



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**NİGELLA SATIVA İLE DENTAL PULPA KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRESİNİN RAT TİBİA KEMİK
DEFEKTİ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

DT. ERSİN ÖZDEN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. BEYZA KAYA

2021-DİYARBAKIR

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

NİGELLA SATİVA İLE DENTAL PULPA KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRESİNİN RAT TİBİA KEMİK
DEFEKTİ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

DT. ERSİN ÖZDEN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. BEYZA KAYA

2021-DİYARBAKIR

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından DİŞ.20.012 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Başarımı borçlu olduğum ve yaşamım boyunca hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen saygıdeğer **annem ve babama**, bu süreçte beni motive eden sevgili eşim **Canan ÖZDEN** ve kızım **Defne ÖZDEN’e**

Uzmanlık eğitimim süresince her türlü desteği ile sürekli yanımda olan, engin bilgi ve birikiminden istifade ettiğim, tezimin yazımında büyük emekler sarf eden değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Beyza KAYA’ya**,

Güçlü karakteri ve profesyonel duruşu ile mesleki hayatımda kendime her zaman örnek olarak aldığım Dicle Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dekanı Sayın **Prof. Dr. Belgin GÜLSÜN’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 **Dr. Öğr. Üyesi Nedim GÜNEŞ’e**,

Ne zaman bir hasta danışmak istesem tüm yoğunluklarına rağmen bana her zaman vakit ayırmış olan, bilgisini ve tecrübelerini aktarmaktan çekinmeyen Sayın **Doç. Dr. Utku Nezih YILMAZ’a** ve **Prof Dr. Kamil Serkan AĞAÇAYAK’a**

Desteklerini her daim yanımda hissettiğim, zorlu yolları birbirimize tutunarak beraber yürüdüğümüz **Dt. Hatice DEMİRCAN AĞIN**, başta olmak üzere bölüm arkadaşlarıma,

Sonsuz teşekkür ederim.

İyi ki varsınız...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	X
KISALTMALAR	XI
ÖZET.....	XIV
SUMMARY	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik Dokusu	4
2.1.1. Kemik Matriksi	5
2.1.2. Kemik Hücrleri.....	5
2.1.3. Periosteum ve Endosteum	9
2.2. Kemik Tipleri	10
2.2.1. Primer (Birincil) Kemik Dokusu (Woven kemik)	10
2.2.2. Sekonder Kemik Dokusu	11
2.2.2.1. Spongioz (Kansellöz, Trabeküler) Kemik.....	11
2.2.2.2. Kompakt (Kortikal, Lameller) Kemik	12
2.3. Kemik Oluşumu ve Gelişimi.....	13

2.3.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu (Doğrudan Kemikleşme).....	13
2.3.2. Endokondral Kemikleşme.....	14
2.4. Kemik Dokusunun Büyüme Evreleri	16
2.4.1. Şekillenme (Modelling)	16
2.4.2. Yeniden Şekillenme (Remodelling).....	17
2.5. Kemik Dokusunun İyileşmesi	18
2.5.1. İnflamasyon Fazı.....	19
2.5.2. Granülasyon Dokusu Fazı	19
2.5.3. Kallus Fazı	20
2.5.4. Yeniden Yapılanma Fazı.....	20
2.6. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler	22
2.6.1. Lokal Faktörler.....	22
2.6.2. Genel Faktörler.....	23
2.6.3. Kırık İyileşmesinde Biyokimyasal Faktörler	26
2.7. NİGELLA SATİVA	26
2.7.1. N. Sativa'nın Kimyasal Özellikleri	27
2.7.2. N. Sativa'nın Farmasötik Etkileri	28
2.7.3. Anti-inflamatuvar Etkileri.....	28
2.7.4. Anti-mikrobiyal (Anti-bakteriyel) ve Anti-fungal etkileri.....	30
2.7.5. Analjezik Etkileri	31
2.7.6. Anti-oksidan Etkileri.....	32
2.7.7. Anti-diyabetik Etkileri	33

2.7.8. Anti-histaminik Etkileri	34
2.7.9. İmmün Sistem Üzerine Etkileri.....	34
2.8. N. Sativa'nın Potansiyel Toksisitesi	35
2.9. KÖK HÜCRELER.....	36
2.9.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	37
2.9.1.1. Farklılaşma Yetkinliğine Göre.....	37
2.9.1.2. Elde Edildikleri Döneme Göre.....	38
2.9.2. Dental Dokulardan İzole Edilen Yetişkin Kök Hücreler	39
2.9.2.1. Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPSCs).....	40
2.9.2.2. Apikal Papilla Kök Hücreleri (SCAPs).....	40
2.9.2.3. Periodontal Ligament Kök Hücreleri (PDLSCs)	41
2.9.2.4. Eksfoliyeye Olmuş İnsan Süt Dişi Kök Hücreleri (SHEDs)	42
2.9.2.5. Dental Folikül Kök Hücreleri (DFSCs)	42
2.9.2.6. Diş Germi Progenitor Hücreleri	43
2.9.3. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu.....	43
3. MATERYAL VE METOD.....	44
3.1. Nigella Sativa'nın Dozu, Hazırlanışı, Uygulanma Yolu.....	45
3.2. Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerinin Eldesi ve Uygulanma Yolu	45
3.3. Diş Çekim Yöntemi	46
3.4. Cerrahi Aşamalar.....	49
3.5. Tibia Kemiğinde Defekt Bölgesinin Oluşturulması.....	50

3.6. Tibia Doku Takibi.....	61
3.7. Hematoksilen-Eozin Boyama.....	61
3.8. İmmünohistokimyasal Boyama.....	61
3.9. İstatistiksel Yöntem.....	62
4. BULGULAR.....	63
4.1. Histopatolojik Bulgular.....	63
4.1.1. Dördüncü Hafta Histopatolojik Bulgular.....	63
4.1.1.1. Kontrol Grubu.....	63
4.1.1.2. Timokinon Grubu.....	64
4.1.1.3. Kök Hücre Grubu.....	65
4.1.1.4. Kök hücre + Timokinon Grubu.....	66
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	67
4.2.1. BMP-2.....	67
4.2.1.1. Kontrol Grubu.....	67
4.2.1.2. Timokinon Grubu.....	68
4.2.1.3. Kök hücre Grubu.....	69
4.2.1.4. Kök Hücre + Timokinon Grubu.....	70
4.2.2. BMP-4.....	71
4.2.2.1. Kontrol Grubu.....	71
4.2.2.2. Timokinon Grubu.....	72
4.2.2.3. Kök Hücre Grubu.....	73
4.2.2.4. Kök Hücre + Timokinon Grubu.....	74

4.3. İstatiksel Bulgular.....	74
4.3.1. Enflamasyon Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	76
4.3.2. Osteoklastik Aktivite Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	77
4.3.3. Osteoblast Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	78
4.3.4. Bağ Dokusu Oluşumu Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	79
4.3.5. Yeni Kemik Oluşumu Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	80
4.3.6. BMP-2 Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	81
4.3.7. BMP-4 Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması.....	82
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇ.....	96
7. KAYNAKLAR	98
8. ORJİNALLİK RAPORU	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kemik hücrelerinin ve diferansiyon yolaklarının şematik çizimi.....	6
Şekil 2.2. Periosteum ve endosteum.....	10
Şekil 2.3. Kansellöz kemiğin morfolojisi.....	12
Şekil 2.4. İntramembranöz kemikleşme.....	15
Şekil 2.5. Kemik remodelasyon döngüsü.....	21
Şekil 2.6. N. Sativa bitkisi.....	27
Şekil 2.7. N. Sativa tohumları.....	27
Şekil 2.8. N. Sativa'nın temel bileşenleri ve kimyasal görünümü.....	28
Şekil 3.1. Ketamin hidroklorür ve ksilazin hidroklorür.....	47
Şekil 3.2. Deney hayvanının steril örtüler ile örtülmesi.....	47
Şekil 3.3. Ameliyat ve diş çekimi için kullanılan steril aletler.....	48
Şekil 3.4. Sıçanların steril aletler ile dil ve yanağının ekarte edilmesi.....	48
Şekil 3.5. Alt sol 1. ve 2. büyük azı dişlerinin çekilmesinden sonra oluşan çekim yarası ve çekilmiş dişler.....	49
Şekil 3.6. Deneklerin genel anesteziinde kullanılan ilaçlar.....	49
Şekil 3.7. Sıçanların gözlerine oftalmik komplikasyonları önlemek amacıyla pomadın sürülmesi.....	50
Şekil 3.8. Sıçanların bacağına işlem için traşlanması.....	51
Şekil 3.9. İşlem öncesi sıçanların bacağına lokal anestezi yapılması.....	51

Şekil 3.10. İnsizyon hattının belirlenmesi.....	52
Şekil 3.11. 15 nolu bistüri ucuyla insizyon yapılması.....	52
Şekil 3.12. Kemiğin açığa çıkartılması.....	53
Şekil 3.13. Anguldruva ve ucundaki trefan frez ile defekt oluşturulması.....	54
Şekil 3.14. Defekt alanının sınırlarının belirlenmesi.....	54
Şekil 3.15. Kemiğin doku pensetiyle blok şeklinde çıkartılması.....	55
Şekil 3.16. Oluşturulan defektin görünümü.....	55
Şekil 3.17. Kontrol grubundaki açılan defektin görünümü.....	56
Şekil 3.18. Periost ve kasın sütüre edilmesi.....	57
Şekil 3.19. Periost ve kasın sütüre edilmiş görünümü.....	57
Şekil 3.20. Cildin sütüre edilmesi.....	58
Şekil 3.21. Sıçanların bacaklarına batikon uygulanması.....	59
Şekil 3.22. Sıçanlarda subkütan enjeksiyon uygulanması.....	59
Şekil 3.23. Tibianın kas bağlantılarından ayırma işlemi.....	60
Şekil 3.24. Diseke edilen tibianın görünümü.....	60
Şekil 4.1. Kontrol grubu histopatolojik görünümü.....	63
Şekil 4.2. Timokinon grubu histopatolojik görünümü.....	64
Şekil 4.3. Kök hücre grubu histopatolojik görünümü.....	65
Şekil 4.4. Kök hücre + Timokinon grubu histopatolojik görünümü.....	66

Şekil 4.5. BMP-2 / Kontrol grubu immünohistokimyasal bulgular.....	67
Şekil 4.6. BMP-2 / Timokinon grubu immünohistokimyasal bulgular.....	68
Şekil 4.7. BMP-2 / Kök hücre grubu immünohistokimyasal bulgular.....	69
Şekil 4.8. BMP-2 / Kök hücre+Timokinon grubu immünohistokimyasal bulgular...	70
Şekil 4.9. BMP-4 / Kontrol grubu immünohistokimyasal bulgular.....	71
Şekil 4.10. BMP-4 / Timokinon grubu immünohistokimyasal bulgular.....	72
Şekil 4.11. BMP-4 / Kök hücre grubu immünohistokimyasal bulgular.....	73
Şekil 4.12. BMP-4 / Kök hücre+Timokinon grubu immünohistokimyasal bulgular.	74
Şekil 4.13. Enflamasyon değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılık.....	76
Şekil 4.14. Osteoklastik aktivite değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılık..	77
Şekil 4.15. Osteoblast değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılık.....	78
Şekil 4.16. Bağ dokusu oluşumu değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılık.	79
Şekil 4.17. Yeni kemik oluşumu değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılık.	80
Şekil 4.18. BMP-2 değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılık.....	81
Şekil 4.19. BMP-4 değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılık.....	82

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Kruskal Wallis testi ortalama ve standart sapma değerleri.....	75
Tablo 4.2. Enflamasyon değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu.....	76
Tablo 4.3. Osteoklastik aktivite değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu.....	77
Tablo 4.4. Osteoblast değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu.....	78
Tablo 4.5. Bağ dokusu oluşumu değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu.....	79
Tablo 4.6. Yeni kemik oluşumu değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu.....	80
Tablo 4.7. BMP-2 değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu.....	81
Tablo 4.8. BMP-4 değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu.....	82
Tablo 4.9. Medyan ve %25- %75 değerlerini gösteren box plot grafiğinin tüm değişkenleri.....	83

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

LLLT	: Düşük Seviyeli Lazer Terapisi
BMP	: Kemik Morfogenetik Protein
DPSC	: Dental Pulpadan Elde Edilen Kök Hücreler
GAG	: Glikozaminoglikan
PTH	: Paratiroid Hormon
M-CSF	: Makrofaj-Koloni Stimulan Faktör
IL-6	: İnterlökin 6
IL-11	: İnterlökin 11
TNF	: Tümör Nekrotizan Faktör
TGF-β	: Büyüme Faktörü Dönüştürücü Beta
PGE2	: Prostaglandin E2
PGI2	: Prostosiklin I2
NO	: Nitrik Oksit
DKK-1	: Dickkopf WNT Sinyal Yolu İnhibitörü 1
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
PO4	: Fosfat
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
IGF	: İnsülin Büyüme Faktörü
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri

COX	: Siklooksigenaz
LO	: Lipooksigenaz
TQ	: Timokinon
Ig	: İmmünglobulin
OVA	: Ovalbümin
IFN-γ	: İnterferon Gama
ALT	: Alanin Aminotransferaz
ALP	: Alkalen Fosfataz
GGT	: Gamma Glutamil Transferaz
NS	: Nigella Sativa
OH	: Hidroksil
NO	: Azot Monoksit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
GSH	: Glutatyon
iNOS	: Nitrik Oksit Sentaz
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
LPS	: Lipopolisakkarit
SGPT	: Glutamik Piruvik Transaminaz
IP	: İntraperitonel
SCAP	: Apikal Papilla Kök Hücreleri
PDLSC	: Periodontal Ligament Kök Hücreleri

SHED	: Eksfoliye Olmuş İnsan Süt Dişı Kök Hücreleri
DFSC	: Dental Folikül Kök Hücreleri
TGPC	: Diş Germi Progenitör Hücreleri
FACS	: Floresan Aktif Hücre Sıralama
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
IM	: İntramüsküler
NSY	: Nigella Sativa Yağı
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
CCL₄	: Karbontetraklorür

ÖZET

NİGELLA SATİVA İLE DENTAL PULPA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRESİNİN RAT TİBİA KEMİK DEFEKTİ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ

Çene cerrahisindeki en büyük problemlerden biri kemik defektinin tamiridir. Kemik dokusu belirli bir büyüklükteki defektin üzerinde tam bir iyileşme sağlayamamaktadır. Bu boyut ortalama 7 mm olarak kabul edilir ve kritik boyut kemik defekti olarak adlandırılır. Bu boyutun üzerindeki defektlerde kemik dokusunun yapay kemik materyalleri ve biyolojik ajanlarla desteklenerek iyileşmesine yardım edilmektedir. Bu biyolojik ajanlar çeşitli vitaminlerden lazer ve ozon uygulamasına kadar geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Literatürde güncelliğini hiç kaybetmeden bu maddelere yenileri eklenmektedir. Biz bu çalışmamızda güncel ve yeni bir ajan olan Nigella Sativa'nın dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücresi ile birlikte kemik iyileşmesine olan etkinliğini saptamayı amaçladık.

Çalışmamızda 28 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar 4 gruba ayrıldı. Pozitif kontrol grubuna sadece tibia kemiği üzerinde trefin frezle defekt açılıp serum fizyolojik uygulanıp kapatıldı. 2. grupta tibia üzerinde trefin frezle defekt açıldı, daha sonra kapatıldı ve gavaj ile Nigella Sativa uygulandı. 3. grupta trefin frezle defekt açıldı ve daha sonra kapatıldı ve lokal olarak kök hücre verildi. 4. grupta ise trefin frezle defekt açıldı. Defekt kapatıldıktan sonra ratlara gavaj ile Nigella Sativa verildi ve defekt bölgesine lokal olarak kök hücre uygulandı. Hayvanların tamamı 4. hafta sonunda sakrifiye edilerek çıkarılan dokular fiksatif solüsyonu içinde histomorfolojik olarak incelemeye tabi tutuldu.

Çalışmamızın sonucunda ise sadece timokinon veya kök hücre tedavisinin defekt oluşturulması sonrası kemik gelişimini kısmen uyardığı ve yeni kemik trabeküllerinin gelişimini desteklediği izlendi. Defekt oluşturulduktan sonra kök hücre + timokinon tedavisinin sadece timokinon ya da sadece kök hücre tedavisine göre çok daha etkin olduğu, daha fazla kemik trabekül gelişimini indüklediği, matriks ve bağ doku oluşumuna katkı sağladığı ve kemik yapımında rol alan osteoblastların ve osteositlerin sayısını arttırdığı gözlemlendi.

Bu sonuçlara dayanarak kök hücre ve nigella sativanın kombine olarak uygulandığı defektlerde iyileşme açısından önem arzettiği kanısına varılmıştır. Ancak bu özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha ileri düzeyde araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Kemik defekti, nigella sativa, çörek otu, timokinon, mezenkimal kök hücre



SUMMARY

COMPERATIVE EFFECT OF NIGELLA SATIVA WITH DENTAL PULP MESENCHYMAL STEM CELL THERAPY ON HEALING OF RAT TIBIAL BONE DEFECT.

One of the biggest problems in jaw surgery is the repair of the bone defect. Bone tissue cannot provide fully heal over a defect of a certain size. This size is considered to be an average of 7 mm and is called the critical size bone defect. In defects over this size, bone tissue is supported by artificial bone materials and biological agents to help it heal. These biological agents have a wide variety from various vitamins to laser and ozone application. In the literature, new ones are added to these items without losing their timeliness. In this study, we aimed to determine the effectiveness of a current agent, Nigella Sativa, on bone healing together with dental pulp-derived mesenchymal stem cells.

In our study, 28 Sprague Dawley male rats were used. Rats were divided into 4 groups. In the positive control group, only the defect on the tibia bone was opened with a trephine bur, and saline was applied and then closed. In the second group, the defect was opened with a trephine bur on the tibia bone, then closed and Nigella sativa was applied by gavage. In the 3rd group, the defect was opened with a trephine bur, then closed and stem cells was given locally. In the 4th group, the defect was opened with a trephine bur. After the defect was closed, Nigella sativa was given to the rats by gavage and stem cells was applied locally to the defect area. All animals was sacrificed at the end of the 4th week and the removed tissues was subjected to histomorphological examination in fixative solution.

As a result of our study, it was observed that only thymoquinone or stem cell therapy partially stimulated bone growth and supported the development of new bone trabeculae after defect creation. After the defect was created, it was observed that stem cell + thymoquinone treatment was much more effective than only thymoquinone or only stem cell treatment, inducing more bone trabeculae development, contributing to matrix and connective tissue formation, and increasing the number of osteoblasts and osteocytes involved in bone formation.

Based on these results, it was concluded that the combined application of stem cells and nigella sativa is important in terms of healing in defects. However, further research is needed to better understand these features.

Key words: Bone defect, nigella sativa, black cumin, thymoquinone, mesenchymal stem cell



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Oral ve maksillofasiyal cerrahide, operasyon alanındaki iyileşme ve kemik oluşumu en fazla üstünde durulan konulardan biri olmuştur. Günümüzde kemik iyileşmesinde altın standart olarak kabul edilip kullanılan otojen greftlemedir. Fakat otojen greftin dezavantajlarından dolayı allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik materyaller de sıklıkla kullanılmaktadır (1).

Meydana gelen defektlerden sonra sert doku iyileşmesini hızlandırabilmek için elektriksel ve elektromanyetik tedavi, hiperbarik oksijen tedavisi, ultrason uygulaması ve düşük seviyeli lazer terapisi (LLLT) gibi tedaviler mekanik; lokal/sistemik medikanlar (kemik morfogenetik proteinleri [BMPs], büyüme faktörleri, hormonlar vb.) kimyasal metodlar olarak uygulanabilmektedir (2).

Son zamanlarda oldukça yaygınlaşan alternatif tedavi yöntemlerinden biri olan bitkisel tedaviler, diğer tedavi yöntemlerine alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bitkisel tedaviler iyileşme sağladığı ileri sürülen fakat etkileri bilimsel yöntemlerle ispatlanamayan, geleneksel ve güncel tıbbi yaklaşımlar olarak bilinen alternatif tedavi yöntemidir. Nigella Sativa bitkisel tedavi yöntemlerinde kullanılan ve şifalı bitkilerden biri olduğuna inanılan, hem gıda takviyesi hem de tedavi amaçlı kullanılan Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller) familyasından Nigella türüdür. İnsanlar arasında hem tedavi edici hem de besin olarak tohumlarından faydalanan Nigella Sativa ismini siyah görünümlü olan tohumlarından almıştır. Nigella Sativa'nın birçok tedavi edici etkilerinin olduğu son dönemlerde yapılan klinik ve deneysel çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bitki tohumlarında ciddi oranlarda sabit ve uçucu yağ ihtiva etmektedir. İçeriğinde bulunan bu sabit ve uçucu yağların sahip olduğu bileşenler hücre içerisinde güçlü anti-inflamatuvar, anti-kanserojen ve anti-mikrobiyal aktiviteye sebep olmaktadır (3).

Güncel bazı çalışmalarda Nigella Sativa'nın kemikle ilgili hastalıklarda, kemik metabolizmasında, kemik oluşumu ve kemik iyileşmesi üzerine olan olumlu etkileri bildirilmiştir. Femurda defekt oluşturulmuş hayvan modellerinde düzenli olarak verilen Nigella Sativa'nın fizyolojik yanıtları incelenmiş ve kemik iyileşmesinde faydalı olduğu tespit edilmiştir. Osteoblastik aktiviteyi arttırmasının yanı sıra

osteoklast sayısını da ciddi oranda düşürerek kemik iyileşmesini hızlandırmaktadır (4).

N. sativa kemik yapımından sorumlu hücreler olan osteoblastların çoğalmasını sağlayarak bu hücrelerin olgunlaşması için gerekli olan alkalen fosfataz (osteoblastlar için ilk belirteç), osteokalsin ve osteopontin (osteoblast farklılaşma aşaması belirteci) gibi genlerin salgılanmasını indükleyerek özümleyici etki yapar (5).

Kök hücreler, kendini yenileme kapasiteleri ve başka hücre tiplerine farklılaşabilme özellikleri ile ön plana çıkmaktadırlar. Vücutta kordon kanı, plasenta, kemik iliği, yağ dokusu gibi pek çok dokudan elde edilebildiği gibi dental kaynaklardan da temin edilebilmektedirler. Periodontal ligament, dental folikül, apikal papilla, süt dişi ve dental pulpadan kök hücre izolasyonu yapılabilmektedir. Kolay elde edilebilmeleri ve yüksek farklılaşma potansiyelleri dental kök hücre kaynaklarını ön plana çıkarmaktadır. Dental pulpadan elde edilen kök hücreler (DPSC) de hem yöntem olarak kolay elde edilebilirliği, hem de osteojenik farklılaşma kapasitesinin yeterli olduğu pek çok kez gösterilmiş olmasından dolayı önemli bir kaynak olarak görülmektedir (6).

Son yılların araştırılan tedavi yöntemlerinden olan, dental pulpa ve dental folikülden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kemik iyileşmesi üzerine etkileri, verici bölgede oluşan hastalıkların elimine edilmesi ve güçlü osteojenik etkileri nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilmiştir (7). Dental pulpadan elde edilen kök hücreler (DPSC) odontoblast, myosit, osteoblast, kondrosit, adiposit ve kornea epitel hücrelerine dönüşebildiği gösterilmiştir (8). Buna ek olarak son dönem çalışmalarda kemik iliği kök hücresiyle karşılaştırıldığında dental pulpa hücrelerinin daha fazla bölünme, nöral ve epitelyal hücrelere farklılaşma özelliği gösterdiği bildirilmiştir (9). DPSC'ler uygun indüksiyon ortamında mineralize doku oluşturma özellikleri sayesinde kemik rejenerasyonu hedeflenen çalışmalar için uygun bir kaynaktır (10).

Bu çalışmada, deneysel olarak rat tibialarında açılan kemik defektlerinde sistemik olarak uygulanan Nigella Sativa'nın etken maddesi olan timokinon ile lokal olarak uygulanan dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrenin osteogenezis

üzerine etkinliklerini immünohistokimyasal olarak karşılaştırmalı saptanması amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Yüksek oranda farklılaşmış bir bağ dokusu olan kemik yapısında fosfat kalsiyum gibi birçok iyonları barındıran ve gerektiğinde kana geçişini sağlayan, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin kan hücreleriyle ilişkisi ile de hematopoezde görev alan konnektif, dinamik ve canlı bir dokudur (11).

Ekstrasellüler matriksin mineralize olması kemiği diğer bağ dokularından ayıran en önemli özelliktir (12). Kalsifiye matriks esasen kondrotin sülfat, tip I kollajenin oluşturduğu demetlenmiş iplikli maddeler ve sülfatlanmış glikozaminoglikanların yan bağlarını barındıran zengin bir yapı içerir. Bunların yanında osteopontin, osteonektin ve gama-karboksiglutamik asit içeren protein gibi glikoproteinler ve kemik sialoproteinlerini de ihtiva eder (13).

Kemik en dış katmanda kompakt kemik veya kortikal kemikten meydana gelir, bu yapı mekanik destek sağlar ve lameller kemik formunda ince kollajen fibrillerden oluşur. Metabolik faaliyetlerden görevli olan spongiöz, kansellöz ya da trabeküler kemik ise merkezinde yer alır. Matriksi gevşek yapıdadır, bunun nedeni ise bu kısımda düzgün sıralanmış fibriller bulunmamasıdır. Üzerinde hematopoetik elemanları barındıran bu yapı makroskopik olarak kafes veya bal peteği görünümündedir (14). Periosteum, eklem içi sinoviyal yüzeyler hariç kemik dokusunu saran tabakadır. Periosteum osteoprogenitör hücreler içeren bir iç tabaka ve yoğun fibröz bir bağ dokusu içeren dış tabakadan meydana gelmiştir (15). Kemik kendi kendini yenileyebilen özelleşmiş bir dokudur. Yaşam boyunca istemli mekanik aktivitelere destek ve direnç sağlayan, dış etmenlerin meydana getirdiği fiziksel uyarılar doğrultusunda içeriğini, şeklini ve hacmini yönetebilen bir yapıya sahiptir (16). Bu işlevlerinin yanında, kaldıraçlarından oluşturduğu sistemlerle iskelet kasılmalarının meydana getirdiği kuvvetleri belirli oranda arttırarak fiziksel hareketlere çevirir (17).

2.1.1. Kemik Matriksi

İnorganik ve organik olarak ikiye ayrılır.

İnorganik Matriks

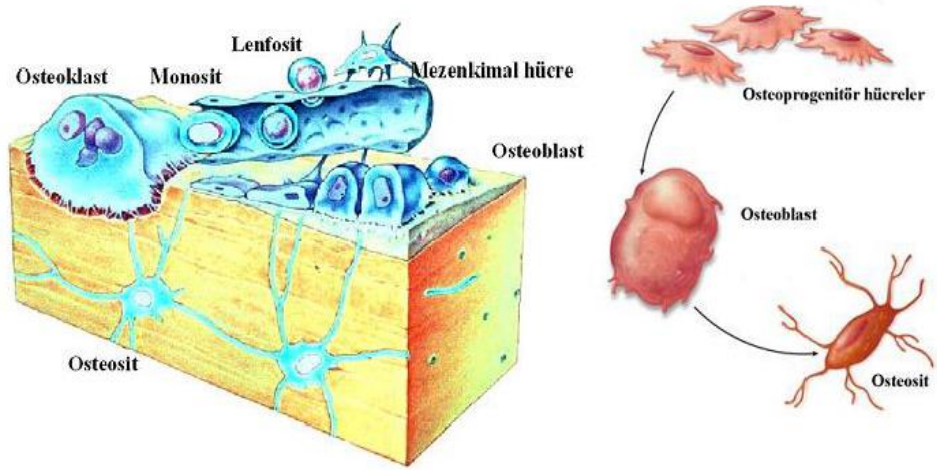
Kemik kuru ağırlığının %50- 65'ini oluşturur. Kalsiyum fosfat (%85) ve bikarbonat yanında sitrat, magnezyum florid, sodyum florid ve potasyum içerir. Kalsiyum ve fosfat esas olarak 'hidroksilapatit kristalleri' şeklinde bulunur. 40 nm uzunluk, 25 nm genişlik ve 1,5-3 nm kalınlıktaki hidroksilapatit kristalleri kollajen boşluklar arasında depolanırken, yüzey iyonları su (H₂O) ile birleşir ve iyon alışverişini gerçekleştirir (18). Kollajen ile birlikte, kollajen olmayan matriks proteinleri, hidroksiapatit birikimi için bir iskelet oluşturur ve bu tür bir ilişki, kemik dokusunun tipik sertliği ve direncinden sorumludur (19). Yaş ilerledikçe inorganik kısmın esnekliği azalarak kırılgan hale gelir (20).

Organik Matriks

Kemik kuru ağırlığının %35'ini oluşturur. Organik komponentin %90'ını tip I kollajen lifler yapar ve bunlar 67 nm aralıklarla yerleşmiş, 50-70 nm çapında çapraz bağlı liflerden oluşmuştur. Bunun yanında, kondrotin sülfat ve keratan sülfat gibi glikozaminoglikanları (GAG) içerir. Kemikteki glikoproteinler; hidroksilapatite bağlanan osteokalsin, osteoblast ve osteoklastların üzerindeki integrinler ve hidroksilapatite bağlanan osteopontinlerdir. Vitamin D, bu glikoproteinlerin sentezini artırır. Kemik sialoproteini ise, osteoblast ve osteoklastların üzerindeki integrinlere bağlanarak, bu hücrelerin kemik matriksine tutunmasını sağlar. Eğer organik komponent uzaklaştırılırsa, orijinal şekli korumakla beraber kemik çok kolay kırılabilir bir hale gelir (21).

2.1.2 Kemik Hücreleri

Kemik dokusunun temel hücreleri osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve mezenkimal osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır (22).



Şekil 2.1. Kemik hücrelerinin ve diferansiyasyon yollarının şematik çizimi (22). Osteoklastlar, kemik iliğinde bulunan ve makrofajın oluşumunda köken olan monositlerin birleşimiyle meydana gelir. Osteoprogenitör hücreler ise kemikte gerek duyulduğunda osteoblastlara, osteoblastlar da osteositlere dönüşebilir.

Osteoblast Hücreleri

Küboid yapıda hücrelerden meydana gelen osteoblastlar, kemik hücrelerinin toplamda %4-6'sını oluşturur. Kemik yüzeyinde bulunan ve kemiğin oluşumunda en önemli role sahip olan hücrelerdir (23).

Osteositler bazı osteoblastların yeni oluşmuş matriks tarafından sarılmasıyla oluşur. Bu kuşatma esnasında meydana gelen boşluklara laküna adı verilir. Lakünaların içerisinde osteositler uzantılarıyla beraber bulunur, bunlarla birlikte hareket eden az sayıda kalsifiye olmamış matriks de vardır. Osteoblastlar, alkalen fosfataz enzimi içermektedir. Hem kalsifikasyonda hem de matriks oluşumunda önemli bir rolü olan alkalen fosfataz enzimi fosfatı su ile parçalayarak lokal inorganik fosfat miktarını arttırıp bunun kalsiyum iyonlarıyla birleşmesini sağlar. Bu birleşmenin sonucu olarak kalsiyum tuzları şeklinde dokuya çökmesi gerçekleşir (24).

Matriks üretmeyi sonlandıran "yüzey" osteoblastları daha düz şekilli, suskun bir forma dönüşürler ve "bone-lining" hücreleri adını alırlar. Bu hücreler morfolojik olarak osteoprogenitör hücreler gibi görünmelerine rağmen, çoğalabilme yetenekleri

yoktur; sadece, uygun etkenlerle matriks oluşturan eski hallerine dönüşebilirler. Osteoblastlar, kemik iliğinde oluşmasını sağladığı osteoklastların PTH tarafından uyarılması gerektiğinde varlıkları gerekli olan hücreler olup, kemik döngüsünü yüzeyde bulunan hücreler ve osteositlerin de yer aldıkları osteoblastik hücreler, hormonlar, fiziksel yüklenme gibi diğer etmenlerin stimülasyonlarını algılayarak kontrol ederler (25).

Osteoklast Hücreleri

Kemikte destüriksiyonu veya kemik rezorbsiyonunu gerçekleştiren hücrelerdir. Bu işlevlerinden dolayı makrofaj türü hücre olarak kabul edilirler. 2-50 ye kadar değişen sayılarda çekirdekleri bulunan ve 20-100 µm arasında çaplara sahip iri hücrelerdir. Aktif fagositoz yapmamalarına rağmen, mononükleer fagositer sisteme dâhil edilmiş hücrelerdir. Osteoklastlar kemiği rezorbe etmek için kollegenaz ve diğer proteolitik enzimleri kullanırlar. Bu enzimlerle rezorbe edilen kemik dokusu uzantılarla hücre içine çekilmektedir. Kemikte Howship lakünası adı verilen boşlukta bulunan osteoklastlarda kemiğe bitişik yüzlerinde fırça kenarlı hücre uzantıları bulunur. Bu uzantılar hücre yüzeyinin genişletilmesinde rol oynarlar. Hormonlara karşı aşırı derecede tepki veren osteoklastlar kemiğin destrüksiyonu ve kemiğin şekillenmesinde önemli rol oynar. Bu süreç birbirine zıt olan osteoblast ve osteoklast hücrelerinin uyum içerisinde çalışması sonucu gerçekleşmektedir.

Kemik iliğinin stromal hücrelerinden salgılanan makrofaj-koloni stimülan faktör (M-CSF) ve interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-11 (IL-11) gibi sitokinler osteoklast farklılaşması için gereklidir. Buna ek olarak osteoklast hücre serisinin oluşumunda etkili olan sistemik faktörler arasında 1,25-dihidroksi vitamin D3, paratiroid hormon ve tümör nekrotizan faktör (TNF) sayılabilir (13,34). Osteoklastların fonksiyonları kemik liflerinin ve mineralize dokunun yıkımı ve rezorpsiyonunu içerir. Osteoklastlar bir monosit kök hücre soyundan türetildiği için, dolaşımdaki makrofajlara benzer fagositoz yeteneklerine sahiptir. Osteoklastlar olgunlaşır ve başka kemik yüzeylerine göç eder. İlgili bölgeye ulaştıklarında tartarat dirençli asit fosfataz gibi aktif enzimler mineral substratına karşı salgılanır (26).

Kemiğin mineral yapısı gerekli durumlarda osteoklastlar tarafından çözülerek kalsiyum açığa çıkarılır. Böylelikle kemikten kana kalsiyum geçişi sağlanır. Osteoklastların etkilerini azaltan hormonların başında östrojen ve kalsitonin gelirken, etkilerini arttıran hormonların ilk sırasında paratiroid ve tiroksin hormonları gelir. Ayrıca bifosfonatlar osteoklastların çalışmasını olumsuz etkilerken D vitamini ise aktivitelerini artırır. Östrojen ve TGF- β tarafından apoptoza sürüklenen osteoklastların yaşam süreleri 3-4 haftadır (27).

Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör hücreler, büyümenin tamamlanmasını takiben inaktif duruma geçen ancak kemik rahatsızlıklarında iyileşme sürecinde tekrar aktive olarak osteoblast ve osteoklastlara dönüşen, kemiğin embriyonik mezenkiminden köken alan, Havers ve Volkman kanallarındaki bağ dokusunda endosteum ve periosteumda bulunan hücrelerdir (28).

Mitozla bölünüp çoğalan hücrelerin bir bölümü kemik hücresi olma yönünde şartlanmış olup osteoblastlara dönüşen, yapı itibarıyla iğ şeklinde fibroblastlara benzeyen mezenkim hücreleridir. Kemik dokusunun yapı birimi olarak kabul edilen osteonların yıkımından sonra, yenilerini üretmek, kırık iyileşmesini takiben ya da yeni kemik dokusu modelleşirken aktif hale gelip bölünürler ve osteoblastları oluştururlar (29).

Osteosit Hücreler

Osteositler, matürasyonunu tamamlamış kemikte en fazla oranda bulunan, hücre dışındaki kalsiyum ve fosfor yoğunluğuna göre kalsitonin tarafından aktive edilen, paratiroid hormon tarafından inaktif hale gelen kemiğin mekanoreseptör hücreleridir (22). Matriks lamelleri arasındaki lakuna olarak adlandırılan boşluklarda yerleşmişlerdir ve her lakuna içinde yalnızca bir osteosit bulunur (11). Kanalikül içinde uzanan sitoplazmik uzantıları sayesinde beslenerek yaşamlarını sürdürürler. Ayrıca sitoplazmik uzantılar osteositlerin periosteumu döşeyen hücreler ve osteoblastlar ile bağlantı kurmasını da sağlamaktadır. Osteositlerin hemostatik mekanizmayı düzenlemek için kemiğin mineral yapısını çözerek kalsiyumun kemiklerden kana verilmesini sağlayan metabolik görevleri de vardır (12,25).

Kemik Yüzeyini Döşeyen Hücreler (Sınır Hücreleri)

Kemik yüzeyinde yassılaştırmış ve uzamış halde yer alan ve kemik yapımında herhangi bir rolü bulunmayan osteoblastlar, kemik yüzeyini döşeyen hücreler olarak adlandırılırlar (30). Bu hücreler ince ve düz nükleer bir profil sergiler; sitoplazması kemik yüzeyi boyunca uzanır ve granüllü endoplazmik retikulum, golgi cisimciğı gibi birkaç sitoplazmik organel gösterir. Kemik ve hücre dışı sıvı bölümü arasında bariyer oluşturdıkları ve kemikte rezorpsiyonun ya da yeni kemik oluşumunun nerede gerçekleşeceğini düzenleyen hücreler olduğı düşünülür (31).

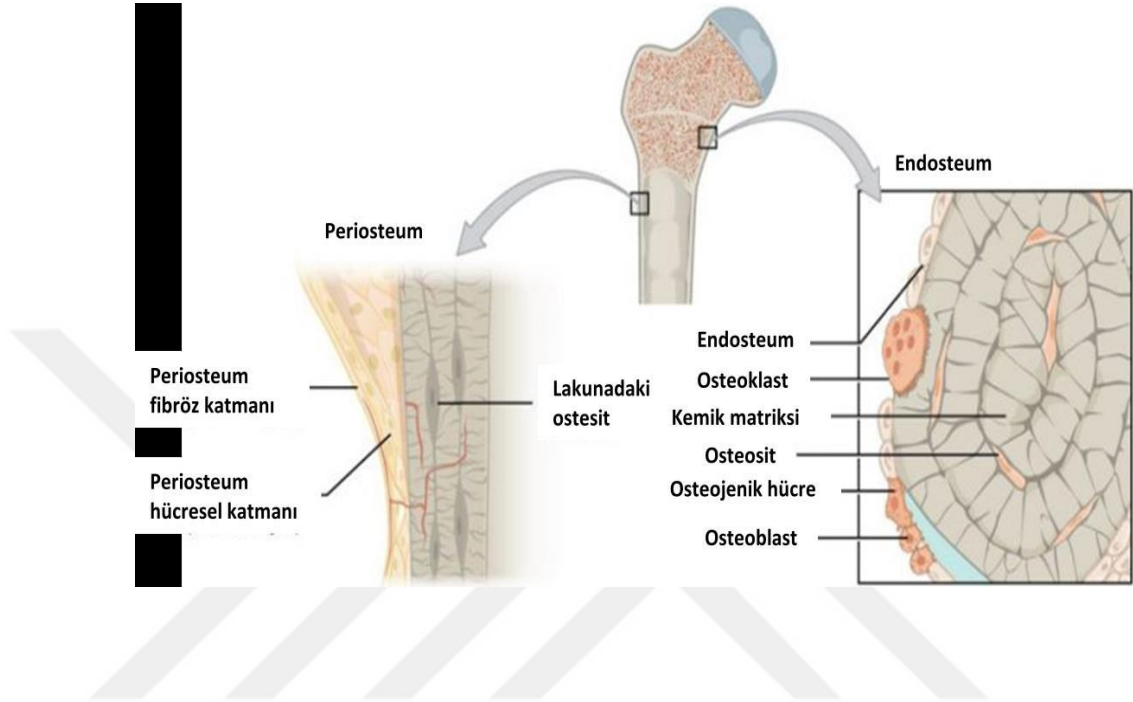
Kemik yüzeyinde aktif osteoblastlara dönüşmek için hazır bekleyen bu inaktif hücreler, hücre engeli oluşturarak kemik içine çevre sıvılardan giriş ve çıkış yapan kalsiyum ve fosfat gibi minerallerin dengesini sağlayarak uygun mikro ortamı koruyup kemik dokusunun büyüme ve gelişimini kontrol eder (30).

2.1.3 Periosteum ve Endosteum

Kemiğın iç katmanı endosteum, dış katmanları ise periosteum denilen bağ dokusu tabakaları ile kaplıdır (13). Periosteum, dıştan fibrötik, içten osteojenik katman olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Fibrötik katman kollajen lifler ve fibroblastik hücrelerden oluşmaktadır. Sharpey lifleri denen periosteal kollajen lifler, matriks içine girerek periostu kemiğe sıkıca bağlar. Osteojenik tabaka ise bölünerek farklılaşabilen ve aktif osteoblastlara dönüşebilme potansiyeline sahip düz hücrelerden (osteoprogenitör hücreler) oluşmaktadır. Ayrıca periosteum kıkırdak dokuda ve kıkırdak içeren eklem yüzeylerinde, tendonlarda ve kasların tutunduğı bölgelerde bulunmaz (14). Damardan zengin olan periost tabakası matür kemiklerde kemik dokusuna çok sıkı bir şekilde yapışmıştır. Periost zarından çıkan damarlar foramen nutrisyumdan geçip kemik dokusuna girer ve kemiğı besler. Periostun kemiğe bağlanması dış tabakadan ayrılan sharpey liflerinin kemik dokusuna girerek dış halka lamellerle yüzeye yakın bulunan ara lamellerin derinlerine kadar ulaşır ve periostu kemiğe sabitler (32).

Kemiğın, büyük iç ilik boşlukları endosteum ile kaplanmıştır. Endosteum, bu kavitelere entegre olan osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlar içeren bağ dokusunun çok ince bir katmanıdır. Endosteum bu nedenle periostdan oldukça

incedir. Bu hücreler kemik yapımı ve onarımı esnasında bölünerek osteoblastlara farklılaşır. Kemik dokusunun beslenmesi ve kemiğin onarımı veya büyümesi için sürekli olarak yeni osteoblastlar sağlanması, periost ve endosteumun temel görevleri arasındadır (33).



Şekil 2.2. Periosteum ve endosteum: Periosteum kemiğin dış yüzeyini oluşturur ve endosteum medüller boşluğu kaplar (33).

2.2. Kemik Tipleri

Kemik mikroskopik olarak incelendiğinde, primer (birincil) ve sekonder (ikincil) olmak üzere iki ayrı tipte kemik dokusu olduğu görülür. Primer (birincil) kemik embriyolojik gelişim sürecinde, kırık ve tamir olaylarında ilk meydana gelen kemik türüdür. Primer kemik kalıcı değildir ve erişkinlerde yerini sekonder (ikincil) kemik alır (34).

2.2.1. Primer (Birincil) Kemik Dokusu (Woven Kemik)

Primer (birincil) kemik dokusu, prenatal gelişme, büyümeyle beraber kemik iyileşmesi sırasında kan damarlarının yakınındaki osteoprogenitör hücreler tarafından üretilir. Üç yaşından sonra yerini lameller kemiğe bırakan birincil kemik, erişkinlerde kraniumdaki düz kemik eklemlerinde, diş alveollerinde ve tendonların

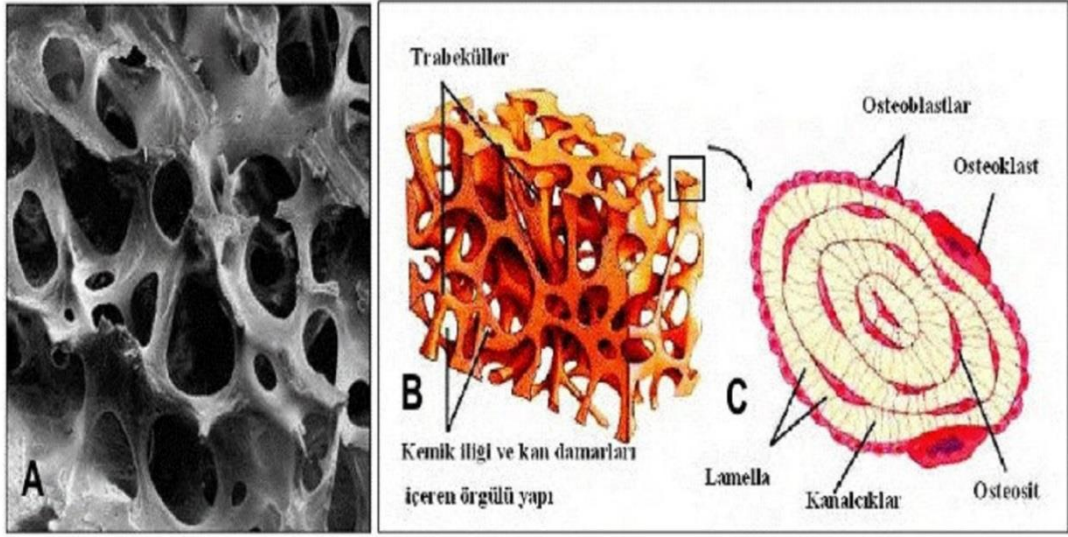
kemiğe yapıştığı alanlar gibi yerler haricinde geçici bir kemik yapısıdır (35). Primer kemik kollajen liflerinin düzensiz rastgele dizildiği, daha yüksek oranda osteosit içeriğine sahip, olgunlaşmamış kemiktir (26). Olgunlaşmamış kemik dokusu, nonlameller kemik (Woven, reticulated) olarak da adlandırılır. Primer kemik oldukça az mineral içerir ve mekanik direnci az olup, lameller kemiğe oranla daha kısa ömürlüdür (36).

2.2.2. Sekonder Kemik Dokusu

Sekonder kemikte, kollajen lifler ve diğer matris bileşenleri, Havers kanalları etrafında 3-7 mm kalınlığında lameller oluşturarak Havers sistemi ya da osteon olarak adlandırılan sistemi meydana getirirler (37). Havers sistemi diyafizin uzun eksenine paraleldir (26). Kemik yüzeyine dik olarak konumlanan diğer bir kanal sistemine ise ‘Volkmann Kanalları’ denir. Volkmann kanalları içindeki damarlar Havers kanalları içindekilerle bağlantılı olup kemiğin iç ve dış yüzeyi arasında bağlantı sağlar. Volkmann kanallarının etrafında Havers kanallarında olduğu gibi lameller yoktur. Osteositlerin yerleştiği lakunalar ya lameller arasında ya da lameller üzerinde bulunur (12). Sekonder kemik; kortikal (kompakt, sıkı) kemik ve kansellöz (spongiyöz, süngerimsi) kemik olmak üzere 2 şekilde görülür. İskeletin tamamının %80’i kansellöz kemik, %20’si kortikal kemiktir (38).

2.2.2.1. Spongiöz (Kansellöz, Trabeküler) Kemik

Spongiyöz kemikler; genel olarak uzun ve kısa kemiklerin metafiz ve epifiz bölgelerinde ve düz kemiklerin iç katmanlarında bulunan, yüksek trabeküllü yapıya sahip kemiklerdir. Trabeküller arasında da içleri kemik iliğiyle dolu olan düzensiz boşluklar bulunur. Bu tip kemiklerde Volkmann ve Havers kanalları bulunmaz (39). Bu kemik yapısı uzun ve kısa kemiklerin diafiz ve epifizleri arasında kalan metafiz ve kemiğin her iki ucunda buluna epifizlerin iç yüzeylerinde ve düz kemiklerinde iç katmanlarında bulunur. İnce kemik trabeküllerinin birleşmeleriyle oluşurlar. Trabeküller arası düzensiz boşlukları kemik iliği doldurur. Kemik hücreleri besin maddelerini stoplazma çıkıntıları aracılığıyla kan damarlarından zengin olan kemik iliğinden alırlar (40). Spongiöz kemik, kemiğin metabolik faaliyetlerini düzenler. Bu, kemik gelişme periyodunda oluşan ilk kemiktir (41).



Şekil 2.3. Kansellöz kemiğin morfolojisi. A: Kansellöz kemiğin gevşek trabeküler yapısının görünümü. B: Kansellöz kemiğin trabeküler yapısının ve kemik iliği ile kan damarı içeren örgülü yapının şematik görünümü. C: Kansellöz kemik haversian sistem içermez (13).

2.2.2.2. Kompakt (Kortikal, Lameller) Kemik

Kompakt ve lameller kemik olarak bilinmektedir. Mikroskop altında bakıldığında kanalcıklı bir yapıya sahiptir ve yetişkin iskeletin %80'ine yakını meydana getirir (42). Kemikte taşıyıcı rolünün yanı sıra sert ve yoğun yapısı sayesinde savunma fonksiyonunu da sağlar. Düz kemiklerin her iki yüzeyinde, uzun kemiklerin ise sadece dış katmanlarında bulunan kompakt kemik dokusu, birbiri içerisine geçmiş halkalar şeklinde pozisyonlanan matriks katmanları içerir. Bunlara lamel adı verilir. Yaklaşık olarak 50 nanometre (nm) çapındaki havers kanallarının etrafında ve diafize paralel seyredecek şekilde dizilmiş olarak pozisyonlanmışlardır. Havers kanalları ile kompakt kemiğe eğimli bir şekilde nüfuz eden Volkman kanallarıyla oluşturdukları birleşmeler neticesinde oluşan metabolik alışveriş, çözünerek sinyal oluşturan hormonlar için vasküler lenfatik kanalları meydana getirir (43,44).

Osteonların sık dizilimi, kompakt kemiğin mekanik gücünü belirler. Bu kemik balpeteği görümlü hematopoetik elemanlar içeren ağ ve kemik trabeküllerden oluşur. Trabeküller, kortekse dik açı ile konumlandıklarından dışarıdan gelen fiziksel

yüklenmeye karşı yapısal olarak koyma gücü sağlarlar. Trabeküler kemik internal endosteal katmanda, devamlı olarak yeniden yapılanma oluşturmaktadır (45,46).

2.3. Kemik Oluşumu ve Gelişimi

Ossifikasyon ya da osteogenesis, osteoblast adı verilen hücreler tarafından yeni kemiğin oluşum sürecidir. Bu hücreler ve kemik matriksi, kemiğin oluşmasında rol oynayan en önemli iki unsurdur (32). Kıkırdak dokunun yeni kemik dokusuyla düzenli olarak yer değiştirmesi nedeniyle kemikler boyca uzama gösterirler. Periost zarından meydana gelen osteoblastlar sayesinde ise kemiğin genişlemesi ya da enine büyümesi gerçekleşir (47). Kemik oluşumu intramembranöz ve endokondral olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir (12). İntramembranöz kemikleşmede mezenkimal doku doğrudan kemiğe dönüşerek kafatası, klavikula ve kraniyal kemikleri oluşturur. Endokondral kemikleşme ise mezenşimal doku ile başlar; oluşan kıkırdak doku, kemik dokuya dönüşür, uzun kemikleri ve aksiyal iskeletin kalanını oluşturur (48).

Bu iki kemik şeklinin farkı endokondral kemikleşmede daha önceden oluşmuş kıkırdak bir modelin bulunmasıdır. Her iki kemikleşme türünde meydana gelen ilk kemik birincil kemiktir ve daha sonra yerini ikincil ya da lameller kemiğe bırakır (12). Kemik olgunlaşması sırasında, birincil kemik sahaları, sekonder kemik bölgeleri ve rezorbsiyon bölgeleri beraber görülürler. Bu kemik oluşum süreci ve yeniden şekillenme, matürleşmeye devam eden kemiklerle beraber erişkinlerde de ömür boyu devam eder. Fakat erişkinlerdeki değişim hızı oldukça yavaştır (24).

2.3.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu (Doğrudan Kemikleşme)

İntramembranöz kemikleşme veya diğer adıyla doğrudan kemikleşme, bağ dokusu sayesinde meydana gelir (49). Yaklaşık olarak intrauterin hayatın 8. haftasında başlar. Mezenkim hücreleri belirli alanlarda bir araya gelerek gruplar yaparlar. Mezenkim dokusu içinde hücrelerin yoğunlaşarak oluşturduğu alanlar membrana benzetildiği için bu tür kemikleşmeye intramembranöz kemikleşme denir (13).

Mezenkim hücreleri öncelikli olarak seri bölünmeye uğrarlar ve osteoprogenitör hücrelere dönüşürler. Daha sonra da osteoblastlara dönüşerek osteoid dokunun kollajen ve diğer matriks proteinlerini salgılamaya başlar. Birbirinden ayrı çok sayıda kemikleşme merkezlerindeki mezenkim hücreleri osteoblastları oluşturmaya devam

eder (12,26). Kalsifikasyonun sağlanması için osteoblastların sentezlediği alkalen fosfataz sayesinde kalsiyum ve fosfat iyonları kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşür (35).

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 ışınal 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 (50). Daha sonra spongiyöz kemiklerin bazıları kompakt kemiğe dönüşür. Trabeküllerin arasında kalan mezenkim dokusundan da kemik iliği gelişir. İntramembranöz kemikleşme yassı kemiklerde gözlenmekte olup; frontal, parietal, oksipital, temporal, mandibula ve maksilla gibi bazı kraniyofasiyal kemiklerde ve klavikuların lateral kısımlarında görülür (26).

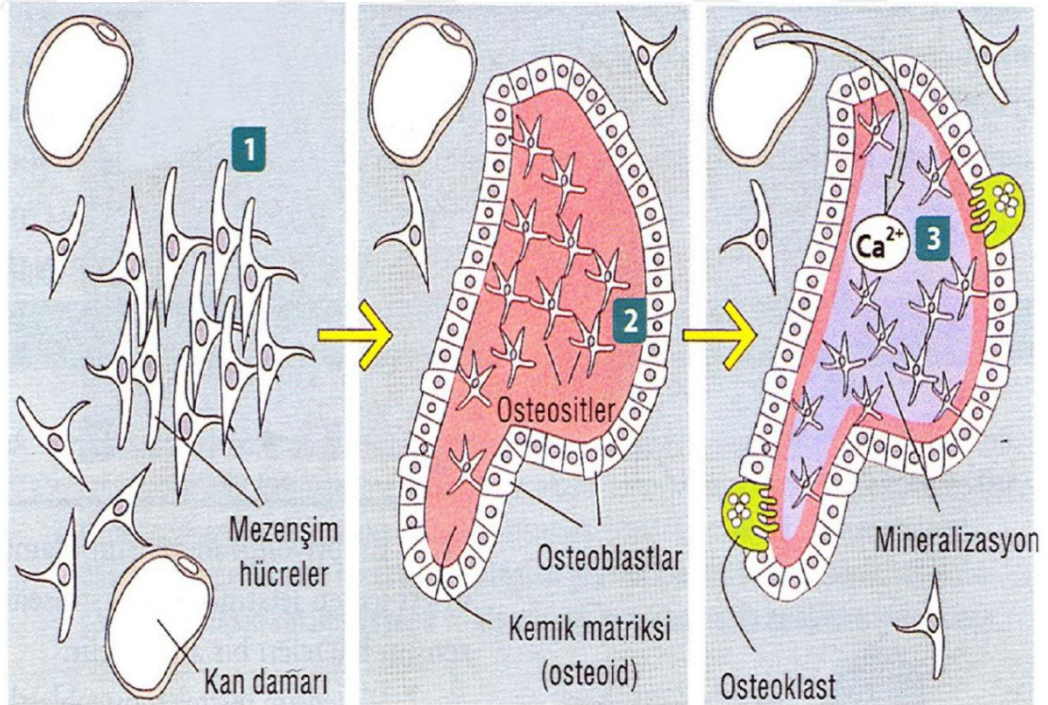
2.3.2. Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşme embriyonik dönemden itibaren başlayıp doğum sonrası gelişim tamamlanıncaya dek süregelen, öncesinde kıkırdaktan olgunlaşan iskeletin kemik dokuya dönüşmesiyle karakterize bir kemik oluşumudur (51). Klavikula dışında kalan uzun kemiklerin, kafa tabanı, omurga ve kalça kemiklerinin kemikleşmesi bu yolu takip ederek meydana gelir. Uzun kemiklerin olgunlaşmasından ve son şeklini almasından önce mezenkimal dokudan hyalin kıkırdak formunda ufak bir taslağı oluşur. Bu kıkırdak taslak perikondriumun alt kısmındaki fibroblastların matriks maddelerini sentezlemesi ve salgılamasıyla hücrelerin birbirinden uzaklaşması sonucu oluşan büyüme yoluyla daha uzun bir şekil alır (51,52).

Kıkırdaki çevreleyen perikondrium, kemiği çevreleyen periosteuma dönüşür. Periosteumdan kaynaklanan osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşerek kemiği sentezlemeye başlarlar. Böylece kıkırdak modelin çevresinde bir kemik tabakası yapılır ve hemen sonra kıkırdığın iç ve orta bölümlerindeki kondrositler kalsifikasyona bağlı olarak ölürler. Kalsifiye matriksin parçalanması sonucu oluşan

boşluklar birleşerek kemik materyalin birikmesi için yapısal bir kafes oluştururlar. Osteoprogenitör hücreler ve kan damarları, dejenere olan kıkırdak matriks içine girerler ve gelişmekte olan kemikte bir ossifikasyon (kemikleşme) merkezi oluştururlar. Kemikleşme merkezi ilk defa uzun kemiklerin diyafizinde görülür ve buraya primer kemikleşme merkezi denir (53).

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. Daha geç dönemde epifizde ortaya çıkan kemikleşme merkezine sekonder kemikleşme merkezi denir. 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 (49). Büyüme ve gelişimin tamamlanmasıyla hormonlar daha çok kıkırdak oluşumunu engelleyerek büyüme plaklarının kemikleşmesini ve diyafizler ile epifizlerin birleşmesini sağlarlar.



Şekil 2.4. İntramembranöz kemikleşme. (1) Mezenkimal hücrelerin kan damarları etrafında kümeleşmesi. (2) Mezenkim hücrelerinin osteoblastlara

dönüşmesi ve kemik matriksinin şekillenmesi. (3) Kapillerden osteoid dokuya kalsiyum ve fosfat iyonları taşınması ile kalsifikasyonun sağlanması (13).

2.4. Kemik Dokusunun Büyüme Evreleri

2.4.1. Şekillenme (Modelling)

Kemik dokusunun büyüme ve şekillenmesi ard arda meydana gelen olaylardır. Büyümeyi kontrol altında tutan yerel faktörler aynı zamanda buna paralel olarak uygun kemik remodellingi de başlatır (54,55). Kemiğin şekillenmesi yüzeyde yapım ve yıkım olaylarının birbirlerini takip etmesiyle oluşur. Bu olayların sonucunda yüzeye yeni kemik dokusu ilave edilmesi veya mevcut kemik dokusunun eksilmesi gerçekleşir. Kemikte büyüme aşamasında periosteal yapım endosteal yıkıma oranla daha fazladır (54).

Remodelling kemiklerin anatomik özelliklerini, dirençlerini, şekillerini ve büyüme hızlarını belirler. Aynı zamanda modelling ile kortikal tabaka kalınlığı artırılarak ve kemik iliğinin yer aldığı boşluğun çapı genişletilerek uzun kemiklerin uç kısımları şekillendirilmiş olur. Kafatası konturlarının değişip gelişmesinden de kemiğin şekillenme olayı sorumludur (55).

2.4.2. Yeniden Şekillenme (Remodelling)

Kemik remodelling süreci, yeniden şekillendirilmesi gereken kemik boşlukları içerisinde gerçekleşir. Bu boşluklarda, temel çok hücreli birimler olarak adlandırılan geçici anatomik yapıların oluşumu vardır. Bu yapılar; osteoklast, kan damarları ve osteoblastları içerir (56). Kemik remodelling döngüsü, osteoklastlar tarafından oluşturulan kemik rezorbsiyonu ile başlayan bir başlangıç fazıyla başlar, bunu osteoblastlar tarafından bir kemik oluşumu aşaması izler ve bu iki faz arasında bir geçiş fazı vardır. Döngü osteositlerin ve sınır hücrelerinin koordineli eylemleriyle tamamlanır (57,58).

Osteoklastlar ve osteoblastların yanı sıra, kemik remodeling döngüsü sırasında osteositlerin kilit rol oynadığı gösterilmiştir (59). Osteositler, kemik remodelling sürecinde orkestra şefleri gibi hareket ederler, osteoblast ve osteoklast aktivitelerini etkileyen faktörler oluştururlar. Mekanik etkiler osteositi uyarırken, prostaglandin E2

(PGE2), prostasiklin (PGI2) ve nitrik oksit (NO)(72-75) gibi kemik üzerinde anabolik etki yapan faktörler üretilir (60). Kemik remodelling süreci, yeniden şekillendirilmesi gereken kemik boşlukları içerisinde gerçekleşir. Bu boşluklarda, temel çok hücreli birimler olarak adlandırılan geçici anatomik yapıların oluşumu vardır. Bu yapılar; osteoklast, kan damarları ve osteoblastları içerir (56). Kemik yeniden şekillendirme kompartmanının kemik yüzeyi üzerindeki sınır hücrelerine bağlı olduğu görülmekte olup kemik matriksinin içerisine yerleştirilmiş osteositler ile iletişim halindedir (61). Normal koşullarda yıkılan kemik miktarı ölçüsünde kemik sentezi yapılır. Yetişkin bir bireyde kortikal kemiğin yenilenme hızı (turnoveri) 20 yıl iken, spongios kemiğin 1-4 yıl kadardır. Kemik dokuda meydana gelen bu sürekli yenilenme iskeletsel dayanıklılığa, kemikte oluşan hasarlarda onarıma, kan hücrelerinin imal edilmesinin devamlılığına ve kalsiyum metabolizmasının regülasyonunda etkin rol oynar (54).

Mekanik etkiler osteositi uyarırken, prostaglandin E2 (PGE2), prostasiklin (PGI2) ve nitrik oksit (NO)(72-75) gibi kemik üzerinde anabolik etki yapan faktörler üretilir. Ayrıca mekanik etkinin azalması anabolik faktörleri azaltır ve osteosit aktivitesini inhibe eden sklerostin, Dickkopf WNT sinyal yolu inhibitörü 1 (DKK-1)'i ve lokal osteoklastogenezi uyarıcı spesifik faktörleri üretmek için osteositleri uyarır (62).

2.5. Kemik Dokusunun İyileşmesi

Kemik iyileşmesi yaralanmanın hemen ardından orijinal iskeletsel yapı ve fonksiyonu oluşturmak için birbirine bağlantılı hücreler, humoral 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. 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 (63).

Kemik dokusunda bir hasar olduğu durumda, etrafındaki yumuşak dokuda ve kemik içinde hemoraji meydana gelir. Defekt alanı kan ile dolar ve bu kanın

pıhtılaşması ile kemik iyileşmesi başlar (20). Kan damarları kemiğin periostundan başlayarak ilerleyip çevredeki bağ doku ile birlikte ilgili defekt alanına girer. Böylece bölge damarsal ve hücrel yönden zengin granülasyon dokusu ile dolar. Zamanla bu granülasyon dokusunun bağ dokusu öncülleriyle yer değiştirmesi sonucu yeni kemik dokusu oluşumu başlar. Oluşan yeni kemik, modelasyon ve remodelasyon aşamalarından geçerek kemik iliğine ve lameller formdaki kemiğe dönüşür. Kemik yapıdaki depozisyon, rezorpsiyon ve remodelling süreçleri kemik dokusunun iyileşme sürecini kolaylaştırır (64).

Kemiklerde meydana gelen kırıklar 2 yolla iyileşir: Birincil (primer) kırık iyileşmesi, rijit internal fiksasyondan sonra görülen iyileşme tipidir. Belirli bir dış kallus oluşmaz. Sadece iç kallusla devam eden temas iyileşmesidir. Radyolojik olarak kallus görülmez. Kırıkta süreç olmadığından dolayı intramembranöz kemikleşmeye benzer. Kırık ameliyatsız tedavi edilirse sekonder kırık iyileşmesi görülür. Doğal iyileşme şekli budur. Radyolojik olarak kallus görülür. Cruess ve Dumont' a göre sekonder kırık iyileşmesinin 4 safhası vardır (63). Bunlar sırasıyla;

- İnflamasyon fazı
- Granülasyon dokusu fazı
- Kallus fazı
- Remodelasyon fazı

2.5.1 İnflamasyon Fazı

Bir kemik hasarı spesifik olarak bölgesel yumuşak doku bütünlüğünün deformasyonu ile alakalıdır, bu da ilgili bölgede kanamaya ve kanama sonucu olarakta hematoma gelişimine sebep olur. Yara iyileşmesinin ilk safhası çok tipik değildir ve inflamatuvar ajanların regülasyonu ile karakterizedir. Enfeksiyonu önlemek için doku hasarının meydana geldiği alanda, inflamatuvar hücreler, trombositler ve makrofajlar kümelenir. Büyüme faktörleri ve sitokinler salgılanmaya başlar, fibrinöz trombus içinde pıhtı oluşur. Zamanla endotel hücreleri pıhtı içinde ilerleyerek yeni kılcal damarlar meydana getirir ve granülasyon dokusu şeklini alır. Dev hücreler, makrofajlar ve diğer fagositoz yapan hücreler bütünlüğü bozulmuş

hücreleri ve diğer artıkları temizler. Bu hücresel cevap, belirli sitokin ve büyüme faktörünün ortama salınması ile kontrol edilir. Bir inflamasyon durumunda hücreler ve moleküllerin yanında biyomekanik özellikleri ve spesifik geometrik şekli olan ESM (ekstrasellüler matriks)'yi de kapsayan son derece karmaşık bir süreçten meydana gelir (65,66).

2.5.2. Granülasyon Dokusu Fazı

Bölgesel uyarıcılara reaksiyon gösteren ilk hücreler intersellüler madde, yeni damar, fibroblast, destek hücreleri ve benzeri hücreleri meydana getirmek için değişerek, oluşan hematoma şekillendirmeye başlarlar. Reaksiyon gösteren bu ilk hücrelerin bir araya gelmesi ve farklılaşmasıyla oluşan granüler doku hasara uğramış alanı belirli oranlarda stabil eder. Kırık ya da hasarlı bölgede oluşan bu süreç asidik bir pH'da gerçekleşir (67).

Mezenkimal menşeyli olup kırık tamiri boyunca görev alan hücrelerin kollajen, kıkırdak ve bunları organize ederek kemik dokusunu meydana getirdiği tespit edilmiştir. Çoğunluğu endosteum, granülasyon alanı ve periost zarının yeni kemik sentezleyebildiği katmanından salgılanır. Osteoid maddeyi osteoblast, kollajeni fibroblast ve kondroblast, glikozaminoglikanları kıkırdak temel hücresi olan kondroblastlar sentezler. Hasarlı alanı hücre çeperi gibi sarıp, hareketini engelleyip iyileşmesinde etkili olduğu düşünülen yapıya kallus adı verilmiştir. Bu yapı gelişmemiş kemik, kıkırdak ve fibrötik dokudan meydana gelir (68).

2.5.3. Kallus Fazı

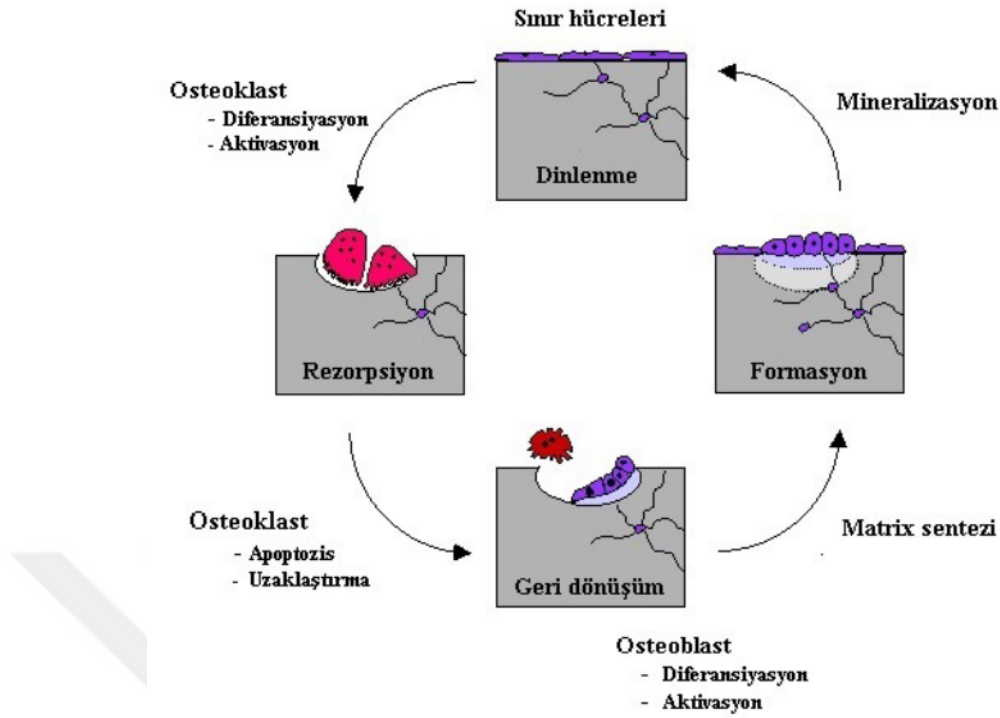
Kırıklar yüksek oranda fiziksel dengesizlik ile tipiktir. Kemikleşme kıkırdak taslakla meydana geldiği için yumuşak kallus kırık olan alana aşırı sert olmayan bir desteklik verir. Kondrositler ve fibroblastlar kıkırdak matriksin salgılanmasında görevli hücrelerdir ve kırık parçalar arasında süreklilik göstermeyen tıkaç görevini ifa eder. Mezenkimal progenitörlerden sentezlenen kondrositler, programlanmış ölüme uğramadan önce aşırı derecede bir gelişime uğrar ve kıkırdak matriksi kalsifiye eder. Büyüme faktörlerinin fibroblast bölünmesi, kondrosit farklılaşması ve mevcut damarlardan kollateral dalların ve daha büyük damarların anjiyojenik morfolojik değişiminin düzenlenmesi gibi önemli görevleri mevcuttur.

Bu evrede, kemiksel faktörlerin varlığında osteoprogenitörlerden köken alan osteoblastlar hücre miktarı açısından baskındır. Progenitör hücreler periost zarı, kemik iliği, vasküler sistem ve bölgesel dokular gibi benzeri kaynaklardan köken alır. Bu aşamada osteoblastlar, yumuşak kallusun hareketsiz alanlarından başlayarak kalsifiye olmuş kemik matriksi sentezler. Yeni sert kallus bağlantısı sağlamak için stabil olmayan yumuşak kallus yeniden damarlanmayla beraber yavaş yavaş ortadan kaldırılır. Angiogenik sistem, ilgili bölgedeki osteoblastlara farklılaşan progenitör hücrelerin oksijen gereksiniminin karşılanmasını sağladığı için sert kallus oluşumunun olmazsa olmazıdır (65).

2.5.4. Yeniden Yapılanma Fazı

Kemik tamirinin en uzun süren safhası olup, fiziksel açıdan dayanıklı fakat histolojik olarak düzenli olmayan kallus, kemiğin lameller muhtevası ile değişime uğrar (69). Örgü kemik lameller kemiğe dönüşür ve fazla kallus osteoklastlarca rezorbe edilir. Örgü kemikte parmaklı formda yeni kılcıl damarlar meydana gelir. Olgunlaşmamış ilk kemik dokusu kılcıl damarları sarar. Yeni olgunlaşmamış kemik üretimiyle trabeküller kalınlaşır ve birincil osteonlar oluşur. Bu kemik birikimi ile beraber olgunlaşmamış kemik ağırlığa dayanıklı bir hal alır. Bu yeni yapı paralel lifli kemik olarak adlandırılır (70).

Yeniden şekillenme sürecinde primer osteonlar sekonder osteonlara dönüşür. Örgü kemik belli bir seviyede rezorbe olur. Bu rezorpsiyon seviyesi geri dönüşüm çizgisi olarak adlandırılır. Bu seviye ayrıca sekonder osteonların yapıldığı ve yeni kemiğin oluşmaya başladığı andır (71,72). Kemiğin yeniden modellenmesi, uzun aksı boyunca etkileyen baskı kuvvetlerinin meydana getirdiği elektromanyetik saha sebebiyle oluşur ve ortalama birkaç yıl sürer. Bu zaman zarfında, kemik trabekülleri ve kompakt kemik tekrardan süreklilik kazanır. Yeniden şekillenme safhasında vaskülarizasyonun normale dönmesi ile birlikte, dokudaki oksijenlenme de normalleşir ve bu safha da birkaç yıl sürer (73).



Şekil 2.5. Kemik remodelasyon döngüsü. (113)

2.6. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kemik iyileşmesini etkileyen faktörler arasında; travmanın şiddeti, fragmanların pozisyonu, bölgenin vaskülarizasyonu, kemik tipi, dokudaki nekroz, yumuşak doku hasarının derecesi, enfeksiyon, hareketsizlik gibi lokal etmenler ile yaş, sistemik hastalıklar (diabet, anemi, tüberküloz gibi), paratiroid, kalsitonin, insülin, büyüme hormonu gibi hormonlar, A, C ve D vitaminleri, kondroitin sülfat düzeyi ve egzersiz gibi genel faktörler sayılabilir (68).

2.6.1. Lokal Faktörler

Travmanın derecesi iyileşme üzerinde önemli bir faktördür. Kemikte ve yumuşak dokuda kayıp görülebilir. Bu durum kırık iyileşmesi üzerinde negatif etkiye neden olur. Fragmanlar arası kallusta beslenme granülasyon dokusu ve fraktür alanına gelen kan damarları aracılığıyla ve difüzyon yoluyla olur. Fragmanların uçları arasındaki mesafenin artması dolaşımın bozulmasına böylelikle iyileşmenin bozulmasına neden olur (74).

Fraktür alanında yumuşak dokuda da hasar varsa açık kırık oluşur. Açık kırıklarda kallus ve iyileşme için osteoblastik aktiviteyi oluşturacak kırık hematomu ortadan kalkar ve bakterilerin ilgili alana dış ortamdan penetrasyonu sonucu enfeksiyon gelişebilir. Oluşabilecek enfeksiyon fraktür iyileşmesini geciktirebilir veya tamamen bozabilir. Enfeksiyon geliştiğinde bölgedeki granülasyon dokusu ile kemikleşme dönemindeki dokularda tahribat oluşur. Fibröz doku ile nedbe gelişerek iyileşmeyi bozarlar (75). Alanda oluşan yumuşak doku hasarına bağlı vaskülarizasyonun bozulmasıyla beslenme de bozulur. Kırık parçalarının stabilizasyonunu sağlayacak yumuşak dokularda oluşan hasar aynı zamanda kırığın tesbitini de zorlaştırarak iyileşmeyi güçleştirir. Doğru redükte ve tespit edilen fraktüre fragmanlara erken fonksiyon ve sınırlı yük verilmesinin kemik doku iyileşmesini olumlu biçimde uyardığı bildirilmiştir.

Kırık uçlarının hareketini engellemek amacıyla fraktür alanında gerekli tespit yapılmazsa fragmanlar hareket ederek vaskülarizasyonun bozulmasına, oluşan yeni damarlarda parçalanmaya ve sonuç olarak kemik doku iyileşmesinde güçlüğü neden olur. Kemiği redükte ve manipüle etme hareketlerinin tekrarlanması da iyileşmeyi geciktirir (76). Bunlara ilaveten dejeneratif, metabolik, tümoral, enfeksiyon hastalıkları ile radyoterapiye bağlı direnci azalan kemiklerde minör travmalar bile kırılabilirliği artırır (67).

Fraktür bölgesindeki herhangi bir sinirsel yapının hasarı da iyileşmeyi olumsuz etkiler. Spongioz kemiklerde meydana gelen fraktürlerde kemik iyileşme hızı kompakt kemiğe oranla daha fazladır. Bunun nedeni kansellöz kemikte vaskülarizasyon ve hücre sayısı daha fazla, birim alandaki kemik doku temas yüzeyi daha geniştir ancak kortikal kemikte ise temas yüzeyi ve vaskülarizasyon daha azdır (77).

Kırığın yönüne göre bakıldığında deplase olmayan veya az deplase spiral ve oblik kırıklarda iyileşme enlemesine gelişen kırıklara göre daha iyidir. Bu yargı enlemesine fraktürlerde damarların aynı düzeyde kesintiye uğraması buna karşılık spiral ve oblik fraktürlerde damarların devamlılığının bozulmamasıyla ilişkilidir (74). Günlük ortalama iki saat, 2-3 atmosfer basınç altında hiperbarik oksijen

uygulanmasının fraktür iyileşmesine katkı sağladığı gözlenirken, altı saatlik dozu aşan uygulamaların iyileşmeyi geciktirdiği rapor edilmiştir (78).

2.6.2. Genel Faktörler

Genel faktörler arasında; beslenme, hormonal faktörler, sistemik hastalıklar, ilaçlar, yaş ve alışkanlıklar sayılabilir.

Beslenme

Fraktür iyileşmesinde matriks, kollagen, proteoglikan ve makromoleküllerin sentezlenmesinde, hücre göçü ve çoğalmasında yüksek seviyede protein ve karbonhidrata gereksinim duyulur. Özellikle büyüme çağında kemik beslenme faktörlerine karşı oldukça hassastır. Geçirilen travma ve majör cerrahi operasyonlar immün sistem yanıtını azaltıp malnütrisyona sebep olabilir. Böyle hastalarda beslenmeye önem gösterilmelidir. Proteinin yetersiz alınımına bağlı olarak osteoblast hücrelerin kollajen sentezi azalır (79).

Kalsiyum iyonu ile D vitamini iyileşmede en önemli role sahip faktörlerdir. Ca^{+2} eksikliğinde matriksin yetersiz kalsifikasyonu görülürken D vitamini, Ca^{+2} ve PO_4 'un gastrointestinal sistemden geri emilimini artırır. Osteoid dokunun maturasyonunu ve kalsifikasyonunu uyararak kemik yapımını uyarır. Vitamin A mezenkimal hücre diferansiyasyonunu uyararak iyileşmede rol oynar. Eksikliğinde, osteoblast ve osteoklast aktivitelerinde değişim ile birlikte kemik oluşumunda azalma görülür. Fazlalığında ise, kırık dokularda erozyon oluşur, osteoklast dönüşümünde artış bunun sonucunda kırık iyileşmesinde gecikme meydana gelir. Vitamin C primer olarak osteoblast ve osteosit hücrelerinin ürettiği kollagen sentezinde görev alır ve iyileşmeye dolaylı olarak katkı sağlar. Eksikliğinde kemik dokuda tamir ve büyüme olumsuz yönde etkilenir (80).

Hormonal Faktörler

Melatoninin serbest oksijen radikallerini baskılayıp antioksidan enzim regülasyonun sağlayarak kırık iyileşme sürecine olumlu etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu durumun, fraktür sahasındaki serbest oksijen radikallerine bağlı, antioksidan etkinlik sonucu olduğu ortaya atılmıştır (81) .

Paratiroid bezinin esas hücrelerinden salınan polipeptid yapılı hormon olan parathormon (PTH) kemik dokuda osteoklast hücre sayısını artırır. Ortamda kalsitriol varlığında, kemik yıkımını indükleyip serum Ca^{+2} ve PO_4 seviyelerini yükseltir. Osteoblastlar üzerine dolaylı yoldan etki ederek sayılarını ve fonksiyonlarını çoğaltırlar, kemik formasyonunu arttıırırlar. Yüksek olmayan dozlar trabeküler kemik oluşumunu olumlu etkiler. Ancak sonuç olarak kemik kaybına ve fraktür iyileşmesinin yavaşlamasına neden olurlar (82).

PTH'nun antagonisti olarak işlev gören kalsitonin, tirod glandının parafoliküler hücrelerinden salınan polipeptid yapılı hormondur. Plazma içindeki Ca^{+2} ve PO_4 seviyelerini azaltarak, kemik yıkımını önler, osteoblastik aktiviteyi artırır. Buna bağlı olarak trabeküler ve kortikal kemik yapımının artışı sağlanır. Kalsitoninin dozu ile yeni kemik dokusu oluşumu arasında korelasyon mevcutken, iyileşme üzerindeki olumlu rolünün mekanizması açıklığa kavuşturulamamıştır (83).

Ovaryumdan salgılanan östrojen hormonu, kemik yıkımını azaltarak kemik kaybını önler. Östrojen eksikliğinde, osteoporoz oluşma olasılığı artar.

Tiroid hormonu, kemiğin remodellinginde paratiroid hormonu gibi işlev görür. Fraktür iyileşmesinde etkin bir rol aldığı ileri sürülmüştür. Hipotiroidinin replasman tedavisinde kullanılan tiroid hormonları osteoporoz ve fraktür riskini uzun dönem kullanımlarda arttırabilir (84).

Growth hormon proteine bağlı Ca^{+2} üzerine etki ederek kırık iyileşmesini olumlu yönde etkiler ve iyileşme hızını artırır. Bu hormon hipofiz bezinin ön lobundan salgılanır ve kallus hacmini artırır. Fraktür iyileşmesini hızlandırdığı klinik çalışmalarda da gösterilmiştir. Büyüme hormonu yanında insülin hormonu da aynı işleve sahip olup iyileşmeyi artırır (85).

Sistemik Hastalıklar

Fraktür iyileşmesini geciktiren hastalıklar arasında diabet, anemi, tüberküloz, raşitizm ile beslenme bozukluklarına neden olan gastrointestinal sistem hastalıkları sayılabilir. Diyabette, osteoblast hücrelerini aktive eden faktörlerin sentezinde azalma ve bunun sonucunda kemik iyileşmesinde bozulma gözlenir (85).

İlaçlar

Hyalüronidaz ve kondroitin sülfat iyileşmeyi olumlu yönde etkiler. L-Dopa ve klonidinin deneysel çalışmalarda growth hormonu miktarını artırarak, fraktür iyileşmesine katkı sağladıkları gösterilmiştir (86).

Kırık iyileşmesi uzun süreli steroid kullanımını gerektiren cushing sendromu, sistemik lupus eritematozus, otoimmün deri hastalıkları, romatoid artrit gibi romatizmal eklem hastalıklarından olumsuz şekilde etkilenir (87).

Prostoglandinlerin osteoblast hücreleri üzerindeki aktivasyonunu artırıcı tesirini önleyen non steroid antienflamatuar ilaçlar iyileşmeyi geciktirir (88).

Heparinin osteoblast yapımını azaltıp, osteoklastları artırarak kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkiye neden olduğu düşünülmektedir (89).

Nitrik oksit ile yapılan deneysel çalışmada, fraktür iyileşmesinde radyolojik incelemelerde ve histolojik kesitlerde olumlu sonuçlar gösterilmiştir (90).

Alışkanlıklar

Sigara içmenin iyileşmeyi olumsuz etkilediği klinik çalışmalarda tespit edilmiştir. Tibiaları osteotomi ile çıkarılan tavşanlarda, kontrol grubuna oranla nikotin grubundaki deneklerde iyileşmenin geciktiği gösterilmiştir. Greft uygulanmış başka bir klinik çalışmada, nikotinin otojen kemik greftinin kanlanması bozarak iyileşmeyi inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. (91).

Yaş

Yaş arttıkça iyileşmede görevli hücrelerin yenilenmesi, sert doku oluşumu ve hasarlı alanın remodellingi yavaşlar.

2.6.3. Biyokimyasal Faktörler

Kemik yapım ve yıkım mekanizması kimyasal, elektriksel ve mekanik uyarılarla düzenlenir. İyileşme sırasında plateletler, makrofajlar ve fibroblastlar ile birlikte bazı proteinler ve büyüme faktörlerini sentezlerler. Salgılanan bu proteinler hücre göçü, çoğalması, farklılaşması ile yıkım arasındaki dengeyi yönetmede görev

alırlar. Kemik iyileşmesinde görev alan kemik uyarıcı faktörlerden en çok bilinenleri BMP (kemik morfojenik protein), TGF- β (growth faktör dönüştürücü β), VEGF(vasküler endotelyal büyüme faktörü), PDGF (trombosit derive growth faktör), FGF (fibroblast büyüme faktörü) ve IGF (insülin benzeri growth faktör) olup bu faktörlerin bazıları sınırlı olarak klinik çalışmalarda kullanılmış, ancak rutin kullanıma henüz tam olarak girememişlerdir (92,93)

2.7. NİGELLA SATİVA

Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller) ailesinden olan, Avrupa, Asya'nın güney batısı, Afrika'nın kuzeyinde bulunan ve yurdumuzda daha çok Konya, Afyon, Burdur ve Isparta civarlarında oluşan “çörek otu” olarak bilinen *Nigella sativa* 15-25 cm ebatlarında çiçek açan senelik bir bitkidir (94,95). Çörek otu doğrusal mızrak biçiminde yaprakları ihtiva eder. Hassas çiçekleri 5-10 taç yapraklarından meydana gelmektedir ve genel olarak sarı, beyaz, pembe, soluk mavi ve mor renklidir. Her biri birçok tohum barındıran çörek otunun meyveleri, geniş ve 3-7 tane birleşmiş kökten meydana gelir. *Nigella Sativa*; doymuş/doymamış sabit yağlar (%31-35,5), uçucu yağlar (%0,4-0,45), karbonhidratlar (%33-34), proteinler (%16-19,9), aminoasitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, lifler, mineraller (kalsiyum, çinko, fosfat), vitaminler (askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit) içermektedir (96).

Halk arasında çörek otu ismiyle adlandırılan cinsi bitkilerin kapsül içerisinde oluşan tohumudur. Yeni bir besin yağı kaynağı şeklinde görülen çörek otu tohumu yağı, vücut sağlığı ve insan diyetinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Çörek otundan ve tohumundan üretilen ilaçlar eskiden olduğu gibi günümüzde de lokman hekimliğinde, nezle, grip, baş ağrısı, koah, gaz giderici, diüretik, hepatit A, çeşitli romatizma ve enfeksiyon hastalıkları ve benzeri bir çok hastalığın tedavisinde sürekli olarak kullanılmaktadır (97). Bu tohum yağının antioksidan aktivitesi (98), antitümör aktivitesi (99), anti inflamatuvar aktivitesi (100), antibakteriyel aktivitesi (101) ve immün sistem üzerine uyarıcı etkisi (102) olduğu rapor edilmiştir.



Şekil 2.6. N. Sativa bitkisi

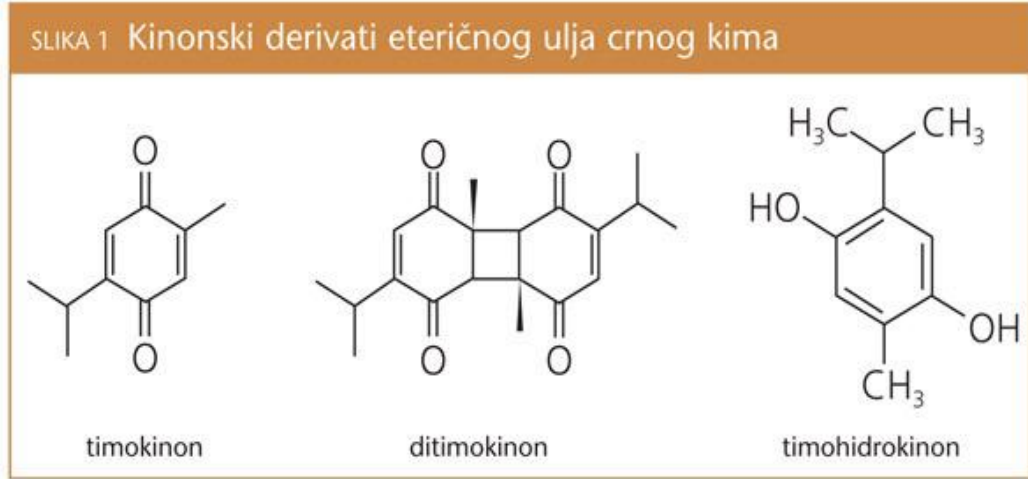


Şekil 2.7. N. Sativa tohumları

2.7.1. N. Sativa'nın Kimyasal Özellikleri

Çörek otu tohumunda bulunan kinin bileşenleri farmakolojik etkilerinin birçoğundan özellikle timokinon sorumludur. Nigella Sativa tohumu uçucu yağının ana biyolojik aktif maddesi timokinondur. (2-izopropil-5-metilbenzo-1,4-kinon) (%18,4-24). Enol ve keton form dâhil tautomerik formlarda bulunmaktadır. Keton formu çoğunluğunu meydana getirmektedir (yaklaşık %90) ve maddenin farmakolojik etkilerini oluşturur. Timokinon hidrofobik bir molekül olup ışığa karşı yüksek hassasiyete sahiptir ve ışıklı ortamda yıkıma uğramaktadır. Ph'ın artması ile timokinonun stabilitesi azalmakta, ph'ın azalması ile minimum degradasyon görülmektedir (103).

Nigella Sativa tohumunun % 22.6-26.7 protein, %32,7-40,0 karbonhidrat ihtiva ettiği bulunmuştur. Tohumu parçalandığında, ortaya çıkan proteinlerin molekül ağırlığı SDS-PAGE elektroforezi ile ölçüldüğünde 94- 100 kDa değerlerindedir. Ayrıca çörek otu glukoz, ramnoz, ksiloz, arabinoz formunda monosakkaridleri de içermektedir (104). Çörek otunun yapısındaki ana fosfolipid grupları fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinisitol şeklinde sıralanır (105). Tohumlarda bulunan karoten karaciğerde A vitaminine dönüştürülür. Çörek otu tohumları kalsiyum, potasyum ve demir kaynağıdır (106).



Şekil 2.8. N. Sativa'nın temel bileşenleri ve kimyasal gösterimleri (106).

2.7.2. N. Sativa'nın Farmasötik Etkileri

Çörek otunun anti-diyabetik, anti-oksidan, anti-inflamatuvar, anti-histaminik, anti-mikrobiyal, anti-tümör, hematolojik ve immünomodülatör etkileri çeşitli çalışmalarla belirlenmeye çalışılmıştır.

2.7.3. Anti-inflamatuvar Etkileri

Enflamasyonun akut ve kronik devamlılığı, makrofaj ve nötrofillerden salınan oksidanlar ve sitokinler gibi birçok mediatör ile düzenlenmektedir. NO ve ROT doku hasarına yol açan toksik oksidatif reaksiyonları baslatırlar (154). Enflamasyon ayrıca siklooksigenaz (COX) ve lipooksigenaz (LO) gibi iki ana enzim tarafından da kontrol edilir (104,107). Pekçok in vitro deneylerde çörek otu yağının ve yağın sahip olduğu aktif maddelerinin, enflamatuvar birleşenlerin üretilmesindeki azaltıcı etkileri tespit edilmiştir. TQ ve çörek otunun ham yağının, araşidonik asit metabolizmasındaki COX ve 5-LO aşamalarını engellediği ve TQ'un inhibi edici özelliğinin daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Yapılan araştırmalarda, allerjik akciğer inflamasyonlu rat modellerinde timokinonun antiinflamatuvar etkileri bildirilmiştir. Timokinonun akciğerdeki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, Th2 sitokinleri ve eozinofil hücrelerini azaltarak allerjik astımda inflamasyonu ortadan kaldırmaya çalıştığı bildirilmiştir. Bunun yanında serumda bulunan artmış immünglobulin (Ig)G1 ve ovalbümin (OVA)

spesifik IgE seviyelerinin düşmesine neden olmuştur. Bronkoalveolar lavaj sıvısı içinde interferon gama (IFN- γ) üretimini arttırdığı ve interlökin (IL)-4, IL-5 ve IL-13 üretimlerini ise azalttığı bulunmuştur. Timokinonun LT-C4 ve LT-B4 üretimini ve 5-LO açığa çıkmasını azaltarak pulmoner inflamasyonu iyileştirdiği bildirilmiştir (108,109).

Çörek otunun anti-inflamatuvar etkilerinden timokinon ve timokinonun toksik olmayan karbonil polimeri olan nigellonun sorumlu olduğu belirtilmektedir. Ratlarla yapılan bir araştırmada sabit yağdaki timokinonun potansiyel bir anti-inflamatuvar ajan olarak araşidonik asit ile lökotrien üretimini ve zar lipid peroksidasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Ham sabit yağ, farelerin periton lökosit hücrelerinde kalsiyum iyonofor ile aktive hale gelen araşidonik asit metabolizmasında siklooksijenaz ve 5-lipooksijenaz yolunun olası anti-inflamatuvar ajanı şeklinde davranmaktadır, ancak bu etkinliğin yağda mevcut TQ'un oluşturduğu etkiden daha fazla olması öngörülmektedir. Bu sonuçlar sabit yağın anti-inflamatuvar etkinliğinin tamamen TQ'dan ötürü olmayıp, bununla birlikte tohumun yağında esasen hazırda bulunan C20:2 yağ asidi sayesinde de olabileceğini göstermiştir.

Timokinon uygulamalarının IgE, histamin ve sitokin seviyelerini düşürerek allerjiye bağlı gelişen konjunktivitte semptomları büyük oranda azalttığı tespit edilmiştir (110).

Ülseratif kolit, akut inflamasyon siklusları, ülserasyon ve kolon mukozasındaki kanamalarla ortaya çıkan başka bir antiinflamatuvar hastalıktır. Kolitin patogenezinin tamamen anlaşılmamasına rağmen, araşidonik asit, lökotrien, trombosit aktive edici faktör ve oksijen üreten serbest radikaller gibi birçok medyatörün hastalığın oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (111).

Campieri ile Gionchetti ve ark.'ının 1991 senesinde gerçekleştirdikleri çalışmalarda antiinflamatuvar ajanların, Koch ve ark.'ı ile Choudhary ve arkadaşlarının 2000 ve 2001 yıllarında yaptıkları çalışmalarda anti-oksidan maddelerin hastalıkların belirtileri üzerine iyileştirici etkinliklerinin olduğu gösterilmiştir (112).

Mahgoub 2003 yılında yaptığı çalışmada ratlarda asetik asit ile stimüle olan kolit üzerine TQ'nun etkinliğini araştırmıştır. Çalışmada ratlara, %3'lük asetik asit intrakolonik enjeksiyon yapılmadan önceki 3 gün süresince TQ verilmiş ve TQ'nun asetik asit ile aktive olan kolite karşı antikolit bir ilaç olan sülfasalazinden daha fazla etkinlikle koruma sağladığı gösterilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre TQ'nun anti-kolit etkinliği, anti-oksidan ve anti-histaminik aktivitelerince sağlanmaktadır (113).

2.7.4. Anti-mikrobiyal (Anti-bakteriyel) ve Anti-fungal Etkileri

Timokinonun, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*'i de içine alan bazı bakteriyel suşlara karşı antibakteriyel ve özellikle gram-pozitif koklara karşı önemli bakterisidal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (114,115). Böbrek epitel hücrelerine tutunabilen *Streptococcus pyogenes* bakterilerinin sayısı timokinonun kullanımı ile doza bağımlı şekilde düşmüştür (116).

Aboul-Ela tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada *Schistosoma mansoni* (S. masoni) ile enfekte olmuş ratların N. Sativa yağıyla işlem görmesinden sonra karaciğerdeki S. Masoni sayılarının azaldığı, karaciğer ve bağırsaklardaki yumurta miktarının da önemli ölçüde düştüğü görülmüştür.

N. Sativa yağının, Şiştozomiyaz tedavisinde kullanılan Praziquantel adlı ilacın etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (117).

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 bağlı biyokimyasal ve patolojik değişiklikleri gidermiştir (118).

NS'nin etkin maddelerinden biri olan TQ'nun antifungal etkisini inceleyen bir çalışmada, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidormophyton floccosum* ve *Microsporum canis*'i içeren dermatofitlere karşı etkili olduğu gözlenmiştir (119).

Ratlarda yapılan bir başka çalışmada NS'nin candida albicans enfeksiyonunun gelişimini inhibe edici özellik gösterdiği gözlenmiş ve bu durum histopatolojik incelemelerle teyit edilmiştir (120).

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 etkinlik testi amacıyla kullanılmıştır. Anti-fungal aktivasyon için Candida albicans (C. Albicans), Candida tropicalis (C. tropicalis) ve Candida krusei (C. krusei); antimikobakteriyel aktivasyon için de Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) ve Mycobacterium avium (M. avium) ile çalışılmıştır. Bu mikroorganizmalardan inokulum preparatları hazırlanıp N. Sativa yağının anti-mikrobiyal etkinliğine gr (+) ve gr (-) bakterilerde mikrodilüsyon yoluyla bakılmıştır.

In vitro anti-fungal etkinliğine de fungal mikroorganizmalarda ketokanazol ve flukonazol kontrol ajanlarıyla birlikte bakılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre Mısır ve Türkiye'den alınan dört ayrı çörek otu örneklerinde de antimikrobiyal etkinlik gözlenmiş olup antimikrobiyal aktivite en fazla Mısır çörek otunda saptanmıştır (121).

2.7.5. Analjezik Etkileri

N. Sativa'nın içeriğinde yer alan maddelerden TQ, doza bağımlı olarak tromboksan B2 ve lökotrien B4, siklooksijenaz ve araşidonik asit düzeylerini azaltıp analjezik ve anti-romatizmal etkinlik gösterir (97).

Karragenanın etkinliğiyle pençelerinde ve hint yağı etkinliğiyle de kulaklarında ödem oluşturulan ratlarda anti-inflamatuvar etkinin değerlendirildiği araştırmada N. Sativa'nın önemli miktarda ağrı kesici etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Opioid ağrı kesici grup üyesi olan naloksan, N. Sativa'nın formalin testinde ortaya koyduğu ağrı kesici etkinliği geri alamadığından, başka bir deyişle yeterli antagonizma sergileyemediğinden N. Sativa yağının ağrı kesici etkisinin opioid dışındaki reseptörler aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. NS'nin analjezik etkisinin ratlarda hot-plate testi ile ölçüldüğü iki farklı hayvan çalışmasında NS'nin analjezik etkisinin olduğu bulunmuş, ağrının erken ve geç dönemlerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (110).

N. Sativa ‘nın içeriğindeki nigellonun mast hücrelerinden histamin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bunun yanında N. Sativa çekirdeğinde bulunan sabit yağın ve saf TQ’un ratların peritoneal lökositlerinde araşidonik asit metabolizmasında siklooksijenaz ve 5-lipooksijenaz yollarını inhibe ettiği de gösterilmiştir. Bu etkilerin tromboksan B2 ve lökotrien B4’ ün doza bağımlı inhibisyon yoluyla olduğu ileri sürülmüştür. Bu veriler ışığında N. Sativa’nın romatizma ile çeşitli inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülebilir.(106).

2.7.6. Anti-oksidan Etkileri

NS tohumlarının etkilerinden biri de antioksidan özellikleri ile toksisiteyi azaltmalarıdır. Oksitleyici hasarlar, biyolojik yapılarda, özellikle kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi birçok hastalığa sebep oluştururlar. Oksitleyici hasara serbest radikaller neden olmaktadır. Hücrede oksidatif hasar; oksidan bileşikler ile fazla oksitleyici strese bağlı oluşan serbest radikal üretiminin artması veya mevcut serbest radikallerin hücrelerden yok edilebilme yeteneğinin azalması sebebiyle meydana gelir. Elektriksel olarak yüklü olan oksijen (O₂), hidroksil (OH⁻) ve azot monoksit (NO⁻) gibi serbest radikaller, hücrede membrandan geçerek hücre içine girer ve hücredeki nükleik asitler, proteinler ve enzimler ile bir dizi reaksiyona girerek ilgili alanda yıkım oluşturur. Yapılan in-vitro çalışmalarda, NS’nin tohum ekstresinin yılan ve akrep zehirlerinin hemolitik etkinliğini engellediği, alyuvarları lipid peroksidasyonuna, protein denaturasyonuna, hidrojen peroksit (H₂O₂) ‘in sebep olduğu artan ozmotik basınca karşı koruduğu gösterilmiştir. Bunların yanında laringeal karsinoma hücrelerini, lipopolisakkarit veya kortikosteroidler yoluyla aktive olan apoptosisten koruduğu bildirilmiştir (122).

İyonize radyasyona maruz bırakılan ratlarda nitrikoksitsentaz enzim aktivitesi, NO ve peroksinitrit düzeyleri gibi nitrozatif stres oranlarının daha fazla bulunması, N. Sativa yağı ve TQ uygulandığında ise bu parametrelerin anlamlı seviyede düşük saptanması beyinde, oksidasyon meydana geldiğinde N. Sativa yağı ve TQ maddelerinin antioksidan etkinlik gösterdiği görüşünü desteklemektedir (123).

Timokinonun antioksidan etkileri özetle şöyle sıralanabilir; demir ile ilişkili lipit peroksidasyonunu önlemesi, toplam tiyol bileşeni ve GSH düzeylerini artırması, serbest radikalleri ortadan kaldırması, karaciğerdeki CYP1A1/A2 izozimlerinin aktivitelerini önlemesi, iNOS ekspresyonunu engellemesi, kinon redüktaz, CAT, SOD ve glutatyon transferaz enzim etkinliklerini artırması ve karaciğer hücrelerinde lipogenezi önlemesidir (124).

2.7.7. Anti-diyabetik Etkileri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) araştırma komitesi, 1980 yılında diabet tedavisi için tamamlayıcı tıpta kullanılan hipoglisemik ajanların araştırılmasını önermiştir. Bu amaçla, hipoglisemik, enfeksiyon önleyici ve immunmodülatör etkilerinden ötürü *Nigella Sativa* (NS) yağı, deneysel diabetik nefropatide kullanılmıştır. Kan glukozu ve HbA1c değerlerini düşürdüğü gözlenen NS yağının hipoglisemik etkisinin mekanizması netleştirilememiştir. Karaciğerin glukoz üretimini azalttığı, intestinal glukoz absorpsiyonunu önlediği, oksidatif stresi azaltarak pankreasta beta hücre rezervini koruduğu bildirilmiştir.

Streptozosin verilerek modelsel diabet oluşturulmuş ve yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda yapılan bir çalışmada, günlük düzenli NS yağı uygulamasının kan glukozu, lipid düzeyi, oksidatif stres değişkenleri ve insülin reseptörü ile uyarılan bazı genler üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre NS yağı uygulanan ratların diğerlerine oranla insülin reseptörlerinin gen ekspresyonlarının indüklendiği, ayrıca insülin benzeri büyüme faktörü-1 ve fosfoinositid-3 kinaz sentezlerinin arttığı, ADAM-17 sentezinin azaldığı görülmüştür. Bunların yanında kan glukoz seviyesi, lipid bileşenleri ve oksidatif stres değişkenleri de NS yağı verilenlerde azalmış ve NS'nin antidiyabetik etkisinin mevcut olduğu gözlenmiştir (125).

Streptozosin ile diabet oluşturulan ratlarda yapılan başka bir çalışmada *N. sativa*'nın hipoglisemik etki mekanizmasının açıklanması hedeflenmiştir. Bu çalışmada ratlara diabet oluşturulduktan sonra gastrik gavaj yolu ile 400 mg/kg olacak şekilde *N. sativa* yağı uygulanmıştır. *N. sativa* yağı tedavisiyle kan glukoz düzeylerinde 1, 2, 3, 4. haftaların sonlarında anlamlı azalmalar saptanmıştır.

Çalışmadan elde edilen veriler ışığında N. sativa yağının hipoglisemik etkinliğinin azda olsa karaciğerde glukoneogenezin azalması, makrofajların fagositik aktivitelerinin uyarılması veya lenfositlerin doğrudan aktive edilmesi yollarıyla olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada ayrıca N. Sativa yağı uygulamasının glikolize hemoglobini de azalttığı gösterilmiştir. Total glikolize hemoglobindeki bu azalma uzun süre kan glukoz seviyesinin normal seviyede kalabildiğini göstermektedir (126).

2.7.8. Anti-histaminik Etkileri

Histamin, bazofil ile mast hücrelerinden üretilen ve allerjik reaksiyonların oluşumundan sorumlu bir otakoiddir. Timokinonun bazı antiinflamatuvar etkileri histamin salınımının inhibisyonuna bağlıdır. Timokinon OVA'ya maruz kalan ratlarda histamini azaltarak allerjik konjunktivitinin semptomlarını hafifletmiştir (164). Yapılan preklinik ve klinik çalışmalar ile N. Sativa tohumlarının anti-histaminik etkinliği gösterilmiştir. Bu çalışmalar için, mukozada bulunan histamin oranını bariz şekilde çoğaltan ve oral yolla etanol verilmesiyle oluşturulan gastrik ülser modeli kullanılmıştır. Ülser oluşturulmadan önce N. Sativa yağı uygulanan ratların ve ülser oluşturulan ratların gastrik mukozadaki histamin miktarları ölçülmüş ve daha önce N. Sativa yağı uygulanmış ratların gastrik mukozadaki histamin oranları diğer gruba göre daha düşük bulunmuştur. N. Sativa yağı uygulamasının gastrik mukozadan histamin üretimine karşı % 53.56 oranında protektif etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, timokinonun ratlarda histamin ve trombosit aktive edici faktör salınımını azaltarak, asetik asit yardımıyla meydana gelen koliti engellediği gösterilmiştir (127).

2.7.9. İmmün Sistem Üzerine Etkileri

Doğal bağışıklık makrofajlar, naturel killer ve granülositler gibi hücreler yoluyla oluşurken, kazanılmış bağışıklık ise spesifik antikor üreten B hücreleri aracılı humoral bağışıklık ve CD4+ ve CD8+ T hücreleri aracılı hücresel bağışıklık yollarıyla meydana gelir. N. Sativa yağının ve TQ'nun T hücreleri ve immün cevaba aracılık eden doğal öldürücü hücrelerin sayılarının artışı sağladığı ve önemli immünomodülatör etkinlik gösterdiği bildirilmektedir (123). TQ, lipopolisakkaritler (LPS) tarafından uyarılan makrofaj hücrelerinin supernatantlarında nitrit üretimini

azaltıp, periton makrofaj hücrelerinin indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) protein düzeyini de yoğunluğa bağlı olacak şekilde düşürmüştür. Gönüllü insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada N. Sativa'nın immün sistem üzerine etkileri araştırılmış çalışmanın sonucunda N. Sativa çekirdeklerinin T helper ile T süpresör hücre sayılarını % 55, doğal öldürücü hücre aktivitesini de ortalama % 30 oranında artırdığı saptanmıştır (128).

2.8. N. Sativa'nın Potansiyel Toksisitesi

Timokinonun etkileri üzerine yapılan araştırmalarda daha çok tedavi edici etkinliğine odaklanılmıştır. Yapılmış çalışmaların birçoğunda timokinonun böbrek, karaciğer, kalp, akciğer ve mide gibi organ sistemlerinde oluşan oksidatif strese bağlı gelişen hasarları tamir edebileceği bildirilmiştir. Timokinonun antikarsinojenik, antiinflamatuvar, analjezik, hipoglisemik, immün sistemi güçlendirici gibi faydalı etkileri ileri sürülmekte olup kullanımının güvenli olduğu bildirilmektedir. Timokinon toksisitesini değerlendirmek üzere yapılan çalışmalarda, toksik etkilerin ancak oldukça yüksek dozlarda uygulandığında ortaya çıktığı gösterilmiştir. Timokinon yüksek dozlarda selektif sitotoksik etkiye sahip olup; osteoblastlar, rat böbrek hücreleri, insan akciğer fibroblast hücreleri gibi normal hücrelerde herhangi bir sitotoksikite göstermeksizin tümör hücrelerini etkili şekilde ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (103).

Gamma glutamil transferaz (GGT) peptidlerden ve diğer bileşiklerden γ -glutamil grubunu transfer eden bir enzim olup vücutta kas hücreleri dışında tüm hücrelerde ve serumda bulunmaktadır. Serum içindeki ana kaynağı hepatobilyer sistemdir. GGT, alkol ve ilaçların hepatik sistem üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirilmesinde oldukça önemlidir. Alanin aminotransferaz (ALT-SGPT), ketoasitlerle aminoasitlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen transaminaz enzimlerinden biridir. Bu 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 dönüşmüş olur. Normalde serumda ALT seviyesi oldukça azdır. Karaciğer üzerindeki toksik etkiler ALT'nin serum konsantrasyon düzeyini artırır.

Tennekoon ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları bir çalışmada N. Sativa tohumlarının sulu ekstraktını 2 hafta süresince erkek Sprague Dawley cinsi ratlara oral yolla uygulamışlar ve kilit hepatik enzimlerin seviyelerindeki değişiklikleri ve histopatolojik değişimleri ölçerek tohumların olası toksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda gözle görülür patolojik değişim olmaksızın N. Sativa ekstraktıyla işlem görmesi sonrası ratların serum GGT ve ALT konsantrasyonlarında belirgin artış olduğunu tespit etmişlerdir (129).

Çörek otu tohumu ekstresinin (50 mg/kg) ratlara 5 gün süresince intraperitoneal uygulanmasında böbrek ve karaciğer fonksiyonlarını etkilemediği gösterilmiştir (67). Yapılan bir diğer çalışmada, çörek otu sabit yağının 10 mL/kg pozolojide oral yolla 12 hafta süresince uygulanmasında ratlarda mortaliteye veya histopatolojik değişikliklere, ALT, AST ve GSH başta olmak üzere temel karaciğer enzimlerinde anlamlı değişimlere neden olmadığı bildirilmiştir. Gali-Muhtasib ve ark. nın yaptıkları başka bir çalışmada, timokinonun 20 gün boyunca sürekli uygulanmasında Balb/c türü farelerde mortaliteye veya ortalama vücut ağırlığında herhangi bir değişime sebep olmamakla birlikte iyi tolere edilebildiği bildirilmiştir (130).

2.9 KÖK HÜCRELER

Kök hücreler bütün çok hücreli canlı organizmalarda bulunan; kendini yenileme (self renewal), çeşitli hücrelere farklılaşma (differentiation) ve klon oluşturma yeteneğine (clonality) sahip özelleşmemiş hücrelerdir (131). Bu tip hücreler kemik iliği, kan, kalp, bağırsak, adipoz doku, karaciğer, pankreas ve dişler gibi birçok organ ve dokudan izole edilmiştir (132).

Kök hücrelerin iki ana tipi belirtilmiştir, embriyonik kök hücreler ve postnatal veya yetişkin kök hücreler. Embriyonik kök hücreler blastosistten oluşurlar. Yetişkin kök hücreler dokularda bulunan kendini yenileyebilen multipotent hücrelerdir. Kök hücreleri diğer vücut hücrelerinden ayıran özellikler vardır, birincisi normal vücut hücreleri sınırlı sayıda çoğalabilirlerken veya hiç çoğalamazlarken kök hücreler sınırsız sayıda çoğalabilirler. İkincisi vücut hücreleri bir işi yapmak için özelleşmişlerdir fakat kök hücreler özelleşmemiş hücrelerdir. Üçüncüsü vücut

hücreleri bir başka hücre tipine farklılaşamazlar fakat kök hücreler belirli sinyaller ile farklı hücre tiplerine farklılaşabilirler, özelleşebilirler (133).

Klon oluşturma yeteneği, kök hücrelerin vazgeçilmez özelliklerinden biri olmak durumundadır. Tek bir hücreden çok sayıda yeni kök hücrenin üremesi olarak tanımlanan klonalite, klonun büyüklüğüne göre ve klon oluşturma hızına göre kök hücreler arasında yapılacak kıyaslamalarda kullanılan ölçütlerdendir. Klonları oluşturan hücrelerin kültürde canlılıklarını korumaları, başarıyla dondurulup çözülebilmeleri ve pasajlanabilmeleri öngörülür (134).

2.9.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler farklılaşma yetkinliğine göre ve elde edildikleri döneme göre iki şekilde sınıflandırılmaktadır (135).

2.9.1.1. Farklılaşma Yetkinliğine Göre

Farklılaşma yetkinliğine göre kök hücreler dört sınıfta incelenebilir.

Totipotent Kök Hücreler: Yumurta ile sperm hücreleri birleştiğinde yani döllenme olayı gerçekleştiğinde oluşan zigot bütün organizmayı yalnız başına oluşturabilecek genetik bilgiye sahiptir. Bu özellikteki her şeyi tek başına oluşturabilen hücrelere totipotent hücreler denir. Totipotent hücreler zigot safhasında 8 hücreye sahip blastomerde bulunan sınırsız diferansiye olabilen hücreler olup embriyo ve embriyo dışındaki zar ve organlara kaynaklık ederler. Memelilerin gelişiminde zigot erişkin vücutta tüm hücre türlerine dönüşebilir. Diferansiyasyon ve proliferasyon özellikleri sayesinde organizmayı oluşturma kabiliyetindedirler. Totipotent kök hücrelerin bu kabiliyetleri döllenmeden sonraki 5. güne kadardır (136).

Pluripotent Kök Hücreler: Döllenme olayından 4-5 gün sonra oluşan blastosiste ait hücreler diferansiyasyona uğrayıp iki farklı türe dönüşür. Dış tabaka plesantayı oluşturmak üzere trofoektoderme dönüşür. İç tabakada bulunan hücreler ise embriyoyu oluştururlar. İndüklenmiş pluripotent hücreler; erişkin somatik hücrelerden de diferansiyasyon yoluyla pluripotent hale geçip embriyonik kök hücre gibi kök hücre protein genlerini eksprese edebilirler. Aynı zamanda bu hücreler

embriyoid cisimcik ve teratom oluşturma yeteneğine sahiptirler. Pluripotent hücreler, mezoderm kökenli(kemik, kas, kan, kıkırdak gibi) ektoderm kökenli (nöron, saç, deri gibi) ve endoderm kökenli (hepatositler, pankreatik beta hücreleri, sindirim sistemi hücreleri gibi) hücrelere dönüşebilirler. Pluripotent hücrelerin vücuttaki tüm hücreleri oluşturabilme yeteneğinden ötürü gerçek kök hücreler oldukları düşünülmektedir (137).

Multipotent Kök Hücreler: Yalnızca tek germ tabakasına ait hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir. Gelişimleri devam ederken hücreler daha özel işlevlere sahip olurlar. Bu erişkin hücreler özel olarak bulundukları dokuların hücre tiplerini oluştururlar. Mesela, kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreler, alyuvarlar ve akyuvarlar ile beraber plateletler gibi birçok türde kan hücresine kaynak oluşturabilirler. Yine mezenkimal kök hücrelerden kemik iliği kaynaklı olanlar fibroblast, osteoblast, kondroblast ve adipoz hücrelerine diferansiye olabilirler. Nöronal kök hücreler tüm farklı sinir hücre tiplerini oluşturabilirken bazı kök hücreler yalnızca tek bir olgun hücre türüne farklılaşabilir (korneanın yapısındaki kök hücre gibi). Kendini dönüştürme yeteneği olmayan ya da sınırlı olup tek bir hücre türüne diferansiye olabilen bu hücrelere “progenitör hücre” veya “prekürsör hücre” denir (138).

Unipotent Kök Hücreler: Farklılaşmanın en son basamağında sadece tek bir hücre tipini oluşturabilme özelliğine sahip kök hücrelerdir. Kendi kendini yenileyebilme yapısı ile kök hücre özelliğini korurlar (139).

2.9.1.2. Elde Edildikleri Döneme Göre

Elde edildikleri döneme göre kök hücreler ikiye ayrılır (135).

Embriyonik Kök Hücreler: Embriyolojik gelişimin erken evrelerinde blastosist aşamasındaki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen, vücuttaki her hangi bir farklılaşmış hücreyi oluşturma yeteneğine sahip pluripotent hücrelerdir (139).

Yetişkin Kök Hücreler: Erken embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler olarak tanımlanır. Hasarlanan dokuların yenilenmesinde görev alan bu hücreler, yaşam boyu kök hücre havuzunu yenileyerek kök hücre sayısının

azalmadan sürdürülebilmesini garanti altına alır. Yetişkin kök hücreler arasında multipotent olanların yanı sıra unipotent hücrelere de rastlamak olasıdır. Günümüzde üzerinde en çok çalışılan yetişkin kök hücre tiplerinden biri mezenkimal kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler; kemik iliği, yağ dokusu, kemik, periost, sinovyal eklemler, iskelet kası, deri, periferik kan, periodontal ligament ve pulpa dahil olmak üzere farklı kaynaklardan izole edilmiştir (140).

2.9.2 Dental Dokulardan İzole Edilen Yetişkin Kök Hücreler

Diş pulpası, son zamanlardaki çalışmalarda üzerinde önemle durulan bir kök hücre kaynağıdır. Dental pulpadaki kök hücrelerinin izole edilmesinin kolay olması, etik problemler oluşturmaması, yüksek diferansiyasyon özelliğine sahip olması, biyouyumlu materyallerle gerçekleştirilen uygulamalarda dokuların onarımında etkili bir rol oynaması ve uygun şartlarda dondurularak saklandıktan (kriyoprezervasyondan) sonra çözülendiğinde yüksek canlılık oranı sergilemesi sebebiyle kök hücre çalışmalarında kullanmak için gerekli tüm özellikleri taşımaktadır (140,141).

2011 yılında yapılan bir çalışmada, pulpa nekrozlu immatür daimi dişlerde apikal kanama uyarılmış ve kök kanalı içinde mezenkimal kök hücrelerin varlığı değerlendirilmiştir. Rejeneratif endodontik işlemler sırasında farklılaşmamış mezenkimal kök hücrelerin kök kanalı içine önemli ölçüdeki girişi ilk kez bu çalışmayla gösterilmiş olup, aynı zamanda kanal içindeki bazı mezenkimal kök hücre belirteçlerinin (CD105) salınım oranının sistemik dolaşıma göre 700 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışma rejeneratif endodontik uygulamaların kök hücre bazlı tedaviler olduğunu gösteren ilk klinik çalışmadır (142).

Dental dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücreler şöyle sıralanabilir:

- a) Dental Pulpa Kök Hücreleri (Dental Pulp Stem Cells, DPSCs)
- b) Apikal papilla kök hücreleri (Stem Cells Of The Apical Papilla, SCAP)
- c) Periodontal Ligament Kök Hücreleri (Periodontal Ligament Stem Cells, PDLSCs)
- d) Eksfoliyeli Olmuş İnsan Süt Dişi Kök Hücreleri (Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth, SHED)

- e) Dental Folikül Kök Hücreleri (Dental Follicle Stem Cells, DFSCs)
- f) Diş Germi Progenitör Hücreleri (Tooth Germ Progenitor Cells, TGPCs)

2.9.2.1. Dental Pulpa Kök Hücreleri (DPSCs)

Dental pulpa kök hücreleri ilk kez Gronthos ve ark. tarafından 2000 yılında üçüncü molar dişlerin pulpa dokusundan elde edilmiştir. 20 yaş dişleri, çekilmiş süt dişleri ve ortodontik tedavi, periodontal problem veya travma sebebiyle çekilmiş dişler başlıca pulpa kök hücre kaynaklarını oluşturmaktadır. Çekim endikasyonlarının olması ve sık bulunmaları, 20 yaş dişlerini dental pulpa kök hücre çalışmalarında tercih sebebi yapmaktadır. Ayrıca, bu dişlerin ağızda en son gelişen dişler olması sebebiyle genç bireylerde gelişimini henüz tamamlamamış, pulpa dokusu açısından oldukça zengin 20 yaş dişlerine rastlamak mümkündür.

Dental pulpa kök hücreleri kemik iliği kök hücreleri ile benzer karakteristik özelliklere sahiptir. Her iki doku benzer kök hücre belirteçlerini eksprese etmektedirler ve mineralize doku formasyonundan sorumlu matriks proteinlerine (alkalin fosfataz, osteokalsin ve osteopontin) sahiptirler (143). In vivo olarak DPSCs, hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat (HA/TCP) birleşiminden oluşan bir iskeletle immün sistemi baskılanmış farelerin deri altına transplante edildiğinde, bu hücrelerin odontoblastlara farklılaşarak dentin/pulpa benzeri bir yapı oluşturabildikleri gösterilmiştir (145).

Huang ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada DPSCs'nin dentin üzerinde büyütüldüğünde, dentin kanallarının içine doğru uzanan sitoplazmik uzantılarıyla odontoblast benzeri hücrelere dönüştüğü ortaya konmuştur (144).

2.9.2.2. Apikal Papilla Kök Hücreleri (SCAPs)

İnsana ait gelişen daimi bir dişin apeksinde konumlanan dental papilla dokusunun fiziksel ve histolojik karakteri ilk olarak Sonoyama ve ark. tarafından 2008 yılında tanımlanmış ve bu doku “apikal papilla” olarak isimlendirilmiştir. Gelişmekte olan kökün apeksine gevşek bir şekilde bağlı olan bu doku kolaylıkla kökten ayrılabilir. Apikal papillada bulunan kök hücreler pulpadan daha farklı özelliklere sahiptir (146). Daha apikalde konumlandığı için apikal papillanın

kollateral dolaşımdan faydalandığı ve böylelikle pulpa nekrozu boyunca hayatta kalabildiği düşünülmektedir. Pulpitis ya da pulpa nekrozunun ileri aşamalarında pulpa kaynaklı kök hücreler kaybedilir. Periapikal bölgedeki kök hücrelerin bir araya gelmesi ya da kan akımıyla kanal içine gönderilmesi zor olsa da mümkün olabilir (147).

Yapılan çalışmalarda güncel rejeneratif endodontik prosedürlerin bir basamağı olan apikalden kanamanın uyarılması sırasında apikal alanda bulunan kök hücre ve büyüme faktörlerinin fibrin pıhtı içine yerleşmesiyle pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonunun indüklendiği gösterilmiştir (148).

Sonoyama ve ark. tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada, SCAP'nin DPSCs'nden farklı olup olmadığını incelemek amacıyla aynı diştten izole edilen DPSCs ve SCAP aynı koşullar altında kültüre edilmiştir. Sonuç olarak SCAP'nin, daha yüksek hızda popülasyonunu ikiye katladığı, doku rejenerasyon kapasitesinin daha yüksek olduğu, daha fazla kök hücreye özgü pozitif yüzey antijeni (STRO-1) içerdiği ve daha yüksek seviyede antiapoptotik protein (survivin) eksprese ettiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada elde edilen SCAP, HA/TCP bileşiminden oluşan bir iskeleyle immün sistemi baskılanmış farelere transplante edilmiş ve HA/TCP yüzeyi üzerinde bağ dokusu ile birlikte tipik bir dentin tabakasının oluştuğu tespit edilmiştir. SCAP'nin henüz gelişmekte olan bir diştten elde ediliyor olması, bu hücrelerin DPSCs'ne kıyasla daha erken dönem kök hücre olduğu kanaatini uyandırmaktadır. SCAP'nin kök dentininin oluşumundan sorumlu olan primer odontoblastların, DPSCs'nin ise reperatif dentin üretmekten sorumlu olan odontoblastların kökeni olduğu düşünülmektedir. Bu da SCAP'nin doku onarımında DPSCs'ne kıyasla daha üstün olduğu anlamına gelebilir (149).

2.9.2.3. Periodontal Ligament Kök Hücreleri (PDLSCs)

Periodontal ligament, sement ile alveol kemiğin iç duvarı arasında yerleşmiş, dişi çeneler içinde destekleyen ve karmaşık vasküler yapıya ve çok sayıda hücre içeriğine sahip yumuşak bağ dokusudur. PDLSCs, farklı hücre gruplarına farklılaşma potansiyeli olan heterojen bir hücre topluluğundan oluşmaktadır (150,151).

Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda PDLSCs'nin sement, periodontal ligament ve alveolar kemik gibi periodontal dokuları rejenere etme yeteneği ortaya konmuştur (150). Sonoyama ve ark. (2006) ise PDLSCs'ni immün sistemi baskılanmış farelere transplante etmiş ve bu hücrelerle fonksiyonel bir periodonsiyumun başarıyla oluşturulabileceğini göstermiştir. PDLSCs mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerini göstermeleri ve multipotansiyel farklılaşma kapasiteleri sayesinde mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanıldığı için klinik açıdan büyük öneme sahiptir (152).

2.9.2.4. Eksfoliye Olmuş İnsan Süt Dişi Kök Hücreleri (SHEDs)

SHED, fizyolojik düşme zamanı gelmiş süt dişlerinin pulpasından izole edilmektedir. Odontoblast, adipositler ve nöral hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir ve SHED'nin in vivo koşullar altında kemik oluşumu ve dentin üretimini indüklediği gösterilmiştir (221). SHED'nin özellikle lamelli yapıda kemik benzeri bir matriks oluşumunu indükleyebildiği gösterilmiştir (153). Sahip olduğu bu farklı özelliğin süt dişinin kendi doğasından kaynaklı olduğu, yani kök rezorpsiyonu ve kökü çevreleyen yeni kemik oluşumunun eş zamanlı gerçekleşiyor olmasıyla açıklanabileceği öne sürülmüştür. Kemik iliği kök hücreleri ve DPSCs ile karşılaştırıldığında, SHED'nin daha yüksek proliferasyon kapasitesine ve hücre sayısını iki katına çıkarma hızına sahip olduğu tespit edilmiştir (154).

2.9.2.5. Dental Folikül Kök Hücreleri (DFSCs)

Diş folikülü gelişen diş germini saran mezenkimal dokudur. Dişin kök gelişimi süresince dental folikül kök hücreleri tarafından, sement, periodontal ligament, alveolar kemiği hücreleri oluşturulur. Gömük yirmi yaş dişlerinin çekimi sırasında alınabilen diş foliküllerinin kolaylıkla izole edilmesi bu hücrelerin kolay ulaşılabilir bir kaynak olmasını sağlar. Gömülü üçüncü büyük azı dişlerinin foliküllerinden izole edilen DFSCs'nde farklılaşmamış hücrelere özgü yüzey antijenlerinden olan Nestin ve Notch-1 ekspresyonu görülmüştür (155). Uygun ortamda DFSCs'nin sement, kemik, sinir hücreleri ve adipositlere farklılaşabildiği gözlenmiştir (156).

2.9.2.6. Diş Germi Progenitör Hücreleri

Diş germi (pulpa ve çevresindeki dokular), embriyonik gelişim boyunca ektomezenkimal etkileşimler sonucu oluşan bir yapıdır. Buradaki progenitör hücreler dental organ, dental papilla ve dental foliküle farklılaşırlar (157).

TGPCs ilk kez Ikeda ve ark. (2008) tarafından çan evresinin geç dönemindeki üçüncü molar diş germinden izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Yüksek proliferasyon kapasitesine sahip bu hücrelerin, in vitro koşullarda üç germ yaprağından köken alan osteoblast, sinir hücreleri ve hepatositlere dönüşebilme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. İnsanda 6 yaş civarı, üçüncü molardan elde edilen diş germi dokuları henüz organogenezis aşamasındadır. Üçüncü molarlarda organogenezisin doğumdan sonra gerçekleşmesi, yani buradaki embriyonik dokuların bu zamana kadar farklılaşmamış olması bu dokuyu eşsiz kılmaktadır. Bu nedenle üçüncü molarların diş germinden elde edilen kök hücrelerin, yetişkin hastalarda gerçekleştirilen kök hücre bazlı tedavilerdeki önemini göz ardı etmemek gerekir (158).

2.9.3 Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

Kök hücre biyolojisi ve klinikte kullanılabilirlikleri üzerine çalışmalar hızla artmaktadır. Kök hücreler bazı özelliklerinden dolayı, diğer hücrelerden farklıdırlar (159). Düşük düzeyde immünojeniteleri nedeniyle hücresel tedavilere en iyi aday olan mezenkimal kök hücreler, yaygın olarak kullanılan dört farklı yöntemle karakterize edilmekte ve izolasyonu yapılmaktadır. Bunlardan ilki hücrelerin spesifik antikorlarla boyandıktan sonra, akan hücre ölçer (flow cytometer) kullanılarak kök hücre karakterizasyonunun yapıldığı floresan aktive hücre ayırma tekniğidir (fluorescence-activated cell sorting, FACS). Diğerleri ise immünomanyetik boncuklar kullanılarak, immünohistokimyasal boyama yapılarak ve son olarak da fenotip, kemotaksi, çoğalma, farklılaşma ve mineralizasyon gibi fizyolojik ve histolojik kriterler kullanılarak kök hücrelerin karakterize edilmesi ve ayrılmasıdır (148).

3. MATERYAL METOD

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden (DÜSAM) temin edilen, 28 adet 10-12 haftalık, ortalama 300 ± 50 gram ağırlığındaki, sağlıklı, Sprague-Dawley cinsi erişkin erkek sıçanlar üzerinde yürütüldü. Çalışmanın içeriği, Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (DÜHADEK) 26.02.2020 tarih, 02/2020 protokol ve 03 nolu karar ile onaylandı.

Deney hayvanlarının ameliyatlarını ve sakrifikasyonlarını içeren deneysel kısım DÜSAM'da, kök hücrelerinin eldesi Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde, histolojik ve histomorfometrik incelemeleri ise Dicle Üniversitesi, 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 ise 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. Güç değerini optimum (%80) tutarak örneklem sayısı belirlemek, etik açıdan oluşabilecek sakıncaları ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle bizim çalışmamızda araştırmaya başlamadan önce kullanılacak hayvan sayısına karar verilmede uygulanacak istatistiksel yöntem ve daha önce yapılmış benzer çalışmalar belirleyici olmuş ve gerekli minimum örneklem sayısı güç değeri optimum tutularak belirlenmiştir.

Deney süreleri boyunca 21 ± 10 C sıcaklıkta, bağıl nem oranı % 40-60, ışık periyodu 12 saat aydınlık 12 saat karanlık standardını sağlayacak şekilde ortamda, ameliyat sonrası 7 denek aynı metal kafes içinde olacak şekilde muhafaza edilecektir.

Deney hayvanları, % 21 protein içeren standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. 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 biyomateriyaller arası etkileşimin önlenmesi amaçlandı. Çalışmaya dahil edilen 28 adet Spraque- Dawley cinsi deney hayvanları rastgele 4 gruba ayrıldı ve her grupta 7 adet rat olacak şekilde gruplar oluşturuldu.

- Grup 1: Kontrol; Oluşturulan defekt bölgesinin kendi kendine iyileşmesi beklendi

- Grup 2: Nigella Sativa sistemik olarak verilerek oluşturulan defekt bölgesinin iyileşmesi beklendi.

- Grup 3: Kök hücre verilen ratlarda oluşturulan defekt bölgesinin iyileşmesi beklendi.

- Grup 4: Kök hücre ve Nigella Sativanın birlikte uygulandığı ratlarda oluşturulan defekt bölgesinin iyileşmesi beklendi.

3.1 Nigella Sativa'nın Dozu, Hazırlanışı, Uygulanma Yolu

Çalışmada kullanılacak olan Nigella Sativanın aktif formu olan timokinon (kod:27466 SİGMA-ALDRICH/ALMANYA) mısır yağında çözülmüş halde 10 mg/kg/gün 4 hafta boyunca günde 1 kez 4-F feeding katater ile oral gavaj yoluyla 2. ve 4. gruba verildi.

3.2 Dental Pulpa Mezankimal Kök Hücrelerinin Eldesi ve Uygulanma Yolu

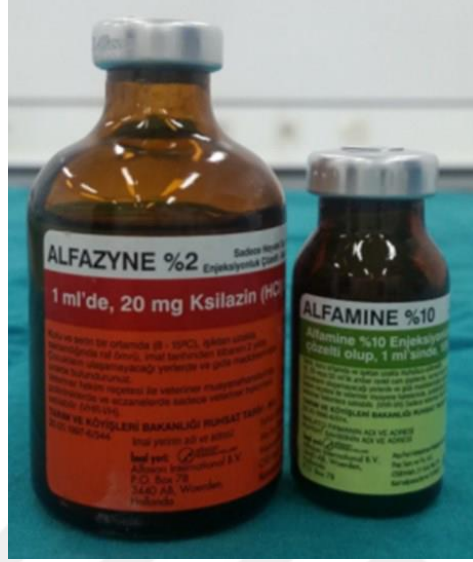
Sprague Dawley soyundan iki yetişkin erkek deney hayvanından anestezi altında (Ketamine: 75-90 mg/kg + xylazine 5-8 mg/kg, IP olarak uygulandı) alt azı dişlerinden diş çekimi yapıldı. Çekilecek dişlerden dental pulpa kök hücrelerinin (DPKH) çıkarılması için dişler neşter yardımıyla ufak parçalara ayrıldıktan sonra %0.1 kolajenaz ve % 0.25 tripsinetilendiamintetraasetik asit içeren fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde süspanse edilip 37 ° C'de 30-60 dakika arasında inkübe edildi. 70 mm'lik hücre filtrelerinden geçirilerek süspansyondaki DPKH'lar mikroskop altında morfolojik olarak incelendi ve hücrelerin sayımı hemositometre aracılığı ile yapılarak 100 mm plastik petri tabağa 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

DPKH'lar büyütölmek için inkübatöre alındı ve 37 ° C, doymuş nem ve %5'lik CO2 koşullarında inkübe edildi. İnkübasyonu yapılacak hücreler 5.5 mmol/L glukoz, 20% fetal sığır serumu ve %1 penisilin streptomisin içeren alfa modifiye Eagle vasatında büyütöldü. Hücrelerin %70-80 konfluent duruma gelince iki defa daha pasajlandı ve üçüncü pasaj (P3)'da hücreler deneylerde kullanılmak üzere karakterize edildi. Deney hayvanları uygulamasına geçilmeden önce hücrelerin mezankimal kök hücre olduğu ve farklılaşma yeteneği test edildi.

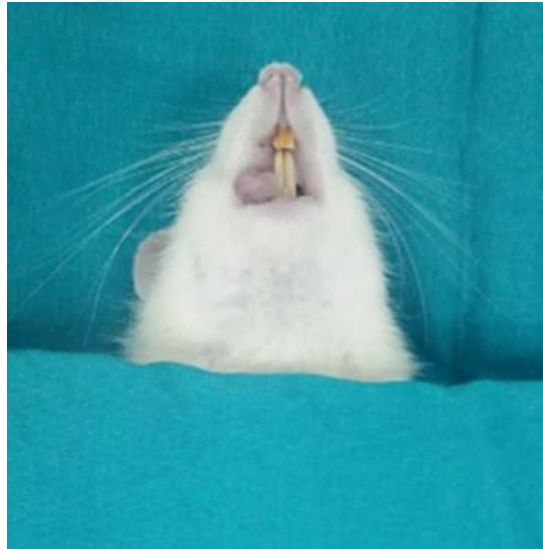
Mezankimal kök hücrelerin (MKH) varlığı FACS yöntemi ile CD45 PC5, CD44 PE, CD105 FITC veSTRO-1 PE antikorları ile tespit edildi. DMKH'ların CD44, CD105 ve STRO-1 pozitif ve CD45 negatif olması beklendi. Bu analiz için 20000-50000 hücre kullanılmış olup, MKH hücrelerinin varlığı ve oranı tespit edildi. DPKH'ların farklılaşma yeteneği için osteojenik farklılaşma test edildi. Osteojenik farklılaşmayı indöklmek için OriCell™ osteogenez farklılaşma kiti (Cyagen, Guangzhou, Çin) kullanıldı ve hücreler bu kit ile 3 hafta boyunca her 3 günde bir vasatın değıştirilmesi ile osteogeneze indöklendi. 3 hafta sonrasında Alizarin kırmızısı çözeltilisi ile hücreler boyandı ve 3-5 dakikalık inkübasyon sonrası osteogenez tespiti yapıldı. Bu testlerden sonra deney hayvanlarına DPKH'lar 1×10^7 hücre olacak şekilde kuyruk damarından IV olarak verildi. Kontrol grubuna ise salin enjeksiyon yapıldı. Hayvanlar normal beslenme ve büyütölmek koşullarına geri bırakıldı.

3.3 Diş Çekimi Yöntemi

Asepsi ve antisepsi kurallarına uyularak deneklerin tümüne anestezi için intramuskuler yolla ketamin hidroklorür 75-90 mg/kg ve ksilazin hidroklorür 5-8 mg/kg, enjeksiyonu yapıldı. Operasyon sahası açıkta kalacak şekilde steril örtüler ile örtöldü (Şekil 3.2). Lokal hemostaz amacıyla operasyon bölgesine 0,5 cc, 0,006 mg/ml epinefrin içeren %4'lük artikain (Ultracain D-S Forte-Aventis, İstanbul, Türkiye) ile infiltratif lokal anestezi uygulandı. Steril ameliyat takımındaki aletlerle (Şekil 3.3.-3.4.) sıçanın dil ve yanağı ekarte edildikten sonra ucu kıvrık hemostat yardımı ile lüksasyon uygulayarak deneklerin alt sol 1. ve 2. büyük azı dişleri çekildi (Şekil 3.5.). Hemostazı sağlamak için steril tampon uygulandı ve daha sonra çekim bölgeleri 4-0 vicryl (Doğsan, Türkiye) ile sötüre edildi.



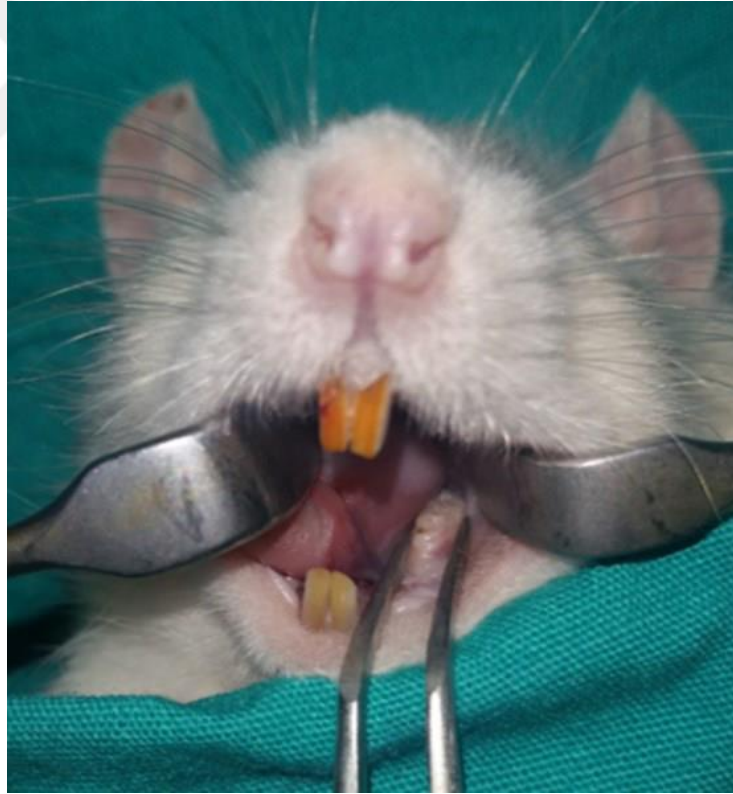
Şekil 3.1. Ketamin hidroklorür (%10 Alfamine, Alfasan, Hollanda) ve Ksilazin hidroklorür (%2 Alfazyne, Alfasan, Hollanda)



Şekil 3.2. Deney hayvanının steril örtüler ile örtülmesi



Şekil 3.3. Ameliyat ve diş çekimi için kullanılan steril aletler



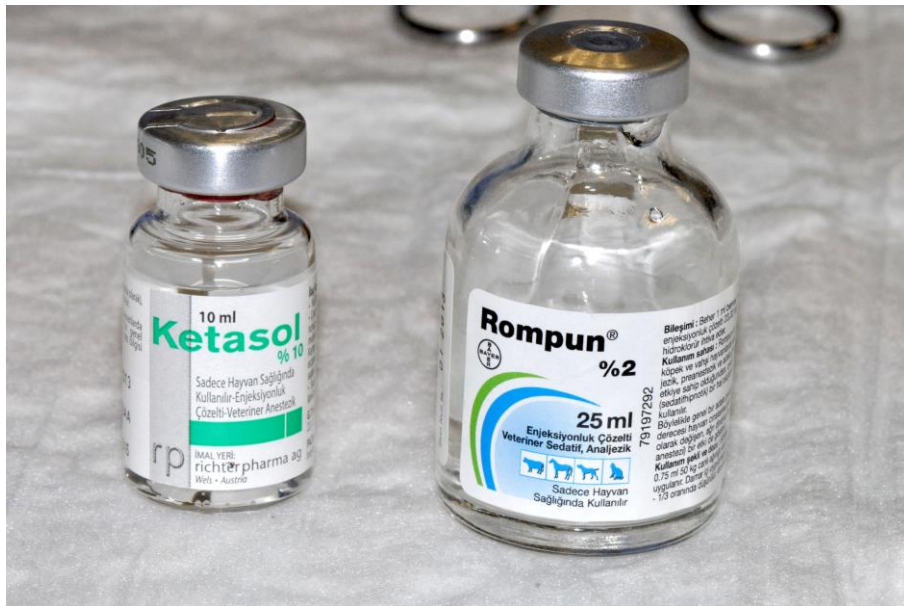
Şekil 3.4. Sıçanların dil ve yanağının steril aletlerle ekarte edilmesi



Şekil 3.5. Alt sol 1. ve 2. büyük azı dişlerin çekilmesinden sonra oluşan çekim yarası ve çekilmiş dişler.

3.4. Cerrahi Aşamalar

Veteriner hekim gözetiminde; 75-90 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketasol R, Richterpharma, Avusturya) ve hem analjezik hem de anestezik olarak %2'lik 5-8 mg/kg Ksilazin hidroklorid (Rompun R, Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti, İstanbul, Türkiye) intramüsküler (IM) enjeksiyonu ile deneklerin genel anestezisi sağlandı (Şekil 3.6.). Genel anestezi sırasında oftalmik komplikasyonların engellenmesi amacı ile sıçanların gözlerine basitrasin ve neomisin sülfat pomadı (Thiocillin R 5g, Abdi İbrahim, Türkiye) sürüldü (Şekil 3.7.). Sıçanlar ısıtıcı lamba altında masaya yatırıldı.



Şekil 3.6. Deneklerin genel anesteziinde kullanılan ilaçlar.



Şekil 3.7. Sıçanların gözlerine oftalmik komplikasyonların önlenmesi amacıyla pomadın sürülmesi.

3.5. Tibia Kemiğinde Defekt Bölgesinin Oluşturulması

Genel anestezi altındaki denekler, standart postüre getirilip sabitlendikten sonra sol bacaklarının medial yüzeyi traş makinesi ile traşlandı (Şekil 3.8.). Jetokain (Adeka 2ml; Türkiye) ile IM olarak lokal anestezi uygulandı (Şekil 3.9.). 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 (Şekil 3.10.-3.11.). İnsizyon sonrasında flep, periost elevatörü ile subperiosteal olarak kaldırıldı ve kemik açığa çıkartıldı (Şekil 3.12.).



Şekil 3.8. Sıçanların bacağına işlem öncesi traşlanması



Şekil 3.9. İşlem öncesi sıçanların bacağına lokal anestezi yapılması



Şekil 3.10. İnsizyon hattının belirlenmesi.



Şekil 3.11. 15 nolu bisturi ucuyla insizyonun yapılması



Şekil 3.12. Kemiğin açığa çıkartılması

Kemiğin kolaylıkla görülebildiği rahat bir çalışma ortamının sağlanması sonrası fizyodispanlere bağlı mikromotor -anguldruva ve ucundaki trefan frez ile 200-400 devir/dakikada steril serum fizyolojik irrigasyonu altında kemik defekti oluşturuldu (Şekil 3.13.). Açılan defektler periodontal sonda yardımı ile kontrol edildi (Şekil 3.14.). Bu işlemler esnasında defekt alanı içerisindeki kemik, doku penseti yardımıyla blok halinde çıkarıldı (Şekil 3.15.).



Şekil 3.13. Anguldruva ve ucundaki trefan frez ile defekt oluşturulması



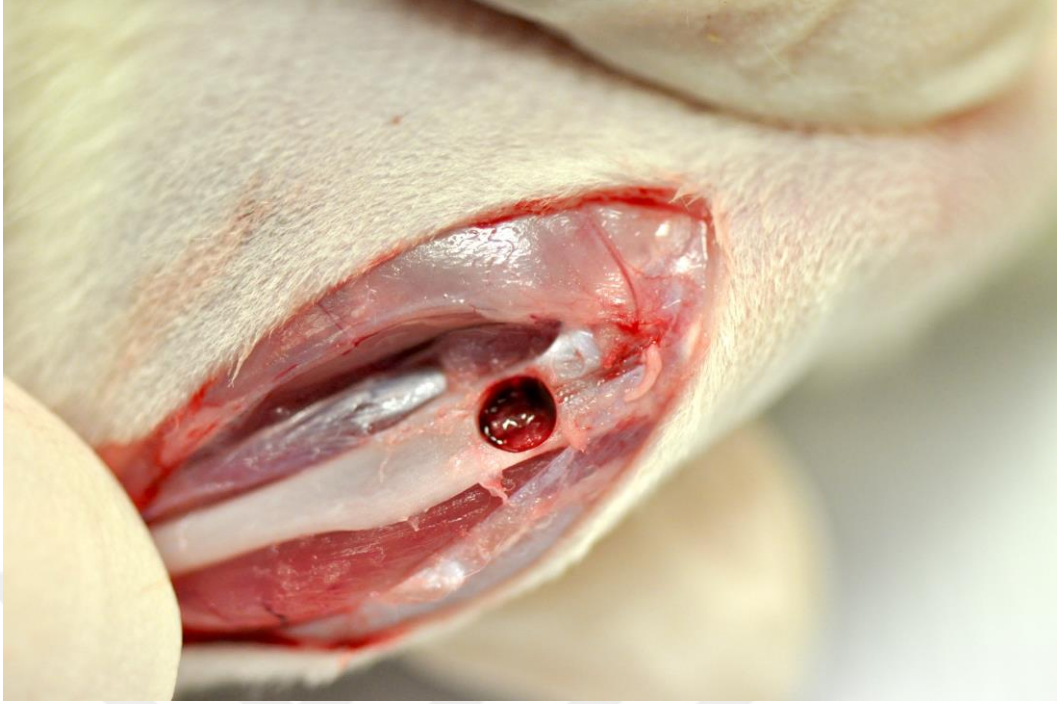
Şekil 3.14. Defekt alanının sınırlarının belirlenmesi



Şekil 3.15. Kemğin doku pensetiyle blok şeklinde çıkartılması



Şekil 3.16. Oluşturulan defektin görünümü



Şekil 3.17. Kontrol grubunda açılan defektin görünümü

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



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



Şekil 3.19. Periost ve kasın suture edilmesi

Periost ve kasın suture edilmesinden sonra mezenkimal kök hücreler, kök hücre ve timokinon + kök hücre gruplarına insülin enjektörü yardımı ile uygulandı.



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

Sıçanların lokal saha temizliği Batikon (providon iyot solüsyonu) (Bonmed Sağlık Ürünleri ve Makine San. Tic. Ltd. Şti. Türkiye) ile yapıldı (Şekil 3.21.). Enfeksiyon kontrolü amacıyla post-operatif 30 mg/kg Sefazolin intramüsküler (i.m) olarak uygulandı. Denekler metal kafeslerde uyanma odasına alındı ve post-operatif dönemde ağızdan beslenen deneklere ameliyattan sonraki ilk beş gün boyunca, günde 1 kez olmak üzere 30 mg/kg Sefazol (i.m) ve Carprofen 4 mg/kg subkütan olarak uygulandı.



Şekil 3.21. Sıçanların bacaklarına batikon uygulanması (Bonmed Sağlık Ürünleri ve Makina San. Tic. Ltd. Şti. Türkiye)

Tüm denekler 28. günün sonunda, veteriner hekim yardımıyla cam kavanozda 30 ml izofluran (Isoflurane-USP, Adeka İlaç ve Kimyasal Ürünler San. Ve Tic. A. Ş. Türkiye) ile sakrifiye edildi (Şekil 3.22-3.23.-3.24.).



Şekil 3.22. Sıçanlara subkütan carprofen 4 mg/kg enjeksiyonunun uygulaması.



Şekil 3.23. Tibiadan kas bağlantılarının ayrılması işlemi.



Şekil 3.24. Diseke edilen tibianın görünümü

Sakrifikasyon işlemleri sonrasında deney hayvanlarının tibiaları, içerisinde %10'luk nötral formaldehit (PH=7.4) bulunan önceden etiketlenerek belirlenmiş biyopsi kaplarına sırasıyla yerleştirildi. Doku örnekleri (n=28) histopatolojik ve

histomorfometrik incelemeler için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında takibe alındı.

3.6. Tibia Dokusunun Takibi

Tibia dokuları ilk önce %10'luk nötral formalin solüsyonuna alınarak rutin paraffin doku takibine başlandı. Fiksasyon (24 saat) işleminden sonra dokular %10'luk seyreltilmiş formik asit solüsyonunda dekalsifikasyon işlemi için 1 ay süreyle bekletildi. Yumuşayan kemik dokuları 6 saat akar çeşme suyu altında bekletildi. Dokular %50, %70, %80, %90, %96 ve absöü etil alkol serilerinden geçirildi ve şeffaflaştırma işlemi için ksilende 3 kere 45 dakika bekletildi. Son olarak dokular infiltrasyon için 58°C' de parafin yağına alındı. Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü ve mikrotom (katalog no: Leica RM2265, Wetzlar, Germany) yardımıyla Hematoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyamalar için bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı.

3.7. Hematoksilen-Eozin Boyama

Parafin bloklardan alınan tibial doku kesitleri 37°C'ye ayarlanmış benmariye alındı. Lam üzerinde fazla parafini eritmek için kesitler 58-62°C etüvde 6 saat boyunca bekletildi. Kesitler 3x15 dakika ksilende deparafinize edildi. Kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70, %50 etil alkol) 10'ar dakika geçirildi ve distile suya getirilerek 5 dakika bekletildi. Harris Hematoksilen boyasında 8 dakika bekletildikten sonra kesitler akan su altında 5 dakika yıkandı. Kesitler durulandı ve alkolik eozin boyasında 6 dakika bekletildi. Kesitler artan alkol serilerine (%80, %90, %96 etil alkol serilerinden geçirilerek) hızlıca daldırıldı ve absöü alkolde 2 dakika bekletildi. Son olarak kesitler 3x15 dakika ksilende bekletildi ve doku üzerine Entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.8. İmmünohistokimyasal Boyama

Parafin bloklardan alınan kesitler 37°C' ye ayarlanmış benmariye ve buradan polisilinli lamlara alındı. Lam üzerinde fazla parafini eritmek için kesitler 58-62°C etüvde 6 saat boyunca bekletildi. Kesitler 3x15 dakika ksilende deparafinize edildi. Kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70, %50 etil alkol) 10'ar

dakika geçirildi ve distile suya getirilerek 5 dakika bekletildi. Kesitler fosfat tampon solüsyonunda (PBS) 3x5 dakika yıkandı. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) buffer solüsyonuna (pH: 8.0, katalog no: ab93680, Abcam, Cambridge, USA) alındı ve ısı-indüklü epitope retrieval işlemi gerçekleştirildi. 20 dakika oda sıcaklığında bırakılan kesitler tekrar PBS'e alındı. Kesitler immunohistokimya barına dizildi, barın nemliliği ve sıcaklığı kontrol edildi. Kesitlere hidrojen peroksit solüsyonu (katalog no: TA-015-HP, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılıp 20 dakika inkübe edildi. Ardından PBS ile 3X5 dakika yıkama yapıp, Ultra V Block (katalog no: TA-015-UB, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) solüsyonunda 7 dakika bekletildi. Kesitler, anti-BMP-2 (katalog no: sc-137087, Santa Cruz Biotechnology, 10410 Finnell St, Dallas, Texas 75220, US) ve anti-BMP-4 (katalog no: sc-393329, Santa Cruz Biotechnology, 10410 Finnell St, Dallas, Texas 75220, US) antikorları ile bir gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün kesitler oda sıcaklığına bırakılarak 30-60 dakika bekletildi. PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine biotinli sekonder antikor (katalog no: TP-015-BN, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılıp 14 dakika kadar inkübe edildi. Daha sonra streptavidin-peroxidase (katalog no: TS-015-HR, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılıp 15 dakika beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı. Yıkanan kesitlerin üzerine Diaminobenzidin (DAB) (katalog no: TA-001-HCX, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılıp reaksiyon mikroskop altında izlendi ve PBS ile durduruldu. Harris hematoksin ile zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler entellan (katalog no:107961, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) ile kapatılıp, Zeiss Imager A2 fotomikroskopunda değerlendirilip, görüntülendi.

3.9. İstatistiksel yöntem

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro wilk testi ile test edilmiş, normal dağılmayan özelliklerin 2 den fazla bağımsız grupta karşılaştırılmasında ise Kruskal Wallis ve Dunn çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 24.0 paket programı kullanılmış ve $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

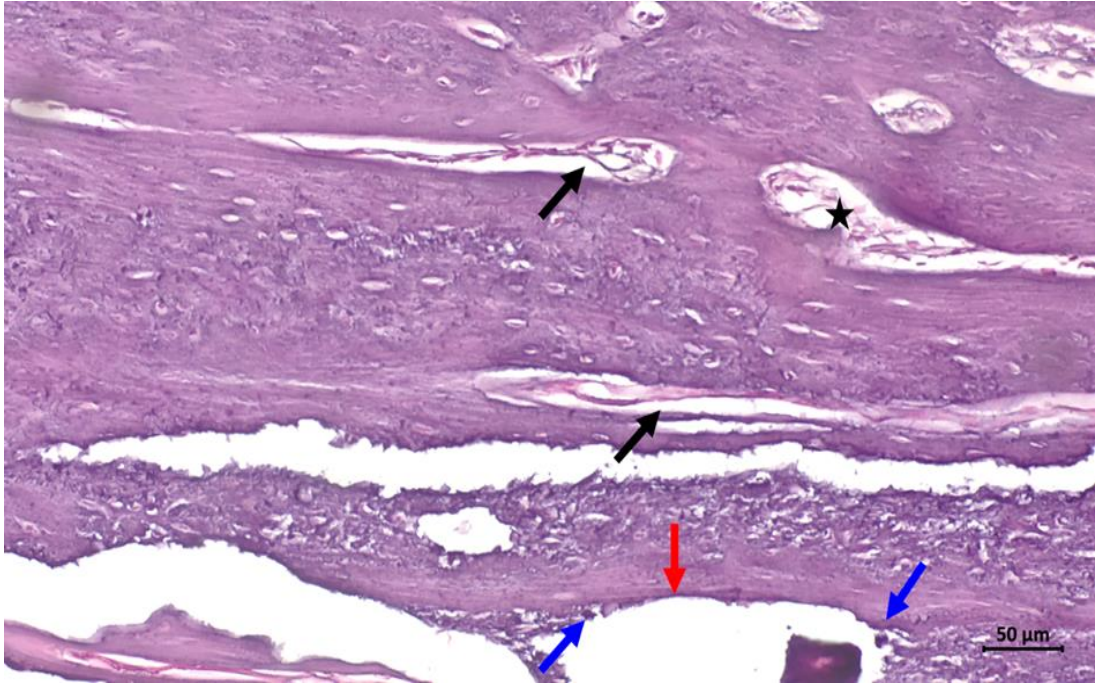
4. BULGULAR

Araştırmamızda her grupta 7 adet olmak üzere toplam 28 adet Sprague-Dawley cinsi ortalama 350 gr ağırlığında yetişkin erkek rat kullanılmıştır. Çalışmamız, Kontrol Grubu (K), Timokinon (TQ) Kök hücre (KH), Timokinon + Kök Hücre (TQ + KH) olmak üzere 4 gruptan oluşmuş ve her gruptan 7 hayvan 4. hafta sonunda sakrifiye edilerek çıkarılan dokular fiksatif solüsyon içinde histomorfolojik olarak incelemeye tabi tutulmuştur. Deneysel çalışma süresince ratların uygulanan cerrahi işlemi iyi tolere ettiği, beslenmeleri açısından herhangi bir olumsuzluk gelişmediği, operasyona bağlı herhangi bir enfeksiyon oluşmadığı ve deneklerin genel sağlık durumlarının iyi olduğu gözlemlendi.

4.1. Histopatolojik Bulgular

4.1.1. Dördüncü Hafta Histopatolojik Bulgular

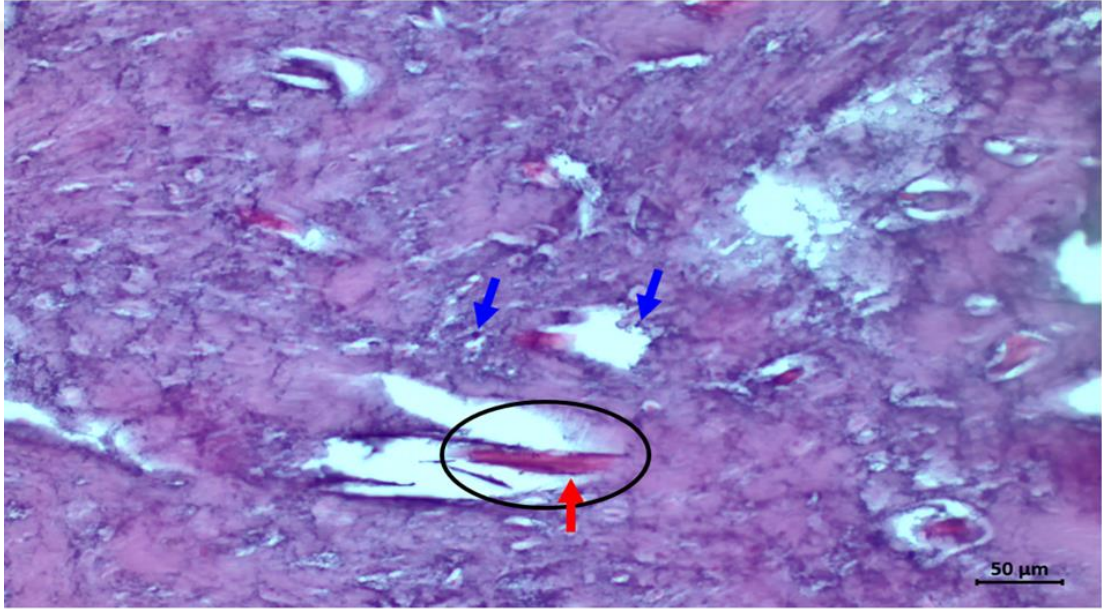
4.1.1.1. Kontrol Grubu



Şekil 4.1. Dördüncü haftada kontrol grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (→): Kan damarları, (→): Osteoblast hücreleri, (→): Osteoklast hücreleri, (★): İnflamatuar hücreler. H-E boyama, bar skala 50 µm.

Sakrifiye edilen ratların kontrol grubunda tibia kemiğe ait defekt oluşturulan bölgedeki kesitler histopatolojik olarak incelendiğinde, özellikle kan damarlarında aşırı dilatasyon ve yer yer konjesyonel alan gözlenirken (siyah oklar), inflamasyonun belirgin olarak özellikle kan damarları çevresinde tek bir alan olarak yoğunlaştığı görüldü. Osteoblastik hücrelerin (kırmızı ok) de hafif dejenere olduğu ve aynı şekilde osteoklast hücrelerinin (mavi oklar) fazla sayıda olduğu tespit edildi. En belirgin özelliklerden birisi inflamatuvar hücrelerde (yıldız) yoğun bir artışın görülmesiydi. (Şekil 4.1.)

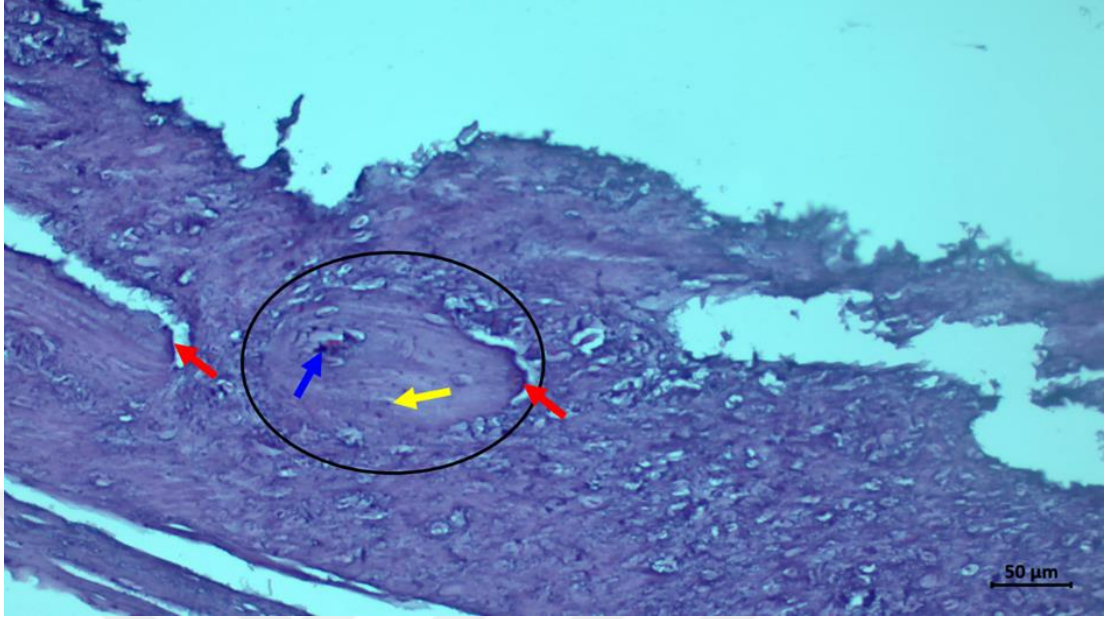
4.1.1.2. Timokinon Grubu



Şekil 4.2. Dördüncü haftada timokinon grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (→): Osteoklast hücreleri, (→): Osteoblast hücreleri, (○): Kemik trabekülleri. H-E boyama, bar skala 50 µm.

Tibial kemiğin longitudinal kesitinde defekt alanının bulunduğu yerlerde osteoklastların (mavi oklar) belirgin olduğu ancak küçük kemik trabeküllerinin daha hazırlık evresinde sadece osteoblastlarının (kırmızı ok) belirginleşmeye başladığı çok hafif düzeyde ekstrasellüler matriks yapısının ortaya çıktığı, pembemsi alan olarak gördüğümüz yerlerde küçük kemik trabeküllerinin (siyah daire) oluşmaya başladığı görüldü. Ara bağ dokuda yoğun bir kollajen doku artışı izlendi. (Şekil 4.2.)

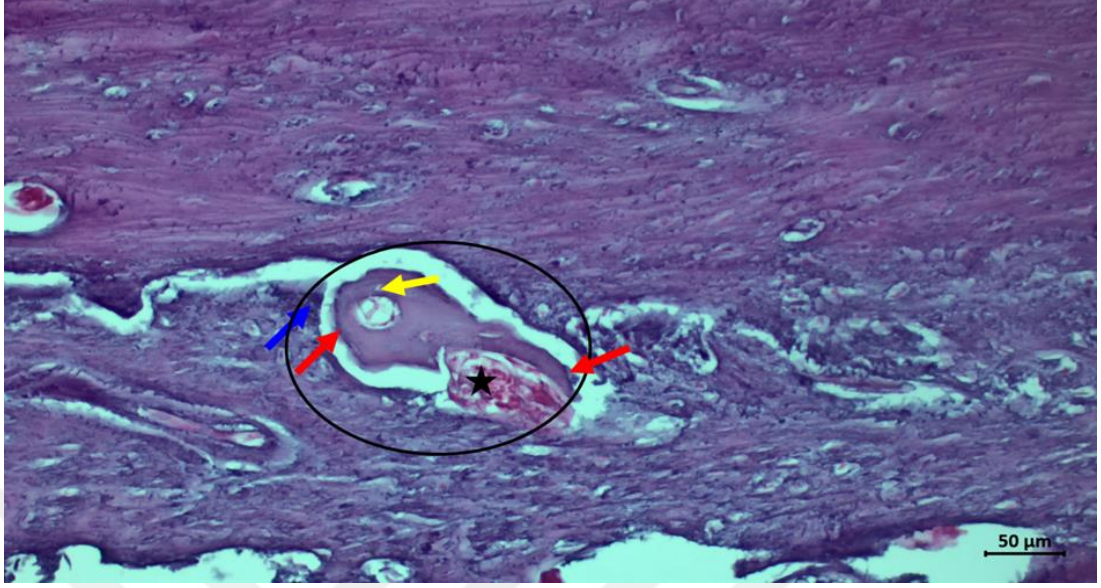
4.1.1.3 Kök Hücre Grubu



Şekil 4.3. Dördüncü haftada kök hücre grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (→): Osteoblast hücreleri, (→): Osteoklast hücreleri, (→): Osteosit, (○): Kemik trabekülleri. H-E boyama, bar skala 50 µm.

Tibial kemiğin longitüdüinal kesitinde defekt alanının bulunduğu bölgelerde osteoklastik aktivitenin (mavi ok) azalmasına bağlı osteoblastlarda (kırmızı okları) belirgin bir artış tespit edildi ve yer yer yeni kemik trabeküllerinin (siyah daire) oluşmaya başladığı görüldü. Bazı alanlarda küçük osteosit (sarı ok) yapılarına rastlanması sebebiyle matriks yoğunluğunun arttığı görüldü. (Şekil 4.3.)

4.1.1.4. Kök Hücre + Timokinon Grubu



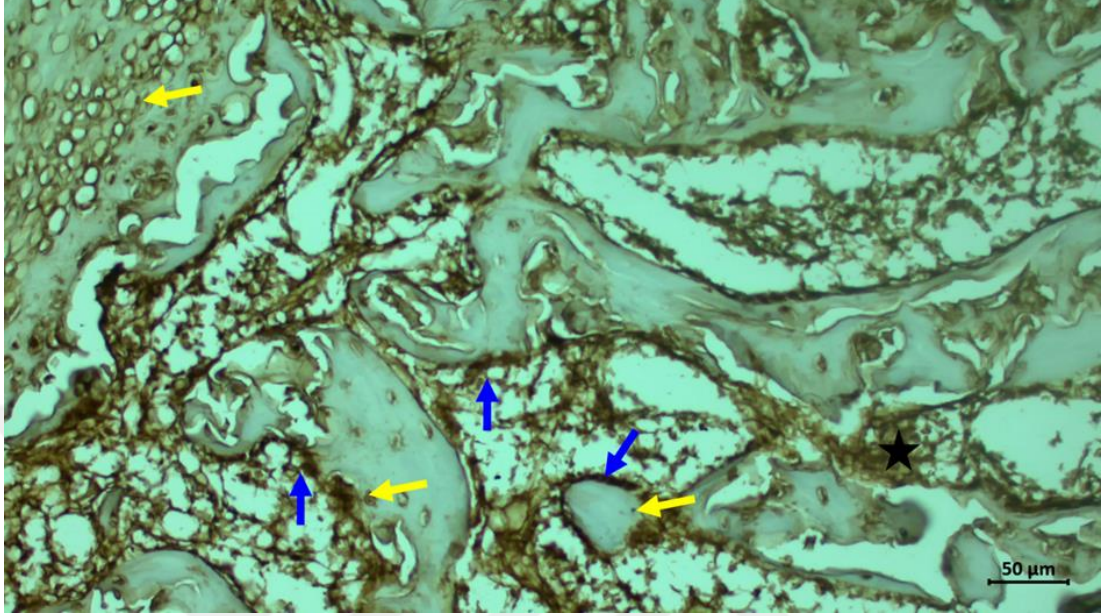
Şekil 4.4. Dördüncü haftada kök hücre + Timokinon grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü: (→): Osteoblast hücreleri, (→): Osteoklast hücreleri, (→): Osteosit hücreleri, (○): Kemik trabekülü, (★): Kemik iliği elemanları. (H-E boyama, bar skala 50 µm.)

Tibial kemiğin özellikle endosteal bölgeye yakın olan kısımlarındaki defekt alanında osteoklastik aktivite (mavi ok) azalması sebebiyle yeni kemik trabeküllerinin ortaya çıktığı (siyah daire) görüldü. Kemik trabeküllerindeki osteoblastların (kırmızı oklar) artması ile birlikte trabekülün orta kısımlarına doğru kanal sisteminin belirmeye başladığı, aynı şekilde osteositlerin (sarı ok) de yavaş yavaş laküner evreye geçtiği görüldü. Bu kemik trabeküllerinin arasında da yer yer yeniden yapılanma (reorganizasyon) şeklinde kemik iliği yapısını oluşturacak elemanlar da belirmeye başladı (yıldız). (Şekil 4.4)

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. BMP-2

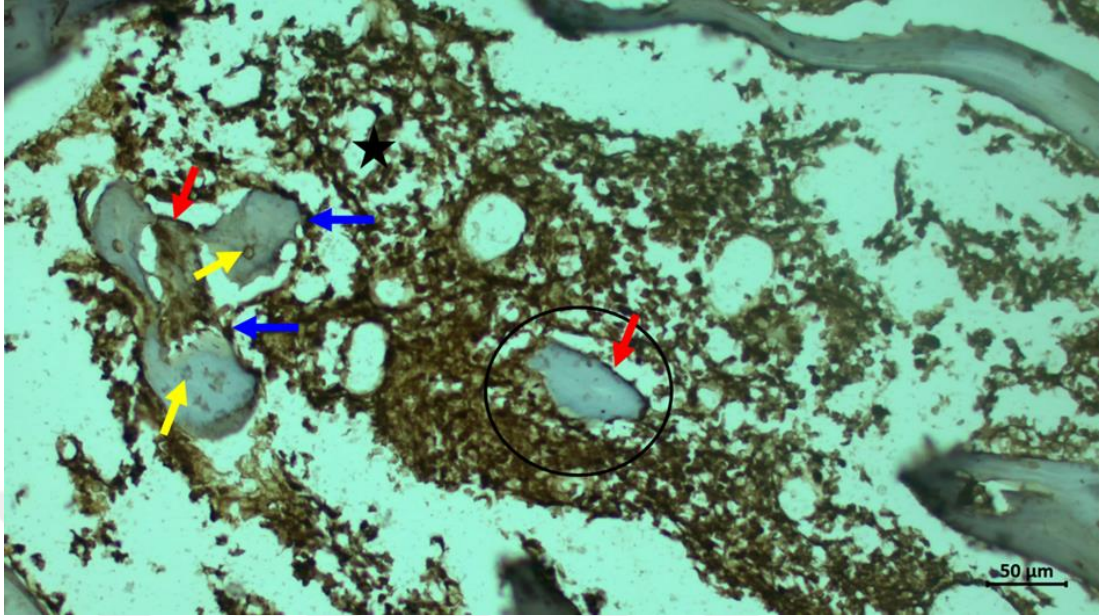
4.2.1.1. Kontrol Grubu



Şekil 4.5. Dördüncü haftada kontrol grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (★): Bağ dokusu ve kollajen, (→): Osteoklast hücreleri, (→): Osteosit hücre nükleusları. İHK. Boyama, bar skala 50 μ m.

Tibial kemik bölgesinde defekt alanı içerisinde yoğun inflamasyon artışı ile birlikte bağ dokunun ve kollajenin arttığı görüldü (yıldız). Kırılan kemik trabeküllerinin dış kısmına doğru ve yeni kemik gelişiminin olduğu alanlarda osteoklastik aktivitenin belirgin artış gösterdiği ve BMP-2 reaksiyonunun pozitif olduğu tespit edildi (mavi oklar). Aynı şekilde periferde ve yeni kemik trabeküllerindeki osteosit hücre nükleuslarında (sarı oklar) BMP-2 reaksiyonunun pozitif olduğu ve artış gösterdiği görüldü. (Şekil 4.5.)

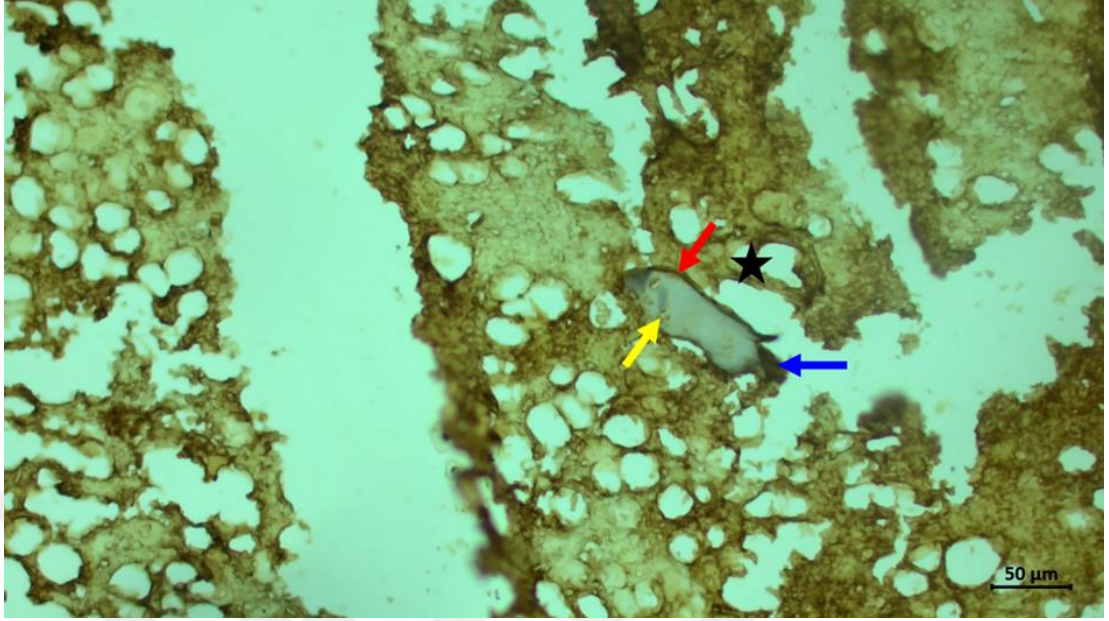
4.2.1.2. Timokinon Grubu



Şekil 4.6. Dördüncü haftada Timokinon grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (★): İnflamatuvar hücreler, (○): Kemik trabekülleri, (→): Osteoblast hücreleri, (→): Osteoklast hücreleri, (→): Osteosit hücreleri. İHK. boyama, bar skala 50 µm.

Defekt alanı içerisinde yoğun bağ doku artışı ile birlikte inflamatuvar hücrelerde (yıldız) de belirgin artış görüldü. Ancak küçük kemik trabeküllerinin (siyah daire) periferinde özellikle osteoblastik aktivitede (kırmızı oklar) artışla birlikte BMP-2 reaksiyonunun pozitif olduğu değerlendirildi. Timokinonun kemik trabeküllerine yakın bir zeminde özellikle osteoklast hücrelerinde (mavi oklar) BMP-2 pozitif reaksiyon oluşturduğu görüldü. Ancak bu ilacın etkisine bağlı olarak osteosit hücrelerinde laküner evre bitmekle birlikte osteosit hücrelerinde (sarı oklar) BMP-2 reaksiyon pozitif olarak izlendi. (Şekil 4.6.)

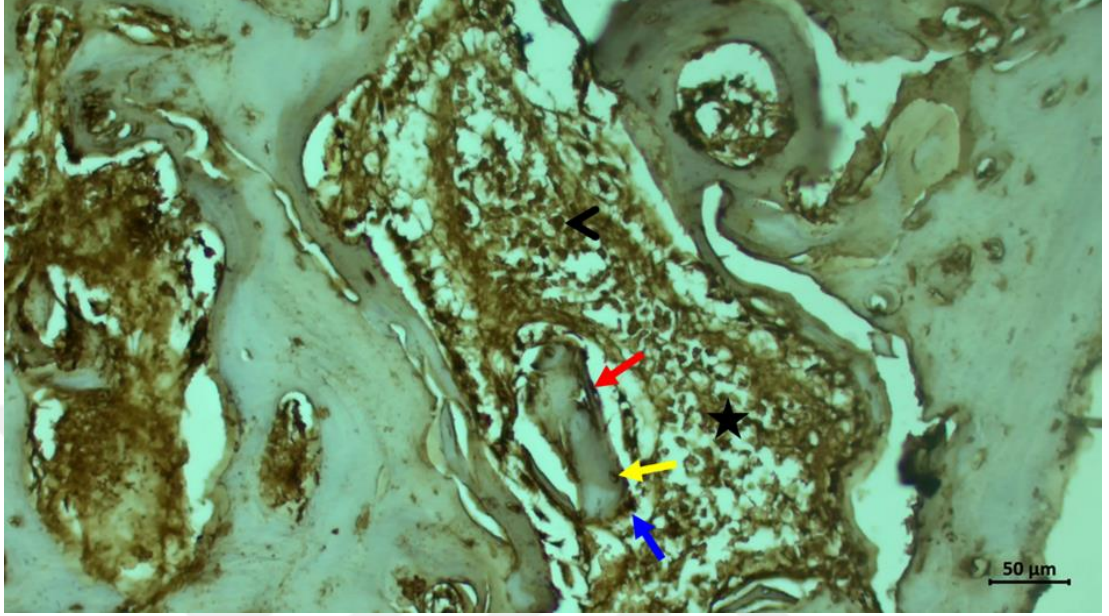
4.2.1.3. Kök Hücre Grubu



Şekil 4.7. Dördüncü haftada Kök hücre grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (★): İnflamatuvar hücreler, (→): Osteoklast hücreleri, (→): Osteoblast hücreleri, (→): Osteosit hücreleri. İHK. boyama, bar skala 50 μ m.

Özellikle defekt alanının bulunduğu bölgede yağ dokusu artışına bağlı bağ dokusunda belirgin bir artış ve inflamasyon bölgesinde azalma (yıldız), osteoklast hücrelerde azalma (mavi ok) ile birlikte BMP2 reaksiyonunun pozitif olduğu görüldü. Yeni kemik trabeküllerinin periferinde belirgin bir yoğunlukta BMP-2 reaksiyonu özellikle osteoblast hücrelerinde (kırmızı ok) belirgin olarak izlendi. Kemik trabekülünün matriks gelişimi başlaması sebebi ile yeni oluşan yaklaşık 2-3 adet osteosit hücresinde (sarı ok) BMP-2 reaksiyonunun pozitif olduğu izlendi. Kök hücre açısından bakıldığında yeni kemik oluşumunu belirginleştirdiği ve arttırdığı izlendi. (Şekil 4.7.)

4.2.1.4. Kök Hücre + Timokinon Grubu

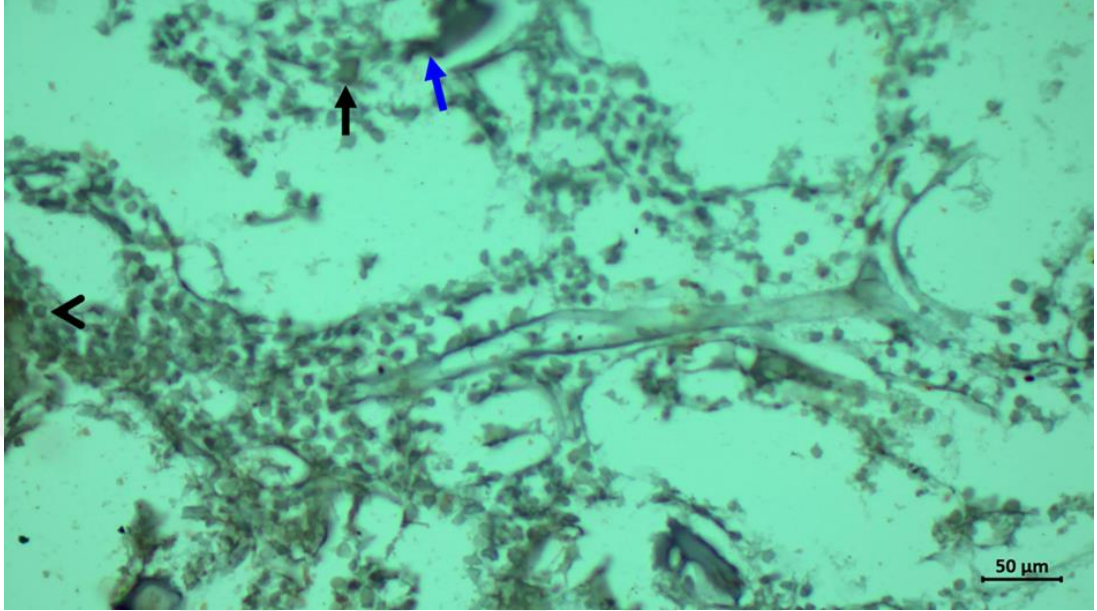


Şekil 4.8. Dördüncü haftada Kök hücre + Timokinon grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (★): İnflamatuar hücreleri, (➤): İnflamasyon alanı, (➔): Osteoblast hücreleri, (➡): Osteoklast hücreleri, (➞): Osteosit hücreleri. İHK. boyama, bar skala 50 μ m.

Genişlemiş kemik trabekülleri ile birlikte saf bağ dokusunda timokinon grubuna kıyasla inflamasyon hücrelerinde soliter bir dağılım ve inflamasyonda (yıldız) kısmen azalma gözlemlendi. Bu alandaki inflammatuar hücrelerde (ok başı) BMP-2 pozitif gözlemlendi. Genişlemiş kemik trabeküllerinin etrafında osteoblastlarda (kırmızı ok) ve içerdeki matriks gelişimine bağlı olarak osteositlerde (sarı ok) BMP-2 reaksiyonu pozitif olarak değerlendirildi. Az sayıda osteoklast hücrelerde de (mavi ok) BMP-2 reaksiyonu pozitif olarak izlendi. Yeni kemik oluşumuyla ilgili timokinon ve kök hücre birlikte uygulandığında kemik oluşumunu arttırarak inflamasyonu azalttığı düşünülebilir. (Şekil 4.8.)

4.2.2. BMP-4

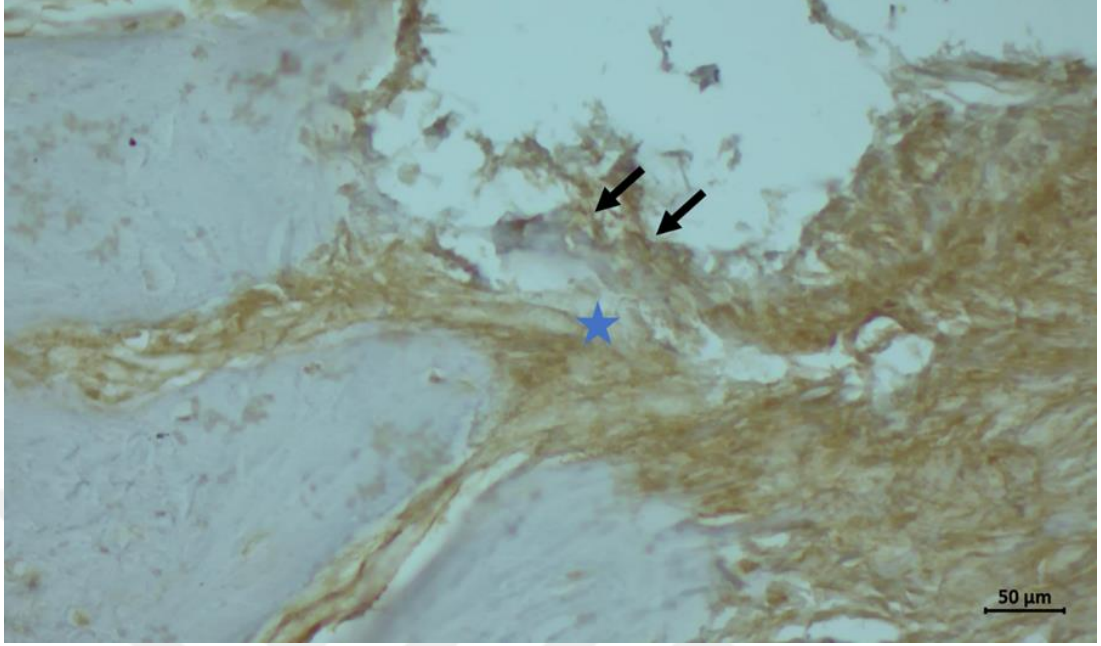
4.2.2.1. Kontrol Grubu



Şekil 4.9. Dördüncü haftada Kontrol grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (↗): İnflamatuvar hücreler, (➔): Endotel hücreleri, (➡): Osteoklast hücreleri. İHK. boyama, bar skala 50 µm.

İnflamatuvar hücrelerde belirgin bir artışla birlikte özellikle lökositler yapılarında (ok başı) BMP-4 ekspresyonunun pozitif olduğu, genişlemiş damar duvarının endotel hücrelerinde (siyah ok) BMP4 ekspresyonunun pozitif olduğu görüldü. Aynı zamanda da bazı alanlarda özellikle kollajen liflerin bağ doku alanında artmasına bağlı olarak damar çevresinde osteoklastik hücrelerde (mavi ok) BMP-4 ekspresyonunun arttığı görüldü. (Şekil 4.9.)

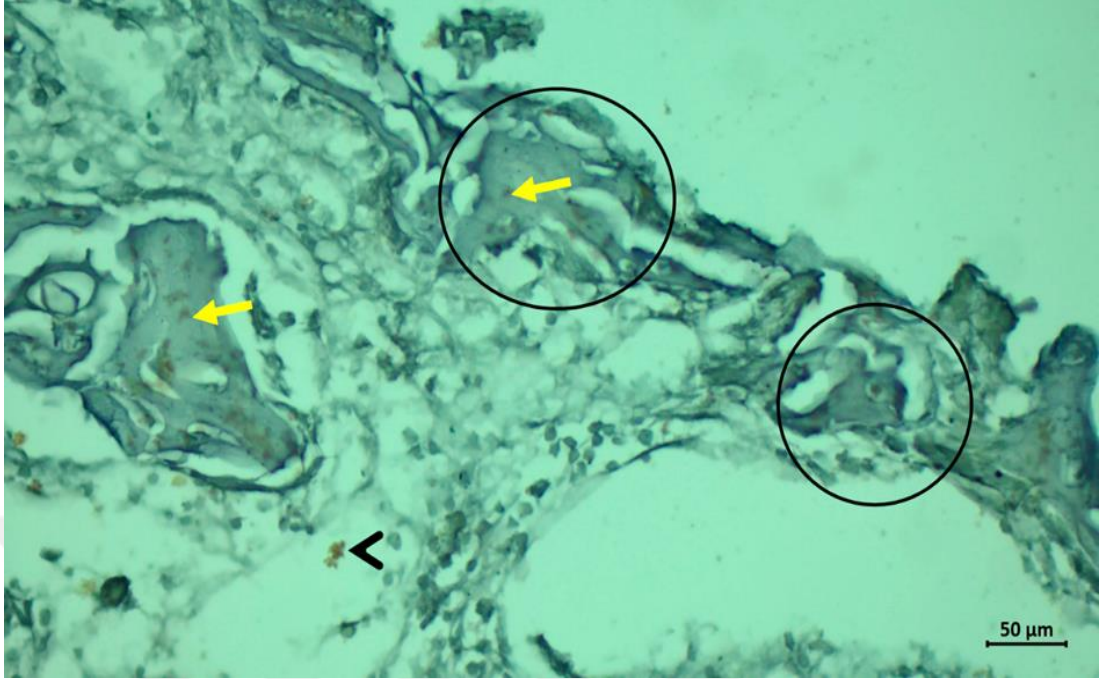
4.2.2.2. Timokinon Grubu



Şekil 4.10. Dördüncü haftada Timokinon grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (★): Kollajen lifler, (➔): Kemik trabekülleri. İHK. boyama, bar sakala 50 μm.

Bu gruba ait kesitlerde defekt alanı içerisinde en belirgin özelliklerden bir tanesi fibroblastik aktivite ile birlikte kollajen lif sentezinde (yıldız) artıştır. Bununla beraber özellikle yeni kemik oluşumuna ait küçük kemik trabeküllerinin şekillendiği ancak matriksin henüz olgunlaşmaya başladığı bölgede BMP-4 reaksiyonunun pozitif olduğu görüldü (siyah oklar). İnflamasyonun azalması da dikkat çekici özelliklerden biridir. (Şekil 4.10.)

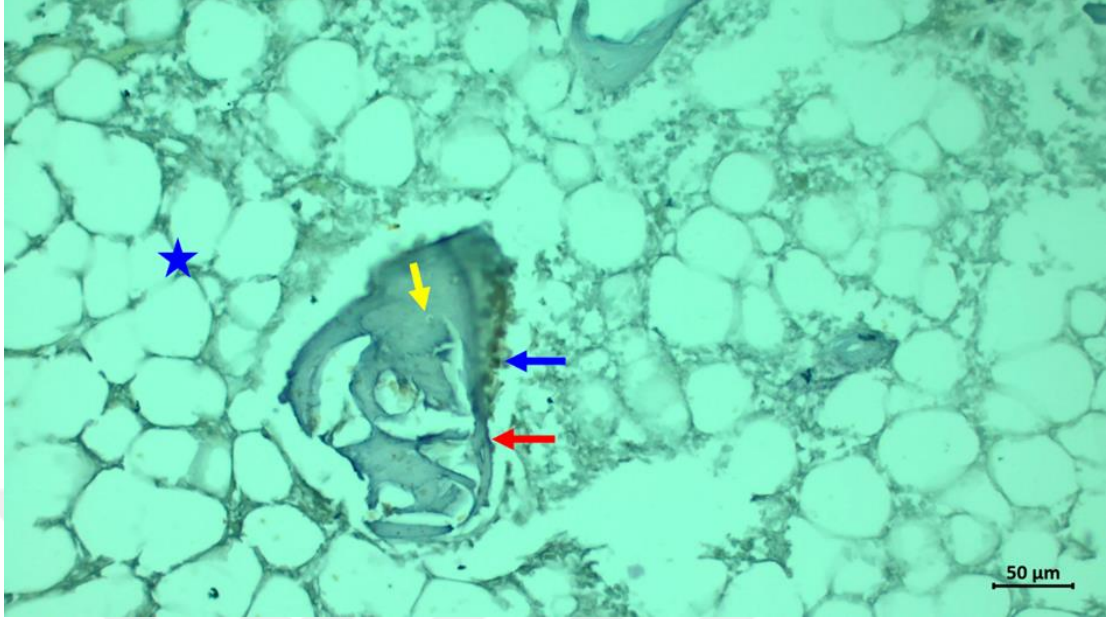
4.2.2.3. Kök Hücre Grubu



Şekil 4.11. Dördüncü haftada Kök hücre grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (○): Kemik trabekülleri, (➤): İnflamatuar hücreler, (➡): Osteosit hücreleri. İHK. boyama, bar skala 50 µm.

Defekt alanı içerisinde çok sayıda yeni oluşan kemik trabekülleri (siyah daireler) görülmeye başlandı. Bunun haricinde; soliter tarzda dağılan inflamatuvar hücrelerde BMP-4 reaksiyonunun pozitif olduğu izlendi (ok başı). Yeni kemik trabeküllerinin içerisindeki osteosit hücrelerinin BMP-4 (sarı oklar) reaksiyonunun pozitif olduğu görüldü. (Şekil 4.11.)

4.2.2.4. Kök Hücre + Timokinon Grubu



Şekil 4.12. Dördüncü haftada Kök hücre + Timokinon grubu tibial kemiğe ait defekt alanı görünümü. (★): Yağ dokusu, (→): Osteoblastik aktivite ve BMP-4 reaksiyonu, (→): Osteosit hücreleri, (→): Osteoklast hücreleri. İKH. Boyama, bar skalası 50 μ m.

Yağ dokusunda belirgin bir artış görülmekle (mavi yıldız) birlikte inflamatuvar hücrelerde kısmen azalma, genişlemiş kemik trabeküllerinin periferinde osteoblastik aktivitede ve BMP-4 reaksiyonunda (kırmızı ok) artış gözlenmiştir. Ayrıca küçük laküner yapılarıdaki osteositlerde (sarı ok) kemik trabeküllerinin içerisinde görülmeye başlamış ancak ekspresyonun orta seviyede olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra osteoklast hücrelerde azalma ile birlikte BMP4 aktivitesinin (mavi ok) pozitif olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.12.)

4.3. İstatistiksel Bulgular

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro wilk testi ile test edilmiş, normal dağılmayan özelliklerin 2 den fazla bağımsız grupta karşılaştırılmasında ise Kruskal Wallis ve Dunn çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 24.0 paket programı kullanılmış ve $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Sayısal değişkenlerde normal dağılım gözlenmediğinde non-parametrik testler kullanıldı ve tanımlayıcı istatistik olarak medyan %25 -%75 değerlerini verdi.

	Kontrol (n=7)	Kök Hücre (n=7)	Timokinon (n=7)	Kök Hücre Timokinon (n=7)	
Değişkenler	Medyan [%25-%75]	Medyan [%25-%75]	Medyan [%25-%75]	Medyan [%25-%75]	P
Enflamasyon	3 (3 -4)	3 (2 -3)	3 (2 -3)	2 (2 -2)	0,025*
Osteoklastik aktivite	3 (3 -4)	2 (2 -3)	2 (2 -3)	1 (1 -2)	0,007*
Osteoblast	1 (1 -2)	3 (2 -3)	3 (2 -3)	3 (3 -3)	0,001*
Bağ dokusu oluşumu	1 (0 -1)	2 (1 -2)	2 (2 -3)	3 (3 -4)	0,001*
Yeni kemik oluşumu	0 (0 -0)	2 (1 -2)	2 (2 -3)	3 (3 -3)	0,001*
BMP2	0 (0 -1)	2 (1 -2)	2 (2 -3)	3 (3 -4)	0,001*
BMP4	0 (0 -1)	2 (1 -2)	2 (2 -2)	3 (3 -4)	0,001*

Tablo 4.1. *0,05 düzeyinde anlamlı; Kruskal Wallis testi ortalama ve standart sapma değerleri.

Kruskal Wallis testi sonucuna göre tüm ölçümler en az bir grupta anlamlı olarak farklı bulundu. Farkın hangi gruptan kaynaklandığını ortaya koymak için Dunn çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

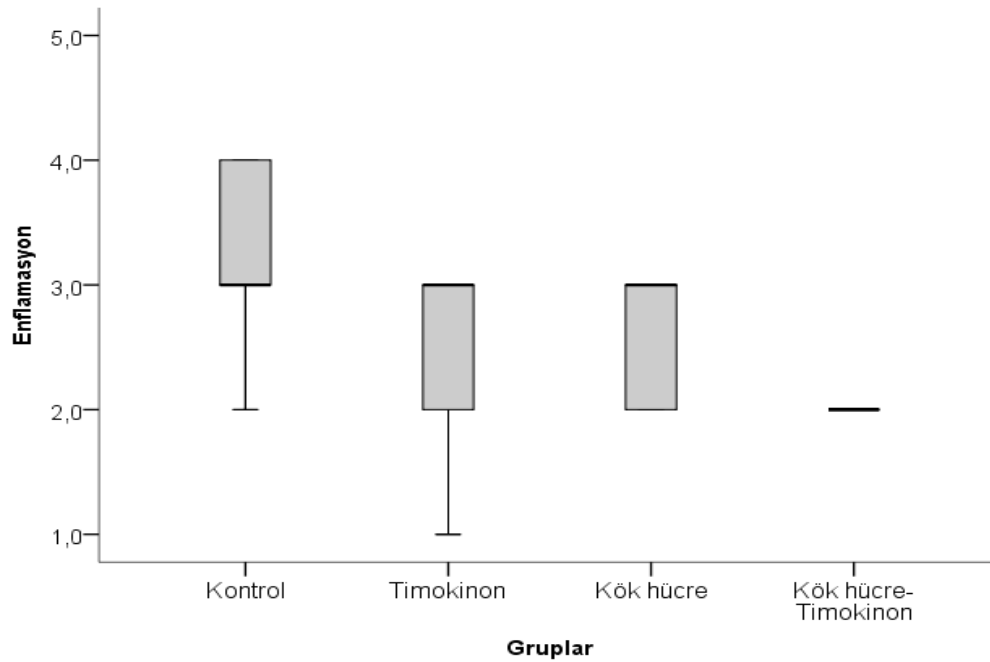
Yorum yazarken p değeri 0,05 in altında olanlara anlamlı denildi. Anlamlı bulunan sonuçlar için yorum yaparken de medyan değeri düşük olanda azalma, yüksek olan grupta ise artma var denildi.

4.3.1. Enflamasyon Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Grup karşılaştırmaları	p
Kök hücre-Timokinon / Timokinon	0,227
Kök hücre-Timokinon / Kök hücre	0,151
Kök hücre-Timokinon / Kontrol	<u>0,002</u>
Timokinon / Kök hücre	0,820
Timokinon / Kontrol	0,069
Kök hücre / Kontrol	0,111

Tablo 4.2. Enflamasyon değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu

Enflamasyon değerleri bakımından ‘**Kök hücre-Timokinon**’ grubundaki enflamasyon değerleri ‘**kontrol**’ grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($P < 0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.



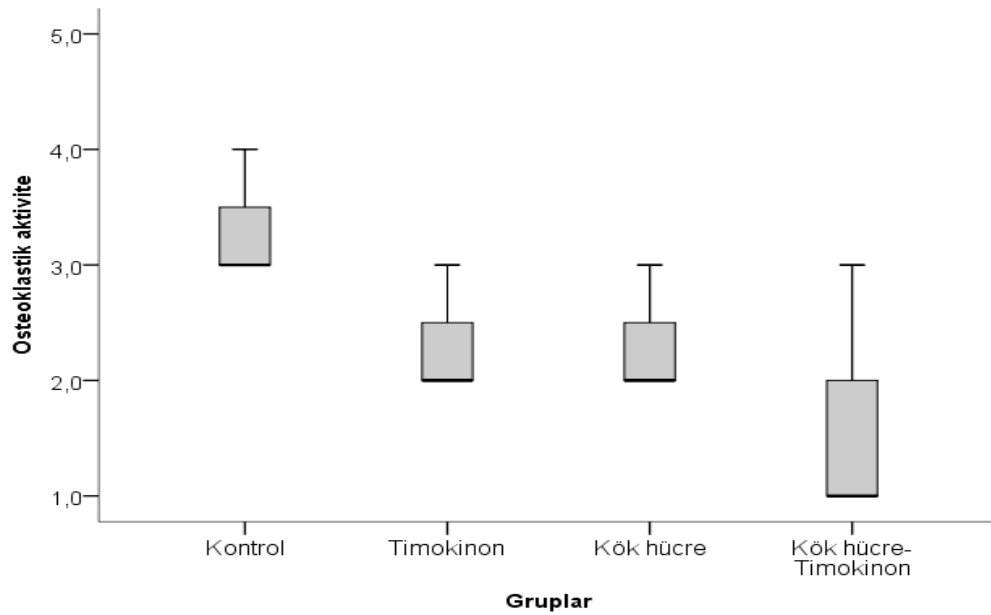
Şekil 4.13. Enflamasyon değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılık.

4.3.2. Osteoklastik Aktivite Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Grup karşılaştırmaları	p
Kök hücre-Timokinon / Timokinon	0,116
Kök hücre-Timokinon / Kök hücre	0,116
Kök hücre-Timokinon / Kontrol	<u>0,001</u>
Timokinon / Kontrol	0,055
Kök hücre / Kontrol	0,055
Timokinon / Kök hücre	1,000

Tablo 4.3. Osteoklastik aktivite değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu

Osteoklastik aktivite değerleri bakımından '**Kök hücre-Timokinon**' grubundaki osteoklastik aktivite değerleri '**Kontrol**' grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($P < 0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.



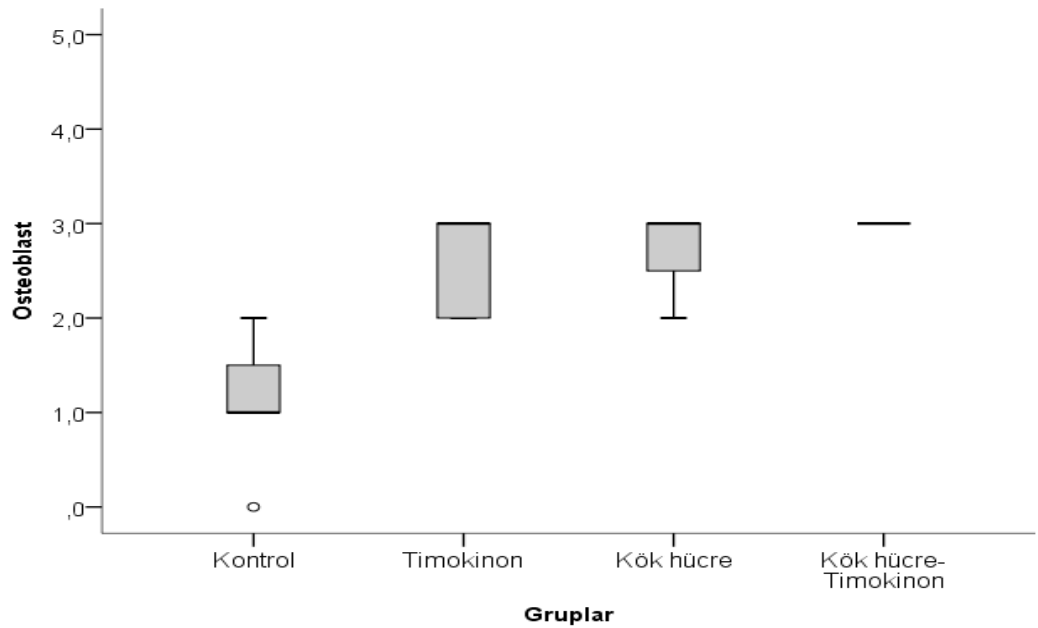
Şekil 4.14. Osteoklastik aktivite bakımından gruplar arasındaki farklılık

4.3.3. Osteoblast Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Grup karşılaştırmaları	p
Kontrol / Timokinin	0,008
Kontrol / Kök hücre	0,002
Kontrol / Kök hücre-Timokinin	0,001
Timokinin / Kök hücre	0,695
Timokinin / Kök hücre-Timokinin	0,143
Kök hücre / Kök hücre-Timokinin	0,284

Tablo 4.4. Osteoblast değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu

Osteoblast değerleri bakımından ‘**Timokinin**’ ($P < 0,05$), ‘**Kök hücre**’ ($P < 0,05$) ve ‘**Kök hücre-Timokinin**’ ($P < 0,05$) gruplarında ‘**Kontrol**’ grubuna göre yüksek derecede anlamlı farklılık bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.



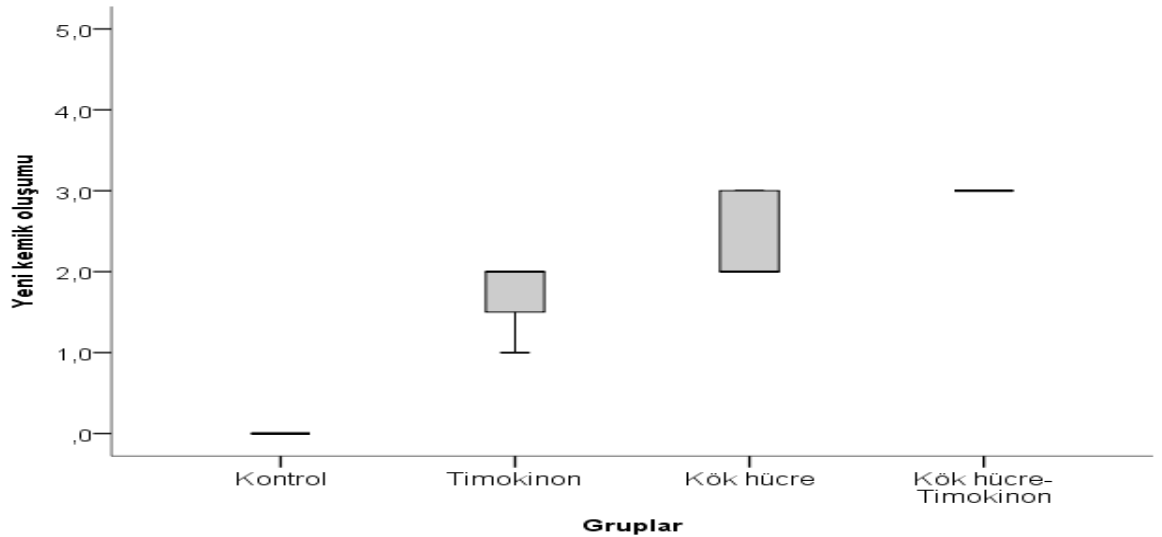
Şekil 4.15. Osteoblast bakımından gruplar arasındaki farklılık

4.3.4. Bağ dokusu oluşumu değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Grup karşılaştırmaları	P
Kontrol / Timokinon	0,115
Kontrol / Kök hücre	<u>0,004</u>
Kontrol / Kök hücre-Timokinon	<u>0,001</u>
Timokinon / Kök hücre	0,191
Timokinon / Kök hücre-Timokinon	<u>0,003</u>
Kök hücre / Kök hücre-Timokinon	0,087

Tablo 4.5. Bağ dokusu oluşumu değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılığa ilişkin analiz sonucu.

Bağ dokusu oluşumu değerleri bakımından '**Kök Hücre**' ($P < 0,05$) ve '**Kök hücre-Timokinon**' ($P < 0,05$) gruplarında '**Kontrol**' grubuna göre yüksek derecede farklılık bulundu. Ayrıca '**Timokinon**' grubunda '**Kök hücre-Timokinon**' grubuna göre farklılık anlamlı derecede düşük bulundu ($P < 0,05$).



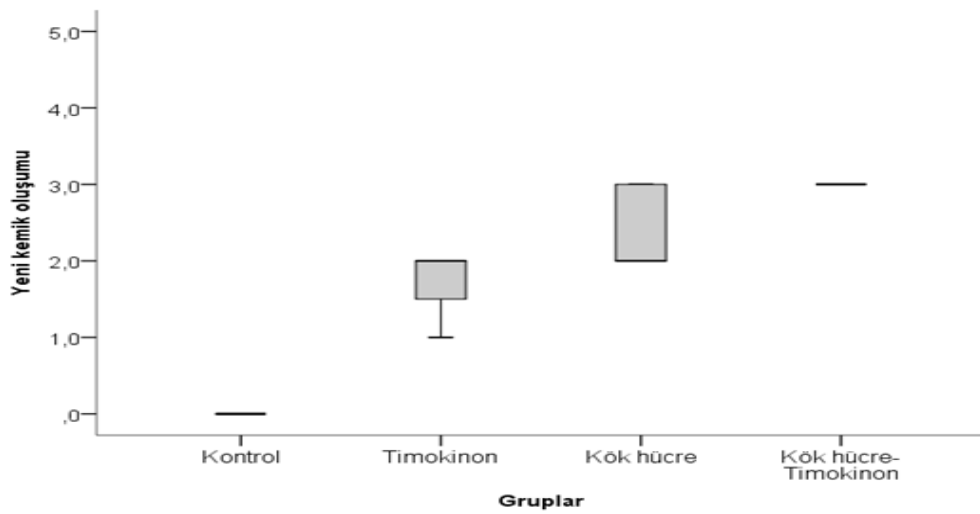
şekil 4.16. Bağ dokusu oluşumu bakımından gruplar arası farklılık

4.3.5. Yeni Kemik Oluşumu Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Grup karşılaştırmaları	p
Kontrol / Timokinon	<u>0,044</u>
Kontrol / Kök hücre	<u>0,001</u>
Kontrol / Kök hücre-Timokinon	<u>0,001</u>
Timokinon / Kök hücre	0,176
Timokinon / Kök hücre-Timokinon	<u>0,016</u>
Kök hücre / Kök hücre-Timokinon	0,286

Tablo 4.6. Yeni kemik oluşumu değerleri bakımından gruplar arası farklılığa ilişkin analiz sonucu

Yeni kemik oluşumu değerleri bakımından ‘**Timokinon**’ ($P < 0,05$), ‘**Kök Hücre**’ ($P < 0,05$) ve ‘**Kök hücre-Timokinon**’ ($P < 0,05$) gruplarında ‘**Kontrol**’ grubuna göre yüksek derecede anlamlı farklılık bulundu. Ayrıca ‘**Timokinon**’ grubunda ‘**Kök hücre-Timokinon**’ grubuna göre farklılık anlamlı derecede düşük bulundu ($P < 0,05$).



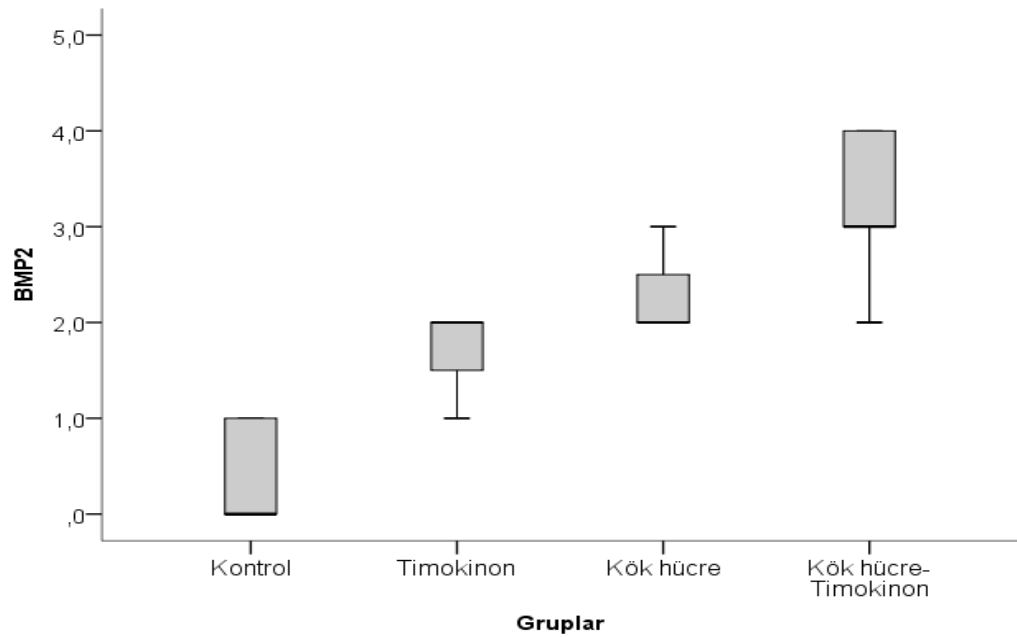
Şekil 4.17. Yeni kemik oluşumu bakımından gruplara arası farklılık

4.3.6. BMP-2 Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Grup karşılaştırmaları	p
Kontrol / Timokinon	<u>0,050</u>
Kontrol / Kök hücre	<u>0,002</u>
Kontrol / Kök hücre-Timokinon	<u>0,001</u>
Timokinon / Kök hücre	0,280
Timokinon / Kök hücre-Timokinon	<u>0,010</u>
Kök hücre / Kök hücre-Timokinon	0,137

Tablo 4.7. BMP-2 değerleri bakımından gruplar arası farklılığa ilişkin analiz sonucu.

BMP-2 değerleri bakımından ‘**Timokinon**’ ($P < 0,05$), ‘**Kök hücre**’ ($P < 0,05$) ve ‘**Kök hücre-Timokinon**’ ($P < 0,05$) gruplarında ‘**Kontrol**’ grubuna göre farklılık anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca ‘**Timokinon**’ grubunda ‘**Kök hücre-Timokinon**’ grubuna göre farklılık anlamlı derecede düşük bulundu ($P < 0,05$).



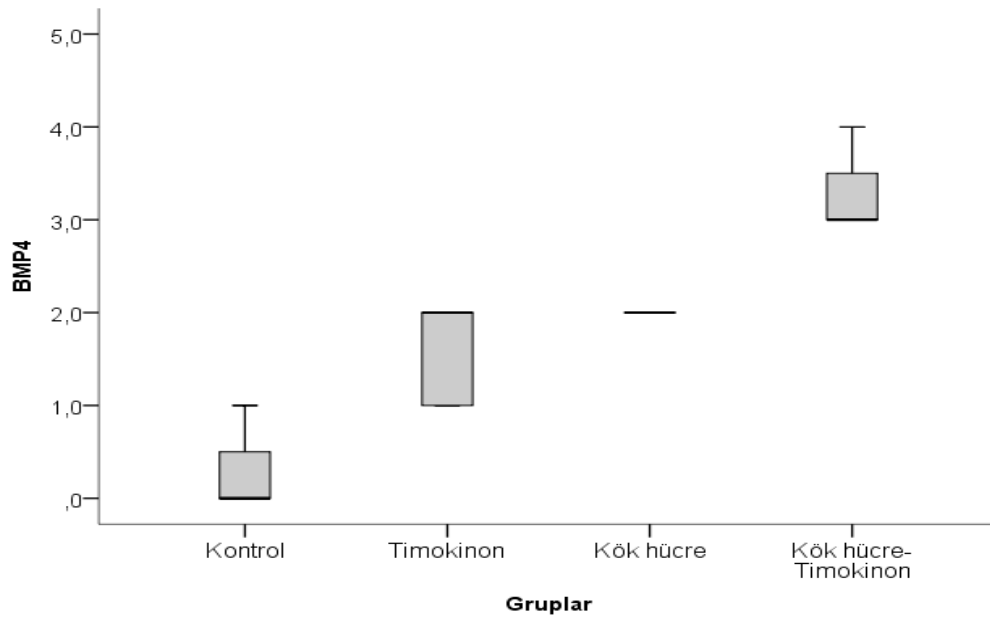
Şekil 4.18. BMP-2 bakımından gruplar arası farklılık.

4.3.7. BMP-4 Değerlerinin Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Grup karşılaştırmaları	P
Kontrol / Timokinon	<u>0,045</u>
Kontrol / Kök hücre	<u>0,005</u>
Kontrol / Kök hücre-Timokinon	<u>0,001</u>
Timokinon / Kök hücre	0,430
Timokinon / Kök hücre-Timokinon	0,011
Kök hücre / Kök hücre-Timokinon	0,078

Tablo 4.8. BMP-4 değerleri bakımından gruplar arası farklılığa ilişkin analiz sonucu.

BMP-4 değerleri bakımından ‘**Timokinon**’ ($P < 0,05$), ‘**Kök hücre**’ ($P < 0,05$) ve ‘**Kök hücre-Timokinon**’ ($P < 0,05$) gruplarında **Kontrol** grubuna göre farklılık anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca ‘**Timokinon**’ grubunda ‘**Kök hücre-Timokinon**’ grubuna göre farklılık anlamlı derecede düşük bulundu ($P < 0,05$).



Şekil 4.19. BMP-4 bakımından gruplar arası farklılık.

	Kontrol (n=7)	Timokinon (n=7)	Kök hücre (n=7)	Kök hücre- Timokinon (n=7)
Değişkenler	Ortalama ±SS	Ortalama ±SS	Ortalama ±SS	Ortalama ±SS
Enflamasyon	3,29 ± 0,76	2,43 ± 0,79	2,57 ± 0,53	2 ± 0,58
Osteoklastik aktivite	3,14 ± 0,69	2,29 ± 0,49	2,29 ± 0,49	1,57 ± 0,79
Osteoblast	1,14 ± 0,69	2,57 ± 0,53	2,71 ± 0,49	3,14 ± 0,38
Bağ dokusu oluşumu	0,57 ± 0,53	1,57 ± 0,53	2,29 ± 0,49	3,43 ± 0,53
Yeni kemik oluşumu	0,14 ± 0,38	1,71 ± 0,49	2,43 ± 0,53	3 ± 0,58
BMP2	0,43 ± 0,53	1,71 ± 0,49	2,29 ± 0,49	3,29 ± 0,76
BMP4	0,29 ± 0,49	1,57 ± 0,53	2 ± 0,58	3,14 ± 0,69

Tablo 4.9. Medyan ve %25-%75 değerlerini gösteren box plot grafiğinin tüm değişkenleri.

5. TARTIŞMA

Vücudumuzda birçok fizyolojik ve patolojik durumdan kaynaklı kemik kayıpları meydana gelir. Fiziksel problemler genel olarak yaşın ilerlemesi sonucu oluşur. Cerrahi operasyonlar ve iyi, kötü huylu kist veya tümörlerin çıkartılmasından sonra oluşan kemikteki eksilmelerde ise fizyolojik tamir aktif hale gelir (160). Kendi başına ve seri olarak iyileşmeyi sağlamak kemik tamirinde ana hedeftir. Kritik değeri aşmayan kemik kayıplarında bunu sağlamak mümkün görünse de, vücudun herhangi bir bölgesinde ve 7 boyutun üzerindeki kemik kayıpları kendi kendini onaramamaktadır (161). Anatomisi bozulan bu dokunun fonksiyonunu ve estetiğini geri kazanabilmesi için çeşitli metodlar uygulanmaktadır (162). Bu metodların genelinin ana prensibi, bu alanın fonksiyonunu ve estetiğini yeni kemik oluşumuyla eski haline geri döndürmektir. Çeşitli sistemik veya lokal olarak etkili ilaçların yanı sıra farklı materyellerde bu hedef doğrultusunda kullanılmıştır (163). Allogreftler, xenogreftler gibi kemik greftleri ve biyomateriyaller bölgesel olarak kullanılanlara örnek olarak gösterilebilir. Sistemik olarak kullanılanlara ise osteoblastik aktiviteyi aktifleyip osteoid madde üretimini çoğaltan ilaçlar örnek olabilir.

Biz araştırmamızda kemik üretimini uyaran ve kemik rezorpsiyonunu engelleyen *Nigella Sativa*'nın etken maddesi olan timokinonun izole ve kök hücreyle birlikte ayrıca kök hücrenin de izole yeni kemik oluşumundaki etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Tıp dünyasında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda hayvan modelleri büyük önem taşır. Stevenon ve ark. hayvan modellerinin seçiminde, çalışmanın gerektirdiği koşullara uygunluk ve konuyla ilgili yeterli kaynak bulunmasının belirleyici etkenler olduklarını bildirmişlerdir (164). Bu çalışmadaki hayvan modelinin seçiminde aşağıdaki temel hususlara dikkat edilmiştir:

- Yeterli miktarda ve araştırma şartlarına uygun nitelikte denek temin edilebilmesi
- Araştırma yapılacak alanda deneklerin hayati öneme sahip organların ve dokularının bulunmaması

- Cerrahi uygulamanın çok zor olmaması
- Planlanan ölçüm parametrelerinin basit ve hassas bir şekilde uygulanabilir olması
- Deneklerin genel fizyolojisi ve dokularının iyileşmesi hakkında yeterli kaynak bulunması

Yeni kemik yapımının incelendiği deneysel çalışmalarda kullanılan deney hayvanlarının yaşı önemlidir. Genç hayvanlarda yeni kemik yapımı daha hızlı olmaktadır. Ratlarda ilk üç aya kadar yeni kemik yapımının hızlı olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (165). Bu bilgiler göz önüne alınarak çalışmamızda 13 haftalık ratlar kullanılmıştır.

Kritik boyutlu bir defekt genel olarak hayvanların bazı kemiklerinde ömürleri boyunca kendiliğinden onarılamayan en küçük kemik içi hasar olarak tanımlanabilir. Bu tür hasarlarda defektler kemik oluşumundan çok, fibrotik bağ dokusuyla onarımı ve iyileşme eğilimi göstermektedirler. Yaş ve hayvan çeşidi kritik boyutlu bir defektin tespit edilmesinde iki önemli faktör olarak görülmektedir (166,167).

Takagi ve Urist, ratlarda kritik boyutlu defekti 8 mm, tavşan ve farelerde 15 mm, köpekte ve maymunda 20 mm olarak tespit etmişlerdir (168).

Schmitz ve arkadaşları 8 mm lik defektin uygun bir defekt olduğunu 3, 4, 5 ve 8 mm lik defektlerde çalışma yaparak savunmuşlardır (169).

Son yıllarda doku mühendisliği yönteminin geliştirdiği kök hücreler ile ilgili, uygun bir yapı iskelesi ve büyüme faktörleriyle birlikte kullanıldığı maksillofasiyal bölge dokularının rejenerasyonu için yeni yöntemler araştırılmaya başlanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (170).

Kök hücreler gelişimsel olarak embriyonik kök hücre veya post-natal kök hücre (organa spesifik, dokuya spesifik veya erişkin kök hücre de denir) olarak ikiye ayrılırlar (171)

Embriyonik kök hücreler (EKH'ler) gelişmekte olan blastosistin iç kitlesinden köken alırlar ve vücuttaki tüm hücre çeşitlerine (endoderm, mezoderm ve ektoderm)

dönüşebildikleri için ‘pluripotent hücre’ olarak kabul edilirler. Embriyonik kök hücreler özelleşmiş doku ve organlardan elde edilirler, tüm bir doku veya dokuları oluşturan çeşitli hücre türlerine dönüşebildikleri için ‘multipotent’ olarak kabul edilirler. EKH’ler pek çok dokunun tamiri veya rejenerasyonu için önemli hücre kaynakları olsalar da; etik sorunlar, kontrol edilemeyen farklılaşmaları ve verici-alıcı arasındaki immünite problemleri yüzünden klinik kullanımları sınırlıdır. Ayrıca in vivo ortamda kullanıldığında gelişebilecek kromozomal değişkenlik ve tümörleşme olasılıklarını elimine edebilmek için uzun dönem klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Rosenthal ve arkadaşları yaptıkları çalışmada teratom oluşturabildiklerini göstermişlerdir. In vitro ortamda daha yavaş büyüme oranları ve daha az telomerez aktivitelerinin olmasına bağlı olarak, mezenkimal kök hücrelerin EKH’lere göre tümör oluşumu açısından nispeten daha az risk taşıdığı düşünülmektedir (172). Embriyonik kök hücreler; kemik iliği, sinir dokusu, kas, deri, barsak, karaciğer, dental pulpa, periodontal ligament, alveolar kemik ve çekilmiş daimi dişler gibi pek çok organ ve dokudan elde edilmiştir (173). Bu kanıtlar, tedavi uygulamaları için MKH’lerin birçok organdan elde edilebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte organ veya dokuya özgü nitelikler, kök hücre davranışını etkileyebileceği için, tedavi amaçlı kök hücre kaynağının seçiminde dikkatli olmak gerektiği çalışmalarda rapor edilmiştir (174).

Çalışmalar uygun uyarılar altında dental pulpadan alınan ve karakterize edilen kök hücrelerin yüksek proliferasyon ve farklılaşma potansiyelleri nedeniyle bu amaca hizmet edebileceğini göstermektedir (143). Çünkü dental pulpa kök hücreleri; kas, yağ, kıkırdak, sinir ve diş dokusunu oluşturan odontoblast hücrelerine dönüşebilirler. Dental doku mühendisliği çalışmalarında da kullanılan DPKH, uygun uyarılar altında dentin ve pulpa dokusuna da dönüşerek diş dokusunun elde edilmesinde de umut vermektedir (144). DPKH hücrelerinin üç boyutlu kollajen sünger, pöröz seramik ve fibröz titanyum meş ile birlikte farelere nakledilmesi ile yapılan çalışmada da bu hücrelerin önemli bir kaynak olduğu ifade edilmektedir (175).

d’Aquino R ve ark. tarafından 17 hastaya dental pulpadan elde edilen kök hücreler klinik olarak ilk defa 2009 yılında uygulanmıştır. Çift taraflı gömülü alt

yirmi yaş dişi çekilecek hastaların üst yirmi yaş dişlerinden elde edilen dental pulpa kök hücreleri çekim bölgesine kollajen sünger ile birlikte tatbik etmişlerdir. Kontrol grubunda çekim sonrası sokete sadece kollajen sünger konulurken, çalışma grubundaki soketlere kollajen süngere emdirilmiş kök hücreler konulmuştur. Hastalar üç ay sonra radyografik ve histolojik olarak incelenmiştir. Alınan sonuçlara göre hastanın kendisinden alınan kök hücrelerin konulduğu tarafta oluşan yeni kemik yüksekliği ve doku organizasyonunun daha tatmin edici olduğu izlenmiştir (176).

Dental pulpadan elde edilen kök hücrelerin uyarılması ile in-vitro şartlarda osteoblastlara dönüşebildiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (177,178). Hatta DPKH hücrelerinin kök hücre araştırmalarında standart olarak kabul edilen kemik iliği kök hücrelerinden bile in-vitro şartlarda daha fazla farklılaşma kabiliyetine sahip olduğunu savunan makaleler mevcuttur.

Miura ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları süt dişi pulpasından mezenkimal kök hücre izole ettikleri çalışmalarında hücrelerin plastik yüzeylere yapışabildikleri ve diğer stromal hücrelerin karakteristiğinde olduğu gösterilmiştir. Süt dişi mezenkimal kök hücreleri kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri ve yetişkin diş pulpası mezenkimal kök hücreleri ile karşılaştırdıklarında yüksek proliferasyon kapasitesinde ve yüksek katlanma oranında olduğu görölmüştür (149).

Iwasa J ve ark. mezenkimal kök hücre yoğunluğunun matris sentezi üzerine etkinliğini araştırdıkları çalışmalarda çeşitli konsantrasyonlarda hücre yoğunluklu MHK'lar kullanıp, yüksek miktarda hücre yoğunluğunun daha derin bölgelerdeki hücrelere vaskülarizasyonu ve sıvı infiltrasyonunu engelleyebildiğini tespit etmişlerdir. 2×10^6 - 2×10^7 hücre/ml arasında MKH konsantrasyonları kullanılan çalışmalarda, kemik defektlerinde etkili doku rejenerasyonunun gerçekteleştii bildirilmiştir (179). Çalışmamızda bu çalışma sonuçlarına paralel olacak şekilde 2×10^7 hücre/ml yoğunluğundaki mezenkimal kök hücreler kullanıldı.

LI Jing-hui ve ark. yaptıkları çalışmada jelatin süngere ekilmiş kök hücrelerin farelerde ektopik yerleşimde dahi osteojenik farklılaşma gösterebildiğini ve DPKH hücrelerinin kemik doku mühendisliği çalışmalarında uygun ve etkili bir kaynak olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (180).

DPKH yalnızca diş hekimliği alanı için değil tıbbın diğer kolları için de iyi sonuçlar elde edilen zengin bir kaynaktır. Yapılan çalışmalarda myokard enfarkt bölgesi, sinir doku rejenerasyonu, musküler distrofi, serebral iskemi (181), anjiyogenetik özelliklerin geliştirilmesi (182) ve korneal rejenerasyon tedavisinde (183) de başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir.

Kliniğimizde Ağaçayak ve Gülsün'ün yaptıkları deneysel tez çalışmasında, kök hücre teknolojisi ile elde edilen mezenkimal kök hücreleri, bifazik kalsiyum fosfat seramikleri ve trombositten zengin plazma kullanarak, bu materyallerin ve hücrelerin kemik defektinde osteogenezis üzerine etkilerinin histolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırılmasını hedeflemiştir. Sonuç olarak osteoblastik aktivite ve osteogenezisin mezenkimal kök hücrenin kombine edildiği gruplarda ideal sonuçlar verdiği, osteokondüktif etkili grefte büyüme faktörü içeren trombositten zengin plazma ve mezenkimal kök hücrelerin ilavesiyle düzenli bir kemik yapının oluştuğu ve osteoindüksiyonun sağlandığını gözlemlemiştir (184).

Kandal S. ve ark. 50 adet wistar türü erkek ratın 10 tanesini allojen mezenkimal kök hücre elde etmek için kullanıp, 4 gruba ayırdıkları diğer ratların frontal kemiğinde 7 mm çaplı kritik büyüklükte kemik defekti oluşturmuşlar. grup I (n=10) operatif kontrol grubu iken, grup II'de (n=10) insan kaynaklı demineralize kemik matriksi, grup III'de (n=10) mezenkimal kök hücre, grup IV'de (n=10) mezenkimal kök hücre ve demineralize kemik matriksi kombinasyonunu defektlere uygulamışlardır. Deneklerin tamamını 12. hafta sonunda sakrifiye etmişlerdir. Değerlendirmede radyolojik olarak, gruplar arasında 0., 4., 8., ve 12. haftaların defekt alan ölçümleri ve kapanma yüzdeleri, 12. hafta için kemik yoğunluklarının ve kemikleşme paternlerinin karşılaştırmalarını yapmışlardır. Grup III'ün (mezenkimal kök hücre) 0-12. haftadaki kapanma yüzdesinin grup I'e (operatif kontrol grubu) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla olduğunu saptamışlardır. Diğer gruplar arasında diğer haftalar içinde geçerli olmak üzere anlamlı fark bulamamışlardır (185).

Liechty ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; KİMKH'lerin sistemik enjeksiyondan sonra birçok organda bölgeye özgü olarak farklılaştığı, yapısına girdiği ve yaralanmış bölgeye göç ettikleri gösterilmiştir (186).

Maraldi ve ark. 2013 yılında 30 sıçan kalvaryumuna açtıkları bilateral defektler ile amniyon sıvısından ve dental pulpadan elde edilen kök hücrelerin neovaskülarizasyona etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları histolojik ve immüno Floresan incelemeler neticesinde yeni damarsal yapılanma açısından kök hücre gruplarının kontrol gruplarına göre açık ve anlamlı bir şekilde daha iyi sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir (187).

2014 yılında Yuji Ando ve ekibi serum içermeyen insan MKH'larından elde ettikleri koşullu besiyerlerini osteoblastlar üzerine uyguladıklarında osteoblast farklılaşmasını artırdığını göstermişlerdir (188).

Carbone A. ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş dental pulpa kök hücrelerinden elde ettikleri koşullu besiyerini adipoz kaynaklı kök hücreler üzerine uyguladıktan sonra bu hücrelerin mineralize matriks ürettiğini gözlemlemişlerdir (189).

Lee TJ. ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları benzer bir çalışmada insan MKH'larından elde edilen koşullu besiyeri ile insan embriyonik kök hücrelerini kültüre etmişler ve bu grubu koşullu besiyeri uygulanmayan grup ile karşılaştırdıklarında; osteojenik ve kondrojenik farklılaşmanın hızlandığını, ALP, OPN, ON, OC gibi osteojenik farklılaşma genlerinin ekspresyon düzeylerinin arttığını ve ortamda kalsiyum birikiminin hızlandığını bildirmişlerdir (190).

Yu F. ve ark. 2011 yılında insan periferik kanından osteoklast benzeri hücreler elde ettiler. Bu hücrelerden topladıkları koşullu besiyerini fibroblastlar üzerine uyguladıklarında fibroblastların alkalik fosfatase ve mineralizasyon seviyelerinin önemli derecede arttığını göstermişlerdir (191).

Jin Z. ve ark. 2016 yılında insan periyodontal ligament hücrelerini 10 ve 15 günlük osteojenik indüklenmiş kemik iliği stromal hücrelerinden elde ettikleri koşullu besiyerinde kültüre ettiklerinde proliferasyonun ve osteogenezin önemli derecede hızlandığını göstermişlerdir. Osteojenik indüklenme uygulanmayan gruptan elde edilen koşullu besiyerinin ise böyle bir etkisi gözlemlenmemiştir (192).

Su-Hwan ve arkadaşlarının çalışmalarında, köpeklerde peri-implant defekt modeli oluşturmuşlar ve periodontal ligamentten ve kemik iliğinden elde ettikleri kök hücreleri defekt bölgesine uygulayarak yeni kemik oluşumu açısından değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda histomorfolojik olarak yapılan

değerlendirmede, yeni kemik oluşumunun, kemik iliğinden kaynaklı mezenşimal kök hücrelerle tedavi edilen defekt bölgesinde yüksek olduğu, periodontal ligamentten elde edilen kök hücrelerle tedavi edilen defekt bölgesinde kemik oluşumunun nispeten azaldığını ve son olarak hücresiz kullanılan hidroksi apatit /trikalsiyum fosfat konulan defekt bölgesinde kemik oluşumunun en az seviyede olduğunu gözlemlemişlerdir (193).

2005 yılında Kawacuci ve arkadaşları, hastaların iliak kemiklerinden izole ettikleri mezenşimal kök hücreleri periodontal cerrahi işlem sırasında kemik defektlerine uygulayarak gerçekleştirdikleri çalışmada, klinik sonuçların oldukça başarılı olduğunu belirtmişlerdir (194).

Taguchi ve arkadaşları kemik iliği hücrelerinin invivo hareketi ve tamire olan katkısını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada farelerin femurlarında oluşturulan kırıkları takiben kuyruk veninden verilen kemik iliği hücrelerine bağlı olarak kallus dokusunun belirgin şekilde olduğu ve bunun kesin olarak mezenkimal kök hücrelerle ilgili olduğu ortaya konulmuştur (195).

Kliniğimizde Erdoğan ve Gülsün'ün yaptıkları deneysel tez çalışmasında kök hücre teknolojisi ile elde edilen mezenkimal kök hücreleri, demineralize kemik tozu ve trombosit zengin plazma kullanılarak bu materyallerin ve hücrelerin kemik defektindeki etkilerinin histolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırılmasını hedeflemişler.

55 adet Wistar-Albino türü dişi ratların 4 tanesini trombosit zengin plazma elde etmek için kullanıp geriye kalan ratları 5 gruba ayırmışlar. Ratların her iki tibiasında 10 mm uzunluğunda 3 mm derinliğinde ve 2 mm genişliğindeki kemik defektleri oluşturmuşlar.

Grup 1 operatif kontrol grubu iken, Grup 2' de demineralize kemik grefti, Grup 3' de demineralize kemik grefti ve trombosit zengin plazma, Grup 4' de mezenkimal kök hücre ve demineralize kemik grefti kombinasyonu ve Grup 5' de mezenkimal kök hücre, trombosit zengin plazma ve demineralize kemik grefti kombinasyonu defektlere uygulamışlar. Deneklerin tamamını 2., 8. Ve 12. Hafta sonunda kurban etmişler.

Yapılan çalışmanın sonucunda; araştırmanın 12. haftasında osteoblastik aktivite ve osteogenezisin daha ideal olduğu, osteogenezise bağlı olarak osteopontin ve

osteonektin ile boyanmaya pozitif yanıt verdiği saptanmıştır. En ideal osteogenezisi oluşturan grubun Greft + Trombositten zengin plazma + Mezenkimal kök hücre grubunun olduğu, bunu sırasıyla Greft + Trombositten zengin plazma grubunun ve son olarakta yalnızca Greft uygulanan grubun izlediği gözlenmiştir (196).

Nigella sativa yağı içerisinde bulundurduğu; güzel esanslı yağlar, elementler ve vitaminler gibi yüzlerce öğeden kaynaklı olarak çok faydalıdır. %58 oranında temel yağ asidi İçinde omega 3 ve omega 6 bulundurur. Bu faydalı yağlar, Prostaglandin E1 oluşumunu sağlayarak bağışıklık sistemini alerji ve enfeksiyonlara karşı kuvvetlendirip, kronik hastalıklara karşı korur. Bu oluşum sağlıklı hücreleri virüslerden koruyup tümör oluşumunu engeller. Nigella Sativa (çörek otu) ile alakalı olarak yakın zamanda yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, antioksidan, antikanserojen, antibakteriyel, antiülser, antifungal, antitümör, antialerjik etkilerinin olduğu saptanmıştır (197). Çörek otu yağının kemik metabolizması üzerine de etkilerinin olduğu bilinmektedir.

Bruits ve Bucar'ın yaptıkları bir çalışmada NS esansiyel yağının antioksidan aktivitesini araştırmışlar ve radikal süpürücü özelliklerini göstermişlerdir. Aynı zamanda etkili bir hidroksil radikal süpürücü ajanlar olduklarını da belirtmişlerdir. Çörek otu, antibakteriyel etkisini gram-pozitif bakterilere karşı göstermiş ve çörek otunun dietileter ekstresi ise, gram-pozitif bakteri olan Staphylococcus aureus ve gram-negatif bakteriler olan Pseudomonas aeruginosa ve Escherichia coli karşısında miktarına göre bir inaktivasyon meydana getirmiştir. Buna ilaveten, çörek otunun eter özütü pek çok antibiyotik ile konnektif ve additif antibakteriyel etki meydana getirmiştir. Çörek otunun eter özütü, V. cholera, E. coli ile Shigella dysentriae' nin tüm türleriyle beraber ilaca dirençli bakteriler için daha etkilidir. Nigella Sativa tohumu dietileter özütü stafilokok enfeksiyonunu başarılı bir şekilde elimine etmiştir. İn-vitro ve in-vivo ortamda yapılan çalışmalar, antitümör etkisini çörek otu tohumlarının etkili bileşenlerinin sebebiyle olduğuna işaret etmektedir. Çörek otu uçucu yağının değişik tipteki insan kanserli hücrelerinde meydana getirdiği etkiler gözlemlenmiştir. Meme kanseri olan kişiden alınan kanserli hücrelerin sulu veya alkollü özütlerle etkileşimi sonrası hücre büyümesi tamamen durmuştur (198).

F. Işık ve ark. yapmış oldukları deneysel kolit modelinde *Nigella Sativa* yağının serum kolesterol ve trigliserit seviyesini düşürdüğünü, oksidan parametrelerde azalmaya neden olurken antioksidan enzim seviyelerinde artışa sebep olduğunu belirtmişlerdir. Çörek otu yağının biyolojik membranlardaki lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (199).

El-Abhar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, NSY'nin 4 hafta oral alımının karaciğer fonksiyon testleri üzerindeki etkileri karbon tetraklorürle (CCI4) indüklenen hepatoksisite ile araştırmışlardır. NSY, CCI4 ile hepatoksisitenin indüksiyonundan önce 4 hafta vermişler ve sonuçta CCI4 hepatoksisitesine karşı kısmen etkilerini koruyabildiğini görmüşlerdir. NSY 4 hafta süreyle 80 mg/kg dozunda oral olarak alındığında serum total kolesterol, LDL (düşük dansiteli lipoprotein) ve trigliserit düzeylerinde önemli bir azalmaya yol açarken, serum HDL (yüksek dansiteli lipoprotein)'de anlamlı bir artış sağladığını tespit etmişlerdir.

Kanter ve ark. yaptıkları bir çalışmada, CCI4 ile muamele edilen deney hayvanlarında *Nigella Sativa* (N.S.)'nın lipid peroksidasyonu ve karaciğer enzim aktivitelerini azaltırken, antioksidan savunma sistemini oluşturan enzim aktivitelerini arttırdığını tespit etmişlerdir. Çörek otu yağının birçok faydalı özelliği bilinmesine rağmen kemik metabolizması ile ilgili yapılan çalışma sayısı sınırlıdır (200).

A.Wirries ve ark. yaptıkları bir çalışmada çörek otu yağının kullanılması ile osteoblast hücrelerinin farklılaşması, çoğalması ve mineralizasyonunu değerlendirmişler ve anlamlı sonuçlar almışlardır. Osteoblast hücrelerini, farklı miktarlarda *Nigella Sativa* uygulayarak 14 gün boyunca kültür etmişlerdir. Mineralizasyon bakımından kalsiyum değerlerini Alizarin Red kullanarak ölçmüşler ve anlamlı bir şekilde artış olduğunu ortaya koymuşlardır (5).

Hijazi ve ark. 3 aylık 2-2,25 kg ağırlığında 24 sağlıklı erkek Yeni Zelanda tavşanının üst iki orta kesici dişlerini genel anestezi altında çekmişler, 12 denekten oluşan 1. ve 2. grubun soketlerinin 2/3 lük kısmının kan pıhtısını aldıktan sonra 1. grubun sol taraf soketlerine N.S.'nin tohumlarının tozunu koyup, 2. Grubun sol taraf soketlerine N.S. emdirilmiş pamukları 5 dk süreyle uygulayıp, 24 adet tavşanın sağ taraflarındaki kontrol grubu soketlerine herhangi bir madde uygulamadan sütüre

ettikleri çalışmadan 1 ve 6 hafta sonra radyolojik olarak ve kavitelerden alınan kesitleri histopatolojik olarak değerlendirdikleri çalışmanın sonucunda yapılan incelemelerde 1. haftanın sonunda 1. ve 2. gruplarda kontrol grubuna kıyasla erken osteoid formasyonu ve 6. hafta sonunda ise yeni kemik trabeküllerinin kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduklarını tespit etmişlerdir (201). Bu sonuçları değerlendirdiklerinde N.S.'nin kemik oluşumunu artıran biyoaktif ve biyoindüktif bir materyal gibi davrandığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda da elde ettiğimiz bulgular Hijazi ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmanın bulguları ile mukayese edildiğinde osteoblast, osteosit ve yeni kemik oluşumu açısından paralellik göstermiştir.

İ. Kara ve ark. 3 aylık, 280 ila 310 g ağırlığında 32 dişi sıçanda 12 gün boyunca 24 tanesine maksiller genişletme yapmışlar; 1. gruba sadece maksiller genişletme yapmışlar, 2. grupta maksiller genişletmeden 40 gün önceden ve 12 günlük genişletme periyodu boyunca da çörek otu yağını sistemik 10 mg/kg olarak vermişler, 3. grupta 12 günlük maksiller genişletme süresince çörek otu yağını sistemik olarak vermişler, 8 denekli 4. grupta ise maksiller genişletme yapmamışlar. ilgili bölgelerden alınan kesitler 12. günde histopatolojik olarak incelediklerinde, 2. grupta enflamatuar hücre sayısının anlamlı derecede yüksek, osteoblast sayısının anlamlı derecede en yüksek, osteoklast miktarının en az olup yeni kemik yapımının en yüksek olduğunu ancak kapiller hücre yoğunluğunda fark olmadığını, kontrol grubunda ise enflamatuar hücre sayısı ve osteoblast miktarının diğer gruplara göre en düşük olduğunu, 1. ve 3. gruplar arası anlamlı farklılık olmadığını tespit etmişlerdir (202). Çalışmamızda timokinon ve timokinon + kök hücre gruplarında ki osteoblast, osteoklast ve yeni kemik yapımı açısından elde ettiğimiz sonuçlar, İ. Kara ve arkadaşlarının çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Fakat enflamatuar hücrelerinin yoğunluğu bizim çalışmamızla zıtlık göstermiştir. Bunun nedeni bizim 4. hafta sonunda enflamatuar hücrelerinin yoğunluğunu değerlendirmemizden kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Özdemir ve ark. 3 aylık 280 ila 310 gr ağırlığında 24 erkek sıçanların 1. Molar dişlerinde periodantal defekt oluşturup, 1. grubu kontrol grubu olarak belirleyip sadece defekt oluşturmuşlar, 2. grupta defektleri ligatürlemişler, 3 grupta ise defektleri ligatürleyip oragastrik yolla 11 gün boyunca 10mg/kg çörek otu yağı

verdikleri çalışmada 11. günde örnekleri histopatolojik olarak incelediklerinde, 3. grupta kontrol grubuna göre daha az kemik kaybı, osteoblast sayısında artış, osteoklast miktarının azaldığını, enflamatuvar mediatörler ve sitokinlerinde yüksek seviyede olduklarını bulmuşlardır (203).

Çalışmamızda da timokinon ve timokinon + kök hücre grubunda kontrol grubuna göre osteoklastik aktivitenin düşük, osteoblastik aktivitenin daha yüksek olduğunu tespit ettik. Bizim bulgularımızla Özdemir ve ark bulguları bu bağlamda paralellik göstermektedir. Fakat enflamatuvar mediatörler ve sitokin bulguları bizim çalışmamızla uyuşmamaktadır. Bunun nedeni olarak ise onların çalışması 11. günde sonlandırılıp histopatolojik olarak değerlendirilmiş, bizim çalışmamız ise 4. hafta sonunda sonlandırılıp, enflamatuvar hücrelerinin yoğunluğunu değerlendirmemizden kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Ş. Ezirganlı ve ark. 3 aylık, 280 ila 310 g ağırlığında 32 dişi sıçanın kalvaryumunda 7 mm lik defekt oluşturmuşlardır. Bunların 16 sına nigella sativayı oro-gastrik tüp ile sistemik olarak vermişler, diğer N.S.uygulanmayan 16 deneklik kontrol grubuyla birlikte 2., 4. haftalarda sakrifiye ederek histopatolojik olarak değerlendirmişler ve çalışma gruplarından alınan kesitlerde kontrol gruplarına göre daha fazla osteoblastik aktivitenin ($P<0.05$), yeni kemik yapımının olduğu bunun yanında osteoklastik aktivitenin ise istatistiksel olarak daha az olduğunu tespit etmişlerdir (5). Çalışmamızda da benzer şekilde 4. hafta sonunda, timokinon, kök hücre ve ikisinin kombine kullanıldığı gruplarda kontrol grubuna göre osteoblastların anlamlı derecede yüksek olduğu ($P<0.05$), ve osteoklastik aktivitenin ise anlamlı derecede düşük olduğu ($P<0.05$), tespit edilmiştir (5).

Literatürde timokinonun kemik üzerine etkileri başlığı altında çok fazla çalışma olmaması, kök hücre ile kombine kullanımının ise hiç rastlanamaması bizim tezimizin orjinallliğini göstermektedir. Timokinonun fonksiyonel tıpta umut vadeden bir ajan olması kök hücrenin ise moleküler biyoloji alanında çığır açması çalışmamızda bu iki ajanı kombine kullanmamızı sağlamıştır. Konu ile ilgili tüm taradığımız literatürlerdeki araştırmacıların bulgularının ve çalışmamızın sonucundaki bulguların ışığı altında değerlendirme yaptığımızda kemik defektleri oluşturularak nigella sativanın sistemik ve lokal veya sadece lokal uygulamanının farklı süreler sonunda

oluşturduğu etkilerin histopatolojik olarak değerlendirilmesinin konuya daha fazla ışık tutacağı kanaatindeyiz.



6. SONUÇLAR

Nigella Sativa, kök hücre ve bunların kombine kullanımının kritik kemik defektlerinde, kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini, yeni kemik oluşumlarını ve kemik iyileşmesinde görev aldıkları bilinen BMP-2 ve BMP-4' ün immün lokalizasyonu ve ekspresyonu üzerine olan etkilerini histolojik ve moleküler düzeyde ortaya koymak amacıyla yaptığımız çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar aşağıdaki gibidir.

1. Kök hücre + Timokinon grubundaki enflamasyon, kontrol grubundaki enflamasyona oranla anlamlı derecede düşük bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.
2. Kök hücre + Timokinon grubundaki osteoklastik aktivite, kontrol grubundaki osteoklastik aktiviteye oranla anlamlı derecede düşük bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.
3. Kök hücre + Timokinon, kök hücre ve timokinon gruplarındaki osteoblastik aktivite, kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.
4. Kök hücre + Timokinon ve kök hücre gruplarındaki bağ doku oluşumu kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca timokinon grubundaki bağ doku oluşumu kök hücre + timokinon grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.
5. Kök hücre + Timokinon, kök hücre ve timokinon gruplarındaki yeni kemik oluşumu kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca timokinon grubundaki yeni kemik oluşumu kök hücre + timokinon grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.
6. Kök hücre + Timokinon, kök hücre ve timokinon gruplarındaki BMP-2 değerleri kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca timokinon grubundaki BMP-2 değerleri kök hücre + timokinon grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.

7. Kök hücre + Timokinon, kök hücre ve timokinon gruplarındaki BMP-4 değerleri kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca timokinon grubundaki BMP-4 değerleri kök hücre + timokinon grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.

Sonuçları genel anlamda yorumladığımızda yaptığımız çalışmada sadece timokinon veya kök hücre tedavisinin defekt uygulaması sonrası kemik gelişimini kısmen uyardığı, yeni kemik trabeküllerinin gelişimini desteklediği izlendi. Defekt sonrası kök hücre + timokinon tedavisinin sadece timokinon ya da sadece kök hücre tedavisine göre çok daha etkin olduğu, daha fazla kemik trabekül gelişimini indüklediği, matriks ve bağ doku oluşuma katkı sağladığı ve kemik yapımında rol alan osteoblastların ve osteosit sayısının arttığı gözlemlendi. Ayrıca yeni kemik trabeküllerinin oluşumunda kontrol grubuna göre timokinonun kemik gelişimini osteoblast ve osteositlerde BMP-2/4 ekspresyonunu arttırarak indüklediği, ancak kök hücrenin timokinone göre kemik gelişiminde daha etkili olduğu gözlemlendi. Kök hücre tedavisinin osteosit oluşumunu da indükleyerek osteositlerde BMP-2/4 ekspresyonunu arttırdığı gözlemlendi. Defekt sonrası kök hücre + timokinon uygulamasının kemik gelişiminde rol alan osteoblast ve osteositlerin yanı sıra matriks ve yağ dokusunun gelişimini indükleyerek bu dokularda BMP-2/4 ekspresyonunu arttırarak yeni kemik oluşumunu çok daha etkin bir şekilde desteklediği gözlemlendi.

7. KAYNAKLAR

1. Pejrone G, Lorenzetti M, Mozzati M, Valente G SG. Sinus floor augmentation with iliac bone block grafts: a histological and histomorphometrical report on the two-step surgical technique. *Int J Maxillofac Surg.* 1999;41:383–8.
2. İşler SC, Demircan S, Çakarar S, Çebi Z, Keskin C SM. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper® on early bone healing. *J Appl Oral Sci.* 2017.
3. Yılmaz A. Deneysel olarak oluşturulan, kontamine edilmiş kritik boyuttaki kemik defektlerinde *Nigella sativa*'nın (timokinon) kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin histolojik ve histomorfometrik olarak incelenmesi. doktora tezi. 2016;2–3.
4. Seref Ezirganli, PhD, DDS, Hakki Oguz Kazancioglu, PhD, DDS,y Hakan Ozdemir, PhD, DDS,z Deniz Sahin Inan, MD, and Mustafa Tek. PhD, DDSjjThe Effects of *Nigella Sativa* Seed Extract on Bone Healing in an Experimental Model. *J Craniofac Surg.* 2016;27:1905–1909.
5. Wirries A, Schubert AK, Zimmermann R, Jabari S, Ruchholtz S E-NN. Thymoquinone accelerates osteoblast differentiation and activates bone morphogenetic protein-2 and ERK pathway. *Int Immunopharmacol.* 2013;15(2):381–6.
6. Fatih Asutay. Pulpal dental kök hücre kaynağının kritik boyuttaki rat kalvaryal defekt modeli üzerindeki kemik rejenerasyon etkinliğinin incelenmesi doktora tezi 2. doktora tezi. 2014;2.
7. Pisciotto A, Riccio M, Carnevale G, Beretti F, Gibellini L, Maraldi T, Cavallini GM, Ferrari A, Bruzzesi G DPA. Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. ;7(11): PLoS One. 2012;7(11):50542.
8. Stevens A1, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, Formstecher P, Bailliez Y PR. Human dental pulp stem cells differentiate into

neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities.

9. Yan X1, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S HG. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin.
10. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L XY. Expression of mineralization markers in dental pulp cells.
11. Tanakol R. Fizyopatolojik Etmenler İçinde Osteoporoz Y(Ed.) Gökçe Kutsal Güneş Kitabevi Ltd.Şti, Ankara 2005;3-70.
12. Eşrefoğlu M. Genel Histoloji, 1. Baskı. Malatya, Medipress Matbaacılık Yayıncılık Ltd., 2009: 169-88.
13. Kierszenbaum A.L: Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş. Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, s118:2006.
14. Ashammakhi N, Ferretti P. Topics in tissue engineering. Volume I (Electronic book), 2003: 1-46.
15. Gartner LP, Hiatt JL: Color textbook of Histology. 2th edition, W.B Saunders company, p129-155:2001.
16. Bernard GW. Bernard GW. Healing and repair of osseus defects. Dent Clin North Am 1991; 35: 469-77.
17. Doblare M, Garcia JM, Gomez MJ. Modelling bone tissue fracture healing: a reiew. Engineering Fracture Mechanics 2004; 71: 1809-40. Model bone tissue Fract Heal a reiew Eng Fract Mech. 2004;71:40–1809.
18. Junueira LC., Carneiro J: Basic Histology 10th ed. Lange p141-154:2003.
19. Datta H, Ng W, Walker J, Tuck S, Varanasi S. The cell biology of bone metabolism. Journal of Clinical Pathology, 2008, 61:577-587.
20. Tuskan C. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateyaller.

İstanbul Üniversitesi Diş Hekim Fakültesi Yayınları. 2002.

21. Gartner LP, Hiatt JL: Color textbook of Histology. 2th edition, W.B Saunders company, p129-155:2001.
22. Kierszenbaum A.L. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, Mosby Inc. St. Louis, Chapter 5, page 127, 2002
23. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014, 561:3-12.
24. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S,(Çeviri editörleri.) İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri 2006:141–54. Temel Histoloji Aytekin Y, Solakoğlu S,(Çeviri Ed İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2006;54–141.
25. Gartner LP, Hiatt JL, Color Textbook of Histology, 3rd Edition, Chapter 7, s.136-156. Textb Histol 3rd Ed. 7:136–56.
26. Premkumar S. Textbook of craniofacial growth. 1st ed., New Delhi, JP Medical Ltd, 2011:1-24. Textb craniofacial growth 1st ed, New Delhi, JP Med Ltd. 2011;1–24.
27. Şirin SY. Deneysel olarak meydana getirilen kemik defektlerine yerleştirilen farklı tipteki yapay kaynaklı greft materyallerinin kemikleşmesinde hiperbarik oksijen uygulamasının etkilerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,2005
28. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. Biomaterials. 2001; 22:2581-2593. Biomater bone mechanotransduction Biomater. 2001;22:2581–93.
29. Robbins SL, Kumar V. Basic Pathology, Fourth Ed. WB. Saunders Company, Philadelphia PA 19105, 1987. Basic Pathol Fourth Ed WB Saunders Company, Philadelphia PA. 1987.
30. Tanırkulu S, Gönen E, Kırık iyileşmesi, TOTBİD Dergisi 2017; 16:455–475

<https://doi.org/10.14292/totbid.dergisi.2017.62>. TOTBİD Derg. 2017;16:455–75.

31. Miller SC, Bowman B, Jee W. Bone lining cells: structure and function. Scanning Microscopy, 1989, 3: 953-960. Bone lining cells Struct Funct Scanning Microsc. 1989;3:953–60.
32. Bancroft JD, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th ed. Churchill Livingstone, Newyork 1996; 15: 309-339. Theory Pract Histol
33. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Solkoğlo S Aytekin Y, çev. Nobel Tıp Kitap Evleri, 2009, 121-182.
34. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi, 3:3-4, 2004.
35. 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.
36. Martin RB, Burr DB. Mechanical adaptation in structure, function and adaption of compact bone, Raven press: New York; 1989.
37. Gratzl M. Junqueira Carneiro. Histologie. 6. baskı. Heidelberg: Springe; 96 s, 2005.
38. Tunçay Ekin Ö. Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Ankara; 2013.
39. H. E. Kemik Dokusu. Editör: A Özer. Temel Histoloji. 1. baskı Nobel Yayınevi. s: 237–62, 2011.
40. Caranza FA, Newman MG TH. Caranza FA, Newman MG, Takei HH. Carranza's Clinical Periodontology 9. Edition, USA WB. Saunders Co 2002;812-819

41. Ross M, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology 6th Edition. Philadelphia, Macmillan Company, 2011 :218-244.
42. Neligan PC. Neligan PC. Plastic Surgery. İçinde Seitz IA, Teven CM, Reid RR, editors. Repair and Grafting of Bone. 2013. pp. 425-463.
43. Jee WSS. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. İçinde: Cowin SC, editor. Bone Mechanics Handbook. 2nd edition. Florida: CRC Press. 2001, pp. 1-68.
44. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. 10. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2003.145-83.
45. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A GR. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. J Clin Periodontol 2008; 35: 539–546.
46. Sandy C, Marks JR, Popoff SN. Bone cell biology: The regulation of development, structure and function in the skeleton. The American Journal of Anatomy 1988; 83(1): 1-44
47. Jee WSS. Integrated bone tissue physiology: Anatomy and physiology. In Cowin SC(Ed) Bone Mechanics Handbook 2 ed. Florida CRC press; 2001;1-68.
48. Breeland G. Menezes RG. Embryology, Bone Ossification. Yayın Evi: StatPearls. Treasure Island (FL). Bone Ossification Yayın Evi StatPearls Treasure Isl. 2019.
49. Calmar EA, Vinci R. The anatomy and physiology of bone fracture and healing. Clinical Pediatric Emergency Medicine. 2002; 3:85-93. Anat Physiol bone Fract Heal Clin Pediatr Emerg Med. 2002;3:85–93.
50. Mescher A. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. Thirteenth Edition: McGraw- Hill Education: 2009.

51. Calmar EA, Vinci R. (2002). The anatomy and physiology of bone fracture and healing. *ClinicCalmar EA, Vinci R.al Pediatric Emergency Medicine*. 2002; 3: 85-93..
52. 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.
53. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2008, 15: 53-76
54. Gorski JP. Is all bone the same. Distinctive distributions and properties of non collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9:201–23.
55. Meade JB, Cowin SC, Kiawitter JJ, Van Buskirk WC SH. Bone remodeling due to continuously applied loads. *Calcif Tissue*. 1984;36:25–30.
56. Matsuo K IN. Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473:201–9.
57. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A WE. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011;17:1231–4.
58. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC OC. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*. 2011;17:1235–41.
59. LF. B. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26:229–38.
60. Rochefort G, Pallu S BC-L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int*. 2010;21:1457–69.
61. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, Plesner T DJ-M. A physical mechanism for coupling bone

- resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol.* 2009;174:239–47.
62. Bonewald LF JM. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008;42:606–15.
63. Kılıçoğlu SS. Mikroskopik Düzeyde Kırık İyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 2002;55:143–50.
64. Kalfas IH. Principles of bone healing. E1. *Neurosurg Focus.* 2001;10.
65. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT ET. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873–84.
66. Le A, Miclau T, Hu D HJ. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res.* 2001;19(1):78–84.
67. Frost HM. The biology of fracture healing and over view for clinicians part I. *Clin Orthop Rel Res.* 1979;248:283–93.
68. Kabaca G. Diabetik Sıçanlarda Selenyumun Kemik İyileşmesi Üzerine Etkileri. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.* 2007.
69. Schenk RK. Histophysiology of bone remodeling and bone repair. Lin OCC, Chao EVS *Perspect Biomater Amsterdam, Elsevier Sci Publ.* 1976;75–94.
70. Sfeir, C., Ho, L., Doll, B.A., Azari, K. ve Hollinger, J.O. Lieberman JR FG. Fracture Repair, Bone regeneration and repair. *Biol Clin Appl Totowa, New Jersey Humana Press Inc.* 2005;21–43.
71. Ozaki, A., Tsunoda, M., Kinoshita, S. ve Saura R. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci.* 2000;5(1):64–70.
72. William, V., Giannobile, W.V., Rios, H.F. ve Lang NP. Bone as a tissue.

İçinde: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. Clin Periodontol Implant Dent 5thEd, Oxford Blackwell Publ Company. 2008;86–98.

73. Netter FH. Kemikğin oluşumu ve yapısı. A Tansu, Kayalar Ak G (Editörler)The netter Collect Med Illus Ankara Güneş Tıp Yayınevi. 2009;169–74.
74. CAL. B. Biophysical principles of affecting bone structures in G. H. Bourne (Ed.). Biochem Physiol Bone Acad Press Inc NewYork. 1971;1–76.
75. RL. C. Healing of bone, tendon and ligament. Fract 2nd ed, Philadelphia, Lippincott Co. 1984;1:147–67.
76. Marks SC PS. Bone cell biology: The regulation of development, structure and function in the skeleton. Am J Anat. 1988;182:1–44.
77. Martin RB BD. Mechanical adaptation, in Structure, Function and Adaptation Of Compact Bone. Raven Press New York, chaps2,4,7,8. 1989.
78. Özyuvacı H, Fırat D, Soydan N, Aktaş Ş, Oğuz N, Doğan Ö, Yaltırık M IA. Deneysel kemik defektlerine yerleştirilen iki farklı kemik greft materyalinin radyoterapi ve radyoterapi+hiperbarik oksijen uygulaması sonrası dokuda meydana getirdiği reaksiyonların histopatolojik yönden incelenmesi. Oral İmp Der. 1997;2:60–4.
79. Pollak D, Floman Y, Simkin A, Avinezer A FH. The effect of protein malnutrition and nutritional support on the mechanical properties of fracture healing in the injured rat. J Parenter Enter Nutr. 1986;10:564–7.
80. Yılmaz C, Erdemli E, Selek H AM. The Contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. Arch Trauma Surg. 2001;121:426–8.
81. Halıcı M, Öner M, Güney A, Canöz Ö, Narin F HC. Melatonin promotes fracture healing in the rat model. Eklem Hast Cerrahisi. 21(3):127–7.
82. Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, Bernat M, Bijvoet OL CP et al. Anabolic effect ofhuman parathyroid hormone fragment on trabecular bone in

involutional osteoporosis: amulticentre trial Br Med J. 1980;280:130–4.

83. Charbon A EE. Extra-osseous actions parathyroid hormone and calcitonin clinical orthopaedics and related research. Clin Orthop Relat Res. 1971;178:140–50.
84. Edward G, Heinz W, William M, Stephen F, Mark A AW et al. Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. Ann Intern Med. 1992;11:117.
85. Bak B, Holmberg P, Andreassen J AT. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. Acta Orthop. 1990;61(1):54–7.
86. Kılıçoğlu Sibel S. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. . Ankara Üniv Tıp Fak Mecmua. 2002;55(2):143–50.
87. Dalle Carbonare L GS. Histologic diagnosis of metabolic bone diseases: bone histomorphometry. Reumatism. 2004;56:15–23.
88. Akman Ş, Göğüş A, Şener N, Bilgiç B AB. Sıçan tibia kırıkları sonrası uygulanan diklofenak-sodyum’un kırık kaynaması üzerine etkileri. Hacettepe Ortop Derg. 2001;11(2):55–60.
89. Folwarczna J, Janiec W SL. Effects of heparin and low-molecular weight heparin on bone mechanical properties in rats. Thromb Haemost. 2004;92(5):940–6.
90. Baldık Y, Talu U, Altinel L, Bilge H, Demiryont M ATG. Bone healing regulated by nitric oxide: an experimental study in rats. 2002;404:343–52.
91. Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O JB et al. Smoking and fracture risk: A meta-analysis. Osteoporos Int. 2005;16(2):155–62.
92. Khan SN, Bostrom MP LJ. Bone growth factors. Orthop Clin North Am. 2000;31:375–88.
93. Mathes SJ. Repair and grafting of bone. Plast Surg 2nd ed Saunders Elsevier Inc, Philadelphia. 2006;639–728.

94. Forouzanfar F, Bazzaz BS HH. Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone). *a Rev Antimicrob Eff Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(12):929–38.
95. Khader M EP. Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(12):950–7.
96. El-Tahir KEH BD. The black seed *Nigella sativa* L. a min for multi cure: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *J Taibah Univ Med Sci.* 2006;1–19.
97. MS. A-G. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:45–8.
98. Burtis M BF. Antioxidant activity of *nigella sativa* essential oil. *Phyther Res.* 2000;14:323–8.
99. Worthen DR, Grosheh OA CP. The in vitro anti-tumor activity some crude and purified components of blackseed, *nigella sativa*. *Anticancer Res.* 1998;18:1527–32.
100. Houghton PJ, Zarka R, De La Heras B HJ. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica.* 1995;61:33–6.
101. NM. M. Antimicrobial effect of crude extracts of *nigella sativa* on multiple antibiotics - resistant bacteria. *Acta Microbiol Pol.* 2000;49:641–9.
102. Salem ML HM. In vivo acute depletion of CD8(+) T cells before murine cytomegalovirus infection upregulated innate antiviral activity of natural killer cells. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22:707-718.
103. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A H, Colagar A SS. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res.* 2015;95–96:138–58.
104. ML. S. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the *Nigella sativa* L seed. *Int imunopharmacol.* 2005;5:1749–70.

105. Backesjo CM, Li Y, Lindgren U HL. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Min Res.* 2006;21:993–1002.
106. 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.
107. Williams CS, Mann M DR. The role of cyclooxygenases in inflammation,7 cancer, and development. *Oncogene.* 1999;18:7908–16.
108. El Gazzar M, El Mezayen R MJ, Nicolls MR, Canastar A DS. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2006;6(7):1135–42.
109. El Gazzar M, El Mezayen R NM, Marecki JC DS. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Acta* 2006;1760(7):1088-95. *Biochim Biophys.* 2006;1760(7):1088–95.
110. Hayat K, Asim MB, Nawaz M, Li M Z, L SN. Ameliorative effect of thymoquinone on ovalbumin-induced allergic conjunctivitis in Balb/c mice. *Curr Eye Res.* 2011;36(7):591–8.
111. Chakrabarty A,Emerson Mr LS. Hemeoxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Mult Scler.* 2003;9:4372–81.
112. Koch TR, Yuan LX SS et al. Total Antioxidant Capacity of Colon in Patients with Chronic Ulcerative Colitis. 2000; 45(9): 1814-1819. *Dig Dis Sci.* 2000;45(9):1814–9.
113. Choudhary S, Keshavarzian A YS et al. Novel antioxidants zolimid and AEOL11201 ameliorate colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2001;46(10):2222–30.
114. Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS GA. The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phyther Res.* 2013;17(2):183–6.

115. Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H MK, A. B. Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complement Altern Med*. 2011;11(29).
116. Hull Vance S, Benghuzzi H TM. Inhibition of bacterial attachment to kidney epithelial cells using thymoquinone-biomed 2010. *Biomed Sci Instrum*. 2010;46:69–74.
117. Mahmoud MR, El-Abhar HS SS. The effect of *nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol*. 2002;79:1–11.
118. Aboul-Ela EI. Cytogenetic studies on *Nigella sativa* seeds extract and thymoquinone on mouse cells infected with schistosomiasis using karyotyping. 2002; 516: 11-7. *Mutat Res*. 2002;516:11–7.
119. Aljabre SH, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM AA. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *J Ethnopharmacol*. 2005;101(1–3):116–9.
120. Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS GA. The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytother Res*. 17(2):183–6.
121. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B LJ. Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African J Bot*. 2010;76:210–6.
122. Salem ML HM. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Int J Immunopharmacol*. 2000;22(9):729–40.
123. Al. Ahlatcı A et. 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.
124. Mollazadeh H HH. The protective effect of *Nigella sativa* against liver injury: a review. 958-66. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;17(12):958–66.

125. Balbaa M, El-Zeftawy M, Ghareeb D, Taha N MA. *Nigella sativa* Relieves the Altered Insulin Receptor Signaling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Fed with a High-Fat Diet. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1–16.
126. Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H TT. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Res Vet Sci*. 2004;77:123–9.
127. AA. M. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicol Lett*. 2003;143(2):133–43.
128. 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.
129. Tennekoon KH, Jeevathayaparan S, Kurukulasooriya AP KE. Possible hepatotoxicity of *Nigella sativa* seeds and *Dregea volubilis* leaves. *J Ethnopharmacol*. 1991;31:283–9.
130. Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N AK, Amarouch H HM. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*. 2002;9(1):69–74.
131. Weissman IL, Anderson DJ GF. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:387–403.
132. Rodas-Junco BA VC. Dental Pulp Stem Cells: Current Advances in Isolation, Expansion and Preservation. *Tissue Eng Regen Med*. 2017;14(4):333–47.
133. Nadig RR. Stem cell therapy - Hype or hope? A review. *J Conserv Dent*. 2009;12:131–8.
134. Can A. Kök Hücre - Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. *Tıp Kitabevi, Ankara*. 2014;39–47.
135. LA. F. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*. 2005;34:415–23.

136. Blau HM, Brazelton TR WJ. The evolving concept of a stem cell: entity or function?. *Cell*. 2001;106:829–41.
137. Sağsöz H KM. Kök Hücreler. *Dicle Üniversitesi, Veterinerlik Fakülte Dergisi*. 2008;1(2):29–33.
138. Odorico JS, Kaufman DS TJ. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19(3):193–204.
139. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. 2001; 22(3): 149-64. *Mol Asp Med*. 2001;22(3):149–64.
140. Mizuno H, Tobita M UA. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012;30:804–10.
141. M BB, Čolić M, Milenković A, Čolak I, Jokanović V, Nikolić N. Todorović V, Marković D M-JN. Petakov Dental pulp stem cells: Potential significance in regenerative medicine. *Stomatol Glas Srb*. 2008;55:170–9.
142. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I AK. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*. 2012;56:151–65.
143. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG SS. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(25):25–30.
144. W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, Denbesten P, Robey PG, Shi S. Gronthos S, Brahimi J L. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81:531–5.
145. Batouli S, Miura M, Brahimi J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG Ss. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003;82(976):981.
146. D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S WC, Wang S, Shi S. Sonoyama W, Liu Y F. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. 2006;1:e79.

147. Galler KM, Eidt A Sg. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod.* 2014;40:41–5.
148. Murray PE, Garcia-Godoy F HK. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007;33:377–90.
149. Huang GT, Gronthos S SS. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88:792–806.
150. Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahım J, Young M Rp, Wang Cy, Shi S. Seo BM MM. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364:149–55.
151. Rimondini L Ms. Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol.* 2009;58:483–500.
152. Seo Bm, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R Ss. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res.* 2005;84:907–12.
153. Miura M, Gronthos S, Zhao M, LU B, Fisher LW, Robey PG Ss. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5807–12.
154. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I AK. Stem cells in dentistry- part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012;56:151–65.
155. Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, Sippel C H, Kh. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005;24:155–65.
156. Kemoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Farges Jc, Gennero I, Conte-Auriol F B, F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan As, Brunel G Sj. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 2007;329:283–94.

157. Bosshardt Dd. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res.* 2005;84:390–406.
158. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rızvanov AA, Sahin F, Bayrak Of, Sallı U Pa, Gt. K. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J.* 2010;10:105–13.
159. Karaöz E, Aksoy A, Ayhan S, Sarıboyacı A E, Kaymaz F KM. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* 2009;132:533–46.
160. Ninomiya T, Miyamoto Y IT. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur. *J Bone Min Metab.* 2003;21:67–73.
161. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 1980;38:176–80.
162. Buckwalter JA, Einhorn TA SS. *Orthopaedic Basic Science: The Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System.* 2nd Ed Rosemont Illinois 2000. 8.
163. Gupta MC MS. Bone graft substitutes; Past, present, future. *J Postgr Med* 2002. 48:142–8.
164. Stevenson S, Emery SE GV. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;324:66–74.
165. Glowacki J, Kaban LB, Murray KE, Folkman J MJ. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. 1981;1(8227):959–62.
166. Frame JW. Aconvenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 1980;38:176.

167. Takagi K UM. The reaction of the dura the bonemorphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg.* 1982;196:100.
168. MR. U. New advances in bone resarch. *West J Med.* 1984;141:71.
169. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO BB. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat Basel.* 1990;138(3):185–92.
170. Giannobile W.V., Lee C.S., Tomala M.P., Tejeda K.M. ZZ. Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *J Periodontol.* 2001;72(6):815–23.
171. Maria O.M., Khosravi R., Mezey E. TSD. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Dis.* 2007;13(1):11–6.
172. Rosenthal N Prometheus’s vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med.* 2003;349(3):267–74.
173. Baum C.M., Weissman I.L., Tsukamoto A.S., Buckle A.M. PB. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci United States Am.* 1992;89(7):2804–8.
174. Akintoye S.O., Lam T., Shi S., Brahim J., Collins M.T. RPG. Skeletal sitespecific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone.* 2006;38(6):758–68.
175. Koyama, N., Okubo, Y., Nakao, K., Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:501–6.
176. d’Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., Desiderio, V., Laino, G., Papaccio G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. 18, 75-83. *Eur cells Mater.* 2009;18:75–83.
177. Zhang, W., Walboomers, X.F., Shi, S., Fan, M., Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after

cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006;12:2813–23.

178. d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: A pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. 2007;14:1162–71.
179. Iwasa J., Ochi M., Uchio Y., Katsube K., Adachi N. KK. Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel. *Artif Organs.* 2003;27(3):249–55.
180. Li, J.H., Liu, D.Y., Zhang, F.M., Wang, F., Zhang, W.K., Zhang ZT. Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. *Chinese Med journal.* 2011;124:4022–8.
181. Kerkis, I., Ambrosio, C.E., Kerkis, A., Martins, D.S., Zucconi, E., Fonseca, S.A., Cabral, R.M., Maranduba, C.M., Gaiad, T.P., Morini, A.C., Vieira, N.M., Brolio, M.P., Sant'Anna, O.A., Miglino, M.A., Zatz M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (grmd) dogs: Local or systemic?. *J Transl Med.* 2008;6:35.
182. Nakashima, M., Iohara, K., Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine growth factor Rev.* 2009;20:435–40.
183. Monteiro, B.G., Serafim, R.C., Melo, G.B., Silva, M.C., Lizier, N.F., Maranduba, C.M., Smith, R.L., Kerkis, A., Cerruti, H., Gomes, J.A., Kerkis I (2009). Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. *Cell proliferation.* 42:587–94.
184. Ağaayak S. Farklı Rat Kalvaryumunda Oluşturulan Kritik Boyut Defektlerinde Mezenkimal Kök Hücreleri, Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri Ve Trombositten Zengin Plazmanın Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkilerinin Histolojik Ve İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011, Diyarbakır (Danışman: Prof. Dr. Belgin GÜLSÜN).

185. Kandal S, Özmen S, Uygur S, Yagci M, Kayhan H, Elmas Ç, Effects of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Demineralized Bone Matrix on Cranial Bone Healing. 2016 Aug;77(2):249-54.
186. Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F., Radu A., Moseley A.M., Deans R., Marshak D.R., Flake A.W. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature Medicine*, 6(11), 1282-1286:2000
187. Maraldi, T., Riccio, M., Pisciotta, A., Zavatti, M., Carnevale, G., Beretti, F., La Sala, G.B., Motta, A., De Pol, A. (2013). Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. *Stem cell research & therapy*, 4, 53.
188. Ando Y, Matsubara K, Ishikawa J, et al. Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. *Bone* 2014;61:82-90.
189. Carbone A, Valente M, Annacontini L, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal (stem) cells differentiate to osteoblast and chondroblast lineages upon incubation with conditioned media from dental pulp stem cell-derived osteoblasts and auricle cartilage chondrocytes. *J Biol Regul Homeost Agents* 2016;30:111-122.
190. Lee TJ, Jang J, Kang S, et al. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Enhances Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Mesodermal Lineage Induction. *Tissue Engineering* 2014;7:1306-1313.
191. Yu F, Cui Y, Zhou X, Zhang X, Han J. Osteogenic differentiation of human ligament fibroblasts induced by conditioned medium of osteoclast-like cells. *BioScience Trends* 2011;5:46-51.
192. Jin Z, Feng Y, Liu H. Conditioned media from differentiating craniofacial bone marrow stromal cells influence mineralization and proliferation in periodontal ligament stem cells. *Human Cell* 2016;29:162-175.
193. Kim SH , Kim KH, Seo BM , Koo KT, Kim T, Seol YJ, Young K, Rhyu C, Chung CP, Lee YM.(2009), Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in canine peri-implant defects

model: A pilot study. J Periodontol, posted online on July 22

194. Kawaguchi H, Hayashi H, Mizuno N, Fujita T, Hasegawa N, Shiba H, Nakamura S, Hino T, Yoshino H, Kurihara H, Tanaka H, Kimura A, Tsuji K, Kato Y. (2005), Cell transplantation for periodontal diseases. A novel periodontal tissue regenerative therapy using bone marrow mesenchymal stem cells. Clin Calcium, 15(7):99-104.
195. Taguchi K, Ogawa R, Migita M, Hanawa H, Ito H, Orimo H. (2005), The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. Biochem Biophys Res Commun, 27; 331(1):31-36.
196. Erdoğan Z. Rat Tibiasında Oluşturulan Defektlerde Mezenkimal Kök Hücrelerinin, Demineralize Kemik Tozunun Ve Trombosit Zengin Plazmanın Osteogenezis Üzerine Etkilerinin Histolojik Ve İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2013, Diyarbakır (Danışman: Prof. Dr. Belgin GÜLSÜN).
197. Al-Naggar TB, Gomez-Serranillos M P, Carretero ME VA. Neuropharmacological activity of Nigella sativa L. extracts. J Ethnopharmacol. 2003;88:63–8.
198. Burits M BF. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytother Res., 2000;14(5):323–8.
199. F. Isik, Tugba Tunalı Akbay, A. Yarat, Z. Genc, R. Pirisiciler, E. Caliskan-Ak, S. Cetinel, A. Altıntaş GS. Protective effects of Black cumin (Nigella sativa) Oil on TNBS-Induced Experimental Colitis in Rats., 2010;
200. Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H DH. Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of Langerhans by Nigella sativa L. in streptozotocin-induced diabetic rats. Tohoku J Exp Med., 2003;201(4):213–9.

201. 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.
202. Kara M.I , Erciyas K, Altan A.B, Ozkut M, Ay S IS. Thymoquinone accelerates new bone formation in the rapid maxillary expansion procedure. .Archives oral Biol. 2012;357–63.
203. Ozdemir H, Kara MI, Erciyas K, Ozer H AS. Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: a morphometric and histopathological study. J Periodontal Res,. 2012;47(1):74–80.

son hali

ÖRNEK RAPORU

% 22	% 20	% 3	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	9lib.net	%9
	İnternet Kaynağı	
2	pharmacy.erciyes.edu.tr	%1
	İnternet Kaynağı	
3	diclemedj.org	%1
	İnternet Kaynağı	
4	www.coreklen.com	%1
	İnternet Kaynağı	
5	acikerisim.dicle.edu.tr	%1
	İnternet Kaynağı	
6	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080	%1
	İnternet Kaynağı	
7	library.neu.edu.tr	%1
	İnternet Kaynağı	
8	Submitted to TechKnowledge Turkey	%1
	Öğrenci Ödevi	
9	pdfs.semanticscholar.org	<%1
	İnternet Kaynağı	