematür osteoblastlar ile gingival fibroblastlar üzerine 15 J/cm² diyot lazer uygulandığında hücrelerin proliferasyon hızının arttığı göstermişlerdir (210). Lazer dozları üzerine yapılan bir diğer çalışmada diyot lazerin 25 J/cm² ile 50 J/cm² dozları uygulandığı zaman hücrelerdeki reaktif oksijen türlerinin arttığı, 5 J/cm² ile 25 J/cm² arasındaki lazer dozlarının hücre proliferasyonunu hızlandırdığı ancak 50 J/cm² lazer dozu uygulandığında proliferasyonun yavaşladığını

belirtmişlerdir (200). Literatürdeki bu çalışmalar göz önünde bulundurularak araştırmamızda uygun lazer dozunu belirlemek amacıyla bir pilot çalışma yapılmıştır. 980 nm dalga boyunda 0.5 W çıkış güçlü diyot lazer L-PRF ve T-PRF membranlar üzerine 5 J/cm², 15 J/cm², 25 J/cm² dozlarında uygulanmıştır. Lazer uygulanan örnekler histolojik incelemeye gönderilmiş ve fibrin ağ yoğunluğunun 15 J/cm² dozda en fazla, 25 J/cm² dozda en az olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda örnekler üzerine 15 J/cm² diyot lazer uygulanmıştır.

Hanna ve ark. lazerin hedef bölge üzerindeki etkisinin uygulama mesafesine bağlı olarak değiştiğini tespit etmişlerdir. Lazerin preosteblastik hücrelere kontakt, 3 mm mesafeden ve 15 mm mesafeden uygulandığı bu çalışmada mesafe arttıkça hücrelere iletilen enerjinin belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür (7). Bir başka çalışma yakın kızılötesi dalga boyunun enerjisinin %37'sini kaybetmeden önce 2 mm kadar dokuya nüfuz ettiğini tespit etmiştir (211). Literatürdeki bu araştırmalardan yola çıkarak çalışmamızda lazer enerjisinin minimal bir şekilde kayba uğraması için örneklerimize 1-2 mm mesafeden lazer uygulaması yapılmıştır.

Trombositten zengin fibrin (PRF) ilk olarak 2001 yılında Choukroun ve ark. tarafından geliştirilmiştir (92). Daha sonra Dohan ve ark. tarafından lökosit içeriğinin yoğun olmasından dolayı bu ilk trombositten zengin fibrin L-PRF olarak adlandırılmıştır (13). Yapılan çalışmalar L-PRF'nin mikrovaskülarizasyon oluşumunu destekleyen ve yüzeyine epitel hücre göçünü yönlendirebilen biyolojik bir iskele görevi gördüğünü göstermiştir (19, 62). Chang ve ark. tarafından yapılan bir çalışma L-PRF'nin rejenerasyon sırasında görev alan hücrelerin taşınmasında araç görevi görebileceğini göstermiştir (125). Bununla birlikte L-PRF'nin 1 ile 4 hafta boyunca sürekli büyüme faktörü salınımı yaptığı ve yara iyileşmesi için ortamı uyardığı yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (212, 213). Literatüre bakıldığında L-PRF'nin rejeneratif ve cerrahi tedaviler başta olmak üzere diş hekimliğinde birçok alanda sık kullanımı olduğu görülmüştür (214-217). Olumlu özellikleri, ulaşılmasının kolay ve diş hekimliğinde sık kullanılması nedeniyle çalışmamızda kullanılan örneklerden biri L-PRF olarak belirlenmiştir.

L-PRF'nin sahip olduğu bütün avantajlara rağmen O'Connell ve ark. tüp içerisindeki silika partiküllerinin hastaya geçebileceğini göstermişlerdir (96). Bu nedenle Tunalı ve ark. bu riski elimine etmek amacıyla titanyum tüpler kullanarak daha yoğun ve matür bir fibrin ağ yapısına sahip T-PRF'yi geliştirmişlerdir (15). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında L-PRF ile T-PRF membranların benzer yapısal özelliklere sahip olduğu görülmüştür (218). Bununla birlikte T-PRF membranların daha yoğun hücresel dağılımına sahip olduğu, defekt dolumunda daha etkili olduğu görülmüştür (219, 220). Bu nedenle T-PRF membranların özellikle rejeneratif tedavilerde L-PRF membranlar yerine iyi bir alternatif olabileceği bildirilmiştir (219). T-PRF membranların L-PRF membranlar ile benzer yapısal özellikte olup mevcut avantajları nedeniyle çalışmamızda kullanılan örneklerden biri T-PRF olarak belirlenmiştir.

Bu in vitro çalışmada diyet lazerin biyostimülatif etkisi kullanılarak diş hekimliğinde sık kullanılan L-PRF ve T-PRF membranlar üzerindeki etkisine bakılmış kimyasal bozunma yüzdeleri karşılaştırılmış, örneklerin histolojik ve taramalı elektron mikroskopundaki görüntüleri incelenerek lazerin fibrin ağ yapılarına olan olası etkisine bakılmıştır.

Bilgilerimiz dahilinde bu in vitro çalışma diyet lazerin biyostimülatif etkisinin L-PRF ve T-PRF membranlar üzerindeki olası etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır.

Çalışmamıza katılan hasta popülasyonu 18-65 yaşları aralığındaki kadın ve erkek bireylerden oluşmaktadır. 18 yaş altı hastalar, tamamlanmamış büyüme gelişim döneminin kan parametrelerini etkileyebileceği düşüncesi ve aile onayının gerekmesi sebebiyle çalışma dışı bırakılmıştır. 65 yaş üstü hastalar ise ek sağlık problemleri bulunması ve ilaç kullanımı nedeniyle çalışma dışı bırakılmıştır.

Yapılan çalışmalar lazerin biyostimülatif etkisinin hücre aktivitesini, anjiyogenezi ve kolajen gibi biyomoleküllerin sentezini uyardığını göstermiştir. Platteleten zengin fibrinler ile yara bölgesine kombine bir şekilde yapılan lazer uygulamasının sinerjik etki göstererek hücreler ve biyomoleküller arasındaki etkileşimi desteklediği bilinmektedir (221).

Çalışma sonucumuza göre dört grupta da degradasyon yüzdeleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak lazer uygulanmamış L-PRF grubunun degradasyon oranı %34,80 iken, lazer uygulanmış L-PRF grubunun degradasyon oranı %19,74 düştüğü benzer şekilde lazer uygulanmamış T-PRF grubunun degradasyon oranı %16,20 iken, lazer uygulanmış T-PRF grubunun %11,10 olduğu tespit edilmekle birlikte, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamızda lazerin biyostimülatif etkisinin fibrin yıkım hızını yavaşlattığı görülmüştür, anlamlı fark gözlenmemesi örneklem sayısının düşük olmasına bağlı olabilir.

Çalışmamızda lazer uygulanmış L-PRF grubunun kimyasal degradasyon oranının, lazer uygulanmış T-PRF grubundan daha yüksek olduğu belirtilmiş olup, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu farklılık T-PRF'nin L-PRF'ye kıyasla daha geç rezorbsiyon süresine sahip olması ile fotobiyomodülasyon sonrası uzun sürecek olan hücre aktivitesi sonucundaki farklılıktan kaynaklanmış olabilir.

Literatürde lazer uygulanmış L-PRF ve T-PRF membranların degradasyon oranlarını inceleyen çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamıza benzer şekilde, Ravi ve ark. A-PRF, L-PRF ve T-PRF membranların bozunma hızlarını değerlendirdikleri bir çalışmada, membranlar %7,4'lük PBS solüsyonunda bir hafta süreyle orbital çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bir hafta sonunda bozunma oranı %85 ile en yüksek L-PRF membranda, ardından %84 ile A-PRF membranda, en düşük bozunma oranı ise %82 ile T-PRF membranda görülmüştür (195).

Saeed ve ark. ise farklı sterilizasyon metodları uyguladıkları PRF membranların bozunma miktarlarını değerlendirmiştir. Membranlar sterilizasyon prosedürlerinden sonra %7,4'lük PBS solüsyonunda 10 gün boyunca orbital çalkalayıcıda bekletilmiştir. Kızılötesi ışık uygulanan PRF grubu diğer gruplara kıyasla anlamlı olacak şekilde daha az bozunmaya uğramış olup, en fazla bozunmaya steril edilmeyen PRF membran uğramıştır (222).

Bir diğer çalışmada Sam ve ark. kolajen membranlar ile PRF membranların kimyasal bozunma özelliklerini karşılaştırmıştır. Membranlar 1 hafta süreyle PBS

solüsyonunda in vitro degradasyona tabii tutulmuş ve PRF membranlarının bu süre sonucunda başlangıç ağırlığının %36'sını kaybettiği gözlenmiştir (223).

Isobe ve ark. A-PRF, CGF ve PPTF membranların mekanik ve bozunma özelliklerini inceledikleri çalışmada, A-PRF ile CGF'nin benzer fibrin ağı yoğunluğuna sahip olduğu ve benzer mekanik özellikler gösterdiği belirtilmiştir. Bu nedenle PPTF membran en fazla bozunmaya uğrarken, A-PRF ve CGF'nin bozunma oranları birbirlerine benzer olarak bulunmuştur (224).

Damar hasarı meydana geldiğinde plateletlerde ve plazmada bulunan fibrinojenin aktive olmasıyla meydana gelen fibrin, trombosit kümesini sağlamlaştıran bir tür biyolojik yapıştırıcıya dönüşmektedir. Oluşan fibrin ağı damar hasarı bölgesinde koruyucu bir bariyer oluşturmaktadır. Bu yapıdan salınan sitokinler ve büyüme faktörleri doku rejenerasyonunu tetiklemektedir. Bu nedenle normal hemostaz mekanizmasında görülen bu durum aslında yara iyileşmesinin ilk aşamasıdır (12, 19).

Fibrin matris immün destek sağlamakta, anjiyogeneze ve yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. Bu durum fibrin ağı 3 boyutlu yapısı ve ağı hapsedilmiş olan sitokin ve büyüme faktörlerinin eş zamanlı etkisi ile açıklanmaktadır (19, 225, 226). Bu nedenle fibrin matrisin 3 boyutlu yapısı PRF membranın fonksiyonlarını etkilemektedir. Fibrin matrisin yapısı liflerin kalınlığı, sayısı, yoğunluğu gibi parametrelerle tanımlanmaktadır (9).

Fibrin ağının sahip olduğu bu kritik rol nedeniyle çalışmamızda lazer uygulamasının L-PRF ve T-PRF membranların fibrin ağı yapısı üzerinde meydana getireceği değişiklikleri gözlemek amacıyla hücre bloğu sitolojisi kullanılmıştır.

Çalışmamızda fibrin ağı yapısı ışık mikroskobu altında incelendiğinde, toplam fibrin ağı deseni skoru lazer uygulanmış L-PRF ve T-PRF gruplarında, lazer uygulaması yapılmayan gruplara kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte lazer uygulaması yapılan L-PRF membranlar ile lazer uygulanmayan L-PRF membranlar kendi aralarında değerlendirildiğinde fibrin ağı deseni skoru, lazer uygulanan L-PRF membranlarda daha yüksek bulundu. Bu sonuç istatistiksel anlamlılık göstermedi. Lazer uygulanan T-PRF

membranlarda, lazer uygulanmayan T-PRF membranlara kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek fibrin ağ deseni skoru gözlemlendi. Bu sonuç lazerin biyostimülatif etkisinin PRF membranlardaki hücrelerin, mitokondriyal aktivitesini arttırarak hücrel metabolizmalarını hızlandırıp daha fazla protein sentezlenmesi sonucunda bir protein olan fibrinin konsantrasyonunun artmasına bağlanabilir.

Literatürde lazer uygulanması yapılan L-PRF ve T-PRF membranların fibrin ağ desenini inceleyen çalışma bulunmamaktadır.

Dohan ve ark.'nın santrifüjlemenin PRF pıhtısı üzerine etkilerini inceledikleri bir çalışmada, değişen santrifüj hızı ve süresinin fibrin ağ yapısını değiştirdiği, hücre sayısı ve salınan büyüme faktörü üzerinde anlamlı değişikliklere neden olduğunu tespit etmişlerdir (194).

Farklı yaş gruplarındaki bireylerde yapılan bir çalışmada çeşitli santrifüj hızı ve sürelerinin PRF'deki fibrin ağ yapısını değiştirdiği gösterilmiştir (227). Bu çalışmada 20-34 yaş grubundaki bireylere ait PRF'nin diğer yaş aralığındaki bireylere kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek platelet konsantrasyonu içerdiği ve yoğun fibrin ağına sahip olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada santrifüj kuvvetinin artmasının daha yoğun fibrin ağı ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına dayanarak, ileri yaş gruplarındaki bireylerde artan santrifüj hızı ve süresinin daha yoğun bir fibrin ağıyla sonuçlanabileceği öngörülmüştür.

Yajamanya ve ark.'nın farklı yaş gruplarında PRF pıhtısının fibrin ağı üzerine baktıkları bir çalışmada Mamajiwala ve ark. ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Yaşın ilerlemesiyle birlikte yoğun fibrin ağı sayısında anlamlı olacak şekilde bir azalma ve gevşek fibrin ağı sayısında ise artış gözlenmiştir. Ayrıca fibrin ağı içerisine hapsolmuş platelet ve beyaz kan hücresi sayısında da farklılık görülmüştür (193). Bu durum artan yaşla birlikte hücre sayısının azalması ve daha düzensiz fibrin liflerinin oluşmasından kaynaklanmaktadır.

Santrifüj sonrası geçen süre ve membranların elde edilmesindeki kompresyon süresinin PRF pıhtısı oluşumundaki etkilerine bakılan bir çalışmada ise, PRF pıhtısının santrifüj işleminden sonra 5 dakikadan daha fazla tüpde

beklemesinin membranın ağırlık ve boyutunda azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada 1 dakikadan daha az süre kompresyon uygulanan PRF membranlarının anlamlı düzeyde daha gevşek fibrin ağ yapısına sahip olduğu görülmüştür (228). Kompresyon ve bekleme sonucu fibrin yapılarının sıkışması ve boyut değişikliğinin fibrin ağlarında yoğunluğuna neden olduğu sonucuna varılabilir. Bu nedenle çalışmamızda hem L-PRF hem de T-PRF pıhtıları santrifüj sonrasında vakit kaybetmeden Xpression™ Box Kit marka PRF kutusuna alınıp kendi ağırlığında 2 dakika süreyle bekletilmiştir. Membran kalınlıklarını standartize etmek amacıyla 1 mm'lik metal plakalar PRF kutusu ve kapak arasına yerleştirilmiştir.

Chatterjee ve ark.'nın sağlıklı, sigara içen ve hipertansif bireylerdeki L-PRF ve T-PRF membranların fibrin ağ yapılarını hücre bloğu sitolojisini kullanarak inceledikleri çalışmada, çalışma sonucunda hipertansif ve sigara içen bireylerin hem L-PRF hem de T-PRF membranlarının daha gevşek bir fibrin ağ yapısına sahip olduğu görülmüştür. Ancak T-PRF membranların fibrin ağ yapısı L-PRF'ye kıyasla daha sıkı olarak bulunmuştur. Benzer şekilde sağlıklı bireylerde T-PRF membranlarda L-PRF membranlara kıyasla daha organize ve daha kalın bir fibrin ağı gözlenmiştir (229).

Das ve ark.'nın periodontitis olan sistemik olarak sağlıklı, sigara kullanan bireylerdeki ve kontrol altında olmayan tip 2 diyabetli hastalardaki A-PRF membranların fibrin ağ yapısını histolojik olarak karşılaştırdıkları çalışmada, sigara kullanan bireylerdeki A-PRF membranların en az hücresel bileşene ve en gevşek fibrin ağ yapısına sahip olduğu görülmüştür (230).

Elektron mikroskopunun ışık mikroskobuna kıyasla avantajlarının olduğu bilinmektedir. Elektron mikroskobu, elektronları kullanarak ışık dalgalarının ötesinde daha yüksek çözünürlüklü görüntüler elde etmeyi mümkün kılar. Elektron mikroskobu görüntülerinin çözünürlüğü 0,2 nm'ye kadar çıkabilir ki bu, ışık mikroskobuna kıyasla 1000 kat daha ayrıntılıdır. Bununla birlikte karmaşık ve hassas yapıları yüksek kalitede göstermektedir (231). Sahip olduğu bu avantajlardan dolayı çalışmamızda taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanarak

lazer uygulanan ve lazer uygulanmayan L-PRF ile T-PRF membranların fibrin ağ yapısı incelenerek karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda SEM görüntüleri incelendiğinde lazer uygulanmış L-PRF ve T-PRF membranlarda lazer uygulanmayan membranlarla kıyaslandığında daha kompleks ağ yapılarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte lazer uygulaması yapılan L-PRF ve T-PRF membranların, lazer uygulaması yapılmayan L-PRF ve T-PRF membranlara kıyasla daha kalın primer ve sekonder fibrin iplikçiklere sahip oldukları görülmüştür.

Gupta ve ark.'nın periodontitis ve diyabetin PRF pıhtılarının yapısal özelliklerini SEM aracılığıyla inceledikleri çalışmada, diyabetin ve periodontitisin fibrin ağ yapısını anlamlı düzeyde etkilediği, daha gevşek ve ince fibrin ağına neden olduğu görülmüştür (232).

Malgikar ve ark. SEM kullanarak T-PRF ve L-PRF membranların yapısal karakterlerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda T-PRF membranın L-PRF membrana kıyasla anlamlı düzeyde daha kalın ve daha organize bir fibrin ağ yapısına sahip olduğu görülmüştür. Bu durum titanyumun cama göre daha biyouyumlu olup, daha polimerize bir fibrin oluşumuna sebep olması ile açıklanmıştır (233).

Farklı santrifüj cihazlarında yüksek ve düşük hızlarda elde edilen PRF pıhtılarının değerlendirildiği bir çalışmada, hücre sayısı ve fibrin ağ yoğunlukları SEM kullanarak karşılaştırmış, sonuçlar yüksek merkezkaç kuvveti ve uzun sürelerde üretilen PRF pıhtılarının daha yoğun fibrin ağ yapısına sahip olduğu ancak daha düşük hücre konsantrasyonuna sahip olduğunu göstermiştir (234).

Kobayashi ve ark.'nın PRF pıhtısından membran elde etme yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmada bir grup PRF pıhtısı gazlı bez ile sıkıştırılarak, diğer grup PRF pıhtısı özel bir kompresyon cihazı ile membran haline getirilmiştir. Örnekler SEM altında incelediğinde gazlı bezle sıkıştırılarak elde edilen PRF membranın daha sıkı ve yoğun bir fibrin ağına sahip olduğu görülmüştür (235). Bu

sonuç sıkışma miktarının fazla olmasından dolayı fibrin ağının daha yoğun olabileceği bildirilmiştir.

Kobayashi ve ark.'nın yaptıkları diğer bir diğer çalışmada yatay ve sabit açılı santrifüjleme protokolleriyle elde edilmiş PRF pıhtıları SEM altında incelemiş ve sabit açılı santrifüjleme tekniği ile elde edilen PRF'lerin kırmızı kan hücreleri içeren yoğun fibrin ağları olduğu gözlenmiştir. Yatay santrifüjleme tekniği ile elde edilen PRF'lerde ise lökosit ve trombositlerin etrafında dolanmış yoğun bir fibrin ağı gözlenmiştir (236).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Hastalardan alınan tam kan sayımı parametrelerinin (WBC, RBC, HCT, PLT, MCV, PDW, MPV) tamamı normal değer aralığındaydı.
2. Lazer uygulanan T-PRF ve L-PRF membranların, lazer uygulanmayan T-PRF ve L-PRF membranlara kıyasla degradasyon yüzdeleri daha düşük bulundu ancak bu fark anlamlılık göstermedi.
3. Lazer uygulanmamış L-PRF membranlar, lazer uygulanmış L-PRF membranlara kıyasla daha fazla degradasyon yüzdesi gösterdi. Degradasyon yüzdeleri T-PRF membranlarda da lazer uygulanmayan grupta daha düşüktü ancak bu farklılıklar anlamlılık göstermedi.
4. Lazer uygulaması yapılan L-PRF ve T-PRF membranlar arasında degradasyon yüzdesi L-PRF membranda daha yüksekti. Lazer uygulanmış L-PRF ve T-PRF membranlar arasındaki bu fark anlamlı bulundu.
5. Lazer uygulaması yapılmayan L-PRF'lerin degradasyon yüzdesi anlamlı olacak şekilde lazer uygulanan T-PRF membranlardan yüksek bulundu.
6. Lazer uygulanan ve uygulanmayan L-PRF membranların fibrin ağ desen skorları kıyaslandığında lazer uygulanan L-PRF membranların fibrin ağ desen skorları daha yüksekti. L-PRF membranlar arasındaki fibrin ağ desen skorları arasında anlamlı farklılık bulunmadı.
7. Lazer uygulanmış ve uygulanmamış T-PRF membranların fibrin ağ desen skorları kıyaslandığında lazer uygulaması yapılan grubun fibrin ağ desen skorlarının anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu.
8. Lazer uygulaması yapılmayan L-PRF ve T-PRF membranların fibrin ağ desen skorları karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Lazer uygulaması yapılan L-PRF ve T-PRF membranların fibrin ağ desen skorları karşılaştırıldığında T-PRF membranların fibrin ağ desen skorlarının L-PRF membranlara kıyasla daha yüksek olduğu görüldü ancak bu fark anlamlılık göstermedi.
9. SEM incelemesinin sonucunda dört grupta da matür bir fibrin ağ yapısı olduğu gözlemlendi. L-PRF membranlara kıyasla T-PRF membranların fibrin ağlarının daha kalın ve daha sıkı yapıda olduğu görüldü.
10. Lazer uygulanan L-PRF ve T-PRF membranların, lazer uygulanmayan L-PRF ve T-PRF membranlara kıyasla daha kompleks fibrin ağ yapılarına

sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca lazer uygulanan L-PRF ve T-PRF membranların uygulanmayan L-PRF ve T-PRF membranlara kıyasla daha kalın primer ve sekonder fibrin iplikçikleri içerdiği görüldü.



7. KAYNAKLAR

Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.

1. Sobouti F, Khatami M, Heydari M, Barati M. The role of low-level laser in periodontal surgeries. *J Lasers Med Sci*. 2015;6(2):45-50.
2. Ohsugi Y, Niimi H, Shimohira T, Hatasa M, Katagiri S, Aoki A, et al. In Vitro Cytological Responses against Laser Photobiomodulation for Periodontal Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23).
3. Theodoro LH, Marcantonio RAC, Wainwright M, Garcia VG. LASER in periodontal treatment: is it an effective treatment or science fiction? *Braz Oral Res*. 2021;35(Supp 2):e099.
4. Fernandes AP, Junqueira Mde A, Marques NC, Machado MA, Santos CF, Oliveira TM, et al. Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *J Appl Oral Sci*. 2016;24(4):332-7.
5. Rathod A, Jaiswal P, Bajaj P, Kale B, Masurkar D. Implementation of Low-Level Laser Therapy in Dentistry: A Review. *Cureus*. 2022;14(9):e28799.
6. Dompe C, Moncrieff L, Matys J, Grzech-Lesniak K, Kocherova I, Bryja A, et al. Photobiomodulation-Underlying Mechanism and Clinical Applications. *J Clin Med*. 2020;9(6).
7. Hanna R, Agas D, Benedicenti S, Ferrando S, Laus F, Cuteri V, et al. A Comparative Study Between the Effectiveness of 980 nm Photobiomodulation Delivered by Hand-Piece With Gaussian vs. Flat-Top Profiles on Osteoblasts Maturation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:92.
8. Khadra M, Kasem N, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behaviour of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. A scanning electron microscope and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(2):168-75.
9. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:11-30.
10. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:355-67.
11. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1131-7.
12. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e37-44.
13. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-67.
14. Miron RJ, Kawase T, Dham A, Zhang Y, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A. A technical note on contamination from PRF tubes containing silica and silicone. *BMC Oral Health*. 2021;21(1):135.
15. Tunali M, Ozdemir H, Kucukodaci Z, Akman S, Firatli E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013;51(5):438-43.

16. Tunali M, Ozdemir H, Kucukodaci Z, Akman S, Yaprak E, Toker H, et al. A novel platelet concentrate: titanium-prepared platelet-rich fibrin. *Biomed Res Int.* 2014;2014:209548.
17. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(4):420-4.
18. Pietruszka P, Chruscicka I, Dus-Illicka I, Paradowska-Stolarz A. PRP and PRF-Subgroups and Divisions When Used in Dentistry. *J Pers Med.* 2021;11(10).
19. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e56-60.
20. Linden MD. Platelet physiology. *Methods Mol Biol.* 2013;992:13-30.
21. Maouia A, Rebetz J, Kapur R, Semple JW. The Immune Nature of Platelets Revisited. *Transfus Med Rev.* 2020;34(4):209-20.
22. Kiran NK, Mukunda KS, Tilak Raj TN. Platelet concentrates: A promising innovation in dentistry. *J Dent Sci Res.* 2011;2(1):50-61.
23. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(4):1207-10.
24. Schilling JA. Wound healing. *Surg Clin North Am.* 1976;56(4):859-74.
25. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):509-28.
26. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):12S-34S.
27. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.
28. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e45-50.
29. Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, et al. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(3-4):349-59.
30. Anfossi G, Trovati M, Mularoni E, Massucco P, Calcamuggi G, Emanuelli G. Influence of propranolol on platelet aggregation and thromboxane B2 production from platelet-rich plasma and whole blood. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1989;36(1):1-7.
31. Fijnheer R, Pietersz RN, de Korte D, Gouwerok CW, Dekker WJ, Reesink HW, et al. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. *Transfusion.* 1990;30(7):634-8.
32. Lefrancais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature.* 2017;544(7648):105-9.
33. George JN. Platelets. *Lancet.* 2000;355(9214):1531-9.
34. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl.* 1998;61:3-23.

35. Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv Cardiol Clin*. 2017;6(1):1-12.
36. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011;17(11):1423-36.
37. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):195-8.
38. George JN. Platelet immunoglobulin G: its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins. *Blood*. 1990;76(5):859-70.
39. Siegel A, Luscher EF. Non-identity of the alpha-granules of human blood platelets with typical lysosomes. *Nature*. 1967;215(5102):745-7.
40. Riddel JP, Jr., Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs*. 2007;24(3):123-31.
41. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Front Biosci*. 2008;13:3532-48.
42. Stock W, Hoffman R. White blood cells 1: non-malignant disorders. *Lancet*. 2000;355(9212):1351-7.
43. W. L. Tai RMH, H. C. W. Hsiao, R. -M. Chen and J. J. P. Tsai. Blood Cell Image Classification Based on Hierarchical SVM. 2011 IEEE International Symposium on Multimedia. 2011:129-36.
44. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(9):1618-31.
45. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:147-74.
46. Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol*. 1986;39:177-253.
47. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med*. 1993;328(4):257-65.
48. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood*. 2000;96(13):4028-38.
49. Yanez A, Coetzee SG, Olsson A, Muench DE, Berman BP, Hazelett DJ, et al. Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity*. 2017;47(5):890-902 e4.
50. Prinyakupt J, Pluempitiwiriyaew C. Segmentation of white blood cells and comparison of cell morphology by linear and naive Bayes classifiers. *Biomed Eng Online*. 2015;14:63.
51. Santoni G, Cardinali C, Morelli MB, Santoni M, Nabissi M, Amantini C. Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. *J Neuroinflammation*. 2015;12:21.
52. Issekutz AC, Issekutz TB. Quantitation and kinetics of blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, and IL-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and IFN-gamma. *J Immunol*. 1993;151(4):2105-15.
53. Keohane EM. Rodak's hematology : clinical principles and applications. Sixth edition / Elaine M. Keohane, Catherine N. Otto, Jeanine M. Walenga. ed. Otto CN, Walenga J, Rodak BF, editors: Elsevier; 2020.

54. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R, editors. Autoimmunity: From Bench to Bedside. Bogota (Colombia)2013.
55. Paolini R, Bernardini G, Molfetta R, Santoni A. NK cells and interferons. Cytokine Growth Factor Rev. 2015;26(2):113-20.
56. Trinchieri G. Biology of Natural Killer Cells. In: Dixon FJ, editor. Advances in Immunology. 47: Academic Press; 1989. p. 187-376.
57. Christine A. Biron, Khuong B. Nguyen, Gary C. Pien, Leslie P. Cousens a, Salazar-Mather TP. NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE: Function and Regulation by Innate Cytokines. Annual Review of Immunology. 1999;17(1):189-220.
58. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108(5):707-13.
59. Kumar RV, Shubhashini N. Platelet rich fibrin: a new paradigm in periodontal regeneration. Cell and tissue banking. 2013;14(3):453-63.
60. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. Open Med (Wars). 2016;11(1):242-7.
61. Marques LF, Stessuk T, Camargo IC, Sabeh Junior N, dos Santos L, Ribeiro-Paes JT. Platelet-rich plasma (PRP): methodological aspects and clinical applications. Platelets. 2015;26(2):101-13.
62. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;101(3):e51-5.
63. Mattuella LG, Frasca LC, Bernardi L, Moi GP, Fossati AC, de Araujo FB. Tooth supported prosthetic rehabilitation in a 5-year-old child with early childhood caries. J Clin Pediatr Dent. 2007;31(3):171-4.
64. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen. 2008;16(5):585-601.
65. Knezevic NN, Candido KD, Desai R, Kaye AD. Is Platelet-Rich Plasma a Future Therapy in Pain Management? Med Clin North Am. 2016;100(1):199-217.
66. Wu L, Pierce GF, Galiano RD, Mustoe TA. Keratinocyte growth factor induces granulation tissue in ischemic dermal wounds. Importance of epithelial-mesenchymal cell interactions. Arch Surg. 1996;131(6):660-6.
67. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. Endocr Relat Cancer. 2000;7(3):165-97.
68. Clark RAF, Henson PM, editors. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. Springer US; 2012.
69. Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. Wound Repair Regen. 2006;14(4):457-62.
70. Sasaki T. The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing. J Dermatol. 1992;19(11):664-6.
71. Miyazono K, Usuki K, Heldin CH. Platelet-derived endothelial cell growth factor. Prog Growth Factor Res. 1991;3(3):207-17.

72. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995;86(4):1243-54.
73. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989;74(1):1-10.
74. Pitanga TN, Vilas-Boas W, Cerqueira BAV, Seixas MO, Barbosa CG, Adorno EV, et al. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013;4(07):6-12.
75. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. *Cytokines In Immunology*, (Vol. 1). New York: WH Freeman and Company; 2003.
76. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*. 1994;83(1):113-8.
77. Mattuella LG, Bento LW, de Figueiredo JAP, Nör JE, de Araujo FB, Fossati ACM. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *Journal of endodontics*. 2007;33(5):524-30.
78. Henschen-Edman AH. Human Fibrinogen Occurs as Over 1 Million Non-Identical Molecules. In: Atassi MZ, Appella E, editors. *Methods in Protein Structure Analysis*. Boston, MA: Springer US; 1995. p. 435-43.
79. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*. 2012;34(1):43-62.
80. de Moerloose P, Casini A, Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders: an update. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39(6):585-95.
81. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1999;31(7):741-6.
82. Francis CW, Bunce LA, Sporn LA. Endothelial cell responses to fibrin mediated by FPB cleavage and the amino terminus of the beta chain. *Blood cells*. 1993;19(2):291-306; discussion -7.
83. Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *Journal of cell science*. 1997;110 (Pt 7):861-70.
84. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *Journal of periodontology*. 2003;74(6):858-64.
85. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*. 2009;27(3):158-67.
86. Collen A, Koolwijk P, Kroon M, van Hinsbergh VW. Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis*. 1998;2(2):153-65.
87. van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:426-37.
88. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Advances in protein chemistry*. 2005;70:247-99.
89. Mihaylova Z, Mitev V, Stanimirov P, Isaeva A, Gateva N, Ishkitiev N. Use of platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview. *Acta odontologica Scandinavica*. 2017;75(1):1-11.

90. Prakash S, Thakur A. Platelet concentrates: past, present and future. *Journal of maxillofacial and oral surgery*. 2011;10(1):45-9.
91. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(6):638-46.
92. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A, editors. *The opportunity in perio-implantology: The PRF2001*.
93. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of periodontology*. 2010;81(4):546-55.
94. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *Journal of periodontology*. 2017;88(1):112-21.
95. Wang L, Wan M, Li Z, Zhong N, Liang D, Ge L. A comparative study of the effects of concentrated growth factors in two different forms on osteogenesis in vitro. *Molecular medicine reports*. 2019;20(2):1039-48.
96. O'Connell SM. Safety issues associated with platelet-rich fibrin method. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(5):587; author reply -93.
97. Takemoto S, Yamamoto T, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A, Takashima S. Platelet adhesion on titanium oxide gels: effect of surface oxidation. *Biomaterials*. 2004;25(17):3485-92.
98. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Yaprak E, Toker H, et al. A novel platelet concentrate: titanium-prepared platelet-rich fibrin. *Biomed Res Int*. 2014;2014:209548.
99. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014;40(6):679-89.
100. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig*. 2017;21(8):2619-27.
101. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*. 2007;28(31):4551-60.
102. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55(11):1294-9.
103. Mijiritsky E, Assaf HD, Peleg O, Shacham M, Cerroni L, Mangani L. Use of PRP, PRF and CGF in Periodontal Regeneration and Facial Rejuvenation-A Narrative Review. *Biology (Basel)*. 2021;10(4).
104. Marques FP, Ingham SJ, Forgas A, Franciozi CE, Sasaki PH, Abdalla RJ. A manual method to obtain platelet rich plasma. *Acta ortopedica brasileira*. 2014;22(2):75-7.
105. Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*. 2014;7(4):189-97.
106. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*. 2008;19(1):42-6.

107. Tsai C-H, Shen S-Y, Zhao J-H, Chang Y-C. Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells in vitro. *Journal of Dental Sciences*. 2009;4(3):130-5.
108. Bozkurt Doğan Ş, Öngöz Dede F, Ballı U, Atalay EN, Durmuşlar MC. Concentrated growth factor in the treatment of adjacent multiple gingival recessions: a split-mouth randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015;42(9):868-75.
109. Fang D, Long Z, Hou J. Clinical Application of Concentrated Growth Factor Fibrin Combined With Bone Repair Materials in Jaw Defects. *J Oral Maxillofac Surg*. 2020;78(6):882-92.
110. Sohn D-S, Heo J-U, Kwak D-H, Kim D-E, Kim J-M, Moon J-W, et al. Bone Regeneration in the Maxillary Sinus Using an Autologous Fibrin-Rich Block With Concentrated Growth Factors Alone. *Implant Dentistry*. 2011;20(5):389-95.
111. Gürbüz B, Pıkdöken L, Tunalı M, Urhan M, Küçükodacı Z, Ercan F. Scintigraphic evaluation of osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich fibrin. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(5):980-9.
112. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Trandafilovic M, Stojanovic P. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Medicine*. 2021;16(1):446-54.
113. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016;20(9):2353-60.
114. Mourão CF, Valiense H, Melo ER, Mourão NB, Maia MD. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes*. 2015;42(6):421-3.
115. Bowen RA, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochemia medica*. 2014;24(1):31-44.
116. Farshidfar N, Amiri MA, Jafarpour D, Hamedani S, Niknezhad SV, Tayebi L. The feasibility of injectable PRF (I-PRF) for bone tissue engineering and its application in oral and maxillofacial reconstruction: From bench to chairside. *Biomaterials Advances*. 2022;134:112557.
117. Toffler M, Toscano N, Holtzclaw D, Corso M, Ehrenfest DM. Introducing Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) to the reconstructive surgery milieu. 2009;1:21-32.
118. Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009;36(12):1048-58.
119. Varghese MP, Manuel S, Kumar LKS. Potential for Osseous Regeneration of Platelet-Rich Fibrin-A Comparative Study in Mandibular Third Molar Impaction Sockets. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017;75(7):1322-9.
120. Eldibany RM. Platelet rich fibrin versus Hemcon dental dressing following dental extraction in patients under anticoagulant therapy. *Tanta Dental Journal*. 2014;11(2):75-84.
121. Canellas J, Ritto FG, Medeiros PJD. Evaluation of postoperative complications after mandibular third molar surgery with the use of platelet-rich fibrin: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2017;46(9):1138-46.
122. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):299-303.

123. Del Corso M, Mazor Z, Rutkowski JL, Dohan Ehrenfest DM. The use of leukocyte- and platelet-rich fibrin during immediate postextractive implantation and loading for the esthetic replacement of a fractured maxillary central incisor. *J Oral Implantol*. 2012;38(2):181-7.
124. George E. Triple-Layered Closure of an Oroantral Fistula: A Case Report. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2018;33(2).
125. Chang YC, Zhao JH. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects. *Australian dental journal*. 2011;56(4):365-71.
126. Del Corso M, Toffler M, Dohan Ehrenfest D. Use of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) membrane in post-avulsion sites: an overview of Choukroun's PRF. *J Implant Adv Clin Dent*. 2010;1(9):27-35.
127. Sezgin Y, Uraz A, Taner IL, Çulhaoğlu R. Effects of platelet-rich fibrin on healing of intra-bony defects treated with anorganic bovine bone mineral. *Braz Oral Res*. 2017;31:e15.
128. Thorat M, Pradeep AR, Pallavi B. Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2011;38(10):925-32.
129. Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Re: "Clinical evaluation of a modified coronally advanced flap alone or in combination with a platelet-rich fibrin membrane for the treatment of adjacent multiple gingival recessions: a 6-month study". *Journal of periodontology*. 2009;80(11):1694-7; author reply 7-9.
130. Aroca S, Keglevich T, Barbieri B, Gera I, Etienne D. Clinical evaluation of a modified coronally advanced flap alone or in combination with a platelet-rich fibrin membrane for the treatment of adjacent multiple gingival recessions: a 6-month study. *Journal of periodontology*. 2009;80(2):244-52.
131. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Investigations*. 2017;21(6):1913-27.
132. Al-Khawlani E, Adly OA, Ahmed AS, El-Desouky GGE-d, Abass AH, Abdelmabood AA. Evaluation of platelet-rich fibrin versus platelet-rich plasma on the outcome of mandibular fracture: a comparative study. *Egyptian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2014;5(3):96-102.
133. Zhao JH, Tsai CH, Chang YC. Management of radicular cysts using platelet-rich fibrin and bioactive glass: a report of two cases. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2014;113(7):470-6.
134. Kulkarni MR, Thomas BS, Varghese JM, Bhat GS. Platelet-rich fibrin as an adjunct to palatal wound healing after harvesting a free gingival graft: A case series. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2014;18(3):399-402.
135. Keswani D, Pandey RK. Revascularization of an immature tooth with a necrotic pulp using platelet-rich fibrin: a case report. *International endodontic journal*. 2013;46(11):1096-104.
136. Elgazzar RF, Mutabagani MA, Abdelaal SE, Sadakah AA. Platelet rich plasma may enhance peripheral nerve regeneration after cyanoacrylate reanastomosis: a controlled blind study on rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(8):748-55.
137. Yuce E, Komerik N. Comparison of the Efficacy of Intra-Articular Injection of Liquid Platelet-Rich Fibrin and Hyaluronic Acid After in Conjunction With Arthrocentesis for the Treatment of Internal Temporomandibular Joint Derangements. *The Journal of craniofacial surgery*. 2020;31(7):1870-4.
138. Einstein A. Zur quantentheorie der strahlung. *Phys Zeit*. 1917;18:121.

139. Gross AJ, Herrmann TRW. History of lasers. *World Journal of Urology*. 2007;25(3):217-20.
140. Schawlow AL, Townes CH. Infrared and Optical Masers. *Physical Review*. 1958;112:1940-9.
141. Maiman TH. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*. 1960;187(4736):493-4.
142. Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B. IMPACT OF THE LASER ON DENTAL CARIES. *Nature*. 1964;203:417.
143. Sulewski JG. HISTORICAL SURVEY OF LASER DENTISTRY. *Dental Clinics of North America*. 2000;44(4):717-52.
144. Verma SK, Maheshwari S, Singh RK, Chaudhari PK. Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. *National Journal of Maxillofacial Surgery*. 2012;3(2):124-32.
145. Pierce LA. Laser physics and physiology. *Plastic surgical nursing : official journal of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgical Nurses*. 1997;17(3):123-8.
146. Takac S, Stojanović S. [Characteristics of laser light]. *Medicinski pregled*. 1999;52(1-2):29-34.
147. Parker S. Laser-tissue interaction. *British Dental Journal*. 2007;202(2):73-81.
148. Convissar RA. Laser dentistry 101: An introduction to wavelengths and laser-tissue interaction. *Seminars in Orthodontics*. 2020;26(2):74-9.
149. Agrawal R, Wang C. Laser Beam Machining. In: Bhushan B, editor. *Encyclopedia of Nanotechnology*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. p. 1-15.
150. Pogrel MA. The carbon dioxide laser in soft tissue preprosthetic surgery. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1989;61(2):203-8.
151. Israel M. Use of the CO2 laser in soft tissue and periodontal surgery. *Practical periodontics and aesthetic dentistry : PPAD*. 1994;6(6):57-64; quiz
152. Fisher SE, Frame JW, Browne RM, Tranter RM. A comparative histological study of wound healing following CO2 laser and conventional surgical excision of canine buccal mucosa. *Archives of oral biology*. 1983;28(4):287-91.
153. Saydjari Y, Kuypers T, Gutknecht N. Laser Application in Dentistry: Irradiation Effects of Nd:YAG 1064 nm and Diode 810 nm and 980 nm in Infected Root Canals—A Literature Overview. *BioMed Research International*. 2016;2016:8421656.
154. Jennett E, Motamedi M, Rastegar S, Frederickson C, Arcoria C, Powers JM. Dye-enhanced ablation of enamel by pulsed lasers. *J Dent Res*. 1994;73(12):1841-7.
155. White JM, Goodis HE, Rose CL. Use of the pulsed Nd:YAG laser for intraoral soft tissue surgery. *Lasers in surgery and medicine*. 1991;11(5):455-61.
156. Tokita Y, Sunakawa M, Suda H. Pulsed Nd:YAG laser irradiation of the tooth pulp in the cat: I. Effect of spot lasing. *Lasers in surgery and medicine*. 2000;26(4):398-404.
157. Sunakawa M, Tokita Y, Suda H. Pulsed Nd:YAG laser irradiation of the tooth pulp in the cat: II. Effect of scanning lasing. *Lasers in surgery and medicine*. 2000;26(5):477-84.
158. Nair PN, Baltensperger MM, Luder HU, Eyrich GK. Pulpal response to Er:YAG laser drilling of dentine in healthy human third molars. *Lasers in surgery and medicine*. 2003;32(3):203-9.

159. Cozean C, Arcoria CJ, Pelagalli J, Powell GL. Dentistry for the 21st century? Erbium:YAG laser for teeth. *Journal of the American Dental Association* (1939). 1997;128(8):1080-7.
160. Miserendino L, Pick RM. *Lasers in dentistry*. Chicago: Quintessence Pub. Co. Chicago; 1995.
161. Fujii T, Baehni PC, Kawai O, Kawakami T, Matsuda K, Kowashi Y. Scanning electron microscopic study of the effects of Er:YAG laser on root cementum. *Journal of periodontology*. 1998;69(11):1283-90.
162. Folwaczny M, Mehl A, Aggstaller H, Hickel R. Antimicrobial effects of 2.94 microm Er:YAG laser radiation on root surfaces: an in vitro study. *J Clin Periodontol*. 2002;29(1):73-8.
163. Schwarz F, Sculean A, Georg T, Reich E. Periodontal treatment with an Er: YAG laser compared to scaling and root planing. A controlled clinical study. *Journal of periodontology*. 2001;72(3):361-7.
164. Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Kimura Y, Matsumoto N, Matsumoto K. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation in human enamel and dentin: ablation and morphological studies. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1999;17(4):155-9.
165. Uşümez S, Orhan M, Uşümez A. Laser etching of enamel for direct bonding with an Er,Cr:YSGG hydrokinetic laser system. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2002;122(6):649-56.
166. Holmium:YAG surgical lasers. *Health devices*. 1995;24(3):92-122.
167. Finkbeiner RL. The results of 1328 periodontal pockets treated with the argon laser: selective pocket thermolysis. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1995;13(4):273-81.
168. Coluzzi DJ. Lasers and soft tissue curettage: an update. *Compendium of continuing education in dentistry* (Jamesburg, NJ : 1995). 2002;23(11a):1104-11.
169. Moritz A, Gutknecht N, Doertbudak O, Goharkhay K, Schoop U, Schauer P, et al. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 1997;15(1):33-7.
170. Lasers in Periodontics. *Journal of periodontology*. 2002;73(10):1231-9.
171. Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers in surgery and medicine*. 2002;31(4):263-7.
172. Coluzzi DJ. What laser does your practice need? Advantages, considerations, and practice integration of laser dentistry. *The Alpha omegan*. 2008;101(4):202-5.
173. Lomke MA. Clinical applications of dental lasers. *Gen Dent*. 2009;57(1):47-59.
174. Nazemisalman B, Farsadeghi M, Sokhansanj M. Types of Lasers and Their Applications in Pediatric Dentistry. *J Lasers Med Sci*. 2015;6(3):96-101.
175. Coluzzi D. *Soft tissue surgery with lasers: Learn the fundamentals*. 2008.
176. Nivetha G, Ramamurthy J. Hard tissue laser applications in dentistry-A review. *Drug Invention Today*. 2019;11(6).
177. Basford JR, Sheffield CG, Harmsen WS. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low-intensity Nd:YAG laser irradiation on musculoskeletal back pain. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1999;80(6):647-52.

178. Longo L, Tamburini A, Monti A. Treatment with 904nm and 10600nm laser of acute lumbago. *J Eur Med Laser Assoc.* 1991;3:16-9.
179. Mester E, Szende B, Gärtner P. [The effect of laser beams on the growth of hair in mice]. *Radiobiologia, radiotherapia.* 1968;9(5):621-6.
180. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers in surgery and medicine.* 1985;5(1):31-9.
181. Suresh S, Merugu S, Mithradas N, Sivasankari. Low-level laser therapy: A biostimulation therapy in periodontics. *SRM Journal of Research in Dental Sciences.* 2015;6(1):53-6.
182. Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB life.* 2010;62(8):607-10.
183. Khakh BS, Burnstock G. The double life of ATP. *Scientific American.* 2009;301(6):84-90, 2.
184. Karu TI, Afanas'eva NI. [Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light]. *Doklady Akademii nauk.* 1995;342(5):693-5.
185. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers in surgery and medicine.* 2005;36(4):307-14.
186. Zamani ARN, Saberianpour S, Geranmayeh MH, Bani F, Haghighi L, Rahbarghazi R. Modulatory effect of photobiomodulation on stem cell epigenetic memory: a highlight on differentiation capacity. *Lasers in medical science.* 2020;35(2):299-306.
187. Wang Y, Huang YY, Wang Y, Lyu P, Hamblin MR. Photobiomodulation of human adipose-derived stem cells using 810nm and 980nm lasers operates via different mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta General subjects.* 2017;1861(2):441-9.
188. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Australian dental journal.* 1997;42(4):247-54.
189. Pejic A, Kojovic D, Kesic L, Obradovic R. The effects of low level laser irradiation on gingival inflammation. *Photomedicine and laser surgery.* 2010;28(1):69-74.
190. de Paula Eduardo C, de Freitas PM, Esteves-Oliveira M, Aranha AC, Ramalho KM, Simões A, et al. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers in medical science.* 2010;25(6):781-92.
191. Bjordal JM, Couppe C, Ljunggren AE. Low level laser therapy for tendinopathy. Evidence of a dose–response pattern. *Physical therapy reviews.* 2001;6(2):91-9.
192. Sun G, Tuner J. Low-level laser therapy in dentistry. *Dent Clin North Am.* 2004;48(4):1061-76, viii.
193. Yajamanya SR, Chatterjee A, Babu CN, Karunanithi D. Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study. *Journal of Indian Society of Periodontology.* 2016;20(2):151.
194. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang BS, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets.* 2018;29(2):171-84.

195. Ravi S, Santhanakrishnan M. Mechanical, chemical, structural analysis and comparative release of PDGF-AA from L-PRF, A-PRF and T-PRF - an in vitro study. *Biomaterials research*. 2020;24:16.
196. Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2018;17(8):1003-17.
197. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE journal of selected topics in quantum electronics : a publication of the IEEE Lasers and Electro-optics Society*. 2016;22(3).
198. da Fonseca AS. Is there a measure for low power laser dose? *Lasers in medical science*. 2019;34(1):223-34.
199. Zein R, Selting W, Hamblin MR. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *Journal of biomedical optics*. 2018;23(12):1-17.
200. Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers in medical science*. 2014;29(4):1463-7.
201. Skopin MD, Molitor SC. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 2009;25(2):75-80.
202. Pouremadi N, Motaghi A, Safdari R, Zarean P, Rashad A, Zarean P, et al. Clinical Outcomes of Low-level Laser Therapy in Management of Advanced Implant Surgery Complications: A Comparative Clinical Study. *The journal of contemporary dental practice*. 2019;20(1):78-82.
203. Cunha MJ, Esper LA, Sbrana MC, de Oliveira PG, do Valle AL, de Almeida AL. Effect of low-level laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts: in vivo study in rat calvaria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:104230.
204. Thalaimalai DBR, Victor DJ, Prakash PSG, Subramaniam S, Cholan PK. Effect of Low-Level Laser Therapy and Platelet-Rich Fibrin on the Treatment of Intra-bony Defects. *J Lasers Med Sci*. 2020;11(4):456-63.
205. Kara N, Selamet H, Benkli YA, Beldüz M, Gökmenoğlu C, Kara C. Laser Therapy Induces Increased Viability and Proliferation in Isolated Fibroblast Cells. *Wounds : a compendium of clinical research and practice*. 2020;32(3):69-73.
206. Amaroli A, Pasquale C, Zekiy A, Utyuzh A, Benedicenti S, Signore A, et al. Photobiomodulation and Oxidative Stress: 980 nm Diode Laser Light Regulates Mitochondrial Activity and Reactive Oxygen Species Production. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021;2021:6626286.
207. Illescas-Montes R, Melguizo-Rodríguez L, Manzano-Moreno FJ, García-Martínez O, Ruiz C, Ramos-Torrecillas J. Cultured Human Fibroblast Biostimulation Using a 940 nm Diode Laser. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2017;10(7).
208. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2009;7(4):358-83.
209. Tschon M, Incerti-Parenti S, Cepollaro S, Checchi L, Fini M. Photobiomodulation with low-level diode laser promotes osteoblast migration in an in vitro micro wound model. *Journal of biomedical optics*. 2015;20(7):78002.
210. Bourouni I, Kyriakidou K, Fourmouis I, Vrotsos IA, Karoussis IK. Low Level Laser Therapy With an 810-nm Diode Laser Affects the Proliferation and Differentiation of Premature Osteoblasts and Human Gingival Fibroblasts In Vitro. *J Lasers Med Sci*. 2021;12:e33.

211. Henderson TA, Morries LD. Near-infrared photonic energy penetration: can infrared phototherapy effectively reach the human brain? *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2015;11:2191-208.
212. Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, et al. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2015;103(4):825-31.
213. Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian dental journal*. 2012;57(2):207-12.
214. Bianchi S, Torge D, Rinaldi F, Piattelli M, Bernardi S, Varvara G. Platelets' Role in Dentistry: From Oral Pathology to Regenerative Potential. *Biomedicines*. 2022;10(2).
215. Ucer C, Khan RS. Extraction Socket Augmentation with Autologous Platelet-Rich Fibrin (PRF): The Rationale for Socket Augmentation. *Dentistry Journal*. 2023;11(8):196.
216. Meza-Mauricio J, Furquim CP, Geldres A, Mendoza-Azpur G, Retamal-Valdes B, Moraschini V, et al. Is the use of platelet-rich fibrin effective in the healing, control of pain, and postoperative bleeding in the palatal area after free gingival graft harvesting? A systematic review of randomized clinical studies. *Clinical Oral Investigations*. 2021;25(7):4239-49.
217. Crisci A, Manfredi S, Crisci M. Fibrin rich in Leukocyte-Platelets (L-PRF) and Injectable Fibrin Rich Platelets (I-PRF), two opportunity in regenerative surgery: Review of the sciences and literature. *IOSR J Dent Med Sci*. 2019;18:66-79.
218. Reshma AP, Varghese SS, Pampadykandathil LP. Comparison between the regenerative potential of different types of platelet concentrates in periodontal intrabony defect management: A systematic review. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2022;26(5):425-33.
219. Bhattacharya HS, Gummaluri SS, Astekar M, Gummaluri RK. Novel method of determining the periodontal regenerative capacity of T-PRF and L-PRF: An immunohistochemical study. *Dent Med Probl*. 2020;57(2):137-44.
220. Gummaluri SS, Bhattacharya HS, Astekar M, Cheruvu S. Evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin and leucocyte platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: A randomized clinical trial. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*. 2020;14(2):83-91.
221. Reis CHB, Buchaim DV, Ortiz AdC, Fideles SOM, Dias JA, Miglino MA, et al. Application of Fibrin Associated with Photobiomodulation as a Promising Strategy to Improve Regeneration in Tissue Engineering: A Systematic Review. *Polymers*. 2022;14(15):3150.
222. Akbari Saeed T, Ahmadi ZeydAbadi M, Fatemi A, Farsinejad A. In vitro evaluation of decontamination effects on mechanical properties of fibrin membrane. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*. 2018;32:2.
223. Sam G, Vadakkekuttical RJ, Amol NV. In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2015;19(1):32-6.
224. Isobe K, Watanebe T, Kawabata H, Kitamura Y, Okudera T, Okudera H, et al. Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF). *International journal of implant dentistry*. 2017;3(1):17.
225. Sahni A, Odrljcin T, Francis CW. Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(13):7554-9.

226. Feng X, Tonnesen MG, Mousa SA, Clark RA. Fibrin and collagen differentially but synergistically regulate sprout angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells in 3-dimensional matrix. *International journal of cell biology*. 2013;2013:231279.
227. Mamajiwala AS, Sethi KS, Raut CP, Karde PA, Mangle NM. Impact of different platelet-rich fibrin (PRF) procurement methods on the platelet count, antimicrobial efficacy, and fibrin network pattern in different age groups: an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2020;24(5):1663-75.
228. Wei Y, Cheng Y, Wang Y, Zhang X, Miron RJ, Zhang Y. The effect of resting and compression time post-centrifugation on the characteristics of platelet rich fibrin (PRF) membranes. *Clin Oral Investig*. 2022;26(8):5281-8.
229. Chatterjee A, Debnath K, Ali MM, Babu C, Gowda PL. Comparative histologic evaluation of titanium platelet-rich fibrin and platelet-rich fibrin in hypertensive and smoker participants: A cell cytology study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2017;21(3):195-200.
230. Das N, Amaranath BJJ. Qualitative Analysis of Modified Advanced-Platelet-Rich Fibrin Buffy Coat among Diabetic Patients and Tobacco Smokers with Chronic Periodontitis: A Cell Block Cytology Study. *Contemp Clin Dent*. 2022;13(2):173-82.
231. Inkson BJ. 2 - Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In: Hübschen G, Altpeter I, Tschuncky R, Herrmann H-G, editors. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*: Woodhead Publishing; 2016. p. 17-43.
232. Gupta S, Jain A, Gupta M, Gupta J, Kansal S, Bhansali A, et al. Influence of periodontitis and diabetes on structure and cytokine content of platelet-rich fibrin. *Oral Diseases*. 2023;29(8):3620-9.
233. Malgikar S, Sisinty VS. Comparative Evaluation of Titanium-platelet-rich Fibrin and Leukocyte-platelet-rich Fibrin – A Scanning Electron Microscopic Study. *Journal of Interdisciplinary Dentistry*. 2023;13(3):134-7.
234. Miron RJ, Xu H, Chai J, Wang J, Zheng S, Feng M, et al. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces. *Clin Oral Investig*. 2020;24(3):1171-82.
235. Kobayashi M, Kawase T, Horimizu M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*. 2012;40(5):323-9.
236. Fujioka-Kobayashi M, Kono M, Katagiri H, Schaller B, Zhang Y, Sculean A, et al. Histological comparison of Platelet rich fibrin clots prepared by fixed-angle versus horizontal centrifugation. *Platelets*. 2021;32(3):413-9.