

**T. C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**NİGELLA SATİVA VE EQUİSETUM ARVENSE BİTKİ
EKSTRAKTLARININ RATLARDA DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN YARALARIN İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

Dt. Çiğdem KÖŞE

**Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Nazife Begüm KARAN**

RİZE-2019

T. C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ, DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**NİGELLA SATİVA VE EQUİSETUM ARVENSE BİTKİ
EKSTRAKTLARININ RATLARDA DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN YARALARIN İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

Dt. Çiğdem KÖŞE

- Tez Savunma Tarihi** : 14.02.2019
- Tez Danışmanı** : Dr. Öğr. Üyesi Nazife Begüm KARAN (Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)
- Jüri Üyesi** : Prof. Dr. Zeynep YEŞİL DUYMUŞ (Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)
- Jüri üyesi** : Prof. Dr. Firdevs ŞENEL (Beykent Üniversitesi)
- Jüri üyesi** : Doç. Dr. Levent TÜMKAYA (Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)
- Jüri üyesi** : Doç. Dr. Cem ÜNGÖR (Karadeniz Teknik Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **uzmanlık tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zeynep YEŞİL DUYMUŞ

Fakülte Dekanı

Uzmanlık Tezi

RİZE-2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
TABLOLAR DİZİNİ	XIX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Oral Mukoza	3
2.2. Oral Mukozada Yara İyileşmesi	7
2.2.1. Hemostaz ve Enflamatuvar Faz	8
2.2.2. Proliferatif Faz	9
2.2.3. Matürasyon (Remodeling) Fazı	10
2.3. Yara İyileşme Tipleri	11
2.3.1. Primer iyileşme	11
2.3.2. Sekonder İyileşme.....	13
2.3.3. Tersiyer İyileşme	14
2.4. Kemik Doku.....	14
2.5. Kemik Dokuda Yara İyileşmesi.....	18

2.5.1. Enflamatuar Evre	19
2.5.2. Proliferatif Evre	20
2.5.3. Matürasyon ve Remodeling Evresi.....	20
2.6. Bitki Ekstraktlarının Sağlık Alanında Kullanımı.....	20
2.6.1. Çalışmada Kullanılan Bitkiler	22
2.6.1.1. Equisetum Arvense (Kırkkilit Otu; EA)	22
2.6.1.2. Nigella Sativa (Çörek Otu; NS).....	25
2.6.2. Bitki Ekstraktlarının Elde Edilme Yöntemleri.....	28
2.6.2.1. Soxhlet Ekstraksiyon Yöntemi	28
2.6.2.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Yöntemi	29
2.6.2.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi.....	30
2.6.2.4. Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi	31
2.6.2.5. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi	32
2.6.2.6. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon Yöntemi	33
2.7. Çalışmada Kullanılan Histolojik ve Biyokimyasal Biyo-belirteçler	33
2.7.1. Kemik Alkalin Fosfataz	33
2.7.2. Kemik Sialoprotein	34
2.7.3. Osteokalsin.....	35
2.7.4. Tip I Çapraz Bağlı N-Telopeptit (NTX).....	35
2.7.5. Total Oksidan Kapasite.....	36
2.7.6. Total Antioksidan Kapasite	37

3. MATERYAL VE METOD	39
3.1. Kullanılan Malzemeler	39
3.2. Doğal ekstraktların eldesi	39
3.3. Deney Hayvanlarının Temini.....	40
3.4. Çalışma Modeli ve Cerrahi Protokol	40
3.5. Histopatolojik Analiz Porsedürü.....	42
3.6. İmmunohistokimyasal (İHC) Analiz Prosedürü	42
3.7. Semi-Kantitatif Analiz	43
3.8. Biyokimyasal Analiz.....	43
3.8.1. Osteokalsin Düzeylerinin Belirlenmesi	44
3.8.2. NTX Düzeylerinin Belirlenmesi	45
3.8.3. TAS Ölçümü	46
3.8.4. TOS Ölçümü	47
3.9. İstatistiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR.....	49
4.1. Histopatolojik Bulgular.....	49
4.1.1. Kontrol 1. Hafta Grubuna Ait Bulgular	49
4.1.2. Kontrol 3. Hafta Grubuna Ait Bulgular	50
4.1.3. Kontrol 5. Hafta Grubuna Ait Bulgular	51
4.1.4. Equisetum Arvense Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait Bulgular	52
4.1.5. Equisetum Arvense Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait Bulgular	53

4.1.6. Equisetum Arvense Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait Bulgular	54
4.1.7. Nigella Sativa Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait Bulgular	55
4.1.8. Nigella Sativa Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait Bulgular	56
4.1.9. Nigella Sativa Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait Bulgular	57
4.1.10. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavi 1. Hafta Grubuna Ait Bulgular	58
4.1.11. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavi 3. Hafta Tedavi Grubuna Ait Bulgular	59
4.1.12. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavi 5. Hafta Grubuna Ait Bulgular	60
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	61
4.2.1. Alkalen Fosfataz	61
4.2.1.1. Kontrol 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	61
4.2.1.2. Kontrol 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	62
4.2.1.3. Kontrol 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	63
4.2.1.4. Equisetum Arvense Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	64
4.2.1.5. Equisetum Arvense Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	65
4.2.1.6. Equisetum Arvense Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	66

4.2.1.7. Nigella Sativa Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	67
4.2.1.8. Nigella Sativa Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	68
4.2.1.9. Nigella Sativa Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	69
4.2.1.10. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular.....	70
4.2.1.11. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular.....	71
4.2.1.12. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular.....	72
4.2.2. Kemik Sialoprotein	73
4.2.2.1. Kontrol 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	73
4.2.2.2. Kontrol 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	74
4.2.2.3. Kontrol 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	75
4.2.2.4. Equisetum Arvense Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	76
4.2.2.5. Equisetum Arvense Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	77
4.2.2.6. Equisetum Arvense Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	78

4.2.2.7. Nigella Sativa Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular...	79
4.2.2.8. Nigella Sativa Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	80
4.2.2.9. Nigella Sativa Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular	81
4.2.2.10. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular.....	82
4.2.2.11. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular.....	83
4.2.2.12. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular.....	84
4.3. Semi-Kantitatif Bulgular.....	85
4.3.1. Histopatolojik Kemik İyileşmesi Skoru.....	85
4.3.2. Alkalen Fosfataz Pozitivite Skoru	89
4.3.3. Kemik Sialoprotein Pozitivite Skoru	91
4.4. Biyokimyasal Analiz Bulguları	93
5. TARTIŞMA.....	96
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	112
KAYNAKLAR	113
EKLER	131
EK-1 ÖZGEÇMİŞ	131

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Zeynep Yeşil Duymuş'a,

İlk öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, klinik eğitimimde ve mesleki ilerlememde büyük rolü olan, tezimin hazırlanmasında bilgisini, zamanını ve desteğini benden esirgemeyen, bana yol gösteren, değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nazife Begüm Karan'a,

İlk danışmanım olan, o günden beri sevgisini ve desteğini hep hissettiğim kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Firdevs Şenel'e,

Bu çalışmayı TDH-2017-728 proje numarası ile destekleyen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne,

Gece gündüz demeden yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Tolga Mercantepe'ye,

Çalışmama katkı sağlayan, bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Adnan Yılmaz'a, Doç. Dr. Fatma Beyazal Çeliker'e ve özellikle Dr. Öğr. Üyesi Meryem Yeşil'e,

Kıymetli tez jürilerim Prof. Dr. Sevil Kahraman'a, Doç. Dr. Cem Üngör'e, Doç. Dr. Levent Tümkeya'ya, Dr. Öğr. Üyesi Barçın Eröz Dilaver'e ve Dr. Öğr. Üyesi Murat Alkurt'a,

Her zaman bilgi ve destekleriyle bana yol gösteren Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde görev yapan başta Prof. Dr. Engin Dursun ve Prof. Dr. Rüştü Köse'ye, tanıdığım tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalında görev yapan değerli tüm öğretim üyelerine, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, saatlerce mesai bitimi demeden özveriyle çalıştığımız bölümümdeki tüm hemşirelere ve personele, beni hiçbir durumda yalnız bırakmayan tüm dostlarıma,

Bana sevgi, değer, hak ve emeği öğreten, varlıklarıyla tüm zorluklara göğüs gerebildiğim, hayatımın en kıymetlileri olan annem ve babama,

Saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Nigella Sativa ve Equisetum Arvense Bitki Ekstraktlarının Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Yaraların İyileşmesi Üzerindeki Etkileri

Amaç: Yara iyileşmesi cerrahi operasyonlarda önemli bir basamaktır ve başarıda ana kriterlerden biridir. Fitoterapi son yıllarda cerrahide hem yumuşak hem de kemik doku iyileşmesine destek olabilecek bir alan haline gelmiştir. Bu çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulmuş mukoza ve kemik yara dokusuna uygulanan EA ve NS ekstraktlarının iyileşmeye olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmada 84 adet erkek rat (Sprague Dawley) kullanılmıştır. Ratların sağ mandibulasına cerrahi frezle defektler oluşturulmuştur. Defekt bölgesine EA ve NS'nin etanolle elde edilen ekstraktları konularak primer kapatılmıştır. Kontrol grubunda defekte ekstrakt konulmadan bölge suture edilmiştir. Ratlar 1., 3. ve 5. haftalarda sakrifiye edilerek oluşturulan defektlerin iyileşmesi değerlendirilmiştir. Çalışmada histopatolojik, immunohistokimyasal (BALP ve kemik sialoprotein) ve biyokimyasal (osteokalsin, NTX ve TOS/TAS) yöntemler kullanılmıştır. Biyokimyasal incelemeler ratların sol ventrikülünden alınan kan örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Bulgular: EA ve NS ekstraktlarının kombine şekilde uygulandığı gruplarda, HKİS skorları, BALP, kemik sialoprotein ve osteokalsin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (EA+NS 3. hafta HKİS: 7.00 ± 0.46 , EA+NS 5. hafta HKİS: 8.00 ± 0.54). Biyokimyasal biyo-belirteç verilerinde ise BALP ve sialoprotein ekspresyonlarında olduğu gibi korele bir artış izlenmemiştir.

Sonuç: Defekt bölgesine uygulanan ekstraktların akut enflamasyon sürecini kısalttığı, fibröz kallus formasyonuna geçişi hızlandırdığı ve osteoblastik aktiviteye

katkıda bulunduğu saptandı. Tüm haftalarda ekstrakt uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha iyi iyileşme skorları elde edilmiştir. Kemik doku iyileşmesinde EA ve NS'nin kombine kullanımının iyileşme sürecini hızlandırdığı gözlenmiştir. Bu bitki ekstraktlarının cerrahi tedavilerde etkili bir uygulama yöntemi olabileceği düşünülmektedir. Mevcut ekstraktların kemik doku iyileşmesinin remodelasyon safhasına olan etkilerinin izlenebilmesi için uzun dönem takip içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Equisetum arvense, kemik doku iyileşmesi, nigella sativa, bitki ekstraktı, yumuşak doku iyileşmesi

ABSTRACT

The Effects of Nigella Sativa and Equisetum Arvense Plant Extracts on Experimentally Performed Wounds in Rats

Aim: Wound healing is an important step in surgical procedures and is one of the main criteria for success. In recent years, phytotherapy has become a treatment of choice which can support both soft and bone tissue healing. The aim of this study was to investigate the effects of EA and NS extracts applied to experimentally performed bone defects.

Material and Method: 84 male rats (Sprague Dawley) were used in the present study. Surgical defects were performed on the right mandible. Groups were divided into four as; control, EA,NS,EA+NS (combined). Extracts were applied to the defect area in all experimental groups. In control group, bone defect was closed without any application. Rats were sacrificed in the 1.,3. and 5. weeks and the healing scores of the defects were examined histopathologically. Biochemical (osteocalcin, NTX and TOS/TAS), immunohistochemical (BALP, bone sialoprotein) parameters were determined. The results were evaluated by statistical methods.

Results: In the combined therapy group HPBS, BALP, bone sialoprotein and osteocalcin levels were significantly different (EA+NS 3.week HKIS:7.00±0.46, EA+NS 5.week HKIS:8.00±0.54). There was no increase reported in biochemical marker scores as in the BALP and sialoprotein expression.

Conclusion: The extracts applied to the defect area reduced the process of acute inflammation and accelerated formation of fibrous callus and contributed to osteoblastic activity. Combined therapy was accelerated the healing process in all weeks compared to

control group. Plant extracts can be used as an effective method in surgical treatment. Long-term follow-up studies are needed to evaluate the remodeling process of bone healing.

Key Words: Bone healing, equisetum arvense, nigella sativa, plant extract, wound healing

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	: Alkalen fosfataz
BALP	: Kemik alkalen fosfataz
BSP	: Kemik sialoprotein
cm	: Santimetre
CO₂	: Karbondioksit
DNA	: Deoksi-ribo nükleik asit
EA	: Equisetum Arvense
ECM	: Ekstraselüler matriks
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
GAG	: Glikozaminoglikan
GLA	: Gama-karboksi glutamik asit
HPBS	: Histopathologic bone healing score
HKİS	: Histopatolojik kemik iyileşme skoru
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
i.p	: İntraperitoneal
M-CSF	: Makrofaj koloni stimüle edici faktör

ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
μmol	: Mikromol
MHz	: Mega hertz
Mpa	: Megaspaskal
NO	: Nitroz oksit
NS	: Nigella Sativa
NTX	: Tip 1 çapraz bağlı kollajen N-telopeptid
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
TAS	: Total antioksidan kapasite
TGF β	: Transforme edici büyüme faktörü
TNF α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
TOS	: Total oksidan kapasite
TQ	: Timokinon
RANKL	: Reseptör aktivator nükleer kappa B ligandı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Equisetum Arvense.....	23
Şekil 2. Nigella Sativa	26
Şekil 3. Kontrol grubu 1. hafta mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	49
Şekil 4. Kontrol grubu 3. hafta mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	50
Şekil 5. Kontrol grubu 5. hafta mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	50
Şekil 6. EA tedavisi 1. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	51
Şekil 7. EA tedavisi 3. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	52
Şekil 8. EA tedavisi 5. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	52
Şekil 9. NS tedavisi 1. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	53
Şekil 10. NS tedavisi 3. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	54
Şekil 11. NS tedavisi 5. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	54

Şekil 12. EA+NS kombine tedavi 1. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	55
Şekil 13. EA+NS kombine tedavi 3. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	56
Şekil 14. EA+NS kombine tedavi 5. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü	56
Şekil 15. Kontrol 1. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	57
Şekil 16. Kontrol 3. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	58
Şekil 17. Kontrol 5. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	59
Şekil 18. EA tedavisi 1. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	60
Şekil 19. EA tedavisi 3. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	61
Şekil 20. EA tedavisi 5. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	62
Şekil 21. NS tedavisi 1. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	63
Şekil 22. NS tedavisi 3. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	64

Şekil 23. NS tedavisi 5. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	65
Şekil 24. EA+NS kombine tedavisi 1. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	66
Şekil 25. EA+NS kombine tedavisi 3. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	67
Şekil 26. EA+NS kombine tedavisi 5. hafta grubu mandibula doku kesiti BALP pozitive görüntüsü	68
Şekil 27. Kontrol 1. hafta grubu mandibula doku kesiti sialoprotein pozitive görüntüsü	69
Şekil 28. Kontrol 3. hafta grubu mandibula doku kesiti sialoprotein pozitive görüntüsü	70
Şekil 29. Kontrol 5. hafta grubu mandibula doku kesiti sialoprotein pozitive görüntüsü	71
Şekil 30. EA tedavisi 1. hafta grubu mandibula doku kesiti sialoprotein pozitive görüntüsü	72
Şekil 31. EA tedavisi 3. hafta grubu mandibula doku kesiti sialoprotein pozitive görüntüsü	73
Şekil 32. EA tedavisi 5. hafta grubu mandibula doku kesiti sialoprotein pozitive görüntüsü	74
Şekil 33. NS tedavisi 1. hafta grubu mandibula doku kesiti sialoprotein pozitive görüntüsü	75

Şekil 34. NS tedavisi 3. hafta grubu mandibula doku kesiti sialoprotein pozitive görüntüsü	76
Şekil 35. NS tedavisi 5. hafta grubu mandibula doku kesiti sialoprotein pozitive görüntüsü	77
Şekil 36. EA+NS kombine tedavi 1. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait kemik sialoprotein aktivitesi görüntüsü	78
Şekil 37. EA+NS kombine tedavi 3. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait kemik sialoprotein aktivitesi görüntüsü	79
Şekil 38. EA+NS kombine tedavi 5. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait kemik sialoprotein aktivitesi görüntüsü	80

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Histopatolojik Kemik İyileşme Skoru (HKİS)	48
Tablo 2. İmmunohistokimyasal (İHC) pozitivite skorlaması.....	48
Tablo 3. Histopatolojik Kemik İyileşme Skoru (HKİS) Analiz Sonuçları	84
Tablo 4. Alkalen fosfataz pozitivite skorlama bulguları.....	86
Tablo 5. Kemik sialoprotein pozitivite skorlama bulguları	88
Tablo 6. Biyokimyasal Analiz Bulguları	91

1. GİRİŞ

Canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel özelliklerinin travma, cerrahi girişim ya da hastalıklar gibi nedenlerle bozulmasına ve bu özelliklerinin geçici veya tamamen kaybolmasına 'yara' denir. Yara iyileşmesi dokunun farklı aşamalarda verdiği farklı yanıtları içeren karmaşık bir süreçtir. Yumuşak doku iyileşme sürecinde hücresel matriks bütünlüğü bozulan dokunun yerini alır ve bu süreç rejenerasyon veya skar oluşumu ile sonuçlanır. Rejenerasyon, enflamatuar fazlar aracılığıyla dokunun orjinal mimarisinin yeniden oluşturulmasıdır. Yara iyileşmesi enflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma safhalarını içerir ve bu süreçte enflamatuar hücreler, biyokimyasal mediyatörler, ekstraselüler moleküller ve hücre gruplarının kendi aralarındaki etkileşimleri rol alır.¹⁻⁶

Kemik dokusundaki yaraların onarım süreci de yumuşak dokudaki sürece benzer özellikler gösterir ve yapısal değişimler 7-12 gün içerisinde belirginleşir. Yara iyileşmesinin ilk basamağında önce kan hücreleri organize olur ardından lokal olarak uyarılan mezankimal kaynaklı ve çok yönlü gelişim gücüne sahip öncü hücreler yeni damar, fibroblast, matriks ve destek hücreleri oluşturmak üzere farklılaşır. Onarım mekanizmasında rol oynayan mezankimal kökenli multipotent öncü hücreler periosta bulunan osteojenik tabakadan, granülasyon dokusundan ve bir miktar da endosteumdan köken alır.⁷⁻⁹

Hücresel ve biyokimyasal süreçler genetik özelliklere ve çevresel etmenlere göre farklılık gösterir. Buna bağlı olarak yara iyileşmesindeki safhaların süresi değişkenlik gösterebilmektedir. Bu süreçleri hızlandırmaya yönelik yapılmış ve pozitif etkisi görülen birçok çalışma mevcuttur. Trombositten zengin fibrin, düşük doz lazer, amniyon zarı vb. uygulamalar bu sürecin değiştirilebileceğini ve hızlandırılabilirliğini ortaya

koymuştur.¹⁰⁻¹² Ayrıca bitki kullanılarak yapılan fitoterapi yaklaşımının da yara iyileşmesine pozitif katkıları olduğu ortaya konmuştur.¹³ Fitoterapi tedavisinde kullanılan *Equisetum Arvense* (EA)'nın kemik yapının güçlenmesi ve yara iyileşmesindeki olumlu katkıları çalışmalarda gösterilmiştir. Bir diğer fitoterapötik bitki olan *Nigella Sativa* (NS)'nin antioksidan, antibakteriyel ve antienflamatuar etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca çene bölgesindeki yaralar üzerinde olumlu katkıları olduğu tespit edilmiştir.¹⁴⁻¹⁹

Rutinde uygulanan diş çekimleri, gömülü diş operasyonları, implant uygulamaları, preprotetik uygulamalar ve ileri cerrahi işlemlerin tümünde; yara iyileşmesi kemik ve yumuşak dokunun her ikisini de kapsamaktadır.^{12,20,21} Bu tez çalışmasında fitoterapötik bitkiler olan EA ve NS'nin mandibuler defekt üzerindeki etkinliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oral Mukoza

Oral mukoza ağız boşluğunu kaplayarak çevre dokulardan ayırır. Damak, dişeti, vestibulum oris, ağız tabanı, dudak ve yanak epitelı ektoderm, dil kökü epitelı ise endoderm kökenlidir.^{22,23}

Oral mukozayı döşeyen epitel histolojik olarak; stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum korneum'dan oluşmaktadır. Epitelin ilk katmanı olan stratum basale, bazal membran üzerine yerleşim gösterir ve hücreleri prizmatiktir. Bazal hücrelerin sitoplazmalarında tonofilamanlar vardır ve hücreler arası bağlantı modelinde sıklıkla dezmozomlar gözlenir. Stratum basale, bazal membrana hemidezmozomlarla bağlanır ve en aktif mitoz bölünme burada gerçekleşir. Deride tek hücre sırasıyla oluşan bazal tabaka, oral epitelde iki veya üç hücre kalınlığında olabilir. Bazal lamina lamina lusida ve lamina densa adı verilen iki kısımdan oluşur. Lamina lusida glikoprotein yapıdaki lamininden oluşur ve epitelin bazal tabakası ile komşudur. Lamina densa ise tip IV kollajenden oluşur ve epitelin bağ dokusu ile komşu olan bölümüdür. Stratum spinosum tabakası epitelin yüzey olarak en geniş bölümüdür. Hücreleri mitoz bölünebilir ancak bazal tabakadaki hücrelere göre daha az mitoz bölünme gözlenir. Ribozom organeli ve dezmozom yapısı gelişmiştir ve keratin proteini vardır. Keratin filaman demetleri olan tonofilamanlar sayıca artarak demet oluşturur. Stratum granulosum tabakası, stratum spinosumun üst kısmındadır. Hücreler yassı şekildedir ve sitoplazmalarında koyu boyanan keratohiyalin granülleri vardır. Hücre aktivitesi diğer katmanlara göre düşüktür. Sitoplazmadaki tonofilaman ve dezmozom sayısı burada sayıca daha da artmış olarak izlenir. Stratum korneum, epitelin en üstünde yer alan tabakasıdır. Hücreler dejenere olmuştur ve ortokeratinize epitele dönüşmüştür. Bu tabakadaki hücreler yüzeyden

atılırlar. Bu durum bazal tabakadan yüzeye doğru yer değiştiren hücreler ile devamlılık arzeder.^{20,22,24,25}

Oral mukoza temel olarak vajinada ve özofagusta bulunan örtücü mukozaya benzer ve kutan mukoza özelliği gösterir. Fakat epitelinin keratinizasyon derecesinde farklılıklar vardır. Oral mukoza epiteli bazı bölgelerde keratinizasyon gösterirken bazı bölgelerde göstermez. Oral bölgede keratin tabakası parakeratinize, ortokeratinize veya her ikisinin kombinasyonu formunda şekillenmiştir. Sert damak ortokeratinize epitelle örtülü iken; diş eti, dil sırtı, alveoler mukoza orto ve parakeratinize epitelle örtülüdür. Yanak mukozası, vestibül sulkus, labial mukoza, yumuşak damak, diş eti aralığı, ağız tabanı, dilin alt ve yan tarafı, keratinize olmayan epitelle kaplanmıştır.^{21,23,26}

Ağız boşluğunu örten mukoza çok katlı yassı epitelidir ve dört anatomik tabakadan oluşmaktadır. Bunlar;

1. Çok katlı yassı epitel
2. Bazal membran
3. Lamina propria (Bağ dokusu)
4. Submukoza tabakasıdır.

Epitel tabakanın bazal membrana komşu olan yüzeyinde hücreler bölünerek çoğalırlar. Bölünen hücrelerden en genç olanlar bazal membran yüzeyinde kalarak daha yaşlı olan hücreler yüzeye doğru göç etmektedir. Epitel tabakasının bütünlüğünün ve kalınlığının devamı bu yenilenme hareketi sayesinde olmaktadır. Hücrelerin bu değişim süreci yaklaşık 10-12 gündür. Oral mukoza bu sebeple yaklaşık iki haftalık sürede kendini yenilemektedir. Lamina propria'nın altında yer alan submukoza tabakasında damarlar, yağ hücreleri ve mukus salgılayan tükürük bezleri bulunur. Epitel tabakasının altında ise

bağ dokusu bulunur. Bağ dokusuna ait papillalar epitelin içine doğru çıkıntılar yaparak dalgalı bir görünüm oluştururlar.^{21,23,24,27}

Oral mukoza morfolojik yapı olarak üçe ayrılır. Bunlar;

1. Örtücü mukoza
2. Çiğneme mukozası
3. Özelleşmiş mukozadır.

Örtücü mukoza, yanak, dudak, ağız tabanı, dilaltı, vestibül bölge ve yumuşak damakta görülür. Çiğneme mukozası dişetinde ve sert damakta vardır. Bu mukozada submukoza tabakası yoktur, direkt periosta bağlıdır. Özelleşmiş mukoza ise sadece dil üzerinde vardır. Ağırlıklı olarak keratinize olan bu bölgede tat tomurcukları ve papillalar da görülmektedir.^{22,23,28}

Oral mukozaya yapısal destek sağlayan bağ dokusu (lamina propria) mezodermden köken alır ve fibröz tiptedir. Bağ dokusunda yoğun olarak kollajen lifler, fibroblastlar, sinir-damar paketi ve dişeti bölgesi hariç yer yer tükürük bezleri yer almaktadır.^{20,21,28} Dişlerin etrafını saran alveoler kemikte ve sert damak ön bölümünde bağ dokusu direkt olarak periosteuma tutunur. Ağız tabanında ise bağ doku submukoza üzerindedir ve gevşektir.^{22,26}

Bağ dokusunda fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar ve enflamatuar hücreler bulunmaktadır. Bağ dokusunun esas hücresi olan fibroblastlar; mekik biçimlidir, bir veya daha fazla çekirdekçik içerir. Çok sayıda mitokondrileri, iyi gelişmiş endoplazmik retikulumları ve golgi organelleri vardır. Sitoplazmasında tonofilaman miktarı fazladır. Doku yaralanması gibi gerekli durumlarda mitoz bölünme yapar. Fibroblastlar fibröz bileşenlerin (kollajen, retikülin ve elastin) ve mukopolisakkaritlerin (glikoproteinler ve glikozaminoglikanlar) yapımından sorumludur. Fibroblastlar kollajen sentezi yanında

kollajen yıkımını da düzenlerler. Fibroblastlar doku yaralanmasında şekilsiz temel madde ve fibril senteziyle tamir sürecinde önemli rol almaktadır.^{21,22,24}

Mast hücrelerinin golgi kompleksleri iyi gelişmiştir. Sitoplazmalarında proteolitik enzim, histamin ve heparin içeren çok sayıda vezikül mevcuttur ve sitoplazmaları iri granüller içerir. Granüllerin içi doku iritasyonunda serbest kalan ve kan dolaşımını kontrol eden vazoaktif maddeler ile doludur. Bu içerikleri sebebiyle organizmadaki enflamasyon ve anafilaksi olaylarında etkilidir ve heparin sayesinde kanın pıhtılaşmasını engeller. Lökosit hücresinden köken alan nötrofiller, fagositozda ve mikroorganizmaların öldürülmesinde görev alan bağ doku enflamatuvar hücreleridir.^{21,29}

Monositler kemik iliği kökenlidir, damar dışına çıkıp dokuya geçtiklerinde makrofaj adını alırlar. Makrofajlar, bağ dokusunda fibroblastlardan sonra en çok bulunan hücrelerdir. Savunma sisteminin önemli hücresi olan makrofajlar dokuya dışarıdan gelen zararlı mikroorganizmaları, doku ve hücre artıklarını fagositozla yok eder. Makrofajlar kronik iltihaplı dokuda sayıca fazladır.^{20,21}

Oral mukozada dört çeşit bağ dokusu lifi bulunmaktadır. Bunlar;

1. Kollajen İplikler
2. Retiküler İplikler
3. Oksitalan İplikler
4. Elastik İpliklerdir.

Oral mukozadaki temel bağ dokusu lifi kollajendir ve en küçük birimi tropokollajendir. İpliksel bir protein olan tropokollajen üç polipeptid zincirinin heliks oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Her zincir yaklaşık 1000 aminoasit içerir ve içeriğinde glisin, prolin ve hidroksiprolin aminoasitleri vardır. Kollajen fibriller olgunlaştıkça tropokollajenin heliks yapısında bulunan kovalent çapraz bağlar artarak

şekillenir ve dokuya gerilme kuvveti kazandırır. Bağ dokusunda temel olarak tip I kollajen vardır. Retiküler lifler tip III kollajen içerir ve bazal membranın retiküler laminasını oluştururlar. Gevşek bağ dokusu içinde ise kan damarlarının çevresinde bulunmaktadır. Oksitalan iplikler, periodontal ligamentte çokça bulunmaktadır ve dişin uzun aksına paralel uzanır. Fonksiyonları henüz tam olarak bilinmemektedir. Elastin adı verilen proteinler elastik lifleri oluştururlar. Paralel veya ağ şeklinde yapılar oluşturarak dişeti ve periodontal ligamentte yoğun olarak bulunur.^{20-22,30}

Bağ dokusunun şekilsiz temel maddesi proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşur. Proteoglikanı glikozaminoglikanlar oluşturur ve karbonhidrat bileşenleri baskındır. Glikoproteinler oligosakkarit içerirler ve protein bileşeni fazladır. Bağ doku hücreleri bu temel madde içerisinde canlı kalıp fonksiyon görmektedir. Bağ dokudaki madde taşınımı, hücrelerin bazal membrana tutunması, doku osmotik basıncının ayarlanması bağ dokunun şekilsiz temel maddesi ile gerçekleşmektedir.^{21,31,32}

2.2. Oral Mukozada Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, bütünlüğünü kaybetmiş dokunun normal anatomik, fizyolojik ve histolojik yapısının tekrar kazanılmasıdır. Yaralanma sonrası birçok farklı prosesler tamir amacıyla devreye girer. Bu, kompleks ve dinamik yollarla dokunun yıkılması (katabolik faz) ve yeniden sentezi (anabolik faz) şeklinde olmaktadır. Yara iyileşmesi, organize ve karmaşık birtakım hücrel ve biyokimyasal olayları içerir. İyileşmenin ana ögesi hücre bölünmesidir. Dokunun bütünlüğü ve sağlamlığının temini kollajen sentezi sayesinde olmaktadır ve bu durum yara iyileşmesinin tüm aşamalarında kilit rol oynamaktadır. Tüm yara tiplerinde olduğu gibi oral mukozada da iyileşme prosesi hemostazı takiben enflamatuar faz, proliferatif faz ve rejeneratif fazdan oluşmaktadır.^{3,4,33-36}

2.2.1. Hemostaz ve Enflamatuvar Faz

Yaralanma ile birlikte damarlar hasar görür ve dokudaki hasardan hemen sonra trombosit ve fibrinin oluşturduğu hemostatik tıkaç şekillenir. Açığa çıkan subendotelyal kollajene trombositlerin adezyon ve agregasyonu sonucu pıhtılaşma süreci başlar. Oluşan pıhtı bir yapı iskelesi görevi görür. Sonrasında sırasıyla vazokonstriksiyon, trombosit agregasyonu ve fibrin formasyonu oluşmaktadır. Plazma proteini olan fibrinojenin fibrine dönüşmesiyle trombin aktive olur. Böylece fibrin molekülü hem hemostazı sağlar hem de yaradaki geçici matriksin esas bileşeni olarak görev yapar. Dokuda oluşan vazokonstriksiyonun yerini bir süre sonra vazodilastasyon almaktadır. Bu vazodilastasyon histamin, bradikinin, prostoglandin ve lökotrien gibi faktörlerin salınımıyla olmaktadır. Artmış vasküler geçirgenlikle beraber plazma proteinlerinin, prostaglandinlerin, kemotaktik faktörlerin (kompleman, interlökin-1 (IL-1), TNF α , TGF β , bakteri yıkım ürünleri) salınımı ve lenfatik drenajın blokajı sonucu şişlik, kızarıklık, sıcaklık artışı, fonksiyon kaybı ve ağrı gibi enflamasyonun belirtileri oluşmaktadır. Fibrinden salınan sitokinlerin kemotaktik etkileriyle enflamatuvar hücreler yara bölgesine gelir. Trombositlerden sitokinler ve büyüme faktörlerinin salınımıyla beraber enflamasyon bölgesine ilk olarak nötrofil hücreleri göç etmektedir. Nötrofiller yaralanmadan 24-48 saat sonra enflamasyon bölgesinde maksimum sayıya ulaşır ve bölge tekrar kontamine olmazsa sayıları günler içerisinde azalmaya başlar. Yaralanmadan 72 saat sonra bölgeye makrofaj hücreleri gelerek pıhtı içinde bulunan nötrofilleri, ortamdaki hücre yıkım ürünlerini, bakterileri ve artıklarını fagosite ederek temizler. Makrofaj hücreleri sitokinleri aktive ederek lenfositlerin salınımında, NO aracılığıyla ise monosit, fibroblast ve endotel hücrelerinin aktivasyonunda görev almaktadır. Enflamasyon evresi 3-6 gün sürmektedir.^{3,4,37-43}

2.2.2. Proliferatif Faz

Bu aşamada, yara bölgesinde bir onarım süreci başlar. Proliferasyon evresi yaralanmadan sonraki 4. gün içinde başlayıp 2-3 hafta kadar sürmektedir. Bu evre enflamatuvar hücreler, fibroblastlar ve yeni oluşan kapilleri içeren granülasyon dokusu oluşumu ile karakterizedir. Sırasıyla hücre proliferasyonu, anjiogenez ve epitelizasyon gerçekleşmektedir. Burada etkin hücreler; fibroblastlar, endotel ve epitel hücreleridir. İlk önemli basamak, yaranın artan oksijen ve besin ihtiyacının karşılanması için bölgede yeni kan damarlarının oluşumudur.^{3,44-46} Anjiogenezde makrofajlardan salınan sitokinler dokudaki hipoksisiyle beraber aktif hale gelir. Endotel hücreleri uyaran bölgesine göç ederek bölünüp farklılaşarak yara kenarından merkeze doğru yeni damarlanma meydana getirirler. Yeni meydana gelen bu damar ağının bir kısmı sonraki evrelerde kaybolmaktadır. Fibroblastlar enflamatuvar hücreler ve kemotaktik sitokinlerin etkisiyle yara bölgesine göç ederler. Bu hücreler kollajen, elastin, fibronektin, glikozaminoglikan ve kollajenaz gibi proteazları üreterek yara iyileşmesinde önemli rol oynarlar. Böylece ekstraselüler matriks (ECM) şekillenir. Yara iyileşmesi devam ettiği sürece makrofaj sayısı azalırken, fibroblastların sayısı artmaktadır.^{45,47-49}

Yara iyileşmesinin temelinde kollajen sentezi vardır. Fibroblastlar mobilize olarak yeni kollajeni üretirler. İlk şekillenen kollajen ektomezankimal hücreler ve fibroblastlar tarafından sentezlenen Tip III kollajendir. Tropokollajen sentezlendikten sonra olgun kollajen haline dönüşür ve çapraz bağlarla kollajen yapısı güçlenir. Bu sayede yaranın gerilme gücü yaralanmadan sonraki 10. günden sonra hızla artar. Kollajen birikimi yaranın gerilme kuvvetini artırır ve yeni oluşan damarlara destek verir. Yeterli kollajen ve matriks üretimi normal yara iyileşmesinin göstergeleridir. Oluşan granülasyon dokusu erken evrede gevşek, normal mukoperiosteal dokudan ince, daha az yoğunlukta lif içermesi ve birim alan başına düşen fibroblast sayısı daha fazladır.

Granülasyon dokusunda artan kollajen matürasyonu ile zamanla daha fibröz bir bağ dokusu oluşmaktadır.⁵⁰⁻⁵³ Bu süreçte epitel hücreleri yara bölgesine doğru göç ederek çoğalır. Epitel hücrelerinin migrasyonunda EGF, transforme edici büyüme faktörleri (TGF α , TGF β) gibi sitokinler görev alır. Çok katlı yassı epitelin tabakaları oluşarak etkili bir epitelyal bariyer oluşturulur. Bu epitelyal bariyer bağ doku iyileşmesi için gerekli duvarı sağlamaktadır, sıvı kaybını önlemektedir ve gerekli dayanıklılığı sağlamaktadır. Reepitelizasyon sonucu yara kenarları birbirine doğru yaklaşır, yara bölgesi kontraksiyona uğrayarak boyutu küçülür. Bağ dokusu iyileşmesi epitelyal bariyer oluşuktan sonra başlar. Makrofajlar, nötrofillerin başlattığı fagositoza enflamatuvar faz boyunca devam ederken aynı zamanda makrofajlar fibroblastların yara alanına migrasyonunu sağlayan faktörler sentezlerler.^{3,43,51,54,55}

2.2.3. Matürasyon (Remodeling) Fazı

Yara alanındaki fibroblast sayısının azalması ve kapillerden oluşan zengin ağırlıkta gerilemeye başlaması bağ dokusu iyileşmesinin sona erdiğini ve matürasyon (remodeling) fazının başladığını gösterir. Bu aşamada kollajen lifleri form, hacim ve oryantasyon olarak birçok değişikliğe uğrar. Başlangıçta yara bölgesine Tip III kollajen, hakimken, olgunlaşma ilerledikçe Tip I kollajen yoğunluğu artmaktadır. Kollajenler gerilme çizgilerine göre organize olurlar, mekanik güçleri giderek artar. Buna bağlı olarak skar dokusunun gerilme kuvveti giderek artar ve sonunda normal doku geriliminin %80'ine ulaşır. Fakat hiçbir zaman normal dokunun gücüne ulaşamaz. Skar kollajeninin ve matriksinin homeostazı serin proteaz ve matriks metalloproteinazlar tarafından düzenlenir. Matürasyon evresinin ne kadar süreceği belirsizdir. Bu süreç yetersiz matriks yapımıyla sonuçlanır ve dolayısıyla iyileşmenin skar formasyonu veya yara dehissensi ile sonuçlanabilir.^{4,33,50,53,54}

2.3. Yara İyileşme Tipleri

2.3.1. Primer iyileşme

Cerrahi insizyonlarda olduğu gibi yara kenarları birbirine çok yakınsa ve doku kaybı yoksa dokuda primer iyileşme tipi gözlenmektedir ve minimum granülasyon dokusuyla iyileşmektedir. Basit bir insizyon epidermal dokuda ve bağ dokuda birçok hücreler ölmesine yol açar. Bu arada pek çok küçük damar yaralanır ve kanama meydana gelir. Böylece insizyon yeri pıhtılaşan kan ile hızla dolar ve fibrin miktarında artış olur. İlk 24 saat içinde yara kenarlarında sıvı eksüdasyonu, daha çok fibrin birikimi, nötrofil, monosit ve lenfositlerin eşlik ettiği orta dereceli bir enflamasyon meydana gelmektedir. Bu akut enflamatuvar dönemde nötrofillerden serbestlenen enzimlerle kan pıhtısı sindirilerek parçalanmaktadır. 3. günde ortamdaki nötrofillerin çoğu kaybolur ve yerini fagositik makrofajlar alır. Bunlar da ortamda kalan diğer fibrin, ECM artıkları, eritrosit ve diğer hücre artıklarını sindirir. Hasara uğramış hücreler ve bu hücrelerden çıkan yıkım ürünleri, fibronektin ve nötrofillerden salınan lizozomal enzimler makrofajlar için kemotaktiktir. Bu aşamada fibronektin opsonizasyon görevi üstlenerek makrofajlarca yapılan bu debridman işleminde durumu hızlandırmaktadır.⁵⁶⁻⁵⁸

Epitel rejenerasyonu; hücre migrasyonu, hücre proliferasyonu ve yara sonrası yeniden yapılanmayı kapsar. Epitelyal aktivitenin en erken habercisi, başlayan hücre migrasyonudur. Yara dokusunun marjinal kenarından başlayan mitoz bölünme artışı gözlenir. Epitel hücreleri yassılaşılarak yaprak şeklinde uzanır ve yüzeyden aşağıya doğru bir derinleşme görülür. Hücreler bölünürken aynı zamanda bazal membran komponentlerini de salgılar. Böylece epidermal bazal membran kademeli olarak tamir edilir. Epiteldeki defekt 48 saat içinde devamlılık gösteren ince bir epitelyal kabukla örtülür. Proliferatif cevapta rol oynayan epitel hücreleri hem bazal hem de suprabazal

hücrelerdir. Başlangıçta örtü görevi gören hücreler esasen bölünmeyen hücrelerdir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar ve insan deneyleri göstermiştir ki; marjinal epitelde DNA sentezi ve mitoz bölünme çok düşük veya hiç yoktur. Ancak yara kenarından bir miktar uzaklaşınca mitoz bölünmenin ve hücre proliferasyonunun fazla olduğu görülmüştür. Mitoz bölünmedeki pik aktivite yaralanmadan 2- 5 gün sonra görülmektedir Granülasyon tabakası enflamasyon başlangıcından 4 gün sonra görülür ve başlangıçtaki bu epitel normal epitele göre daha kalındır.³⁵

Dokuda iyileşme basamağı fibroblastların proliferasyonu ve yeni damar oluşumlarıyla granülasyon doku formuna geçmektedir. Granülasyon dokusu pembe renklidir ve geniş doku defekti yüzeyinde granüler bir görünüme sahiptir. Granülasyon dokusu çok ince granüler bir yapıdadır ve kolayca kanayabilen yeni kapillerlerin oluşturduğu kıvrımlardır. Vasküler proliferasyon, yaralanmadan 2-3 gün sonra başlar. Endotelial hücreler bir şerit halinde tomurcuklanır, bu olaya anjiyogenezis veya neovaskülarizasyon denir. Gelişen yeni kan damarlarının bazal membranlarında lokal degradasyon (yıkım) alanları görülür. Bu durum endotel hücrelerinden kaynaklanan ekstraselüler proteolitik aktiviteye bağlanmaktadır.^{36,59} Oluşan yeni damarlar başlangıçta küçük bir bazal membrana sahiptir. Bu aşamada akut enflamasyon döneminde olduğu gibi hücreler arası madde geçişlerine izin verildiği için, ekstraselüler alana proteinden zengin sıvı ve eritrositler sızmakta olduğundan yeni granülasyon dokusu önemlidir. Bu sebeplerden dolayı granülasyon dokusu vücuttaki en damarlı yapılardan biridir. Bu damarlanma bağ dokusunun iyileşebilmesi için temel gerekliliktir. Yeni oluşan kapillerler birkaç gün içinde arteriyoller ve venüllere farklılaşırlar. Zamanla granülasyon dokusundaki kan damarlarının bir kısmı dejenere olarak rezorbe edilir, sayıları azaltılır. Granülasyon dokusunda lenfatik kanallar da bulunur ve kan damarlarına benzer şekilde oluşurlar.^{60,61} Anjiogenezise paralel olarak bağ dokusu yaralanmalarında yaraya

fibroblast göçü olur, kısa ve şiddetli mitotik aktivite görülür. Fibroblastların yara iyileşmesindeki asıl işlevleri sekresyondur. Yaralanmadan 4-5 gün sonra fibroblast hücreleri hipertrofiye uğrar. Hücrede endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi organellerinin sayıları artar. Hipertrofiye uğrayan fibroblastlar ECM komponentlerinin sentezi ve sekresyonunda tekrar aktif hale gelirler. Fibroblastlar özellikle polisakkarit glikozaminoglikanlar (GAG), fibronektin, kollajen tip I ve III ile kovalent bağlanır. Yara yerindeki GAG ve proteoglikan miktarı, 1. hafta sonunda pik değere ulaşır. Eş zamanlı olarak yara yerinde fibronektin birikimi de olmaktadır. Yaklaşık 2 hafta sonra fibronektin düzeyleri normale döner. Fibroblastlardan kollajen sentezi dokudaki yaralanmadan 3-4 gün sonra başlar ve yaradaki kollajen düzeyi 3. haftada maksimum seviyeye ulaşır. Tip I ve tip III kollajen üretilse de yara dokusunda baskın olan tip III kollajendir. 1. haftanın sonunda kollajenin yıkım hızı artar ve bu dönemden sonra yeniden şekillenme (remodeling) başlamaktadır. Bu dönemde tip III kollajenin yerini tip I kollajen alır. Bu yeni kollajen lifleri mekanik strese göre yeniden dizilim gösterirler.⁶² Yara dokusunun gerilim gücündeki artış, hem kollajen fibrilleri arasındaki intramoleküler ve intermoleküler çapraz bağlanmayla olmaktadır.^{3,62-64}

2.3.2. Sekonder İyileşme

Doku kaybının fazla olduğu yaralarda ya da kontaminasyon ve cerrahi sebeplerle yara kenarları birleştirilemeyip açık bırakılan yaralarda yara kenarları düzensiz ve birbirinden çok ayıktır. Bu yüzden onarım süreci, yara kenarlarının karşı karşıya getirildiği primer iyileşmeden daha yavaştır. Ayrıca daha çok doku ve hücre artığı olduğundan daha şiddetli bir enflamasyon görülmektedir. Sekonder iyileşmede iltihabi reaksiyon daha yoğundur, daha fazla granülasyon dokusu oluşur ve iyileşme sonunda skar dokusu kalır. Büyük yüzey yaralarında görülen yara büzüşmesi (kontraksiyon) primer

iyileşmeyi sekonder iyileşmeden ayıran en önemli özelliktir. Yara kontraksiyonu kollajen liflerinin kılınmasına bağlı olarak oluşmaz, modifiye fibroblastların kontraksiyonuna bağlı olarak oluşmaktadır. Büzüşme fibroblastlardan farklılaşan hücreler ve myofibroblastlar sayesinde olmaktadır. İyileşme sürecinde, yara kenarları arasındaki boşluk granülasyon dokusu ile kapanırken yara kenarından ilerleyen epitel de granülasyon dokusunu örtmeye çalışır. Bu tipteki defektlerin iyileşmesi bağ dokusu oluşumu, epitel göçü, kollajen depozisyonu, kontraksiyon ve remodeling ile gerçekleşmektedir. İnsizyon yaralarında olduğu gibi, geniş doku defekti kanamaya ve kan pıhtısının oluşmasına neden olur. Bunu takiben nötrofil hücrelerinin ve makrofajların göçü meydana gelir. Skar dokusu, yüzeye paralel ilerleyen kollajen bantları ile özellik kazanır. Elastik lifler genellikle yer almamaktadır. Bazı durumlarda az miktarda yer alan elastik lifler ise kollajen bantlarına paralel olarak uzanır. Diş çekim socketinin iyileşmesi sekonder iyileşmeye örnektir. Sekonder yara iyileşmesinde kollajen metabolizması rol oynamadığından iyileşmenin takibinde kollajen ölçümleri yardımcı olmamaktadır.^{3,34,54,65}

2.3.3. Tersiyer İyileşme

Tersiyel iyileşmeye bırakılan yaralarda doku kaybı yoktur. Enfekte olan yaralarda enfeksiyon bölgesi tedavi edilirken yara açık bırakılır. Enfeksiyon geçtikten sonra yara bölgesi cerrahi olarak dikilmektedir. Buna gecikmeli primer kapatma veya tersiyer iyileşme denir.⁶⁵

2.4. Kemik Doku

Rijid yapısına rağmen, kemik dokusu yaşam boyunca sürekli olarak yeniden şekillendirilen çok dinamik bir dokudur. Kalsiyum ve fosfat tuzlarıyla mineralize olmuş, kollajen matriksten oluşan ve sürekli remodele olabilme yeteneğine sahip bir bağ

dokusudur. Doku içeriğinde organik ve inorganik bileşenler vardır. Organik ve inorganik bileşenlerin her ikisi de kemik dokusuna sağlık ve kuvvet kazandırır. Bileşenler anatomik bölge, yaş, beslenme alışkanlıkları ve hastalık varlığına bağlı olarak farklılıklar gösterebilir. Kemik dokusunun organik bileşenlerini; tip 1 kollajen, matriks proteinleri (osteopontin, osteokalsin, osteonektin, kemik sialoprotein), proteoglikan, lipitler, büyüme faktörleri ve sitokinler oluşturmaktadır. Kemik lifli yapısı kollajen tarafından oluşturulur. Kollajen yapıda olmayan proteinlerin ise mineralizasyonda rol oynadıkları düşünülmektedir. Kemik dokusunun inorganik bileşenlerini hidroksiapatit kristalleri, kalsiyum, fosfat, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum gibi mineraller oluşturmaktadır.⁶⁶

Kemik dokusunda osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve osteoprogenitör hücreler olmak üzere; dört farklı hücre tipi vardır.

Osteoblastların kök hücresi mezenkim dokudur. Periostun iç yüzeyinden ve komşu osteoprogenitör hücrelerin mezenkimal dokularından farklılaşır. Osteoblastlar kübik şekilli, bazofilik boyanan, 20-30 µm genişliğinde hücrelerdir. Bu hücrelerin büyük çekirdekleri, hücresel uzantıları ve hücreler arası bağlantıları, iyi gelişmiş endoplazmik retikulumları, gelişmiş golgi aparatı ve içleri kollajenle dolu salgı kesecikleri vardır. Osteoblastlar bölünemez. Kemik doku oluşumu esnasında bazı osteoblastlar osteositlere dönüşür, bir kısmı ise periostta ve endostta varlıklarını sürdürürler⁹. Osteoblastlar kemik matriksinin sentezinden, gelişiminden, yeniden şekillenmesinden (remodeling) ve onarım sürecinden sorumludur. Osteoblastların prekürsör hücre olduğu düşünülmektedir. Bu hücreler hem Tip 1 kollajeni hem de kemiğin organik matriksinin kollajen olmayan proteinlerini salgırlar. Ayrıca bu matriksin mineralizasyonunu da regüle ederler.^{66,67}

Osteositler kemik dokusunun esas hücreleridir. Osteositler kemik matriks içine hapsolmuş olgun osteoblastlardır. Kemik yapımı sırasında osteoid madde içinde kalan

osteoblastlar, organellerinin çoğunu kaybederek osteositlere dönüşür. Metabolik olarak inaktif olan osteositler yenilenemez ve yaşam ömürleri birkaç yıldır. Osteositlerin hücresel olarak en belirgin özelliği sitoplazmik uzantıdır. Bu uzantılar sayesinde osteositler, çevredeki diğer osteositlerle, osteoblastlarla, kemik yüzeyini döşeyen hücrelerle, periost hücreleriyle ve damarlarla bağlantılar kurarlar. Böylelikle sitoplazmik uzantılar ve periferindeki hücreler ile 'osteositik membran' adı verilen bir sistemi oluştururlar. Bu membran sistemi kemikten kana kalsiyum geçişinde ve kalsiyumun vücut sıvılarındaki konsantrasyonunun dengelenmesinde etkindir. Osteositlerin görevi kemik dokunun devamlılığını sağlamaktır. Ayrıca kemik sentezinde ve rezorpsiyonunda da rol oynadıkları bilinmektedir.^{9,21,66,68-70}

Osteoklastlar kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerinden köken alır. Osteoklastlar diğer kemik hücrelerinden farklı olarak hematopoetik dokulardaki tek çekirdekli prekürsör hücrelerin birleşmesi sonucu oluşur. Osteoklast hücreleri, çok çekirdekli ve hücre çapları 20–100 µm arası değişir. Foksiyonlarından dolayı makrofaj türü hücre olarak kabul edilen osteoklastlar, mononükleer fagositer sisteme dahil hücrelerdir ancak fagositoz yapmazlar. Kemik yıkımından sorumludurlar. Osteoklastların içerdikleri kollegenaz ve diğer proteolitik enzimler kemiği rezorbe edici özelliktedir. Kemik yüzeylerinde yer alan howship lakünaları adı verilen boşluklarda bulunurlar. Yaşam süreleri 3-4 haftadır. Osteoklastların rezorpsiyon alanlarını belirleyen sinyal mekanizması henüz anlaşılmaş değildir. Osteoblastlarla beraber osteoklastlar, kemiğin mekanik etkenlere bağılı olarak şekillenmesinde rol oynar.^{7,21,69}

Osteoprogenitör hücreler mezenkim kaynaklıdır. Bu hücreler periostun iç yüzeyinde, kemik yüzeylerinde ve kompakt kemiğin vasküler kanallarında bulunur. Osteoprogenitör hücreler inaktif kemik yüzeylerini örten düz, iğ şeklinde hücrelerdir. Osteoblastların prekürsör hücreleri olabilecekleri düşünölmektedir. Büyüme sırasında

aktif olan osteoprogenitör hücreler, erişkin hayatında kırık iyileşmesi veya farklı tipteki yaralanma durumunda aktive olurlar, ihtiyaç halinde osteoblast veya osteoklast gibi diğer tip kemik hücrelerine dönüşebilirler. Bu hücrelerin kemik dokusundaki görevleri ve hangi basamakta aktive olduğu hakkında yeterli bilgi yoktur.^{7,21}

Kemik metabolizması esas olarak iki hücre tipinin koordine hareketleriyle gerçekleştirilir. Kemik sentezleyen osteoblastların ve kemikte rezorpsiyon yapan osteoklastların etkileşimiyle olmaktadır. Her iki hücre tipinin kemik metabolizması aktivitelerinde köklü rollerine ek olarak, birbirlerini çapraz olarak etkileyebileyen farklılaşma şekilleri de olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda osteoblastların, osteoklastojenik süreçte, özellikle makrofaj-koloni uyarıcı faktörün (M-CSF) sentezini ve nükleer faktör B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü olarak osteoklastojenezi teşvik eden iki önemli faktörün salgılanmasında etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) kemik rezorpsiyon sitokinleri olarak adlandırılır ve kemik dokudaki rezorpsiyonda majör rol oynarlar. Bu iki yapım ve yıkım mekanizması karşılıklı olarak sürekli devam eder ve yeniden şekillenme denilen döngüyü oluştururlar.^{7,8,21,68,71-75}

İnsan vücudunda morfolojik olarak üç farklı kemik yapısı vardır. Bunlar; kortikal kemik, trabeküler (spongiyoz) kemik ve ağsı (woven) kemiklerdir.

Kortikal kemik tabakası kemik dokunun en dış kısmında yer alan kalsifiye ve metabolik aktivitesi düşük olan bir yapıdır. Kompakt kemik olarak da adlandırılan bu kısım insan vücudunda tüm iskelet kütlelerinin %80'ini oluşturmaktadır. Kortikal tabaka kemiğe mekanik destek sağlar ve lameller kemik formunda ince kollajen fibrillerden oluşmuştur. Kemiğin metabolik faaliyetleri daha merkezde yer alan trabeküler ya da spongiyoz kemik dokusunda olmaktadır. Kortikal kemik diğer kemik türlerine göre daha serttir, torsiyon ve bükülmeye karşı daha dayanıklıdır. Vaskülaritesi azdır ve kemik

metabolizması hızı düşüktür. Kortikal kemikte havers kanalları (osteon) vardır, bu kanallar kemik uzun eksenine paralel yerleşimlidir. havers kanalları transvers olarak birbirine bağlanmaktadır bu yolaklara ise volkman kanalları denilmektedir. Bu sistemde kanalların içinde vasküler yapılar, sinirler ve lenf damarları bulunur. Havers kanalı etrafında osteoblastlar çoğunluktadır.^{70,74,75}

Trabeküler kemik aynı zamanda spongiyoz kemik olarak da adlandırılır. İskeletin %20'sini oluşturur, daha az kalsifiedir ve metabolik aktivitesi daha yüksektir. Spongiyoz kemikte makroskopik olarak gözlenebilen, trabekül adı verilen boşluklar ve bunları birbirine bağlayan septumlar vardır. Spongiyoz kemik dokusunda havers sistemi bulunmaz. Karmaşık yapıda fibrilleri, gevşek yapılı makriksi ve bu matris içinde kan damarları ve kemik iliği bulunmaktadır. Kortikal kemiğe göre daha elastiktir ve daha hızlı kemik döngüsüne sahiptir.^{70,74}

Ağsı kemik embriyodaki kemik dokusudur ve lamel içermez. Kırık iyileşmesinde sırasında kallus formasyonunda da ağsı kemik yapısı görülür. Yapısında organize olmayan kollajen lifleri ve düzensiz dağılımlı mineralizasyon alanları vardır. Kemiğin yeniden şekillenmesi esnasında kortikal ya da trabeküler kemik ile yer değiştirir.^{9,28,70,74,76}

2.5. Kemik Dokuda Yara İyileşmesi

Kemik iyileşmesi dokunun orjinal yapısını ve fonksiyonunu tekrar kazandırmak için süregelen basamakları içermektedir. Kemik dokunun iyileşmesinde de yumuşak doku yaralanmasında görülen evreler yer almaktadır. Yumuşak dokuda iyileşme skar formasyonu olurken kemik dokuda skar oluşumu olmayıp direkt kemik dokuyla iyileşme gözlenir. Kemik iyileşmesi de üç basamakta gerçekleşmektedir. Bunlar; enflamatuvar, proliferatif ve matürasyon (remodeling) safhalarıdır.^{9,28,74,77,78}

2.5.1. Enflamatuar Evre

Kemik dokuda meydana gelen yaralanmayla birlikte kan, lenf ve doku sıvıları bölgede trombosit agregasyonunu sağlar ve hemostatik tıkaçla birlikte hematoma oluşturur. Yara bölgesinde oluşan hematoma defekt iyileşmesi için gerekli birçok faktörün depo özelliğini taşır. Hematom komşu yumuşak dokuların arasını doldurarak travma bölgesinde az da olsa mekanik bir stabilite sağlar ve bölgeye prekürsör hücrelerin gelmesini sağlar. Deneysel olarak hematoma organize olduktan sonra çıkarıldığında osteojenik uyarının büyük bir kısmının yok olduğu öne sürülmüştür. Hematom içerisindeki trombositlerden ve zarar görmüş kemik ve yumuşak dokulardan salgılanan enflamatuar mediatörler kan damarlarının vazodilatasyonuna, plazmanın hücre dışına çıkmasına ve travma bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşumuna neden olurlar. Enflamatuar evrede nötrofil hücreleri başrolde dir. Kırık bölgesindeki hematoma 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur ve mevcut enflamasyon pik seviyeye ulaşır ve doku yaralanmasını takiben 1 hafta içinde sona erer. Nötrofillerin bölgeye göçü yaralanmanın 3. veya 4. gününde en yüksek seviyededir. Esas görevleri fagositoz yapmak, debris ve hasarlı dokuyu yok etmektir. 5. günde dolaşımdaki monositlerden farklılaşan makrofajlar baskın hale gelir ve reperatif süreç boyunca ortamda bulunmaya devam ederler. Makrofajlar enflamatuar debris fagositoz yoluyla ve hidrolitik enzimler salarak uzaklaştırırlar. Enflamatuar hücrelerden salgılanan IL-1, IL-6, TGF β ve PDGF'ler hücre göçü, proliferasyonu ve mezenşimal kök hücre farklılaşmasında görev alırlar. Enflamasyonda görev alan hücreler (makrofajlar, monositler, lenfositler ve polimorfonükleer hücreler) ve fibroblastlar, prostoglandin etkileşimi ile kemiğe infiltre olurlar ve anjiogenezden sorumlu sitokinleri salgılar. Bu aşamada son evresinde defekt bölgesinde granülasyon dokusu oluşumu, vasküler doku ve mezenşimal hücre göçü başlar. Enflamatuar cevap azalırken nekrotik doku ve eksüda rezorbe olur.^{74,77,78}

2.5.2. Proliferatif Evre

Proliferasyon kemik dokuda yaralanmadan hemen sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7-12 gün sürer. Kemik dokuda yaralanmayı takiben 3. günde defekt alanında yoğun mezenşimal hücre mevcudiyeti gözlenmektedir. Bu evrede fibroblastlar, vasküler göçe yardım ederek çevre dokulardan bölgeye mikrovasküler büyüme gerçekleşir. Lokal mezenşimal hücreler fibroblast, osteoblastlara farklılaşır kollajen, GAG, glikoprotein ve glikolipid içeren bir ECM oluştururlar. Hücrel farklılaşma, çoğalma ve aktivasyon sonucu sonradan remodele olacak kollajen bir matriks üretilir Böylece kollajen ve zengin kapiller kaynağa sahip granülasyon dokusu oluşur. Vasküler göç arttıkça, ilk 4-6 haftalık süre içinde osteoidlerin oluşumunu takiben defekt alanında yumuşak kallus meydana gelir. İlk oluşan kemik örgü kemiktir ve iyileşmenin 4.-6. haftasına kadar baskın halde gözlenir.^{74,77,78}

2.5.3. Matürasyon ve Remodeling Evresi

Kemik iyileşmesinin en uzun süren evresidir ve yıllar boyu devam edebilir. Kemiğin metabolik yapısının korunması ve biyomekanik olarak güçlenmesini sağlar. Defekt alanında kallus oluşumundan sonra başlayan osteogenez süreci, osteoblastik hücrelerin çoğalması, yenilenmesi ve farklılaşmasıyla devam eder. Farklılaşan osteoblastlar matriksin mineralizasyonunda görev alırlar. Oluşan yeni kemik dokusu osteoblast ve osteoklastların karşılıklı yapım ve yıkımlarıyla farklılaşmaya ve şekillenmeye başlar. Böylelikle hücreden zengin ve organize olmayan örgü kemik zamanla organize olan lameller kemiğe dönüşür.^{74,77,78}

2.6. Bitki Ekstraktlarının Sağlık Alanında Kullanımı

Bitkiler yıllardan beri çay, baharat ve tedavi amaçlı olarak tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sıklıkla kullanılmaktadır. Ülkemizin coğrafi olarak Avrupa ile Asya

arasında köprü olması, üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, pek çok cins ve seksiyonun orjin ve farklılaşım merkezlerinin Anadolu oluşu, ekolojik farklılaşma ile ilgili olarak tür endemizminin yüksek oluşu mevcut olan bitkisel floranın zenginliğini açıklamaktadır. Ülkemizde 9000'e yakın farklı doğal bitki türü bulunmaktadır; ancak, bu bitki zenginliğinden yeterince fayda sağlanılamamaktadır.⁷⁹

Bitkiler; endüstride koku ve temizlik malzemesi, gıdalarda koruyucu madde, gıda kaynaklı hastalık ve zehirlenmelerde antidot, kozmetik sektörde koku ve baharat olarak kullanılmış olup; çeşitli hastalıkların ve enteritlerin tedavisinde ise tıbbi amaçlı olarak kullanılmıştır. 'Fito-' bitki, 'terapi' tedavi demektir. Hastalıklardan korunmak amacı ile bitkilerle yapılan tedavi olarak da tanımlanabilir. Bitkilerin çeşitli yöntemlerle ayrıştırma işlemleriyle elde edilen, ilaç hammaddesi olarak da kullanılan bitki özlerine ekstrakt denilmektedir. Ekstraktların kimyasal bileşenleri sebebiyle farklı biyolojik etkileri mevcuttur ve çeşitli farmasötik formlar (tablet, kapsül, tentür vb.) halinde kullanılmaktadır. Etkileri, etken maddelerine göre değişmekle birlikte pek çok bitki ekstraktının antimikrobiyal, antihelmintik, koloretik, karminatif, antispazmodik, sedatif, diüretik ve antimitojenik özellikleri bulunmaktadır. Antibakteriyel, antifungal, antienflamatuar etkilerinden dolayı oral bölge yara iyileşmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.⁷⁹⁻⁸¹

Yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği öne sürülen hipotezlerden biri bakteri varlığı olup, bu durumun önüne geçmek amacı ile farklı antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak; antibiyotiklerin fazla miktarda kullanımı supraenfeksiyonlara neden olabilir. Fungal enfeksiyonlar ve dirençli patojenler gelişebilir. Bu büyük sağlık probleminden dolayı, ilaçlara alternatif olarak yeni tedavi yöntemlerinin bulunması amacı ile çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Tıbbi bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda esansiyel yağlar ya da bitki ekstraktları yeni antimikrobiyal ajanlar olarak önerilmektedir.⁷⁹ Çalışmalar

bitki ekstraktlarının etkinliği üzerine odaklanmış; ancak, yaptığımız araştırmalara göre bu ekstraktların oral cerrahi işlemlerdeki yumuşak doku ve kemik doku üzerindeki etkilerini birlikte inceleyen çalışmaya rastlanılmamıştır.

2.6.1. Çalışmada Kullanılan Bitkiler

2.6.1.1. Equisetum Arvense

Equisetaceae familyasına bağlı bir cins olan Equisetum cinsinin dünyada 25, ülkemizde 7 türü bulunmaktadır. “Atkuyruğu” olarak da bilinen EA, bir metre derinliğe kadar inebilen rizom kökleri olan ve yaklaşık 10 mm uzunluğuunda ve 4 mm çapında bir ana gövdeye sahip olan pteridofit bir bitkidir. Çok yıllık, otsu ve çiçeksiz bitkilerdir. Yaprakları çok küçük, pul biçiminde ve sivri uçludur. Kök sapı kırmızı kahverengi ve siyah renk karışımındadır. Gövdesi, silindir biçiminde, siyah-yeşil renkli, sert ve içi boştur. Dikey olarak gelişen ve boğumlu olan gövde sapı 20-60 cm uzunluğa ulaşabilir. Bu boğumlardan çok sayıda yaprak çıkar ve silisyum kristalleri ile kaplıdır. Spor ile çoğalır. Spor keseleri verimli gövdelerinin uçlarında başak şeklinde toplanmıştır. Özellikle Avrupa, Kuzey ve Orta Amerika’da, çoğunlukla kuzey yarımkürede yaygın olarak bulunur. Sıcak ve nemli hava koşullarında yetişir. Türkiye’de atkuyruğu otu, zemberekotu, amotu, kırkboğum, tilkikuyruğu otu ve katırkuyruğu otu olarak da tanınan EA nemli topraklardan, tarla aralarından ve dere kıyılarından toplanır. EA sulu bölgelerde yetiştiğinden Rize’de oldukça yaygın dağılım gösteren bir bitkidir. Toplanacak olgunluğa ulaşan bitkiler, 25-60 cm boyunda ve sapı ince (3-6 mm civarında) olan türlerdir. Çalılık, fundalık alanlarda süpürge otu ve oban zm gibi bitkilerin altına saklanarak byrlr. Bitki doğrudan güneşte yaşayamaz, çalı ve ağaç altlarında orman içinde yaşar. Türkiye’de 7 farklı türü yetişmektedir. EA’nın varsayılan tıbbi özellikleri eski Yunanlılar ve Romalılardan beri yaraları tedavi etmek için kullanılmıştır. Ayrıca; artrit, böbrek

hastalıkları, kanamalı ülserler, hepatit, sarılık ve tüberküloz için halk arasında sıklıkla kullanılmıştır. Avrupa ilaç sektöründe de birçok alanda bu bitkinin farklı türleri bulunmaktadır.^{72,82,83}



Şekil 1. Equisetum Arvense

EA'nın sulu ve etanollü ekstraktlarının *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Candida* türleri üzerinde antimikrobiyal özellikleri olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bu bitkinin sulu ve metanollü ekstraktının süperoksit anyonlarına ve hidroksil radikallerine karşı yüksek antioksidan aktivite gösterdiği, ancak kökünün antioksidan etki bakımından oldukça yetersiz kaldığı tespit edilmiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada EA'nın kreatin seviyesini düşürdüğü ve antidiyabetik özelliğinin olduğunu ortaya konulmuştur. EA'nın ayrıca antiinflamatuvar, antinosiseptif, antiseptik, hepatoprotektif, diüretik ve vazodilatör etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. EA'nın kanama durdurucu etkisi de vardır.^{18,83-91}

EA'nın kemik metabolizmasını etkilediği, osteoid dokunun iyileşmesine yardımcı olduğu ve osteoporoz, romatoid artrit gibi bazı kemik hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı gözlenmiştir. EA'nın bu özelliğinin yüksek silika içeriği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. EA bu elementin bilinen en yüksek konsantrasyonunu içerir. Böylelikle, sadece kemik enfeksiyonlarının ve bazı kemik metabolik hastalıklarının tedavisinde değil, aynı zamanda kemik rejenerasyon yöntemlerinde de potansiyel bir araç haline gelmektedir. Ayrıca EA'nın dermis ve epidermin yeniden şekillendirilmesinde, damarlanmasında ve granülasyon dokusu kalınlığında da önemli katkılarının olduğu tespit edilmiştir.^{72,83}

EA'nın kimyasal içeriğinde alüminyum, demir, kalsiyum fosfat, kalsiyum karbonat, mangan, potasyum sülfat, potasyum klorid 3-methoxypyridin, malik asit, oksalik asit ve nadir bulunan dikarbolik asit (equisetol asit) vardır. EA ayrıca saponin, %60-70 silisilik asit (silika), kafeik asit, stilipironlar, timol, hexahidrofarnesil, transfitol, cis-granil aseton, izokersitrin, kersetin-glikozit, steroller (β -sitosterol, campasterol, isofucosterol) ve alkaloidler (nikotin, equisetin, quercetin, luteolin, apigenin, palustrin, paludtridin, izoflavon, flavonol) içerir. EA bitkisinin C ve E vitamini bakımından zengin olduğunu ve yüksek seviyelerde Cu ve Zn elementi içerdiğini saptanmıştır.^{82,83,92-94}

EA'nın kemik hücre aktivitesinin modülasyonu üzerindeki etkilerine işaret eden veriler olmasına rağmen, bu konuda yeterli çalışmalar mevcut değildir. İnsan kemik iliği hücre kültürü üzerinde yapılan bir çalışmada, EA'nın hidrometanolik ekstraktının, hücre canlılığı/proliferasyonunu, bazı osteoblastik biyo-belirteçlerin gen ekspresyonunu ve alkalin fosfataz (ALP) aktivitesini uyarma kabiliyetine sahip olduğu ortaya çıkmıştır. EA içeriğindeki silisik asit beyaz kan hücrelerinin artışı teşvik eder. Silika kalsiyum emilimini artırdığından vücutta daha fazla kalsiyum stoklanmasını sağlayarak daha güçlü iskelet ve tendon oluşumuna sebep olduğu söylenmektedir.^{18,72,83}

2.6.1.2. Nigella Sativa

“Siyah tohum”, “siyah kimyon”, “shonaiz”, “kalajira” ve “çörek otu” gibi dünyada değişik isimlerle tanımlanan NS, Ranunculaceae ailesinden olup çiçekli yıllık yetişen bir dikotiledondur. NS bölünmüş yapraklar ile 20-90 cm’ye yükselebilir. Çiçekleri belirgin ve beyaz, sarı, pembe, soluk mavi veya soluk mor renktedir. Bitkinin meyvesi, çok sayıda tohumla 3–7 birleşik folikülle doldurulmuş büyük bir kapsüldür. Tohumlar keskin, küçük boyutlu (1–5 mg), koyu gri veya siyah renktedir. Biraz acı bir tadı vardır. 2000 yıldan fazla bir süredir Asya, Orta Doğu, Afrika ve Uzak Doğu ülkelerinde doğal ilaç olarak kullanılmış bir bitkidir. NS Güney Avrupa, Suriye, Türkiye, Suudi Arabistan, Pakistan ve Hindistan’da yetişmektedir. Bitkisel ilaçlarda, NS’nin yağı ve tohumları dislipidemi, ishal ve astım gibi hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır.⁹⁵

NS bitki ekstraktları birçok farmakolojik etki göstermektedir. Antimikrobiyal, antibakteriyel, analjezik, antipiretik, antifungal, antiviral, antiparazitik, antidiyabetik, antiastmatik, antienflamatuar, antialerjik, antitümoral, antidiyabetik, antioksidan, antitusif, antikonvülsan, antiobezitik, kardiyoprotektif, nefroprotektif, hepatoprotektif, gastroprotektif ve pnömoprotektif etkiler, süt üretiminin uyarılması ve hücrel metabolizmanın düzenlenmesi gibi birçok etkisinin olduğu gösterilmiştir.⁹⁵



Şekil 2. Nigella Sativa

Geleneksel olarak, NS tohumu ve yağı lokal anestezi, sarılık, deri hastalıkları, anoreksi, dispepsi, abdominal rahatsızlıklar, amenore, böbrek ve karaciğer hastalıkları için, dolaşım ve bağışıklık sistemi desteği de dahil olmak üzere çeşitli amaçlarla kullanılır. Serbest O₂ radikalleri hücre membranındaki geçirgenliği bozarak nükleik asit, protein ve enzimler üzerinde hasara neden olur. NS'nin bir veya daha fazla bileşeninin potansiyel özelliklerinden biri de yukarıda bahsedildiği gibi antioksidan faaliyetlerinden dolayı toksisiteyi azaltmasıdır. Yapılan çoğu invitro ve invivo çalışma, NS'nin farklı antitoksik özelliklerini belirlemek için yapılmıştır. Çalışmalarda NS'nin hücrelere toksik etkisinin olmadığı da belirlenmiştir. NS patojenik *Candida albicans*'a karşı olduğu kadar *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi pek çok bakteri suşuna karşı antibakteriyel etki göstermiştir. En son incelenen literatürde NS'nin yağı ve onun aktif maddelerinin değişik immünomodülatör ve immünoterapötik etkilerinden söz edilmekte ve tartışılmaktadır. Bu etki çeşitliliği NS'nin içeriğinde bulunan aktif bileşenlerden kaynaklanmaktadır.⁹⁵⁻⁹⁷

NS'nin kimyasal içeriğinde; %34 karbonhidrat, %32–40 yağ (%0.4 uçucu yağ), %16-19 temel aminoasit içeren proteinler, A, B, C gibi vitaminler, kalsiyum, potasyum, selenyum, fosfor, demir, sodyum, bakır, çinko, Mg, Ca, Mn gibi mineraller ve %6 oranında su bulunmaktadır. NS'de yaklaşık 32 aktif bileşik tanımlanmıştır. Bunlar; timokinon (TQ), timohidrokinon, p-cymene, karvakrol, 4-terpineol, tanethol, a-pinene, nigellisin, nigellimine-n-oksit, nigellidine ve hedrin (triterpen)'dir. NS'nin sabit yağı %32-40 oranında doymamış yağ asitleri içerir. Uçucu yağı ise %0.4 – 0.45 oranında doymuş yağ asitleri içerir. Farmakolojik etkilerden daha çok sabit ve uçucu yağı sorumlu olduğundan çalışmalar bu iki etken madde üzerinde yoğunlaşmıştır. Tohumlarda bulunan sabit yağın özellikle çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengin olmasının birçok farmakolojik etkilerinin olmasını sağladığı öne sürülmektedir. NS'nin biyoaktif bileşenleri ve onların miktarları yetiştiği coğrafik koşullara, depolama koşullarına ve ekstraksiyon yöntemine bağlıdır. Örneğin, İran kökenli bir NS esansiyel yağı %33p-cymene ve %26.8 timol içeren fenilpropanoidden oluştuğu, Fas kökenli NS esansiyel yağı için monoterpenlerin üstünlüğü bildirilmiştir.^{95,97-100}

TQ, NS'den elde edilen uçucu yağın ana bileşenidir, çeşitli serbest radikal oluşturucu maddeler tarafından uyarılan oksidatif hasara karşı önemli bir koruyucu etkiye sahiptir. TQ'nun NS'nin pozitif farmakolojik etki mekanizmasında, en etkili bileşenlerinden biri olduğu saptanmıştır. Fakat bu etkilerin oluşmasında NS'de bulunan diğer bileşiklerin sinerjik etkileri de vardır ve tüm bileşenlerin kombinasyonu NS'nin farmakolojik aktiviteleri için gereklidir. NS ekstraktı ve içeriğindeki TQ partikülleri çeşitli yaralarda makrofaj hücre sisteminin gelişimini artırarak antitoksik etki de göstermektedir. Ayrıca; TQ'nun akut toksisitesinin düşük olduğu (LD₅₀ 2.4 g/kg) saptanmıştır. TQ'nun sürekli verilmesi sonucunda görülen tek yan etkisinin hipoglisemi olduğu gözlenmiştir.^{95,96,100}

Kemik dokusu Ca, Cu, P, Fe, Zn, Mg, Ma, Mn, Se, Sr gibi eser elementler içerir ve bu elementler kemik metabolizması ve kemik mineralizasyonunda kilit rollere sahiptir. NS ekstraktının kemik iliğinde bağışıklık sistemi ile ilgili hücrelerin sayılarında artışa neden olduğu, ayrıca myelopoezisi uyardığı gösterilmiştir. NS ekstraktının sistemik uygulaması, greft ile dolu bir kemik defektinde kemik rejenerasyonunu artırabildiğinden, kemik defektlerinin onarımında ve rekonstrüksiyonunda önemli bir ilgi alanı haline gelmiştir.^{95,97}

2.6.2. Bitki Ekstraktlarının Elde Edilme Yöntemleri

Bitkilerdeki biyoaktif moleküllerin ortaya çıkarılması, onların kullanılabilmesi için ekstraksiyon denilen özüt çıkarma işlemine ihtiyaç duyulmuştur. En sık kullanılan ekstraksiyon yöntemleri şunlardır.¹⁰¹

2.6.2.1. Soxhlet Ekstraksiyon Yöntemi

Soxhlet ekstraksiyon yöntemi, ekstraksiyon sonucu ve kalitesinin seçilen çözücüye bağlı olduğu bir ekstrakt elde etme tekniğidir. Özel bir düzenek ile gerçekleştirilen soxhlet ekstraksiyon yöntemi, katı veya yarı katı numuneler için uygundur. Yöntem 1879 yılında Franz von Soxhlet tarafından bulunmuştur. Soxhlet ekstraksiyon yöntemi, esas olarak organik bileşiklerin katı örneklerinin çevresel analizlerinde, gıda analizlerinde ve fitoterapi analizlerinde kullanılan bir yöntemdir.^{101,102}

Ekstrakte edilmek istenen katı örnek, kartuş olarak adlandırılan örnek bölmesine konulur. Düzenegin alt bölümündeki balon jöjeye çözücü (solvent) doldurulur. Yoğunlaşmanın etkisiyle ısıtılan çözücünden çıkan buharlar, kondansatöre doğru ilerler ve yoğunlaşır. Yoğunlaşmanın sayesinde örneğin üzerine damlayarak katı veya yarı katı olan örneği ıslatır. Solvent seviyesi sifonun en üst noktasına ulaşınca tüm örnek bölmesi boşalarak solvent şişesine geri damlamaya başlar. Bu sayede sıcak solvent birkaç kere

örnek içerisinde devir daim yapmaktadır. Böylelikle solvent şişesinde, elde etmek istediğimiz ürün oluşmuş olur. Bu düzenekte solvent miktarı az olmamalıdır. En az 100-500 mL kadar büyük sayılabilecek hacimde solvent gereklidir. Ekstraksiyondan sonra filtreleme işlemine gerek duyulmaz. Bu yöntem basit, ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Karşılaşılan problemlerin çoğu düzeneğin iyi temizlenmemiş olmasından kaynaklıdır. Katı örneğin sürekli taze çözücüyle temas halinde olması etkileşimin tekrarlı olmasını sağlar. Bu sistemle ekstraksiyon zamanı 6 saat ile 24 saat arasında değişmektedir. Ekstraksiyon süresinin uzun olması, büyük hacimlerde çözücü gerektirmesi ve sıcakla bozulabilecek maddelerde çalışılmaması bu yöntemin dezavantajlarıdır.¹⁰¹⁻¹⁰³

2.6.2.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Yöntemi

Süperkritik akışkan, kendi kritik sıcaklığı üzerinde ısıtılan ve kendi kritik basıncı üzerinde basınç uygulanan karışıma verilen isimdir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu klasik çözücü ekstraksiyonunda kullanılan sıvı karışımlarının özelliklerinin geliştirilmesiyle elde edilen yöntemlerden biridir. Çözücü olarak sıklıkla CO₂ kullanılır. CO₂ 'nin toksik olmaması, alev almaması, çevre dostu olması, ucuz olması gibi avantajları vardır. Akışkan CO₂ ile katı matriks seçilen süperkritik şartlarda etkileşime girmektedir. Kullanılan çözücünün yüksek çözme yeteneğinin olması gerekmektedir.¹⁰¹⁻

104

Yöntemde; sıvı CO₂ pompa yardımıyla ile istenilen basınç değerine getirilir. Akışkan, ısıtıcıda istenilen sıcaklık değerine getirilir. Böylelikle kütle transferi süperkritik akışkanın adsorpsiyon ve difüzyonuyla süperkritik basınç ve sıcaklık değerlerine getirilmiş olur. Bu akışkan sıcaklığı sabit tutulan bir ekstraktöre gelir. Akışkanın fiziksel özelliği basınç ve sıcaklık değişimiyle sıvı veya gaz formuna

dönüştürülemez. Ekstrakte edilecek madde ile temas sonrasında, süperkritik CO₂'de çözünen karışım bir ayırıcıya alınır ve basınç düşürülür. Basıncın düşürülmesi ile çözme gücünü kaybeden akışkan üründen ayrılır. Elde edilen ürünler, ayırıcının altındaki bölümden toplanır Soğutucuda sıcaklık düşürülerek CO₂ gazının tekrar kazanımı yapılır.^{101,102,104,105}

Yöntemin hızlı olması (20-60 dakika), düşük solvent tüketimi (10-20 mL), ısısal olarak kararsız örnekler için uygun olması, sıcaklık, basınç ve modifikator değiştirilerek yüksek seçicilik sağlanması gibi avantajları vardır. Süperkritik akışkan ekstraksiyon yönteminin farmasötik kimya, polimer analizi, gıda analizi gibi geniş bir kullanım alanı vardır. Önemli bir nokta ise saflaştırma prosesi esnasında, yağın içerisindeki faydalı bileşikler de kaybolabilir. Endüstri sanayi, süperkritik tekniklerle daha çok ilgilenmektedir. Son yıllarda çok sayıda süperkritik akışkan ekstraksiyon yönteminin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır.¹⁰¹⁻¹⁰⁵

2.6.2.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi, özellikle bitki ekstraksiyonunda ve ekstraksiyonun analitik ölçümünde en gelişmiş yöntemlerden biridir. Mikrodalga, iyonize olmayan elektromanyetik dalgaların spektrumu içerisindeki infrared ve radyo frekansı arasında yer alır. Mikrodalgalar frekansı 300-300.000 MHz arasında değişen elektromanyetik dalgalarıdır. Doğal ürünlerde 2500-75.000 MHz'de ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Çözücünün içeriğine, bitkinin içeriğine ve elektromanyetik dalga gücüne bağlı olarak değişen enerji aralıkları vardır.^{102,106}

Mikrodalga ışıması, ekstraksiyon solventini ve örneği ısıtmak için kullanılır. Klasik yöntemler ısı iletimini temas ile sağlarken, bu yöntemde mikrodalgalar örneği moleküler düzeyde ısıtmaktadır. Mikrodalga destekli ekstraktörlerin açık ve kapalı olarak

2 türü vardır. Açık olan türde; atmosferik basınçta, kapalı türde; yüksek basınç ve sıcaklıkta çalışma yürütülür.^{101,102,107}

Bu ekstraksiyonda partikül boyutunun ve çözücü seçiminin büyük önemi vardır. Küçük boyutlu partiküllerin yüzey alanı fazla olduğundan, örnek ile çözücünün etkileşimi fazladır. Ekstraksiyonu sorunsuz bir şekilde gerçekleştirmek için solvent seçimi oldukça önemlidir. Çözücünün dielektrik sabitinin yüksek olması, mikrodalga enerjisini iyi absorplaması, solventin mikrodalga ışımasını absorplaması, solventin örnekle etkileşimi ve örneğin solventteki çözünürlüğü dikkat edilmesi gereken hususlardır. Polaritesi açısından uygun çözücüler etanol, su, metanoldür. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin, ürünün filtreden geçirilmesi, santrifüjlenmesi ve uçucu bileşiklerin kullanılmaması gibi dezavantajları vardır. Az miktarda çözücü kullanılması, hızlı, basit ve ucuz olması ise yöntemin avantajlarındandır.^{101,102,107}

2.6.2.4. Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

Ultrasonik ekstraksiyon olarak da adlandırılır. Bu ekstraksiyon yöntemi, 20 kHz üzerindeki frekanslarda ses dalgalarının titreşimleriyle çalışır. Sıvının içinden geçen bu titreşimler sıvının içinde boşluk oluşumu meydana getirir. Bu boşluğun oluşması ultrasonik enerji sayesinde olmaktadır. Bu sayede sıvı ortamda çok sayıda ufak kabarcıklar oluşur ve bu kabarcıklar katılardan partiküllerin kopmasını sağlar. Böylece çözücünün istenen ekstrakta difüzyonu kolaylaşır.^{101,108,109}

Hem katı hem sıvı örnek hazırlamada ultrasonik ekstraksiyon kullanılmaktadır. Katı örneklerin ekstraksiyonu, su banyosunda ultrasonik radyasyon uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir. Ultrason yapılan bitkinin hücre duvarının hasar görmesiyle doku içerisindeki solute dışarı çıkar. Böylece bitkiden çözücüye doğru gerçekleşen bu kütle

transferi ekstraksiyon süresini kısaltır. İşlem esnasında sıcaklık artışı olacağından, ürünün kalitesinin zarar görmemesi için sıcaklık devamlı olarak kontrol edilmelidir.^{101,103,108}

Numune ultrasonik su banyosuna yerleştirilmiş bir ekstraksiyon hücresi veya ultrasonik problu bir su banyosu içine konmaktadır. Bu sistem taze ekstraksiyon solventinin sürekli olarak örneğe pompalandığı, açık bir sistem veya ekstraktın seyrelmesini engelleyen ekstraksiyon solventinin yeniden dolaştığı kapalı bir sistem olarak kullanılabilir. Yöntemin avantajları; basit, ucuz, kısa süreli, ısıya duyarlı bileşiklerin ekstrakte edilebilir olması ve ekstraksiyon kinetiğinin hızlı olmasıdır. Düşük sıcaklıklarda da etkili bir performans göstermektedir.^{101,108,110}

2.6.2.5. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi

Basınç altında yürütülen bir ekstraksiyon yöntemidir. Yüksek basınçla çalışması yüksek sıcaklıktaki solventin sıvı formunu korur. Basınç, sıvı ile ekstraksiyon hücresindeki örneğin güçlü bir şekilde etkileşmesine olanak vermektedir. Bu ekstraksiyon tekniğinde 50-200°C sıcaklık ve 10-15 Mpa basınç aralıklarında gerçekleştirilir. Solvent daha yüksek sıcaklıklarda sıvı halde bulunabilir bu da ekstraksiyonu hızlandırır. Bu nedenle yüksek sıcaklık ve basınç ortamına dayanıklı aletler kullanılır. Son derece hızlı, fakat maliyetli bir yöntemdir.^{102,111,112}

Polar bileşiklerin kullanılabilmesi, az miktarda çözücü kullanımı ile ekstraksiyonun gerçekleştirilebilmesi, ekonomik ve çevresel çözücülerin bu teknikte kullanılabilmesi (CO₂, su gibi) yöntemin avantajlarıdır. Yüksek ısı gerektirdiğinden ısıya duyarlı örneklerde kullanılamaması dezavantajıdır. Yöntemin pestisitlerden gıdaya kadar geniş bir kullanım alanı vardır.^{102,111,112}

2.6.2.6. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

Homojenizatör, hem karıştırma hem de ekstrakte edebilen bir cihazdır. Şekilde yer alan homojenizatör cihazında katı örnek ve solvent yerleştirilerek belirli bir rpm hızına ayarlanır. Ekstraksiyon işleminin süresi ayarlanır. Bu yöntemde filtreleme işleminin ayrıca yapılması gerekir. Hızlı ve düşük maliyetli bir yöntemdir.¹¹³

2.7. Çalışmada Kullanılan Histolojik ve Biyokimyasal Biyo-belirteçler

2.7.1. Kemik Alkalen Fosfataz

Tüm dokuların hücre membranında bulunan ALP, fosfat esterini alkali ortamda yıkan bir enzimdir. Ancak görevi tam olarak bilinmemektedir. Çinko ve magnezyum bu enziminin fonksiyon görmesi için gereklidir. Kalsiyum ve fosfat ise ALP enzim aktivitesini inhibe etmektedir. Sağlıklı çocuklarda total serum ALP aktivitesinin %90'ı kemik doku kaynaklıdır. Sağlıklı yetişkinlerde ise total ALP seviyesinin yarısı kemik kaynaklı yarısı ise karaciğer, bağırsak, böbrek ve plasenta kaynaklıdır. Serum ALP düzeyleri kemik yapımının bir indeksi olarak kullanılmaktadır. ALP'nin kemik spesifik izoenzimi olan kemik alkalen fosfataz (BALP) ise osteoblast hücresinin membranına yerleşmiştir. Kemik dışında; karaciğer, salgılanmaktadır. Osteoblastik aktivite esnasında kana salındığından kemik doku yapımını gösteren en iyi belirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca kemikle ilgili birçok patolojide (kemik kırıkları, paget hastalığı, kemik metastazları) ALP değeri yüksek görülmektedir. Bu nedenle kemik patolojilerini değerlendirmede duyarlılığı düşüktür. BALP kemik dışı patolojilerden pek etkilenmemektedir ve bu yüzden BALP yüksekliği osteoblastik aktiviteyi göstermektedir ve kemik oluşumunu değerlendirmede iyi bir biyo-belirteçtir. ALP ve BALP kinetik metodlarla tayin edilir. Özgünlük ve kesinlik açısından en uygun yöntem *immünassay*'dir.¹¹⁴⁻¹²⁰

2.7.2. Kemik Sialoprotein

Osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir ve kemik doku organik matriksinin önemli bir bileşenidir. Sialoprotein; kemik, dentin, sement, kalsifiye kırık gibi mineralize dokularda bulunmaktadır. Kemik sialoprotein (BSP) fosforilasyon ve glikolizasyon yoluyla elde edilen non-kollajen anyonik bir hücre dışı matriks proteindir. Kemik dokuda ve sementte bulunan non-kollajen proteinlerin yaklaşık % 8'ini oluşturduğu öne sürülmüştür. Kemik dokusu ESM proteinleri arasında yer alan BSP iskelet gelişimi, kemik homeostazı ve kırık iyileşmesi sırasında görev alır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar BSP'nin kemik doku yapımı esnasında hidroksiapatit oluşumunu başlatabildiğini ve immatür kemiğin ekspresyonunu artırdığını göstermektedir. BSP'nin hidroksiapatit oluşumunu indüklediği, BSP ekspresyonunun patolojik durumlarda gözlenen mineralizasyon artışıyla da desteklenmektedir. BSP'nin mevcut biyokimyasal özellikleri kemik doku mineralizasyonunda hidroksiapatitin artmasında ve immatür kemiğin mineral yoğunluğunun artmasında rol oynar. BSP osteoblast farklılaşmasını doğrudan destekleyen matriks ilişkili sinyal proteini olarak işlev göstermektedir. Ayrıca, BSP meme kansinimleri dahil olmak üzere birçok patolojideki kemik doku mineralizasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Yeni oluşan osteoblastlarla birlikte, kemik oluşumunu teşvik eden hormon ve sitokinlerden salınan BSP geninin ekspresyonu artarken, kemik oluşumunu baskılayan faktörlerle azalır. Hidroksiapatit bağlayıcı poliglutamik asit sekansları BSP'nin normal ve metastatik hücrelerin kemik yüzeyine hedeflenmesi ve bağlanmasına aracılık edebileceği yönünde çalışmalar mevcuttur. Yüksek BSP ekspresyonu yeni kemik oluşumunun olduğu bölgelerde ve kırık onarımında olduğu gibi hızlı kemik oluşumu gözlenen durumlarda izlenmektedir. BSP immatür kemik ve sement gibi mineral ve fibrillerin nispeten bol olduğu bölgelerde lokalize olur. BSP'nin ekspresyonunun immatür kemik oluşumundan

sonra hızla azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle BSP hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda başlangıç hidroksiapatit kristallerinin oluşumunda görev almaktadır ancak; olgun kemik oluşumuna katılımı şu anda belirsizdir.^{119,121-124}

2.7.3. Osteokalsin

Osteokalsin gama karboksiglutamik asit (GLA) proteini olarak da bilinir. Kemik dokuda yoğun olarak bulunan nonkollajenaz bir proteindir. Osteoblast hücreleri tarafından sentezlenir. Karboksilasyonu için K vitamini ve sentezinde D vitamini kullanılır. Sentezin tamamlanmasından sonra osteokalsinin büyük bir kısmı kemik matriks dokusunda kalmaktadır. Kan dolaşımına katılan miktarı ise kemik yapımını yansıtmaktadır. Osteokalsinin görevi tam olarak bilinmemekle birlikte kemik dokuda hidroksiapatit kristalleri ve kalsiyumla bağlanarak kalsiyumu tutan ve mineral depolanmasında görev alan bir protein olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kemik dokunun remodelling evresinde önemli rol oynar. Osteogenezisin duyarlı ve özgün bir biyokimyasal belirteçidir. Serum ve plazma düzeylerinin ölçümü *immünassay* yöntemi ile yapılır. Serum örnekleri düşük ısılarda saklanmalıdır. Osteokalsin kan düzeylerinin tespiti metabolik hastalıkların tanısında; kalsitonin, vitamin D₃ ve kalsitriol tedavisinin etkinliğinin değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır. Osteokalsin düzeyi hiperparatiroidizm, hipertiroidizm ve kemik metastazı olan malignitelere yükselir. Osteokalsin düzeyinin düşüklüğü ise; myeloma hastalığı, glukokortikoid tedavisi gibi kemik yapımının azaldığı durumlarda görülür.^{119,120,125,126}

2.7.4. Tip I Çapraz Bağlı N-Telopeptit (NTX)

Kemiğin organik materyali, %90-95 oranında tip I kollajenden oluşur. Bağ dokusu ve diğer bazı dokular da tip I kollajen içerir. Kemik dokuda kollajenin miktarı ve döngü hızı daha fazladır. Kollajen fibrilleri birbirleriyle çapraz bağlarla bağlanarak yüksek

gerilme gücüne sahip kollajen liflerini oluşturur. Kollajen molekülünün amino terminal ve karboksil terminal uçlarında sarmal yapıda olmayan N-telopeptit ve C-telopeptit olarak adlandırılan bölgeler vardır. Bu bölgelerin her biri komşu molekülün helikal bölgesine çapraz bağlar ile bağlanmaktadır. Tip I çapraz bağlı N-telopeptit (NTX) kemik doku tip I kollajenin parçalanma ürünüdür. NTX içerdiği çapraz bağların özelliğinden dolayı kemik doku için daha yüksek özgünlük gösterir. Matür kemik doku kollajeninin osteoklastlar tarafından yıkımı esnasında salınır ve değişime uğramadan kemik yıkımının son ürünü olarak idrarla atılmaktadır. Bu nedenle NTX kemik rezorpsiyonunun ölçümünde spesifik ve stabil bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Serum NTX ve idrar NTX düzeyleri tip I kollajenin çapraz bağlanmış fragmanına karşı antikora dayanan immünoassaylerle ölçülür. NTX düzeyi; osteoporozis, paget, ileri derecede kemik tümörleri, akromegali hiperparatiroidizm ve hipertiroidizm gibi durumlarda artarken; hipoparatiroidizm, hipotiroidizm ve kortizon tedavisi görenlerde azalmaktadır.^{119,120,127,128}

2.7.5. Total Oksidan Kapasite

Oksidatif stres, hücrel metabolizma esnasında oluşan reaktif oksijen ve nitrojen metabolitlerini içeren serbest radikal artışı olarak tanımlanır. Serbest radikaller, kimyasal olarak aktif moleküller olup; hücre proteinleri, hücre membranları ve DNA'ya zarar verebilirler. Reaktif oksijen derivelerinin; endotelden vazodilatör moleküllerin üretimini azaltarak ve vazokonstriktör hormonların üretimini artırarak endotel hasarına sebep olduğu bilinmektedir. Total Oksidan Kapasite (TOS), tüm vücuttaki oksidatif stres düzeyini göstermektedir. Bu nedenden ötürü, oksidan radikallerin ayrı ayrı değerlendirilmesinden daha değerlidir. Total oksidan kapasite ölçümü; serum örneğindeki oksidanların, ferröz iyon-dianisidin kompleksini, ferrik iyon okside etmesi

prensibine dayanır. Gliserol molekülleri ile, oksidasyon reaksiyonunun şiddeti artırılır ve ferrik iyon asidik ortamda 'xylenol orange' ile renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülerek, mevcut serum örneğindeki total oksidan moleküllerin oranı belirlenir. Mevcut örnek, hidrojen peroksit ile katalizlenerek her litredeki mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri olarak belirlenir.¹²⁹⁻¹³²

2.7.6. Total Antioksidan Kapasite

Tüm canlılarda metabolizma sonucu oluşan veya dışarıdan alımı olan maddelerin oluşturduğu oksidatif stresin etkilerini nötralize etmek amaçlı bir antioksidan savunma sistemi vardır. Patolojik durumlar dışında oksidan ve antioksidan sistemler bir denge halindedir. Vücutta oluşan antioksidan sisteminin çalışması, taşınması ve dağıtılması için kan önemli rol oynamaktadır. Antioksidan sisteme büyük oranda plazmada bulunan antioksidan molekülleri katkıda bulunur. Önemli antioksidan savunma mekanizmalarına; A, C ve E vitaminleri, çeşitli enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz), koenzimler (folik asit, vitamin B₁, B₂, B₆ ve B₁₂), alfa-lipoik asit, karotenoidler, çeşitli mineraller (bakır, çinko, selenyum) ve koenzim-Q örnek verilebilir. Her bir antioksidanın farklı çalışma mekanizması vardır. Proteinler plazmanın ana antioksidan bileşenini oluşturmakta olup proteinlerin serbest sülfidril grupları onların antioksidan cevabından sorumludur. Albümin, ürik asit ve askorbik asit ise insan plazmasındaki total antioksidan durumun %85'inden fazlasını oluşturur. Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı serbest radikallere karşı antioksidan moleküllerin sinerjistik etkisinin çok daha kuvvetli koruma sağladığı bilinmektedir. Oksidatif stres mevcudiyetinde, vücuttaki oksidan-antioksidan denge oksidan tarafa kaymaktadır. Sağlıklı bireylerde güçlü serbest radikal reaksiyonlarına karşı serum total antioksidan kapasitenin (TAS) %49'unu oluşturduğu bulunmuştur. Antioksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçümü yapılabilmekle beraber antioksidan

moleküllerin bir arada sinerjistik etki gösterdiği bilinmektedir. Son çalışmalar TAS ölçümünün yapılması daha değerli olduğunu savunmaktadır. TAS ölçümü spektrofotometrik olarak yapılmaktadır.^{129,130,133,134}

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Malzemeler

Bu çalışmada kemik defektlerinin iyileşmesini incelemek amacıyla; EA'nın jel kıvamında, NS'nin ise yağ formunda ekstraktları kullanılmıştır. Ratların mandibulasında dişsiz bölge olarak bulunan mental foramen hizasında 0.6 mm çapındaki paslanmaz çelik rond frezle (Operative carbide Burs, Diameter 0.6 mm, Dentsply) 0.108 mm^3 (yaklaşık 0.2 mm^3) hacminde kemik dokusu defektleri oluşturulmuştur. Defektler korteks ve medulla tabakalarını içine almaktadır. EA ve NS ekstraktları jelatin süngere (Spongostan®) emdirilerek oluşturulan kavitelere uygulanmıştır. İstatistiksel olarak anlamsız olabilmesi için kontrol grubu da dahil tüm defektlere spongostan yerleştirilmiştir. Defektlerin oluşturulması sonrasında 3/0 polyglactin (Vicryl, Ethicon Inc., Cincinnati, OH, USA) suture ile bölge kapatılmıştır.

3.2. Doğal ekstraktların eldesi

Ordu Üniversitesi Teknik Bilimler Yüksekokulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Aktardan alınan kurutulmuş EA bitkisinin saplı yaprakları un haline gelene kadar öğütülmüştür. Öğütülen örnek, kaba süzgeç kâğıdı üzerine (Whatman No1) 5-10 gram tartılarak ve süzgeç kâğıdı da katlanarak kartuşa alınmış, numunenin çözügen ile kartuş dışına taşmaması için üzeri yağsız pamukla kapatılmıştır. Kartuş ekstraktöre (Velp Scientifica™ Solvent Ekstraktörü SER 148 Serisi) yerleştirilmiştir. Çözügen olarak Dietil Eter (etanol/MERCK) kullanılmıştır. Cihazda yapılan programlama neticesinde 110°C ocak sıcaklığında, 5 dakika daldırma (immersion) 40 dakika sifon (washing) ve 5 dakika çözücü geri kazanım (recovery) işlemleri sırasıyla uygulanmıştır. Son olarak kalan çözücü uzaklaştırmak için 105°C 'de

1.5 saat etüvde bekletilmiştir. Elde edilen ekstrakt uygulama zamanına kadar cam petri içinde +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.3. Deneş Hayvanlarının Temini

Bu araştırmada Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Deneş Hayvanları Uygulama Merkezi Etik Kurulu’ndan (2016/35) onay alınmıştır. Çalışma aynı merkezden temin edilen ortalama 275-350 gram ağırlığında 96 adet 11 aylık erişkin erkek Sprague-Dawley cinsi rat üzerinden yürütülmüştür. Aynı merkezde; hayvanlar sekizerli gruplar halinde ayrı ayrı kafeslere konularak, araştırma boyunca standart koşullar altında (oda sıcaklığı 20±1°C, nem %50±10, 12/12 aydınlık karanlık periyodunda, yem ve su kısıtlaması yapılmaksızın) günlük bakıma alınmıştır. Deneş hayvanlarından rastgele bir seçimle gruplar oluşturulmuştur.

3.4. Çalışma Modeli ve Cerrahi Protokol

Bu çalışmada iki farklı bitki ekstraktı kullanılmıştır (EA ve NS). Bitki ekstraktlarının yumuşak doku ve kemik dokusu üzerinde yarattığı iyileşme farklarının kontrol edilebilmesi için 4 ana grup (84 adet rat) oluşturulmuştur. Gruplar; kontrol grubu (21 adet rat), NS ekstraktı uygulanacak grup (21 adet rat), EA ekstraktı uygulanacak grup (21 adet rat) ve bu bitki ekstraktlarının karışımının uygulanacağı grup (21 adet rat) olarak tasarlanmıştır. Bu ana grupların herbiri 1., 3. ve 5. hafta sakrifiye edilmek üzere 3 alt gruba ayrılmıştır. Alt gruplar 1. ve 3. hafta yumuşak doku ve kemik doku yara iyileşmesini; 5. hafta ise kemik dokusu yara iyileşmesini histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirebilmek için oluşturulmuştur. Çalışma sonunda kullanılacak olan istatistiksel yöntemin anlamlı sonuçlar vermesi adına her grupta en az 7 adet deneş hayvanı olması planlanmıştır. Çalışma süresince çeşitli gruplardan 5 adet rat kaybedilmiştir.

Tüm ratlara 50 mg/kg dozunda (i.p) ketamin hidroklorür (Ketalar ®, Eczacıbaşı Parke-Davis, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg dozunda (i.p) Xylazine HCl (Alfazyne ®, Alfasan International B.V. Woerden, Hollanda) ile sedo-analjezi uygulanmıştır. Rektal ısıları anestezi altındayken düzenli olarak ölçülerek, vücut ısılarını yaklaşık 35°C’de tutan sıcak battaniye üzerine yerleştirilmiştir. Anestezi yeterli derinliğe ulaşıncaya, her ratın çene bölgesi povidon iyot çözeltisi ile silinerek aseptik koşullar sağlanılmaya çalışılmıştır. Standart pozisyona getirilen ratlarda deneysel olarak planlanan cerrahi alana ulaşmak için ağız içinden yaklaşık 1 cm uzunluğunda horizontal periosteal insizyon yapılmıştır. Küçük künt bir periost elevatörü kullanılarak mukoperiosteal flep kaldırılmıştır. Mandibulaya ulaşıldığında foramen mentalenin anteriorunda kalacak şekilde serum fizyolojik irrigasyonu altında tur motoru piyasemenine takılı 0.6 mm çapındaki paslanmaz çelik rond cerrahi frezle (Code 389202, Dentsply) 0.2 mm³ hacminde sert doku içeren, korteks ve medulla tabakalarını içine alan kemik defektleri oluşturulmuştur. Ratların deneysel olarak oluşturulmuş yara bölgesine rastgele seçimle; EA ekstraktı, NS ekstraktı ve EA+NS ekstrakt kombinesi konulmuştur. Kontrol grubunda sadece yara dokusu oluşturulmuş herhangi bir ekstrakt yerleştirilmemiştir. Ekstrakt taşıyıcısı olarak uygulanan Spongostan®’ın istatistiksel olarak anlamsız sonuç verebilmesi için kontrol grubunda da boş kaviteye yerleştirilmiştir. Bu işlemler tamamlandıktan sonra oral mukoza 3/0 polyglactin (Vicryl, Ethicon Inc., Cincinnati, OH, USA) suturela primer kapatılmıştır.

Ratlar deney süresinin 1., 3. ve 5. haftası sonunda 50 mg/kg dozunda ketamin HCl ve 3 mg/kg dozunda xylazin HCl enjeksiyonu ile yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilmiştir. Doku oluşumundaki histolojik ve biyokimyasal değişimleri değerlendirmek amacıyla gruplar 1., 3. ve 5. haftalarda sakrifikasyon yapılmıştır.

3.5. Histopatolojik Analiz Prosedürü

İşlem yapılan mandibula üzerinde bir miktar yumuşak doku içerecek şekilde çıkarılan kemik dokusuna ait materyaller %10'luk formalin ile 36 saat boyunca fikse edilmiştir (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ardından Morse's solüsyonunda 36 saat boyunca dekalsifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bir sonraki aşamada mandibula dokusuna ait örnekleri artan etil alkol serileri (Merck, Darmstadt, Germany) ve ksilol (Merck, Darmstadt, Germany) işlemlerinin uygulamasından sonra sert ve yumuşak parafinde (Merck, Darmstadt, Germany) bekletildikten sonra sert parafin ile bloklanmıştır. Elde edilen kesitlerden mikrotom (Leica, RM2125RT, Germany) kullanılarak 3-5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Elde edilen kesitlere Harris hematoksilin (Merck, Darmstadt, Germany) ve Eosin Eosin G (Merck, Darmstadt, Germany) boyaları uygulanmıştır. Preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) incelenerek bulgulara ait fotoğraflar Olympus DP72 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) fotoğraf makinası ile çekilmiştir.

3.6. İmmunohistokimyasal (İHC) Analiz Prosedürü

Çalışmada kemik rejenerasyon biyo-belirteçleri olan alkalen fosfataz (rabbit polyclonal, ab108337, Abcam, İngiltere) ve kemik sialoprotein (Rabbit Polyclonal, Ab125227, Abcam, İngiltere) primer antikorlarını içeren antikorlar kullanılmıştır. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT, Germany) ile kesilen 2-3µm'lik kesitler pozitif sarı lamlar (Patolab, China) üzerine alınmıştır. Bir sonraki aşamada kesitler 10 dakika boyunca %3'lük H₂O₂ solüsyonun ardından 15 dakika boyunca sekonder blocking solüsyonunda inkübe edilmiştir. Kesitler endojen peroksidaz işlemi ardından primer antikor solüsyonlarında 60 dakika ve ardından sekonder antikor solüsyonunda (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), ab205718, Abcam, İngiltere) 10 dakika boyunca inkübe

edilmiştir. Son olarak görüntüleme için diaminobenzidine (DAB) chromogen solüsyonunda inkübe edildikten sonra dokular Harris hematoksilin (Merck, Darmstadt, Almanya) ile boyanmıştır.

3.7. Semi-Kantitatif Analiz

Mandibula dokusuna ait preparatlarda gözlenen histopatolojik değişiklikler Durmuş ve arkadaşlarının mandibula kemiği üzerine yaptığı histopatolojik kemik iyileşmesi skorlama (HKİS) metoduna göre Tablo 1.'de gösterildiği gibi skorlanmıştır.¹³⁵ Histopatolojik kemik iyileşme skorlama metodunda her bir preparatta rastgele ve çakışma olmayacak biçimde belirlenmiş sekiz farklı alan iki bağımsız histopatolog tarafından çift kör bir şekilde yapılmıştır.

Alkalen fosfataz ve kemik sialoprotein pozitivitesi gösteren kemik dokularının değerlendirilmesi Tablo 2.'de gösterildiği gibi analiz edilmiştir. İmmun pozitif kemik dokularının skorlaması her bir preparatta 25 farklı alan olacak şekilde iki histopatolog tarafından çalışmanın grupları bakımından çift kör olarak değerlendirilmiştir.

3.8. Biyokimyasal Analiz

Örneklerin biyokimyasal analizleri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvar'ında yapılmıştır. Antikoagülsüz tüplere alınan kan örnekleri fibrin oluşumunun gerçekleşmesi için yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir ve ardından 2-8°C'de 1000×g 15 dakika santrifüj (Heraus 3SR+ Multifuge) edilmiştir. Elde edilen kan serumları (süpernatantlar) ependorf tüplere (Eppendorf, Socorex) koyularak biyokimya laboratuvarında -80°C'de dondurucuda numunelerin çalışıldığı güne kadar muhafaza edilmiştir. Numunelerin çalışılacağı günden 24 saat önce ependorflar -80°C derin dondurucudan çıkartılmış ve kademeli olarak sırasıyla -20°C ve

ardından +4°C’de çözünmeye bırakılmıştır. Numunelerin hepsi aynı gün ve tek seferde çalışılmıştır.

3.8.1. Osteokalsin Düzeylerinin Belirlenmesi

Örneklerin osteokalsin düzeylerinin ölçümleri enzime bağlı immünosorban yöntem (ELISA) ile Osteokalsin (OC) ticari kiti (Elabscience osteocalcin kiti, katalog no:E-EL-R0243) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Kit içerisindeki standart 1 dakika 10.000×g’de santrifüj edilerek ve 1 ml ‘reference standard & sample diluent’ eklenerek 50 ng/mL stok standart oluşturulmuştur. Hazırlanan 50 ng/mL standarttan seri dilüsyon yapılarak sırasıyla 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 ng/mL standartları hazırlanmıştır ve ‘reference standard&sample diluent’ solüsyonu 0 ng/mL standardı olarak kullanılmıştır.

750 ml yıkama tamponu hazırlamak için 30 ml konsantre yıkama tamponu 720 ml distile su ile seyreltilmiştir. ‘Biotinylated detection ab’ diluent oluşturmak için kullanmadan önce stok tüpü santrifüjlenmiştir ve ‘100×concentrated biotinylated detection ab’ solüsyonu ‘1×biotinylated detection ab diluent’ ile seyreltilerek hazırlanmıştır. ‘Concentrated HRP conjugate working solution’, ise ‘100×concentrated HRP conjugate’, solüsyonu ‘1×HRP conjugate diluent’ ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Plaka üzerindeki kuyucuklara 100 µl standart veya 100 µl numune ilave edilerek üstü kapatılmıştır ve 37°C’de 90 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde yıkama yapmadan kuyucuklardaki sıvı elimine edilerek her bir kuyucuğa 100 µl ‘biotinylated detection ab diluent’ ilave edilmiştir, hafifçe karıştırıldıktan sonra üstü kapatılmış ve 37°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra plakalar hazırlanan yıkama solüsyonu ile otomatik yıkayıcıda üç kez yıkanmıştır. Yıkamanın ardından kuyucuklara 100 µl ‘HRP conjugate working solution’ ilave edilerek üstü kapatılmıştır. 37°C’de 30 dakika inkübe

edilmiştir. İnkübasyon bitiminde plakalar hazırlanan yıkama solüsyonu ile otomatik yıkayıcıda beş kez yıkanmıştır ve ardından bütün kuyucuklara 90 µl ‘substrate reagent’ eklenip üstü kapatılarak karanlıkta 37°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bütün kuyucuklara 50 µl ‘stop solution’ eklenmiştir (Renk maviden sarıya dönüşmüştür) ve plaka 450 nm dalga boyunda bir mikropate okuyucu cihazında (Thermo Multiscan Go) okutularak absorbanslar belirlenmiştir.

3.8.2. NTX Düzeylerinin Belirlenmesi

Örneklerin NTX düzeylerinin ölçümleri enzime bağlı immünoassay yöntem (ELISA) ile NTX ticari kiti (*Elabscience NTX kiti, katalog no:E-EL-R0276*) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir. Kit içerisindeki standart 1 dakika 10.000×g’de santrifüj edilerek 1 ml ‘reference standard&sample diluent’ eklenerek 200 ng/mL stok standart oluşturulmuştur. Hazırlanan 200 ng/mL standarttan seri dilüsyon yapılarak sırasıyla 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ng/mL standartları hazırlanmıştır ve ‘reference standard&sample diluent’ solüsyonu 0 ng/mL standardı olarak kullanılmıştır.

750 mL yıkama tamponu hazırlamak için 30 mL konsantre yıkama tamponu 720 mL distile su ile seyreltilmiştir. ‘Biotinylated detection ab diluent’ oluşturmak için kullanmadan önce stok tüpü santrifüjlenmiş ve ‘100×concentrated biotinylated detection ab solüsyonu’ ‘1×biotinylated detection ab diluent’ ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Konsantre HRP konjugat çalışma solüsyonu ise ‘100×konsantre HRP konjugat solüsyonu’ ve ‘1×HRP konjugat diluent’ ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Plaka üzerindeki kuyucuklara 100 µl standart veya 100 µl numune ilave edilerek üstü kapatılmış ve 37°C’de 90 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde yıkama yapmadan kuyucuklardaki sıvı elimine edilerek her bir kuyucuğa 100 µl ‘biotinylated

detection ab diluent' ilave edilmiştir. Hafifçe karıştırıldıktan sonra üstü kapatılarak 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra plakalar hazırlanan yıkama solüsyonu ile otomatik yıkayıcıda üç kez yıkanmıştır. Yıkamanın ardından kuyucuklara 100 µl 'HRP conjugate working solution' ilave edilerek üstü kapatılmıştır. 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde plakalar hazırlanan yıkama solüsyonu ile otomatik yıkayıcıda 5 kez yıkanmış ve ardından bütün kuyucuklara 90 µl 'substrate reagent' eklenerek üstü kapatılmış ve karanlıkta 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bütün kuyucuklara 50 µl 'stop solution' eklenmiştir (Renk maviden sarıya dönüşmüştür) ve plaka 450 nm dalga boyunda bir mikropate okuyucu (Beckman-Coulter) cihazında okutularak absorbanslar belirlenmiştir.

3.8.3. TAS Ölçümü

Serum TAS düzeyleri *Abbott architect c16000 otoanalizörü* ile *Rel Assay Total Antioksidan Status Test Kiti* (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Türkiye) kullanılarak ölçülmüştür. İndirgenmiş ABTS molekülü asidik ortamda (asetat tamponu, 30 mmol/L, pH:3.6) tek başına H₂O₂ kullanılarak ABTS+ molekülüne oksitlenmiştir. Yüksek pH değerinde daha konsantre bir asetat tampon solüsyonu (asetat tamponu, 0.4 mol/L, pH:5.8) ile dilüe edilerek renk kendiliğinden yavaşça açılmıştır. Örnekte bulunan antioksidanlar konsantrasyonları ile orantılı olarak renkteki açılmayı bir dereceye kadar hızlandırmıştır. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak izlenmiştir ve renkteki açılma hızı örnekteki total antioksidan kapasite ile ters orantılı olarak izlenmiştir. Reaksiyon hızı, total antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri için geleneksel standart olarak yaygın şekilde kullanılan Trolox ile kalibre edilmiştir ve ölçüm sonuçları µmol Trolox ekivalent/L olarak ifade edilmiştir.¹³⁶

3.8.4. TOS Ölçümü

Serum TOS düzeyleri *Abbott architect c16000 otoanalizörü* ile *Rel Assay Total Oksidan Status Test Kiti* (*Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Türkiye*) kullanılarak ölçülmüştür. Örnekte bulunan oksidanlar, Fe^{+2} -o-dianisidine kompleksini Fe^{+3} iyonuna okside edilmiştir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile artırılmıştır. Fe^{+3} iyonu asidik ortamda ksilenol oranj ile renkli bir kompleks yapmıştır. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilmiştir ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalent/L olarak ifade edilmiştir.¹³⁰

3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda tüm veriler *SPSS 18.0 (IBM, Armonk, NJ, USA)* istatistik programı kullanılarak hesaplanmıştır. Semikantitatif analizler sonucu elde edilen veriler maksimum ve minimum değerler göz önüne alınarak median \pm standart sapma şeklinde oluşturulmuştur. Gruplar arasındaki farklar kullanılarak non-parametrik *Kruskall Wallis testi* ve bunu takiben bir *Tamhane testi* uygulanarak analizler yapıldıktan sonra, grupların sayısal verileri analize tabi tutulmuştur (p değeri <0.05 anlamlı olarak seçilmiştir). Elde edilen biyokimyasal veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma şeklinde tablolarda belirtilmiştir. Gruplar arasındaki farklar kullanılarak *tek yönlü varyans analizi (ANOVA)* ve bunu takiben *Tukey HSD testi* uygulanarak analizler yapılarak grupların sayısal verileri analize tabi tutulmuştur (p değeri <0.05 anlamlı olarak seçilmiştir).

Tablo 1. Histopatolojik Kemik İyileşme Skoru (HKİS)

Skor	Bulgu
1	Geniş ödem alanları
2	Yaygın derecede akut enflamasyon (%50'den fazla)
3	Az miktarda akut enflamasyon (%50'den az) ve orta derece granülasyon dokusu (%50'den az)
4	Yaygın granülasyon dokusu (%50'den fazla), orta derece fibröz kallus oluşumu (%50'den az)
5	Yaygın derecede fibroz kallus oluşumu (%50'den fazla)
6	Yaygın fibröz kallus oluşumuna ek olarak (%50'den az) az miktarda immatür (primer) kemik oluşumlarının gözlenmesi
7	Yaygın immatür kemik oluşumlarının gözlenmesi(%50'den fazla)
8	Tamamen immatür kemik
9	İmmatür kemik ve az miktarda olgun (sekonder) kemik
10	Sekonder (lameller) kemik

Tablo 2. İmmunohistokimyasal (İHC) pozitivite skorlaması.

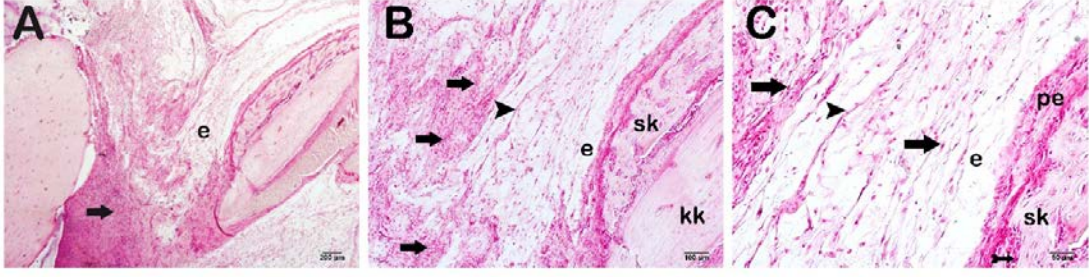
Yüzde	Açıklama	IHC pozitivite Skoru
<5%	Yok	0
<5-25%	Hafif	(+)
<25-50%	Orta	(++)
>50%	Şiddetli	(+++)

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

4.1.1. Kontrol 1. Hafta Grubuna Ait Bulgular

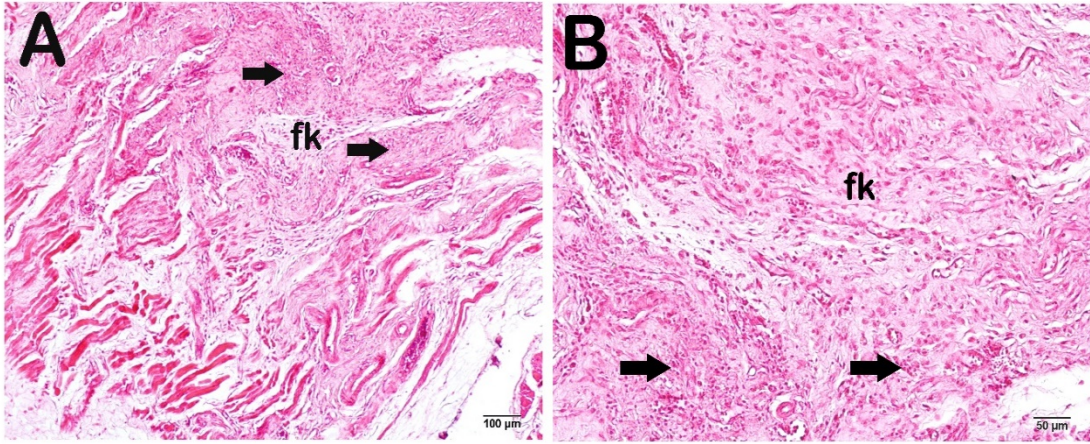
Kontrol 1. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde mandibula kemik dokusunda uygulamanın yapıldığı alanlarda ve bağ dokusunda yaygın akut inflamasyon gözlemlendi. Bunun yanında yaygın ödematoz alanlar mevcuttu (HKİS:1.00±0.74) (Şekil 3.A,B,C).



Şekil 3.A,B,C. Kontrol grubu 1. hafta mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. A: x200 B: x100 C: x50; Kemik dokusu uygulama alanlarında (kuyruklu ok), periodontal ligament ve bağ dokusunda yaygın akut enflamasyon izlenmektedir. Bunun yanında seyrek kollajen fibriller (ok başı) ve yaygın ödematoz alanlar gözlenmektedir (HKİS:1.00±0.74). Kemik iliği (süngerimsi) Kompakt kemik (kk); Periosteum (pe). H&E boyaması.

4.1.2. Kontrol 3. Hafta Grubuna Ait Bulgular

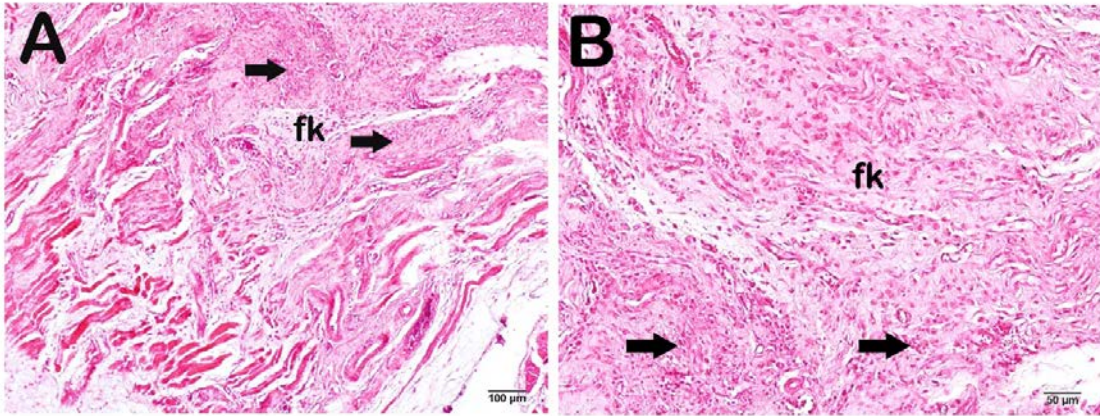
Kontrol 3. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde geniş ödem alanlarının yerini fibröz kallus dokusuna ve akut inflamasyon alanlarının yerini granülasyon dokusuna bıraktığı gözlemlendi. Bunun yanında mandibula kemik dokusunda az da olsa osteoblastik aktivite alanları izlenmiştir (HKİS:2.00±0.64) (Şekil 2A,B).



Şekil 4.A,B. Kontrol grubu 3. hafta mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Yaygın granülasyon dokusu ve fibröz kallus oluşumları gözlenmektedir (HKİS:2.00±0.64). Granülasyon dokusu (ok) Fibröz kallus (fk). H&E boyaması.

4.1.3. Kontrol 5. Hafta Grubuna Ait Bulgular

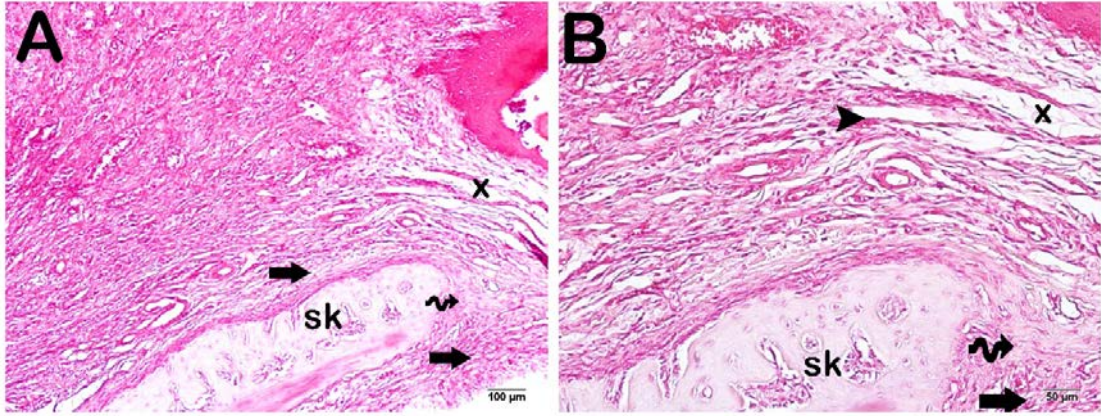
Kontrol grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde mandibula kemik dokusunda ve bağ dokusunda yaygın fibröz kallus yapısı ve immatur (primer) kemik oluşumları gözlemlendi. Ayrıca matür (sekonder) kemik oluşumları da yer yer mevcuttu (HKİS:5.00±0.76) (Şekil 5A,B).



Şekil 5.A,B. Kontrol 5. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Yaygın fibröz kallus (fk) ve immatür kemik oluşumları izlenmektedir. Az miktarda matür kemik oluşumları gözlenmektedir(ok) (HKİS:5.00±0.76). H&E boyaması.

4.1.4. Equisetum Arvense Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait Bulgular

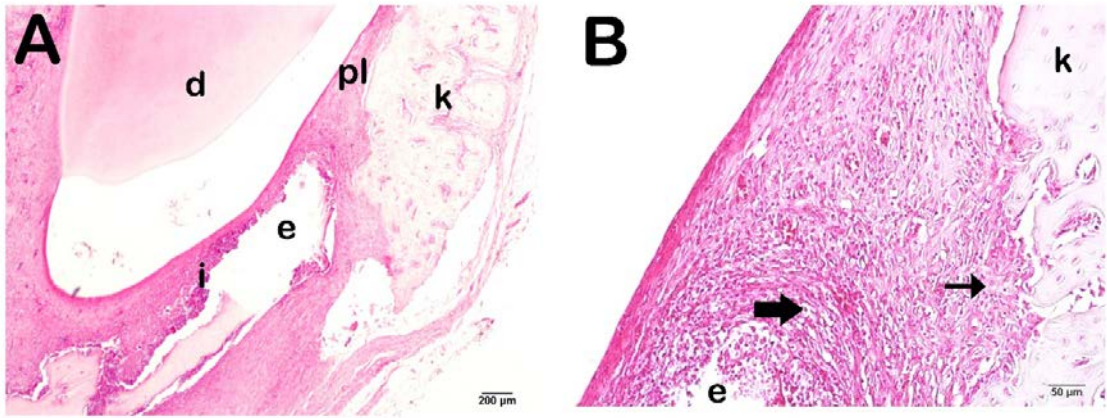
EA tedavisi 1. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde orta derecede fibröz kallus ve granülasyon alanları saptandı. Yer yer osteoblastik aktivite gözlenmesi dikkat çekiciydi. Bunun yanında az miktarda ödematöz alanlar mevcuttu (Şekil 6A,B) (HKİS:3.00±0.64).



Şekil 6.A,B. EA tedavisi 1. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Uygulama bölgesinde fibröz kallus ve osteoblastik aktivite (spiral ok) izlenmektedir. Orta derecede granülasyon dokusu ve az miktarda ödematöz alanlar (x) gözlenmektedir (ok) Süngerimsi kemik (sk) Kollajen fibriller (ok başı) (HKİS:3.00±0.64) H&E boyaması.

4.1.5. Equisetum Arvense Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait Bulgular

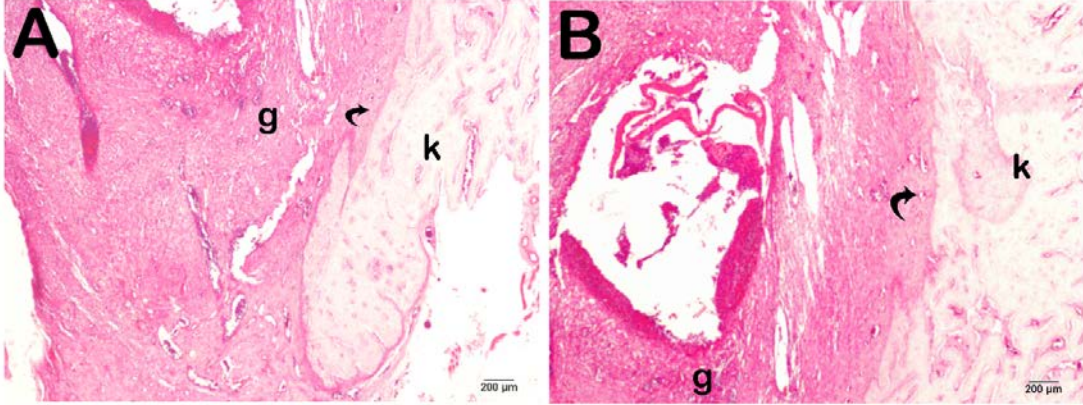
EA tedavisi 3. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde cerrahi uygulama bölgesi olan mandibulada orta derecede immatür kemik oluşumları gözlemlendi. Bunun yanında bağ dokusunda yaygın fibröz kallus ve orta derecede granülasyon dokusu varlığı izlendi (Şekil 7A,B) (HKİS:5.00±0.64).



Şekil 7.A,B. EA tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü Defekt bölgesinde yaygın immatür kemik (ince ok) ve orta seviyede fibröz kallus (fk) yapısı izlenmektedir. Granülasyon dokusu (ok).Kemik (sk). Dentin (d). Periodontal ligament (pl). (HKİS:5.00±0.64). (A: x200 B: x50) H&E boyaması

4.1.6. Equisetum Arvense Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait Bulgular

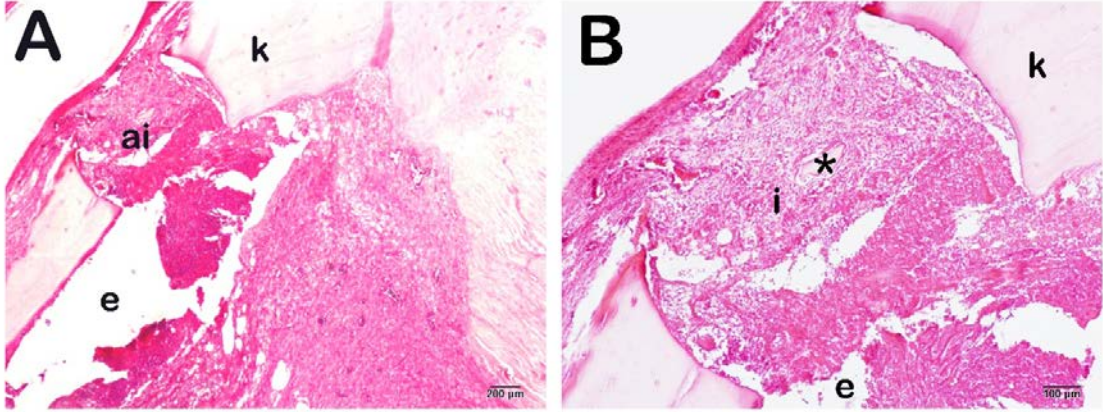
EA tedavisi 5. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde yara bölgesinde yaygın lamellasız immatür kemik yapısı ve orta derecede lamellalı matür kemik oluşumlarını gözlendi (Şekil 8A,B) (HKİS:6.00±0.46).



Şekil 8.A,B. EA tedavisi 5. hafta grubuna kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Defekt bölgesinde yaygın lamellasız yeni kemik dokusu (kıvrık ok) ve lamellalı kemik yapısı izlenmektedir. Kemik (k). Granülasyon dokusu (g) (HKİS:6.00±0.46). H&E boyaması.

4.1.7. Nigella Sativa Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait Bulgular

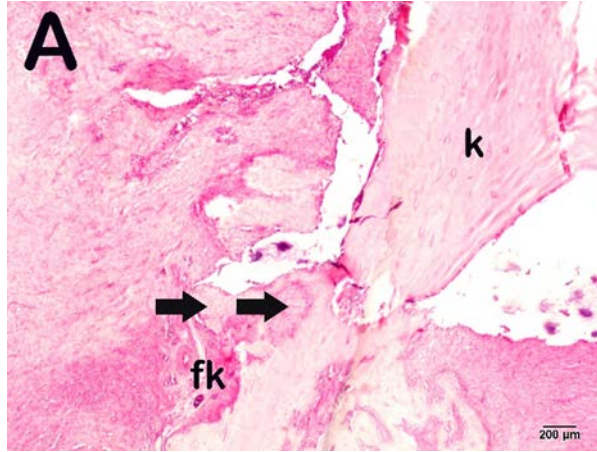
NS tedavi 1. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde defekt bölgesinde yaygın akut inflamasyon ve granülasyon dokusu gözlemlendi. Bunun yanında az miktarda fibröz kallus oluşumları mevcuttu (Şekil 9 A,B) (HKİS:3.00±0.64).



Şekil 9.A,B. NS tedavi 1. hafta grubunda mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Yara bölgesinde yaygın fibröz kallus yapısı izlenmektedir. Yer yer yeni kemik dokusu oluşumu gözlenmiştir (yk). (HKİS:3.00±0.64). H&E boyaması.

4.1.8. Nigella Sativa Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait Bulgular

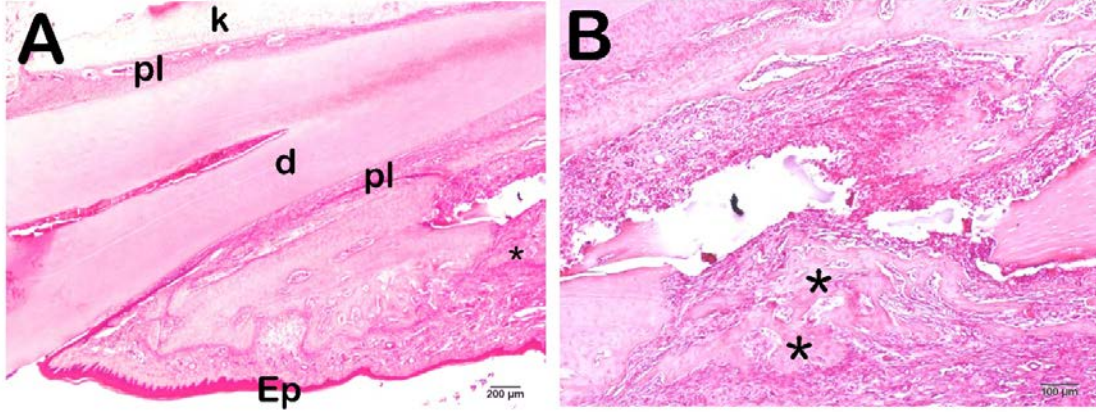
NS tedavi 3. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde yara bölgesinde yaygın fibröz kallus ve az miktarda osteoblastik aktivasyon gözlemlendi. Bunun yanında bağ dokusunda az miktarda granülasyon dokusu mevcuttu (Şekil 10) (HKİS:4.00±0.89).



Şekil 10. NS tedavi 3. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Yara bölgesinde yaygın fibröz kallus ve immatür kemik dokusu oluşumu gözlenmektedir (yıldız). Kemik (k). Peridontal İlgament (pl). Dentin (d). (HKİS:4.00±0.89). H&E boyaması.

4.1.9. Nigella Sativa Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait Bulgular

NS tedavi 5. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde defekt bölgesinde yaygın lamellasız immatür kemik ve az miktarda fibröz kallus oluşumları gözlemlendi (Şekil 11 A,B) (HKİS:7.00±0.50).

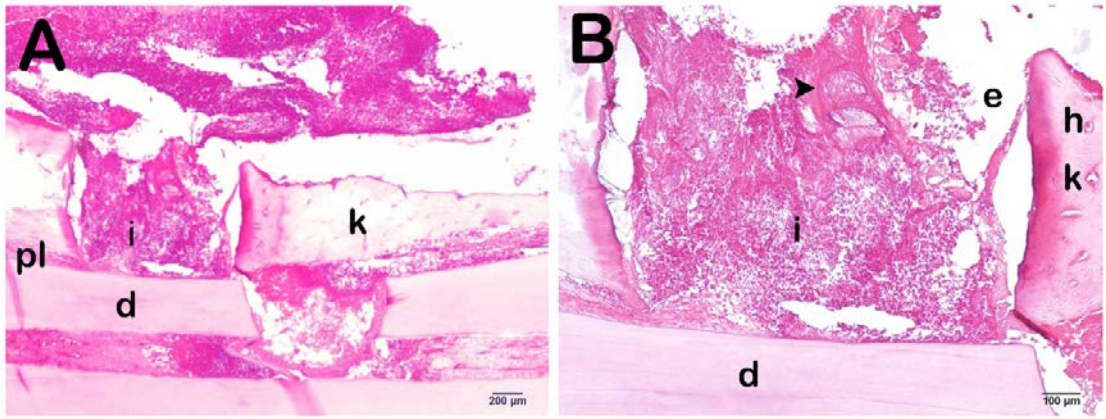


Şekil 11.A,B. NS tedavi 5. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Defekt bölgesinde yaygın lamellasız immatür kemik ve az miktarda fibröz kallus oluşumları gözlenmektedir (Şekil 9 A, B) (HKİS:7.00±0.50).

4.1.10. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavi 1. Hafta

Grubuna Ait Bulgular

EA+NS kombine tedavi 1. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde yara bölgesinde yaygın yaygın enflamasyon ve orta derecede granülasyon dokusu gözlemlendi (Şekil 12 A,B) (HKİS:3.00±0.54).

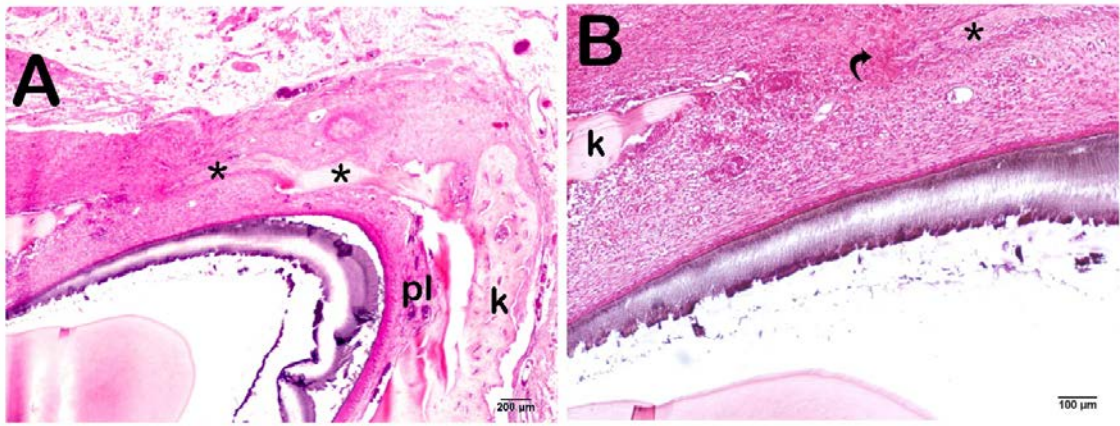


Şekil 12.A,B. EA+NS kombine tedavi 1. hafta kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Yara bölgesinde yaygın enflamasyon ve orta derecede granülasyon dokusu oluşumları gözlenmektedir (HKİS:3.00±0.54).

4.1.11. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavi 3. Hafta Tedavi

Grubuna Ait Bulgular

EA+NS kombine tedavi 3. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde yara bölgesinde yaygın fibröz kallus ve lamellasız yeni kemik oluşumları gözlemlendi. Özellikle osteoblastik aktivitenin yaygın olması dikkat çekiciydi (Şekil 13 A,B) (HKİS:7.00±0.46).

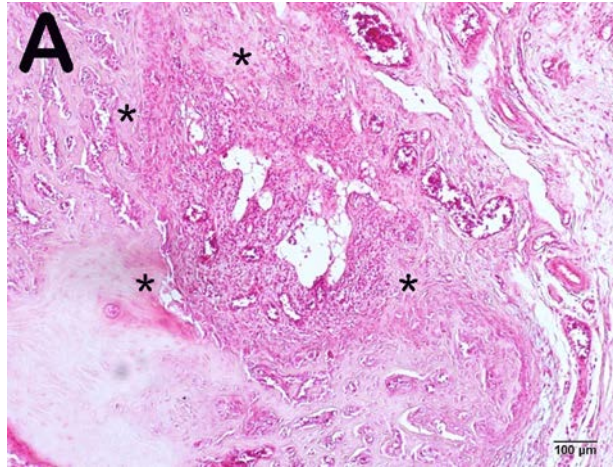


Şekil 13.A, B. EA+NS kombine tedavi 3. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Yara bölgesinde yaygın fibröz kallus ve lamellasız yeni kemik oluşumları (yıldız) gözlenmektedir. Yaygın osteoblastik aktivite (kıvrık ok). Peridontal ligament (pl). Kemik (k). (HKİS:7.00±0.46).

4.1.12. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavi 5. Hafta

Grubuna Ait Bulgular

EA+NS kombine tedavi 5. hafta grubuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde yara bölgesinde yaygın lamellasız yeni kemik oluşumları ve orta derecede lamellalı kemik oluşumları izlenmiştir (Şekil 14) (HKİS:8.00±0.54).



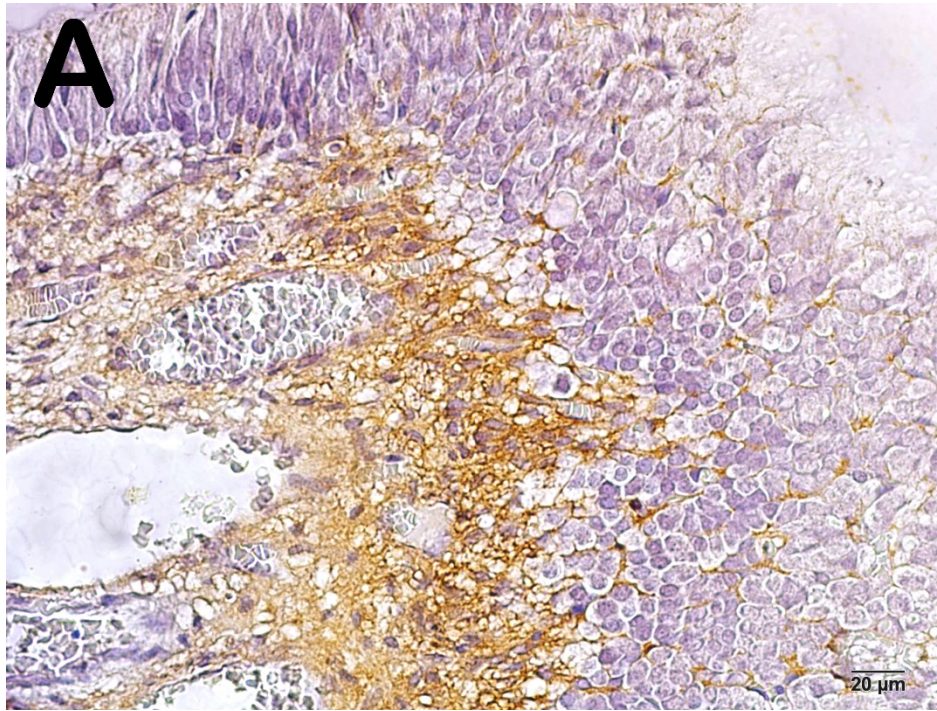
Şekil 14. EA+NS kombine tedavi 5. hafta grubu mandibula kemik dokusuna ait ışık mikroskop görüntüsü. Defekt bölgesinde yaygın fibröz kallus ve lamellasız yeni kemik (yıldız) oluşumları gözlenmektedir (Şekil 12) (HKİS:8.00±0.54).

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.2.1. Alkalen Fosfataz

4.2.1.1. Kontrol 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

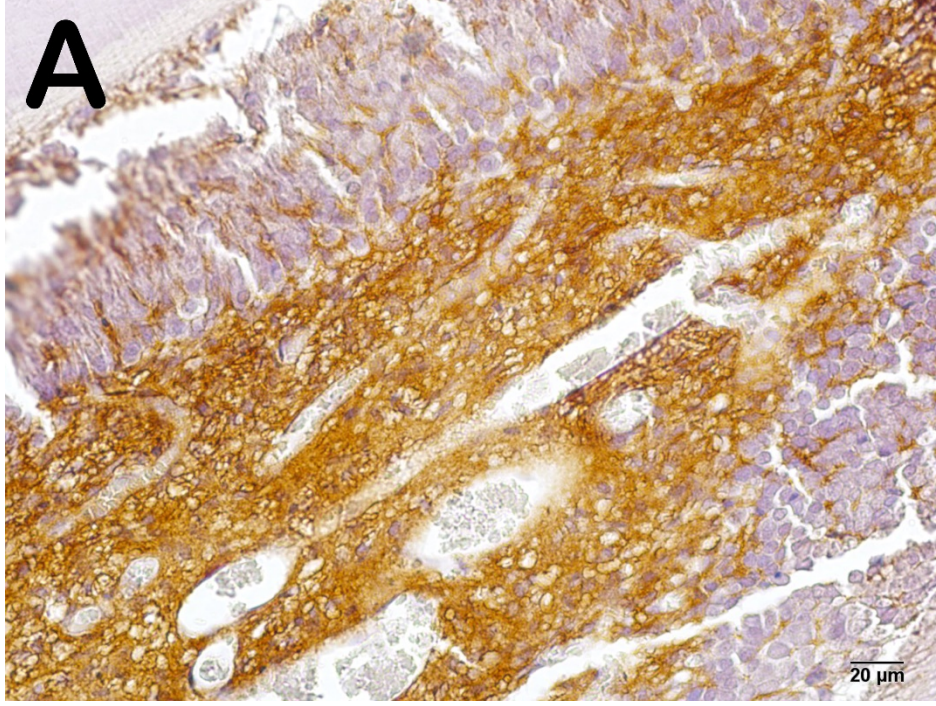
Kontrol grubuna ait mandibula kemik dokusu kesitlerinde hafif derecede alkalen fosfataz pozitivitesi gözlemlendi (AF pozitivite skoru: 1.00 ± 0.46 ; Şekil 15).



Şekil 15. Kontrol 1. hafta grubuna ait mandibula kemik doku kesitlerinde hafif derecede AF pozitivitesi izlendi. x40 (AF pozitivite skoru: 1.00 ± 0.46).

4.2.1.2. Kontrol 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

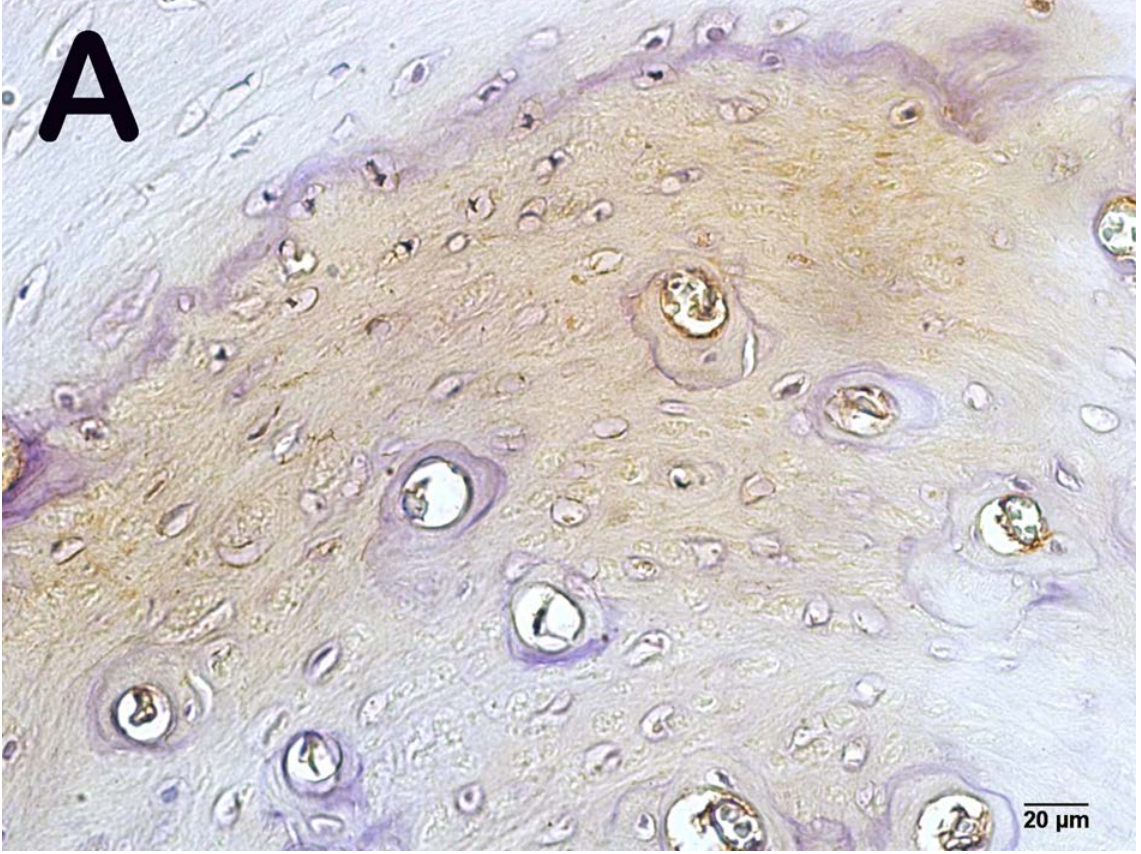
Kontrol 3. hafta grubuna ait mandibula kemik doku kesitlerinde orta derecede alkaleen fosfataz pozitivitesi gözlemlendi (AF pozitivite skoru: 2.00 ± 0.64 ; Şekil 16).



Şekil 16. Kontrol 3. hafta grubuna ait mandibula kemik doku kesitlerinde normal yapıdaki kemik dokusu izlendi. x20 (AF pozitivite skoru: 2.00 ± 0.64).

4.2.1.3. Kontrol 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

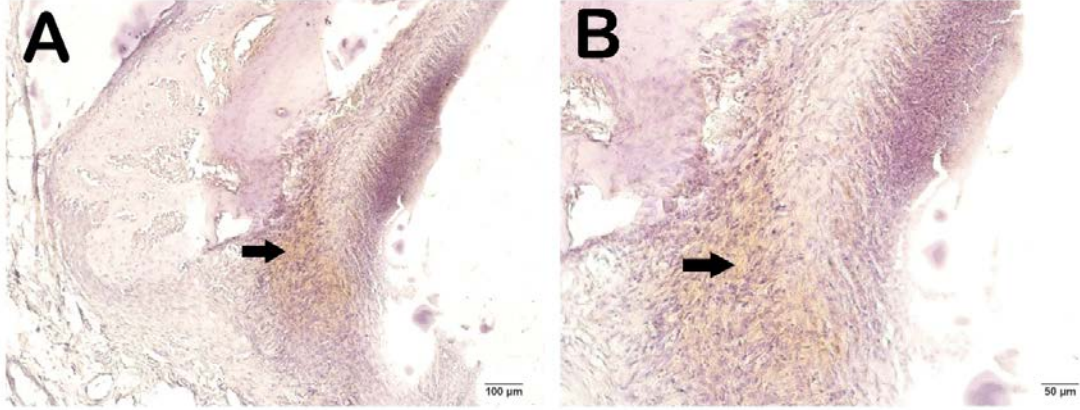
Kontrol 5. hafta grubuna ait mandibula doku kesitlerinde kemik dokusunda orta derecede alkalin fosfataz pozitivitesi gözlemlendi (AF pozitivite skoru: 2.00 ± 0.46 ; Şekil 17).



Şekil 17. Kontrol 5. hafta grubuna mandibulaya ait doku kesitlerinde orta derecede AF pozitivitesi izlendi. x20. (AF skoru: 2.00 ± 0.46).

4.2.1.4. Equisetum Arvense Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

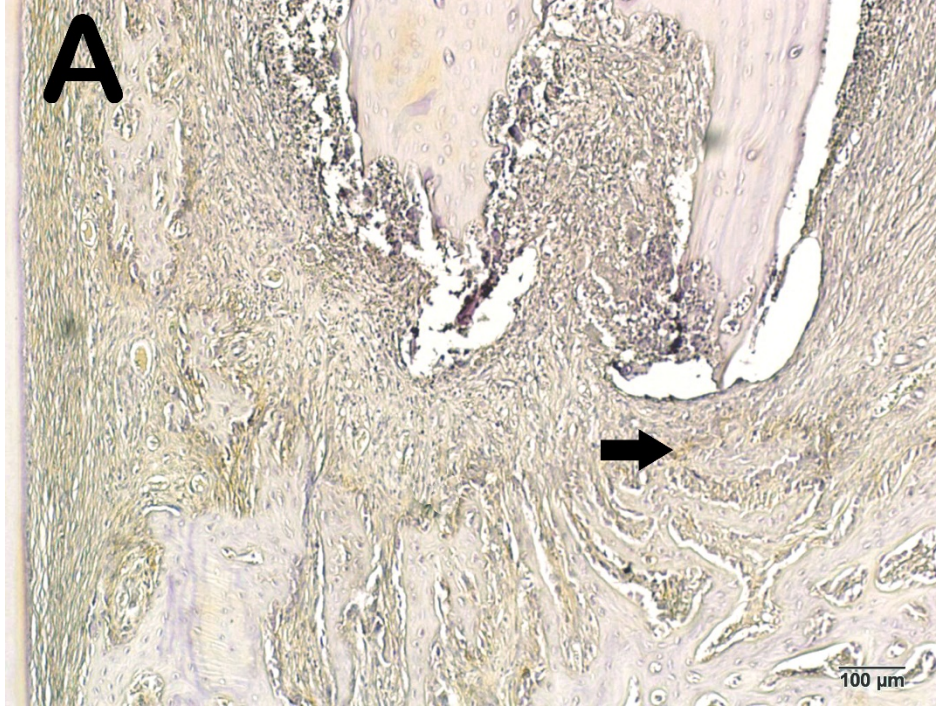
EA tedavisi 1. hafta grubuna ait doku kesitlerinde kemik dokusunda az miktarda alkalin fosfataz pozitivitesi gözlemlendi (AF pozitivite skoru: $1.00 \pm 0,46$; Şekil 18).



Şekil 18. EA tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde az seviyede alkalin fosfataz pozitivitesi izlendi. A: x4, B: x20. (AF pozitivite skoru: 1.00 ± 0.46).

4.2.1.5. Equisetum Arvense Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

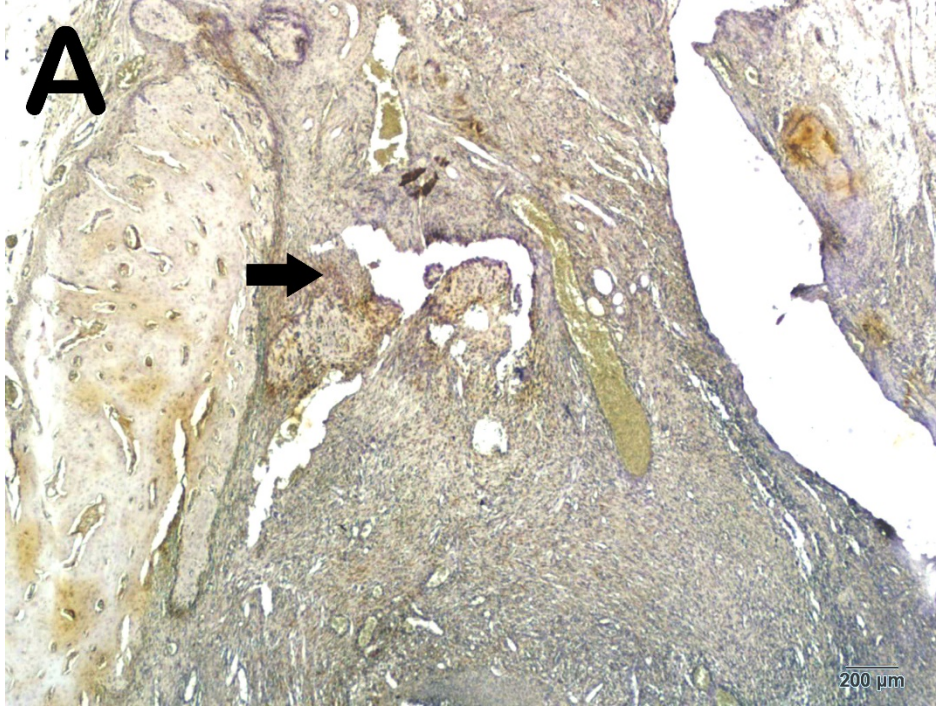
EA tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda orta derecede alkalen fosfataz pozitivitesi gözlemlendi (AF pozitivite skoru: 2.50 ± 0.54 ; Şekil 19).



Şekil 19. EA tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde orta derecede alkalen fosfataz pozitivitesi izlendi. x40 (AF pozitivite skoru: 2.50 ± 0.54).

4.2.1.6. Equisetum Arvense Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

EA tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda yoğun seviyede alkalen fosfataz pozitivitesi izlendi (AF pozitivite skoru: 3.00 ± 0.35 ; Şekil 20).

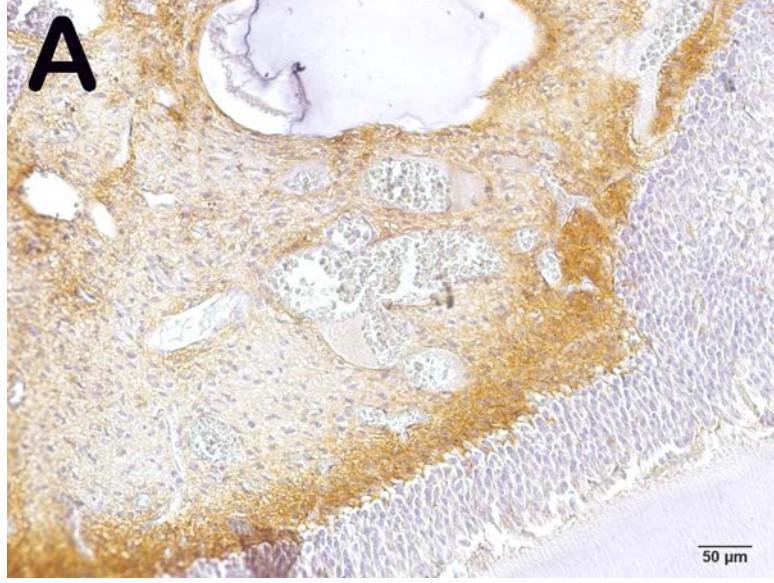


Şekil 20. EA tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde yoğun seviyede alkalen fosfataz pozitivitesi izlendi. x4 (AF pozitivite skoru: 3.00 ± 0.35).

4.2.1.7. Nigella Sativa Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal

Bulgular

NS tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda hafif seviyede alkalen fosfataz pozitivitesi gözlemlendi (AF pozitivite skoru: 1.50 ± 0.64 ; Şekil 21).

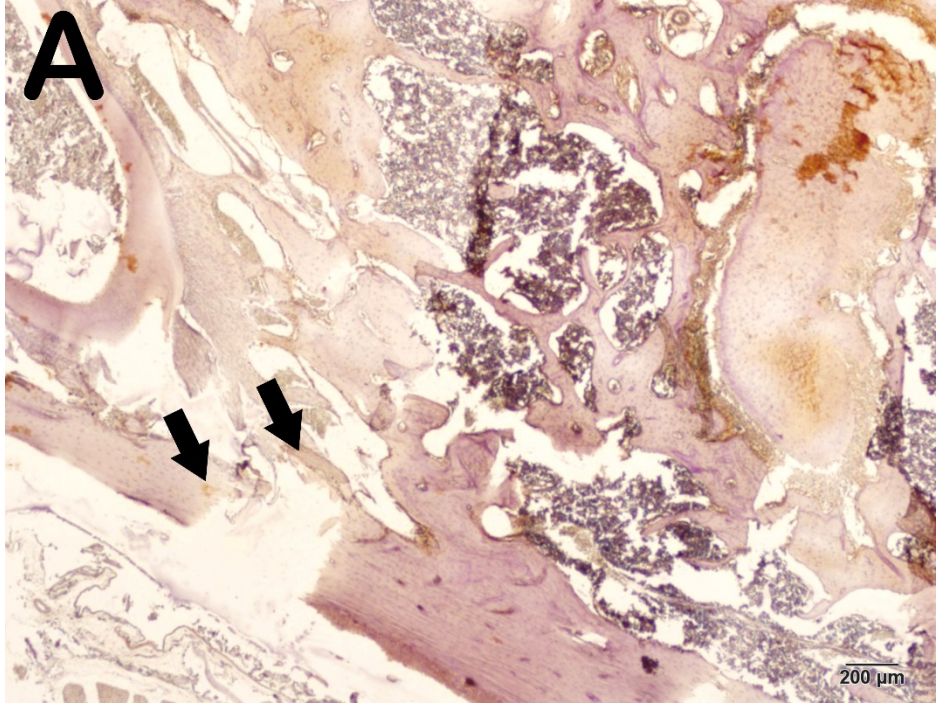


Şekil 21. NS tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula doku kesitlerinde hafif seviyede alkalen fosfataz pozitivitesi gözlemlendi. x4 (Alkalen fosfataz pozitivite skoru: 1.50 ± 0.64).

4.2.1.8. Nigella Sativa Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmünohistokimyasal

Bulgular

NS tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda orta derecede alkalin fosfataz pozitifitesi gözlemlendi (AF pozitifite skoru: 2.00 ± 0.54 ; Şekil 22).

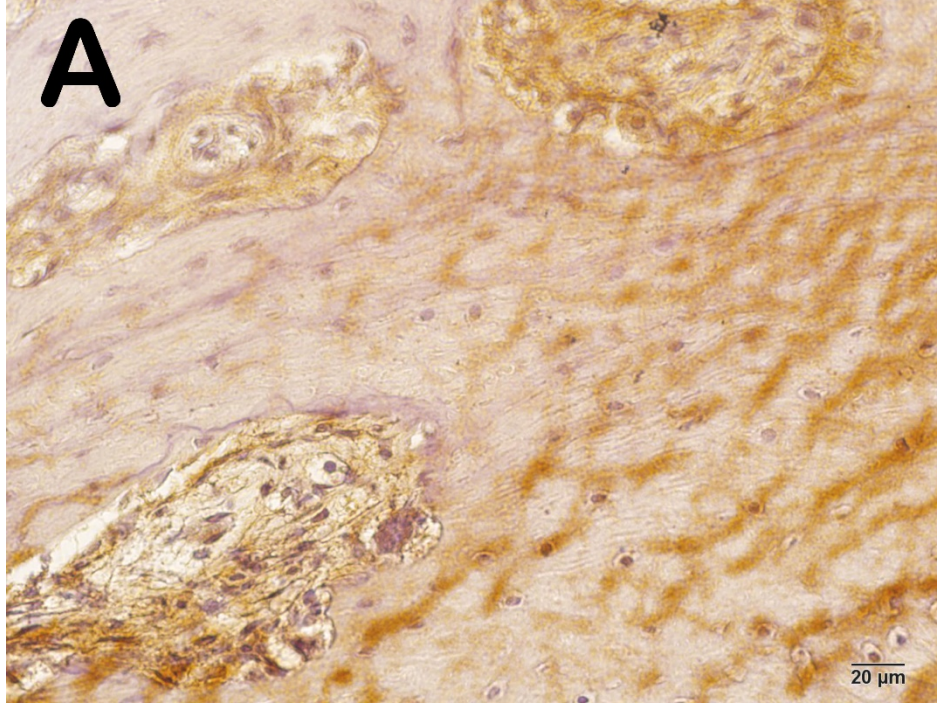


Şekil 22. NS tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde orta seviyede alkalin fosfataz pozitifitesi izlendi. x4 (AF pozitifite skoru: 2.00 ± 0.54).

4.2.1.9. Nigella Sativa Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal

Bulgular

NS tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda yoğun alkale fosfataz pozitifitesi gözlemlendi (AF pozitifite skoru:3.00±0.54; Şekil 23).



Şekil 23. NS tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula doku kesitlerinde yoğun alkale fosfataz pozitifitesi izlendi. x40 (AF pozitifite skoru:3.00±0.54).

4.2.1.10. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

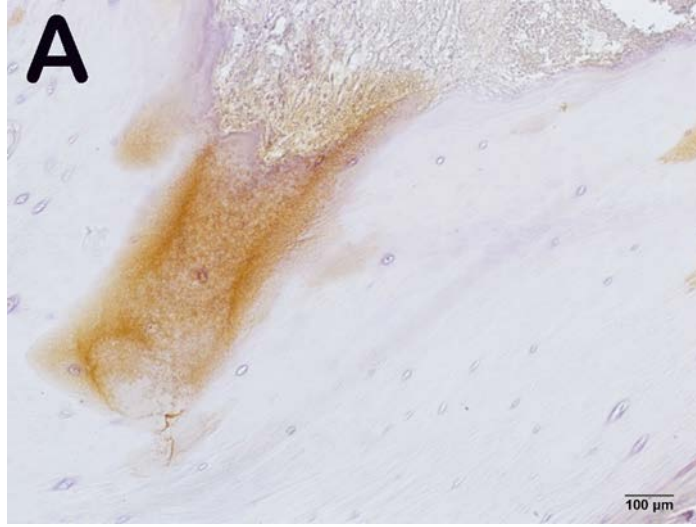
EA+NS kombine tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula doku kesitlerinde kemik dokusunda hafif derecede alkaleen fosfataz pozitifitesi izlendi (AF pozitifite skoru: 1.00 ± 0.54 ; Şekil 24).



Şekil 24. EA+NS kombine tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde hafif seviyede alkaleen fosfataz pozitifitesi izlendi. x4 (AF pozitifite skoru: 1.00 ± 0.54).

4.2.1.11. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

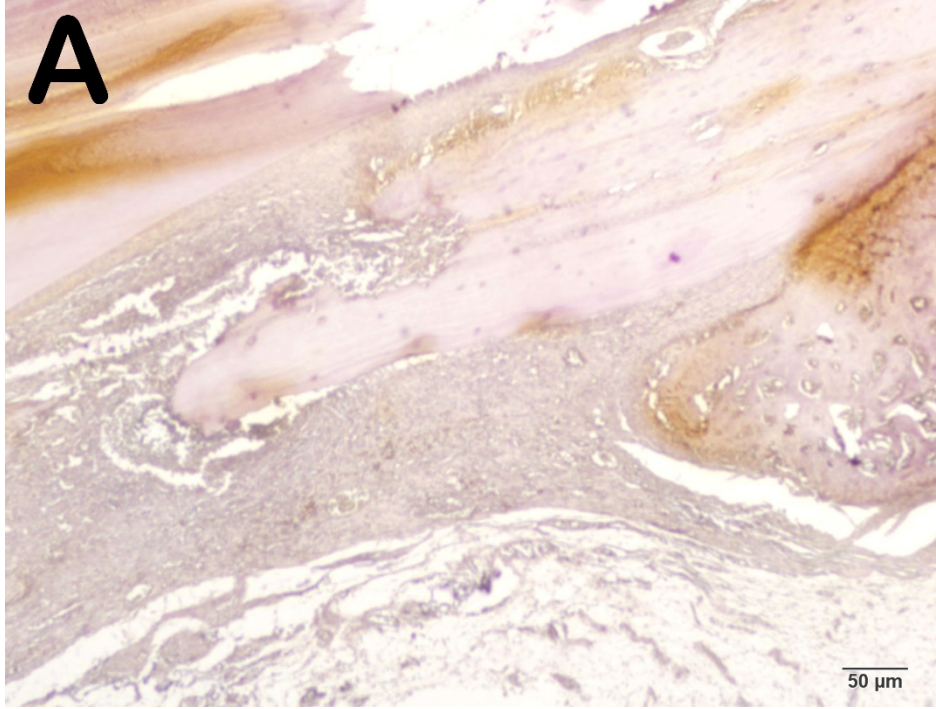
EA+NS kombine tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda orta derecede alkalin fosfataz pozitivitesi gözlemlendi (AF pozitivite skoru: 2.00 ± 0.64 ; Şekil 25).



Şekil 25. EA+NS kombine tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde az seviyede alkalin fosfataz pozitivitesi izlendi. x4 (AF pozitivite skoru: 2.00 ± 0.64).

4.2.1.12. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

EA+NS kombine tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda yoğun alkalin fosfat pozitifitesi gözlemlendi (AF pozitifite skoru: 3.00 ± 0.35 ; Şekil 28).

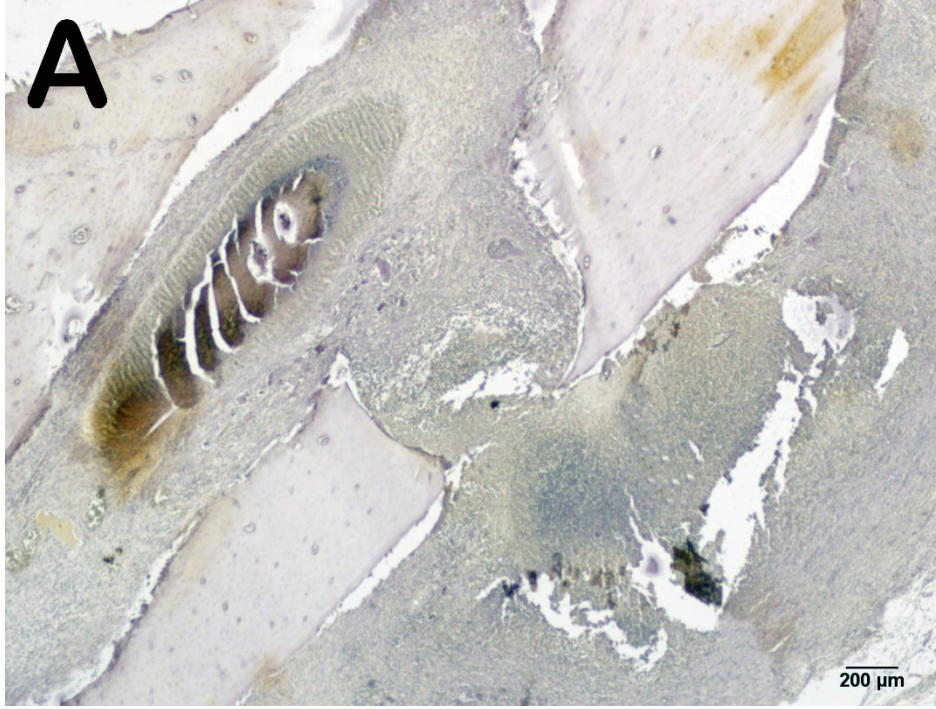


Şekil 26. EA+NS kombine tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde yoğun alkalin fosfat pozitifitesi izlendi. x4 (AF pozitifite skoru: 3.00 ± 0.35).

4.2.2. Kemik Sialoprotein

4.2.2.1. Kontrol 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

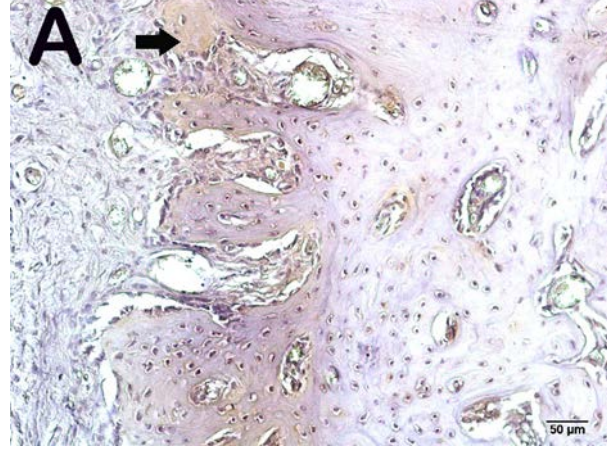
Kontrol grubuna ait mandibula kesitlerinde hafif düzeyde kemik sialoprotein pozitivitesi gözlemlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 1.00 ± 0.52 ; Şekil 27).



Şekil 27. Kontrol 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde hafif düzeyde kemik sialoprotein pozitivitesi gözlemlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 1.00 ± 0.52).

4.2.2.2. Kontrol 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

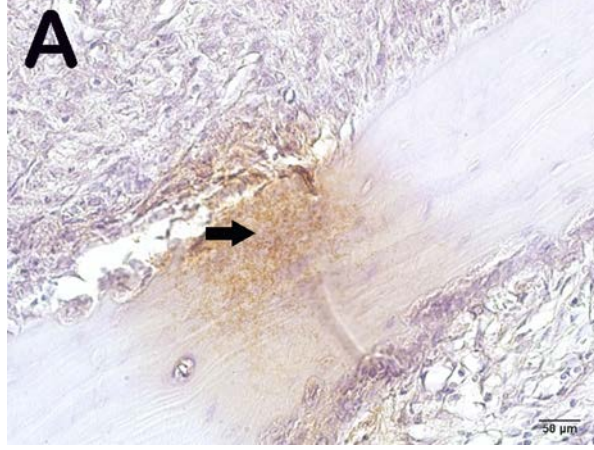
Kontrol 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda hafif derece kemik sialoprotein pozitivitesi izlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 1.00 ± 0.64 ; Şekil 28).



Şekil 28. Kontrol 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde hafif düzeyde kemik sialoprotein aktivitesi izlendi. x10. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 1.00 ± 0.64).

4.2.2.3. Kontrol 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

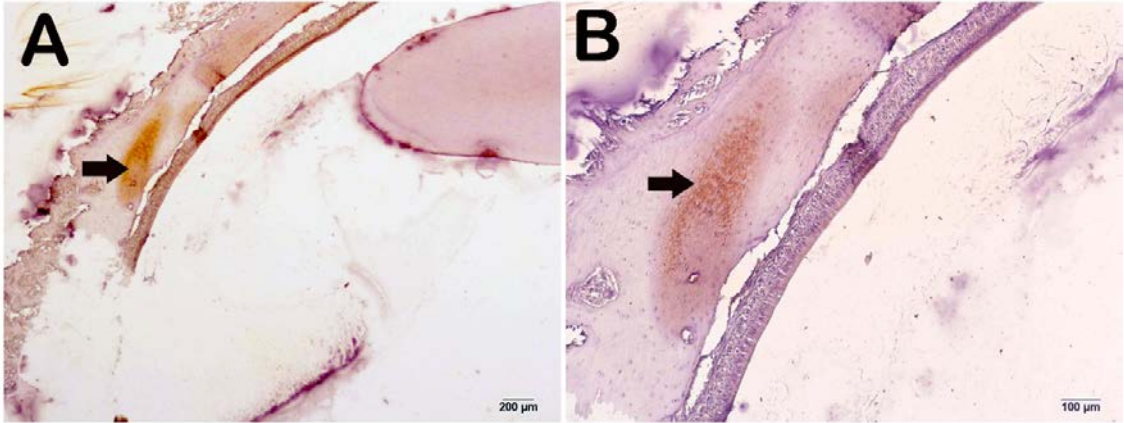
Kontrol 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda orta düzeyde kemik sialoprotein pozitivitesi gözlemlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.88 ; Şekil 29).



Şekil 29. Kontrol 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde orta seviyede kemik sialoprotein aktivitesi gözlemlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.88).

4.2.2.4. Equisetum Arvense Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

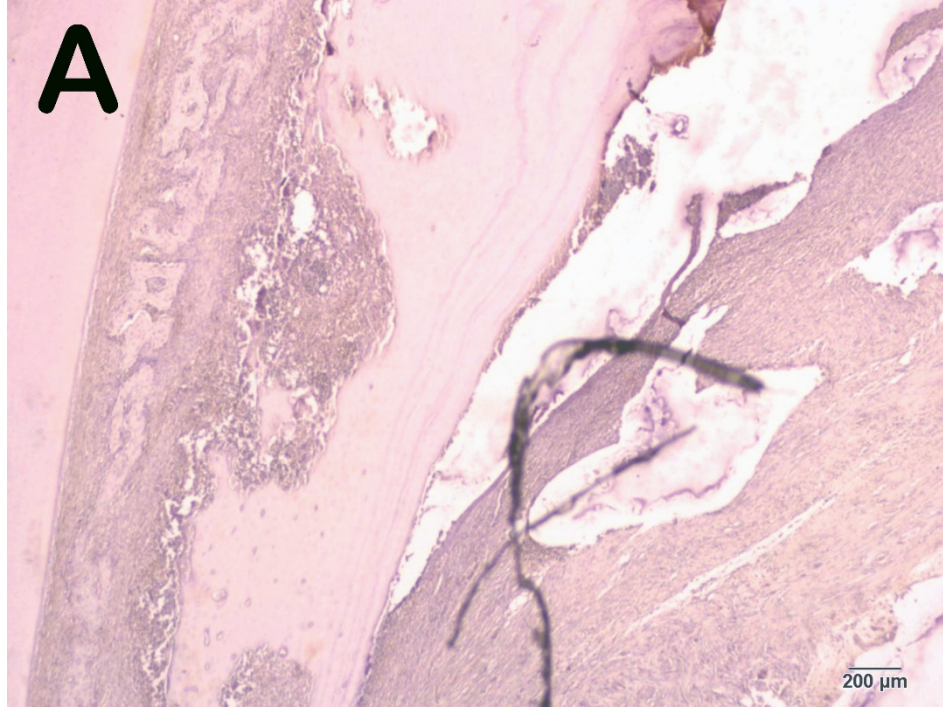
EA tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda orta düzeyde kemik sialoprotein pozitivitesi izlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.35 ; Şekil 30).



Şekil 30. EA tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde orta seviyede kemik sialoprotein aktivitesi izlendi. (ok). x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.35).

4.2.2.5. Equisetum Arvense Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

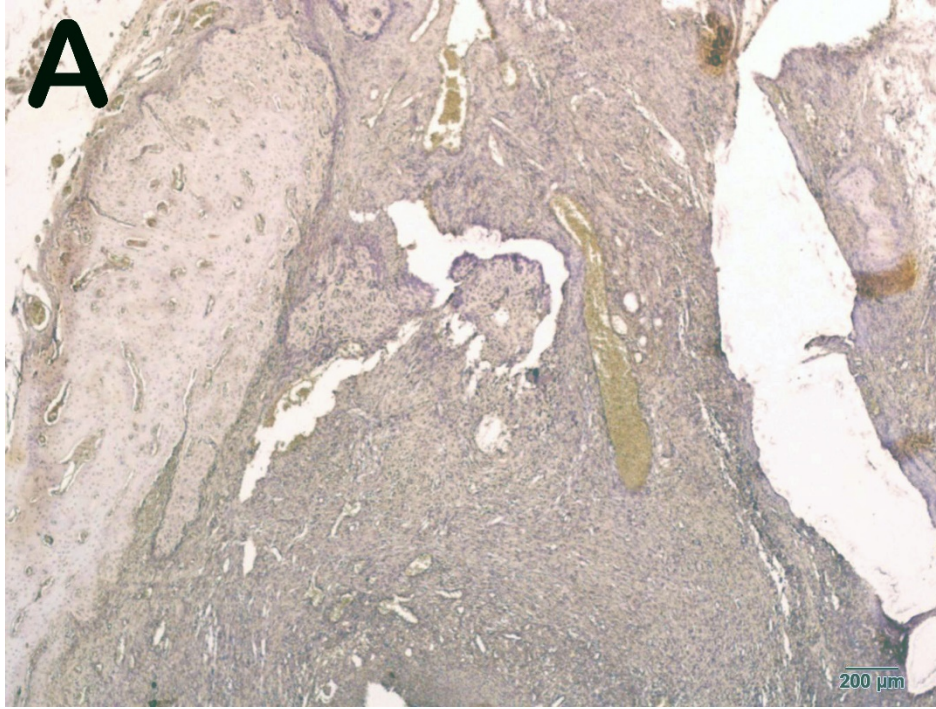
EA tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda orta derecede kemik sialoprotein pozitivitesi gözlemlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.71 ; Şekil 31).



Şekil 31. EA tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde orta seviyede kemik sialoprotein aktivitesi gözlemlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.71).

4.2.2.6. Equisetum Arvense Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

EA tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda yoğun kemik sialoprotein pozitivitesi saptandı (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 3.00 ± 0.35 ; Şekil 32).

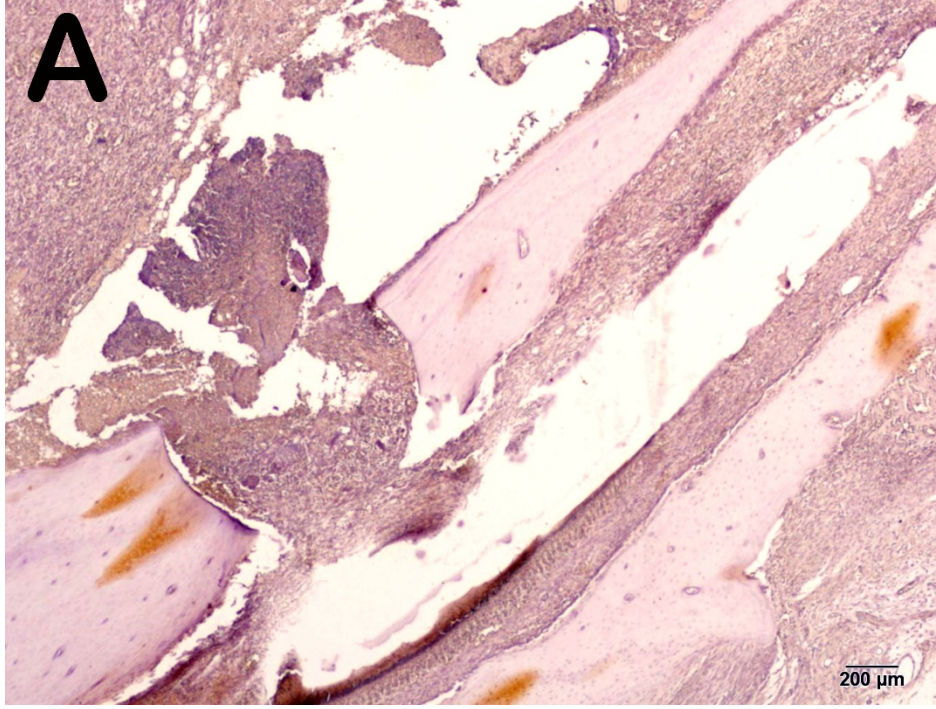


Şekil 32. EA uygulaması 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde yoğun kemik sialoprotein aktivitesi gözlemlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 3.00 ± 0.35).

4.2.2.7. Nigella Sativa Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal

Bulgular

NS tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda hafif kemik sialoprotein pozitivitesi izlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 1.50 ± 0.54 ; Şekil 33).

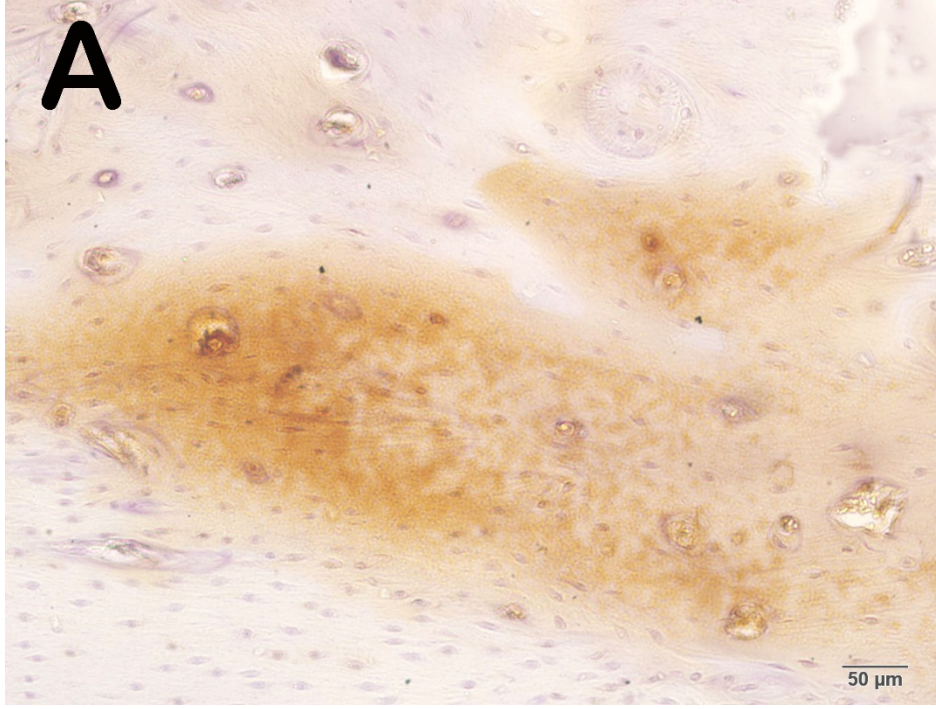


Şekil 33. NS tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde hafif seviyede kemik sialoprotein aktivitesi izlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 1.50 ± 0.54).

4.2.2.8. Nigella Sativa Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal

Bulgular

NS tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda orta derecede kemik sialoprotein pozitivitesi gözlemlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.46 ; Şekil 34).

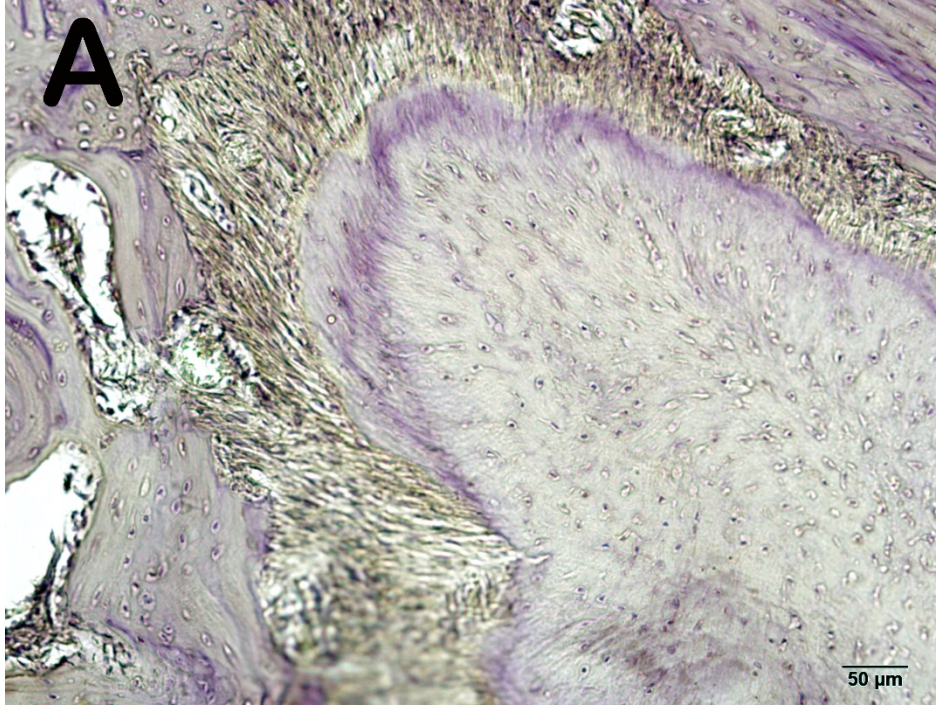


Şekil 34. NS tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde orta derecede kemik sialoprotein aktivitesi gözlemlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.46).

4.2.2.9. Nigella Sativa Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal

Bulgular

NS tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda yoğun düzeyde kemik sialoprotein pozitivitesi gözlemlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 3.00 ± 0.44 ; Şekil 35).



Şekil 35. NS tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde yoğun kemik sialoprotein aktivitesi gözlemlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 3.00 ± 0.44).

4.2.2.10. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 1. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

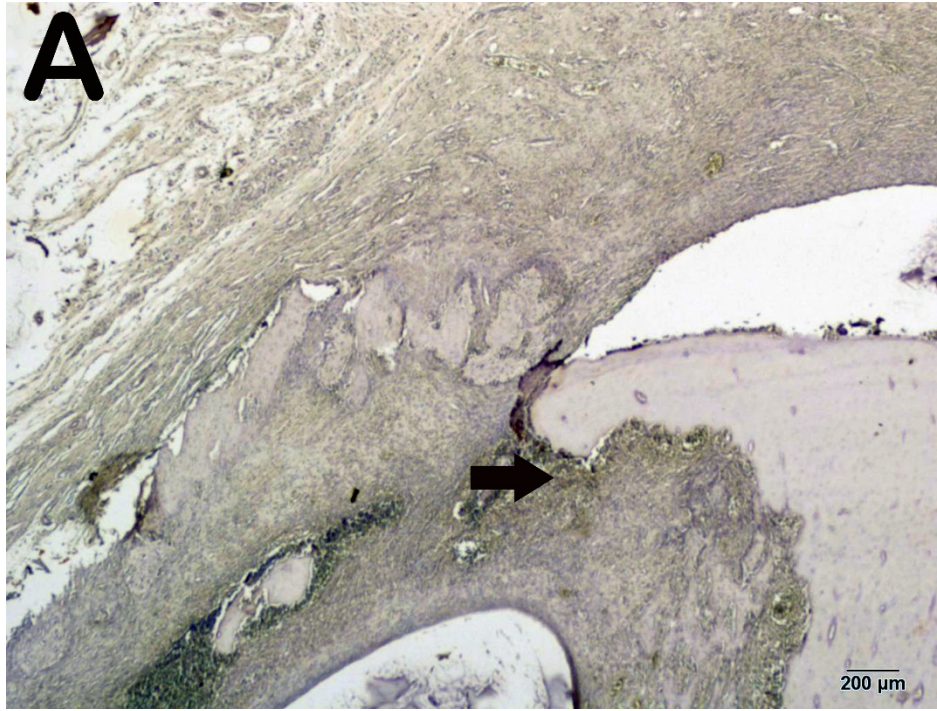
EA+NS kombine tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda orta yoğunlukta kemik sialoprotein pozitivitesi olduğu saptandı (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.57 ; Şekil 36).



Şekil 36. EA+NS kombine tedavisi 1. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde orta derecede kemik sialoprotein aktivitesi gözlemlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.00 ± 0.57).

4.2.2.11. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 3. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

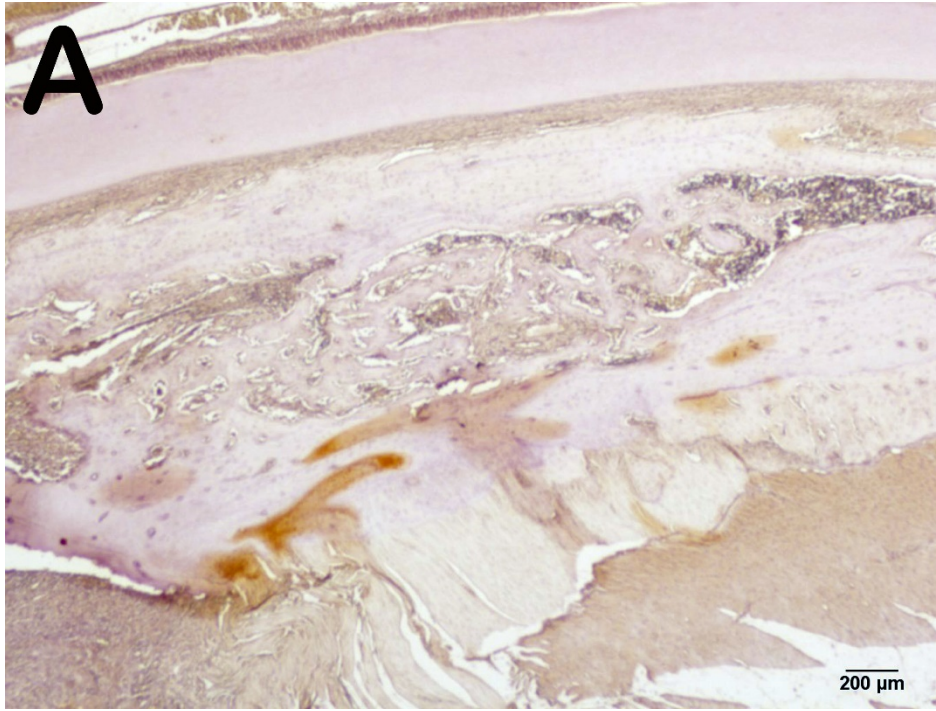
EA+NS kombine tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda orta seviyede kemik sialoprotein ekspresyonu izlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.50 ± 0.54 ; Şekil 37).



Şekil 37. EA+NS kombine tedavisi 3. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde orta seviyede kemik sialoprotein aktivitesi izlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 2.50 ± 0.54).

4.2.2.12. Equisetum Arvense ve Nigella Sativa Kombine Tedavisi 5. Hafta Grubuna Ait İmmunohistokimyasal Bulgular

EA+NS kombine tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde kemik dokusunda yoğun kemik sialoprotein pozitivitesi gözlemlendi (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 3.00 ± 0.46 ; Şekil 38).



Şekil 38. EA+NS kombine tedavisi 5. hafta grubuna ait mandibula kesitlerinde yoğun kemik sialoprotein aktivitesi gözlemlendi. x4. (Kemik sialoprotein pozitivite skoru: 3.00 ± 0.46).

4.3. Semi-Kantitatif Bulgular

4.3.1. Histopatolojik Kemik İyileşmesi Skoru

Alınan kestilerde yapılan ölçümler sonucunda histopatolojik kemik iyileşme skorlarının (HKİS) tüm kontrol gruplarında ilerleyen haftalar içinde anlamlı değişimler gösterdiği izlendi (Kontrol 1. hafta grubu HKİS: 1.0 ± 0.74 , kontrol 3. hafta HKİS: 2.00 ± 0.64 ve kontrol 5. hafta HKİS: 5.0 ± 0.76) ($p < 0.05$; Şekil 3-5; Tablo 3). Bunun yanında kontrol 1. hafta HKİS skoru 1.0 ± 0.74 'den EA uygulaması 1. haftada 3.00 ± 0.76 'e, EA uygulaması 3. haftada 5.00 ± 0.64 'e, EA uygulaması 5. haftada 7.00 ± 0.50 'e anlamlı olarak artmış olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$; Şekil 3, 6-8; Tablo 3). Kontrol grubu 1 hafta grubunda HKİS skoru 1.00 ± 0.74 'den NS uygulama 1. hafta grubunda 3.00 ± 0.64 'e, NS uygulama 3. hafta grubunda 4.00 ± 0.89 'a ve NS uygulama 5. hafta grubunda 7.00 ± 0.50 'ye yükselmiştir ($p < 0.05$; Şekil 3, 9-11; Tablo 3).

Kontrol grubu 3. hafta HKİS 2.00 ± 0.64 'den, EA uygulaması 3. haftada 5.00 ± 0.64 'e, EA uygulaması 5. haftada 7.00 ± 0.50 'e anlamlı olarak yükselmiş olduğunu saptandı ($p < 0.05$; Şekil 4, 7, 8; Tablo 3). Kontrol grubu 3. hafta grubunda HKİS skoru 2.00 ± 0.64 'den NS uygulama 5. hafta grubunda 7.00 ± 0.50 'e yükseldiği gözlemlendi. Ancak kontrol grubu 3. hafta HKİS skoru (HKİS skoru 2.00 ± 0.64) NS uygulama 3. hafta grubunda 4.00 ± 0.89 'a artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p > 0.05$; Şekil 4, 10, 11,; Tablo 3). Kontrol 3. hafta grubuna kıyasla EA 3. hafta grubunda ve EA+NS 3. hafta grubunda anlamlı artış gözlenirken NS uygulanan 3. hafta grubunda HKİS değeri 4.00 ± 0.89 'a artmasına rağmen; istatistiksel anlamda bir fark gözlenmedi. 3. haftada EA ve NS grupları arasında HKİS açısından fark gözlenmezken, EA+NS kombine tedavi grubu HKİS'in EA ve NS ekstraktlarının tek başına uygulandığı gruplara

göre daha yüksek değerde olduğu tespit edildi (sırasıyla $p<0.05$; $p>0.05$; Şekil 4, 13, Şekil 4, 10; $p>0.05$; Şekil 7, 10; $P<0.05$; Şekil 4, 13).

Ekstrakt uygulanan tüm gruplarda 3. haftada gözlenen iyileşmenin kontrol 5. hafta grubuyla aynı olduğu tespit edildi ($p>0.05$; Şekil 5, 7, 10, 13; Tablo 3). Ayrıca NS 1. hafta iyileşmesi EA 1. haftaya göre daha az iyileşme gösterirken (istatistiksel olarak anlamsız); 3. haftada gözlenen iyileşme skorlarında NS ekstraktının EA ekstraktıyla neredeyse aynı iyileşme oranına ulaştığı gözlenmiştir ($p>0.05$; Şekil 6, 7, 9, 10; Tablo3). Kombine tedavi 3. hafta iyileşmesinin NS 1. ve 3. hafta iyileşme skorlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu gözlenirken; kombine tedavi 3. hafta iyileşmesi NS 5. haftayla kıyaslandığında herhangi bir fark bulunmadı (sırasıyla $p<0.05$; Şekil 9, 10, 13; $p>0.05$; Şekil 11, 13; Tablo 3).

Kontrol 3. hafta grubu ile ekstrakt uygulanan tüm gruplardaki 1. hafta HKİS değerleri incelendiğinde iyileşmede istatistiksel anlamda fark gözlenmedi. (Kontrol 3. hafta HKİS: 2.00 ± 0.64 , EA 1. hafta HKİS: 3.00 ± 0.64 , NS 1. hafta HKİS: 3.00 ± 0.64 , EA+NS 1. hafta HKİS: 3.00 ± 0.54) ($p>0.05$; Şekil 4, 6, 9, 12; Tablo 3).

Kontrol 5. hafta grubunda HKİS 5.00 ± 0.76 'dan EA uygulaması 5. hafta grubunda 6.00 ± 0.46 'ya yükseldiği fakat istatistiksel anlamda fark bulunmadığı izlendi ($p>0.05$; Şekil 5, 8; Tablo 3). Bunun yanında NS 5. hafta ve EA+NS 5. hafta skorları kontrol grubu 5. hafta HKİS (HKİS 5.00 ± 0.76) ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.05$; Şekil 5, 11, 14; Tablo 3). Kontrol grubu 5. hafta HKİS skoru (HKİS: 5.0 ± 0.76) EA 3. hafta grubu ve NS 3. hafta grubu HKİS (HKİS: 4.0 ± 0.89) ve EA+NS kombine 3.hafta grubu HKİS değerleri benzerdi. ($p>0.05$; Şekil 5, 7, 10, 13; Tablo 3). NS uygulama 5. hafta grubunda iyileşme skoru (HKİS: 7.0 ± 0.50) kontrol 5. hafta grubuna (HKİS: 5.0 ± 0.76) kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$; Şekil 5, 11;

Tablo 3). EA+NS kombine tedavisi tüm gruplarının HKİS skorları kontrol 1., 3. ve 5. hafta gruplarının HKİS skorlarına kıyasla anlamlı olarak artmış olduğu gözlemlendi ($p<0.05$; Şekil 3-5, 12-14; Tablo 3). Bunun yanında EA+NS kombine tedavi gruplarında 3.ve 5. haftalarda gözlenen HKİS skorlarının yalnızca EA ve NS uygulanan grupların 3.ve 5.hafta HKİS'lerine kıyasla anlamlı olarak artış gösterdiği saptandı ($p<0.05$; Şekil 7, 8, 10, 11, 13, 14; Tablo 3).

Tablo 3. Histopatolojik Kemik İyileşme Skoru (HKİS) Analiz Sonuçları (Ayrıntılı) (Median±Standart sapma).

Gruplar	HKİS
Kontrol grubu 1.hafta	1.00±0.74 ^{c, e, g, i, j, l, n, r, x, z}
Kontrol grubu 3.hafta	2.00±0.64 ^{a, e, h, j, m, p, r, x, z}
Kontrol grubu 5.hafta	5.00±0.76 ^{a, c, f, g, i, k, l, p, r, y, z, β}
EA grubu 1.hafta	3.00±0.64 ^{a, e, i, j, m, p, r, x, z}
EA grubu 3.hafta	5.00±0.64 ^{a, c, g, f, j, l, p, r, y, z}
EA grubu 5.hafta	6.00±0.46 ^{a, c, f, g, i, j, l, n, s, y, β}
NS tedavisi 1.hafta	3.00±0.64 ^{a, e, h, i, j, l, p, r, x, z}
NS tedavisi 3.hafta	4.00±0.89 ^{a, d, h, i, j, m, n, r, x, z}
NS tedavisi 5.hafta	7.00±0.50 ^{a, c, e, g, i, k, l, n, r, y, γ}
EA+NS kombine tedavisi 1.hafta	3.00±0.54 ^{b, e, h, i, j, m, p, r, z}
EA+NS kombine tedavisi 3.hafta	7.00±0.46 ^{a, c, e, g, i, j, l, n, s, y}
EA+NS kombine tedavisi 5.hafta	8.00±0.54 ^{a, c, e, g, i, j, l, n, s, y}
Kruskal Wallis, Tamhane T2	
^a <i>p</i> <0.05 Kontrol 1.Hafta grubuna kıyasla, ^b <i>p</i> >0.05 Kontrol 1.Hafta grubuna kıyasla, ^c <i>p</i> <0.05 Kontrol 3.Hafta grubuna kıyasla, ^d <i>p</i> >0.05 Kontrol 3.Hafta grubuna kıyasla, ^e <i>p</i> <0.05 Kontrol 5.Hafta grubuna kıyasla, ^f <i>p</i> >0.05 Kontrol 5.Hafta grubuna kıyasla, ^g <i>p</i> <0.05 EA 1.Hafta grubuna kıyasla, ^h <i>p</i> >0.05 EA 1.Hafta grubuna kıyasla, ⁱ <i>p</i> <0.05 EA 3.Hafta grubuna kıyasla, ^j <i>p</i> >0.05 EA 3.Hafta grubuna kıyasla, ^k <i>p</i> <0.05 EA 5.Hafta grubuna kıyasla, ^l <i>p</i> >0.05 EA 5.Hafta grubuna kıyasla, ^m <i>p</i> <0.05 NS 1.Hafta grubuna kıyasla, ⁿ <i>p</i> >0.05 NS 1.Hafta grubuna kıyasla, ^o <i>p</i> <0.05 NS 3.Hafta grubuna kıyasla, ^p <i>p</i> >0.05 NS 3.Hafta grubuna kıyasla, ^q <i>p</i> <0.05 NS 5.Hafta grubuna kıyasla, ^r <i>p</i> >0.05 NS 5.Hafta grubuna kıyasla, ^s <i>p</i> <0.05 EA+NS 1.Hafta grubuna kıyasla, ^t <i>p</i> >0.05 EA+NS 1.Hafta grubuna kıyasla, ^u <i>p</i> <0.05 EA+NS 3.Hafta grubuna kıyasla, ^v <i>p</i> >0.05 EA+NS 3.Hafta grubuna kıyasla, ^w <i>p</i> <0.05 EA+NS 5.Hafta grubuna kıyasla, ^x <i>p</i> >0.05 EA+NS 5.Hafta grubuna kıyasla,	

4.3.2. Alkalen Fosfataz Pozitivite Skoru

Kontrol 3. ve 5. hafta alkalen fosfataz pozitive skorlarında 1. haftaya göre artış olduğu gözlemlendi. Kontrol 3. ve 5. hafta skorları arasında istatistiksel anlamlı bir fark izlenmedi (sırasıyla $p < 0.05$; $p > 0.05$; Şekil 15-17; Tablo 4). EA 1. hafta grubu ile kontrol 1. ve 3. hafta grupları arasında alkalen fosfataz pozitivitesinde fark gözlenmedi. EA 1. hafta grubu kontrol 5. hafta grubuyla kıyaslandığında EA grubunda alkalen fosfataz pozitivitesi düşük izlendi (sırasıyla $p > 0.05$; $p < 0.05$; Şekil 15-18; Tablo 4). Kontrol 1. haftaya göre; EA 3. hafta ve NS 3. hafta grupları kıyaslandığında pozitivite skorlarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$; Şekil 15, 19, 22; Tablo 4).

EA 5. hafta ve NS 5. hafta ALP pozitivite skorları tüm kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$; Şekil 15-17, 20,-29; Tablo 4).

EA ve NS kombine tedavi grubunda 5. hafta ALP pozitivite skorlarının tüm kontrol gruplarına göre yükselmiş olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$; Şekil 15-17, 26; Tablo 4). Sonuç olarak çalışma gruplarının hepsinde (EA, NS, EA+NS) 5. hafta ALP pozitivite skorunda kontrol 1., 3. ve 5. hafta ALP pozitivite skorlarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi.

Tablo 4. Alkalen fosfataz pozitivite skorlama bulguları (median±standart sapma).

Gruplar	AF Pozitivite Skoru
Kontrol 1.hafta	1.00±0.46 ^{e, g, i, k}
Kontrol 3.hafta	2.00±0.64 ^{a, k}
Kontrol 5.hafta	2.00±0.46 ^{a, d, g, k}
EA tedavisi 1.hafta	1.00±0.46 ^{e, g, f, i}
EA tedavisi 3.hafta	2.50±0.54 ^{a, d}
EA tedavisi 5.hafta	3.00±0.35 ^{a, b, c, d, h}
NS tedavisi 1.hafta	1.50±0.64 ^{e, i, i}
NS tedavisi 3.hafta	2.00±0.54 ^{a, i}
NS tedavisi 5.hafta	3.00±0.54 ^{a, b, c, d, g, h}
EA+NS kombine tedavisi 1.hafta	1.00±0.54 ^{j, k}
EA+NS kombine tedavisi 3.hafta	2.00±0.64 ^{a, i, k}
EA+NS kombine tedavisi 5.hafta	3.00±0.35 ^{a, b, c, d, g, h, i, j}
Kruskal Wallis, Tamhane T2 <i>^ap<0.05 Kontrol 1. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^bp<0.05 Kontrol 3. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^cp<0.05 Kontrol 5. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^dp<0.05 EA 1. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^ep<0.05 EA 3. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^fp<0.05 EA 5. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^gp<0.05 NS 1. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^hp<0.05 NS 3. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>ⁱp<0.05 NS 5. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^jp<0.05 EA+NS 1. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^kp<0.05 EA+NS 3. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^kp<0.05 EA+NS 5. hafta grubuna kıyasla</i>	

4.3.3. Kemik Sialoprotein Pozitivite Skoru

Kontrol 5. hafta grubu kemik sialoprotein pozitivite skorunun kontrol 1. ve 3. hafta gruplarına kıyasla artmış olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$; Şekil 27-29; Tablo 5). EA tedavisi 1. ve 3. hafta pozitivite skorları arasında fark gözlenmez iken EA 5. hafta pozitivite skoru EA 1. ve 3. haftalara göre artış gösterdi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. NS tedavisi 1. ve 3. hafta pozitivite skorları arasında fark gözlenmez iken NS 5. hafta pozitivite skoru 1. ve 3. haftalara göre artış gösterdi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p > 0.05$; $p < 0.05$; Şekil 30-32; Tablo 5) EA+NS kombine tedavisinde ilerleyen haftalarda pozitivite skorunda artış gözlemlendi. İstatistiksel olarak EA+NS 1. hafta grubuna kıyasla EA+NS 5. hafta grubu pozitivite skorundaki artış anlamlı olarak görüldü ($p < 0.05$; Şekil 36-38; Tablo 8).

EA 1. hafta kemik sialoprotein pozitivitesi skoru kontrol 5. hafta grubuyla kıyaslandığında benzer bulundu ($p > 0.05$; Şekil; 29, 30; Tablo 5). NS tedavi 5. hafta grubu kemik sialoprotein skorunun tüm kontrol gruplarına göre anlamlı artış gösterdiği izlendi ($p < 0.05$; Şekil; 27-29, 35; Tablo 5). Ayrıca EA+NS 3. hafta (Kemik sialoprotein pozitivite skoru; 2.50 ± 0.54) ve 5. hafta (Kemik sialoprotein pozitivite skoru; 3.00 ± 0.46) grupları tüm kontrol gruplarıyla kıyaslandığında kombine tedavi grupları sialoprotein pozitivite skorlarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$; Şekil; 27-29, 37,38; Tablo 5).

Tablo 5. Kemik sialoprotein pozitivite skorum bulgularını (median±standart sapma).

Gruplar	Kemik Sialoprotein Pozitivite Skorum
Kontrol 1.hafta	1.00±0.52 ^{c, d, e, h, f, i, j, k}
Kontrol 3.hafta	1.00±0.64 ^{c, d, e, f, h, i, j, k}
Kontrol 5.hafta	2.00±0.88 ^{a, b, e, f, i, j, k}
EA tedavisi 1.hafta	2.00±0.71 ^{a, b, f, i, k}
EA tedavisi 3.hafta	2.00±0.35 ^{a, b, f, i, k}
EA tedavisi 5.hafta	3.00±0.35 ^{a, b, c, d, e, g, h, i}
NS tedavisi 1.hafta	1.50±0.54 ^{l, f, j, k}
NS tedavisi 3.hafta	2.00±0.46 ^{a, b, i, f, k}
NS tedavisi 5.hafta	3.00±0.44 ^{a, b, c, d, e, g, h, i}
EA+NS kombine tedavi 1.hafta	2.00±0.57 ^{a, b, f, i, k}
EA+NS kombine tedavi 3.hafta	2.50±0.54 ^{a, b, g, h}
EA+NS kombine tedavi 5.hafta	3.00±0.46 ^{a, b, c, d, e, g, h, i}

Kruskal Wallis, Tamhane T2
^ap<0.05 Kontrol 1. hafta grubuna kıyasla,
^bp<0.05 Kontrol 3. hafta grubuna kıyasla,
^cp<0.05 Kontrol 5. hafta grubuna kıyasla,
^dp<0.05 EA 1. hafta grubuna kıyasla,
^ep<0.05 EA 3. hafta grubuna kıyasla,
^fp<0.05 EA 5. hafta grubuna kıyasla,
^gp<0.05 NS 1. hafta grubuna kıyasla,
^hp<0.05 NS 3. hafta grubuna kıyasla,
ⁱp<0.05 NS 5. hafta grubuna kıyasla,
^jp<0.05 EA+NS 1. hafta grubuna kıyasla,
^kp<0.05 EA+NS 3. hafta grubuna kıyasla,
^lp<0.05 EA+NS 5. hafta grubuna kıyasla,

4.4. Biyokimyasal Analiz Bulguları

Dental cerrahi frez ile oluşturulan kemik ve yumuşak dokuyu kapsayan yara dokusundaki hasar sonucunda serbest oksijen radikallerinin üretimine bağlı olarak gelişen oksidatif stres belirteçleri incelendiğinde; kontrol 5. hafta grubu TOS seviyesinin kontrol 1. hafta grubuna kıyasla anlamlı olarak yükseldiğini gözlemlendi (Tablo 6; $p<0.05$). TOS seviyesinin EA 1. hafta, NS 1. hafta ve EA+NS kombine 1. hafta gruplarında kontrol 1. hafta grubuna kıyasla anlamlı olarak artmış olduğunu saptandı (Tablo 6; $p<0.05$). EA, NS ve EA+NS ekstraktı uygulanan gruplar kendi aralarında kıyaslandığında ise 1. ve 5. haftalarda TOS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 6; $p>0.05$).

Total antioksidan kapasite bakımından gruplar incelendiğinde kontrol 5. hafta grubu TAS seviyesinin kontrol 1. hafta grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmış olduğu izlendi (Tablo 6; $p<0.05$). EA tedavi grubu, NS tedavi grubu ve EA+NS kombine tedavisi 1. hafta gruplarının TAS seviyeleri, kontrol 1. hafta grubu TAS seviyesine göre kıyaslandığında anlamlı olarak artmış olduğunu saptandı (Tablo 6; $p<0.05$). EA, NS ve EA+NS ekstraktı uygulanan gruplar kendi aralarında kıyaslandıklarında 1. ve 5. haftalarda TAS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 6; $p>0.05$).

Kemik iyileşmesinin belirteci olan osteokalsin ekspresyonunun kontrol 5. hafta grubunda kontrol 1. hafta grubuna kıyasla anlamlı olarak artmış olduğunu saptandı (Tablo 6; $p<0.05$). Bunun yanında EA 1. hafta grubu, NS 1. hafta grubu ve EA+NS kombine tedavisi 1. hafta grupları ile kontrol 1. hafta grubu osteokalsin ekspresyonları kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi (Tablo 6; $p>0.05$). Bunun aksine EA 5. hafta grubu, NS 5. hafta grubu ve EA+NS kombine 5. hafta

gruplarının kontrol 1. hafta grubuyla kıyaslamasında ekstrakt uygulanan gruplarda osteokalsin ekspresyonlarında artış gözlemlendi (Tablo 6; $p < 0.05$).

Osteoklast hücrelerinin aktivitesinin bir göstergesi olan NTX düzeyleri açısından gruplar değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark saptanmamıştır (Tablo 6; $p > 0.05$).

Tablo 6. Biyokimyasal Analiz Bulguları (mean±standart sapma).

Gruplar	TOS (μmol H_2O_2 Equivalent/L)	TAS (μmol H_2O_2 Equivalent/L)	Osteokalsin (ng/mL)	NTX (ng/mL)
Kontrol 1.hafta	93.63±27.04 ^e	0.75±0.36	49.29±14.03	30.65±17.83
Kontrol 5.hafta	59.91±17.07 ^{a,e}	1.29±0.11 ^a	58.51±7.28 ^{a,b,c,d}	44.20±5.20
EA tedavisi 1.hafta	63.35±14.60 ^{a,e}	1.69±0.36 ^a	65.40±15.33	43.13±17.73
EA tedavisi 5.hafta	66.21±18.21 ^{a,e}	1.50±0.32 ^a	55.08±7.68 ^{a,b,c,d}	50.96±17.20 ^e
NS tedavisi 1.hafta	49.20±13.75 ^{a,e}	1.62±0.28 ^a	49.43±17.14	16.14±19.73 ^e
NS tedavisi 5.hafta	93.41±13.75 ^{a,e}	1.33±0.36 ^a	79.41±11.8 ^{a,b,c,d}	56.24±15.30 ^d
EA+NS 1.hafta	45.17±25.80 ^{a,e}	1.36±0.36 ^a	52.49±21.72	29.18±19.32
EA+NS 5.hafta	28.01±17.74 ^a	1.59±0.28 ^a	65.35±8.71 ^{a,b,c,d}	44.51±13.49 ^e
One way ANOVA, Tukey <i>^ap<0.05 Kontrol 1. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^bp<0.05 EA 1. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^cp<0.05 NS 1. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^dp<0.05 EA+NS 1. hafta grubuna kıyasla,</i> <i>^ep<0.05 EA+NS 5. hafta grubuna kıyasla,</i>				

5. TARTIŞMA

Yara, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara iyileşmesi ise dokuda hemostazı takiben enflamasyon, proliferasyon, matürasyon ve remodeling işlemlerinden oluşan hasarlı bölgenin anatomik ve fonksiyonel özelliklerinin yeniden oluşturulmasını amaçlayan bir onarım sürecidir. Yara iyileşmesi prosesi yumuşak dokuda ve kemik dokuda aynı basamakları içerir, sonrasında değişen formasyonlarla devam eder.^{37,47,137}

Yara iyileşmesini etkileyen lokal ve genel sebepler vardır. Bu sebepler iyileşme basamaklarını farklı yollarda inhibe ederek fizyolojik iyileşmeyi bozmaktadır. Enfeksiyon, ödem, basınç, iskemi ve yabancı cisimler enflamatuvar fazı uzatarak iyileşme sürecini olumsuz etkileyen lokal faktörlerdir.^{138,139} Sistemik hastalıklar, yaş, beslenme, sigara, metabolik patolojiler, radyoterapi ve kemoterapi gibi yara iyileşmesini etkileyen durumlar ise genel faktörler arasında sayılır.¹⁴⁰⁻¹⁴⁴ Yara iyileşmesi; yapılan tüm işlemlerin başarısını belirleyen bir faktördür. Rutinde uygulanan diş çekimleri, gömülü diş operasyonları, implant uygulamaları, preprotetik uygulamalar ve ileri cerrahi işlemlerin tümünde; kemik ve yumuşak dokunun iyileşme süreçleri, başarı kriteri olarak ana etkeni üstlenmektedir.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

Oral mukozadaki yaralar da diğer yaralar gibi granülasyon dokusu ve epitelizasyon formasyonu ile iyileşmektedir. Bakteriyel kontaminasyonun ağız içinde sürekli olmasından dolayı oral bölgedeki cerrahi işlemlerde enfeksiyon riski yüksektir ve iyileşme sürecinde sıklıkla problemlerle karşılaşmaktadır.^{40,55,148-153} Bu faktörlerin iyileşme üzerindeki olumsuz etkilerini azaltabilmek, oral mukozadaki yaraları enfeksiyondan korumak ve iyileşmeye katkı sağlamak amacıyla cerrahi operasyon sonrası oluşan defektlerin rekonstrüksiyonunda, implant operasyonu sonrası veya çeşitli

nedenlerle oluşan mukozal dehissenslerin onarımında, metastatik çene hastalıkları ve osteoradyonekroz sonucu ekspoz olmuş maksillofasial kemik defektlerinin kapatılmasında,¹⁵⁴ preprotetik operasyonlarda,¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ yarık dudak-damak olgularında¹⁵⁸ ve oro-antral fistül onarımında^{159,160} yumuşak dokunun ve kemik dokunun iyileşmesine katkıda bulunacak materyal ve maddelere gereksinim duyulmaktadır.^{145-147,161-164}

Doku iyileşmesinin lokal ve genel faktörler sebebiyle komplike hale geldiği ve doğal iyileşme süreçlerinin yara sahasını kapatmada başarılı olamadığı ve kemik oluşumunu stimüle etmediği durumlarda iyileşmeyi en kısa zamanda hızlandıran tedavi basamaklarının araştırılması konusu halen güncelliğini ve önemini korumaktadır. Burada amaç, var olan patolojinin en az şekil ve fonksiyon kaybı olması kaydıyla hızla normal dokuya dönüşümünü destekleyen şartların sağlanabilmesi ve hastanın mevcut durumunu düzeltmeye yönelik tedavilerin yapılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda iyileşme sürecine pozitif etkisinin olduğu düşünülen birçok farmakolojik ajanın ve bitkisel karışımların araştırılmakta olduğunu görmekteyiz.¹⁶⁵⁻¹⁶⁹ Son yıllarda popülaritesi artan fitoterapinin, cerrahi alanda yumuşak ve sert doku iyileşmesi üzerine olan etkisinin incelenmesi esas alınmıştır. EA bitkisinin çeşitli organlarından elde edilen özütlerde; antiseptik, antioksidan, yatıştırıcı, antidepresan, hipoglisemik, antidiüretik ve karaciğer hastalıklarına karşı koruyucu etki etkilerinin olduğu görülmüştür.^{84,86,87,92,170,171} NS bitkisi ise antienflamatuar, antibakteriyel, antifungal, antikonvülsan, antioksidan antioksidatif, antienflamatuar, anti-tümör, anti-ülserojenik, kemopreventif ve hepatoprotektif özelliklere sahiptir. Genel olarak tüm çalışmalar NS'nin ve ana bileşenlerinin değerli olduğunu kanıtlamaktadır. Tüm bu farmakolojik etkilerin farklı enflamatuar hastalıklarda iyi bir tedavi alternatifi olacağı düşünülmektedir.^{95,97,100} Bu çalışmada, sağlıklı rat modelinde, EA ve NS ekstraktlarının lokal uygulamasının, yara iyileşmesi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Deneysel yara oluşturulan birçok çalışmada deney hayvanları kullanılmaktadır. Yapılan literatür taramalarında, yumuşak doku ve sert dokuya yönelik çalışmalarda genellikle rat femur ve kalvaryaya modellerinin seçilmiş olduğu gözlenmiştir. Schortinguis ve arkadaşları rat mandibulasında, Zwingerberger ve arkadaşları, He ve arkadaşları fare femurunda, Shirasu ve arkadaşları, Toker ve arkadaşları rat kalvaryasında, Bayat ve arkadaşları kedi maksillasında, Klaue ve arkadaşları koyun femurunda oluşturdukları kemik defektlerinde uygulama yapmışlardır.^{75,172-178} Bu çalışmada, EA ve NS'nin yumuşak doku iyileşmesindeki etkilerini ve kemik dokusundaki rejenerasyona olan etkilerini incelemek için rat mandibuler defekt modeli kullanılmıştır. Çünkü her ne kadar yakın histolojik özellikler gösterse de femur ve kalvaryanın mandibula ve maksilla kemiklerini tam olarak taklit edememesi, oral bölgenin kendine özgü mikroflorası, intraoral bölge mukozasının ve bağ dokusunun farklı özellikler barındırması sebebiyle, bu çalışmada deneyin ratlarda intraoral cerrahi yaklaşımla yürütülmesine karar verilmiştir.

Yapılan bir hayvan çalışmasında *Arnebia densiflora* bitki ekstraktının 3. ve 7. günde yara üzerindeki iyileştirici özelliği incelenmiştir. 3. gün sonunda kontrol grupları ile bitki ekstraktı uygulanan grup arasında fark gözlenmemiştir. Ancak; 7. gün sonunda ilgili bitki ekstraktının uygulandığı grupla kontrol grupları arasında önemli farklar bulunmuştur. Bitki ekstraktının oluşturulan yara bölgesinde iyileşme hızını artırdığı ve bunu antienflamatuar etki göstererek sağladığı belirtilmiştir.¹⁷⁹

Mariano ve arkadaşları CHX ve metranidazolün topikal uygulamasının ratların palatal mukozasında yumuşak doku iyileşmesini 3., 6. ve 10. günde değerlendirmişlerdir. Kontrol grubu harici diğer tüm gruplarda 6. günde palatal mukoza epitelinin bütünlüğünü sağladığını gözlemlemişlerdir.¹⁸⁰ Yapılan tez çalışmasında yumuşak dokudaki iyileşme

modelini değerlendirmek için 1. hafta histolojik ve biyokimyasal değerlendirme yapılması uygun görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda mandibuler defekti takiben geniş ödematoz alanlar ile eşlik eden akut inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu, fibroz kallus ve immatür kemik oluşumları gözleendiği bildirilmiştir. Han ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mandibuler kemik defektini takiben ilk üç gün herhangi bir immatür kemik oluşumu gözlememekle beraber defekt modelinin uygulanmasından 7 gün sonra az miktarda immatür kemik gelişimi gözlediklerini ve 5. haftadan itibaren belirgin immatür kemik gelişimi olduğunu raporlamıştır.¹⁸¹ Bu nedenle bu çalışmada da immatür kemik gelişimini izleyebilmek için 1. haftaya ilaveten 5. hafta çalışma grubu oluşturulmuştur.

Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada rat mandibuler defekt modelinde alveoler kemik formasyonu için terapötik yaklaşımları incelemişlerdir. 3. ve 6. haftada alınan kesitlerde implant ve çevresindeki matür kemik arasında gözlenen yeni kemik dokusu oluştuğunu savunmuşlardır.¹⁸² Bu çalışmada da kemik formasyonunun takibini değerlendirmek için ayrıca 3. hafta çalışma grubu eklenmiştir.

Mukoza ve kemik defektlerini kapsayan yaralarda yapılan işlemlerin iyileşmeye etkisinin hücrenel anlamda incelenmesinin daha anlamlı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu alandaki araştırmalarda deneysel hayvan çalışmalarının yapılması daha fazla kabul görmektedir.^{16,183,184}

İşler ve arkadaşlarının rat tibialarında 3 mm çapında ve 2 mm derinlikte kemik defekt modeli oluşturdukları çalışmada *Ankaferd Blood Stopper (ABS)*'nin enfeksiyon, nekroz, fibrozis ve erken kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Dokuların 7. gün histopatolojik değerlendirmesinde ABS uygulanan grupta enflamasyon, nekroz ve yeni kemik oluşumu açısından kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmuştur.¹⁸⁵

EA ve NS'nin antioksidan aktivitesi birçok çalışmada gösterilmiştir. Böylece EA ve NS ekstraktları serbest radikal kaynaklı birçok hastalıkta kullanılabilir bir fitoterapi malzemesi olarak görülmektedir. Uzun ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada erdostein tedavisinin (2 hafta boyunca 20 mg/kg/gün) TAS düzeyini arttırdığını, lipid peroksidasyonunu azalttığı tespit edildi.¹⁸⁶ Yapılan çalışmada ise kontrol gruplarıyla ekstrakt uygulanan rat grupları karşılaştırıldığında EA, NS ve EA+NS uygulanan ratların TAS değerleri yüksek olmakla birlikte, bu seviyelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi.

EA bitkisinin geleneksel olarak organ, doku ve ağız içi yaralanmalarında yaygın kullanım alanı vardır.¹⁸⁷ Broudiscou ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada EA bitki ekstraktının fermentasyon ve metagenesis yapan bakteriler üzerine etkilerini incelemişler ve EA'nın bakterilerde metan üretiminde inhibitör olduğunu bulmuşlardır.⁹² Mekhfi ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada EA'nın antiagregan etkilerinin olduğunu ve bu etkinin trombin ve ADP miktarını belirli dozda artırmak suretiyle gerçekleştirdiğini söylemişlerdir. Aynı çalışmada EA bitki özütünün sıçanlarda antihipertansif etkili olduğu da görülmüştür.¹⁷⁰ Bessa Pereirave ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada metanollü EA ekstraktının doza bağımlı olarak osteoblastların proliferasyonunu artırıcı etkisi tespit edilmiştir. Aynı zamanda, kemik enfeksiyonlarında sıklıkla rastlanan *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyal etkinlik görülmüştür.¹⁴

Yapılan birçok çalışmada EA'nın hidroalkolik ekstraktının analjezik, sedatif, antienflamatuar, antiseptik antidepresif, hipoglisemik ve diüretik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca insan karaciğerine uygulanmasıyla bitkinin hepatit üzerinde de olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. EA'nın tüm bu pozitif etkilerinin flavanoidler, steroidler ve diğer bileşenlerinden kaynaklanmış olabileceğini öne sürmüşlerdir.^{84, 171} Çalışmalarda ayrıca, EA bitkisinin su ve etanolla ekstrakte edilen bileşiminin

antioksidatif etkileri incelenmiştir. Etanolden elde edilen ekstraktların sudan elde edilene göre içerik bakımından daha zengin olduğu gözlenmiştir. Antioksidan aktivitenin de yine EA içeriğindeki flavanoidlerden kaynaklandığı ortaya konulmuştur.^{18,83,86,87} Bu çalışmada da EA'nın etanolden elde edilen ekstraktı kullanılmıştır.

Carneiro ve arkadaşlarının 36 sağlıklı erkek gönüllü üzerinde yaptıkları çalışmada 4 gün boyunca EA ekstraktı (900 mg / gün), plasebo (mısır nişastası, 900 mg / gün) ve diüretik bir ilaç olan hidroklorotiyazid (25 mg / gün) verilen gruplarda EA'nın diüretik etkileri araştırılmıştır. EA'nın diüretik etkisi negatif kontrol grubuna göre oldukça fazla, hidrokloro-tiyazid uygulanan grupla ise aynı etkiyi gösterdiği bulunmuştur. Yüksek oranda flavonoid, fenolik bileşik ve mineral tuzları içermesi EA'nın diüretik etkisini güçlendirmektedir. Ayrıca içeriğinde silika tuzlarının bol miktarda bulunması, EA'nın remineralizasyon özelliğine de sahip olabileceğini göstermektedir.¹⁸⁸

EA bitkisi tıbbi kullanımına ek olarak doza bağlı olarak toksik etkiye de sahiptir. Equisetum türlerinin toksik etkisinin "*thiaminase*" kimyasalından kaynaklandığı gösterilmiştir.¹⁸⁹ Oliveira ve arkadaşları EA'nın ağızdan izole edilen *S.mutans* türlerini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. EA'nın ayrıca *stafilokok* ve *candida* türlerine etkili olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada dört farklı bitkinin sitotoksitesisi incelenmiş, EA bu dört bitki içerisinde %50'den daha çok hücre ölümüne neden olduğu için en sitotoksik bitki olduğu belirtilmiştir.¹⁹⁰

Özay ve arkadaşları farelerde yaptıkları bir çalışmada EA'nın 14 günlük etkilerinde dermis ve epidermisin yeniden şekillendirilmesinde ve granülasyon dokusu kalınlığında önemli katkılarının olduğunu tespit edilmiştir.¹⁹ Ashrafi ve arkadaşları tavşanlarda 2. ve 3. haftadaki yumuşak doku yara iyileşmesi sürecini histopatolojik olarak

değerlendirdikleri bir çalışmada EA ekstraktının çinko oksitli kreme göre yara büyüklüğünü daha etkili bir şekilde azalttığını görmüşlerdir.¹⁹¹

Costa-Rodrigue ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada EA'nın hidrometanolik ekstraktının insanda osteoklastik aktiviteyi azalttığını tespit etmişler ve artmış osteoklastik aktivite ile birlikte patolojik durumlarda muhtemel bir yararın olabileceğini ifade etmişlerdir. EA'nın insan kemik iliği hücre kültürlerinde hücre proliferasyonunu, ALP aktivitesini ve bazı osteoblastik biyo-belirteçlerin gen ekspresyonunu uyarma yeteneğine sahip olduğu ve kemik rejenerasyonu ile ilgili potansiyel olarak ilginç bir profil gösterdiği kemik rejenerasyon stratejilerinde tedaviye katkı sağlayabileceği bildirilmiştir.⁷²

Bitkisel çalışmaların geneline bakıldığında oral cerrahi işlemlerde mukozal ve kemiksel iyileşmeyi incelemek amaçlı yapılan çalışmaların az olduğu görülmüştür. 2018'de yayınlanmış olan bir derlemeye göre EA bitkisinin oral yolla verilmesiyle normal ve fizyolojik olarak kemik ve kırık dokusu sentezini gerçekleştirdiği görülmüştür. EA'nın prolil-hidroksilaz enzimine olan katalitik etkisiyle patofizyolojik durumlarda osteoklastogenez inhibisyonu sağlayarak kemik rejenerasyonunu artırdığı düşünülmüştür. Deneysel olarak farelerde uzun süre dişlerin ve kemiklerin büyümesi üzerine EA ekstraktının etkilerini açıklayan kontrollü çalışmada EA'nın hem kırık dokusu hem de kemik dokusunda iyileşme sağladığı görülmüştür. EA ekstraktının ratların normal diyetine eklenmesi ile kemik uzunluğunda, kemik yoğunluğunda ve kompaktlığında artış ile belirgin bir iyileşme olduğu bildirilmiştir.¹⁹² Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak oral yolla değil doğrudan kemik üzerine EA ekstraktı uygulaması yapılmıştır. EA'nın kemik dokusu üzerindeki mevcut pozitif etkileri bu çalışmada da izlenmiştir.

NS halk arasında yaygın olarak kullanılan bir bitkidir. NS bitkisinden elde edilen ekstraktlar birçok farmakolojik etki göstermektedir. NS'nin, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi pek çok patojenik maya ve bakteriye karşı antibakteriyel etkinliği gösterilmiştir.¹⁹³ Arıcı ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada in vitro olarak NS ekstraktının antibakteriyel aktivitesi araştırılmış ve 24 farklı bakteriye karşı antibakteriyel etkisi olduğu görülmüştür. Bu etkinin timokinon, p-cymene ve karvakrol bileşenlerinin NS'de yüksek oranda bulunmasıyla ilişkili olabileceği söylenmiştir.¹⁷ Antienflamatuar, antioksidan, antibakteriyel ve benzeri yara iyileşmesini etkileyebilecek birçok etkisinden dolayı NS'nin yara iyileşmesine katkıda bulunacak alternatif bir ajan olacağı ileri sürülmektedir.^{15,99,193-196}

Serbest O₂ radikalleri hücre içinde mevcut olan nükleik asit, protein ve enzimlerde hasara neden olur. İnvitro olarak yürütülen çalışmalar; NS tohumlarının yılan ve akrep zehirlerinin yaptığı hemolitik aktiviteyi inhibe ederek H₂O₂'nin neden olduğu protein yıkımında ve dehidratasyonda osmotik frajiliteyi artırarak hücre bütünlüğünü koruduğunu göstermiştir. NS'nin bu aktivitesinin içeriğinde bulunan fosfolipidler ve çoklu doymamış yağ asitleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.^{193, 197, 198} Kanter ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada spinal kort hasarlı sıçanlarda NS tedavisinin doku malondialdehit (MDA) seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzimlerinin inhibisyonunu önlediği ileri sürülmüştür.¹⁹⁹ Yapılan çalışmalar NS etanolik ekstraktının mısır yağıyla kombine kullanımının, triaçilgliserolün oksidatif basamağının inhibisyonu ile eikazonoit yolağının bozulması ile sonuçlandığını göstermiştir. Ayrıca NS ekstraktının oral formlarının ratlarda glutatyon (GSH) ve NO seviyelerini normalize ettiğini ve oksidatif strese iyi bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.^{95,97,100} CCl₄

ile oluşturulan toksisite modelinde NS ekstraktının serum lipit düzeyinde iyileşme sağlayarak hepatotoksisiteye karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Bu etkisini yüksek olan potasyum ve kalsiyum seviyelerini düşürerek, alt seviyelerde seyreden hemoglobin, lökosit ve trombosit değerlerini iyileştirerek göstermiştir. Lipid peroksidasyonunu ve dolayısıyla karaciğer enzim seviyelerini düşürerek, non-oksidatif enzim seviyelerini artırmıştır. NS ekstraktının antioksidan aktivite göstererek tavşanlarda CCl₄ ile oluşturulan karaciğer fibrozisini önlediği ileri sürülmektedir.^{200,201} Neveen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NS'nin iyi bir radikal temizleyici olduğunu ve böylelikle hepatik lipid peroksidasyon düzeyini azaltabildiği ve glutatyon-S transferaz gibi hepatik enzimleri yükselttiği rapor edilmiştir.²⁰² NS ekstraktının ana kimyasalı olan TQ' nun ayrıca doza bağımlı bir şekilde serebral kortekste MDA düzeyini ve lipit peroksidasyonunu azaltarak akrilamid toksikasyonunun yol açtığı anomalileri azalttığı gösterilmiştir.²⁰³ Tüm bu bulgular NS ekstraktının potansiyel antioksidan etkilerini göstermektedir.

Akut ve kronik enflamasyon fazlarında makrofajlar ve nötrofiller tarafından salgılanan eikosanoidler, oksidanlar, sitokinler ve litik enzimler vb. çok sayıda mediyatör aracılık etmektedir. Nitrit oksit doku hasarına yol açan bir toksik oksidatif maddedir ve enflamasyonu indükler. Enflamasyona aynı zamanda siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri aracılık eder. Siklooksijenaz yoluyla, araşidonik asitten prostaglandinler ve tromboksan oluşurken, lipooksijenaz yoluyla lökotrienlerin formasyonu şekillenir.^{193,204,205} Pek çok in vitro çalışmada NS ekstraktının enflamasyon mediyatörlerinin üretimi üzerinde inhibitör etkileri bulunduğu gösterilmiştir. Örneğin, NS ekstraktının sıçan peritoneal lökositlerinde kalsiyum ionophore ile stimüle edilen araşidonik asit metabolizmasının hem siklooksijenaz hem de 5-lipooksijenaz yollarını inhibe ettiği görülmüştür. NS ekstraktının interlökin-3 ve interlökin 1-b üretimini

artırdığı, lenfositler ve makrofajlar üzerinden etkisini yürüttüğü yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. NS ekstraktının ve içeriğindeki TQ'nun ödem, ensefalomyelit, kolit, artrit gibi deneysel olarak oluşturulmuş enflamasyonlarda prostaglandin ve lökotrien düzeylerinde artışa neden olarak antienflamatuar etki gösterdiği gözlenmiştir. NS ekstraktının TQ ile polimorfonükleer lökositlerin (nötrofiller) in vitro tedavisinin etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada 5-lipooksijenaz ürünlerinin ve 5-hidroksi-eikosa-tetra-enoik asit üretiminin konsantrasyon bağımlı inhibisyon sağladığı görülmektedir. Bu nedenle, NS ekstraktının antienflamatuar etkileri hem siklooksijenaz hem de 5-lipooksijenaz yollarında inhibisyon yapmasıyla açıklanmaktadır. Yapılan diğer çalışmalarda lipopolisakkarite yanıt olarak gelişen endotoksin şokunda NS ekstraktının emülsiyon formunun enjeksiyonu ile endotoksin düzeylerinde anlamlı düşüş gözlenmiştir. Enflamasyona verilen immün yanıtın derecesi ve potensi, enflamatuar hücrelerin mevcut enflamasyon alanında toplanması ile kontrol edilmektedir. NS'nin enflamasyonu baskılayan inhibitör etkisine aracılık eden mekanizmanın kemokinlerin ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonundaki değişim olduğu düşünülmektedir.^{193,206-211}

NS'nin önemli özelliklerinden birisi de immünomodülatör etkinliğidir. Çalışmalar, yaklaşık on yıldan beri sürekli kullanıldığında NS'nin insanlarda immün yanıtı arttırabileceğini ileri sürmektedir. Etkili immünitinin sağlanması için hem patojenle ilişkili moleküler yapıları tanıyan doğal immünite hem de spesifik antijenleri tanıyan kazanılmış immünitinin olması gereklidir. Yapılan bir çalışmada 4 hafta boyunca NS ekstraktının oral yolla alınması ile CD₄ /CD₈ oranında %55'lik bir artış ve natural killer hücre fonksiyonunda %30'luk bir ilerleme gösterilmiştir. NS'nin bileşenlerinin T hücre aracılı immünite üzerinde güçlü potansiyelize edici etkileri ve B hücre aracılı immünite üzerinde süpressör etkilerinin bulunduğu söylenmektedir. Örneğin, 1 hafta NS tohumlarının sulu ekstraktlarının oral yolla verilmesi, kontrol naturel killer hücreleriyle

karşılaştırıldığında, splenik naturel killer hücre sayısını artırmaktadır. Bu durum NS ekstraktının hücrel immünite ve doğal immüntenin hücre fonksiyonlarını da artırma potansiyeli olduğuna işaret etmektedir.²¹²⁻²¹⁴

El-Kadi ve Kandil NS 'nin immün sistem üzerindeki etkisi incelenmiştir ve 2 günde 1 gram kullanımının T helper ve naturel killer hücre aktivitesini geliştirdiğini açıkça rapor etmiştir. NS ekstraktı yanmış yara modelinde yarayı iyileştirmeyi geliştirmek için kullanılmıştır. NS yara iyileşmesini hızlandırdığı, fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu artırdığı gözlenmiştir. NS ekstraktının ve aktif maddesi olan TQ'nun pozitif immünomodülatör özellikleri olduğunu ve bu etkiyi T hücresi ve natural killer hücresi aracılığıyla sağladığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Birçok çalışmada NS ekstraktının ve aktif bileşenlerinin potansiyel immünomodülatör etkileri olduğunu, antibakteriyel, antifungal, antihelmintik ve antiviral etkileri kapsayan antimikrobiyal etkileri gösterdiği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada NS ekstraktının farelerin sitomegalovirüs enfeksiyonuna daha dirençli hale gelmesiyle ortaya çıkan antiviral etkisinin makrofaj, CD₄ ve CD₈ hücrelerinden salgılanan IFN- γ üretimini artırarak sağladığı bulunmuştur.^{95-97,100,193,215,216}

NS'nin etkili bir antiosteopörotik ajan olduğu söylenmektedir. Sistemik uygulamasının kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, NS ekstraktının sıçan kalvaryal defekt modelinde kemik rejenerasyonunu artırdığı gözlenmiştir.⁹⁵ Yapılan bir diğer hayvan çalışmasında ise tavşanların diş çekim soketlerine uygulanan NS ekstrakt grubunun postoperatif 1. haftasının kontrol grubuyla karşılaştırılmasında soketin koronal kısmında bağ dokusunun aktif proliferasyonu ve osteoblast hücrelerinin varlığı gösterilmiştir. NS uygulanan grubun 6. haftasında ise yara bölgesinin epitel tabakasıyla kapandığını, kemiğin tüm servikal bölgeleri doldurduğu

histolojik ve radyografik (2 boyutlu görüntüleme) olarak gösterilmiştir. NS 'nin dokuda iltihaplanma belirtileri göstermeyen inert ve biyoyumlu bir bitki olduğu, epitel proliferasyonunu artırdığı, osteoblast hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını artırdığı ileri sürülmüştür. NS bu etkileri kemik dokuya özgü olan osteokalsin, kemik silaoprotein gibi proteinler üzerinden yaptığı düşünülmektedir.¹⁶ Bu çalışmada NS'nin kemik doku etkilerinin incelenmesi amaçlanarak oluşturulan defekt üzerine doğrudan uygulanmıştır. Çalışmadan ele edilen histolojik ve biyokimyasal bulgular yapılan diğer çalışmalarla korelasyon göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda NS içeriğindeki TQ'nun akut toksisitesinin çok düşük olduğu (LD₅₀ 2.4 g / kg) saptanmıştır. Timokinonun sürekli verilmesi sonucu görülen tek etkinin hipoglisemi olduğu ileri sürülmektedir.^{96,217} Yüksek LD₅₀ değeri, hepatik enzimlere zarar vermemesi ve tedavi boyunca değerlerindeki stabilitesi NS' nin tedavide kullanım güvenilirliği konusunda geniş bir alanı işaret etmektedir.²¹⁸

Çalışmanın 1. hafta HKİS bulguları değerlendirildiğinde EA ve NS tedavi grupları iyileşmesinin benzer ve kontrol 1. hafta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu, kombine tedavide gözlenen iyileşmenin ise kontrol 1. hafta grubuna göre skor değerinin arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Kontrol grubunun 3. haftasındaki HKİS skoruna tüm tedavi gruplarında (EA, NS ve EA+NS) 1. haftada ulaşıldığı gözlenmiştir. Bu çalışmada gözlenen sonuçlar kontrol grubunda geniş ödem alanları olduğunu göstermekte iken tedavi gruplarında enflamatuar hücrelerin bölgeye gelmesinden kaynaklı yaygın akut enflamasyon gözlenmiştir. Tedavi grupları kendi aralarında incelendiğinde ise kombine tedavinin 1. haftasında gözlenen kısa süreli yoğun akut enflamasyonun hücre proliferasyonunu hızlandırdığı düşünülmektedir. Kombine tedavinin 3. haftasındaki iyileşme skorunu EA'nın 1., 3. ve hatta 5. haftasına göre

istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Kombine tedavinin 3. haftasında gözlenen bu iyi sonuçların hücre proliferasyonunu ve dolayısıyla doku iyileşme hızını artırarak kemik doku oluşumunu pozitif etkilediği ve böylelikle 3. haftada immatür kemik gözlenmesine neden olduğu söylenilebilir. Bu etkinin ise EA ve NS'nin tek tek uygulanmasına göre kombine şekilde uygulanmasının 1+1>2 (sinerjistik etki) şeklinde etki gösterdiği düşünülmektedir.

ALP kemik dokunun yapım mekanizmalarını izlemek için kullanılan bir biyo-belirteçtir. Yapılan son çalışmalarda kemik alkalen fosfataz (BALP) ve osteokalsinin total ALP ölçümüne göre daha spesifik olduğu söylenmektedir ve bu sebeple BALP ve osteokalsin ölçümleri günümüzde daha sık tercih edilmektedir. Menapozla bağlı osteoporozla ilgili yapılan bir çalışmada ALP düzeylerinin normal sağlıklı kemik dokusuna sahip olan grupta ve orta-az derecede osteoporoz gözlenen grupta fark göstermediği; fakat ağır şiddette osteoporoz gözlenen grupta ALP değerlerinin anlamlı fark gösterdiği söylenmiştir. Mandibular kortikal genişliğin ise ALP ve NTX değerleriyle ilişkili olmadığı bulunmuştur. Bu sonuçla beraber ALP ve NTX düzeylerinin menopozdan sonra artmış kemik döngüsünü yansıtmayabileceği, genç yaşta yüksek kemik kütlelerini ve döngüsünü yansıtabileceğini belirtmişlerdir.^{120,219}

Farelerde kırık iyileşmesi modeli ile yapılan bir çalışmada *Silymarin (Silybum marianum)* bitki ekstraktının ALP ve osteokalsin ekspresyonunu artırdığı böylelikle osteoblast farklılaşmasını ve kemik biyo-belirteçlerinin gen ekspresyonunu tetikleyerek doğrudan kemik oluşturma aktivitesini canlandırabileceği söylenmiştir.²²⁰

Zhu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada maksillofasial fraktürleri olan hastalarda ALP, kalsiyum, fosfat ve magnezyum değerlerindeki değişimleri incelemişlerdir. Fraktür olan hastalarda sağlıklı hastalara kıyasla ALP seviyelerinde

yükselme olduğu ifade edilmiştir. Birden fazla fraktürü hattı olan hastaların ALP seviyelerinin tek fraktür hattı olan hastalara göre daha yüksek olduğu ve bu sonucun da travma olan bölgede osteoblastların aktivasyonunun daha fazla olmasıyla ortaya çıktığını açıklamışlardır.²²¹

Gerdhem ve arkadaşları, kemik döngüsünün bir belirteci olan idrar NTX düzeyleri ile ilgili kalça kırıklarında yürüttükleri çalışmada, yüksek düzeyde NTX değerleri saptamışlardır. NTX'in trabeküler kemiği de içeren kırık modellerinde öngörülebildiği ancak; kalça kırığı modelindeki gibi kortikal kemik yoğunluğunda anlamlı sonuç vermediğini söylemişlerdir.^{77,222-225}

NTX'in serum ve idrar düzeyleri postmenopozal durumlarda ve kanser gibi kemik dokunun yıkımıyla sonuçlandığı vakaların uzun dönem takibinde kullanılmaktadır. 6 haftalık, 12 haftalık ve yıllık takiplerde idrar NTX'in serum NTX'e göre daha anlamlı sonuçlar verdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada ise serum kemik markerları ve idrar NTX değerlerinin birbirine aynı oranda benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir. Uzun dönem takiplerde serum ve idrar NTX düzeyleri kemik rezorpsiyon belirteci olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada da immatür kemikleşme oranlarının karşılaştırılması istenerek serum NTX düzeyleri incelenmiştir ve tüm gruplarda 5. hafta NTX düzeyleri 1. haftaya göre yüksek bulunmuştur. Bu sonucun osteoblast ve osteoklastların aktivite artışı ve yeni oluşan kemik dokunun matür kemik dokusuna dönüştüğünü gösterdiğini düşünmekteyiz.^{219,226}

Yapılan literatür taramasında kanın oksidatif / antioksidatif durumunu saptamada oksidanların / antioksidanların tek tek ölçümünden ziyade toplam oksidan / antioksidan değerini veren TOS / TAS ölçümünün daha değerli bilgiler verdiği görülmüştür. Bu amaçla çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan defektlere uygulanan ekstraktların

oksidan / antioksidan etkilerini incelemek için *Erel* (2004) tarafından geliştirilen ve günümüzde sıklıkla kullanılan bir metod olan TAS ve TOS ölçümleri yapılmıştır.¹²⁹

Mevcut çalışmada BALP ve sialoprotein değerleri EA+NS kombine tedavi grubunda tüm kontrol gruplarına göre yüksek bulunmuştur. NTX düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Ekstrakt uygulanan tüm gruplarda 5.haftada gözlenen osteokalsin pozitivite skorları kontrol 1. hafta grubuna göre yüksek bulunmuştur. Bu bulgular çalışma gruplarında (EA, NS, EA+NS) mukozal iyileşmenin daha erken tamamlandığını ve kemik doku oluşumunun daha erken başladığını düşündürmektedir. 1. hafta HKİS skorlarında tedavi grupları (EA, NS, EA+NS) arasında istatistiksel olarak fark olmaması, EA ve NS'nin enflamasyon ve granülasyon dokusunu aynı etkide ve benzer oranlarda azalttığını göstermektedir. EA tedavisinin 3. haftadaki değerleri göz önünde bulundurulduğunda NS tedavisi 3. haftaya, EA ve kontrol grubu 1. hafta değerlerine göre daha yüksek bulunması EA'nın enflamasyona etkili bir ajan olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca NS tedavisi 5. hafta iyileşmesinin 3.hafta uygulamasına göre anlamlı artış göstermesi göz önünde bulundurulduğunda ise NS'nin kemik dokuda daha etkili olabileceği düşünülmektedir. Tüm tedavi gruplarındaki iyileşme skorları değerlendirildiğinde EA ve NS'nin tüm bu koruyucu ve tedavi edici özelliklerinin dokudaki akut enflamasyonu azaltarak fibröz kallusa geçişi hızlandırarak gösterdiğini düşünülmektedir. NS tedavisinin 5. hafta iyileşmesinde gözlenen bu ivmenin daha sonraki haftalarda devam edip etmeyeceği bilinmediğinden, kombine tedavinin 5. haftadan sonraki iyileşme değerlerinin tek başına uygulanan EA ve NS'ye göre iyileşme korelasyonu bilinmemektedir.

Bu çalışmadaki sonuçlar immatür kemik iyileşme değerlerini karşılaştırmaktadır. Matür kemik oluşumunda iyileşmenin hangi gruptan dolayı ortaya çıkacağı

söylenmemektedir. Bitki ekstraktlarının bu etkilerinin daha sonraki çalışmalarda değerlendirilmesi tavsiye edilebilir. Çalışmamızda bazı sınırlamalar mevcuttur. Ayrıca tedavi gruplarındaki HKİS skorlarının hangi mekanizmaları etkileyerek artırdığını ele alan diğer çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın antioksidanlar, enzimler, proteinler, mitokondriyal kalsiyum seviyeleri ve pro-enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu inceleyen ayrıntılı çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular, çene cerrahisinde yara iyileşmesinde mukoza defektlerinin tamirinde ve kemik rejenerasyonunda EA ve NS'nin terapötik stratejilere ek katkılar sağlayabileceğini düşündürmektedir. EA ve NS bitkilerinin etkilerini inceleyen bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların, yapılan literatür çalışmaları da göz önünde bulundurularak, kimyasal bileşenlerdeki maddelerin herhangi birinden kaynaklandığı söylenebileceği gibi, bu maddelerin birlikte sinerjistik etki sağlayarak yumuşak ve kemik doku iyileşmesinde daha etkili sonuçların elde edilmesini sağladığı da düşünülebilir. Kemik dokunun değişim süreçlerini remodeling aşamasında da değerlendirebilmek ve bu ekstraktların uzun dönem etkilerini de gözlemleyebilmek için daha uzun takibi olan çalışmalara ihtiyaç vardır. Mevcut histopatolojik ve biyokimyasal analiz değerlerinin seyrini, EA ve NS ekstraktlarının mevcut olan pozitif etkilerinin matür kemik dokusunda nasıl süreceleceğini inceleyen çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. EA ve NS'nin kemik iyileşmesi üzerine hangi fizyolojik basamağı etkilediğine dair daha fazla araştırma yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. MacKay DJ, Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Alternative medicine review*, 2003, 8: 359-378.
2. Çuhadar SFP, Haliloğlu S. Kobaylarda vitamin C ve vitamin E uygulamalarının yara iyileşmesi, doku mineral madde ve hidroksiprolin düzeyleri üzerine etkileri. 2012.
3. Phillips SJ. Physiology of wound healing and surgical wound care. *ASAIO journal*, 2000, 46: S2-S5.
4. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 1997, 77: 509-528.
5. Yalçın Ögbuh, Özkalp B. Vücut Hijyeninin Önemi ve Yara Bakımında Yeni Gelişmeler.
6. Mustoe TA, O'shaughnessy K, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006, 117: 35S-41S.
7. Norazlina M, Lee P, Lukman H, Nazrun A, Ima-Nirwana S. Effects of vitamin E supplementation on bone metabolism in nicotine-treated rats. *Singapore Medical Journal*, 2007, 48: 195.
8. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, 2001, 22: 2581-2593.
9. Van'T Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*, 2001, 103: 255-261.
10. Ehrenfest DMD, 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: 158-167.
11. Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: Histological study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 2007, 39: 788-796.
12. Tsuno H, Arai N, Sakai C, Okabe M, Koike C, Yoshida T, Nikaido T, Noguchi M. Intraoral application of hyperdry amniotic membrane to surgically exposed bone surface. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 2014, 117: e83-e87.
13. Hotwani K, Baliga S, Sharma K. Phytodentistry: use of medicinal plants. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 2014, 11: 233-251.
14. Bessa Pereira C, Gomes P, Costa-Rodrigues J, Almeida Palmas R, Vieira L, Ferraz M, Lopes M, Fernandes M. Equisetum arvense hydromethanolic extracts in bone

tissue regeneration: in vitro osteoblastic modulation and antibacterial activity. *Cell proliferation*, 2012, 45: 386-396.

15. Al-Ghamdi M. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001, 76: 45-48.

16. Al-Hijazi AY. Evaluation of the effect of *Nigella Sativa* oil and powder on socket healing process. *Evaluation*, 2013, 3.

17. Arici M, Sagdic O, Gecgel U. Antibacterial effect of Turkish black cumin (*Nigella sativa* L.) oils. *Grasas y Aceites*, 2005, 56: 259-262.

18. Nagai T, Myoda T, Nagashima T. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food chemistry*, 2005, 91: 389-394.

19. Ozay Y, Ozyurt S, Guzel S, Cimbiz A, Olgun EG, Cayci MK. Effects of *Equisetum arvense* Ointment on Dermal Wound Healing in Rats. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 2010, 22: 261-267.

20. Lang NP, Lindhe J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 2 Volume Set*. Baskı. John Wiley & Sons, 2015.

21. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's clinical periodontology*. Baskı. Elsevier health sciences, 2011.

22. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clinics in dermatology*, 2000, 18: 499-511.

23. Yücetaş Ş. *Ağız ve çevre dokusu hastalıkları*. Baskı. Atlas Kitapçılık, 2005.

24. Krstic RV. *Human microscopic anatomy: an atlas for students of medicine and biology*. Baskı. Springer Science & Business Media, 2013.

25. Bhaskar S. *Orban's Oral Histology And Embryology, 11E. Edition. St. Louis: CV Mosby*, 1991: 178.

26. Markiewicz MR, Margarone JE, Barbagli G, Scannapieco FA. Oral mucosa harvest: an overview of anatomic and biologic considerations. *EAU-EBU update series*, 2007, 5: 179-187.

27. Hollins C. *Basic guide to anatomy and physiology for dental care professionals*. Baskı. John Wiley & Sons, 2012.

28. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology E-Book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2006: 367-379.

29. Carranza FA, Cabrini RL. Mast cells in human gingiva. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1955, 8: 1093-1099.

30. Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers: a review. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 1974, 3: 291-316.
31. Oksala O, Salo T, Tammi R, Häkkinen L, Jalkanen M, Inki P, Larjava H. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1995, 43: 125-135.
32. Luomanen M, Tiitta O, Heikinheimo K, Leimola-Virtanen R, Heinaro I, Happonen RP. Effect of snuff and smoking on tenascin expression in oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 1997, 26: 334-338.
33. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *The American Journal of Surgery*, 1993, 165: 728-737.
34. Forrest L. Current concepts in soft connective tissue wound healing. *British Journal of Surgery*, 1983, 70: 133-140.
35. Hesp W, Hendriks T, Schillings P, Lubbers E, De Boer H. Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. *British journal of experimental pathology*, 1985, 66: 511.
36. Porras-Reyes BH, Mustoe TA. Platelet-activating factor: improvement in wound healing by a chemotactic factor. *Surgery*, 1992, 111: 416-423.
37. Broughton Gn, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117.
38. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*, 2007, 25: 9-18.
39. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Advances in skin & wound care*, 2004, 17: 24-35.
40. Bertolami C, Ellis D, Donoff R. Healing of cutaneous and mucosal wounds grafted with collagen-glycosaminoglycan/silastic bilayer membranes: a preliminary report. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1988, 46: 971-978.
41. Szpaderska A, Zuckerman J, DiPietro L. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *Journal of dental research*, 2003, 82: 621-626.
42. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 1999, 341: 738-746.
43. Brandão ML, Reis PRM, Araújo LAd, Araújo ACV, Santos MHdAS, Miguel MP. Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and Aloe Vera extract in rats. *Acta cirurgica brasileira*, 2016, 31: 570-577.

44. van Beurden HE. *Characterization of fibroblast phenotypes in intra-oral wound healing*. Baskı. [Sl: sn], 2006.
45. Kirsner RS, Eaglstein WH. The wound healing process. *Dermatologic clinics*, 1993, 11: 629-640.
46. Niesler CU, Ferguson MW. TGF- β superfamily cytokines in wound healing. İçinde: *TGF- β and related cytokines in inflammation*, Springer, 2001: 173-198.
47. Steed DL. Wound-healing trajectories. *The Surgical clinics of North America*, 2003, 83: 547-555, vi-vii.
48. Zhang Q-X, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender KT, Ko W, Rosengart TK. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *Journal of surgical research*, 1997, 67: 147-154.
49. Desmouliere A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell biology international*, 1995, 19: 471-476.
50. Compton C, Gill J, Bradford D, Regauer S, Gallico G, O'connor N. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1989, 60: 600-612.
51. McGrath MH. The effect of inhibition of angiogenesis in granulation tissue on wound healing and the fibroblast. *Annals of plastic surgery*, 1985, 15: 105-122.
52. Hunt T, Knighton D, Thakral K, Andrews W. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery*, 1984, 96: 48-54.
53. Harrison JW. Healing of surgical wounds in oral mucoperiosteal tissues. *Journal of endodontics*, 1991, 17: 401-408.
54. Miloro M, Ghali G, Larsen P, Peterson LJ, Waite P. *Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery*. Baskı. PMPH-USA, 2004.
55. Sciubba JJ, Waterhouse JP, Meyer J. A fine structural comparison of the healing of incisional wounds of mucosa and skin. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 1978, 7: 214-227.
56. Gauperaa T, Seljelid R. Plasma fibronectin is sequestered into tissue damaged by inflammation and trauma. *Acta chirurgica scandinavica*, 1986, 152: 85-90.
57. Hsieh P, Chen LB. Behavior of cells seeded in isolated fibronectin matrices. *The Journal of cell biology*, 1983, 96: 1208-1217.

58. Kurisu K, Ohsaki Y, Nagata K, Kukita T, Yoshikawa H, Inai T. Immunoelectron microscopic localization of fibronectin in the smooth muscle layer of mouse small intestine. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1987, 35: 411-417.
59. Tsuji K, Eguchi Y, Kodama M. Postoperative hypercoagulable state followed by hyperfibrinolysis related to wound healing after hepatic resection. *Journal of the American College of Surgeons*, 1996, 183: 230-238.
60. Bogden A, Moreau J, Eden P. Proliferative response of human and animal tumours to surgical wounding of normal tissues: onset, duration and inhibition. *British journal of cancer*, 1997, 75: 1021.
61. Form D, Pratt B, Madri J. Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1986, 55: 521-530.
62. Miro D, Julia MV, Sitges-Serra A. Wound breaking strength and healing after suturing noninjured tissues. *Journal of the American College of Surgeons*, 1995, 180: 659-665.
63. Miller EJ, Gay S. [1] The collagens: An overview and update. İçinde: *Methods in enzymology*, Elsevier, 1987: 3-41.
64. Kjolseth D, Frank JM, Barker JH, Anderson GL, Rosenthal AI, Acland RD, Schuschke D, Campbell FR, Tobin GR, Weiner LJ. Comparison of the effects of commonly used wound agents on epithelialization and neovascularization. *Journal of the American College of Surgeons*, 1994, 179: 305-312.
65. Selçuk A. Devekuşu (struthio camelus) yumurta kabuk zarının tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan palatinal mukoza yaralarının iyileşmesi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2013.
66. Roberts WE, Hartsfield Jr JK In *Bone development and function: genetic and environmental mechanisms*, Seminars in Orthodontics, (editör).[^](editörler). Elsevier: 2004; 100-122.
67. Akman Ş, Gögüs A, Sener N, Bilgiç B, Aksoy B, Seckin F. Effect of diclofenac sodium on union of tibial fractures in rats. *Advances in therapy*, 2002, 19: 119-125.
68. Hall JE. *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2015.
69. Bartl R, Frisch B, Tresckow E, Bartl C. *Bisphosphonates in medical practice: actions-side effects-indications-strategies*. Baskı. Springer Science & Business Media, 2007.
70. Hernandez-Gil IF-T, Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Jerez LB. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral*, 2006, 11: E47-51.

71. Cetinus E, Kılınç M, Uzel M, Inanç F, Kurutaş EB, Bilgic E, Karaoguz A. Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2005, 125: 376-380.
72. Costa-Rodrigues J, Carmo SC, Silva JC, Fernandes MH. Inhibition of human in vitro osteoclastogenesis by *Equisetum arvense*. *Cell Prolif*, 2012, 45: 566-576.
73. KALFAS IH. Principles of bone healing. *Neurosurg. Focus*, 2001, 10: 1.
74. Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. *Principles of bone biology*. Baskı. Academic Press, 2008.
75. Shirasu N, Ueno T, Hirata Y, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Sawaki M, Wakimoto M, Ota A, Imura H. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta histochemica*, 2010, 112: 270-277.
76. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic histology: text & atlas*. Baskı. McGraw-Hill New York, 2003.
77. Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporosis international*, 2009, 20: 843-851.
78. Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *Journal of orthopaedic science*, 2000, 5: 64-70.
79. Toroğlu S, Çenet M. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2006, 9: 12-19.
80. Ersöz T. Bitkisel Tedaviye Bilimsel Bakış: Doğrular ve Yanlışlar. *Journal of Pediatric Infection*, 2011, 5: 217-222.
81. Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2011, 11: 52-67.
82. Beckert C, Horn C, Schnitzler J-P, Lehning A, Heller W, Veit M. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense*. *Phytochemistry*, 1997, 44: 275-283.
83. Čanadanović-Brunet JM, Četković GS, Djilas SM, Tumbas VT, Savatović SS, Mandić AI, Markov SL, Cvetković DD. Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 2009, 44: 269-278.

84. Do Monte FcHM, dos Santos Jr JG, Russi M, Lanziotti VMNB, Leal LKAM, de Andrade Cunha GM. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacological research*, 2004, 49: 239-243.
85. Štajner D, Popović B, Čanadanović-Brunet J, Boža P. Free radical scavenging activity of three *Equisetum* species from Fruška gora mountain. *Fitoterapia*, 2006, 77: 601-604.
86. dos Santos Junior JG, do Monte FHM, Blanco MM, Lanziotti VMdNB, Maia FD, de Almeida Leal LK. Cognitive enhancement in aged rats after chronic administration of *Equisetum arvense* L. with demonstrated antioxidant properties in vitro. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2005, 81: 593-600.
87. Oh H, Kim D-H, Cho J-H, Kim Y-C. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 95: 421-424.
88. Doi K, Kojima T, Fujimoto Y. Mulberry leaf extract inhibits the oxidative modification of rabbit and human low density lipoprotein. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2000, 23: 1066-1071.
89. Sakurai N, Iizuka T, Nakayama S, Funayama H, Noguchi M, Nagai M. Vasorelaxant activity of caffeic acid derivatives from *Cichorium intybus* and *Equisetum arvense*. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2003, 123: 593-598.
90. Vlachojannis C, Magora F, Chrubasik S. Rise and fall of oral health products with Canadian bloodroot extract. *Phytotherapy Research*, 2012, 26: 1423-1426.
91. Trouillas P, Calliste C-A, Allais D-P, Simon A, Marfak A, Delage C, Duroux J-L. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food chemistry*, 2003, 80: 399-407.
92. Broudiscou L-P, Papon Y, Broudiscou AF. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, 2000, 87: 263-277.
93. Radulović N, Stojanović G, Palić R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 2006, 20: 85-88.
94. Milovanović V, Radulović N, Todorović Z, Stanković M, Stojanović G. Antioxidant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five Serbian *Equisetum* species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2007, 62: 113-119.

95. Ezirganli S, Kazancioglu HO, Ozdemir H, Inan DS, Tek M. The Effects of Nigella Sativa Seed Extract on Bone Healing in an Experimental Model. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2016, 27: 1905-1909.
96. Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Sohaibani MO, Al-Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 1997, 75: 1356-1361.
97. Javidi S, Razavi BM, Hosseinzadeh H. A review of neuropharmacology effects of Nigella sativa and its main component, thymoquinone. *Phytotherapy Research*, 2016, 30: 1219-1229.
98. Randhawa MA, Al-Ghamdi MS. A review of the pharmaco-therapeutic effects of Nigella sativa. *Pak J Med Res*, 2002, 41: 77-83.
99. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International immunopharmacology*, 2006, 6: 1135-1142.
100. Erboga M, Kanter M, Aktas C, Sener U, Erboga ZF, Donmez YB, Gurel A. Thymoquinone ameliorates cadmium-induced nephrotoxicity, apoptosis, and oxidative stress in rats is based on its anti-apoptotic and anti-oxidant properties. *Biological trace element research*, 2016, 170: 165-172.
101. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17: 300-312.
102. Kılıç A. Methods of essential oil production. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 2008, 10: 37-45.
103. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters*, 1991, 281: 9-19.
104. Lehotay SJ. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *Journal of chromatography A*, 1997, 785: 289-312.
105. Amarowicz R, Estrella I, Hernández T, Robredo S, Troszyńska A, Kosińska A, Pegg RB. Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food chemistry*, 2010, 121: 705-711.
106. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*, 2003, 22: 18-35.
107. Rietjens IM, Boersma MG, de Haan L, Spenklink B, Awad HM, Cnubben NH, van Zanden JJ, van der Woude H, Alink GM, Koeman JH. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2002, 11: 321-333.

108. Santos H, Capelo J. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, 2007, 73: 795-802.
109. Capelo J, Mota A. Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry*, 2005, 1: 193-201.
110. Tadeo JL, Sánchez-Brunete C, Albero B, García-Valcárcel AI. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of chromatography A*, 2010, 1217: 2415-2440.
111. MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86: 2046-2056.
112. Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 2002, 13: 105-113.
113. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, 52: 7970-7981.
114. Garnero P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: Applications for osteoporosis. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 1998, 27: 303-323.
115. Watts NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clinical Chemistry*, 1999, 45: 1359-1368.
116. Magnusson P, Häger A, Larsson L. Serum osteocalcin and bone and liver alkaline phosphatase isoforms in healthy children and adolescents. *Pediatric research*, 1995, 38: 955.
117. Gomez B, Ardakani S, Ju J, Jenkins D, Cerelli MJ, Daniloff GY, Kung VT. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clinical Chemistry*, 1995, 41: 1560-1566.
118. Farley J, Chesnut C, Baylink D. Improved method for quantitative determination in serum of alkaline phosphatase of skeletal origin. *Clinical Chemistry*, 1981, 27: 2002-2007.
119. Özgürtaş T, Kutluay T. Yeni kemik markörleri ve klinik kullanımları. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2001, 21: 523-527.
120. Brown JP, Albert C, Nassar BA, Adachi JD, Cole D, Davison KS, Dooley KC, Don-Wauchope A, Douville P, Hanley DA. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clinical biochemistry*, 2009, 42: 929-942.

121. Gordon JA, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*, 2007, 41: 462-473.
122. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1999, 10: 79-98.
123. Fisher L, Torchia D, Fohr B, Young M, Fedarko N. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochemical and biophysical research communications*, 2001, 280: 460-465.
124. Katzman DK, Bachrach LK, Carter DR, Marcus R. Clinical and anthropometric correlates of bone mineral acquisition in healthy adolescent girls. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1991, 73: 1332-1339.
125. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *Journal of cellular physiology*, 2013, 228: 1149-1153.
126. Delmas P, Christiansen C, Mann K, Price P. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *Journal of bone and mineral research*, 1990, 5: 5-11.
127. Valizadeh N, Zakeri H, Shafiee A, Sarkhail P, Heshmat R, Sereshti H, Larijani B. Impact of Black seed (*Nigella sativa*) extract on bone turnover markers in postmenopausal women with osteoporosis. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015: 20-25.
128. Cremers S, Garnero P. Biochemical markers of bone turnover in the clinical development of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease. *Drugs*, 2006, 66: 2031-2058.
129. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 2004, 37: 112-119.
130. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 2005, 38: 1103-1111.
131. Song F, Jia W, Yao Y, Hu Y, Lei L, Lin J, Sun X, Liu L. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clinical science*, 2007, 112: 599-606.
132. Fabbrini E, Serafini M, Baric IC, Hazen SL, Klein S. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. *Diabetes*, 2014, 63: 976-981.
133. Wagener F, Carels C, Lundvig D. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. *International journal of molecular sciences*, 2013, 14: 9126-9167.

134. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 29: 1106-1114.
135. Durmuş K, Turgut NH, Doğan M, Tuncer E, Özer H, Altuntaş E, Akyol M. Histopathological evaluation of the effect of locally administered strontium on healing time in mandibular fractures: An experimental study. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*, 2017, 26: 1063-1067.
136. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, 2004, 37: 277-285.
137. Clark RA. Biology of dermal wound repair. *Dermatologic clinics*, 1993, 11: 647-666.
138. Kivisaari J, Vihersaari T, Renvall S, Niinikoski J. Energy metabolism of experimental wounds at various oxygen environments. *Annals of surgery*, 1975, 181: 823.
139. Simman R, Alani H, Williams F. Effect of mitomycin C on keloid fibroblasts: an in vitro study. *Annals of plastic surgery*, 2003, 50: 71-76.
140. Gerstein AD, Phillips TJ, Rogers GS, Gilchrest BA. Wound healing and aging. *Dermatologic clinics*, 1993, 11: 749-757.
141. Barbul A, Purtill WA. Nutrition in wound healing. *Clinics in dermatology*, 1994, 12: 133-140.
142. Ekmektzoglou KA, Zografos GC. A concomitant review of the effects of diabetes mellitus and hypothyroidism in wound healing. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2006, 12: 2721.
143. Deliaert A, Van den Kerckhove E, Tuinder S, Noordzij S, Dormaar T, van der Hulst R. Smoking and its effect on scar healing. *European journal of plastic surgery*, 2012, 35: 421-424.
144. Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: review of the literature. *Radiation Oncology*, 2012, 7: 162.
145. Fowler EB, Breault LG, Rebitski G. Ridge preservation utilizing an acellular dermal allograft and demineralized freeze-dried bone allograft: Part I. A report of 2 cases. *Journal of periodontology*, 2000, 71: 1353-1359.
146. Tal H. Subgingival acellular dermal matrix allograft for the treatment of gingival recession: A case report. *Journal of periodontology*, 1999, 70: 1118-1124.
147. Speroni S, Ciccì M, Maridati P, Grossi GB, Maiorana C. Clinical investigation of mucosal thickness stability after soft tissue grafting around implants: a 3-year retrospective study. *Indian Journal of Dental Research*, 2010, 21: 474.

148. Doillon CJ. Porous collagen sponge wound dressings: in vivo and in vitro studies. *Journal of biomaterials applications*, 1987, 2: 562-578.
149. Chung JH, Cho KH, Lee DY, Kwon OS, Sung M-W, Kim KH, Eun HC. Human oral buccal mucosa reconstructed on dermal substrates: a model for oral epithelial differentiation. *Archives of dermatological research*, 1997, 289: 677-685.
150. May SR. The effects of biological wound dressings on the healing process. *Clinical materials*, 1991, 8: 243-249.
151. Gao Z, Hao Z, Li Y, Im M, Spence R. Porcine dermal collagen as a wound dressing for skin donor sites and deep partial skin thickness burns. *Burns*, 1992, 18: 492-496.
152. Bessho K, Murakami K, Iizuka T. The use of a new bilayer artificial dermis for vestibular extension. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1998, 36: 457-459.
153. Güngörmüş M, Kaya Ö. Evaluation of the effect of heterologous type I collagen on healing of bone defects. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2002, 60: 541-545.
154. Chandarana SP, Chanowski EJ, Casper KA, Wolf GT, Bradford CR, Worden FP, Eisbruch A, Chepeha DB. Osteocutaneous free tissue transplantation for mandibular osteoradionecrosis. *Journal of reconstructive microsurgery*, 2013, 29: 005-014.
155. Güler R, Ercan M, Ulutuncel N, Devrim H, Uran N. Measurement of blood flow by the ¹³³Xe clearance technique to grafts of amnion used in vestibuloplasty. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1997, 35: 280-283.
156. Bholá M, Newell DH, Hancock EB. Acellular dermal allograft for vestibuloplasty—an alternative to autogenous soft tissue grafts in preprosthetic surgical procedures: a clinical report. *Journal of Prosthodontics*, 2003, 12: 133-137.
157. Kothari CR, Goudar G, Hallur N, Sikkerimath B, Gudi S, Kothari MC. Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: a clinical study. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2012, 50: 545-549.
158. Duskova M, Leamerova E, Sosna B, Gojis O. Guided tissue regeneration, barrier membranes and reconstruction of the cleft maxillary alveolus. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2006, 17: 1153-1160.
159. Waldrop TC, Semba SE. Closure of oroantral communication using guided tissue regeneration and an absorbable gelatin membrane. *Journal of periodontology*, 1993, 64: 1061-1066.
160. Visscher SH. Biodegradable polyurethane for closure of oroantral communications. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2010, 68: 1384-1391.

161. Cortellini P, Prato GP, Tonetti MS. Interproximal free gingival grafts after membrane removal in guided tissue regeneration treatment of intrabony defects. A randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontology*, 1995, 66: 488-493.
162. Peterson LJ, Crump TB, Rivera-Hidalgo F, Harrison JW, Williams FE, Guo IY. Influence of three membrane types on healing of bone defects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 1996, 82: 365-374.
163. Rastogi S, Modi M, Sathian B. The efficacy of collagen membrane as a biodegradable wound dressing material for surgical defects of oral mucosa: a prospective study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2009, 67: 1600-1606.
164. Narang S, Gupta R. Evaluation of resorbable membrane in treatment of human gingival isolated buccal recession. *Indian Journal of Dental Research*, 2011, 22: 749.
165. Akturk O, Tezcaner A, Bilgili H, Deveci MS, Gecit MR, Keskin D. Evaluation of sericin/collagen membranes as prospective wound dressing biomaterial. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2011, 112: 279-288.
166. Mian E, Martini P, Beconcini D, Mian M. Healing of open skin surfaces with collagen foils. *International journal of tissue reactions*, 1992, 14: 27-34.
167. Asadi SY, Parsaei P, Karimi M, Ezzati S, Zamiri A, Mohammadzadeh F, Rafieian-Kopaei M. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on healing process of surgical wounds in rat. *International Journal of Surgery*, 2013, 11: 332-337.
168. Sandberg E, Dahlin C, Linde A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1993, 51: 1106-1114.
169. Atila A, Halici Z, Cadirci E, Karakus E, Palabiyik SS, Ay N, Bakan F, Yilmaz S. Study of the boron levels in serum after implantation of different ratios nano-hexagonal boron nitride–hydroxy apatite in rat femurs. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 58: 1082-1089.
170. Mekhfi H, El Haouari M, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, Remmal A, Ziyat A. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 94: 317-322.
171. Dos Santos Jr J, Blanco M, Do Monte F, Russi M, Lanziotti V, Leal L, Cunha G. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense*. *Fitoterapia*, 2005, 76: 508-513.
172. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Archives of oral biology*, 2012, 57: 1545-1550.
173. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. A comparative evaluation of the systemic and local alendronate treatment in synthetic bone graft: a histologic and

histomorphometric study in a rat calvarial defect model. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 2012, 114: S146-S152.

174. Bayat M, Momen-Heravi F, Marjani M, Motahhary P. A comparison of bone reconstruction following application of bone matrix gelatin and autogenous bone grafts to alveolar defects: An animal study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2010, 38: 288-292.

175. Klaue K, Knothe U, Anton C, Pflugler DH, Stoddart M, Masquelet AC, Perren SM. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. *Injury*, 2009, 40: S95-S102.

176. Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJ, Bronckers AL, Raghoobar GM, Stegenga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Archives of oral biology*, 2003, 48: 155-160.

177. Zwingenberger S, Niederlohmann E, Vater C, Rammelt S, Matthys R, Bernhardt R, Valladares RD, Goodman SB, Stiehler M. Establishment of a femoral critical-size bone defect model in immunodeficient mice. *Journal of surgical research*, 2013, 181: e7-e14.

178. He Y-X, Zhang G, Pan X-H, Liu Z, Zheng L-z, Chan C-W, Lee K-M, Cao Y-P, Li G, Wei L. Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: A drill-hole defect model. *Bone*, 2011, 48: 1388-1400.

179. Kosger HH, Ozturk M, Sokmen A, Bulut E, Ay S. Wound healing effects of *Arnebia densiflora* root extracts on rat palatal mucosa. *European journal of dentistry*, 2009, 3: 96.

180. Mariano RC, Oliveira MR, Silva LC, Ferreira S, Júnior IRG, de Carvalho Silva A. Effect of topical application of chlorhexidine and metronidazole on the tissue repair of palatal wounds of rats: a clinical and histomorphometric study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 2015, 119: 505-513.

181. Han J, Ma B, Liu H, Wang T, Wang F, Xie C, Li M, Liu H, Ge S. Hydroxyapatite nanowires modified polylactic acid membrane plays barrier/osteoinduction dual roles and promotes bone regeneration in a rat mandible defect model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2018.

182. Zhang W, Zhang Z, Chen S, Macri L, Kohn J, Yelick PC. Mandibular jaw bone regeneration using human dental cell-seeded tyrosine-derived polycarbonate scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 2016, 22: 985-993.

183. Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E, Pearce S. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*, 2007, 13: 1-10.

184. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *Journal of orthopaedic research*, 1991, 9: 383-390.

185. İşler SC, Demircan S, Çakarer S, Çebi Z, Keskin C, Soluk M, Yüzbaşıoğlu E. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper® on early bone healing. *Journal of Applied Oral Science*, 2010, 18: 409-414.
186. Uzun Ö, Balbay Ö, Çomunog˘lu NÜ, Yavuz Ö, Annakkaya AN, Güler S, Silan C, Erbaş M, Arbak P. Hypobaric-hypoxia-induced pulmonary damage in rats ameliorated by antioxidant erdosteine. *Acta histochemica*, 2006, 108: 59-68.
187. Baytop T. *Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün)*. Baskı. İstanbul Üniversitesi, 1984.
188. Carneiro DM, Freire RC, Honório TCdD, Zoghaib I, Cardoso FFdS, Tresvenzol LMF, de Paula JR, Sousa ALL, Jardim PCBV, Cunha LCd. Randomized, double-blind clinical trial to assess the acute diuretic effect of Equisetum arvense (field horsetail) in healthy volunteers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 2014.
189. Phillipson J, Melville C. An investigation of the alkaloids of some British species of Equisetum. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1960, 12: 506-508.
190. Oliveira MJL, Martins CC, Paiva SM, Tenuta L, Cury JA. Estimated fluoride doses from toothpastes should be based on total soluble fluoride. *International journal of environmental research and public health*, 2013, 10: 5726-5736.
191. Ashrafi A, Rezaii A, Sohrabi HI, MehdiNeghad B, Ashrafi I, Asmarıyan S. Histometric and histopathologic evaluation of the effects of Equisetum Arvense herbal extract versus zinc oxide in rabbit skin wound healing model. 2010.
192. Saudelli G, Tinti L, Suffritti G. A Review on the Treatment of Osteoporosis with Equisetum arvense. *Gen Med (Los Angeles)*, 2018, 6: 2.
193. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. *International immunopharmacology*, 2005, 5: 1749-1770.
194. Aljabre SHM, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of Nigella sativa and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 101: 116-119.
195. Kanter M, Demir H, Karakaya C, Ozbek H. Gastroprotective activity of Nigella sativa L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2005, 11: 6662.
196. Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. Partial regeneration/proliferation of the β -cells in the Islets of Langerhans by Nigella sativa L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 2003, 201: 213-219.
197. Suboh S, Bilty Y, Aburjai T. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to*

Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 2004, 18: 280-284.

198. Ramadan MF, Kroh LW, Mörsel J-T. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils and oil fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, 51: 6961-6969.

199. Kanter M, Coskun O, Kalayc M, Buyukbas S, Cagavi F. Neuroprotective effects of *Nigella sativa* on experimental spinal cord injury in rats. *Human & experimental toxicology*, 2006, 25: 127-133.

200. Nagi MN, Alam K, Badary OA, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Bekairi AM. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *IUBMB Life*, 1999, 47: 153-159.

201. Meral I, Kanter M. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on selected mineral status and hematological values in CCl₄-treated rats. *Biological trace element research*, 2003, 96: 263-270.

202. Neveen AN, Iman MM. Evaluation of antioxidant effect of *Nigella sativa* oil on monosodium glutamate-induced oxidative stress in rat brain. *J Am Sci*, 2010, 6: 13-19.

203. Mehri S, Shahi M, Razavi BM, Hassani FV, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effect of thymoquinone in acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2014, 17: 1007.

204. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 1999, 18: 7908.

205. Ryn Jv, Trummlitz G, Pairet M. COX-2 selectivity and inflammatory processes. *Current medicinal chemistry*, 2000, 7: 1145-1161.

206. Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C₄ synthase in human blood cells by thymoquinone. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2004, 19: 431-436.

207. El-Dakhakhny M, Madi N, Lember N, Ammon H. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, 81: 161-164.

208. Chakrabarty A, Emerson M, LeVine S. Hemeoxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Multiple Sclerosis Journal*, 2003, 9: 372-381.

209. Ali B, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 2003, 17: 299-305.

210. Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 2004, 18: 195-199.
211. Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*, 2005, 48: 16-42.
212. Abuharfeil N, Salim M, Von Kleist S. Augmentation of natural killer cell activity in vivo against tumour cells by some wild plants from Jordan. *Phytotherapy Research*, 2001, 15: 109-113.
213. Fararh K, Atoji Y, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Takewaki T. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Research in veterinary science*, 2004, 77: 123-129.
214. Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *International journal of immunopharmacology*, 1999, 21: 283-295.
215. Kalus U, Pruss A, Bystron J, Jurecka M, Smekalova A, Lichius JJ, Kiesewetter H. Effect of *Nigella sativa* (black seed) on subjective feeling in patients with allergic diseases. *Phytother Res*, 2003, 17: 1209-1214.
216. Salem ML, Hossain MS. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *International journal of immunopharmacology*, 2000, 22: 729-740.
217. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine*, 2004, 11: 56-64.
218. Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*, 2002, 9: 69-74.
219. Taguchi A, Sanada M, Krall E, Nakamoto T, Ohtsuka M, Suei Y, Tanimoto K, Kodama I, Tsuda M, Ohama K. Relationship between dental panoramic radiographic findings and biochemical markers of bone turnover. *Journal of bone and mineral research*, 2003, 18: 1689-1694.
220. Kim J-L, Park S-H, Jeong D, Nam J-S, Kang Y-H. Osteogenic activity of silymarin through enhancement of alkaline phosphatase and osteocalcin in osteoblasts and tibia-fractured mice. *Experimental Biology and Medicine*, 2012, 237: 417-428.
221. Zhu S, Wang X, Zhang Y, Cai W, Ji Y. A survey of the changes of serum inorganic salts and alkaline phosphatase after jaw fractures. *Shanghai kou qiang yi xue= Shanghai journal of stomatology*, 2000, 9: 203.

222. Colt E, Gorich G, Quinnan S, Raj R, Thornton J, Matti B, Pierson Jr R, Quinlan E. Quantitative Heel Ultrasonography, 25-Hydroxyvitamin D, and Urine Amino-terminal Cross-linking Telopeptide of Type I Collagen in Patients With a Recent Hip Fracture. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2009, 28: 337-343.
223. Clemens JD, Herrick MV, Singer FR, Eyre DR. Evidence that serum NTx (collagen-type I N-telopeptides) can act as an immunochemical marker of bone resorption. *Clinical Chemistry*, 1997, 43: 2058-2063.
224. Avolio G, Brandão C, Marcucci M, Alonso G. Use of the plasma CTX for assessing the bone activity of the mandible among osteopenic and osteoporotic patients. *Brazilian oral research*, 2010, 24: 250-255.
225. Gerdhem P, Ivaska KK, Alatalo SL, Halleen JM, Hellman J, Isaksson A, Pettersson K, Väänänen HK, Åkesson K, Obrant KJ. Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. *Journal of bone and mineral research*, 2004, 19: 386-393.
226. Shen C-L, Yang S, Tomison M, Romero A, Felton C, Mo H. Tocotrienol supplementation suppressed bone resorption and oxidative stress in postmenopausal osteopenic women: a 12-week randomized double-blinded placebo-controlled trial. *Osteoporosis international*, 2018, 29: 881-891.

EKLER

EK-1 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Çiğdem KÖŞE
Doğum Tarihi : 06.08.1989
Doğum Yeri : Meram / KONYA
Uyruğu : T. C
Adres : Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği
Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D., 53100, Rize
Tel : 0506 2941715
E-mail : hsvw-179@hotmail.com

Eğitim

Lise : Meram Anadolu Lisesi (Konya Maarif Koleji) (2002-2006)
Lisans : Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2008-2013)
Uzmanlık : Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği
Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D. (2014-2019)

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce : Orta derece

EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
(Republic of Turkey Recep Tayyip Erdogan University Local Ethics Committee for Animal Experiments)

BAŞVURU BİLGİLERİ (Application Information)	ETİK KURUL DOSYA NO(REFERENCE):02		
	ÇALIŞMANIN ADI	Nigella Sativa ve Equisetum Arvense Bitki Ekstraktlarının Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Yaraların İyileşmesi Üzerindeki Etkileri	
	Title	Effects of the Extracts of Nigella Sativa and Equisetum Arvense Plants on Experimentally Induced Wound Healing in Rats	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (Director of Project)	Yrd.Doç.Dr.Nazife Begüm KARAN	
	DİĞER GÖREVLİLER (Researchers)	Çiğdem KÖŞE, Levent TÜMKAYA, Tolga MERCANTEPE	
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkezli Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkezli Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	Karar No(Decision No):2017/2	Tarih (Date): 24.01.2017
	R.T.E. Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi'nden, Yrd.Doç.Dr.Nazife Begüm KARAN 'ın sorumluluğunda yürütülen ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Hayvan Deneyleri Araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına katılan üyelerin oy birliğiyle karar verilmiştir.	
Decision Information	The study above has been approved by the Local Ethics Committee of R.T.E.University.	
	<input checked="" type="checkbox"/> Accepted	<input type="checkbox"/> Rejected

ÜYELER (Members)						
Ünvanı/ Adı/ Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Doç.Dr. Fikri BALTA (Başkan,Müdür,Veteriner Hekim)	Su Ürünleri	R.T.E. Üniversitesi Su Ürünleri Fak.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr. Adnan YILMAZ (Başkan Vekili)	Tıbbi Biyokimya	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr. Nurhayat ÖZDEMİR (Üye)	Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr. Levent TÜMKAYA (Üye)	Histoloji Embriyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	-----
Yrd.Doç.Dr. Saliha EKŞİ (Üye)	Tıbbi Mikrobiyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yrd.Doç.Dr. Hatice SEVİM NALKIRAN(Üye)	Tıbbi Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç.Dr. Murat ALKURT (Üye)	Protetik Diş Tedavisi	R.T.E. Üniversitesi Dış Hekimliği Fak.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Barış KARA (Üye)	Sağlık Çalışanı	Sağlık Sen	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Eylem RAKICI EKŞİOĞLU (Üye)	Serbest Çalışan	Sivil Üye	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

*Araştırma ile ilişki(Relation to the project, E: Yes, H: No)

**Toplantıda Bulunma(Attendance, E: Yes, H: No)