

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN,
KONTAMİNE EDİLMİŞ KRİTİK
BOYUTTAKİ KEMİK DEFEKTLERİNDE
NİGELLA SATİVA'NIN (TİMOKİNON)
KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
HİSTOLOJİK VE HİSTOMORFOMETRİK
OLARAK İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

DİŞ HEKİMİ
AYŞE YILMAZ



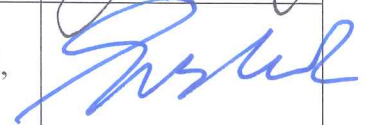
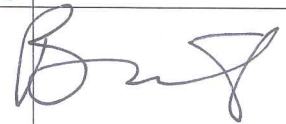

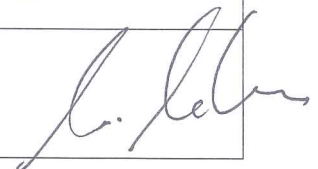
DANIŞMAN
DOÇ. DR. CEYDA ÖZÇAKIR TOMRUK

İSTANBUL, 2016

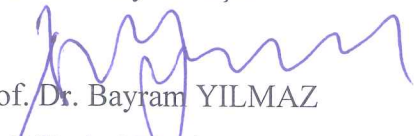
TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Ağız Diş Çene Cerrahisi
Tez Başlığı : Deneysel olarak oluşturulan, kontamine edilmiş, kritik boyuttaki kemik defektlerinde *Nigella sativa*'nın (Timokinin) kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin histolojik ve histomorfometrik olarak incelenmesi
Tez Sahibi : Aysheh HAMOEIPOUR
Sınav Tarihi : 21/06/2016

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı:	Prof.Dr. Nurhan GÜLER Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi AD	
Tez danışmanı:	Doç.Dr. Ceyda ÖZÇAKIR TOMRUK Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi AD	
Üye:	Prof.Dr. Nurhan GÜLER Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi AD	
Üye:	Prof.Dr. Buket AYBAR İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi AD	
Üye:	Doç.Dr. Berkay Tolga SÜER GATA Diş Hekimliği Bilimleri Ağız Diş ve Çene Cerrahisi	
Üye:	Doç.Dr. Ahmet Hamdi Arslan Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi AD	

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 22/06/2016 tarih ve 2016/14-14 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

Dt. Ayşe YILMAZ

İTHAF

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan canım annem
ve babama ...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca hocalığın yanı sıra çoğu zaman bana ablalık da yapan, akademisyenliğiyle beraber iyi yürekli ve yardım sever kimliği ile de bilinen, yoluma bilgileriyle, düşünceleriyle ve sevgisiyle ışık tutan, her zaman yanımda olan ve yanımda olmaya devam edeceğini umduğum kıymetli danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Ceyda ÖZÇAKIR TOMRUK'a**,

Güçlü karakteri ve profesyonel duruşu ile mesleki hayatımda kendime her zaman örnek olarak aldığım Yeditepe Üniversitesi Ağız, Diş, Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Nurhan Güler'e**,

Yol haritamı oluşturmamda bana yardımcı olan sevgili Sayın **Prof. Dr. Kemal ŞENÇİFT'e**,

Hem mesleki hem de hayati tecrübelerini bana aktaran, bana farklı perspektiflerden bakabilmeyi öğreten, hayatımda çok değerli bir yere sahip olan çok kıymetli hocam Sayın **Yrd. Doç. Dr. Ufuk İşeri'ne**,

Ne zaman bir hasta danışmak istesem tüm yoğunluklarına rağmen bana her zaman vakit ayırmış olan, bilgisini ve tecrübelerini aktarmaktan çekinmeyen Sayın **Doç. Dr. Ahmet ARSLAN'a**, Sayın **Doç. Dr. Ediz DENİZ'e** ve anestezi hocamız Sayın **Dr. Adnan NOYAN'a**,

Çalışma hayatımda kendime her zaman örnek aldığım, cerrahi tecrübelerinden faydalanmama her zaman fırsat tanıyan, bana her zaman rehber ve destek olan sevgili Sayın **Yrd. Doç. Dr. Fatih CABBAR'a**,

Hastalara yaklaşım ve meslek etiği açısından kendime her zaman örnek aldığım, desteğini her zaman yanımda hissettiğim ve ağabeyim demekten gurur duyduğum Sayın **Öğr. Gör. Dr. Çağrı BURDURLU'ya**,

Desteklerini her daim yanımda hissettiğim, zorlu yolları birbirimize tutunarak beraber yürüdüğümüz **Dr. Onur SORKUN** ve **Dt. Hakan GÜLŞEN** başta olmak üzere bölüm arkadaşlarıma,

Hayatımda var olduklarını bilmenin bile, beni çok mutlu ettiği Sayın **Doç. Dr. Zeynep ÖZKURT KAYAHAN'a**, Sayın **Yrd. Doç. Dr. Gonca DUYGU ÇAPAR'a**, Sayın

Öğr. Gör. Dr. Ayşe YALNIZ, Sayın **Öğr. Gör. Dr. Burcu NUR YILMAZ'a**, Sayın **Öğr. Gör. Dr. Tuba AYHAN'a**,

Pozitif kişiliği ve neşeli tavırlarıyla hayat yükümü yarıya indiren, kardeşlerimden ayrı görmediğim, çocukluğumdan itibaren her daim yanımda olan ve bir hayat boyu beraber olacağımıza inandığım sevgili kardeşim **Seda OKUR'a**,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca ne zaman umutsuzluğa kapılsam yanımda olup beni motive eden, mesleki bilgisine çok güvendiğim, bana kıymetli vaktini ayırmaktan hiç bir zaman çekinmeyen, bir sınıf arkadaşı olmaktan çok daha öte hayat boyu her zaman yanımda olmasını istediğim dostum **Yrd. Doç. Dr. Gül Merve YALÇIN ÜLKER'e**,

Yürüdüğümüz bu uzun yolda tek başıma olmadığımı bana her zaman hatırlatan, desteğini ve emeğini hiç bir zaman benden esirgemeyen geç sattlelere kadar bana eşlik eden canım arkadaşım **Dr. Selen MERT'e**,

Benden desteğini hiç bir zaman esirgememiş olan, ne zaman sıkıntıda olsam bir telefon kadar uzağımda olan canım arkadaşım **Dt. Zeynep KILINÇ'a**,

Doktora eğitimim boyunca, bana konforlu ve düzenli bir şekilde hasta bakacak ortamı sağlayan başta ablam **Semra TİK** ve tüm hemşire arkadaşlarım'a;

Çalışmamın deney aşamasında kendilerinden çok şey öğrendiğim, yardımlarını benden esirgemeyen Sayın **Vet. Hek. Engin SÜMER'e**, Sayın **Selim DOĞAN'a** ve Sayın **Fatma ÖZEN'e**,

Tezimin yazımı aşamasında, her ihtiyacımda benden yardımını esirgemediği için Uzman Kütüphaneci **Arife ÇELİK'e**,

Bütün hayatlarını çocuklarına adayan ve onların mutluluğu ve başarıları için hiç bir fedakârlıktan çekinmemiş olan annem **Münire YILMAZ**, babam **Hüseyin YILMAZ** ve hayat yolumda bana eşlik eden benim çelikten kanatlarım ağabeyim **Mansur YILMAZ** ve kardeşim **Sabrihan YILMAZ'a**,

Sonsuz teşekkür ederim.

İyi ki varsınız...

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK

ONAY SAYFASI

BEYAN

İTHAF

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ

ŞEKİL LİSTESİ

RESİM LİSTESİ

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

İNGİLİZCE ÖZET

TÜRKÇE ÖZET

1.GİRİŞ VE AMAÇ

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

2.1.1. Kemik Hücreleri

2.2. Kemik Tipleri

2.3. Kemik İyileşmesi

2.4. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler

2.5. Kritik Boyutlu Defekt

2.6. Kemik Greftleri

2.7. Bariyer Membranlar

2.8. *Porphyromonas Gingivalis*

2.9.1. Ranunculaceae familyasının Botanik Özellikleri

2.9.1.1. *Nigella sativa* L.'nin Botanik Özellikleri

2.9.1.2. *Nigella sativa*'nin kimyasal özellikleri

2.9.1.2.A. *Nigella sativa*'nın temel etken maddesi Timokinon

2.9.1.3. *Nigella sativa* L.'nin farmasötik özellikleri

- 2.9.1.3.I. Anti-inflamatuar etkiler
- 2.9.1.3.II. Anti-mikrobiyal (antibakteriyel) ve antifungal etkiler
- 2.9.1.3.III. Analjezik etkiler
- 2.9.1.3.IV. Anti-oksidan etkiler
- 2.9.1.3.V. Anti-diyabetik etkiler
- 2.9.1.3.VI. Anti-histaminik etkiler
- 2.9.1.3.VII. İmmün sistem üzerine etkiler
- 2.9.1.4. *Nigella sativa*'nın Potansiyel Toksisitesi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

4. BULGULAR

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

6. KAYNAKLAR

7. Ek-1: Etik Kurul Onay Belgesi

8. ÖZGEÇMİŞ

TABLO LİSTESİ

		Sayfa
Tablo 3.2	Doku yanıtı skorlaması	60
Tablo 4.1	Tüm grupların mikrobiyolojik inceleme sonucuna göre bakteri koloni sayısı miktarı	63
Tablo 4.2	Tüm gruplardaki örneklerin histolojik olarak yeni kemik oluşumu, osteoblast sayısı, kapiller yoğunluk ve doku yanıtı	64
Tablo 4.3	Kontrol grubunun PG, L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	65
Tablo 4.4	PG grubunun L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	66
Tablo 4.5	L-KOL grubunun PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+N grupları ile ikili karşılaştırılması	67
Tablo 4.6	PG+L-KOL grubunun L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	67
Tablo 4.7	L-KOL+NS grubunun PG+L-KOL+NS grubu ile ikili karşılaştırılması	68
Tablo 4.8	Kontrol grubunun PG, L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	69
Tablo 4.9	PG grubunun L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	70
Tablo 4.10	L-KOL grubunun PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+N grupları ile ikili karşılaştırılması	71
Tablo 4.11	PG+L-KOL grubunun L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	71
Tablo 4.12	L-KOL+NS grubunun PG+L-KOL+NS grubu ile ikili karşılaştırılması	72

Tablo 4.13	Kontrol grubunun PG, L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	73
Tablo 4.14	PG grubunun L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	74
Tablo 4.15	L-KOL grubunun PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+N grupları ile ikili karşılaştırılması	75
Tablo 4.16	PG+L-KOL grubunun L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	75
Tablo 4.17	L-KOL+NS grubunun PG+L-KOL+NS grubu ile ikili karşılaştırılması	76
Tablo 4.18	Kontrol grubunun PG, L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	77
Tablo 4.19	PG grubunun L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	78
Tablo 4.20	L-KOL grubunun PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+N grupları ile ikili karşılaştırılması	79
Tablo 4.21	PG+L-KOL grubunun L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması	80
Tablo 4.22	L-KOL+NS grubunun PG+L-KOL+NS grubu ile ikili karşılaştırılması	80

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa
Şekil 2.1	<i>N. Sativa</i> Bitkisi	24
Şekil 2.2	<i>N. Sativa</i> Tohumları	24
Şekil 2.3	<i>N. Sativa</i> 'nın temel bileşenleri ve kimyasal gösterimleri	25
Şekil 2.4	TQ'nun Kimyasal Yapısı	26
Şekil 4.1	Grupların kemik iyileşmesi oranları	68
Şekil 4.2	Grupların kemik yüzeyindeki osteoblast sayılarının karşılaştırılması	72
Şekil 4.3	Grupların kapiller yoğunluklarının karşılaştırılması	76
Şekil 4.4	Grupların doku yanıtı oranlarının karşılaştırılması	81

RESİM LİSTESİ

		Sayfa
Resim 3.1	Deneklerin genel anestezide kullanılan ilaçlar	41
Resim 3.2	Sıçanların gözlerine oftalmik komplikasyonların önlenmesi amacıyla pomad sürülmesi	41
Resim 3.3	Sıçanların bacağına işlem öncesi traşlanması	42
Resim 3.4	İşlem öncesi sıçanların bacağına lokal anestezi yapılması	42
Resim 3.5	İnsizyon hattının belirlenmesi	43
Resim 3.6	15 nolu bisturi ucuyla insizyonun yapılması	43
Resim 3.7	Kemiğin açığa çıkartılması	44
Resim 3.8	Anguldruva ve ucundaki 3 mm çapındaki trefan frez ile kritik boyutlu defekt oluşturulması	45
Resim 3.9	Defekt alanının sınırlarının belirlenmesi	45
Resim 3.10	Kemiğin doku pensetiyle blok şeklinde çıkartılması	46
Resim 3.11	Kritik boyutlu defekt görünümü	46
Resim 3.12	Kontrol grubundaki sıçanlarda 3x3 mm'lik açılan defektin görünümü	47
Resim 3.13	PG grubundaki kritik defektin <i>P. gingivalis</i> ile kontaminasyonu	47
Resim 3.14	L-KOL grubundaki sıçanların defekt bölgesine lokal kollajen membranın uygulanımı	48
Resim 3.15	PG+L-KOL grubundaki sıçanların defekt bölgesine, <i>P. gingivalis</i> ile kontaminasyonu ve lokal kollajen membranın uygulanımı.	48
Resim 3.16	L-KOL+NS grubundaki sıçanların defekt bölgesine, <i>N. sativa</i> içeren kollajen membranın uygulanımı.	49
Resim 3.17	PG+L-KOL+NS grubundaki sıçanların defekt bölgesine <i>P. gingivalis</i> ile kontaminasyonu ve <i>N. sativa</i> içeren kollajen membranın uygulanımı	49
Resim 3.18	Periost ve kasın 4-0 yarım yuvarlak 20 mm vikril dikiş ipliği (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş. Türkiye) ile	50

	sütüre edilmesi	
Resim 3.19	Periost ve kasın sütüre edilmesi	51
Resim 3.20	Cildin 3-0 yarım yuvarlak 20 mm ipek dikiş ipliği (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Türkiye) ile primer olarak sütüre edilmesi	51
Resim 3.21	Sıçanların subkutan % 5 dekstrozu enjeksiyonu uygulaması	52
Resim 3.22	Sıçanların bacaklarına Batikon uygulaması (Bonmed Sağlık Ürünleri ve Makina San. Tic. Ltd. Şti. Türkiye)	52
Resim 3.23	Tibianın kas bağlantılarından ayırma işlemi	53
Resim 3.24	Diseke edilen tibianın görünümü	53
Resim 3.25	<i>P. gingivalis</i> ile kontamine edilen tibianın görünümü	54
Resim 3.26	Anaerobik ortam şartlarını sağlayan %10 H ₂ , %10 CO ₂ ve %80 N ₂ gaz karışımını içeren %80 nemli ve 37 °C'deki anaerobik kabinin görünümü	56
Resim 3.27	%5 koyun kanlı BHI katı besiyerinde <i>P. gingivalis</i> görünümü	56
Resim 3.28	Kemik örneklerinin tartılması	57
Resim 3.29	Tibialar izotonik tuzlu su içerisinde parçalandıktan sonra %5 koyun kanlı BHI üzerine ekim yapılması	58
Resim 4.1	PG grubundaki enfeksiyon bulgusu	62
Resim 4.2	Kontrol grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. (A. Hematoksilen – Eozin X100; B. Masson Trikrom X100)	82
Resim 4.3	PG grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri (C. Hematoksilen-Eozin X40; D. Masson Trikrom X40)	82
Resim 4.4	L-KOL grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. (E. Hematoksilen	83

- Eozin X40; F. Masson Trikrom X40)
- Resim 4.5** PG-L-KOL grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen 83
örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını
dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri
(G. Hematoksilen – Eozin X100; H. Masson Trikrom X100).
- Resim 4.6** L-KOL+NS grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen 84
örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını
dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. Artmış
sayıda yeni kemik trabekülleri ve bunları çevreleyen aktif
osteoblastlar
(I. Hematoksilen-Eozin X40; J. Masson Trikrom X40).
- Resim 4.7** PG-L-KOL+NS grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen 84
örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını
dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. Artmış
sayıda yeni kemik trabekülleri ve bunları çevreleyen aktif
osteoblastlar. (K. Hematoksilen-Eozin X100; L. Masson
Trikrom X100)

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter Baumannii</i>
AIDS	Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
ALP	Alkalin Fosfataz
ALT	Alanin Amino Transferaz
ATCC	American Tissue Culture Collection
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus Subtilis</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BMP	Kemik morfogenetik proteini
<i>C. krusei</i>	<i>Candida Krusei</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida Tropicalis</i>
<i>C.albicans</i>	<i>Candida Albicans</i>
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CFU	Koloni Oluşturan Birim (Colony Forming Unit)
DTQ	Ditimokinon
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EAE	Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit
e-PTFE	Genişletilmiş Politetrafloroetilenleri
FGF	Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörleri
GGT	Gamma Glutamil Transferaz
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IGF	İnsülin Büyüme Faktör
IL	İnterlökin
IM	İntramüsküler
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KBD	Kritik Boyut Defekti
kDa	Kilodalton
Kh	Klorheksidin
LPS	Lipopolisakkarit
<i>M. avium</i>	<i>Mycobacterium Avium</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
MCMV	Sıçan Sitomegalo Virüsü
NIDDM	İnsülin Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus
NO	Nitrik Oksit
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas Gingivalis</i>
PBS	Fosfat Tampon Solusyonu
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri
PGA	Poliglikolik Asit
PLA	Polilaktik Asit
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>
PTFE	Politetrafloroetilen
PTH	Paratiroid Hormonu
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
<i>N. Sativa</i>	<i>Nigella Sativa</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>

S. dysenteriae

S. faecalis

S. maltophilia

S. masoni

S. paucimobilis

SDS PAGE

TCP

TGF

THQ

THY

TNF

TQ

PDGF

V. Cholera

YKR

YÜDETAM

µg

Shigella Dysenteriae

Streptococcus faecalis

Stenotrophomonas Maltophilia

Schistosoma Mansoni

Sphingomonas Paucimobilis

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofore

Transmission Control Protocol

Dönüştürücü Büyüme Faktörleri

Timohidrokinon

Timol

Tümör Nekrotizan Faktör

Timokinon

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri

Vibrio Cholera

Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu

Yeditepe Uiversitesi Deney Hayvanları

Araş tırma Merkezi

Mikrogram

ABSTRACT

YILMAZ, A. (2016). Histological and Histomorphometric Evaluation of *Nigella sativa* (Thymoquinone) containing collagen membrane on Bone Healing in Experimental Bone Defects contaminated with *Porphyromonas gingivalis*. Yeditepe University, Health Sciences Institute, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, PhD Thesis, İstanbul. The aim of this study was to evaluate the influence of *Nigella Sativa* (*N. sativa*) containing collagen membrane on bone healing in experimental critical size bone defects contaminated with *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), both histologically and histomorphometrically. Forty two female Sprague Dawley rats, weighing 250 ± 20 g were used in this study. Rats were randomly divided into six groups. 3x3mm defects were created on tibia of each rat. The following procedures were performed for each group: Group 1 (Control group): Only critical size defect was created; Group 2 (PG): critical size defect was created and contaminated with *P. gingivalis*; Group 3 (L-COL): critical size defect was created and covered with collagen membrane; Group 4 (PG+L-COL): critical size defect was created, contaminated with *P. gingivalis* and covered with collagen membrane; Group 5 (L-COL+NS): critical size defect was created and covered with collagen membrane containing *N. sativa*; Group 6 (PG+L-COL+NS): critical size defect was created, contaminated with *P. gingivalis* and covered with collagen membrane containing *N. sativa*. Rats were sacrificed at 28 days and evaluated both histologically and histomorphometrically. Quantitative measurement for new bone formation and osteoblast lining; semi-quantitative measurement of capillary intensities and tissue response were statistically analyzed. The new bone formation was significantly greater in the *N. sativa* administered groups compared to other groups ($p<0.01$). When compared in terms of osteoblast numbers, the number of osteoblasts were significantly found to increase in *N. sativa* administered groups ($p<0.05$). *N. sativa* administered groups showed an increase in capillaries compared to other groups ($p<0.05$). When control and PG, PG+L-COL and PG+L-COL+NS groups were compared in terms of tissue response, the difference was statistically significant ($p<0.001$); ($p=0,02$); ($p=0,041$). As a result the new bone formation was significantly higher in the *N. sativa* administered groups compared to

other groups. It can be concluded that local administration of *N. sativa* containing collagen membrane positively affects bone healing due to its antibacterial effects on *P. gingivalis* contaminated critical size bone defects.

Key Words: *Nigella Sativa* (*N. sativa*); rat tibia; critical size bone defect; *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

TÜRKÇE ÖZET

YILMAZ, A. (2016) Deneysel olarak oluşturulan, *Porphyromonas gingivalis* ile kontamine edilmiş kritik boyuttaki kemik defektlerinde *Nigella Sativa*'nın (Timokinon) kemik iyileşmesi üzerine histolojik ve histomorfometrik etkilerinin incelenmesi, Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, İstanbul. Bu deneysel çalışmanın amacı, *Nigella sativa* (*N. Sativa*) içeren kollajen membranın *P. gingivalis* ile enfekte edilen kritik boyutlu kemik defektlerinde kemik iyileşmesi üzerine olan etkisinin histolojik ve histomorfometrik olarak incelenmesidir. Çalışmamızda 42 adet ortalama 250±20 gr ağırlığında dişi Sprague Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize olarak altı gruba ayrıldı. Deneklerin tibialarına 3x3 mm boyutunda tek defekt açıldı. Grup 1: Kontrol; Kritik boyutlu defekt bölgesi kendi kendine iyileşmeye bırakıldı. Grup 2: PG; Kritik boyutlu defekt bölgesi, *P. gingivalis* ile kontamine edilerek hiçbir tedavi uygulamadan kendi kendine iyileşmeye bırakıldı. Grup 3: L-KOL; Kritik boyutlu defekt bölgesine lokal olarak kollajen membran uygulandı. Grup 4: PG+L-KOL; Kritik boyutlu defekt bölgesi *P. gingivalis* ile kontamine edilip, lokal olarak kollajen membran uygulandı. Grup 5: L-KOL+NS; Kritik boyutlu defekt bölgesine lokal olarak *N. sativa* içeren kollajen membran uygulandı. Grup 6: PG+L-KOL+NS; Kritik boyutlu defekt bölgesi *P. gingivalis* ile kontamine edilip lokal olarak *N. sativa* içeren kollajen membran uygulandı. Deney hayvanları ise 28. günde sakrifiye edildikten sonra histolojik ve histomorfometrik olarak değerlendirildi. İnceleme esnasında bütün gruplardan elde edilen kesitler, yeni kemik oluşumu, yeni kemik yüzeyindeki osteoblast sayısı, kapiller yoğunluk ve doku yanıtı açısından değerlendirildi. Yeni kemik oluşumu *N. sativa* uygulanan gruplarda diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha fazlaydı ($p<0,001$). Kemik yüzeyindeki osteoblast sayıları açısından değerlendirildiğinde; *N. sativa* uygulanan gruplarda osteoblast sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış olmuştur ($p<0,05$). *N. sativa* uygulanan gruplarda diğer gruplara göre kapiller yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı derecede artış olmuştur ($p<0,05$). Doku yanıtı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile PG, PG+L-KOL ve PG+L-NS grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$); ($p=0,02$); ($p=0,041$).

Sonuç olarak lokal olarak *N. sativa* uygulanan gruplarda yeni kemik oluşununun diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak daha fazla olduğu görülmektedir. Cerrahi olarak oluşturulan *P. gingivalis* ile kontamine edilen kritik boyutlu kemik defektlerinin iyileşmesinde *N. sativa* içeren kollajen membran, anti-bakteriyel etkisine bağlı olarak kemik iyileşmesini olumlu yönde etkilemektedir.

Anahtar Kelimeler: *Nigella Sativa* (*N. sativa*); sıçan tibia; kritik boyutlu kemik defekti; *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oral ve maksillofasiyal cerrahinin temel hedeflerinden biri, ağız ve çeneler bölgesinde çeşitli sebeplerle meydana gelen defektlerin eski anatomik formuna kavuşturulması ve yitirilen fonksiyonların yeniden kazandırılmasıdır. Bu kemik defektlerinin bir bölümü, kemiğin kendini tamir edebilme yeteneğiyle onarılırken, büyük kemik defektlerinde ise çeşitli doğal ve sentetik biyomateryaller kullanılmaktadır. Kemik içi defektlerin tedavisinde, kemik rejenerasyon hızını arttırabilmek için farklı cerrahi teknikler, yeni greft materyalleri, biyouyarıcı sistemler, sistemik olarak uygulanan vitamin, hormon ve mineral destekleri, elektriksel uyarıcılar ve büyüme faktörleri gibi anabolik ajanlara başvurulduğu bilinmektedir. Bu çalışmalarda defektin, çevresindeki kemikle aynı yoğunlukta ve sağlıklı yeni kemikle en kısa zamanda doldurulması amaçlanmıştır.

Çeşitli hayvan modellerinde yapılan deneysel çalışmalar mekanik bariyer kullanımının osseoz rejenerasyonu arttırdığını göstermektedir. Günümüzde kemik defektlerinde kemik oluşumunu arttırmak için rezorbe olabilen kollajen membranlardan rezorbe olmayan bariyer membranlara kadar pek çok biyomateryal kullanılmaktadır. Bu konsept bariyer membran kullanıldığında yumuşak dokunun defekt içine büyümesinin engellendiğini göstermektedir. Bariyer membranlarla birlikte çeşitli kemik greftleri kullanılarak defektlerin rejenerasyonu hedeflenmiştir. Ancak membran uygulamaları ile ilgili olarak en sık karşılaşılan sorunlardan biri membranın açığa çıkmasına bağlı gelişen enfeksiyonlardır. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) gibi çeşitli periodontal patojenlerin doğrudan ileri derecede doku yıkımına neden oldukları bilinmektedir. Aynı zamanda konağın doku yıkıcı mekanizmalarını da başlatarak doku yıkımını arttırmaları. İndirek veya konağa bağlı doku yıkım etkisi, lokal doku yıkımına yol açan konak hücrelerinin veya hümmoral faktörlerin indüksiyonu, stimülasyonu veya aktivasyonunun sonucudur. *P. gingivalis* tümör nekrozitan faktör- α (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-17 (IL-17) gibi dolaşan pro-inflamatuvar sitokinleri arttırmaktadır. *P. gingivalis*'in sinüzit, kronik periodontitis ve periapikal enfeksiyonlara neden olabileceği de bilinmektedir. *P. gingivalis* için çok

önemli bir virülans faktörü ve kemik rezorbsiyonunda rol oynayan ana etken olarak ileri sürülen lipopolisakkarit (LPS) konak dokunun harabiyetine neden olan biyolojik aktiviteleri yöneten bir moleküldür. Mandibulada osteoradyonekroz olgularında yapılan bir çalışmada, rezeke edilen 12 osteoradyonekrotik mandibulanın derin medullar yapılarında en predominant organizma olarak *P. gingivalis* tespit edilmiştir. Bu da bize iyileşmenin geciktiği olgularda *P. gingivalis* 'in etkili olabileceğini göstermektedir.

Hastalık ya da travma nedeniyle kaybedilmiş dokuların yeniden oluşturulması ve yapılandırılması için sentetik veya biyolojik matriksler içine yerleştirilmiş aktivasyon molekülleri ve büyüme faktörlerinin kemik rejenerasyonu amacıyla kullanılması doku mühendisliğinin hedefleri arasındadır. Çeşitli nedenlerle kaybedilmiş ya da hasar görmüş vücut dokularının klasik biyomateryal uygulama teknikleri ile onarılması yöntemi kullanılan biyomateryalin zamanla yıkıma uğrayarak istenilen etkin çevresel koşulların sağlanmasını engeller. Ancak doku mühendisliği uygulamalar sayesinde doku içerisine yerleştirilen sistemler doğal dokulara benzer biyolojik ve fiziksel uyarılara cevap verme ve ekstraselüler matriks yapısını yeniden şekillendirme kapasitesine sahiptir.

Günümüzde kemik rejenerasyonu amacıyla sıkça kullanılan büyüme faktörleri kemik morfojenetik proteinler (BMP2), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β), fibroblast kaynaklı büyüme faktörleri (FGF)'dir. Bu büyüme faktörlerinin osteojenik hücre farklılaşması ve kemik rejenerasyonunu artırıcı etkileri kontrollü ilaç salınım metodu kullanılarak kanıtlanmıştır. *P. gingivalis* ile enfekte edilen kemik defektlerine doksisisiklin içeren kollajen membran uygulandığında enfeksiyonun sınırlandırıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu tedavi yöntemlerinin yanı sıra alternatif tedavi yöntemleri özellikle de bitkisel tedaviler son zamanlarda oldukça yaygınlaşmıştır. Tedavi yaptığı ileri sürülen, ancak bu etkileri bilimsel metotlarla kanıtlanamayan geleneksel veya güncel tıbbi uygulamalar olarak bilinen alternatif tedavi yönteminin başlıcası bitkisel tedavilerdir ve bitkisel tedavi amacıyla kullanılan şifalı bitkilerden biri de *Nigella sativa* (*N. sativa*)'dır. *N. sativa* hem gıda olarak hem de tedavi amaçlı sıkça tüketilen bir bitkidir. Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller) familyasından *Nigella* türüdür. Bitki ismini siyah tohumlarından almıştır ve halk arasında hem besin olarak

hem de tedavi edici olarak tohumlarından faydalanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan klinik ve deneysel çalışmalar da bu bitkinin birçok terapötik etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Bitkinin tohumlarında önemli miktarda uçucu ve sabit yağ bulunmaktadır. İçeriğindeki uçucu ve sabit yağlarda güçlü anti-inflamatuvar ve anti-mikrobiyal aktiviteye sahip bileşenler bulunmaktadır.

N. sativa'nın anti-inflamatuvar aktiviteleri hücrel nitrik oksit (NO) oluşturma kapasitesinin inhibisyonu yolu ile belirlenmiştir. Pek çok dokuda nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla L-argininden sentezlenen NO pek çok inflamatuvar hastalıkla ilişkilendirilir. Birçok in vitro çalışmada *N. sativa* yağının ve yağın aktif bileşenlerinin, inflamatuvar mediyatörlerin üretilmesindeki inhibe edici etkileri gösterilmiştir. *N. sativa*'nın ham yağının, araşidonik asit metabolizmasındaki COX ve 5-LO yollarını inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

N. sativa'nın ve aktif bileşenlerinin anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-helminitik ve anti-viral olmak üzere anti-mikrobiyal özellikleri de olduğu rapor edilmiştir. *N. sativa*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Streptococcus faecalis* (*S. faecalis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) gibi pek çok bakteriye karşı anti-bakteriyel ve bunların yanı sıra patojenik maya *Candida albicans* (*C. albicans*) ve fungusa karşı anti-fungal etki göstermektedir. *N. sativa*'nın anti-mikrobiyal aktiviteye sahip olması nedeniyle oral cerrahide çok sık karşılaşılan membranın açığa çıkmasına bağlı gelişen enfeksiyonlarda faydalı olacağı kanısıyla bu çalışmayı planladık.

Çalışmamızda *N. sativa* içeren kollajen membranın *P. gingivalis* ile enfekte edilen kritik boyutlu kemik defektlerinde kemik iyileşmesi üzerine olan etkisini histolojik ve histomorfometrik olarak incelemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

İskelet sisteminin en önemli yapı taşı oluşturulan kemik, özelleşmiş bir bağ dokusudur. Yapısında bulundurduğu farklı hücrelerin ve ara maddenin üzerine organik ve inorganik tuzlar çökeler, böylelikle esneklik ve sağlamlılık gibi fiziksel özellikler kazanmış olur (1, 2). Kemik dışarıdan gelen mekanik uyarılara karşı kendini yenileyebilen, hacmini, şeklini ve içeriğini bu doğrultuda yönlendirebilen bir dokudur (3, 4).

Kemik en dış kısımda kortikal kemik veya kompakt kemik bulunur, mekanik destek sağlar ve lameller kemik formunda ince kollajen fibrillerden oluşur. Kemiğin metabolik faaliyetlerinden sorumlu kısmı, merkezinde yer alan kansellöz, trabeküler ya da spongios kemiktir. Bu kısımda düzgün sıralanmış fibriller bulunmaz, matriksi gevşek yapıdadır. Makroskopik olarak balpeteği veya kafes görüntüsü olup üzerinde hematopoetik elemanları barındırır (5).

Sert ve dayanıklı bir yapı olan kemiğin % 70'i inorganik ve % 30'u organik yapıdadır. Organik kısım çoğunlukla Tip 1 kollajenden ve daha az oranda glikoproteinler ve glikozaminoglikanlardan oluşur. İnorganik kısmının çoğunluğunu kalsiyum ve fosfat oluşturmakla birlikte, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum bulunur (6, 7).

Bütün kemiklerin iç ve dış yüzeyleri, kemik yapan ve tamir eden hücreler içeren, dış yüzeylerde “periosteum” ve iç yüzeylerde “endosteum” olarak adlandırılan doku tabakaları ile örtülüdür (7, 8, 9).

2.1.1. Kemik hücreleri

Kemiğin temel hücreleri osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve mezenkimal osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır (10).

2.1.1.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar, embriyonel yaşamda mezenkim hücrelerinden, daha sonraları da bağ dokusunu oluşturan fibroblastlardan farklılaşan kemik yapıcı hücrelerdir. Kemik matriksini oluşturan Tip 1 kollajeni, glikoproteinleri, osteokalsin, osteoprotegerin gibi bazı proteinleri salgırlar. Kemik yapıcı görevleri sona erdiğinde oluşturdıkları matriks içerisinde osteositlere dönüşürler (11, 7).

Osteoblastlar, osteoklastlarla beraber kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesinde etkili olup; rezorbe edilen kemik yüzeylerinde yeni kemik oluşturur (8).

2.1.1.2. Osteositler

Osteositler kalsifiye kemik matriksi içerisindeki lakün denilen küçük boşluklarda yerleşmiş olgun hücrelerdir. Her lakünün içinde bir osteosit bulunur (7). Hücrelerin metabolizma faaliyetlerinin devamlılığını sağlayan, kanalikül adı verilen küçük kanalcıklar ile lakünler birbirlerine ve kan damarlarına bağlıdır (12). Osteositler, kemiğe etki eden kuvvetler karşısında siklik adenozin monofosfat (cAMP), osteokalsin ve insülin büyüme faktörü (IGF) salgırlar. Bu faktörlerin salgılanmasını takiben, pre-osteoblastların sayısı artarak kemikte yeniden şekillenme (remodeling) ve kemik apozisyonu görülür (13, 14, 7).

2.1.1.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar kemik yıkıcı hücreler olup; 5 ile 50 arasında değişen sayıda çekirdekleri vardır. Kemik rezorpsiyonunun arttığı patolojik durumlarda bu hücrelerin sayısı artarken, normal kemik yeniden şekillenmesi sırasında ise sayıları azalır (15). Osteoklastlar kendi oluşturduğu Howship lakünü denilen kavitelerde görülür. Osteoklastlar kemik iliğinden elde edilen hücrelerin kaynaşması ile ortaya çıkarlar (6).

2.1.1.4. Osteoprogenitör hücreler

Mitozla çoğalabilen kemik yapıcı öncü hücreler olup, periyosteumun iç tabakasında, havers kanallarında ve endosteumda bulunur. Embriyojenik mezenkimden

köken alıp osteoblastlara farklılaşabildikleri gibi düşük oksijen konsantrasyonlarında kondrojenik hücrelere de farklılaşabilirler (18, 19). Osteoprogenitör hücreler oval çekirdekli olup, sitoplazmaları açık pembe boyanır. En çok kemik büyümesi sırasında aktif olurlar (6).

2.2. Kemik Tipleri

Mikroskopik olarak primer (olgunlaşmamış/woven) ve sekonder (olgun/lameller) kemik olmak üzere iki farklı tipte kemik bulunur (20).

Primer kemik dokusu, prenatal gelişme, büyüme ve kemik iyileşmesi sırasında kan damarlarının yakınındaki osteoprogenitör hücreler tarafından üretilir. Üç yaşından sonra yerini lameller kemiğe bırakan primer kemik, yetişkinlerde kafatasındaki yassı kemik eklemlerinde, diş alveollerinde ve tendonların kemiğe tutunduğu bölgeler gibi yerler dışında geçici bir kemik yapısıdır (21). Primer kemik oldukça az mineral içerir ve mekanik direnci az olup, lameller kemiğe oranla daha kısa ömürlüdür (22).

Sekonder kemik dokusu genellikle yetişkinlerde bulunan, kortikal ve kansellöz olmak üzere iki yapısal türe ayrılan kemiktir. Erişkin insan iskeletinin %80'ini oluşturan kortikal kemik, uzun kemiklerin diafizlerini ve metafizlerinin dış tabakasını kaplayan, solid ve kompakt bir dokudur (23).

Havers kanallarının etrafında iç içe geçmiş halkalar şeklinde konumlanan lameller, ancak mikroskopik olarak görülebilir. Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran, dairesel lamellere 'Havers Sistemi' ya da 'Osteon' denir (24,25). Kemik yüzeyine dik olarak konumlanan diğer bir kanal sistemine ise 'Volkmann Kanalları' denir. Volkmann kanalları içindeki damarlar Havers kanalları içindikilerle bağlantılı olup kemiğin iç ve dış yüzeyi arasında bağlantı sağlar (11).

Kansellöz (spongiyöz) kemik kortikal kemiğe göre daha zayıf ve yumuşaktır. Hacimsel olarak vücut kemiklerinin %20'sini oluşturur. Osteon, süngerimsi kemikte bulunmaz. Trabekül adı verilen ve makroskopik olarak gözlenebilen plaklar ve gözeneklerden oluşur. İçerisinde kan damarları ve kemik iliği bulunur (20, 1).

Kemik oluşumu iki farklı şekilde gerçekleşir.

- İntramembranöz kemik oluşumu (doğrudan kemikleşme)
- Endokondral kemik oluşumu (dolaylı kemikleşme)

İntramembranöz kemikleşme ile oluşan kemiklere; kafatasının frontal ve pariyetal kemiklerinin yanı sıra oksipital, temporal, mandibula ve maksilladaki kemiklerin bazıları örnek gösterilebilir (7). Mezenkim hücreleri membranöz kemiğin oluşacağı yere göç eder ve kemik şemasının oluşacağı bölgelere yapışırlar. Mezenkim hücrelerinden gelişen fibroblastlardan salınan kollajen fibrillerden zar şeklinde bağ dokusu oluşur. Zar yapının oluşmasından sonra mezenkim dokusu vaskülarize olmaya başlar ve kemikleşmenin başlayabilmesi için yoğunlaşır. Bu yoğunlaşma alanlarına primer kemikleşme noktaları adı verilir. Mezenkim hücreleri osteoblastlara dönüşür ve osteoblastlar da kemik matriksini oluşturmak üzere kollajen ve proteoglikanların üretimine başlar. Bu aşamadan sonra oluşan kemik matriksinin kalsifikasyonudur. Osteoblastlar oluşturdukları kemik matriksi zamanla kalsifiye oldukça osteositlere dönüşür ve yerlerini, çevre mezenkim hücrelerinden farklılaşan yenileri alır. Bu şekilde pek çok kemikleşme merkezinden oluşan, kemik adacıkları meydana gelir. Birkaç kemikleşme merkezi ışınsal olarak büyüyüp birleşir ve başlangıçtaki bağ dokusu zarının yerini alır. Kemik adacıkları arasında kalan mezenkim dokusundan kemik iliği hücreleri meydana gelir ve oluşan bu kemik süngerimsi yapıdadır (26, 27, 28).

Süngerimsi kemik yeterli büyüklüğe ulaştınca, mezenkim membranın kemikleşmeye katılmayan bölümünün periferik kısmı periostu oluştururken, inferior kısmı endosteumu oluşturur. Süngerimsi kemik etrafında, periost tarafından tabaka tabaka birbiri üstüne yığılmış kompakt kemik kabuğu yapılıdır (29, 30). Mezenkim kökenli yoğun bağ dokusu bir kalıp oluşturarak yeni kemik oluşumuna yardımcı olmaktadır.

Endokondral kemik oluşumu; embriyonik yaşamda başlayıp doğum sonrası büyüme tamamlanıncaya kadar devam eden, kıkırdaktan gelişen iskeletin yerini kemik dokuya bırakmasıyla karakterize bir kemik oluşumdur. Önce bir kıkırdak taslak geliştiği ve dolaylı olarak kemik oluşumu başladığı için bu kemik oluşumuna indirekt

kemikleşme de denilmektedir. Özellikle yuvarlak bir uç olan epifiz ve uzun bir diyafizden oluşan uzun kemiklerin şekillenmesi bu yolla olmaktadır (31). Klavikula dışında kalan uzun kemiklerin, kafa tabanı, omurga ve kalça kemiklerinin kemikleşmesi de bu yolla gerçekleşir. Uzun kemiklerin gelişiminde önce bu kemiğin mezenkim dokudan hyalin kıkırdak yapıda küçük bir taslağı oluşur ve bu kıkırdak taslak apozisyonel büyüme yoluyla daha uzun bir şekil alır (29, 31).

Mezenkim hücreleri ilk önce kıkırdak matriksi oluşturacak olan kondroblastlara dönüşür. Hiyalin kıkırdağın kondrositleri hipertrofiye uğrar ve harap olarak ölür, geriye lakünler kalır. Osteoprogenitör hücreler ve kan damarları, kıkırdak hücrelerinden geriye kalan lakünlere dolar. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşür, böylece kartilaj yapı kemik matriksiyle örtülmeye başlar. Kalsifikasyonun da başlamasıyla kemikleşmenin sonuna yaklaşılr. Diafiz kemikleştikten sonra diafizin üstünü saran kıkırdak kılıfı olan perikondrium periosteum haline dönüşür. Bundan sonra diafizin kalınlaşması gibi kemikleşme olayları direk olarak yani intramembranöz yol ile meydana gelir. Ancak uzun kemiğin diafizinin uç kısımlarında primordial kıkırdaklar kalır ve buradan endokondral kemikleşme ile kemik uzunluğu artmaya devam eder (27, 32).

Doğumdan sonra uzun kemiğin uç kısımlarında bulunan primordial kıkırdakta bir ikincil kemikleşme merkezi oluşarak uzun kemiğin epifizi meydana gelir. Birincil kemikleşme merkezinden oluşan diafiz kemiği ile ikincil epifiz kemiği arasında bir primordial kıkırdak tabakası kalır. Bu kıkırdak tabakasına epifiz kıkırdağı adı verilir. Büyüme bitinceye kadar epifiz kıkırdağındaki hücre çoğalması ve endokondral kemikleşmeyle kemik uzunluğu artmaya devam eder. Büyüme bitince bu epifiz kıkırdağı tamamen kemikleşerek kalsifiye olarak ortadan kalkar (32).

2.3. Kemik İyileşmesi

Kemik iyileşmesi yaralanmanın hemen ardından orijinal iskeletsel yapı ve fonksiyonu oluşturmak için birbirine bağlantılı hücresel, hümorale ve vasküler olaylar sonucunda oluşan doku yanıtıdır. Kemik dokusu rejenerasyon kapasitesine sahiptir.

Kemik iyileşmesi defekt olduğu andan itibaren, içindeki ve etrafındaki mezenkimal dokuların latent pozisyonu ile defekte karşı bölgesel bir tepki oluşturarak yanıt verir ve defekt kapanıncaya dek devam eder (33, 34). Kemikte yaralanmanın karakterine göre rejenerasyon veya tamir şeklinde yanıt oluşur. Stabilize bir yeşil ağaç kırığında rejenerasyon şeklinde olurken, kemikteki daha geniş bir defekt ise tamir ile iyileşir.

Kemik dokudaki iyileşme dört safhada gerçekleşmektedir:

- Yangı (inflamasyon) fazı
- Granülasyon dokusu fazı
- Kallus fazı
- Remodelasyon fazı

2.3.1. Yangı (inflamasyon) fazı

İlk gözlenen faz olup yaralanma bölgesine kan ve lenf sıvısı gelir. İlk tepki olarak kan damarlarında vazokonstriksiyon oluşur daha sonra mast hücrelerinden histamin salınımı ile vazodilatasyon gerçekleşir. Vazodilatasyon ve lenf sıvısı eksudasyonuna bağlı olarak ilk 24 saatte ödem gerçekleşir. Daha sonra polimorf nüveli hücreler, monositler ve lenfositler gibi iltihap hücreleri hasarlı bölgeye göç ederek akut yangıyı oluştururken, pıhtılaşma faktörleri ve trombositler ise pıhtıyı oluşturur. Daha sonra pıhtının periost ve yumuşak dokunun altında birikmesiyle hematoma meydana gelir. Oluşan bu hematoma, çevre yumuşak doku sahalarıyla sınırlanmış hipoksi asidik bir oluşum olup çevresindeki sağlam dokulardaki hücreler ile iletişim halindedir (35, 36).

2.3.2. Granülasyon dokusu fazı

Yangı safhasında oluşan hematoma bu safhada organize olup onarım fazını başlatmaktadır (37, 38, 39, 40).

Öncü hücreler olan ve birden çok hücreye farklılaşma yeteneğine sahip olan mezenkimal kök hücreleri, kemotaktik sinyaller ile bölgeye çağırılır. Mezenkimal kök hücreleri kimyasal, mekanik, elektriksel lokal uyaranlara cevap vererek fibroblastlara,

intersellüler materyallere ve destek hücrelerine farklılaşarak yumuşak granülasyon dokusu oluşturarak bölgede stabilite sağlarlar (37, 38, 39, 40).

Mezenkimal kök hücreleri ilk 16 saatte çoğalır ve 32. saatte en yüksek seviyeye erişmektedirler. 3. günde yoğunlaşan mezenkimal kök hücreleri kemotaktik sinyaller ile gelip, periosteum ile kemik arasında birikerek osteoprogenitör hücreler, osteoblast ve kondroblastlara farklılaşırlar (41, 40).

Periost altında kan damarlarına yakın olan, beslenmenin iyi olduğu kemik yüzeylerinde mezenkimal hücreler osteoblastlara dönüşerek osteoidi oluşturur. Kapiller gelişim osteojenik gelişim kadar hızlı olmadığından alt katmanlara inildikçe damarlanma azalır böylelikle mezenkimal kök hücreler kondroblastlara farklılaşarak kıkırdak matriksi oluşturur. Bunun sonucunda osteoid doku ve kıkırdak matriks mineralizasyona hazır hale gelmektedir (37, 42).

2.3.3. Kallus fazı

Osteoid ve kıkırdak matriksin mineralizasyonunun gerçekleştiği fazdır. Kıkırdak matriks tarafından yumuşak kallus (fibröz kallus) meydana gelir, fakat bu kallusun sert kallusa (kemik kallusuna) dönüşmesi için damarlanması gerekmektedir. Damar endotelindeki sialik asitlerin ve kıkırdak dokudaki proteoglikanların negatif (-) yüklü olmasından dolayı bu yapılar birbirini itmekte ve damar kıkırdak doku içine doğru dallanamamaktadır. Bu noktada damarların ilerleyeceği boşluklar ancak osteoid dokunun mineralizasyonu sonucu gerçekleşecektir (39, 40).

Osteoblastlar osteoid dokuda mineralizasyonu başlatıp devam ettirir. Hücresel düzeyde matriks veziküllerinin içerdiği lipid, alkalen fosfataz, yoğunlaşmış kalsiyum fosfat, alkalen adenozintrifosfat ve profosfataz enzim sayesinde osteoid dokunun mineralizasyonu tamamlanır. Osteoblastlar, kalsifiye doku içinde kaldıkları için osteositlere dönüşür ve böylece dağınık trabeküler kemik ağı oluşturulur. Kemik trabeküllerinin sayısı gittikçe artar ve bu trabeküller birbirleriyle birleşerek bir kemik ağı meydana getirir (29, 43). Böylelikle; damarlar, kıkırdak matriks içine ilerler ve alkalen fosfataz salgılanmasıyla da kıkırdak matriksin kalsifikasyonu başlar. Kalsifiye

doku içinde kalan kondrositler ölmeye başlarlar ve böylece buldukları yerlerde lakünler meydana gelir. Kondroklastik aktiviteyle artan rezorpsiyon sonucu lakünler genişlemeye devam eder. Bu süreç devam ederken laküner boşluklara kapiller damarlar ve osteojenik hücreler invaze olmaya başlar. Lakün içine invaze olan osteojenik ve kan kaynaklı hücrelerden osteoblastların belirmesiyle, rezorbe olan kalsifiye kıkırdak matriksle yeni kemik dokusunun yer değiştirmesine adım atılmış olur. Bütün bu aşamaların sonunda da yumuşak kallusun kemik kallusa dönüşmesi gerçekleştirilmiş olmaktadır (44, 29, 43).

2.3.4. Yeniden yapılandırma (Remodelling Fazı):

Kemikte devamlı olarak osteoklastik faaliyet sonucu oluşan rezorpsiyon alanları olan boşluklarda osteoblastlar tarafından kemiğin tekrar yapıldığı, yeniden şekillenme sürecidir. Bu süreçte kalsifiye kıkırdak osteoid ile yer değiştirir ve daha sonra da osteoid doku lameller kemik dokuya yerini bırakır. Kemik iyileşmesinin en uzun safhasını oluşturan bu dönem aylarca veya yıllarca sürebilmektedir (35, 40).

2.4. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kemik yapımı, şekillenmesi, yeniden şekillenmesi ve tamiri gibi hücrel işlevlerin uyumlu bir şekilde yürütülebilmesi için çeşitli sistemik ve lokal düzenleyici faktörlere ihtiyaç vardır.

2.4.1. Sistemik faktörler

Sistemik hormonların, kemik metabolizmasının düzenlenmesinde önemli etkileri vardır. Paratiroid hormon (PTH), kemik ve böbrekler üzerinde etkili olarak, kanda ve ekstrasellüler sıvıda kalsiyum düzeyinin yüksek tutulmasını sağlar. Kemik üzerinde yeniden şekillenmeyi uyaran bir etkisi vardır. PTH öncelikle osteoblast reseptörlerini etkileyerek, yeni kemik yapımının durdurulmasını ve osteoklast uyarıcı faktörün salgılanmasını sağlayarak, kemik matriksinin rezorbe olması sayesinde kalsiyumun serbest kalmasını sağlar (45). Kalsitonin, PTH'nun antagonistidir. Hem kompakt, hem

de trabeküler kemik yapımını artırır. Olgunlaşmış osteoklastlar üzerinde, osteoklastik aktivitelerini engelleyici bir etkisi vardır. Glukokortikoidler, anabolik ve katabolik etkisi olan PTH ve insülin büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi hormonların etkinliğini arttırmaktadır. Glukokortikoidlerin aktif osteoblastlar üzerindeki etkilerinin çoğu engelleme yönündedir. Osteoblastların apoptozuna neden olarak kemik yapımını engellerler (46). Östrojen ise kemik kütesinin korunmasında etkilidir. Östrojenlerin dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) üretimini uyararak osteoklast ölümünde artışa yol açtığı düşünülmektedir (16).

2.4.2. Lokal düzenleyici faktörler

Trombositlerden, makrofajlardan ve fibroblastlardan salgılanan, büyüme faktörleri adı verilen proteinler de kemik metabolizmasını etkiler. Kemığın iyileşme sürecinde damarlanmasını, sertliğini, mekanik olarak işlev görmesini sağlayan bu proteinler genel olarak, kemik kemik iyileşmesini hızlandıran proteinler, kemik morfojenetik proteinler (BMP), IGF, TGF, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF) ve fibroblast kaynaklı büyüme faktörleri (FGF)'dir. Bu proteinler monosit ve fibroblast gibi mezenkim kökenli hücrelerin göç etmesini, çoğalmasını ve kemik hücrelerine farklılaşmasını düzenlerler (47, 48).

PDGF, osteoprogenitör hücreleri ve protein sentezini uyarırlar. FGF, osteoblast proliferasyonunu ve kollajen sentezini artırır. IGF, preosteoblastik proliferasyonu stimüle ederler ve kollajen yıkımını azaltırlar. TGF ise, osteoblast oluşturan öncül hücreleri uyararak hücrel olgunlaşmada görev alırlar. TGF- β salınımı ile Tip 1 kollajen sentezi arasında ilişki bulunmaktadır (47).

Büyüme hormonu ise, osteoblastlar tarafından IGF-1 yapımını artırarak etki gösterir. Prostaglandinler, prostanoik asit adı verilen doymuş yağ asidinin türevidir, osteoblastik hücrelerde adenilat siklazı aktive ederek PTH'a karşı verilen tepkilere benzer cevap elde edilmesine yol açarlar (47, 46).

2.5. Kritik Boyutlu Defekt

Bir kemik defektinde gerçekleşecek iyileşme miktarı, büyük oranda defektin büyüklüğüne bağlıdır. Bu nedenle iyileşmenin değerlendirilmesi için kullanılan deneysel kemik yarası, spontan iyileşmeye engel olmak için yeteri kadar büyük olmalıdır (49).

Kritik boyutlu defekt (KBD), bir hayvanda her hangi bir osteopromotif bir materyal kullanılmadan yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı (dolumu) ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak tanımlanmaktadır (49). Osteojenik materyallerin değerlendirilmesinde standart bir model olarak Hollinger ve Kleinschmidt tarafından önerilmiştir (50,51).

KBD'ler kendi haline bırakıldığında kemikle değil de fibröz bağ doku ile iyileşmektedir. Bununla birlikte pek çok çalışmada sürenin sınırlı olması ve hayvanın tüm hayatına uzatılamamasından dolayı hayvan çalışmalarında KBD, çalışmanın süresi boyunca iyileşemeyen defektleri ifade etmektedir (50).

KBD çalışmaları için seçilen anatomik bölgeler kalvaryaya, mandibula ve tibia gibi uzun kemiklerdir (51, 52).

Defektin büyüklüğü ve hayvan türüne göre kemik defektinde kemik iyileşmesi farklılık göstermektedir. Çeşitli kaynaklarda buna yönelik farklı rakamlar verilebilmektedir. Sıçan tibiasında oluşturulan defektlerde kritik boyutta kemik defektinin 3 mm olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi 4 mm olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (53, 54, 55).

Hayvan modelleri kullanılarak kontrol gruplarının standardize edildiği kritik boyutlu kemik defekti konsepti, yeni bir greft materyali ve maksillofasiyal bölgede kullanılan kemik greft materyallerinin etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılabilir bir modeldir (49, 51).

2.6. Kemik Greftleri

Canlı dokunun transplantasyonu ve organların kazanılmış veya konjenital defektlerin rekonstrüksiyonunda yer tutucu özelliği ile birlikte kemik yapımını uyaran tüm materyaller için greft terimi kullanılmaktadır (56).

Kemik greft materyalleri etki şekline göre üç şekilde sınıflandırılırlar. Bunlar:

Osteogenezis: Bir materyalin doğrudan osteoblastlar ile yeni kemik yapabilmek kabiliyetine denir. Osteogenezde kemik greft materyalleri, direkt olarak osteoblast hücrelerinden kemik oluşturma kapasitesine sahip organik materyaller içerirler. Bu osteojenik özelliğe sahip tek greft materyali ise otojen kemiktir (57, 58, 59).

Osteoindüksiyon: Alıcı sahadaki farklılaşmamış mezenkimal kök hücrelerinin osteoblast veya kondroblastlara dönüşümü ile gerçekleşir (57, 60, 61, 62).

Osteokondüksiyon: Greft materyalinin uygulandığı alanda çatı görevi görmesi ve zamanla rezorpsiyona uğrayarak yerini yeni kemiğe bırakmasıdır (63).

Kemik greftleri elde edilme yöntemlerine göre otojen kemik greftleri, allogreft, ksenogreft ve alloplastik materyaller olmak üzere dört ana sınıfa ayrılır.

2.6.1. Otojen greftler

Otojen greftler, bir canlıdan alınan doku parçasının yine aynı canlının vücudunun başka bir yerine yerleştirilmesidir. Otojen greftler, kemik greftleri arasında altın standart olarak kabul edilir. Bu greftlerin en büyük özelliği, osteojenik hücreler bulundurmaları ve immünolojik reaksiyona sebep olmamalarıdır. Ağız içi verici alanlar olarak; alt çene ucu bölgesi (simfiz), alt çene ramus bölgesi, üst çene tüber bölgesi, dişsiz kret veya retromolar bölgelerden alınan greftler kullanılabilir. Ağız dışı verici bölgeler olarak; tibial kemik, kaburga, kalvaryum ve iliak kemikten alınan greftler kullanılabilir. Bu greftlerin osteokondüktif ve osteoindüktif olmalarının yanında, verici bölgede ikinci bir operasyona ihtiyaç duyulması, işlemlerin zaman alıcı olması, hasta için travmatik olmasının yanı sıra postoperatif ağrı ve ödem, greftin alındığı bölgeye göre değişen komplikasyonların ortaya çıkabilmesi gibi dezavantajlara sahiptir (64, 65, 66, 67, 68).

2.6.2. Allogreftler

Allogreftler, genetik olarak birbiriyle ilgisi olmayan fakat aynı tür canlıdan dokulara denir. Bu greftler, kadavralardan veya kalça kırıkları gibi insanlardan çıkarılan kemiklerden elde edilip, liyofilizasyon, demineralizasyon ve deproteinizasyon gibi bir seri işlemlere tabi tutularak kemik bankalarında muhafaza edilirler (69). Bunlar osteokondüktif aktiviteye sahip olup aynı zamanda osteoindüktif kapasiteye de sahiptirler.

2.6.3. Ksenogreftler

Ksenogreftler, bir canlı türünden alınıp farklı canlı türüne aktarılan materyallerdir. Domuz, at, mercan ve sığır yaygın bir şekilde greft kaynağı olarak kullanılıp, demineralizasyon ve deproteinize işlemlerine tabi tutulurlar. Osteokondüktif özelliğe sahiptirler (69).

2.6.4. Alloplastlar

Vücut dokularıyla uyumlu, sentetik organik maddeden arındırılmış ve biyouyumlu materyallerdir. Bu sentetik kemik materyalleri, osteokondüktif etkiye sahiptirler fakat osteojenik ve osteoindüktif etkilerininin olmayışı büyük bir dezavantajdır (70).

Hidroksiapatit, trikalsiyumfosfat, biyoaktif cam seramikler, kalsiyum sülfat en sık kullanılan alloplastik materyallerdir (71).

2.7. Bariyer Membranlar

Kemik defektlerinin iyileşme sürecinde bağ dokusu ve kemik dokusunun farklı rejenerasyon döngüsü ile, çevre dokulardan gelen fibröz doku daha hızlı rejenerasyon olarak kavite içine yerleşebilir, osteogenezisi bozarak kemik formasyonunu engelleyebilir.

Fibröz iyileşme sonucu kemiğin devamlılığı ve fonksiyonu sağlanamaz ve sonuç olarak yeni bir rekonstrüktif cerrahi gereksinimi ortaya çıkabilir (72).

Gingival epitel ve bağ dokusunun bariyer ile oluşturulan boşluğa yerleşmesinden korumak ve defekt bölgesindeki rejenaratif hücrelerin repopulasyonun teşviki için gingival flep ile defekt arasında fiziksel bir bariyer olarak konumlandırılan ve böylece planlanan kemiksel iyileşmeyi sağlayan biomateryallere bariyer membran denir.

İnsan ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar mekanik bariyer kullanımının kemik rejenerasyonunu arttırdığını göstermektedir (73). Bunun yanı sıra yapılan pek çok çalışma sonucunda da bu teknikle bariyer membran hapsettiği alan içindeki rejenaratif hücrelerin göçüne izin verirken, istenmeyen hücrelerin ise yara bölgesine göçünü engellemektedir.

Bariyer membranların genel özellikleri:

- Yara ve çevre yumuşak dokudan tamamen korur,
- Defekt içine osteojenik güce sahip olan hücrelerin dolmasını sağlar,
- Yeni oluşan kemik sınırlarını tayin eder ve iskeletsel konturun elde edilmesini sağlar,
- Flep üzerine gelecek mekanik streslere rağmen pıhtının aynı kalmasını sağlar,
- İmplant ve kemik defekti yüzeyinden diş eti dokularını ayırmak için kullanılan kullanılan fiziksel bariyer görevi yaparak bir boşluk oluşması ve bu boşluğun kemik ile dolmasını sağlar,
- Altındaki kemik greftini stabilize ederek, çöküş veya yumuşak dokunun içine büyümesini engeller (74, 75, 76).

Scantlebury ve ark.'ları tarafından tanımlanan beş temel tasarım kriterleri olmadan bariyer membranların tıbbi bir araç olarak kullanılması pek mümkün değildir. Bu kriterler (77) ;

- Biyo-uyumluluk,
- Büyüme için alan yaratma,
- Hücre tıkalılığı,
- Doku entegrasyonu,
- Klinik yöneltilebilirliktir.

Membranlarda bulunması gereken diğer özellikler ise;

- Membran güvenli olup hastalık iletmemeli,
- Kemiğe veya köke sıkı bir şekilde adapte olmalı,
- Defekte bir kollaps yapmamalı,
- Geçirgenliği olmalı,
- Antimikrobiyal ve biyostimulan olmalı,
- Biyoyıkımı kontrol edebilir olmalıdır.

Membran Bariyer Çeşitleri

Farklı bariyer membranlar, klinik uygulamalarda birçok fonksiyona hizmet vermek için geliştirmişlerdir. Membranların biyomateryal ve fiziksel karakteristikleri, nihayetinde onların fonksiyonlarını etkilemektedir. Tüm materyaller, o an için seçilmiş olan materyale bakılmaksızın, güvenli, etkili, kolay kullanılabilir olmalıdır, rejenerasyon tamamlanana kadar yerlerinde kalmadırlar ve yeniden oluşan dokuyla karışmamalıdır. Farklı klinik durumları farklı materyaller gerektirmektedir ve bu materyallerin her biri doğasına uygun olarak hem avantajlar, hem de dezavantajlar taşımaktadır. Membran bariyer materyalleri 'rezorbe olabilen' ve 'rezorbe olamayan' olarak ikiye ayrılmıştır (78).

2.7.1. Rezorbe olabilen membranlar

Rezorbe olan membran kullanımının en önemli avantajı ikinci bir cerrahi prosedüre gerek duyulmamasıdır. Böylece hasta morbiditesi ve maliyet daha az olur (80). Dezavantajı postoperatif doku iyileşmesinde problem yaratan, materyalin açığa çıkması yada flebin açılmasıdır. Ameliyattan sonra materyalin açığa çıkması bakteri çoğalmasına, fibroblast morfolojisinin değişmesine ve migrasyonuna, bütün bunlar da rejenerasyon prosesinin başarısının tehlikeye atılmasına yol açabilir. Bir diğer yaygın problem ise, defekt içine doğru membranın kollabe olmasıdır. Kollaps boşluğun yetersiz olmasına yol açabilir (80).

Rezorbe olabilme çevre dokuların hücre sel cevabı olarak enzimatik aktivite (biyolojik bozunma) veya hidrolizasyon (biyoabsorbsiyon) yoluyla bozunma ile ilgili olabilir. İnflamatuar cevap minimal olmalı ve rejenerasyona engel olmamalıdır (81).

2.7.1.1 Kollajen membranlar

Kollajen, fizyolojik olarak metabolize olan bir makromoleküldür. Zayıf immünojendir (79, 82). Kollojenin, koagülasyon ve doku iyileşmesindeki olumlu etkileri, kontrollü çapraz bağları, düşük antijenitesi, genişletilebilir olması, yüksek gerilim direnci, lif yapısının uygun olması iyi bir bariyer materyali olmasını sağlayan karakteristik özellikleridir. Kollojen yaprak, jel, tüp, toz ve sünger gibi değişik formlarda üretilebilir (83). Kollajen membran kullanımının avantajları minimal postoperatif komplikasyon, yüksek iyileşme oranı, materyalin açığa çıkmaması, dokuda perforasyona yol açmamasıdır. Bunlara ilave olarak hassasiyet reaksiyonları, immün cevap, dokunun pul pul dökülmesi, geç iyileşme ya da postoperatif infeksiyon insidansı yoktur. Kollojenin doku integrasyonu, boşluk oluşturması, hücre geçirgenliğinin olmaması, biyouyumluluğu ve klinik uygulanabilirliği bariyer membran tekniği seçimindeki kriterlere uymaktadır. Bu nedenle kollojen, rejeneratif tedavide faydalı bir membran materyalidir (80).

Kollajen yüksek oranda kalsiyum bağlama özelliğine sahiptir. Tip-1 kollajen, periyodontal konnektif dokuda bulunan temel komponenttir. Ve bu membranların da temel komponentini oluşturur (84, 75, 76, 85).

Kollajen kendi başına bir doku olarak, işe yarar bir bariyer aracı durumunda kullanıldığında, 2 belirgin yöneme sahiptir. İlk olarak kemotaksisi düzenler (fibroblastlar için), ve ikinci olarakta hemostazı düzenlemektedir (79, 86, 87).

2.7.1.2 Polilaktik asit ve poliglikolik asit polimerleri

Polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asit (PGA) polimerleri asıl olarak rezorbe olabilen alifatik poliesterlerdir. PLA ve PGA gibi sentetik polimerler doğal

kaynaklardan elde edilen maddelere göre çeşitli üstün özelliklere sahiptirler. Yapıları kontrol altında tutulabilir (88).

2.7.2. Rezorbe olmayan membranlar

Rezorbe olmayan membranlar, selüloz filtreler, Gore-Tex (Gore-Tex, W. L. Gore, Flagstaff, AZ) tarafından yapılmış genişletilmiş politetrafloroetilenleri (e-PTFE), yoğun (d-PTFE) yapıları, nanopolitetrafloroetilen, titanyum tel meş ve dental rubber damlar içermektedir. Bu materyaller, besin ve sıvı maddelerinin bariyer boyunca geçişine izin verir ama hücrelerin geçişine izin vermez (89). Rezorbe olmayan membranların, ikinci bir cerrahi işlemle çıkartılmasının gerekmesi, maliyeti arttırması, tedavi süresini uzatması ve doku hasarı riski taşıması gibi dezavantajları nedeniyle günümüzde rezorbe olabilen membranlar daha çok tercih edilmektedir (80).

2.7.2.1 e-PTFE

1984 yılından itibaren kullanılmaya başlanan genişletilmiş politetrafloroetilen, yapısında teflon olan poröz bir bariyer olup bilinen en inert biyomateryaldir. Por çapları 0.2-5µm arasında bulunabilir. Yabancı doku reaksiyonu oluşturmaz. Ayrıca oral kaviteye ekspoze olmaları durumunda bile intakt halde kalmaya devam ederler (84, 74, 75, 76, 78).

Yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda kullanılan e-PTFE'in mikroporozite özelliği vardır. Bu, özellikle sıvı geçişini sağlar ve hücreler için gerekli besinlerin geçişine izin verir. Kolayca sterilize edilebilir (90). e-PTFE epitelyum göçünü sınırlamakta, yarayı stabilize etmekte ve epitelyumi muhafaza etmektedir (90).

Membranın çıkarılması için ikinci bir cerrahi operasyona gereksinim duyulması, doku zararı oluşma riski ve hastanın psikolojisini etkilemesi açısından dental tedavilerde pek tercih edilmemektedir (91).

2.7.2.2. Nanopolitetrafloroetilen

Nanopolitetrafloroetilen’de sinterleme işlemi yapılmaz; bu da materyali daha esnek, manüplasyonu ve adaptasyonu daha kolay hale getirir. 0.2 -0.3 µm’lik porlara sahiptir. Bu daha küçük porların epitelyal büyümeyi ve bakteriyel infiltrasyonu limitlediği düşünülmektedir (75, 76).

2.7.2.3. Titanyum membranlar

Boyne ve arkadaşları 1969 yılında, büyük kesikli kemiksel defektlerin yeniden yapılandırılmasında titanyumdan oluşan bir tel mesh kullanmaya başlamıştır (92). Yüksek dayanıklılık, sertlik, düşük yoğunluk ve ağırlık, kimyasal aşınmalara karşı dirençlilik ve yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklılık gibi titanyumun pek çok özelliği olsa da ikinci bir cerrahi operasyona ihtiyaç duyulması ve makro-çoklu gözenekli yapıda olmasıyla mikrobik kontaminasyonun iyileşme bölgesine daha kolay yoldan girmesine olanak tanınmasıyla, dental uygulamalarındaki kullanımı kısıtlıdır (92, 93).

2.7.3 Kombine membranlar

Bazı durumlarda e-PTFE membranlar titanyum ile içten güçlendirilir. İki tabaka PTFE arasına titanyum yerleştirilmesi ile elde edilir. Titanyumla güçlendirmenin sağladığı avantaj rejenerasyon oluşması istenen bölgenin idamesinin sağlanması, yumuşak dokunu çökmesinin engellenmesi, greft materyali üzerine kuvvet gelmesini ve bunun sonucunda da rezorbsiyon oluşmasının engellenmesidir. Yüzey yapısı ve porları, bakteri geçişini ve tutulmasını engelleyecek şekilde tasarlanmıştır. Yumuşak dokunun defekt bölgesine migrasyonunu azaltarak bölgede kemik oluşumu ve neovaskülarizasyona elverişli ortam sağlanır. Bükülemeyecek kadar sıkı, ancak yumuşak dokuyu perfore etmeyecek kadar esnek yapıda bulunurlar (75, 76).

2.8. *Porphyromonas Gingivalis* (*P. gingivalis*)

P. gingivalis non-fermenter, siyah pigmentli zorunlu gram negatif bir anaerob çubuktur (94). Boyutları 0,5 µm -1,2 µm arasındadır ve kokobasil görünümünde olmakla beraber morfolojisi besi yerinin özelliklerine göre değişmektedir. En iyi bilinen periodontal patojen suşlar; *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* 17A3 ve *P. gingivalis* W83'tür. *P. gingivalis*, oral kavitede en çok periodontal bölgede bulunmaktadır (95, 96, 97, 98, 99). Çoğunlukla subgingival bölgelerde ve diş eti oluşunda tek tek duran, kapsüllü ve birbirinden farklı büyüklükte kısa kök zincirleri veya koko-basil kümeleri halinde bulunur; dil ve tonsillerden de izole edilebilmektedir (95). Daha çok periodontal sorunlu dişlerin periodonsiyumlarında rastlanılsa da, son yıllarda yapılan moleküler mikrobiyolojik çalışmalar *P.gingivalis*'in enfekte kök kanalının da başlıca patojenlerinden biri olduğunu göstermiştir (100, 101, 94, 102). *P. gingivalis*, kök kanalındaki karışık anaerobik floranın bir üyesidir. Özellikle abseli dişlerden ve semptomatik peri-radiküler lezyonlardan izole edilebilmektedir (102, 103).

P. gingivalis, son on yıl içerisinde üzerinde en fazla durulan iki oral patojenden biridir. Beslenme gereksinimi, konaktaki davranış biçimi, çoğu diş ve dişeti enfeksiyonunda yer alması gibi özelliklerinin yanısıra ve birçok yıkıcı virülans faktörüne sahiptir (95). *P. gingivalis*'in virülans faktörleri kapsül, endotoksin (lipopolisakkarit), fimbria (pili), tripsin-enzeri enzim, sistein-benzeri proteinaz (gingipain) ve enzimlerdir (kollajenaz, fibrinolizin, fosfolipaz A, fosfataz, H₂S, NH₃, yağ asidi).

Vitamin K1 ve hemin hem üremelerini hem de virülanslarını artırır (97). Hemin (haemin-ferriprotophyrin IX), siyah pigmentli diğer mikroorganizmalar için olduğu gibi, *P. gingivalis* için de önemli bir faktördür. Hücre morfolojisi besi yerinin hemin konsantrasyonuna sıkıca bağlıdır (97). *P. gingivalis* üremek ve hastalık yapabilmek için en az 0,5 µg/ml konsantrasyonda hemine ihtiyaç duyar. Heminden zengin besi yerinde üretilen *P. gingivalis*'in hastalık yapabilme yeteneği de daha fazladır. Hemin bulunmayan besi yerinde ise ovoid kok görünümündedir, fimbriaları bulunmaz ve ekstrasellüler vezikül formasyonu görülür. Besi yerinde 0,5 µg/ml.'ye kadar hemin bulunduğunda 1,5 µm uzunluğunda dolgun çomaklar şeklinde görünür, fimbriaları

bulunur ve çevresinde vezikül üretmez (97). Oksijene oldukça duyarlıdır. Pek çok *P. gingivalis* türleri anti-anaerobik antibiyotiklere, penisilin+Beta Laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Tetrasiklinlerden doksisisikline daha duyarlıdır. Cerahat veya kan içerisinde ve oda ısısında günlerce canlı kalabilir. *P. gingivalis* oluşturduğu ekstrasellüler veziküller sayesinde fagositozdan korunabilir. Ayrıca konakta glikokaliks yapısında bir kapsül oluşturarak fagositik kabiliyetteki konak hücrelerinden korunabilir (102).

P. gingivalis 30 µg/ml' den düşük konsantrasyonlarda klorheksidin (Kh) içerisinde bile üreyebilir. Hücre gövdesinin ve veziküllerin enzimatik aktiviteleri kullanılan Kh'den hiç etkilenmemektedir. Tam aksine, düşük konsantrasyonda (<30 µg/ml) Kh ile muamele edilen bakteriler, membran geçirgenlikleri bozulduğu için ortama daha fazla vezikül, tripsin benzeri proteazlar, alkalın fosfataz ve N-asetil-B-glukozaminidaz gibi enzimler salarlar. Fakat bu veziküllerinin ve enzimlerinin litik etkileri büyük ölçüde kayıp olur. Bu nedenle, Kh kullanılacaksa 30 µg/ml konsantrasyondan daha yoğun kullanılmalı ve sadece profilaktik amaçlarla uygulanmalıdır (97).

2.9.1. Ranunculaceae familyasının botanik özellikleri

Nadiren odunsu, çoğu otsu tırmanıcı bitkilerdir. Yapraklar çoğunlukla alternat ve stipulasızdır, nadiren oppozit veya stipulalıdır, bazen hepsi tabandadır. Çiçekler hermafrodit, alt durumlu, aktinomorf veya zigomorftur. Periant bir sıralı veya iki sıralı, segmentler genelde serbesttir, iç halkadakilerin çoğu genellikle nektaryumludur. Stamenler genelde çok sayıda, spiral şeklinde düzenlenmiş, merkezcil ve anterler dışa yöneliktir. Ginekeum apokarp, nadiren sinkarp ya da bir karpelli, meyve akenin bir bazı ya da folikül, nadiren bir folikül ya da üzüksüdür (104).

Yeryüzünde 35, Anadolu' da 17 cinsi yetişen, zehirli bitkilerin bulunduğu çok zengin ve önemli bir familyadır. Bitkileri nemli yerleri sever. Bu familyada değişik meyve tiplerine rastlanır: folikül (Helloborus), nuks (Anemone), kapsül (Nigella) ve bakka (Actea). Bitkilerin bir kısmı alkaloit içerir, bazıları heterozit taşır, bazılarında da

uçucu laktonlar vardır. Bitkileri Kuzey Yarıkürenin ılıman ve soğuk yörelerinde yetişen familyanın türkçe adı düğünçiçeğigillerdir (105).

2.9.1.1. *Nigella sativa* L. botanik özellikleri

Nigella sativa'nın sistematikteki yeri

Bölüm: Spermatophyta

Altbölüm: Angiospermae

Sınıf: Dicotyledonae

Altsınıf: Dialypetalae

Takım: Ranales

Familya: Ranunculaceae

Cins: *Nigella*

Tür: *Nigella sativa* L.

Nigella cinsi bitkileri yapraklı, tek yıllık üstteki yapraklar bazen derin, üç parçalı ya da düzdür. Çiçekler, yaprakların involukrumu tarafından taşınır ya da çıplaktır. Periant iki sıralı, sepaller 5'li ve genellikle petale benzeyen, meyve de düşürücü, petaller 5-10'lu, saplı, nektarlı, iki dudaklı laminalı, daha aşağıdaki dudak iki loblu ya da ikiye ayrılmıştır. Foliküller kısmen ya da tamamen bir kapsülü oluşturacak şekilde birleşik; stilus kalıcı, uzun ya da kısadır (104).

Nigella sativa (*N. sativa*) bitkisi az çok tüylü veya kısa yapışkan az yumuşak tüylü, 15 -30 cm. ve dallanmıştır. Yaprak dar parçalı, oblang-lanseolat ve oldukça kısadır. Çiçekler involukrum bulundurmaz, açık mavi renkli ve aktinomorfür. Sepaller beyazımsı, ovat ve kısa tırnaklı, petaller alt dudağı ovat, loblu, kısa saplı ve akuminattır. Karpeller tepede birleşmiş, yumrucuk şeklinde, stilus kadar uzun, sert kapsüllüdür. Meyva, 5 folikülün kısmen birleşmesiyle meydana gelen bir kapsüldür. Tohumlar siyah

renkte ve üç yüzeyli olup 2-3 mm. büyüklüğündedir, parmaklar arasında ovalandığında rezene ve anasonu andıran bir koku verir (104, 105).

Bitki, ismini tohumlarının siyah renginden almıştır. ‘Nigella’ kelimesi Latince siyahımsı anlamına gelen ‘nigellus’ dan türetilmiştir (106). Bazı ülkelerde tıbbi amaçla kullanılan çekirdekler küçük (1-5 mg ağırlığında, 1.5-2 mm uzunlukta) koyu gri veya siyah renklidir, yenilebilir, testalar gevrek yapıda olup hafif acımsı biberimsi lezzetli ve özel kokuludur, koku tohum ezilince kolayca hissedilir (106).

N. sativa (L.), Ranunculaceae familyasına mensup (107) ve çoğunlukla Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerde yetişen otsu bir bitkidir (108). Halk arasında çörekotu adıyla bilinen türü bitkilerin kapsül içerisinde oluşan tohumudur. Yeni bir yemeklik yağ kaynağı olarak düşünülen Nigella tohumu yağının insan sağlığı ve beslenmesinde çok önemli bir yeri vardır. *N. sativa* tohumu ve tohumundan elde edilen preparatlar eskiden olduğu gibi günümüzde de halk hekimliğinde, soğuk algınlığı, baş ağrısı, astım, gaz giderici, idrar söktürücü, sarılık, çeşitli romatizma ve iltihap hastalıkları ve benzeri pek çok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (109). Günümüzde Nigella Güney Avrupa, Rusya, Sudan, Etiyopya, Türkiye, Suriye, İran, Afganistan ve Hindistan’da büyük ölçüde üretilmekte ve tüketilmektedir (110). Bu tohum yağının antioksidan aktivitesi (111), antitümör aktivitesi (112), anti inflamatuar aktivitesi (113), antibakteriyel aktivitesi (114) ve immün sistem üzerine uyarıcı etkisi (115) olduğu rapor edilmiştir.



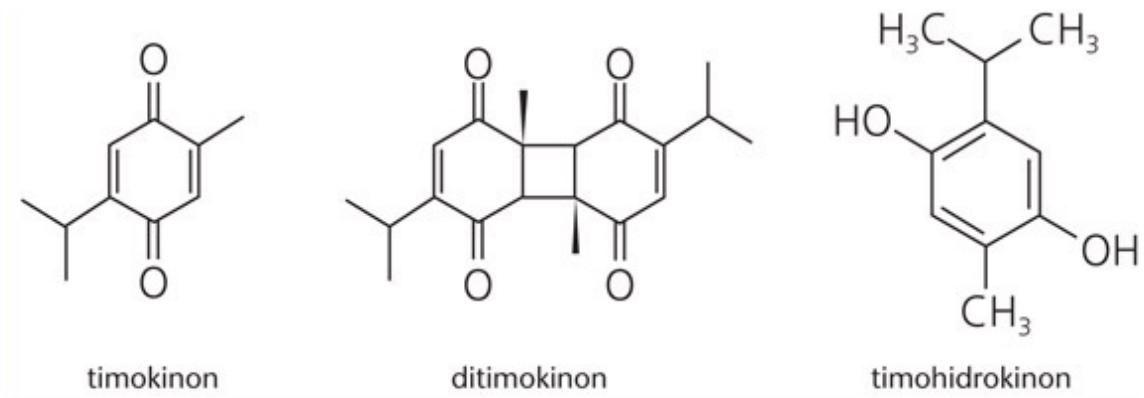
Şekil.2.1. *N. sativa* bitkisi



Şekil.2.2. *N. sativa* tohumları

2.9.1.2. *N. sativa*'nin kimyasal özellikleri

N. sativa tohumlarının kimyasal içerikleri bitkinin yetiştiği coğrafi bölgeye ve iklime bağlı olarak küçük değişiklikler göstermekle birlikte tohumlar ortalama % 36-38 oranında sabit yağ, protein, alkaloid, saponin ve % 0.4 – 2.5 oranında uçucu yağ içerir (116). *N. sativa*'nin uçucu yağı yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizlenmiş ve temel bileşenlerinin timokinon (TQ), ditimokinon (DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timol (THY) olduğu saptanmıştır (112). *N. sativa* tohumları, karbohidratlar, yağlar, vitaminler, mineraller ve 9 esansiyel amino asidin sekizini içeren proteinler gibi besinsel bileşenler de ihtiva etmektedir (117, 118, 119, 120, 121). *N. sativa* tohumun sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE) ile fraksiyonlanması sonucunda molekül kütleleri 94 – 10 kDa aralığında değişen bir dizi protein bandı elde edilmiştir (122). Doymamış ve esansiyel yağ asitleri bakımından zengin tohumlarının, glukoz, ramnoz, ksiloz ve arabinoz formlarında monosakkarit içerdikleri bulunmuştur. Total lipidlerin yağ asidi profili incelendiğinde, linoleik asidinin *Nigella*'da en çok bulunan doymamış yağ asidi olduğu tespit edilmiştir (117, 118, 123, 124, 125). *N. sativa*'da bulunan temel fosfolipid sınıfları fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinisitol olarak sıralanır (117, 118, 126). Tohumlar, karaciğerde A vitaminine dönüştürülen karoten içerirler (118). *N. sativa* tohumları kalsiyum, potasyum ve demir kaynağıdır (107).

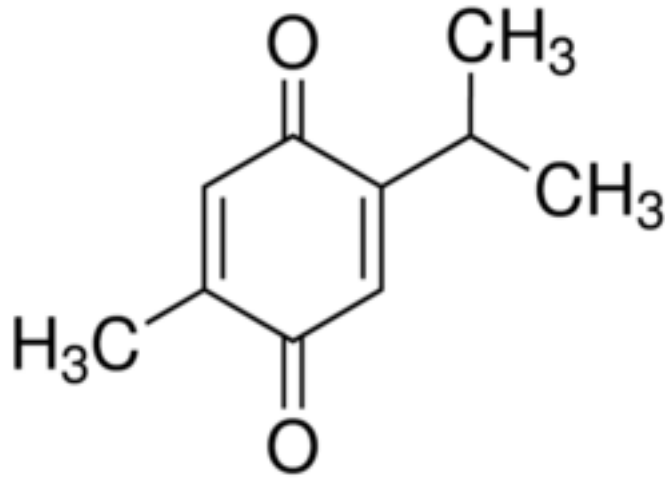


Şekil 2.3. *N. sativa*'nin temel bileşenleri ve kimyasal gösterimleri

2.9.1.2.A. *N. sativa*'nın temel etken maddesi: TQ

N.sativa'nın uçucu yağının temel biyoaktif bileşeni olan TQ (C₁₀H₁₀O₂; 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon (molekül ağırlığı 164.2) 2000 yılı aşkın süredir antioksidan, anti-inflamatuar ve antineoplastik ilaç olarak kullanılmaktadır (127, 128). Yapılan çalışmalarda TQ'un pek çok kanser türünde hücre çoğalmasını durdurucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

TQ'un etkili olduğu kanser türleri; göğüs adenokarsinoması, over adenokarsinoması (129), kolorektal kanser (130), insan pankreatik adenokarsinomu, rahim sarkoması (112), neoplastik keratinosit (130), insan osteosarkoması (131), fibrosarkoma, akciğer sarkoması (132) olarak sıralanabilir. Ayrıca TQ'un, androjen reseptörü ve transkripsiyon faktörü E2F-1'i hedefleyerek hormon-refraktör (cevap vermeyen) prostat kanserini inhibe ettiği rapor edilmiştir (132).



Şekil. 2.4. TQ'nun kimyasal yapısı

2.9.1.3. *N. sativa*'nın farmasötik etkileri

N. sativa'nın anti-diyabetik, anti-oksidan, anti-inflamatuvar, anti-histaminik, anti-mikrobiyal, anti-tümör, hematolojik ve immünomodülatör etkileri çeşitli çalışmalarla aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2.9.1.3.I. Anti-inflamatuvar etkileri

İnflamasyonun akut ve kronik fazlarının devamlılığı ve ilerlemesi bir miktar medyatör tarafından sağlanır. Bunlar eikosanoidler, oksidanlar, sitokin, makrofaj ve nötrofil gibi inflamatör hücreler tarafından salgılanan litik enzimlerdir (133). Başta nitrik oksit (NO) olmak üzere reaktif oksijen türleri, doku harabiyetine sebep olan bol miktarda toksik oksidatif reaksiyonlar başlatır. *N. sativa*'nın anti-enflamatuvar aktiviteleri hücrel NO oluşturma kapasitesinin inhibisyonu yolu ile belirlenmiştir. Pek çok dokuda nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla L-argininden sentezlenen NO pek çok enflamatuvar hastalıkla ilişkilendirilir (133).

Birçok in vitro çalışmada *N. sativa* yağının ve yağın aktif bileşenlerinin, enflamatuvar mediyatörlerin üretilmesindeki inhibe edici etkileri gösterilmiştir. TQ ve *N. sativa*'nın ham yağının, araşidonik asit metabolizmasındaki COX ve 5-LO yolaklarını inhibe ettiği ve TQ'un etkisinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (134).

N. sativa'nın anti-inflamatuvar etkilerinden TQ ve TQ'un non-toksik karbonil polimeri olan nigellon ve THQ'un sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada sabit yağdaki TQ'un potansiyel bir anti-inflamatuvar madde olarak eikosanoit yapımını ve membran lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ham sabit yağ, farelerin peritonal lökositlerinde kalsiyum iyonofor ile stimüle olan araşidonik asit metabolizmasında siklooksijenaz ve 5-lipooksijenaz yolağının potansiyel anti-inflamatuvar maddesi olarak davranmaktadır, fakat bu etkinin yağın içerisindeki TQ'un oluşturduğu etkiden daha yüksek olması beklenmektedir. Bu sonuçlar sabit yağın anti-inflamatuvar aktivitesinin tam olarak TQ'dan dolayı değil buna karşın tohumun yağında zaten hazır olarak varlığı bilinen C20:2 yağ asitinin sayesinde de olabileceğini göstermektedir (135).

TQ ve *N. sativa*'nın ham yağının, arasıdonik asit metabolizmasındaki COX ve 5-LO yolaklarını inhibe ettiği ve TQ'nun etkisinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (113). Her iki maddenin, beyin fosfolipid lipozomlarındaki enzimatik olmayan peroksidasyonu da inhibe ettiği ve yine TQ'nun etkisinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Buna karşın, *N. sativa*'nın sabit yağının eikosanoid oluşumu ve lipit peroksidasyonu üzerindeki inhibisyon etkisi TQ'un etkisinden daha fazladır ve yağın içeriğindeki, doymamış yağ asitleri gibi bileşenlerin, *N. sativa* yağının anti-eikosanoid ve antioksidan etkilerinde rol aldığı düşünülür. Dahası, kalsiyum veya iyonofor-stimüle polimorfonükleer lökositlerin yani nötrofillerin *N. sativa* yağının ham ekstraktı, nigellone veya TQ'den herhangi biri ile in vitro muamelesi, 5-LO ürünlerinin ve 5-hidroksieikosatetraenoik asitin oluşumunu derişime bağımlı olarak inhibe etmektedir (136). Sonuç olarak, *N. sativa* yağının ve aktif bileşenlerinin anti-inflamatuvar etkisi, COX ve 5-LO yolaklarının inhibisyonu yoluyla gerçekleşmektedir.

N. sativa yağının bileşenlerinin deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) ve kolit gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda anti-inflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir. EAE, merkezi sinir sistemini etkileyen otoimmün sinir lifleri üzerindeki miyelin tabakasını yok eden bir hastalıktır. İnsan multiple sklerozunun bir hayvan modelidir. Hastalığın mediyatörü T hücreleridir ve oksidatif stres de hastalığın oluşum ve devamlılığında merkezi rol oynar (137). EAE'li hayvanlar TQ'la muamele edildiğinde, TQ'la muamele edilmeyen EAE'li hayvanlara nazaran, glutasyon düzeylerinin yükseldiği ve hastalık belirtileriyle birlikte perivaküler inflamasyonun ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bu durumda TQ'nun EAE modeli üzerinde terapötik potansiyeli olduğu anlaşılmaktadır. Buna bağılı olarak, insanlardaki multipl skleroz tedavisinde TQ'nun pozitif etkisi olduğu sonucuna varılmaktadır (137).

Ülseratif kolit, akut inflamasyon döngüleri, ülserasyon ve kolonik mukozadaki kanamalarla karakterize edilen bir diğer antiinflamatuvar hastalıktır. Kolitin patogenezi tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, eikosanoid, lökotrien, trombosit aktive edici faktör ve oksijen üreten serbest radikaller gibi pek çok medyatör bu hastalığın patogenezinin sorumludur (138).

Campieri ile Gionchetti ve ark.'nın 1991 yılında yaptıkları çalışmalarda anti-inflamatuvar ajanların, Koch ve ark.'ı ile Choudhary ve ark.'nın sırasıyla 2000 ve 2001 yıllarında yaptıkları çalışmalarda anti-oksidan ajanların hastalığın semptomları üzerinde iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir (139, 140, 141). 2003 yılında Mahgoub, sıçanlarda asetik asit ile indüklenen kolit üzerine TQ'nun etkilerini araştırmıştır. Araştırmacı, hayvanlara, %3'lük asetik asit intrakolonik enjeksiyonu uygulamadan önceki 3 gün boyunca TQ vermiş ve TQ'nun asetik asit ile indüklenen kolite karşı antikolit bir ilaç olan sülfasalazinden daha yüksek etkiyle koruma sağladığını göstermiştir. Bu çalışmaya göre TQ'nun anti-kolit etkisi, anti-oksidan ve anti-histaminik aktiviteleri tarafından sağlanmaktadır (142).

2.9.1.3.II. Anti-mikrobiyal (anti-bakteriyel) ve anti-fungal etkileri

N. sativa yağının ve aktif bileşenlerinin antibakteriyel, antifungal, anti-helminitik ve anti-viral olmak üzere anti-mikrobiyal özellikleri olduğu rapor edilmiştir.

Sıçan sitomegalovirüsü (MCMV) immün yetmezliği olan hayvanlarda tüm vücuda yayılan ve ölümcül bir hastalığa sebep olan bir herpes virüsüdür ve immün yetmezliği olan insanlardaki insan sitomegalovirüsü ile benzerdir (143, 144). *N. sativa* yağının antioksidan etkisi, anti-viral aktivitesine katkıda bulunan başka bir mekanizma sunmaktadır. *N. sativa* yağının MCMV enfeksiyonuna karşı anti-viral etkileri, anti-viral tedavide yeni yollar açmaktadır. Şiştozomiyaz üçüncü dünya ülkelerinde yaygın olarak görülen tropikal parazitik bir hastalıktır. Hastalıktan korunma, hücrel ve hümemoral (vücut sıvılarından ileri gelen) bağışıklık aracılığıyla mümkün olmaktadır. Aşı denemeleri yapılmasına rağmen, kemoterapi halen insan konakçı için tek seçenektir (145). Aboul-Ela tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada *Schistosoma mansoni* (*S. masoni*) bulaşmış farelerin *N. sativa* yağıyla muamelesinin karaciğerdeki *S. masoni* kurtlarının sayısı azalttığı, karaciğer ve bağırsaktaki yumurta miktarını düşürdüğü görülmüştür (146). *N. sativa* yağı, Şiştozomiyaz tedavisinde tercih edilen Praziquantel isimli ilacın etkisini arttırdığı gösterilmiştir (123). *S. masoni* bulaşmış farelere *N. sativa* yağı verilmesi, serum albumin düzeyi ile alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz

(ALP) ve gamma glutamil transferaz (GGT) aktiviteleri gibi enfeksiyona bağılı biyokimyasal ve patolojik değişiklikleri gidermiştir (123, 147).

Sıçan Şiştozomiyaz'ında çeşitli sitokinler, granüloamatöz inflamatuvar cevabın medyatörü olarak rol almaktadır. Buna bağılı olarak, sitokin düzeylerinin modülasyonu inflamatuvar cevabın keskinliğini düzenler. Anti-Schistosome etkilerine benzer olarak, *N. sativa* tohumlarının uçucu yağı 1:100 seyreltmeyle bile tenya, toprak solucanı, nematod (iplik kurdu) ve bağırsak kurduna karşı anti-helminitik etki göstermektedir (148, 149).

Anti-viral ve anti-helminitik etkilerine ek olarak *N. sativa*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Streptococcus faecalis* (*S. faecalis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) gibi pek çok bakteriye karşı anti-bakteriyel ve bunların yanı sıra patojenik maya *Candida albicans* (*C. albicans*) ve fungusu karşı anti-fungal etki göstermektedir (150, 151, 152, 114). *N. sativa*'nın bileşenlerinden DTQ gram-pozitif bakterilere karşı anti-bakteriyel etki gösterdiği El-Fataty'nin 1975 tarihli çalışmasında gösterilmiştir (152). Dietil eter ekstraktının, gram-pozitif bakteri olan *S. aureus* ve gram-negatif bakteriler olan *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı konsantrasyona bağımlı inhibisyonu olduğu, ayrıca eter ekstraktının pekçok antibiyotiğin etkisini arttırdığı gösterilmiştir (150). Ekstraktın *Vibrio Cholera* (*V. Cholera*), *E. Coli* ve *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*) suşlarını da içeren ilaca dirençli bakterilere karşı daha etkin olduğu kanıtlanmıştır (114). In vivo olarak *N. sativa* tohumu dietil eter ekstraktı farelerde öldürücü olmayan derialtı stafilokok enfeksiyonunda, enfeksiyon bölgesine enjekte edildiğinde enfeksiyonu tamamen tedavi etmektedir (150). Buna göre, *N. sativa* tohumunun bileşenleri in vivo ortamda farklı konakçı faktörler aracılığıyla bakterisidal aktivite göstermektedir (150).

Bourgou ve ark.'ı Tunus'tan toplanan *N. sativa* tohumlarının yağı ve bileşenlerinin *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde antibakteriyel özelliklerini araştırmışlardır. Kloramfenikolün pozitif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada *N. sativa* yağının anti-bakteriyel özelliğinin esas olarak TQ içeriğinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (153).

N. sativa'nın anti-mikrobiyal aktivitesini çalışmalarda gr (-) lerden *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*); gr (+) lerden *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis* anti-bakteriyel aktivite testi için kullanılmıştır. Anti-fungal aktivite için *C. albicans*, *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) ve *Candida krusei* (*C. krusei*); anti-mikobakteriyel aktivite için de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) ve *Mycobacterium avium* (*M. avium*) ile çalışılmıştır. Bu mikroorganizmalardan inokulum preparatları hazırlanarak *N. sativa* yağının anti-mikrobiyal aktivitesine gr (+) ve gr (-) bakterilerde mikrodilüsyon yöntemi ile bakılmıştır. In vitro anti-fungal aktivitesine de bu türlerde ketokanazol ve flukonazol kontrol ajanlarına karşı bakılmıştır. Bu çalışmanın sonunda Mısır ve Türkiye'den alınan dört farklı çörek otu numunelerinde de antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. En iyi antimikrobiyal aktivite Mısır çörek otunda gözlenmiştir (154).

2.9.1.3.III. Analjezik etkileri

N. sativa'nın bileşiminde bulunan maddelerden TQ, doza bağlı olarak tromboksan B2 ve leukotriene B4, siklooksijenaz ve araşidonik asit düzeyini azaltarak ağrı kesici ve anti-romatizmal etki göstermektedir (109).

Karragenanın etkisiyle pençelerinde ve hint yağı etkisiyle de kulaklarında ödem oluşturulmuş sıçanlarda anti-inflamatuvar etki değerlendirildiği çalışmada *N. sativa*'nın önemli ölçüde analjezik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Opioit bir analjezik olan naloksan, *N. sativa*'nın formalin testinde gösterdiği analjezik etkiyi geri alamadığından, yeterli bir antagonizma gösteremediğinden *N. sativa* yağının analjezik etkisinin opioit reseptörler dışındaki mekanizmaların etkili olduğunu göstermektedir (135)

Başka bir çalışmada karragenan sodyum tuzu ile enflamasyon oluşturulan sıçanlarda üç ayrı kontrol grubu, aspirin ve *N. sativa* ile tedavi edilen gruplar karşılaştırılmıştır. *N. sativa*'nın analjezik etkisi aspirinle karşılaştırılabilirken, anti-piretik etkisi karşılaştırılamamıştır. Bazı inflamatuvar mediyatörleri TQ ve *N. sativa*'nın diğer komponentleri IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ PGE gibi bazı proinflamatuvar mediyatörleri inhibe ederek anti-inflamatuvar etki gösterir (155). *N. sativa*'nın

bileşimindeki nigellon mast hücrelerinden histamin salımını inhibe ettiği ve *N. sativa* çekirdeğinin sabit yağının ve saf TQ'un sıçanların peritoneal lökositlerinde araşidonat metabolizmasında siklooksijenaz ve 5-lipooksijenaz yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etki tromboksan B2 ve lökotrien B4' ün doza bağımlı inhibisyonu ile olduğu ileri sürülmüştür. Bu da *N. sativa*'nın romatizma ve inflamatuvar hastalıklarda kullanılabileceğini düşündürmektedir. (109).

2.9.1.3.IV. Anti-oksidan etkileri

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres ateroskleroz, diabetes mellitus, hipertansiyon, kanser, Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu (AIDS) gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynar. *Nigella* çekirdeklerinin inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmasından beri *N. sativa* yağın radikal temizleyici etkisinin olabirliği üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Temel yağın iki ana bileşeni olan sabit yağın ve TQ'un lipozomlardaki lipit peroksidasyonunu önleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (111, 156).

Burits ve Bucar Avusturya çörek otundan soxhlet ekstraksiyonu ile elde ettikleri yağın antioksidan aktivitesi olduğunu göstermiştir (111).

İyonize radyasyona maruz bırakılan sıçanlarda nitrikoksitsentaz enzim aktivitesi ve NO, peroksinitrit düzeyleri gibi nitrozatif stres parametrelerinin daha yüksek bulunması, *N. sativa* yağı ve TQ verildiğinde ise bu oranların anlamlı düzeyde düşük tespit edilmesi beyin dokusunda, oksidasyon durumunda *N. sativa* yağı ve TQ maddelerinin antioksidan etki gösterdiğini desteklemektedir (156).

Sıçanlarda yapılan çalışmada koroner, serebral ve periferel damar hastalıklarında risk oluşturan hiperhomosisteinemiye karşı TQ'un koruma sağladığı aynı zamanda TQ'un *N. sativa* tohumundaki diğer bileşenlerden daha yüksek anti-oksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir (157).

2.9.1.3.V. Anti-diyabetik etkileri

N. sativa yağının halk arasında da kullanımının görüldüğü hipoglisemik etkisini ispatlayan birçok çalışma bulunmaktadır.

Diabetes Mellitus'un patogenezi ve oral hipoglisemik ajanlarla kontrol altında tutulması kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (158). *N. sativa*'nın hipoglisemik etkileri de deneysel olarak indüklenmiş diyabetik hayvanlar üzerinde araştırılmıştır (159, 160, 161). *N. sativa*'nın temel etken maddesi TQ'un antidiyabetik etkisinin kısmen hepatik glukoneogenez aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (162).

Nikotinamid ve streptozosin ile diabetes mellitus oluşturulmuş sıçanlarda *N. sativa*'nın olası insülinotropik etkisi incelenmiştir. İntraperitoneal nikotinamid ve intravenöz streptozosin enjekte edilen ratlara oral *N. sativa* yağı verilmiş ve serum insülin seviyeleri ölçülmüştür. Streptozosin ve nikotinamid verilerek İnsülin Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM) oluşturulan sıçanlarda *N. sativa* ile tedavinin 1, 2, 3, 4. hafta sonlarında açlık plazma glukoz seviyelerinde anlamlı düşüşler gözlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar *N. sativa* yağının hipoglisemik etkisini göstermiştir. *N. sativa* yağının NIDDM benzeri modelde insülinotropik etki oluşturduğu bildirilmektedir (161).

N. sativa'nın hipoglisemik etki mekanizmasını açıklamayı hedefleyen bir çalışmada streptozosin ile diabet indüklenen ratlara diabet indüklendikten sonra gastrik gavaje ile 400 mg/kg vücut ağırlığı *N. sativa* yağı verilmiştir. *N. sativa* yağı tedavisi ile kan glukoz seviyelerinde 1, 2, 3, 4. hafta sonlarında anlamlı düşüşler kaydedilmiştir. Çalışmada elde edilen veriler *N. sativa* yağının hipoglisemik etkisinin az miktarda da olsa hepatik glukoneogenezin azalması ve makrofaj fagositik aktivitesini uyarıp veya doğrudan lenfositleri aktive etmek suretiyle olduğu bildirilmektedir. Sonuçlar *N. sativa* yağı ile tedavinin glikolize hemoglobini de azalttığını gösterilmiştir. Total glikolize hemoglobinin bu düşüşü uzun dönem kan glukoz seviyesinin normal tutulabildiğini göstermektedir (163).

2.9.1.3.VI. Anti-histaminik etkileri

Histidin esansiyel bir aminoasittir ve dekarboksilaz ile piridoksal fosfat aracılığıyla histamine dönüşür. Bazofiller, mast hücreleri, mide mukozası, bağırsak ve bazı beyin kısımlarında sentezlenen histamin veziküllerde depo edilmekte ve oksijen, sıcaklık gibi faktörlerin etkisiyle serbestleşmektedir. Histaminin aşırı salgılanması vücutta allerjik reaksiyonlara sebep olur. Dahası küçük venlerde daralma yaparak kapillerlerin genişlemesine yol açan histaminin ödem ve damar yatağı hacminde artışa ve buna bağlı olarak kan basıncının düşmesi ile allerjik şoka sebep olduğu bilinmektedir. Bunların yanısıra histamin, beyinde nörotransmitter olarak görev yapmaktadır (164).

Histamin, bronşial astım gibi durumlarla ilişkili allerjik reaksiyonlar oluşturmak üzere vücut dokularından salgılanır. *N. sativa* tohumlarının içerdikleri etken maddelerin, tohumların geleneksel kullanımıyla, histaminin tetiklediği inflamatuvar hastalıklar üzerinde önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Bronşial astımdan muzdarip hastalara ağızdan *N. sativa* tohumu verildiğinde, hastaların büyük bir kısmında semptomları hafiflettiği gözlenmiştir. Bu anti-histaminik etkinin *N. sativa* tohumlarının uçucu yağından izole edilen DTQ tarafından sağlandığı gösterilmiştir ve izole DTQ'a Nigellone denilmiştir (165).

N. sativa tohumunun bileşenlerinin anti-allerjik özellikleri anti-histaminik etkileriyle ilişkilendirilebilir. İn vitro çalışmalar da bu görüşü destekler niteliktedir. TQ'nun anti-histaminik etkilerinin, kısmen araşidonik asit metabolizmasının lipoksigenaz ürünlerinin inhibisyonu ile birlikte histamin ve serotonin reseptörlerinin seçilimsiz olarak bloke edilmesi sonucu ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (166).

Prelinik ve klinik çalışmalar ile de *N. sativa* tohumlarının anti-histaminik etkileri gösterilmiştir. Bunun için, mukozadaki histamin içeriğini belirgin bir şekilde arttıran ve oral yolla etanol alınmasıyla indüklenen gastrik ülser modeli kullanılmıştır. Ülser indüksiyonundan önce *N. sativa* yağı verilen sıçanların ve verilmeden ülser indüklenen sıçanların gastrik mukozadaki histamin miktarları ölçülmüş ve önceden *N. sativa* yağı ile muamele edilen sıçanların gastrik mukozadaki histamin içerikleri daha düşük bulunmuştur. *N. sativa* yağıyla muamelenin, gastrik mukozadan histamin

salınmasına karşı % 53.56 oranında koruyucu etki gösterdiği gösterilmiştir (167). El Dakhakhny ve ark.'ı tarafından yapılan çalışmada gösterilen histamin salgısını azaltıcı etkisi yanında, başka bir çalışmada TQ'nun histamine karşı tetikleyici etki gösterdiği gösterilmiştir (167, 168). İki durum göz önünde bulundurulduğunda *N. sativa* yağının içeriğinde bulunan farklı etken maddelerin histamin salınımı üzerine farklı etkileri olduğu sonucuna varılır. *N. sativa* ham ekstraktının Nigellone aktif bileşeni DTQ kalsiyum kanalı blokeri olarak etki gösterir ve bu etkiye bağlı olarak, *N. sativa* diyare, astım ve hipertansiyona karşı geleneksel terapötik olarak kullanılmaktadır.

2.9.1.3.VII. İmmün sistem üzerine etkileri

Doğal bağışıklık makrofajlar, doğal katil hücreler, granülositler gibi hücreleri kapsarken, kazanılmış bağışıklık ise spesifik antikor salgılayan B hücreleri aracılı bağışıklığı ve CD4+ ve CD8+ T hücreleri aracılı hücresel bağışıklığı kapsamaktadır. *N. sativa* yağının ve TQ'nun T hücrelerine ve immün yanıtı aracılık eden öldürücü hücrelerin artışı sağladığı ve önemli immünomodülatör etki gösterdiği ifade edilmektedir(156). TQ, lipopolisakkarit (LPS) tarafından uyarılan makrofajların supernatantlarında nitrit üretimini azaltmış, periton makrofajlarındaki indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) protein düzeyini de konsantrasyona bağlı olarak düşürmüştür (157).

Gönüllü insanlar üzerinde *N. sativa*'nın immün sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *N. sativa* çekirdeklerinin T helper ve T süpresör hücreleri % 55 oranında artırdığı, Naturel killer hücre aktivitesini de ortalama % 30 artırdığı gösterilmiştir (169).

2.9.1.4. *N. sativa*'nın potansiyel toksisitesi

Literatürde *N. sativa* tohumları ve bileşenlerinin olası toksik etkileri üzerine yapılmış pek fazla çalışmaya rastlanmamaktadır. 1991'de Tennekoon ve arkadaşları *N. sativa* tohumlarının sulu ekstraktını 14 gün boyunca erkek Sprague Dawley sıçanlarına oral yolla uygulamış ve anahtar hepatik enzimlerin düzeylerindeki değişimi ve

histopatolojik değişimleri ölçererek tohumların olası toksik etkilerini araştırmışlardır (170). Gamma glutamil transferaz (GGT) peptidlerden ve diğer bileşiklerden γ -glutamil grubunu transfer eden bir enzimdir. GGT, kas hücreleri hariç tüm hücrelerde ve serumda bulunmaktadır ve serumdaki temel kaynağı hepatobilier sistemdir. GGT, alkol ve ilaçların karaciğer üzerindeki toksik etkilerinin ortaya konmasında oldukça önemlidir. Alanin aminotransferaz (ALT-SGPT), ketoasitlerle aminoasitlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen transaminazlardan biridir. Söz konusu reaksiyonda alanin amino asitinin amino grubu α -ketoglutarat keto asidine transfer edilir. Böylelikle amino asit olan alanin keto asit olan pirüvata, keto asit olan α -ketoglutarat ise amino asit olan glutamata dönüşür. Normalde serumda ALT konsantrasyonu oldukça düşüktür. Karaciğer üzerindeki toksik etkiler ALT'nin serumdaki konsantrasyonunu artırır (171). Tennekoon ve arkadaşları (1991) gözle görülür patolojik değişiklik olmaksızın *N. sativa* ekstraktıyla muamele sonrası sıçanların serum GGT ve ALT konsantrasyonlarında belirgin artış olduğunu tespit etmişlerdir (170).

Teste tabi tutulan bir popülasyondaki bireylerin yarısını belirli bir sürede öldüren toksik madde dozuna LD50 (Lethal Dose %50) denir. Zaoui ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada *N. sativa*'nın olası toksik etkilerini, deneysel fare grubunun LD50 değerlerini saptayarak ve biyokimyasal, hematolojik ve histopatolojik değişimlerini inceleyerek tespit etmeye çalışmışlardır (172). Farelerin akut toksisite için LD50 değerleri tek dozda ve oral yolla alımda 28.8 mL/kg vücut ağırlığı, yine tek dozda ve intraperitoneal uygulamada 2.06 mL/kg vücut ağırlığı olarak saptanmıştır. Kronik toksisite için sıçanlar 12 hafta boyunca günlük olarak oral yolla *N. sativa* ekstraktına tabi tutulmuş ve LD50 değerlerinin 2mL/kg vücut ağırlığı olduğu bulunmuştur. *N. sativa* yağı ile 12 haftalık muamele sonunda anahtar hepatik enzimlerin düzeylerinde değişim ve herhangi histopatolojik modifikasyon gözlenmemiştir. Buna karşın serum kolesterol, trigliserid ve glukoz düzeyleri ile lökosit ve trombosit sayısının kontrol gruplarıyla kıyaslandığında belirgin bir düşüş, hematokrit ve hemoglobin düzeylerinde ise belirgin bir artış olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında *N. sativa* ile muamele edilen farelerin kilo alımının da yavaşladığı gözlenmiştir (172).

N. sativa'nın toksik olmayan etkileriyle uyumlu olarak, Salim & Fukushima Fischer 344 sıçanlarını 14 hafta boyunca *N. sativa* ham yağı ile muamele etmiş ve karaciğer, böbrek, dalak ve diğer herhangi bir organda, kan veya idrar biyokimyasal parametrelerinde ve kilo alımda herhangi bir patolojik değişiklik tespit etmemişlerdir. (173). Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda yüksek LD50 değerleri, hepatik enzimlerin stabilitesi, organ bütünlüğü *N. sativa*'nın toksik olmadığına işaret etmektedir ve *N. sativa*'nın sabit yağının terapötik dozları geniş bir marjinde güvenilirdir. Bununla beraber *N. sativa* yağının hemoglobin metabolizmasını değiştirdiği ve lökosit ile trombosit sayısını düşürdüğü göz ardı edilmemelidir. Ayrıca, LD50'nin intraperitoneal uygulamada oral uygulamaya oranla yaklaşık 20 kat küçük olduğu hatırlanırsa *N. sativa*'nın uygulama yolu toksisitesini etkilediği görülür ve bu durum oral alımının sistemik alıma göre daha güvenilir olduğuna işaret eder.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden (YÜDETAM) temin edilen, 42 adet 10-12 haftalık, ortalama 250 ± 20 gram ağırlığındaki, sağlıklı, Sprague-Dawley cinsi erişkin erkek sıçanlar üzerinde yürütüldü. Çalışmanın içeriği, Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 01.04.2014 tarih ve 395 sayılı kararı ile onaylandı (EK 1). Deney hayvanlarının ameliyatlarını ve sakrifikasyonlarını içeren deneysel kısım YÜDETAM, kemik dokularının mikrobiyolojik incelemeleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde, histolojik ve histomorfometrik incelemeleri ise İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Hayvan çalışmalarında örneklem sayısı ve güç (power) analizi önemli rol oynamaktadır. Örneklem sayısı, çalışmanın başlangıcında çalışmanın gücüne göre belirlenmelidir. Gereğinden az sayıda örneklem incelemek çalışma sonuçlarının gücünü azaltırken; gereğinden fazla sayıda örneklem incelemek boş yere emek ve kaynak israfına sebebiyet vermektedir. Hayvan deneylerinde ise güç değerini çok yüksek ya da çok düşük tutarak çalışma planlamak gereksiz yere hayvan kullanımına neden olmaktadır. Bu nedenle güç değerini optimum (%80) tutarak örneklem sayısı belirlemek, etik açıdan oluşabilecek sakıncaları ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle biz de çalışmamızda araştırmaya başlamadan önce kullanılacak hayvan sayısına karar verilirken uygulanan istatistiksel yöntem ve daha önce yapılmış benzer çalışmalar belirleyici olmuş ve gerekli minimum örneklem sayısı güç değeri optimum tutularak belirlendi (174).

Deney hayvanları, çalışma boyunca laboratuvar hayvanları bakım prensibine uygun olarak 22 ± 2 °C kontrollü oda sıcaklığında, % 50+10 nem oranında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamı sağlayacak şekilde, gıda ve suya serbest ulaşabilecekleri şekilde hazırlanmış odada kafeslerde barındırıldı.

Hayvanların post-operatif bakımları ve yaşam kaliteleri düşünülerek her bir sıçanda tek tibiada, tek kemik defekti açılarak işlemler gerçekleştirildi. Bu amaçla sıçanların sol tibiaları çalışmaya dahil edildi. Ayrıca kullanılan biyomateryaller arası etkileşimin önlenmesi amaçlandı.

Çalışmaya dahil edilen 42 adet Spraque- Dawley cinsi deney hayvanları rastgele 6 gruba ayrıldı ve her grupta 7 adet sıçan olacak şekilde gruplar oluşturuldu.

- Grup 1: Kontrol; Kritik boyutlu defekt bölgesi kendi kendine iyileşmeye bırakıldı.

- Grup 2: PG; Kritik boyutlu defekt bölgesi, *P. gingivalis* ile kontamine edilerek hiçbir tedavi uygulamadan kendi kendine iyileşmeye bırakıldı.

- Grup 3: L-KOL; Kritik boyutlu defekt bölgesine lokal kollajen uygulandı.

- Grup 4: PG+L-KOL; Kritik boyutlu defekt bölgesi *P. gingivalis* ile kontamine edilip, lokal kollajen uygulandı.

- Grup 5: L-KOL+NS; Kritik boyutlu defekt bölgesine lokal olarak *N. sativa* içeren kollajen membran uygulandı.

- Grup 6: PG+L-KOL+NS; Kritik boyutlu defekt bölgesi *P. gingivalis* ile kontamine edilip lokal olarak *N. sativa* içeren kollajen membran uygulandı. Grupların dağılımı Tablo 3.1’de görülmektedir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Çalışma grupları

Gruplar	P.Gingivalis uygulaması	Materyal	Sakrifiye zamanı
KONTROL	-	-	28. gün
PG	+	-	28. gün
L-KOL	-	Lokal kollajen membran	28. gün
PG+L-KOL	+	Lokal kollajen membran	28. gün
L-KOL+NS	-	<i>Nigella sativa</i> içeren kollajen membran	28. gün
PG+L-KOL+NS	+	<i>Nigella sativa</i> içeren kollajen membran	28. gün

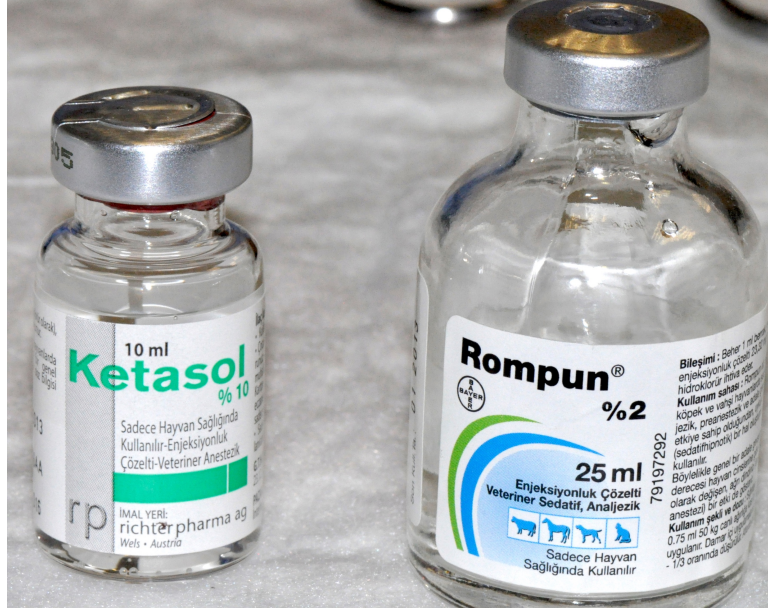
Her gruptan 1 adet sıçan Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümüne verilecek şekilde ayrı kafeslerde muhafaza edildi.

Çalışmada kullanılacak kollajen membran, Albu ve ark.'nın daha önce tanımladığı şekilde dana derisinden elde edilen % 2.6'lık tip 1 fibriller kollajen jel (Coll) kullanılarak Deri Araştırmaları Enstitüsü, Kollajen Departmanı, Bükreş, Romanya'da hazırlandı (175).

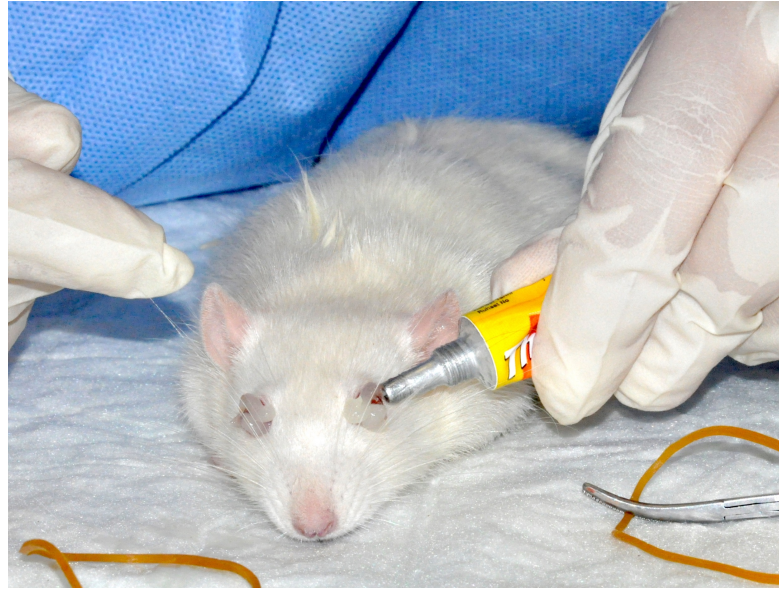
N. sativa içeren kollajen membranın hazırlanmasında Antakya aktarlarından satın alınan *N. sativa* tohumlarından elde edilen yağ kullanıldı. *N. sativa* yağı elde etmek için soğuk sıkma makinası (tek kafa vidalı expeller) (Koçmaksan Sanayi Makineleri, İzmir Türkiye) kullanıldı. Elde edilen yağların bünyesinde bulunan tortuları gidermek amacıyla 5 dakika süre ile 5000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen saf yağlar amber cam şişelere hava almayacak şekilde doldurulup kapatıldı ve analiz edilinceye kadar buzdolabında (+ 4 °C) muhafaza edildi.

Albu ve ark.'nın daha önce tanımladığı şekilde hazırlanan kollajen membranlara % 0.2'lik *N. sativa* yağı eklenerek *N. sativa* içeren kollajen membranlar Deri Araştırmaları Enstitüsü, Kollajen Departmanı, Bükreş, Romanya'da hazırlandı (175).

Veteriner hekim gözetiminde; 80-100 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketasol R, Richterpharma, Avusturya) ve hem analjezik hem de anestezi olarak %2'lik 10 mg/kg Ksilazin hidroklorid (Rompun R, Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti, İstanbul, Türkiye) intramüsküler (IM) enjeksiyonu ile deneklerin genel anestezi sağlandı (Resim 3.1). Genel anestezi sırasında oftalmik komplikasyonların engellenmesi amacı ile sıçanların gözlerine basitrasin ve neomisin sülfat pomadı (Thiocillin R 5g, Abdi İbrahim, Türkiye) sürüldü (Resim 3.2). Sıçanlar ısıtıcı lamba altında masaya yatırıldı.



Resim 3.1 Deneklerin genel anestezisinde kullanılan ilaçlar



Resim 3.2 Sıçanların gözlerine oftalmik komplikasyonların önlenmesi amacıyla pomadın sürülmesi

Genel anestezi altındaki denekler, standart postüre getirilip sabitlendikten sonra sol bacaklarının medial yüzeyi traş makinesi ile traşlandı (Resim 3.3). Jetokain (Adeka 2ml; Türkiye) ile IM lokal anestezisi uygulandı (Resim 3.4). Sol bacakları fleksiyon pozisyona getirilip, asepsi ve antisepsi kurallarına uygun olacak şekilde insizyon hattı belirlenip tibianın medial yüzeyine ulaşmak için kretin orta hattına Bard-Parker 15 no'lu bistüri ucu kullanılarak 15 mm uzunluğunda uzunlamasına cilt, cilt altı ve periost kesisi yapıldı (Resim 3.5, Resim 3.6). İnsizyon sonrasında flep, periost elevatörü ile subperiostal olarak kaldırıldı ve kemik açığa çıkartıldı (Resim 3.7).



Resim 3.3 Sıçanların bacağına işlem öncesi traşlanması



Resim 3.4 İşlem öncesi sıçanların bacağına lokal anestezi yapılması



Resim 3.5 İnsizyon hattının belirlenmesi



Resim 3.6 15 nolu bisturi ucuyla insizyonun yapılması



Resim 3.7 Kemiğin açığa çıkartılması

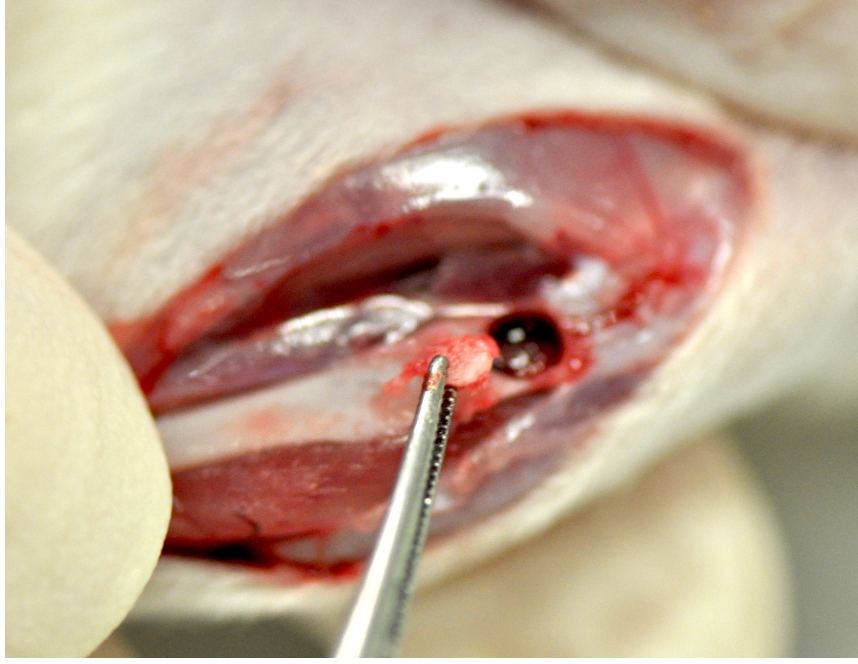
Kütan ve ark.'larının sıçan tibialarında yaptıkları 3x3 mm'lik kritik boyutlu kemik defekti modeli örnek alınarak defektler hazırlandı (176). Kemiğin kolaylıkla görülebildiği rahat bir çalışma ortamının sağlanması sonrası fizyodispanlere bağlı mikromotor - anguldruva ve ucundaki 3 mm çapındaki trefan frez ile 200-400 devir/dakikada steril serum fizyolojik irrigasyonu altında kemik defekti oluşturuldu (Resim 3.8). 3x3 mm olarak açılan defektler periodontal sonda yardımı ile kontrol edildi (Resim 3.9). Bu işlemler esnasında defekt alanı içerisindeki kemik, doku penseti yardımıyla blok halinde çıkarıldı (Resim 3.10).



Resim 3.8 Anguldruva ve ucundaki 3 mm çapındaki trefan frez ile kritik boyutlu defekt oluşturulması



Resim 3.9 Defekt alanının sınırlarının belirlenmesi



Resim 3.10 Kemiğin doku pensetiyle blok şeklinde çıkartılması



Resim 3.11 Kritik boyutlu defekt görünümü



Resim 3.12 Kontrol grubundaki sıçanlarda 3x3 mm'lik açılan defektin görünümü



Resim 3.13 PG grubundaki kritik defektin *P. gingivalis* ile kontaminasyonu



Resim 3.14 L-KOL grubundaki sıçanların defekt bölgesine lokal kollajen membranın uygulanımı



Resim 3.15 PG+L-KOL grubundaki sıçanların defekt bölgesine, *P. gingivalis* ile kontaminasyonu ve lokal kollajen membranın uygulanımı



Resim 3.16 L-KOL+NS grubundaki sıçanların defekt bölgesine, *N. sativa* içeren kollajen membranın uygulanımı



Resim 3.17 PG+L-KOL+NS grubundaki sıçanların defekt bölgesinin *P. gingivalis* ile kontaminasyonu ve *N. sativa* içeren kollajen membrana uygulanımı

Her bir gruptaki işlem tamamlandıktan sonra defekt çevresindeki periost ve kas 4-0 yarım yuvarlak 20 mm vikril dikiş ipliği (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Türkiye) ile, ve cilt ise 3-0 yarım yuvarlak 20 mm ipek dikiş ipliği (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Türkiye) ile primer olarak suture edildi (Resim 3.18, 3.19, 3.20).



Resim 3.18 Periost ve kasın 4-0 yarım yuvarlak 20 mm vikril dikiş ipliği (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Türkiye) ile suture edilmesi



Resim 3.19 Periost ve kasın sütüre edilmesi

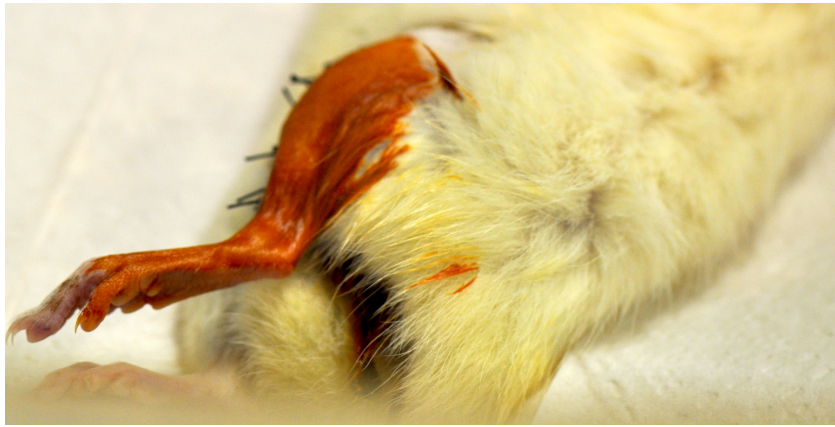


Resim 3.20 Cildin 3-0 yarım yuvarlak 20 mm ipek dikiş ipliği (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Türkiye) ile primer olarak sütüre edilmesi

Operasyonu takiben ilk 2 gün deney sıçanların beslenmesine yardımcı olabilmek amacı ile 5 ml subkütan %5 dekstrozu enjeksiyonu yapıldı (Resim 3.21). Sıçanların lokal saha temizliği Batikon (providon iyot solüsyonu) (Bonmed Sağlık Ürünleri ve Makina San. Tic. Ltd. Şti., Türkiye) ile yapıldı (3.22). Yara bölgesi enfeksiyonunu önlemek için işleminden sonra ilk hafta her gün işlem bölgesine Bepanthol R krem (Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti. Türkiye) sürüldü. 28 günlük deney boyunca hayvanların genel sağlık durumları her gün kontrol edildi.



Resim 3.21 Sıçanlara subkütan %5 dekstrozu enjeksiyonu uygulaması



Resim 3.22 Sıçanların bacaklarına Batikon uygulaması (Bonmed Sağlık Ürünleri ve Makina San. Tic. Ltd. Şti., Türkiye)

Tüm denekler 28. günün sonunda, veteriner hekim yardımıyla birlikte cam kavanozda 30 ml izofluran (Isoflurane-USP, Adeka İlaç ve Kimyasal Ürünler San. Ve Tic. A. Ş., Türkiye) ile sakrifiye edildi (Resim 3.23, 3.24, 3.25).



Resim 3.23 Tibianın kas bağlantılarından ayırma işlemi



Resim 3.24 Diseke edilen tibia'nın görünümü



Resim 3.25 *P. gingivalis* ile kontamine edilen tibiannın görünümü

Sakrifikasyon işlemleri sonrasında deney hayvanlarının tibiaları, içerisinde %10'luk nötral formaldehit (PH=7.4) bulunan önceden etiketlenerek belirlenmiş biyopsi kaplarına sırasıyla yerleştirildi.

Her gruptan 1'er adet sıçanın tibiası (n=6) mikrobiyolojik inceleme için Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde değerlendirmeye alındı.

Diğer doku örnekleri (n=36) histopatolojik ve histomorfometrik incelemeler için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda takibe alındı.

Mikrobiyolojik Değerlendirme

Disk Difüzyon Analizi

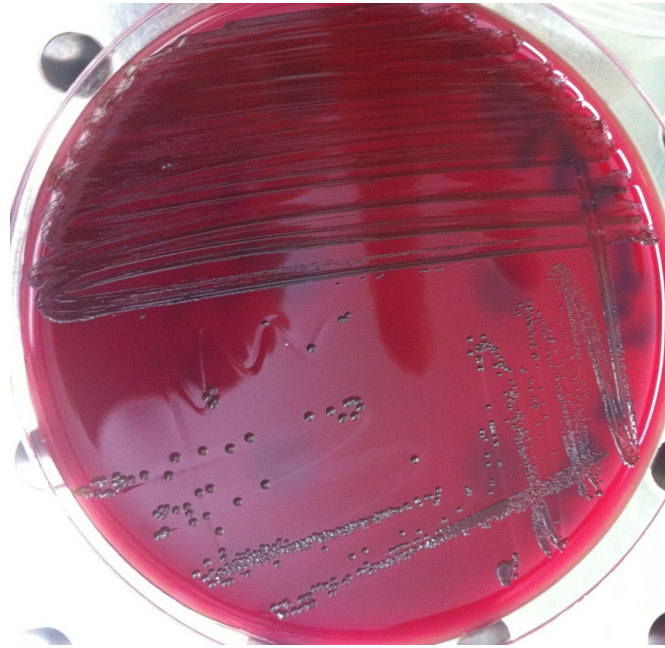
Örneklerin antimikrobiyal özelliği disk difüzyon analizi ile test edildi. Antimikrobiyal analiz klinik laboratuvar standartları enstitüsünün (CLSI, 2000) protokolüne uygun olarak yapıldı. *P. gingivalis* ATCC 3744 -80°C stok kültürü %5 koyun kanlı beyin, kalp, infüzyon (brain heart infusion, BHI) (Salubris, Massachusetts, Amerika) katı besiyeri üzerinde anaerobik koşullarda 72 saat 37 °C'de büyütüldü. İnkübasyonun ardından 10⁹ bakteri/ml (optik yoğunluk ≈ 0.8, 660 nm) olacak şekilde sıvı besiyerinde bakteri sayısı ayarlandı. Ardından 100 µL bakteri kültüründen alınıp %5 koyun kanlı BHI katı besiyeri üzerine ekildi (177, 178).

Test edilecek örnekler *N. sativa* içeren kollajen membran ve kollajen membran 15 µL alınarak 6 mm çapındaki boş steril kağıt plaklar üzerine emdirildi ve daha sonra bakteri ekilmiş katı besiyerinin orta kısmına konuldu. Katı besiyerleri 37 °C'de 72 saat boyunca anaerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından plakların etrafındaki bakteri üremesi görülmeyen kısmın çapı ölçüldü. Her bir örnek için iki kez tekrarlandı ve her tekrarda üç farklı besiyerinde deney tekrarlandı. Sonuçlar bu tekrarların ortalaması ve standart sapması baz alınarak hesaplandı.

Bu çalışmada *P. gingivalis* ATCC 3744 bakteri suşu kullanıldı. Bakteri aseptik koşullarda %5 koyun kanı içeren beyin, kalp, infüzyon katı besiyerine ekilip 72 saat boyunca anaerobik koşullar altında (%10 H₂, %10 CO₂ ve %80 N₂) anaerobik kabinde (Don Whitley, İngiltere) 37 °C'de inkübe edildi (Resim 3.26). İzotonik tuzlu suda canlı bakteri 10⁹ hücre/ml (660 nm'de ≈ 0.8 optik yoğunluk (OD) olacak şekilde hazırlandı. Grup 2, 4 ve 6'daki sıçanların tibiaları 100 µL hazırlanan solüsyon ile enfekte edildi (Resim 3.27).



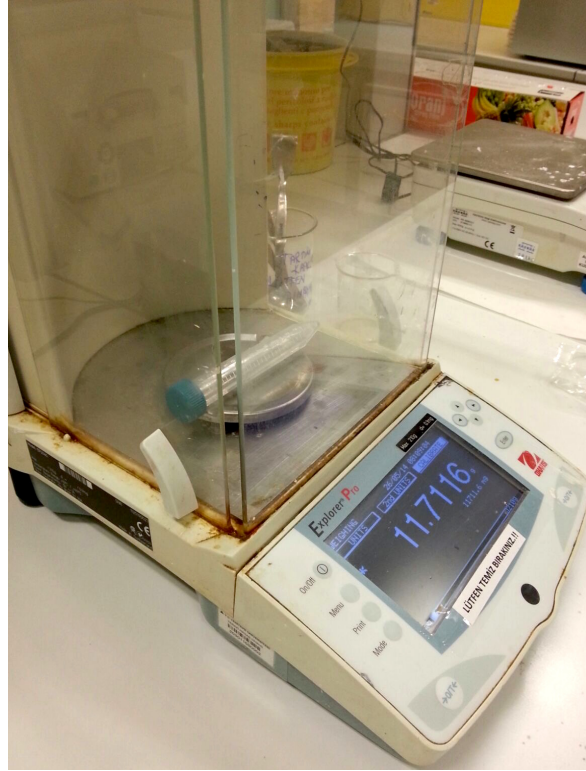
Resim 3.26 Anaerobik ortam şartlarını sağlayan %10 H₂, %10 CO₂ ve %80 N₂ gaz karışımını içeren %80 nemli ve 37 °C'deki anaerobik kabinin görünümü



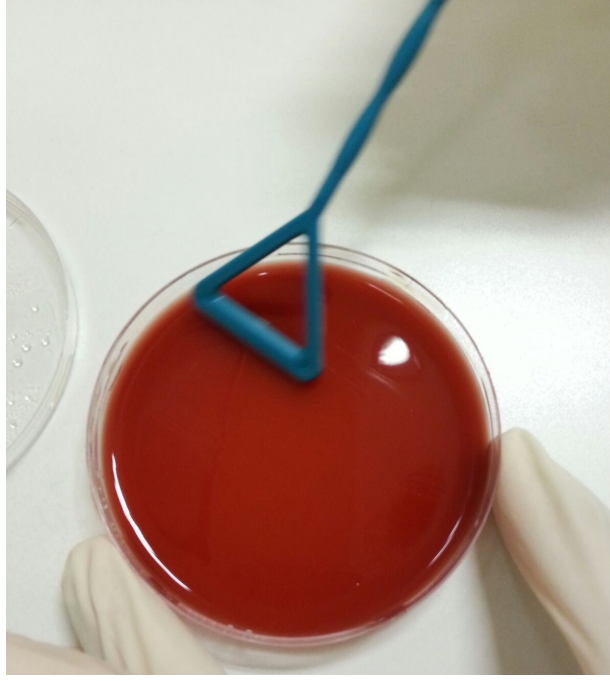
Resim 3.27 %5 koyun kanlı BHI katı besiyerinde *P. gingivalis* görünümü

Kemik Örneklerinin Agar Üzerinde İncelenmesi

P. gingivalis ile enfekte edilmiş sıçan tibialarında bulunan defekt alanları sagittal olarak kesildi. Kemik örnekleri tartıldı ve daha sonra 3 ml fosfat tampon solusyonu (PBS) içinde öğütüldü (Resim 3.28). Süspansiyon, daha sonra seyreltildi (1:1; 1:10, 1:1 ila 100:1, 1000) ve her seyreltmeden 100 µl alınarak % 5 koyun kanlı beyin, kalp infüzyon katı besiyeri üzerine ekildi (Resim 3.29). Ekim yapılan besiyerleri 72 saat, 37 °C'de anaerobik koşullar altında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası büyüyen mikroorganizmalar sayıldı ve koloni sayısı/gr olarak hesaplandı (176, 177).



Resim 3.28 Kemik örneklerinin tartılması



Resim 3.29 Tibialar izotonik tuzlu su içerisinde parçalandıktan sonra %5 koyun kanlı BHI üzerine ekim yapılması

Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme

Çalışmamızda sıçanların tibialarında oluşturulan *P. gingivalis* ile kontamine edilen kemik defektlerinde, enfekte kemik alanındaki kemik iyileşmesi ve kemik yüzeyindeki osteoblast sayısı histomorfometrik olarak, kapiller yoğunluk ve doku yanıtı ise histolojik olarak değerlendirildi.

Histolojik değerlendirmede Aydın ve ark.'nın (2011) ve Bölgen ve ark.'nın (2013) çalışmalarındaki kemik iyileşmesi üzerine yaptıkları yöntem kullanıldı (179, 180). Deney hayvanları sakrifiye edilerek kemik doku örnekleri alındı ve % 10 nötral formalin içinde (pH 7) oda ısısında fikse edildi. De Castro solüsyonunda (kloral hidrat, nitrik asid, distile su) dekalsifiye edilen dokular otomatik doku takip cihazında (Thermo Scientific Spin Tissue Processor, STP-120, Germany) dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilerek parafine gömüldü. Kızaklı mikrotom (Thermo Fisher Scientific, HM 430, Germany) kullanılarak 4-5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen Eozin (HE) ve Masson'un trikrom boyası ile boyandı. Örnekler, kemik defekti iyileşmesi, osteoblast sayısı, kapiller yoğunluk ve greft doku yanıtı açısından değerlendirildi. Masson'un trikrom boyası ile kemik doku kırmızı, yeni kemik ve kırıkta yeşil ve hücre sitoplazması mor olacak şekilde yüksek kontrastlı görüntü oluştuğunda değerlendirmeye alındı.

Kesitler, bilgisayarlı dijital kamera (DP72, Olympus, Japan) bağlı bir ışık mikroskopuyla (BX61, Olympus, Japan), birbiri ile kalibre iki araştırmacı tarafından ayrı ayrı değerlendirildi. Bright-field görüntüleri görüntü değerlendirme programında (DP2-BSW, Olympus, Japan) kantitatif olarak analiz edildi.

Yeni Oluşan Kemik Dokusunun Kantitatif Analizi

Işık mikroskopi görüntüleri, görüntü işleme programı (DP2-BSW, Olympus, Japonya) ile kantitatif olarak analiz edildi. Her görüntüde yeni trabeküler kemik alanlarına karşılık gelen piksel sayısının toplam defekt alanındaki piksel sayısına bölünmesiyle her bir örnek için 2 µm olarak alan hesaplaması yapıldı.

Kemik Yüzeyindeki Osteoblast Sayısının Kantitatif Analizi

Uğraş ve ark.'nın (2013) kemik yüzeyindeki osteoblast sayısı üzerine yaptıkları çalışmada kullandıkları deney yöntemi uygulandı. HE ile boyanmış kesitlerde, yeni kemik yüzeyi boyunca bulunan osteoblastlar morfolojilerine göre sınıflandırıldı. Kesitte rastgele olarak seçilen üç farklı alanda (200x) yeni kemik yüzeyinin total yeni kemik yüzeyinin uzunluğuna olan oranı hesaplandı ve her örnek için bir ortalama yüzde (%) (fraksiyon) hesaplandı (181).

Semikantitatif Kapiller Yoğunluk Analizi

Kemik trabeküllerini çevreleyen bağ dokusunun kapiller yoğunlukları puanlandı. Yoğunluklar, hafif (+: 0-15 hücre), orta (+: 16-30 hücre) ve şiddetli (+++: >30 hücre) olmak üzere birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi (182).

Semikantitatif Doku Yanıtı Analizi

Pişkin ve ark.'ının (2009) inflamatuvar hücre infiltrasyonu yoğunlukları üzerinde yaptıkları çalışmadaki yöntem kullanıldı. Her örnek için birbirine kör ve birbiri ile kalibre iki farklı araştırmacı tarafından fibrotik bağ dokusu oluşumu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu kriterlerinin varlığına bağlı olarak total doku yanıtı puanlandı. Histolojik skorlama kriterleri Tablo 3.2.' de özetlenmiştir (183).

Tablo 3.2 Doku yanıtı skorlaması

Doku yanıtı	4	3	2	1	0
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	İmplant bölgesi veya çevresinde nekroz veya şiddetli hücreyel infiltrasyon var	Çok sayıda lenfosit, makrofaj ve yabancı cisim dev hücre ile birlikte farkedilebilir miktarda eozinofil ve nötrofil oluşumu	Az miktarda yabancı cisim dev hücre ve nötrofil ile birlikte birden çok lenfosit ve makrofaj oluşumu	Az sayıda lenfosit ve makrofaj oluşumu, Yabancı cisim dev hücre, eozinofil veya nötrofil oluşumu yok	İmplant bölgesi veya çevresinde makrofaj, yabancı cisim dev hücre, lenfosit, eozinofil veya nötrofil oluşumu yok, kontrol dokudan fark yok

İstatistiksel Değerlendirme

Histolojik parametreler istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel hesaplamalar, Windows için Sigma Plot 12.0 sürümü kullanılarak yapıldı (Systat Software Inc., San Jose, CA). Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edilmiş olup, yeni kemik alanının normal dağılım gösterdiği belirlendi. Bu nedenle one-way ANOVA analizi ve ardından post hoc Holm-Sidak testi uygulandı. Anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde kabul edildi.

4.BULGULAR

Klinik olarak, kemik ve yumuşak dokuda enfeksiyon bulgusu sakrifikasyon sırasında sadece *P. gingivalis* ile kontamine edilmiş olan PG grubundaki sıçanların bacağında izlendi (Resim 4.1).



Resim 4.1 PG grubundaki enfeksiyon bulgusu

72 saatlik inkübasyonun sonunda katı besiyeri üzerine konulan kollajenin kendiliğinden eridiğ i ve kollajenin bulunduğ u kısımda (10 mm çapında) *P. gingivalis* üremediğ i gözlemlendi. *Nigella sativa* bulunan katı besiyeri üzerinde ise aynı şekilde 10 mm çapındaki bir alanda bakteri üremesi görülmedi.

Defekt oluşturulduktan sonra sadece *P. gingivalis* ile kontamine edilen (PG grubu) çalışma grubunda $4,6 \times 10^4$ koloni sayısı/g bakteri gözlemlendi. *P. gingivalis* ile kontamine edildikten sonra lokal kollajen membran (PG+L-KOL) ve *N. sativa* içeren kollajen membran (PG+L-KOL+NS) uygulanan çalışma gruplarında ise bakteri gözlenmedi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Tüm grupların mikrobiyolojik inceleme sonucuna göre bakteri koloni sayısı miktarı

Gruplar	CFU
KONTROL	-
PG	$4,6 \times 10^4$
L-KOL	-
PG+L-KOL	-
L-KOL+NS	-
PG+L-KOL+NS	-

CFU: bakteri koloni sayısı, - : bakteri büyümesi negatif

Histolojik ve Histomorfometrik Bulgular

Kemikleşme sürecinin kortikal kemik kenarlarından başlayıp, defekt alanının merkezine doğru ilerlediği görüldü. Defekt alanındaki bağ dokusu kallusunun osteoprogenitör hücrelerden, fibrillerden ve yeni kan damarlarından oluştuğu ve intramembranöz kemikleşme ile yeni kemik trabekülleri oluşumuna rehberlik ettiği gözlemlendi. Yeni kemik trabeküllerinin kenarlarında çok sayıda yeni kemik matriksi sentezleyen aktif osteoblastlar görüldü ($0,67 \pm 0,07$, $0,6 \pm 0,7$). İlık boşluğunun hematopoetik öncül hücreleri ve yağ adaları ile dolu olduğu görüldü.

Tüm gruplardaki örneklerin histolojik olarak yeni kemik oluşumu, osteoblast sayısı, kapiller yoğunluk ve doku yanıtı tablo 4.2’de gösterilmektedir.

Tablo 4.2 Tüm gruplardaki örneklerin histolojik olarak yeni kemik oluşumu, osteoblast sayısı, kapiller yoğunluk ve doku yanıtı değerleri

Parametre	Grup	Ortalama	Medyan	Standart Sapma	Standart Hata
Kemik İyileşmesi	Kontrol	0,200	0,200	0,063	0,026
	PG	0,167	0,150	0,082	0,033
	L-KOL	0,233	0,200	0,052	0,021
	PG+L-KOL	0,233	0,250	0,121	0,049
	L-KOL+NS	0,775	0,775	0,076	0,031
	PG+L-KOL+NS	0,500	0,450	0,237	0,097
Kemik Yüzeyindeki Osteoblast Sayısı	Kontrol	0,345	0,345	0,040	0,017
	PG	0,313	0,325	0,050	0,020
	L-KOL	0,350	0,360	0,050	0,020
	PG+L-KOL	0,328	0,335	0,033	0,014
	L-KOL+NS	0,675	0,695	0,067	0,027
	PG+L-KOL+NS	0,597	0,610	0,070	0,029
Kapiller Yoğunluk	Kontrol	0,667	0,500	0,816	0,333
	PG	0,500	0,500	0,548	0,224
	L-KOL	0,667	0,500	0,816	0,333
	PG+L-KOL	0,500	0,000	0,837	0,342
	L-KOL+NS	2,500	3,000	0,837	0,342
	PG+L-KOL+NS	2,333	2,500	0,816	0,333
Doku Yanıtı	Kontrol	0,667	1,000	0,516	0,211
	PG	3,167	3,000	0,753	0,307
	L-KOL	0,500	0,500	0,548	0,224
	PG+L-KOL	2,000	2,000	0,894	0,365
	L-KOL+NS	0,500	0,500	0,548	0,224
	PG+L-KOL+NS	1,833	2,000	0,753	0,307

Gruplar arasında yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,05$). Yeni kemik alanının toplam kemik defekti alanına oranı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile PG, L-KOL ve PG+L-KOL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p = 0,957$); ($p = 0,995$); ($p = 0,985$), (Tablo 4.3).

Yeni kemik alanının toplam kemik defekti alanına oranı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile L-KOL+NS grubu arasında ve kontrol grubu ile PG+L-KOL+NS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p < 0,001$); ($p = 0,003$), (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 Kontrol grubunun PG, L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
KONTROL	0,2±0,06	0,957
PG	0,17±0,08	
KONTROL	0,2±0,06	0,995
L-KOL	0,23±0,05	
KONTROL	0,2±0,06	0,985
PG+L-KOL	0,23±0,12	
KONTROL	0,2±0,06	<0,001***
L-KOL+NS	0,77±0,07	
KONTROL	0,2±0,06	0,003**
PG+L-KOL+NS	0,5±0,23	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SS: Standart Sapma

PG grubu ile L-KOL ve PG+L-KOL arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi (p=0,959); (p=0,935). L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları PG grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu (p<0,001); (p<0,001), (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 PG grubunun L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
PG	0,17±0,08	0,959
L-KOL	0,23±0,05	
PG	0,17±0,08	0,935
PG+L-KOL	0,23±0,12	
PG	0,17±0,08	<0,001***
L-KOL+NS	0,77±0,07	
PG	0,17±0,08	<0,001***
PG+L-KOL+NS	0,5±0,23	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SS: Standart Sapma

L-KOL grubu ile PG+L-KOL grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0.05). L-KOL grubu ile L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bir farklılık bulundu (p<0,001); (p=0,009), (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 L-KOL grubunun PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
L-KOL	0,23±0,05	1
PG+L-KOL	0,23±0,12	
L-KOL	0,23±0,05	<0,001***
L-KOL+NS	0,77±0,07	
L-KOL	0,23±0,05	0,009**
PG+L-KOL+NS	0,5±0,23	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SS: Standart Sapma

PG+L-KOL grubu ile L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu (p<0,001); (p=0,009), (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 PG+L-KOL grubunun L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
PG+L-KOL	0,23±0,12	<0,001***
L-KOL+NS	0,77±0,07	
PG+L-KOL	0,23±0,12	0,009**
PG+L-KOL+NS	0,5±0,23	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SS: Standart Sapma

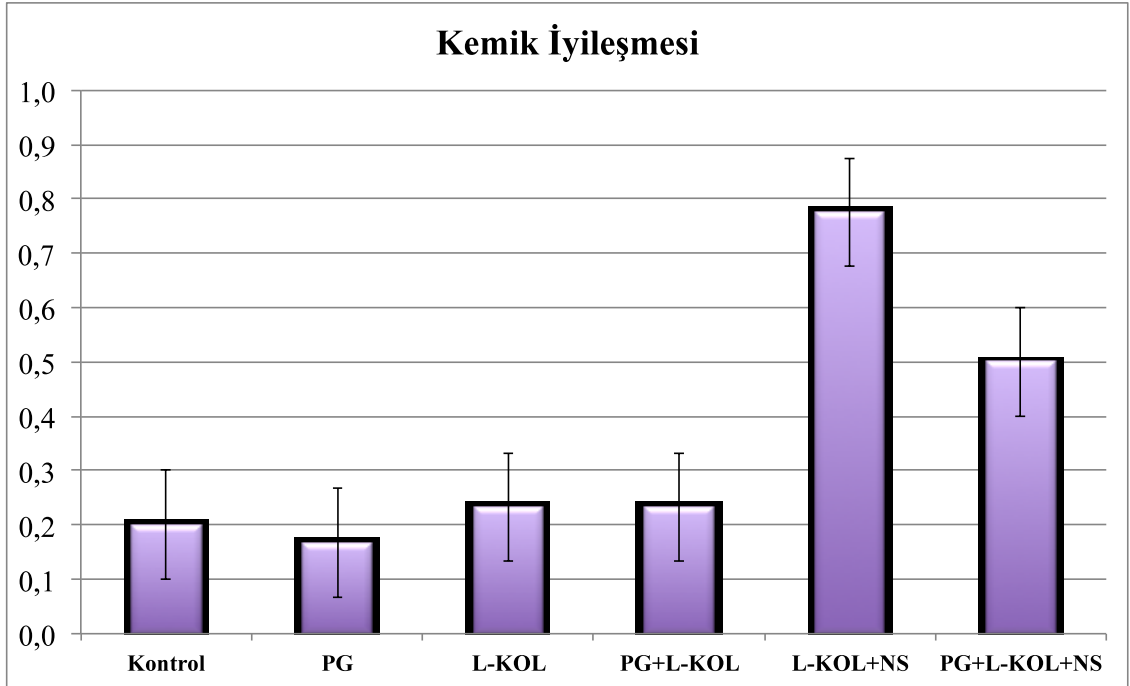
L-KOL+NS grubu ile PG+L-KOL+NS grubu karşılaştırıldığında yeni oluşan kemik miktarı PG+L-KOL+NS grubunda anlamlı derecede daha düşük bulundu ($p=0,007$), (Tablo 4.7).

Tablo 4.7 L-KOL+NS grubunun PG+L-KOL+NS grubu ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
L-KOL+NS	0,77±0,07	0,007**
PG+L-KOL+NS	0,5±0,23	

Holm-Sidak Testi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$); SS: Standart Sapma

Şekil 4.1 Grupların birbiri ile karşılaştırılması



Gruplar arasında yeni kemik yüzeyindeki osteoblast sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubu ile PG, L-KOL ve PG+L-KOL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0,983$); ($p=0,999$); ($p=0,998$). Kontrol grubu ile L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları arasında ise istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,001$); ($p<0,001$), (Tablo 4.8).

Tablo 4.8 Kontrol grubunun PG, L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
KONTROL	0,35±0,04	0,983
PG	0,31±0,05	
KONTROL	0,35±0,04	0,999
L-KOL	0,35±0,05	
KONTROL	0,35±0,04	0,998
PG+L-KOL	0,33±0,03	
KONTROL	0,35±0,04	<0,001***
L-KOL+NS	0,67±0,07	
KONTROL	0,35±0,04	<0,001***
PG+L-KOL+NS	0,6±0,7	

Holm-Sidak Testi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$); SS: Standart Sapma

PG grubu ile L-KOL ve PG+L-KOL grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p=0,973$); ($p=0,997$), PG grubu ile L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları arasında yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$); ($p<0,001$), (Tablo 4.9).

Tablo 4.9 PG grubunun L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
PG	0,31±0,05	0,973
L-KOL	0,35±0,05	
PG	0,31±0,05	0,997
PG+L-KOL	0,33±0,03	
PG	0,31±0,05	<0,001***
L-KOL+NS	0,67±0,07	
PG	0,31±0,05	<0,001***
PG+L-KOL+NS	0,6±0,7	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SS: Standart Sapma

L-KOL grubu ile PG+L-KOL grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0,997). L-KOL grubu ile L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir fark bulundu (p<0,001); (p<0,001), (Tablo 4.10).

Tablo 4.10 L-KOL grubunun PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
L-KOL	0,35±0,05	0,997
PG+L-KOL	0,33±0,03	
L-KOL	0,35±0,05	<0,001***
L-KOL+NS	0,67±0,07	
L-KOL	0,35±0,05	<0,001***
PG+L-KOL+NS	0,6±0,7	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SS: Standart Sapma

PG+L-KOL grubu ile L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları arasında ileri derecede anlamlı bir fark bulundu (p<0,001); (p<0,001), (Tablo 4.11).

Tablo 4.11 PG+L-KOL grubunun L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
PG+L-KOL	0,33±0,03	<0,001***
L-KOL+NS	0,67±0,07	
PG+L-KOL	0,33±0,03	<0,001***
PG+L-KOL+NS	0,6±0,7	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SS: Standart Sapma

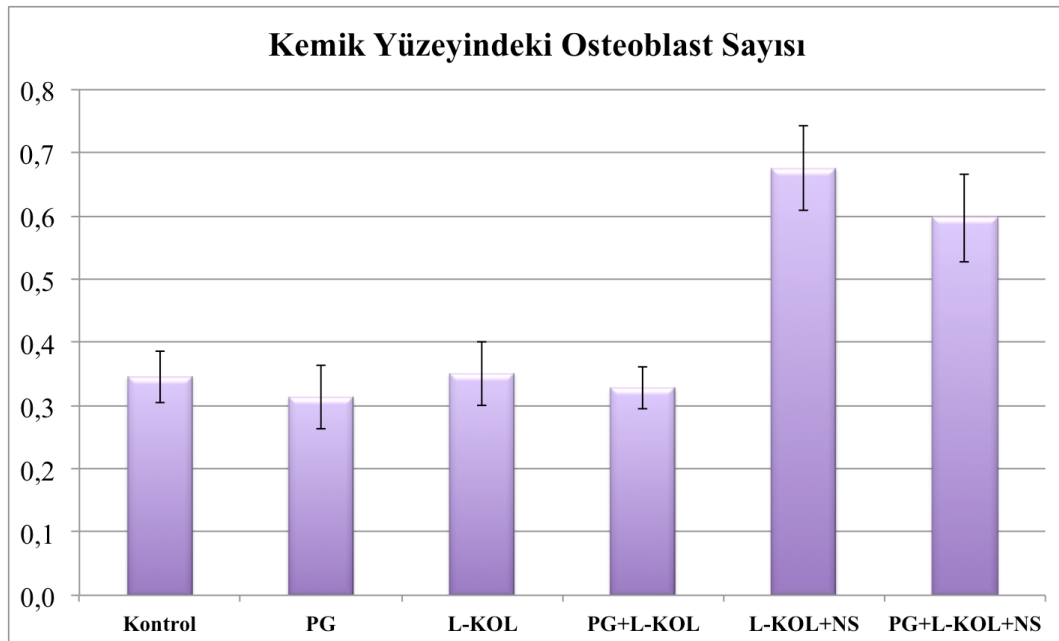
L-KOL+NS grubu ile PG+L-KOL+NS grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,373$), (Tablo 4.12).

Tablo 4.12 L-KOL+NS grubunun PG+L-KOL+NS grubu ile ikili karşılaştırılması

Grup	Ortalama±SS	p
L-KOL+NS	0,67±0,07	0,373
PG+L-KOL+NS	0,6±0,7	

Holm-Sidak Testi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$); SS: Standart Sapma

Şekil 4.2 Grupların birbiri ile karşılaştırılması



Yemi kemik trabeküllerini çevreleyen bağ dokunun damarlanması ve kılcallardaki artış *N. sativa* uygulanan gruplarda diğer gruplara göre daha fazla bulundu ($p<0.05$).

Tüm gruplardaki hayvanlar histolojik olarak kapiller yoğunluk açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda kontrol grubu ile PG, L-KOL ve PG+L-KOL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=1$), ($p=1$), ($p=1$). L-KOL+NS ile PG+L-KOL+NS grupları arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0,003$); ($p=0,009$), (Tablo 4.13).

Tablo 4.13 Kontrol grubunun PG, L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan±SH	p
KONTROL	0,5±0,33	1
PG	0,5±0,22	
KONTROL	0,5±0,33	1
L-KOL	0,5±0,33	
KONTROL	0,5±0,33	1
PG+L-KOL	0±0,34	
KONTROL	0,5±0,33	0,003**
L-KOL+NS	3±0,34	
KONTROL	0,5±0,33	0,009**
PG+L-KOL+NS	2,5±0,33	

Holm-Sidak Testi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$); SH: Standart Hata

PG grubu ile L-KOL ve PG+L-KOL grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p=1$); ($p=1$); L-KOL+NS ile PG+L-KOL+NS grupları arasında ise yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu ($p=0,001$); ($p=0,004$), (Tablo 4.14).

Tablo 4.14 PG grubunun L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan±SH	p
PG	0,5±0,22	1
L-KOL	0,5±0,33	
PG	0,5±0,22	1
PG+L-KOL	0±0,34	
PG	0,5±0,22	0,001**
L-KOL+NS	3±0,34	
PG	0,5±0,22	0,004**
PG+L-KOL+NS	2,5±0,33	

Holm-Sidak Testi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$); SH: Standart Hata

L-KOL grubu ile PG+L-KOL grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p=1$); L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları arasında yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu ($p=0,003$); ($p=0,008$), (Tablo 4.15).

Tablo 4.15 L-KOL grubunun PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan±SH	p
L-KOL	0,5±0,33	1
PG+L-KOL	0±0,34	
L-KOL	0,5±0,33	0,003**
L-KOL+NS	3±0,34	
L-KOL	0,5±0,33	0,008**
PG+L-KOL+NS	2,5±0,33	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SH: Standart Hata

PG+L-KOL grubu ile L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları arasında yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu (p=0,001); (p=0,004), (Tablo 4.16).

Tablo 4.16 PG+L-KOL grubunun L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan±SH	p
PG+L-KOL	0±0,34	0,001**
L-KOL+NS	3±0,34	
PG+L-KOL	0±0,34	0,004**
PG+L-KOL+NS	2,5±0,33	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SH: Standart Hata

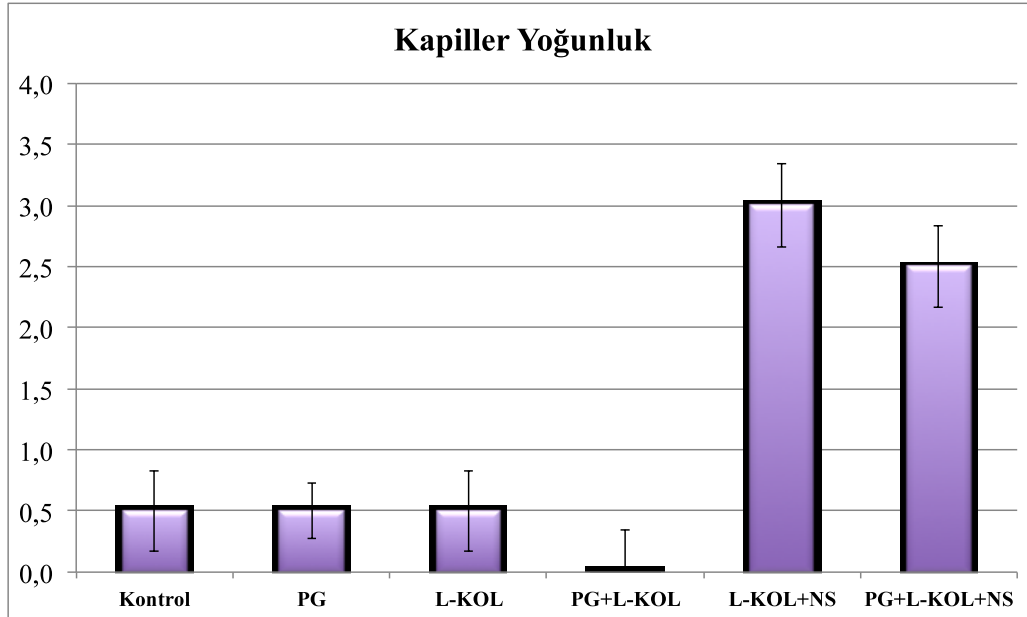
L-KOL+NS grubu ile PG+L-KOL+NS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken L-KOL+NS grubunda kapiller yoğunluk daha fazla izlendi ($3 \pm 0,34$, $2,5 \pm 0,33$), (Tablo 4.17).

Tablo 4.17 L-KOL+NS grubunun PG+L-KOL+NS grubu ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan \pm SH	p
L-KOL+NS	$3 \pm 0,34$	1
PG+L-KOL+NS	$2,5 \pm 0,33$	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SH: Standart Hata

Şekil 4.3 Grupların birbiri ile karşılaştırılması



Tüm gruptaki örneklerin histolojik olarak doku yanıtı açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,05$). Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda inflamatuvar hücre reaksiyonunun şiddeti, PG grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olup iki grup arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,001$). Kontaminasyon makrofajlar, lenfositler, fibroblastlar ve yabancı cisim dev hücreleri ile bazı polimorf çekirdekli lökositler ile karakterize orta-şiddetli düzeyde inflamasyona yol açmıştır.

Kontrol grubu ile L-KOL ve L-KOL+NS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p=1$); ($p=0,996$); kontrol grubu ile PG+L-KOL grubu ve PG+L-KOL+NS arasında ise ileri derecede anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0,041$); ($p=0,02$), (Tablo 4.18).

Tablo 4.18 Kontrol grubunun PG, L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan±SH	p
KONTROL	1±0,21	<0,001***
PG	3±0,31	
KONTROL	1±0,21	0,996
L-KOL	0,5±0,22	
KONTROL	1±0,21	0,02*
PG+L-KOL	2±0,36	
KONTROL	1±0,21	1
L-KOL+NS	0,5±0,22	
KONTROL	1±0,21	0,041*
PG+L-KOL+NS	2±0,31	

Holm-Sidak Testi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$); SH: Standart Hata

PG grubu ile L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir farklılık görüldü ($p<0,001$); ($p=0,038$); ($p<0,001$); ($p=0,018$), (Tablo 4.19).

Tablo 4.19 PG grubunun L-KOL, PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan\pmSH	p
PG	3 \pm 0,31	<0,01**
L-KOL	0,5 \pm 0,22	
PG	3 \pm 0,31	0,038*
PG+L-KOL	2 \pm 0,36	
PG	3 \pm 0,31	<0,001***
L-KOL+NS	0,5 \pm 0,22	
PG	3 \pm 0,31	0,018*
PG+L-KOL+NS	2 \pm 0,31	

Holm-Sidak Testi (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$); SH: Standart Hata

L-KOL grubu ile PG+L-KOL grubu arasında yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu ($p=0,07$). L-KOL grubu ile L-KOL+NS grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p=1$); PG+L-KOL+NS grubu arasında yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu ($p=0,021$), (Tablo 4.20).

Tablo 4.20 L-KOL grubunun PG+L-KOL, L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan±SH	p
L-KOL	0,5±0,22	0,007**
PG+L-KOL	2±0,36	
L-KOL	0,5±0,22	1
L-KOL+NS	0,5±0,22	
L-KOL	0,5±0,22	0,021*
PG+L-KOL+NS	2±0,31	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SH: Standart Hata

PG+L-KOL grubu ile L-KOL+NS grubu arasında yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu (p=0,007), ancak PG+L-KOL+NS grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,999), (Tablo 4.21).

Tablo 4.21 PG+L-KOL grubunun L-KOL+NS ve PG+L-KOL+NS grupları ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan±SH	p
PG+L-KOL	2±0,36	0,007**
L-KOL+NS	0,5±0,22	
PG+L-KOL	2±0,36	0,999
PG+L-KOL+NS	2±0,31	

Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SH: Standart Hata

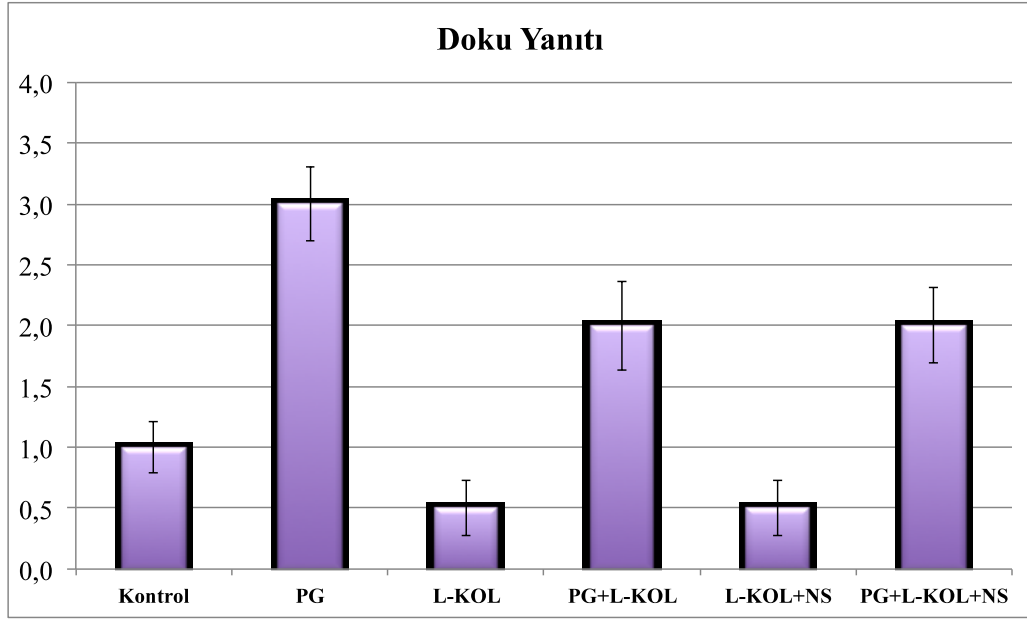
L-KOL+NS grubu ile PG+L-KOL+NS grubu arasında yüksek derecede anlamlı bir fark bulundu (p=0,022), (Tablo 4.22).

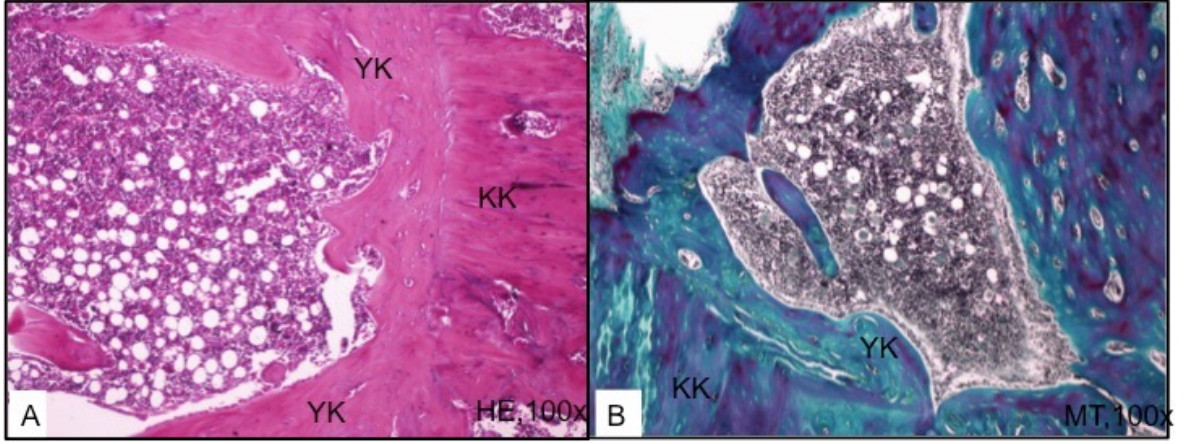
Tablo 4.22 L-KOL+NS grubunun PG+L-KOL+NS grubu ile ikili karşılaştırılması

Grup	Medyan±SH	p
L-KOL+NS	0,5±0,22	0,002**
PG+L-KOL+NS	2±0,31	

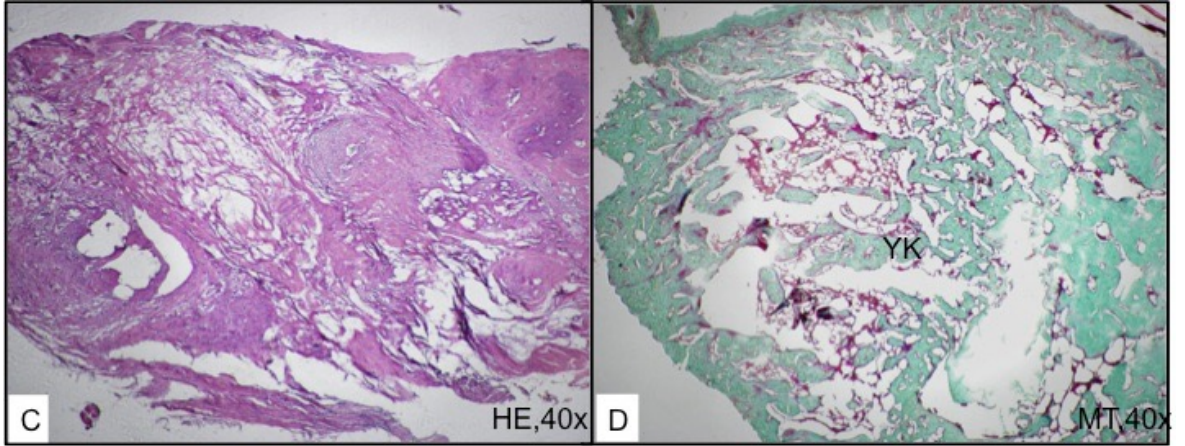
Holm-Sidak Testi (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); SH: Standart Hata

Şekil 4.4 Grupların birbiri ile karşılaştırılması

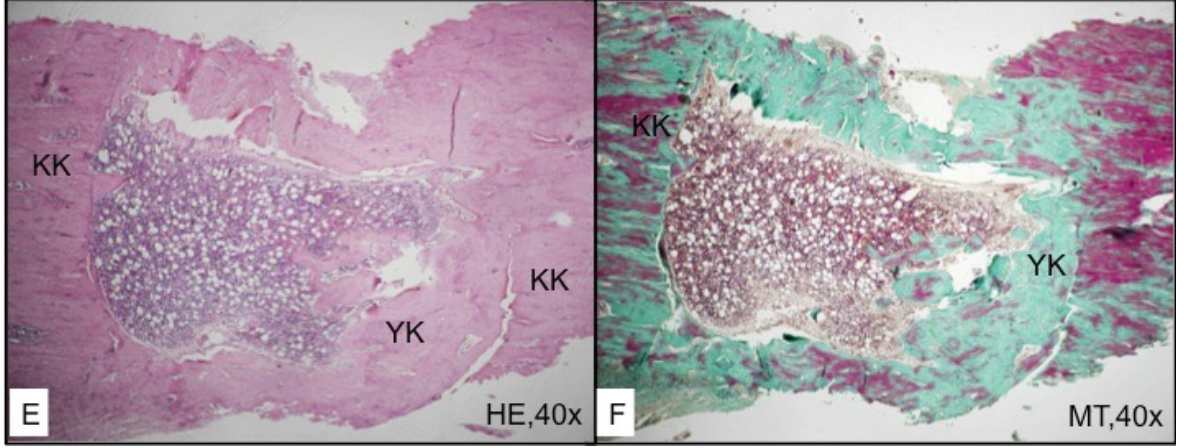




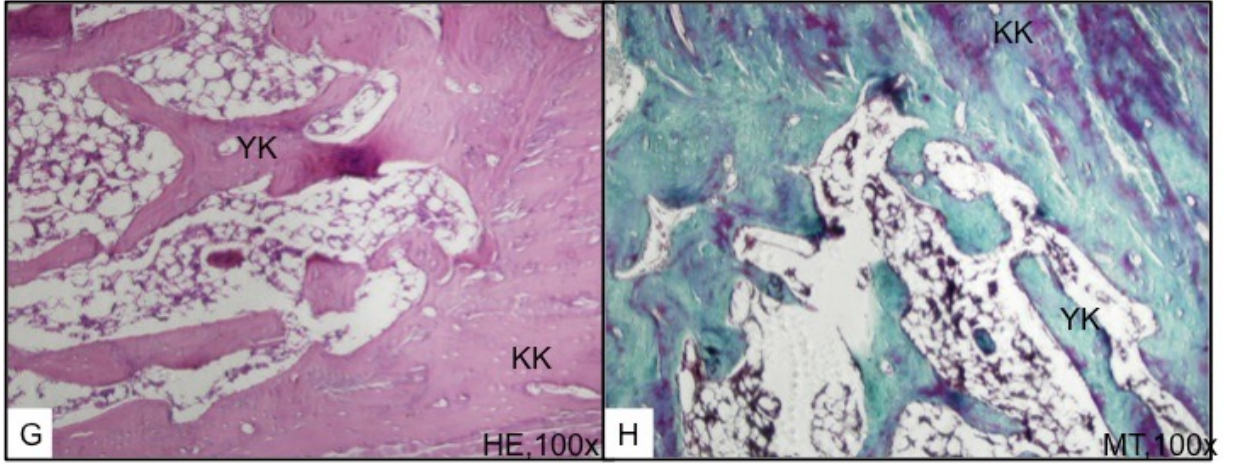
Resim 4.2 Kontrol grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. (A. Hematoksilen-Eozin X100; B. Masson Trikrom X100).



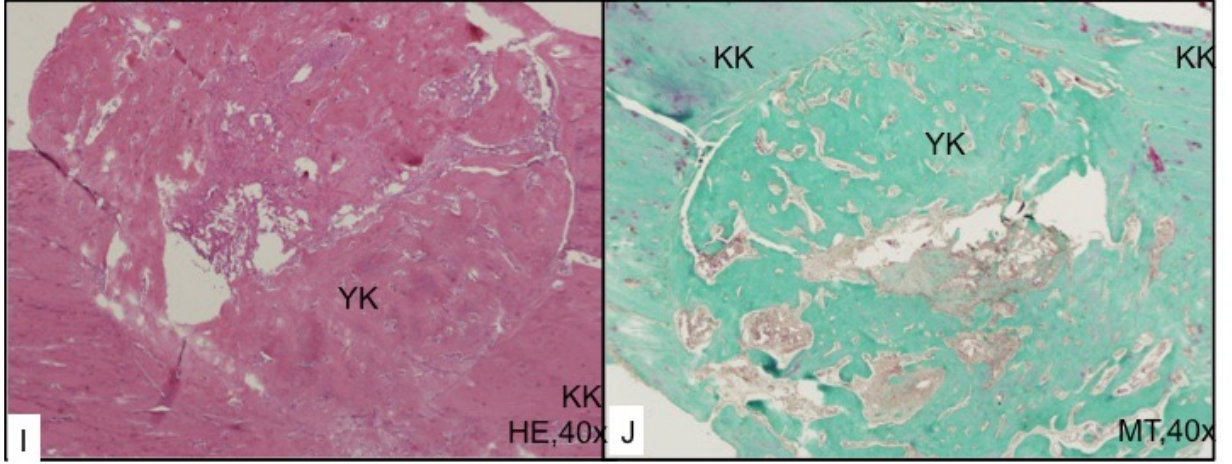
Resim 4.3 PG grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. (C. Hematoksilen-Eozin X40; D. Masson Trikrom X40).



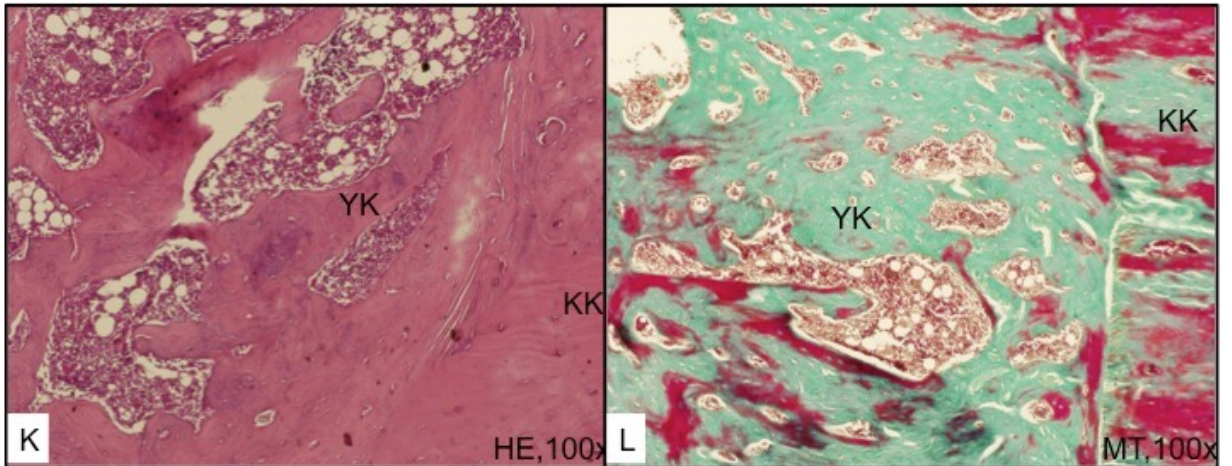
Resim 4.4 L-KOL grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. (E. Hematoksilen-Eozin X40; F. Masson Trikrom X40).



Resim 4.5 PG+L-KOL grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. (G. Hematoksilen-Eozin X100; H. Masson Trikrom X100).



Resim 4.6 L-KOL+NS grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. Artmış sayıda yeni kemik trabekülleri ve bunları çevreleyen aktif osteoblastlar. (I. Hematoksilen-Eozin X40; J. Masson Trikrom X40).



Resim 4.7 PG+L-KOL+NS grubuna ait bir sıçanda 28. günde elde edilen örnekte defekt alanının histolojik görüntüsü. Defekt alanını dolduran fibröz kallus ve yeni kemik trabekülleri. Artmış sayıda yeni kemik trabekülleri ve bunları çevreleyen aktif osteoblastlar. (K. Hematoksilen-Eozin X100; L. Masson Trikrom X100).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik defektleri olarak tanımlanan kemiğin içinde veya kenarında bulunan ve yeni kemikle dolması gereken bölgeler; kemik dokusunun kendini rejenere etme ve yeniden şekillendirme özelliğiyle iyileşmekle birlikte, bu mekanizmanın yetersiz kaldığı konjenital veya travmaya bağlı olarak ortaya çıkan deformitelerin ve kemik patolojilerinin cerrahi eksizyonu sebebiyle meydana gelen geniş kemik defektlerinin tedavisinde, yeni kontür sağlanması ve kemik iyileşmesinin desteklenmesi amacıyla kemik greftleri veya kemik yerine geçen materyallerin kullanımı gerekmektedir (184).

İskelet sisteminin diğer elemanlarında olduğu gibi oral ve maksillofasiyal bölgedeki; osseöz konjenital deformitelerin, travmaya bağlı olarak ortaya çıkmış deformitelerin ve osseöz patolojilerin cerrahi eksizyonundan dolayı açığa çıkan geniş kemik defektlerinin iyileşmesinin desteklenmesi amacıyla çeşitli tipteki kemik greftleri, bunların kombinasyonları, bariyer membranlar veya kemik yerine geçen biyomateryaller kullanılmaya başlanmıştır (185).

Bugüne kadar kemik defektlerinde yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR) çalışmalarının YKR'nin kemik defektlerinde başarılı olduğu, yara iyileşmesi ve osteoblastlar üzerine pozitif etkileri olduğu gösterilmiştir (186). Kemik defektlerinde, YKR operasyonlarında kemik greftleri, bariyer membranlar ve büyüme faktörleri kullanılabilir. Çalışmaların sonucunda başarılar elde edilmiş olsa da, tüm vakalarda tam ve önceden tahmin edilebilir bir rejenerasyonun elde edilebilmesi hala güçtür. Bu nedenle tek başına avantajları olan tekniklerin kombinasyonları yapılarak en ideal ve sonucun önceden tahmin edilebileceği bir teknik bulunmaya çalışılmaktadır (186, 187).

Hastalık ya da travma nedeniyle kaybedilmiş dokuların yeniden oluşturulması ve yapılandırılması için sentetik veya biyolojik matriksler içine yerleştirilmiş aktivasyon molekülleri ve büyüme faktörlerinin kemik rejenerasyonu amacıyla kullanılması doku mühendisliğinin hedefleri arasındadır (187). Çeşitli nedenlerle kaybedilmiş ya da hasar görmüş vücut dokularının klasik biyomateryal uygulama teknikleri ile onarılması

yöntemi kullanılan biyomateryalin zamanla yıkıma uğrayarak istenilen etkin çevresel koşulların sağlanmasını engeller. Ancak doku mühendisliği uygulamalar sayesinde doku içerisine yerleştirilen sistemler doğal dokulara benzer biyolojik ve fiziksel uyarılara cevap verme ve ekstraselüler matriks yapısını yeniden şekillendirme kapasitesine sahiptir (187, 188).

Günümüzde kemik rejenerasyonu amacıyla sıkça kullanılan büyüme faktörleri BMP2, TGF- β ve FGF'dir. Bu büyüme faktörlerinin osteojenik hücre farklılaşması ve kemik rejenerasyonunu artırıcı etkileri kontrollü ilaç salınım metodu kullanılarak kanıtlanmıştır (188, 189, 190). Bu tedavi yöntemlerinin yanı sıra alternatif tedavi yöntemleri son zamanlarda oldukça yaygınlaşmıştır. Tedavi yaptığı ileri sürülen, ancak bu etkileri bilimsel metotlarla kanıtlanamayan geleneksel veya güncel tıbbi uygulamalar olarak bilinen alternatif tedavi yönteminin başlıcası bitkisel tedavilerdir ve bitkisel tedavi amacıyla kullanılan şifalı bitkilerden biri de *N. sativa*'dır. Biyolojik yapılar üzerine *N. sativa* tohumu ve tohumundan elde edilen preparatların etkisi olduğu düşünülmektedir. Tıpta, terapötik amaçlar için *N. sativa* kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bitkinin tohumlarında önemli miktarda uçucu ve sabit yağ bulunmaktadır (155). İçeriğindeki uçucu ve sabit yağlarda güçlü anti-inflamatuvar ve anti-mikrobiyal aktiviteye sahip bileşenler bulunmaktadır. Mevcut antibiyotiklere karşı gelişen direncin ciddi sağlık sorunu haline gelmesinden dolayı araştırmacılar dirençli izolatlar üzerine etkili alternatif anti-mikrobiyel ajanlar üzerinde çalışmaya başlamışlardır. Çalışmalarda *N. sativa* yağı içeriğinde bulundurduğu yağ asitlerinin yanı sıra, yüksek oranda bulunan TQ, p-simen ve karvakrol bileşimlerinin anti-bakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir (191, 192, 193). *N. sativa*'nın anti-mikrobiyal aktivitesi olduğunu bildirmiştir. Bu amaçla oral cerrahide çok sık karşılaşılan membranın açığa çıkmasına bağlı gelişen enfeksiyonlarda faydalı olacağı düşünülebilir.

Kara ve ark.'ı maksiller palatal genişletmede *N. sativa*'nın etken maddesi olan TQ'nun sistemik uygulamasının kemik iyileşmesini arttırdığını bildirmişlerdir (182). Özdemir ve ark.'ı ise sıçan periodontitis modelinde sistemik TQ uygulamasının alveoler kemik rezorpsiyonunu engellediğini göstermişlerdir (194). Literatürde sistemik olarak uygulanan *N. sativa*'nın kemik üzerine etkilerini araştıran çalışmalar bulunmasına

rağmen *N. sativa*'nın lokal uygulamalarını içeren çalışmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda *N. sativa* içeren kollajen membranın *P. gingivalis* ile enfekte kemik alanındaki anti-mikrobiyal etkisini ve kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin histolojik ve histomorfometrik olarak incelemeyi amaçladık.

Histolojik, histomorfometrik ve biyomekanik açıdan kemik dokuyu inceleme amaçlı yapılan bütün çalışmalarda deney hayvanlarından yararlanılır. Seçilecek olan deney hayvanının yapılacak olan çalışmaya uygun olması gerekmektedir. KBD incelenmesinde sıklıkla 4 tip hayvan üzerinde çalışmalar yapıldığı görülmüştür. Deney hayvanlarından domuz, köpek ve sıçanların immünitisi ile insan immünitisi benzerlik göstermektedir. Etik olarak son 10 yıldır ülkemizde köpekler üzerinde çalışma yapılmamaktadır. Domuzlarda ise bakım işleminin ve cerrahi işlemin zor yapılması ve maliyetinin yüksek olması nedeniyle pek tercih edilmemektedir. Sıçanlar bilindiği gibi deney hayvanı olarak sıklıkla tercih edilen hayvanlar grubundadır (195, 196, 197). Test amacıyla sıçanlarda çeşitli osteopromotif materyal uygulama fikri yaklaşık 30 sene öncesine dayanmaktadır. Freeman ve Turnbull, sıçanlarda KBD anlamındaki defektlerde çalışmış ilk araştırmacılarıdır. Çalışmalarında wistar albino sıçanların parietal kemiklerine açtıkları 2 mm çapındaki deneysel defektleri iyileşme yönünden araştırdıklarında 12 hafta sonunda belirgin bir iyileşmenin olmadığı gözlenmiştir (49, 50, 51, 52).

Literatürdeki çalışmalara benzer şekilde deney hayvanı olarak sıçanları seçmemizin nedenleri:

Sıçanların kolay bulunması, uygulanacak cerrahi yöntem açısından kolay çalışılabilecek bir deney hayvanı olması, sıçanların tibiasında diğer bölgelere göre cerrahi çalışma alanının göreceli daha kolay olması, sıçanların barındırma ve beslenmelerinin kolaylığı, maliyetinin düşük olması, primer kemik iyileşmesinin insan kemiğinde görülen iyileşmeye benzerlik göstermesi, sıçanların domuz, koyun gibi kendilerinden daha büyük deney hayvanlarına göre genel anesteziye alınma şartlarının daha basit olması (entübasyona ihtiyaç duyulmaması) ve çalışılacak bölgede sıçan tibiasında denekler için hayati önem taşıyan anatomik oluşumların (majör damarsal ve sinir yapıları) bulunmaması şeklinde sıralanabilir (198, 199).

Literatür incelemesinde, kemik iyileşmesinin genç alıcılarda yaşlılara göre daha iyi olduğunun bildirilmesi sebebiyle tüm deneklerin 10-12 haftalık yaklaşık 250±20 g olmasına dikkat edilerek yaş farklılığının kemik oluşumu üzerinde gösterebileceği olası değişikliklerin elimine edilmesi amaçlanmıştır (200, 201).

Çalışmamızda toplamda 42 adet hayvan olacak şekilde ve her gruptan 1'er hayvan mikrobiyolojik inceleme için ve geri kalan 36 adet hayvan histolojik ve histomorfometrik inceleme için dahil edilmiştir.

Kemik iyileşmesinin histolojik olarak incelendiği çalışmalarda farklı sakrifikasyon zamanları tercih edilmiştir. Hayvan modellerinde, yeni kemik oluşumu ve anjiogenezin gözlemlenmesi için 4 haftalık sürenin yeterli bir zaman dilimi olduğu görüşü hakimdir (202). Frota ve ark.'ı (2011), sıçanların parietal kemiğinde oluşturdukları defekte β -TCP'nin etkilerini inceledikleri çalışmada 7., 15. ve 30. günlerde aldıkları doku örneklerini incelemişlerdir (203). Takechi ve ark.'ları (2008), sıçanların tibialarına yerleştirdikleri implantların osteointegrasyonu üzerine melatonin ve FGF-2'nin etkilerini inceledikleri çalışmalarında 28. günde aldıkları doku örneklerini incelemişlerdir. Biz de çalışmamızda kemik iyileşmesini değerlendirmek için sıçanları 28. günde sakrifiye etmeyi tercih ettik.

KBD modeli Hollinger ve ark.'ı tarafından geliştirilmiş olup kemik doku mühendisliği uygulamalarında altın standart olarak kabul edilmektedir. Kritik boyutlu kemik defekti modelinde dışarıdan bir uygulama olmaksızın kemik defektinin kendi kendisine canlılığın yaşam süresi boyunca iyileşmeyeceği kabul edilmektedir (204). Bu boyuttaki bir defekt, spontan olarak kemik dokusu yerine bağ dokusu oluşumu ile iyileşebileceğinden osteogenezi olumsuz şekilde etkilemektedir (205, 206). Literatürde kemik rejenerasyonu ile ilgili sıçan tibiaları üzerinde yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Defekt boyutu ile ilgili pek çok farklı görüş bildirilmektedir. Bir kısım araştırmacılar sıçan tibialarında 2x2 mm boyutunda defektler oluştururken (207, 208), 3x3 mm boyutunda defekt oluşturulan bir çok çalışma bulunmaktadır (53, 195, 196, 209, 210). Biz de çalışmamızda sıçanların tibia kalınlıklarını ve fraktür risklerini göz önünde bulundurarak 3 mm çapındaki trefan frez ile 3 mm çapında kemik defektlerini

hazırladık. Kontrol grubuna ait sonuçlar değerlendirildiğinde klinik ve histolojik olarak kemikleşmenin olmaması oluşturulan deney modelinin uygun olduğunu göstermektedir.

Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu, bariyer membran kullanılarak kan pıhtısını ve oluşturulan boşluğu korumak için yumuşak doku hücrelerinin proliferasyonunu dışarda tutmayı amaçlamaktadır (187, 189). Membranlar osteojenik özelliği olmayan yumuşak doku hücrelerinin defekt rejenerasyonuna katılmasını engelleyerek, bitişik kemik iliğindeki anjiojenik ve osteojenik hücrelerin defekti kemikle doldurmasına izin vermektedir (211). Bu yöntemle bariyer membranlar kemik greftleri ile birlikte veya tek başına kullanılmaktadır. Bariyer membran kullanılan ve kullanılmayan vakalarda kemik iyileşmesinin karşılaştırıldığı birçok klinik çalışmada membran kullanımı sonucunda kemik oluşumunun hızlandığı belirtilmiştir (211).

Nevins M. ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada; geniş alveolar kemik defektlerinde bariyer membran kullanılmasının iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Bu durum bariyer membran kullanıldığında yumuşak dokunun defekt içine büyümesinin engellenmesinden kaynaklanır (212).

Kemik içi defektlerde bariyer membranların greft materyali olmaksızın tek başlarına kullanımının kemik rejenerasyonunu arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (213, 214, 215). Taha ve ark.'larının yaptıkları deneysel çalışmalarında membran kullanılan ve kullanılmayan kemik içi defektleri karşılaştırmışlar; kollajen membran kullanılan grupta 9. ayda istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla kemik rejenerasyonu saptamışlardır (216). Becker ve ark.'larının deneysel çalışmalarında Gore-Tex membranın tek başına ve otojen greft ya da Demineralize dondurulmuş-kurutulmuş kemik allogreftiyle (DFDBA) birlikte kullanımını değerlendirmişlerdir (217). 12 haftalık takip sonucunda Gore-Tex membranların tek başına veya otojen greft ile kombine kullanımı arasında istatistiksel olarak fark gözlenmemiş, her iki tekniğin de en iyi histolojik ve klinik sonuçlara imkan sağladığı belirtilmiştir. Buna göre YKR'u amacı ile kullanılan membranlar mineral apozisyonunda greftlerden daha önemli bir rol oynayabilmektedir (217). Hockers ve ark. köpekler üzerinde yaptıkları çalışmalarında rezorbe olabilen membran ile kombine ksenogreft ve otojen greft kullanımını değerlendirmişlerdir (218). Çalışmanın sonucunda rezorbe olabilen kollajen membranın

kemik rejenerasyonunu arttırdığını, ayrıca destekleyici bir greft materyaliyle beraber kullanıldığında bu etkisinin daha belirgin olduğunu belirtmişlerdir (218). Imbronito ve ark.'ı köpek mandibulalarında oluşturdukları kemik defekti modelinde rezorbe olmayan PTFE membran ile rezorbe olabilen PLA membranı kemik rejenerasyonu bakımından karşılaştırdıkları çalışmada 2. ve 4. ay ölçümlerinin her ikisinde de bu iki tip membran arasında yeni oluşan kemik miktarları açısından farklılık göstermediğini bildirmişlerdir (219).

Bariyer membranların uygulandığı alanda stabil olmaması, membranın yara kenarlarına migrasyonuna ve yara kenarlarının açılmasına neden olabilmektedir. Böyle bir durumda oral flora ile temas eden membran bakteri kontaminasyonu neticesi enfekte olabilir ve yara iyileşmesinin bozulmasına neden olabilir (220). Bariyer membran prosedürlerinin başarısızlığı, alanların erken açılmasının sonucu olarak bakterilere bağlı komplikasyonlardan dolayı ortaya çıkabilmektedir. Primatlara uygulanan titanyum destekli PTFE membranlar üzerine çalışmanın birinde, membranların erken (bir haftada açılan) açılma alanlarında *Bacteriodes fragilis*, *S. pneumoniae*, *Prevotella intermedia* ve *S. intermedius* bulunmuştur. Açığa çıkmanın ve mikroorganizmaların aşırı büyümesinin görsel işaretleri kızarıklık, ödem ve doku dökülmesidir (221). Özellikle agresif periodontitis gösteren insan deneklerde, *P. gingivalis* ve *S. mutans* bariyer membranlar üzerine yüksek ilgisi olduğu bilinen ortak mikroorganizmalardır. İn-vitro çalışmaları belli bariyer membran bileşimlerine karşı bazı bakterilerin farklılaşmış tercihleri olduğunu göstermiştir (221). Diğer in-vitro çalışma araştırmalarında konak savunması ve bakteriyel rekabet gibi mikroorganizma yapışması ve kolonizasyonunu etkileyen diğer faktörlerin etkisiz olduğu sonucuna geniş yer verilmiştir (222, 223).

P. gingivalis'in ileri derecede doku yıkımına neden olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda konağın doku yıkıcı mekanizmalarını da başlatarak doku yıkımını arttırmaları (94). İndirek veya konağa bağlı doku yıkım etkisi, lokal doku yıkımına yol açan konak hücrelerinin veya humoral faktörlerin indüksiyonu, stimülasyonu veya aktivasyonunun sonucudur. *P. gingivalis* TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-17 gibi dolaşan pro-inflamatuvar sitokinleri arttırmaktadır (94).

P. gingivalis'in sinüzit, diş ve dişeti enfeksiyonlarına neden olabileceği bilinmektedir. Hatta bakteriyemi yoluyla endokardite de neden olabilmektedir (224). Ağız florasında en sık periodontal dokularda görüldüğüne dair çalışmalar mevcuttur (224). Çoğunlukla subgingival bölgelerde ve dişeti oluşunda, özellikle apseli dişler ve semptomatik peri-radiküler lezyonlardan izole edilebilmektedir. Mandibulada osteoradyonekroz olgularında yapılan bir çalışmada rezeke edilen 12 osteoradyonekrotik mandibulanın derin medüller yapılarında en predominant organizma olarak *P. gingivalis* tespit edilmiştir (224). Bu da bize iyileşmenin geciktiği olgularda *P. gingivalis*'in etkili olabileceğini göstermektedir.

Bunun yanı sıra heminden zengin besi yerinde üretilen *P. gingivalis*'in hastalık yapabilme yeteneğinin fazla olduğu da rapor edilmiştir. Hemin varken bakterinin ortama saldığı butirik asit dişeti dokusunda IL-6, IL-8, IL-11 salınmasını artırır ve T lenfositleri için toksiktir, T lenfositlerin apoptozisini artırır, dişeti fibroblastlarını doza bağlı olarak süprese eder (94). Fibrinolitik sistem enflamatuvar lezyonların yayılmasını ve konnektif dokunun bozulmasını sağlayan ekstrasellüler proteolizisi düzenlediği için enflamatuvar reaksiyonlarda önem taşımaktadır (94).

P. gingivalis için çok önemli bir virülans faktörü ve kemik rezorbsiyonunda rol oynayan ana etken olarak ileri sürülen lipopolisakkarit (LPS) konak dokunun harabiyetine neden olan biyolojik aktiviteleri yöneten bir moleküldür (225, 226, 227). Kemik rezorbsiyonuna etkilerinin fazla olmasından dolayı da diş çekimi sonrası oluşabilecek alveolit vakalarında etkisinin oldukça fazla olduğu düşünülebilir.

Kütan ve ark. yaptıkları çalışmada 10^9 CFU/ml canlı bakteri (*P. gingivalis* ATCC 3744) süspansiyonu kullanarak etkili kontaminasyon sağlamışlardır (176). Mevcut çalışmamızda da benzer yöntem kullanılarak defektlerin kontaminasyonu sağlanmıştır. Kontrol grubu ile PG grubu; kemik iyileşmesi, osteoblast sayısı ve kapiller yoğunluk açısından karşılaştırıldıklarında bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), doku yanıtı açısından anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontaminasyon makrofajlar, lenfositler, fibroblastlar ve yabancı cisim dev hücreleri ile bazı polimorf çekirdekli lökositler ile karakterize orta-şiddetli düzeyde

inflamasyona yol açmıştır. İnflamatuvar hücre reaksiyonunun yüksek olması da *P. gingivalis* ile kontaminasyonun sağlandığını göstermektedir.

N. sativa'nın ve aktif bileşenlerinin anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-helminitik ve anti-viral olmak üzere anti-mikrobiyal özellikleri olduğu rapor edilmiştir (114). *N. sativa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* gibi pek çok bakteriye karşı anti-bakteriyel ve bunların yanı sıra patojenik maya *C. albicans* ve fungusu karşı anti-fungal etki göstermektedir (150, 151, 152, 114). *N. sativa*'nın sulu metanollü ekstresinin (IC50, 10-30 µg/ml) *S. mutans*'a karşı anti-bakteriyel aktivite gösterdiği açıklanmıştır. Bitki ekstresinin böylece diş çürümesi ve plakların önlenmesinde etkisi gösterilmiştir (228). Yapılan bir araştırmada tohumların uçucu yağ fraksiyonu anti-bakteriyel aktivite açısından test edildiğinde fraksiyonun daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğu ve özellikle de Gram (+)'lere karşı etkin olduğu saptanmıştır (228). Hanafy ve Hatem tarafından 1991 yılında yapılan bir çalışmada *S. aureus*, *P. aeruginosa* gibi Gram (+) bakteriler ve *C. albicans* gibi mayalar üzerinde *N. sativa* tohumlarının dietil eterli ekstresi ile çalışılmıştır (229). *N. sativa* tohumlarının eterli ekstresi (25-400 µg ekstre/disk) hem Gram (+) (*S. aureus*) hem de Gram (-) (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*) mikroorganizmalara konsantrasyona bağlı olarak inhibitör etki göstermektedir. Aynı araştırmacıların bir başka çalışmalarında ise metanollü ekstre ticari antibiyotikler olan streptomisin ve gentamisin'le kombine edilerek test edilmiş ve sinerjistik bir anti-bakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (230). *N. sativa*'yı da içeren 16 uçucu yağın anti-mikrobiyal ve anti-fungal özellikleri üzerine yapılan bir çalışmada, bütün yağlar arasından *N. sativa*, *C. albicans* (MIC, 2.5 mg/ml)'a karşı çok etkili ve ikinci olarak ise *Chaetomium olivacum* (MIC, 2.5 mg/ml)'a karşı etkili bulunmuştur (230). Sokmen ve ark.'ı eterli ekstrenin Gram (+) bakteri (*S. aureus*), Gram(-) bakteri (*P. aeruginosa*) ve *E. coli*'ye karşı in vitro anti-bakteriyel etkisini göstermiştir (231).

N. sativa, patojenik maya *C. albicans* ve mantara karşı olduğu kadar *E. coli*, *B. subtilis*, *S. faecalis*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* gibi pek çok bakteri suşuna karşı anti-bakteriyel etki göstermiştir (229, 232, 233).

N. sativa, tohumlarının ham alkaloit ekstresi ve sulu ekstresinin septik artritli hastalardan izole edilmiş çok çeşitli mikroorganizmalara karşı etkili olduğu, ekstrenin,

V. cholera, *E. coli* ve *S. dysentriae*'nin bütün suşlarını içeren ilaca dirençli bakterilere karşı çok etkili olduğu kanıtlanmıştır (232).

In vivo olarak *N. sativa* tohumu dietil eter ekstraktı farelerde öldürücü olmayan derialtı stafilokok enfeksiyonunda, enfeksiyon bölgesine enjekte edildiğinde enfeksiyonu tamamen tedavi etmektedir (234, 235). Buna göre, *N. sativa* tohumunun bileşenleri *in vivo* ortamda farklı konakçı faktörler aracılığıyla bakterisidal aktivite göstermektedir (234, 235).

N. sativa'dan elde edilmiş etilen glikoldeki çözeltisinin ve uçucu yağının in-vitro olarak bazı mikroorganizmalara (*S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. niger*, *V. chlorea*) 1:100 dilüsyonda bile iyi bir anti-bakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır. Yağın Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizmalara karşı çok etkili olduğu ve ayrıca özellikle *Aspergillus penicillum* ve *mikrosporyum* türlerine karşı in-vitro anti-fungal aktivitesi Disk Difüzyon Metodu kullanılarak test edilmiş ve anti-fungal aktivite gösterdiği bulunmuştur (236).

El-Kamali ve ark.'ı tarafından yapılan bir araştırmada, araştırmacılar disk difüzyon metodunu kullanarak *N. sativa* uçucu yağının Gram (+) (*S. aureus*, *B. subtilis*) ve Gram(-) (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) bakterilere karşı etkili olduğunu bulmuşlardır (237). Anti-bakteriyel etki *B. subtilis* kullanıldığında maksimum düzeyde olduğu, ayrıca uçucu yağının *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *V. cholerae* ve *E. coli*'ye karşı anti-bakteriyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (229, 231, 233). Biz de çalışmamızda kollajen membranın ve *N. Sativa* içeren kollajen membranın anti-mikrobiyal etki gösterip göstermediğini tespit edilmesi amacıyla disk diffüzyon metodunu kullanarak mikrobiyolojik analiz yaptık. Diğer çalışmaların sonuçları ile benzer şekilde kollajen membranın ve *N. sativa* içeren kollajen membranın *P. gingivalis* bakterisine karşı dirençli olduğunu ve anti-bakteriyel etkiye sahip olduğu sonuçlarını elde ettik.

Çalışmamızın mikrobiyolojik bulgularına göre; defekt oluşturulduktan sonra sadece *P. gingivalis* ile kontamine edilen PG grubunda $4,6 \times 10^4$ koloni sayısı /g bakteri bulundu. *P. gingivalis* ile kontamine edildikten sonra lokal kollajen (PG+L-KOL) ve lokal *N. sativa* (PG+L-KOL+NS) uygulanan çalışma gruplarında ise bakteri

bulunmaması *N. Sativa* ve kollajen membranın anti-mikrobiyal etkisini desteklemektedir.

Kemik iyileşmesinin değerlendirildiği deneysel çalışmalarda, iyileşme derecesinin hücresel seviyede anlaşılması amacı ile histolojik değerlendirme yapılması gerekmektedir. Histomorfometrik değerlendirme kemik hücrelerini, aktivitelerini ve kemik matriksini direkt değerlendirebilen altın standart olarak kabul edilmektedir (238). Çalışmamızda sıçanların tibialarında oluşturulan *P. gingivalis* ile kontamine edilen kemik defektlerinde, enfekte kemik alanındaki kemik iyileşmesi ve kemik yüzeyindeki osteoblast sayısı histomorfometrik olarak, kapiller yoğunluk ve doku yanıtı ise histolojik olarak değerlendirildi.

Kontrol grubu ile L-KOL+NS grubu yeni oluşan kemik miktarı, osteoblast sayısı ve kapiller yoğunluk açısından karşılaştırıldıklarında, bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunması, *N. Sativa*'nın kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkisi olduğunu düşündürmektedir ($p<0,001$), ($p<0,001$), ($p=0,003$). Çalışmamızın sonuçları Al-Hijazi ve Mohammed'in *Nigella sativa*'nın hızlı kemik trabeküller oluşumu ve olgun kemik oluşumu ile kemik iyileşmesini teşvik ettiğini bildiren çalışmaları ile uyumludur (239).

Kontrol grubu ile PG+L-KOL grubu arasında doku yanıtı ($p=0,020$) açısından anlamlı bir farkın olması *P. gingivalis* ile oluşturulan deney modelinin uygun olduğunu göstermektedir.

Kontrol grubu ile PG+L-KOL+NS grubu yeni oluşan kemik miktarı, osteoblast sayısı, kapiller yoğunluk ve doku yanıtı açısından karşılaştırıldıklarında bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunması, defekt bölgesinin *P. gingivalis* ile enfekte edilse dahi *N. Sativa*'nın kemik iyileşmesi üzerine etkisinin anti-mikrobiyal özellikte olduğunu düşündürmektedir ($p=0,003$), ($p<0,001$), ($p=0,009$), ($p=0,041$).

Al-Mutheffer (2014) *N. sativa* ekstresinin epikütanöz uygulamada hücre göçünün ve diferansiasyonun farklı proseslerini, ekstraselüler matrik oluşumu ve organizasyonu arttırarak kemik iyileşmesini arttırdığı göstermiştir (240). *N. Sativa* uygulanan gruplar (L-KOL+NS, PG+L-KOL+NS) ile uygulanmayanlar (Kontrol, PG,

L-KOL ve PG+L-KOL) karşılaştırıldığında yeni kemik oluşumunun *N. Sativa* uygulanan gruplarda anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü. *N. Sativa*'nın kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerine bakıldığında; kemik defekti iyileşmesini olumlu yönde bir etkiye sahip olduğu görüldü.

N. sativa'nın kan akımını hızlandırmak suretiyle defekt bölgesindeki kan miktarını ve dolayısı ile de kemik iyileşmesinde anahtar rolü olan anjiyogenezi artırıcı özelliği çalışmalarda gösterilmiştir (241). Yeni kemik trabeküllerini çevreleyen bağ dokudaki damarlanmanın; *N. sativa* uygulanan gruplarda (L-KOL+NS, PG+L-KOL+NS); Kontrol, PG, L-KOL ve PG+L-KOL gruplarına kıyasla çok daha fazla olduğu görüldü. Bu durum *N. sativa* uygulanan gruplarda kapiller yoğunluğunun çok daha fazla olması anjiyogeneze üzerinde etkili olabileceği görüşünü desteklemektedir.

PG grubu ile PG+L-KOL grubu yeni oluşan kemik miktarı, osteoblast sayısı ve kapiller yoğunluk açısından karşılaştırıldıklarında, bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p>0.05$), doku yanıtı açısından anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p=0,038$). Bu durumun, *P. gingivalis* bakterisinin inflamatuvar rolünden kaynaklandığı ancak kollajen membranın bariyer işlevi gördüğünü düşündürmektedir.

PG grubu ile PG+L-KOL+NS grubu yeni oluşan kemik miktarı, osteoblast sayısı, kapiller yoğunluk ve doku yanıtı açısından karşılaştırıldıklarında, bu iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir ($p<0,001$), ($p<0,001$), ($p=0,004$), ($p=0,018$). Bu farklılık; *N. sativa*'nın kemik iyileşmesinde etkisinin iyi olduğunu düşündürmektedir. *N. Sativa*'nın lokal uygulaması ile kontamine edilmiş defekt alanındaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azalması, *N. Sativa*'nın anti-inflamatuvar ve anti-bakteriyel etkisi olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları; Mutabagani ve El-Mahdy (1997)'nin, TQ'un Eicosanoid üretimini durdurmak sureti ile anti-inflamatuvar etki oluşturduğunu belirten çalışmalarını desteklemektedir (242).

L-KOL grubu ile L-KOL+NS grubu ile yeni oluşan kemik miktarı, osteoblast sayısı ve kapiller yoğunluk açısından karşılaştırıldıklarında, bu iki grup arasında anlamlı bir farkın görülmesi, ($p<0,001$), ($p<0,001$), ($p=0,003$), *N. Sativa*'nın kemik

iyileşmesinde bariyer membranın olası etkilerine ilaveten olumlu etkilerinin olduğunu düşündürmektedir.

PG+L-KOL grubu ile PG+L-KOL+NS grubu yeni oluşan kemik miktarı, osteoblast sayısı ve kapiller yoğunluk açısından karşılaştırıldıklarında, bu iki grup arasında anlamlı bir farkın görülmesi; *N. sativa* içeren kollajen membranın anti-bakteriyel etkisinden kaynaklandığını düşündürmektedir ($p=0,009$), ($p<0,001$) ($p=0,004$).

Mevcut çalışmamızın sonuçlarına göre yapılan cerrahi işlem sıçanlar tarafından iyi bir şekilde tolere edilmiş olup, iyileşme süresi boyunca herhangi bir komplikasyon meydana gelmemiştir. Cerrahi olarak oluşturulan *P. gingivalis* ile kontamine edilen KBD'lerinin iyileşmesinde *N. sativa* içeren kollajen membranın anti-bakteriyel etkisine bağlı olarak kemik iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction, *Biomaterials*. 2001; 22: 2581–2593.
2. Webb JCJ, Tricker J. A Review of Fracture Healing. *Current Orthopaedics*. 2000; 14: 457–463.
3. Bernard GW. Healing and repair of osseous defects. *Dent Clin North Am*. 1991; 35: 469–477.
4. Ezirganlı Ş, Polat S, Barış E, Tatar İ, Çelik HH. Comparative investigation of the effects of different materials used with a titanium barrier on new bone formation, *Clin Oral Implants Res*. 2013; 24(3): 312-319.
5. Ashammakhi N, Ferretti P. Topics in tissue engineering. Volume I (Electronic book), 2003: 1-46.
6. Erdoğan D, Hatipoğlu M, Görgün M, Ilgaz C. Genel Histoloji, Hatipoğlu Yayın Evi, Ankara; 1999: 107–117.
7. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevleri (Çeviri: Aytekin, Y, Solakoğlu, S.) İstanbul; 2006: 141–154.
8. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş, Palme Yayıncılık (Çeviri Ed.: Prof. Dr. Ramazan Demir), İstanbul; 2006: 118-140.
9. Park JB, Bronzino JD. Biomaterials: Principles and Applications, CRC Press, USA; 2002: 5-9.
10. Kalfas IH . Principles of bone healing, *Neurosurg Focus*. 2001; 10(4): 7-10.
11. Altay A. Düşük yoğunluklu, atımlı ultrasonun deney hayvanlarında kemik iyileşmesi üzerine etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelenmesi. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
12. Amsellem M, Masson JM, Negui B. Endotelon in the treatment of venolymphatic problems in premenstrual syndrome – multicenter study on 165 patients. *Tempo Med*. 1987; 282: 46–51.
13. Bancroft JD, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th ed. Newyork: Churchill Livingstone; 1996: 309-339.

14. Fındıkçioğlu, K. Trombositten zengin ve fakir plazmanın kritik boyutta kemik defekti iyileşmesine etkisi. Ankara, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, 2006.
15. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009; 19: 171–180.
16. Duthie RB, Kyle J, Karey LC. *Scientific Foundations of Surgery* 4th ed. Heinemann Medikal Books, Londra, 1989: 150-166.
17. Fawcett, D.W. and Jensch, R.P. *Bloom & Fawcett's Concise Histology*. Second Edition, Arnold, a member of the Hodder Headline Group, London; 2002.
18. Gartner LP, James LH. *Color Atlas of Histology*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2000.
19. Taşdemir OU. Rifamisin ile dekontamine edilen otojen blok kemiğın onley greft olarak kullanımının deneysel olarak incelenmesi. Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.
20. Lee WSS, Cowin SC. ed. *Integrated bone tissue physiology: 2nd ed. Anatomy and physiology*. Bone Mechanics Handbook. CRC press: Florida; 2001.
21. Junqueira LC, Carneiro J, O Kelley R. *Basic Histology by Luiz Carlos Junqueira (1998-09-26) Paperback use pre-formatted date that complies with legal requirement from media matrix – 1656*.
22. Martin RB, Burr DB. *Mechanical adaptation in structure, function and adaption of compact bone*, Raven press: New York; 1989.
23. Ballı, B. *Kemik dokusu, iyileşmesi ve iyileşmeyi etkileyen faktörler*. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, 2004.
24. Bölükbaşı N. *Alveol kemiği implant ilişkisi*. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Implantoloji Anabilim Dalı, 2004.
25. Kocaelli HA. *Korona stimülasyonunun ağız cerrahisi girişimlerinde iyileşme sürecinin etkisinin deneysel araştırılması*. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2000.
26. Leeson CR, Leeson, TS, Paparo AA. *Textbook of Histology*: Saunders; 1985.
27. Küçük, D. *Lokal ve sistemik olarak uygulanan alendronat sodyumun tavşanlarda mandibuler distraksiyon osteogenezisi üzerine etkilerinin deneysel incelenmesi*. Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.

28. Mescher A. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. Thirteenth Edition: McGraw- Hill Education: 2009.
29. Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. American Journal of Anatomy. 1988; 183: 1-44.
30. Jee WSS. Integrated bone tissue physiology: Anatomy and physiology. In: Cowin SC. ed. Bone Mechanics Handbook. 2nd ed. CRC Press: Florida; 2001.
31. Calmar EA, Vinci R. (2002). The anatomy and physiology of bone fracture and healing. Clinical Pediatric Emergency Medicine. 2002; 3: 85-93.
32. Ülgen, M. Anomaliler, Sefalometri, Etioloji, Büyüme ve Gelişim, Tanı. In: Yüz İskeletinin Büyüme ve Gelişimi. Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Yayınları: Ankara; 2010.
33. Alturfan AK, Akalın Y. Ortopedik Travmatoloji. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti: İstanbul; 2002 .
34. Kılıçoğlu SS. Mikroskopik Düzeyde Kırık İyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2002; 55: 143-150.
35. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of Histology. Elsevier: Saunders; 2007.
36. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. Orthopedic Clinics of North America. 2000; 31: 375-88.
37. Ham, A.W., Cormack, D.H. Histophysiology of cartilage bone and joints. Lippincott Company: J. B. Philadelphia and Toronto; 1979.
38. Frost H.M. The biology of the fracture healing and overview for clinicians part I. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1989; 248: 283-293.
39. McKinley TO, Bay BK. Trabecular bone strain changes associated with subchondral stiffening of the proximal tibia. Journal of Biomechanics. 2003; 36: 155-63.

40. Miller PD. Skeletal health and bone strength: DXA and beyond growth for the Journal of Clinical Densitometry. Journal of Clinical Densitometry. 2008; 11: 1-5.
41. Wraighte PJ, Howard PW. (2008). Femoral impaction bone allografting with an Exeter cemented collarless, polished, tapered stem in revision hip replacement: a mean follow-up of 10.5 years. Journal of Bone and Joint Surgery. 2008; 90: 1000-4.
42. Oral O. L-Dopa'nın (Allojenik greft uygulanan ve uygulanmayan) kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine olan etkilerinin deneysel araştırılması. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2000.
43. Yüceyaltırık M. Mine matriks proteini amelogeninin kemik yaralarına etkisinin sıçanlarda histopatolojik olarak araştırılması. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
44. Robert B, Bentli D, Bentli G. (1983). Mercer's Orthopaedic Surgery. 8th ed. Hodder Arnold Publication: London; 1983.
45. Petrovich YA, Podorozhnaya RP, Kichenko SM, Kozlova MV. Effects of selenium-containing compounds and their metabolism in intact rats and in animals with bone fractures. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2004; 137(1): 74 -77.
46. Kream BE, Petersen DN, Raisz LG. Cortisol enhances the anabolic effects of insulin-like growth factor I on collagen synthesis and procollagen Messenger ribonucleic acid levels in cultured 21 day fetal rat calvariae. Endocrinology. 1990; 126: 1576-1583.
47. Arpacı SE. Sıçanlarda diş çekimi sonrası uygulanan lokal hemostatik ajan ankaferdin doku iyileşmesi üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. İstanbul, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010.
48. Fonseca RJ, Walker RV. Oral and maxillofacial trauma. WB Saunders: Philadelphia; 1991.
49. Bozkaya S. Maksillofasiyal cerrahide kritik kemik boyut defekti kavramı. Ondokuz Mayıs Univ Dis Hekim Fak Derg. 2005; 6(1): 49-54.

50. Develiođlu K. Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Dergisi. 2003; 6(1).
51. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defects as an experimental model to test bone repair materials. J Craniofac Surg. 1990; 1: 60-8.
52. Kleinschmidt JC, Hollinger JO. Animal models in bone research. In Mutaz HB, Reddi AH, ed. Bone grafts & bone substitutes. WB Saunders Company: Philadelphia; 1992.
53. Duarte PM, Marues MR, Bezerra JP, Bastos MF. The effects of caffeine administration on the early stage of bone healing and bone density. A histometric study in rats. Archives of Oral Biology. 2009; 54: 717-722.
54. Melo LG, Nagata MJ, Bosco AF, Ribeiro LL, Leite CM. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. Clin Oral Implants Res. 2005; 16(6): 683-91.
55. Bernabe PF, Melo LG, Cintra LT, Gomes-Filho JE, Dezan E Jr, Nagata MJ. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. Clin Oral Implants Res. 2012; 23(3): 348-8.
56. Jablonski P, Goh BL, Maguire J, Glowoski I, Howden BO, Thomson NM, Stein AN. Apoptosis and the expression of genes of the Bcl-2 family and TGF-beta 1 in rat renal allografts transplanted after donor-specific blood transfusion. Transplant Proc. 2005; 37(1): 93-95.
57. Akal ÜK, Cambazoğlu M. Kistektomi, kronik enfeksiyon bölgelerinin küretajı ve apikal rezeksiyon operasyonları sonucunda oluşan kemik defektlerinde solventlerle dehidrate edilmiş spongiöz kemik çipslerinin kullanılması. A.Ü Diş Hek Fak Derg. 1995; 22(2): 103-108.
58. Den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patha P, Bakker FC, Haarman HJ. Healing of segmental bone defect with granuler porous hidroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. J Orthopaedic Res. 2003; 21(3): 521-8.

59. Güven O, Saraçoğlu U. Bir santral odontojenik fibroma vakasında otojen kemik grefti ve implant uygulanması: Vaka raporu. *T Klin Diş Hek Bil.* 2000; 6: 158-162.
60. Gomi K, Lowenberg B, Shapiro G, Davies JE. Resorption of sintered synthetic hidroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials.* 1993; 14(2): 91-6.
61. Tuskan C, Yaltırık M. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kemik defektlerinde kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. *C.Ü. Diş hekimliği Fakültesi Dergisi.* 1999; 2(2): 134-140.
62. Pompili A, Caroli F, Carpanese L, Caterino M, Raus L, Sestili G, Occhipinti E. Cranioplasty performed with a new osteoconductive, osteoinducing hidroxyapatite-derived material. *J Neurosurg.* 1998; 89: 236-242.
63. Tuskan C, Yaltırık M. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateryaller. *İ.Ü. Diş Hekimliği Fak.* 2002; 66.
64. Kenley AR, Yim K, Abrams J. Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharmaceutical Research.* 1993; 10(10): 1393-1401.
65. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Tissue engineering, applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chapter 5, Grafting materials in repair and restoration. Quintessence Publishing Co, Carol Stream: Illionis; 1999d.
66. Marchena JM, Block MS, Stover JD. Tibial bone harvesting under intravenous sedation: morbidity and patient experiences. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60: 1151-1154.
67. Oikarinen K, Kainulainen V, Kainulainen T. A method of harvesting corticocancellous bone chips for reconstructive maxillofacial surgery. *Int. J. Oral Maxillofac Surg.* 1997; 26: 103-105.
68. Raghoobar GM, Louwse C, Kalk WWI, Vissing A. Morbidity of chin bone harvesting. *Clin Oral Impl Res.* 2001; 12: 503-507.
69. Arpak B. Farklı porözitellerdeki Ni-Ti greft materyallerinin kemik iyileşmesine etkilerinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi. Ankara, Başkent Üniversitesi, 2009.
70. Tomak Y, Dabak N, Kökçü C, Gülman B, Karaismailoğlu TN, Andaç A. Allogreft kullanımı ve kemik bankası üzerinde deneyimlerimiz. *Acta Orthopaedica Traumatologica.* 2000; 34: 139-146.

71. Dalkız M, Özcan A, Yapar M, Gökay N, Yüncü M. Evaluation of the effects of different biomaterials on bone defects. *Implant Dent.* 2000; 9(3): 226-35.
72. Sezer B, Seçkin T, Yüçetürk AC, Ünal T, İlgenli T. Farklı iki tip kollagen membranın kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine etkisinin histomorfometrik olarak değerlendirilmesi. *Ege Dişhek. Fak. Derg.* 2003; 24: 119-127.
73. Yaltırık M, Tuskan C. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan biyomateryaller. İstanbul, İstanbul Üniversitesi, 2002.
74. Günsoy F. Yumuşak doku anatomi, patoloji ve rejeneratif tedavi yöntemleri. İzmir, Ege Üniversitesi, 2010.
75. Sanrı M. Cerrahi olarak oluşturulan kemik defektlerinde sığır kaynaklı anorganik kemik grefti ve kanama durdurucu bitki ekstresinin kombine kullanımının kemik rejenerasyonuna etkisi. Adana, Çukurova Üniversitesi, 2013.
76. Görmez U. Dental implant çevresinde cerrahi olarak oluşturulan kemik defektlerinde sığır kaynaklı laktoferrinin kemik rejenerasyonuna etkisi. Adana, Çukurova Üniversitesi, 2008.
77. Scantleburk TV. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1993; 64: 1129-37.
78. Garg A. Barrier membranes-materials review part 1. *Dental İmplantoloji.* 2011; 22: 11.
79. Yukna CN, Yukna RA. Multi-center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human class ii furcations. *J. Periodontol.* 1996; 67: 650-657.
80. Garg AK. Biology, harvesting, grafting for dental implants. Quintessence Publishing Co, Inc; Miami: 2004.
81. Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: Initial healing and long- term results. *J. Periodontol.* 1993; 64(11): 1157-1165.
82. Greenstein G, Caton JG. Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. *Periodontol.* 2000, 1: 36-45.

83. Hyder PR, Dowell P, Singh G, Dolby AE. Freeze- dried cross-linked bovine type I collagen: Analysis of properties. *J. Periodontol.* 1992; 63:182-186.
84. Zerrin MK. Diş hekimliğinde kullanılan greftler ve membranlar. İzmir, Ege Üniversitesi, 2007.
85. Kaya A. Yumuşak doku greftleri. İzmir, Ege Üniversitesi, 2000.
86. Blumenthal N, Steinberg J. The use of collagen membrane barriers in conjunction with combined demineralized bone-collagen gel implants in human infrabony defects. *Journal of Periodontology.* 1990; 61: 319-327.
87. Pruthi VK, Gelskey SC, Mirbod SM. Furcation therapy with bioabsorbable collagen membrane: A clinical trial. *Journal of Canadian Dental Association.* 2002; 68: 610-615.
88. Fields T. Guided bone degeneration: Focus on resorbable membranes. In: Baylor Oral Surgery Thursday Morning Conferance, 2001.
89. Keklik H. Rejeneratif periodontal tedavide kullanılan greft materyalleri. İzmir, Ege Üniversitesi, 2010.
90. Cafesse GR, Nasgleti CE. Comparison of bioabsorbable and non-bioabsorbable membranes histologic and histometric study in dogs. *J. Periodontal.* 1994; 65: 583-591.
91. Von Arx T, Hardt N, Wallkamm B. The TIME technique: a new method for localized alveolar ridge augmentation prior to placement of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 11: 387-94.
92. Zablotsky M, Meffert R, Gaudill R. Histological and clinical comparisons of guided tissue regeneration on dehiscid hydroxylapatite-coated and titanium endosseous implant surfaces. A pilot study. *Int J Oral Maxillofacial Implants.* 1991; 6: 294.
93. Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence Int.* 1996; 27: 401-8.
94. Jacinto RC, Gomes BPPA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza- Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *P. gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J.* 2006; 39: 62-70.

95. Aydın M. *Porphyromonas gingivalis*. Ed. Mısırlıgil CA. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Güneş Yayınevi; Ankara: 2004.
96. Baumgartner JC, Hutter JW, Siqueira JF. Endodontic Microbiology and Treatment of Infections. In: Cohen S, Hargreaves KM, ed. Pathways of the Pulp. 2nd ed. Mosby Elsevier; Canada: 2006.
97. Marsh P, Martin MV. Oral microbiology. 4th ed. Elsevier Science Ltd; Edinburgh: 2002.
98. Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus *Porphyromonas*. Int J Systemic Bacteriol. 1988; 3: 128-31.
99. Van Winkelhoff AJ, Von Steenberg TJM, Graaff J. The role of black pigmented *Bacteroides* in human oral infections. J Clin Periodontol. 1988; 15: 145-55.
100. Roças IN, Siqueira JF, Santos KRN, Coelho AMA. Red complex (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 91: 468-71.
101. Gomes BPF, Jacinto RC, Pinheiro ET, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 211-5.
102. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black pigmented bacteria with endodontic infections. J Endod. 1999; 25: 413-5.
103. Laine ML, Appelmeik BJ, Von Winkelhoff AJ. Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. J Dent Res. 1997; 76: 1840-4.
104. Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol: 1, University Press, Edinburgh: 1965.
105. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik. Ankara Üniversitesi Yayınları. 2004; 88: 199.
106. Bzaytop T. Türkiye’de bitkiler ile tedavi. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevi; İstanbul: 1999.

107. Al-Gaby AM. Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with nigella sativa (black cumin) cake protein. *Nahrung*; 1998; 42:290 – 4.
108. Gad AM, El-Dakhakni M, Hassan M. Studies on the chemical composition of Egyptian nigella sativa l. oil. *Planta Medica*. 1963; 11: 134 –138.
109. Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of Nigella sativa. *J Ethnopharmacol*. 2001; 76:45 – 8.
110. Selman UŞ. Nigella sativa l. (Ranunculaceae) bitkisi üzerinde farmakognozik araştırmalar. Mersin, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı, 2009.
111. Burtis M, Bucar F. Antioxidant activity of nigella sativa essential oil. *Phytotherapy Research*. 2000; 14: 323-328.
112. Worthen DR, Grosheh OA, Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity some crude and purified components of blackseed, nigella sativa l. *Anticancer Research*. 1998; 18: 1527-1532.
113. Houghton PJ, Zarka R, De La Heras B, Hoult JRS. Fixed oil of Nigella sativa and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*. 1995; 61: 33-36.
114. Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of nigella sativa on multiple antibiotics - resistant bacteria. *Acta Microbiologica Polonica*. 2000; 49: 641-649.
115. Salem ML, Hossain MS. In vivo acute depletion of CD8(+) T cells before murine cytomegalovirus infection upregulated innate antiviral activity of natural killer cells. *International Journal of Immunopharmacology*. 2000; 22: 707-718.
116. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of nigella sativa. *Phytother Res*. 2003; 17: 299-305.
117. Omar A, Ghosheh S, Abdulghani A, Houdi A, Crookscor PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (Nigella sativa L). *J Pharm Biomed Anal*. 1999; 19: 757-62.

118. Al-Jassir MS. Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chem.* 1992; 45: 239-42.
119. Bhatia IS, Bajaj KL. Tannins in black - plum (*Syzygium cumini* L.) seeds. *Biochem J.* 1972; 128: 56.
120. Chun H, Shin DH, Hong BS, Cho WD, Cho HY, Yang HC. Biochemical properties of polysaccharides from black pepper. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25: 1203-8.
121. Correa AD, Jokl L, Carlsson R. Amino acid composition of some *Amaranthus* sp. grain proteins and of its fractions. *Arch Latinoam Nutr.* 1986; 36: 466 -76.
122. Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *Int J Immunopharmacol.* 1999; 21: 283-95.
123. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of *nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79: 1-11.
124. Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z Naturforsch.* 2003; 58: 629-31.
125. Ramadan MF, Morsel JT. Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Nahrung.* 2002; 46: 240-4.
126. El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N. (2002) Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2: 1603-11.
127. Trang NT, Wanner MJ, Phuong le VN et al. Thymoquinone from *Eupatorium ayapora*. *Planta Med.* 1993; 59-99.
128. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine.* 2004;11(1): 56-64.
129. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol.* 2003; 22(1): 107-13.

130. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol.* 2004; 25(4): 857-66.
131. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(2): 160-9.
132. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(16): 7782-8.
133. Lefkowitz DL, Gelderman MP, Fuhrmann SR, Graham S, Starnes JD, Lefkowitz SS, Bollen A, Moguilevsky N. Neutrophilic myeloperoxidase-macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. *Clinical Immunology.* 1999; 91(2): 145-155. Lefkowitz DL, Gelderman MP, Fuhrmann SR, Graham S, Starnes JD, Lefkowitz SS, Bollen A, Moguilevsky N.
134. Yanaroğlu S. Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) biyolojik etkileri üzerine bir araştırma. Lefkoşe, Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.
135. Ayhan B. *Nigella sativa* L. bitkisi üzerine fitoterapötik çalışmalar. Ankara, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı Fitoterapi Programı, 2012.
136. 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(5): 431-436.
137. El-Dakhkhnya M, Madia NJ, Lemberb N, Ammon HPT. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 2002; 81(2): 161-164.
138. Chakrabarty A, Emerson Mr, LeVine SM. Hemeoxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Mult Scler.* 2003; 9: 4372-381.

139. Nieto N, Torres MI, Fernández MI et al. Experimental Ulcerative Colitis Impairs Antioxidant Defense System in Rat Intestine. *Digestive Diseases and Sciences*. 2000; 45(9): 1820-1827.
140. Campieri M, Gionchetti P, Belluzzi A, Brignola C, Tampieri M, Iannone P, Miglioli M, Barbara L. Optimum dosage of 5-aminosalicylic acid as rectal enemas in patients with active ulcerative colitis. *Gut* 1991; 32: 929-931.
141. Koch TR, Yuan LX, Stryker SJ et al. Total Antioxidant Capacity of Colon in Patients with Chronic Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2000; 45(9): 1814-1819.
142. Choudhary S, Keshavarzian A, Yong S et al. Novel antioxidants zolimid and AEOL11201 ameliorate colitis in rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 2001; 46(10): 2222-2230.
143. Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicology Letters*. 2003; 143(2): 133-143.
144. Reynolds RP, Rahija RJ, Schenkman DI, Richter CB. Experimental murine cytomegalovirus infection in severe combined immunodeficient mice. *Laboratory Animal Science*. 1993; 43(4): 291-295.
145. Moro1 D, Lloyd ML, Smith AL, Shellam GR, Lawson MA. Murine viruses in an island population of introduced house mice and endemic short-tailed mice in Western Australia. *Journal of Wildlife Diseases*. 1999; 35(2): 301-310.
146. Chitsulo L, Loverde P, Engels D. Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2: 12-3.
147. Aboul-Ela EI. Cytogenetic studies on *Nigella sativa* seeds extract and thymoquinone on mouse cells infected with schistosomiasis using karyotyping. *Mutat Res*. 2002; 516: 11-7.
148. Gharib B, Abdallahi OMS, Dessein H, De Reggi M. Development of eosinophil peroxidase activity and concomitant alteration of the antioxidant defenses in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Hepatology*. 1999; 30(4): 594-602.
149. Agarwal R, Kharya MD, Shrivastava R. Antimicrobial & anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol*. 1979;17(11): 1264-5.

150. Akhtar, M.S. and S. Rifaat. Field trial of *Saussurea lappa* roots against nematodes and *Nigella sativa* seeds against cestodes in children. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 1991; 41: 185-187.
151. Hanafy MSM, Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *Journal of Ethnopharmacology*. 1991; 34(2-3): 275-278.
152. Khana NA, Shina S, Chunga JW et al. Outer membrane protein A and cytotoxic necrotizing factor-1 use diverse signaling mechanisms for *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 2003; 35(1): 35-42.
153. El-Alfy TS, El-Fatary HM, Toama MA. (1975): Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Pharmazie*. 1975; 30: 109-111.
154. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany*. 2010; 76: 210-216.
155. Piras A. et al. Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. Extracted by supercritical carbondioxide. Elsevier. 2013; 46: 317-323.
156. Ahlatcı A et al. Investigation of the effect of *nigella sativa* on nitrosative stress in the brain tissue of rats exposed to ionising radiation. *Phytomedicine*. 2014; 21(5): 740-4
157. Güllü EB, Avcı G. Timokinon: *Nigella Sativa*'nın biyoaktif komponenti. *Kocatepe Vet J*. 2013; 6(1): 51-61.
158. Rchid H, Chevassus H, Nmila R et al. *Nigella sativa* seed extracts enhance glucose-induced insulin release from rat-isolated Langerhans islets. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2004; 18(5): 525-529.
159. Al-Hader A, Aqel M, Hasan Z. Hypoglycemic effects of the volatile oil of *nigella sativa* seeds. *Pharm Biol*. 1993; 31(2): 96-100.
160. Deresinski S. Infections in the diabetic patient: Strategies for the clinician. *Infect. Dis Rep*. 1995; 1: 1-12.

161. Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Takewaki T. Isulinotropic properties of *Nigella sativa* oil in Streptozotocin plus Nicotinamide diabetic hamster. *Research in Veterinary Science*. 2002; 73: 279-282.
162. Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. (2005) Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Vet Sci*. 2005; 79: 219-23.
163. Fararh KM, 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.
164. Gürdol F, Ademoğlu E. *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul; 2006.
165. El-Dakhakhny M. Studies on the Egyptian *Nigella sativa* L: IV. Some pharmacological properties of the seeds active principle in comparison to its dihydro compound and its polymer. *Arzneimittelforschung*. 1965; 15: 1227–1229.
166. Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, Al-Shabanah OA, Mostafa AA, ElKashef HA (2001). Thymoquinone induced relaxation of guinea pig isolated trachea. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*. 2001; 110(5-6): 333-345.
167. El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim M, Aly SM. Effects of *Nigella sativa* oil gastric secretion and ethanol-induced ulcer in rats. *J. Ethnopharmacol*. 2000; 72: 299-304.
168. El-Tahir KE, Ashour MM, Al-Harbi MM. The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. *Gen.Pharmacol*. 1993; 24: 1115-1122.
169. Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar KSA, Sheth KV, Al-Sedairy ST, et al. *Nigella sativa* effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity *Immunopharmacol*. 1995; 30: 147-55.
170. Tennekoon KH, Jeevathayaparan S, Kurukulasoorya AP, Karunanayake EH. Possible hepatotoxicity of *Nigella sativa* seeds and *Dregea volubilis* leaves. *J Ethnopharmacol*. 1991; 31: 283-9.
171. Mehmetoglu İ. *Klinik Biyokimya laboratuvarı El Kitabı*. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul; 2007.

172. 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.
173. Salim El, Fukushima S. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*. 2003; 45: 195-202.
174. Süt N. Klinik araştırmalarda örneklem sayısının belirlenmesi ve güç (power) analizi. *RAED Dergisi*. 2011; 3(1-2): 29-33.
175. Fıcaı A, Albu MG, Birsan M et al. Collagen hydrolysate based collagen/hydroxyapatite composite materials. *Journal of Molecular Structure*. 2013; 1037: 154-159.
176. Kütan E, Duygu-Çapa G, Özçakir-Tomruk C, et al. Efficacy of doxycycline release collagen membrane on surgically created and contaminated defects in rat tibiae: A histopathological and microbiological study. *Archives of Oral Biology*. 2016; 63: 15-21.
177. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, third edition, M27-A3.
178. Kalembe, D., and A. Kunicka, "Antibacterial and antifungal properties of essential oils", *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 10, pp. 813–829, 2003.
179. Aydın HM, Korkusuz P, Vargel I, Kiliç E, Güzel E, Çavuşoğlu T, Uçgan D, Piskin E. A 6-month in vivo study of polymer/mesenchymal stem cell constructs for cranial defects. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2011 26:207-221.
180. Bölgen N, Korkusuz P, Vargel I, et al. Stem cell suspension injected HEMA-lactatedextran cryogels for regeneration of critical sized bone defects. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2014; 42: 70-77.
181. Uğraş A, Güzel E, Korkusuz P et al. Glucosamine-sulfate on fracture healing. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2013; 19: 8-12.
182. Kara MI, Erciyas K, Altan AB, et al. Thymoquinone accelerates new bone formation in the rapid maxillary expansion procedure. *Archives of Oral Biology*. 2012; 57: 357-363.
183. Piskin E, Isoglu IA, Bolgen N et al. In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of

- cranial bone defects in the rat model. Journal of Biomedical Materials Research. Part A, 1137-51.
184. Çılbrır HÖ, Karaca İ, Sabuncuoğlu B, Akbay C. Demieralize kemik tozunun kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin deneysel olarak incelenmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi. 1999; 2(2):117-121
 185. Atay MH, Yılmaz FR. İki farklı kemik greftinin histopatolojik olarak incelenmesi. Dicle Tıp Dergisi. 2005; 32(4), 172-8.
 186. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res. 2002 Feb;(395): 81-98. Review.
 187. Boyne PJ. Restoration of osseous defects in maxillofacial causalities. J Am Dental Association 1969; 78 (4) : 767-76.
 188. Dahlin C, Andersson L, Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique: a controlled clinical study. Clin Oral Impl Res 1991; 2(4): 159-65.
 189. Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurstram K, Sundin Y. Osteopromotion: a soft tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. J Periodontol 1993; 64 (Supl.11): 1116-28.
 190. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998 Jun;85(6):638- 46.
 191. Mukadder Gün Holly Seed: Nigella Sativa (Çörek Otu). Some Knowledge Corresponding to Nigella Sativa's Therapy Ailment Lokman Hekim Journal of History of Medicine and Folk Medicine 2012 Vol 2, No1.
 192. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res*, 2003; 17: 299– 305.
 193. Burtis M, Bucar F. Antioxidant activity of nigella sativa essential oil. *Phytotherapy Research*. 2000; 14: 323-328.
 194. Ozdemir H, Isa MI, Erciyas K, Ozer H, Ay S. Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: a morphometric and histopathological study. J Periodontol Res. 2012; 47: 74-80.

195. Grewal BS, Keller B, Weinhold P, Dahners LE. Evaluating effects on deferoxamine in a rat tibia critical bone defect model. *Journal of Orthopedics* 2014; 11: 5-9.
196. Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Parizotto NA, Castro CA, Crovace MC, Rodrigues ACM. Porous bioactive scaffolds: Characterization and biological performance in a model of tibial bone defect in rats. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26: 74.
197. Miles JD, Weinhold P, Brimmo O, Dahners L. Rat tibial osteotomy model providing a range of normal to impaired healing. *J Orthop Res*. 2011; 29: 109-115.
198. Badalov E. Vasküler endotelial büyüme faktörünün erken dönem kemik dokusu iyileşmesi üzerindeki etkisinin deneysel sıçan modeli üzerinde histolojik ve histomorfometrik analizi. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014.
199. Bongio M, Van den Beucken JJ, Nejadnik MR et al. Subcutaneous tissue response and osteogenic performance of calcium phosphate nanoparticle-enriched hydrogels in the tibia medullary cavity of guinea pigs. *Acta Biomater*. 2013; 3: 5464-5474
200. Hosny M, Sharawy M: Osteoconduction in Young and Old Rats Using Demineralized Bone Powder Allografts. *J Oral Maxillofacial Surg*. 1985; 43: 925.
201. Irving JT, Le Bolt SA, Schneider EL: Ectopic Bone Formation and Aging. *Clin Orthop Relat Res*. 1981; 154: 249-253.
202. Schmid J, Wallkamm B, Hammerle CH, Gogolewski S, Lang NP. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res*. 1997; 8: 244-248.
203. Frota R, Da Silva-Júnior VA, Teixeira M, Sobral AP, Emanuel-Dias-de Oliveira e Silva, Da Silveira MM, Aragão-Neto AC. Histological evaluation of bone repair using β -tricalcium phosphate. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 1;16(2):e190-4.

204. Hollinger, J.O., ve ark., Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J Biomed Mater Res*, 1998. 43(4): p. 356-64.
205. Zegzula, H.D Buck DC, Brekke J, Wozney JM, Hollinger JO. Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Bone Joint Surg Am*, 1997. 79(12): p. 1778-90).
206. Calvert, J.W., L.E. Weiss, ve M.J. Sundine, New frontiers in bone tissue engineering. *Clin Plast Surg*, 2003. 30(4): p. 641-8.
207. Esteves JC, Jr Marcantonio E, Faloni APS et al. Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling-histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *Journal of Translation Medicine*. 2013; 11:221.
208. Pipi-Favaro E, Feitosa SM, Riberio DA et al. Comparative study of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci*. 2010; 25: 727-732.
209. Xu W, Ganz C, Weber U et al. Evaluation of injectable silica-embedded nanohydroxyapatite bone substitute in a rat tibia defect model. *International Journal of Nanomedicine*. 2011; 6: 1543-1552.
210. İşler SC, Demircan S, Çakarar S, Çebi Z, Keskin C, Soluk M, Yüzbaşıoğlu E. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper on early bone healing. *J Appl Oral Sci*. 2010; 18(4): 409-414.
211. Malmquist JP. Successful implant restoration with the use of barrier membranes. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57(9):1114-6.
212. Nevins M, Kirker-Head C, Wozney JA, Palmer R, Graham D. Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 1996; 16: 8-19.
213. Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. The influence of a biomaterial on the closure of a marginal hard tissue defect adjacent to implants. An experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res*. 2004; 15:285-92.

214. Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Jakob A. Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11(3): 230-241.
215. Miller N, Penaud J, Foliguet B, Membre H, Ambrosini P, Plombas M. Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes. A histomorphometric study in a rabbit model. *J Clin Periodontol.* 1996; 23(12): 1051-9.
216. Taga ML, Granjeiro JM, Cestari TM, Taga R. Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008; 23(3): 427-436.
217. Becker W, Schenk R, Higuchi K, Lekholm U, Becker BE. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10:143-154.
218. Hockers T, Abensur D, Valentini P, Legrand R, Hammerle CHF. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin Oral Impl Res.* 1999; 10:487-98.
219. Imbrunite AV, Todescan JH, Carvalho CV, Arana-Chavez VE. Healing of alveolar bone in resorbable and non-resorbable membrane-protected defects. A histologic pilot study in dogs. *Biomaterials.* 2002; 23:4079-86.
220. Cortellini P, Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *J Periodontol* 2000;22 (2000 Feb):104-32.
221. Fritz ME, Eke PI, Malmquist J, et al. Clinical and microbiological observations of early polytetrafluoroethylene membrane exposure in guided bone regeneration. Case reports in primates. *Journal of Periodontology* 1996, 67:245-249.
222. Want HL, Yuan K, Burgett F, et al. Adherence of oral microorganisms to guided tissue membranes: An in vitro study. *Journal of Periodontology* 1994, 65:211-218.

223. Ricci G, Rasperini G, Silvestri M, et al. In vitro permeability evaluation and colonization of membranes for periodontal regeneration by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontology* 1996, 67:490-496
224. Støre G., Eribe E.R.K., Olsen I.F:DNA–DNA hybridization demonstrates multiple bacteria in osteoradionecrosis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005; 34: 193–196.
225. Olsen I, Dahlen G. Salient virulence factors in anaerobic bacteria, with emphasis on their importance in endodontic infections. *Endodontic Topics* 2004; 9: 15-26.
226. Ito H. -O., Shuto T., Takada H., Koga T., Aida Y., Hirata M., Koga T., Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation in vitro *Archives of Oral Biology*, Volume 41, Issue 5, May 1996,Pages;439-444.
227. Hang CY, Lin SK, Kok SH, Chang SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 162-9.
228. Khan MA. Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn. *Inflammopharmacology*, 1999; 7(1): 15-35.
229. Hanafy MS, Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J. Ethnopharmacol*, 1991; 34: 275–278.
230. Aboul Ela MA, El-Shaer NS, Ghanem NB. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, 1991; 51(12), 993-994.
231. Sokmen A, Jones BM, Erturk M. The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 1999; 67: 79-86.
232. Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics- resistant bacteria. *Acta Microbiol. Pol.* 2000; 49(1): 63-74.
233. Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH. The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytother. Res.* 2003; 17: 183-186.

234. 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. *Int. Immunopharm.* 2006; 6: 1135-1142.
235. Hosseinzadeh H, Fazly Bazzaz BS, Haghi MM. Activity of Total Extracts and Essential oil of *Nigella Sativa* L. Seeds in Mice. *Pharmacolgyonline* 2007, 2: 429-435
236. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res*, 2003; 17: 299– 305.
237. El-Kamali HH, Ahmad AH, Mohammad AS, Yahia AAM, El-Tayeb I, Ali AA. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds etc. *Fitoterapia*. 1998; 69: 77-78.
238. Gençoğlan S. Ratlarda deneysel olarak oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerinde uygulanan sığır kaynaklı demineralize kemik greftinin kemik iyileşmesine olan etkisinin otojen, allojen ve sentetik greftlerle karşılaştırılmasının histomorfometrik olarak incelenmesi. Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ağız, Diş ve ene Cerrahisi Anabilim Dalı, 2014.
239. Al-Hijazi AY and Mohammed HSH Evaluation of the Effect of Nigella Sativa Oil and Powder on Socket Healing Process. *Journal of Natural Sciences Research*, 2013. 3(1):136-140
240. Al-Mutheffer. The percutaneous effect of black seed (*Nigella sativa*) oil as external topical treatment on bone healing in rabbits. *Al-Qadisiya Journal of Vet. Med.* 2014;13:146-154
241. Akhtar M, Maikiyo A, Khanam R, Mujeeb M, Aqil M and Najmi AK (2012). Ameliorating effects of two extracts of *Nigella sativa* in middle cerebral artery occluded rat. *J Pharm Bioallied Sci.* 4(1): 70-75.
242. Mutabagani A, El-Mehdy SAM. A study of the antiinflammatory activity of *Nigella sativa* and thymoquinone in rats. *Saudi Pharm J.* 1997;5:110–113.



**T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU
(YÜDHEK)**

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
06.05.2014	395	01.04.2014 Tarihli Yazı	Doç.Dr. Ceyda ÖZÇAKIR TOMRUK

“Deneysel olarak oluşturulan, kontamine edilmiş kritik boyuttaki kemik defektlerinde **Nigella Sativa’nın biyoaktif komponenti olan Timokinon’un kemik iyileşmesi üzerine etkileri**” adlı bilimsel çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1 Yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Raportör	Prof. Dr. Işıl Aksan KURNAZ	
Üye	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	
Üye	Prof. Dr. Başar ATALAY	
Üye	Yard.Doç.Dr.Soner DOĞAN	
Üye	Yard. Doç. Dr. Ediz DENİZ	
Üye	Doç. Dr. C. Narter YEŞİLDAĞLAR	KATILMADI
Üye	Sumru KİRAZCI	

ÖZGEÇMİŞ

Aysheh HAMOEİPOUR, 01.09.1987 yılında İran'nın Urumiye şehrinde doğmuştur. Eğitim hayatına İran'da başlayıp, 2011 yılında Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden mezun olup; aynı yıl Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başlamıştır. Aysheh HAMOEİPOUR daha sonra Türkiye Cumhuriyeti vatandaşlığına geçerek Ayşe YILMAZ ismini almıştır.