



**T. C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PROPOLİS VE SOĞAN EKSTRAKTLARININ
ANTİMİKROBİYAL VE 3T3 FİBROBLAST HÜCRELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Sedat BALCIOĞLU

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Muhsin KONUK**

İSTANBUL – 2017

**T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PROPOLİS VE SOĞAN EKSTRAKTLARININ ANTİMİKROBİYAL
VE 3T3 FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Sedat BALCIOĞLU

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Muhsin KONUK**

İSTANBUL – 2017



T.C.
ÜSKÜDAR
ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI

..... REN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENEL BİLGİLER

Öğrenci No	:	
Öğrenci Adı Soyadı	:	<u>Sedat BALCIOĞLU</u>
Anabilim Dalı	:	<u>Moleküler Biyoloji</u>
Tez Danışmanı	:	<u>Prof. Dr. Muhsein KANUİK</u>
Tezin Başlığı	:	<u>Propolis ve Soğan ekstraktlarının antimikrobiyal ve ST3 fibroblast Hücreleri Üzerine - Etkileri</u>

Toplantı Tarihi	:	<u>09.11.2017</u>	Saati	:	<u>16:00</u>
Öğrenci Savunmaya	:	<input checked="" type="checkbox"/> Geldi			
Üniversitemiz Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca tez bilimsel olarak incelenmiş, adayın tez çalışmasını sunmasının ardından, adaya tez çalışması ile ilgili sorular yöneltilmiştir.					
<input checked="" type="checkbox"/> Yapılan savunma sınavında adayın tez çalışması başarılı bulunarak KABUL edilmesine,					
<input type="checkbox"/> Yapılan savunma sınavı sonunda tez çalışmasının DÜZELTİLMESİNE , düzeltme için adaya ay EK SÜRE verilmesine (en fazla 3 ay)					
<input type="checkbox"/> Yapılan savunma sınavının sonunda tezin REDDEDİLMESİNE					
<input checked="" type="checkbox"/> OY BİRLİĞİ <input type="checkbox"/> OY ÇOKLUĞU					
İle karar verilmiştir.					
Savunmada Tezin Başlığı : <input checked="" type="checkbox"/> Değişmedi <input type="checkbox"/> Değişti					
Tezin Yeni Başlığı : <input type="checkbox"/> Değişmedi					
Öğrenci Savunmaya : <input type="checkbox"/> Gelmedi					
Üniversitemiz Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca yukarıda belirtilen tarih ve saatte Tez Savunma Jürisi toplanmış ancak ilgili öğrenci savunma sınavına gelmemiştir. Adayın tez çalışmasını Jüri önünde sunmadığı için yapılan değerlendirmeler sonunda adayın tez çalışmasıyla ilgili aşağıdaki kararı,					
<input type="checkbox"/> OY BİRLİĞİ İLE REDDEDİLMİŞTİR.					

Tez Sınavı Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	<u>Doç. Dr. Vedat ULUCAN</u>	
Danışman Üye	<u>Prof. Dr. Muhsein KANUİK</u>	
Üye	<u>Yrd. Doç. Dr. Ucan YILANCI OĞLU</u>	
Üye		
Üye		

[Tüm durumlarda jüri üyelerinin tez değerlendirme raporları gerekir.]

Sayı No :

Tarih : / / 20

Yukarıda kimlik bilgileri belirtilen ve Anabilim Dalımız Yüksek Lisans Programı öğrencisinin Tez Savunma Sınav Tutanağı ve eklerinin Enstitü Yönetim Kurulunda görüşülmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Not: Bu forma orijinal raporlar (bir nüsha) eklenecektir.

.....
Anabilim Dalı Başkanı
(Unvanı, Adı Soyadı, İmza)

ÖZET

PROPOLİS VE SOĞAN EKSTRAKTLARININ ANTİMİKROBİYAL VE 3T3 FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Balcıoğlu, Sedat

Yüksek Lisans, Moleküler Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muhsin KONUK

Eylül 2017

Çalışmamızda odaklandığımız hipotez doğal antibiyotik olarak görülen propolisin kimyasal antibiyotiklerin neden olduğu bakteriyel direncin oluşumuna alternatif olarak doğal antibakteriyel etkili özelliğinin olmasıdır. Ayrıca kapanmayan yaraların tedavisinde ise soğanın yara izi oluşumunu azaltıcı özelliğinin bulunmasıdır. Literatürde Propolis ekstraktının antiseptik, antibakteriyel, antifungal, antiviral, büzücü, spazmolitik, antiinflamatuvar, anestezi, antioksidan, antiülser, immünomodülatör ve yara iyileştirmesini hızlandırıcı özelliğe sahip olduğu ,soğan ekstraktının ise antidiyabetik, antioksidan, antihipertansif, antitrombotik, hipoglisemik, antiinflamatuvar, yara izi oluşumunu azaltıcı ve antihiperlipidemik özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında bizim çalışmamızda ki temel amaç ise çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan soğan ve propolis örneklerinin Fibroblast 3T3 hücre hattında canlılık üzerine etkisini ve 5 farklı bakteride antimikrobiyal özelliğini incelemek olmuştur. Bu amaç doğrultusunda hücre hattı canlılığı için MTT testi kullanıldı. Soğan ile propolis için metanollü ve etanollü ekstraktlarda çalışılmıştır. Antimikrobiyal deneyler için ise metanol, metanol LB ve etanol ekstraktlarıyla çalışılmıştır. Hücre canlılığı ve antimikrobiyal çalışma grubu içinde sıvı mikrodilüsyon tekniği tercih edildi. Soğanın ve propolisin alkol çözücülerini kontrol grubu olarak tercih edildi. Antimikrobiyal deneylerde ise İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinden klinik olarak izole edilen *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* tercih edildi. Metanollü propolis ekstraktlarından elde edilen veriler hücre canlılığında en anlamlı azalmanın 4×10^{-3} µM konsantrasyonunda olduğunu göstermiştir (p=0,001, Tukey

test).Etanollü propolis ekstraktlarının 2×10^{-2} μM konsantrasyonunda hücre canlılığında anlamlı olmasa da bir artış görülmekte ($p=0.151$ Tukey test).

Metanollü ve etanollü soğan ekstraktlarının ise hücre canlılığı üzerine hiçbir etki yapmadığı görülmüştür. Metanollü, metanol LB, etanollü olarak elde edilen soğan ve propolis ekstraktlarının hiçbir konsantrasyonu etki göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Soğan ,3T3 fibroblast, Antimikrobiyal etki.



ABSTRACT

THE EFFECTS OF PROPOLIS AND ONION EXTRACTS ON ANTIMICROBIAL AND 3T3 FIBROBLAST CELLS

The hypothesis we focus on in our study is that the porpholin, seen as a natural antibiotic, has natural antibacterial properties as an alternative to bacterial resistance formation caused by chemical antibiotics. In addition, in the treatment of uncomplicated wounds, onion has the ability to reduce scar formation. The propolis extract has the property of accelerating antiseptic, antibacterial, antifungal, antiviral, astringent, spasmolytic, antiinflatuar, anesthetic, antioxidant, antiulcer, immunomodulator and wound healing in the literature. Onion extract has antidiabetic, antioxidant, antihypertensive, antithrombotic, hypoglycemic, antiinflammatory, scar formation reducing and antihyperlipidemic properties. In the light of all this information, the main purpose of our study was to investigate the effect of onion and propolis samples prepared at various concentrations on viability in Fibroblast 3T3 cell line and the antimicrobial properties of 5 different bacteria. For this purpose, MTT test was used for cell line viability. Onion and methanol extracts were used for onion and propolis. For antimicrobial experiments methanol, methanol LB and ethanol extracts were used. In the cell viability and antimicrobial study group, liquid microdilution technique was preferred. Onion and propolisine alcohol solvents are preferred as the control group. In antimicrobial experiments *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Kliebsiella pneumoniae*, which were clinically isolated from Cerrahpasa Medical Faculty of Istanbul University, were preferred. ($P = 0.001$, Tukey test). An increase in cell viability ($p = 0.151$ Tukey test) was observed at 2×10^{-2} μM concentration of ethanolic propolis extracts. Methanolic and ethanolic onion extracts had no effect on cell viability. No concentration of methanolic, methanol LB, ethanol-derived onion and propolis extracts were effective.

Keywords: Propolis, Onion, 3T3 fibroblast, Antimikrobial effect.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca yüksek fikirlerinden ilham aldığım, maddi ve manevi her zaman yanımda hissettiğim yalnızca akademik bilgisinden değil hayata ve bilimebakış açısıylada kendisini örnek aldığım Danışman hocam saygıdeğer Prof. Dr. Muhsin KONUK'a;

Laboratuvar çalışmalarım, malzeme temininde ve bilgi ve tecrübeleriyle yardımcı olan espiri ve neşe dolu Yard.Doç. Dr Kaan YILANCIOĞLU'na;

Hücre çalışmalarım, fikirleriyle bana destek veren Ar.Gör. Seda KUŞOĞLU'na ve Burcu BALKIŞ'a

Tez yazım aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Tayfun GÖZLER'e

Manevi desteğini hiç eksik etmeyen sabır içinde beni destekleyen Ali ÇALIK ve ev arkadaşlarıma;

Her zaman ve her an varlığını hissettiğim hüzün ve mutluluklarımı paylaşan benim ben olmama sebep olan Annem, Babam ve Aileme teşekkür ederim.

Sedat BALCIOĞLU

EK 2. BEYAN FORMU

Bu çalışmanın kendi tez çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamada etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih

Sedat BALCIOĞLU



İÇİNDEKİLER

EK 1. TEZ ONAY SAYFASI	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
EK 2. BEYAN FORMU	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. YARA	2
2.2. Yara Çeşitleri	3
2.3. Yara iyileşmesi	4
2.3.1. Yara iyileşmesinde evreler	4
2.3.2. İnflamatuvar Faz	5
2.3.3. Erken Enflamasyon	6
2.3.4. Geç Enflamasyon	6
2.3.5. Proliferasyon Fazı	7
2.3.6. Kollajen Sentezi	8
2.3.7. Yara Kontraksiyonu	9
2.3.8. Anjiogenezis	9
2.3.9. Repitelizasyon	10

2.3.10. Remodeling Faz	11
2.4. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler	11
2.4.1. Beslenme	12
2.4.2. Enfeksiyon	12
2.4.3. Diğerleri	13
2.5. Bakteri	14
2.5.1. Bakterilerin genel özellikleri	14
2.5.1.1. Gram Pozitif Mikroorganizmaların Özellikleri	14
2.5.1.2. Gram Negatif Mikroorganizmaların Özellikleri	14
2.5.2.1. Bakterilerin hücre duvarı dışındaki yapılar	15
2.5.2.2. Bakterilerin hücre duvarı altındaki yapılar	16
2.5.3. Escherichia coli genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar	17
2.5.4. Lactobacillus sp. genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar	18
2.5.5. Staphylococcus aureus genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar	19
2.5.6. Pseudomonas aeruginosa genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar	19
2.5.7. Klebsiella pneumoniae genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar	20
2.5.8. Bakterilerin sağlık üzerine olumlu ve olumsuz etkileri ve neden olduğu hastalıklar	20
2.6. PROPOLİS	21
2.6.1. Propolis Tanım ve Tarihçesi	21
2.6.2. Propolis fiziksel özellikleri	23
2.6.3. Propolis kimyasal özellikleri	23
2.6.4. Propolisin biyolojik özellikleri	24

2.6.5. Antioksidan	25
2.6.6. Flavonoidler	26
2.6.7. Propolis antimikrobiyal özellikleri	27
2.6.8. Propolisin kullanım alanları	27
2.6.9. Propolis ile İlgili Çalışma Özetleri	28
2.7. SOĞAN	31
2.7.1. Soğan Tanım ve Tarihçesi	31
2.7.2. Soğan fiziksel özellikleri	32
2.7.3. Soğan kimyasal özellikleri	32
2.7.4. Soğan biyolojik özellikleri	33
2.7.5. Soğan Antimikrobiyal Özellikleri	33
2.7.6. Soğan kullanım alanları	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. GEREÇ	35
3.2. YÖNTEM	37
3.2.1. Çalışmada kullanılan Propolis, Soğan ve Hücre kültüründe kullanılan kimyasal ve malzemelerin hazırlanışı	37
Propolisin Metanollü Ekstraktının Hazırlanışı:	37
Propolisin Etanollü Ekstraktlarının Hazırlanışı:	37
Soğanın Metanollü Ekstraktının Hazırlanışı:	37
Soğanın Etanollü Ekstraktının Hazırlanışı:	38
%70'lik Etanol eldesi:	38
PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4 :	38
Dondurma Medium Hazırlanması :	38

MTT Stok Solüsyonu hazırlanışı :	38
Büyütme Medyumu Hazırlanması :	39
3.2.2. Hücre Kültürü	39
3.2.3. Fibroblast 3T3 Hücre Hattının temini ve çoğaltılması	39
3.2.4. Hücrelerin çoğaltılması, pasajlanması, dondurulması	39
3.2.5. Hücrelerin çözündürülmesi	41
3.2.6. Neubauer lamı yardımıyla hücrelerin sayılması	41
3.2.7. Hücrelerin hesaplanması	41
3.3. MTT (Canlılık Testi)	41
3.3.1. Metanollü Ekstraktlarda MTT (Canlılık Testi)	42
3.3.2. Etanollü Ekstraktlarda MTT (Canlılık Testi)	43
3.3.3. Farklı Konsantrasyonlu Metanollü Ekstraktlara MTT(Canlılık Testi)	45
3.4. Antimikrobiyal testlerde kullanılan bakterilerin eldesi	46
3.4.1. Metanollü Ekstraktlarda Antimikrobiyal Deneyi	47
3.4.2. Metanollü Ekstraktlarda LB ile Seyreltilen Bakterilerin Antimikrobiyal Deneyi	48
3.4.3. Etanollü Ekstraktlarda Bakterilerin Antimikrobiyal Deneyi	49
4. BULGULAR	50
4.1. MTT Testi Kullanılarak Propolis ve Soğan Ekstraktlarının Fibroblast 3T3 hücre hattındaki canlılık sonuçları	50
4.1.1. Propolis ve soğanın metanollü ekstraktının Fibroblast 3T3 üzerine etkisi	51
4.1.2. Propolis metanollü ekstraktlarının 5, 10, 20, 50 , 250 µM konsantrasyonlarıyla Fibroblast 3T3 üzerine etkisi	51
4.1.3. Soğan metanollü ekstraktlarının 50, 250 µM konsantrasyonlarıyla	53

Fibroblast 3T3 üzerine etkisi	
4.1.4. Propolis ve soğanın etanollü ekstraktının Fibroblast 3T3 üzerine etkisi	54
4.1.5. Propolis etanollü ekstraktlarının 50, 250 µM konsantrasyonlarıyla Fibroblast 3T3 üzerine etkisi	54
4.1.6. Soğan etanollü ekstraktlarının 50, 250 µM konsantrasyonlarıyla Fibroblast 3T3 üzerine etkisi	55
4.2. Esherichia coli için propolis ve soğanın metanollü, metanol LB, etanol ile seyreltilmiş ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi	55
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. EK 3. ETİK KURUL KARARI	63
8. KAYNAKLAR	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1** : Tarih öncesi taş kitabet
- Şekil 2** : Yara iyileşmesinin aşamaları.
- Şekil 3** : Çalışmada kullanılan toplanmış ham propolis örnekleri
- Şekil 4** : Propolis metanollü ekstraktlarının Fibroblast 3T3 üzerine etkisi
- Şekil 5** : Propolis metanollü ekstraktlarının Fibroblast 3T3 üzerine etkisi
- Şekil 6** : Soğan metanollü ekstraktlarının Fibroblast 3T3 üzerine etkisi
- Şekil 7** : Propolis etanollü ekstraktlarının Fibroblast 3T3 üzerine etkisi
- Şekil 8** : Soğan etanollü ekstraktlarının Fibroblast 3T3 üzerine etkisi
- Şekil 9** : Metanollü propolisin çalışmamızda kullandığımız bakterilerin üzerine etkisi
- Şekil 10** : Ethanollü Propolisin ve Soğanın çalışmamızda kullandığımız bakterilerin üzerine etkisi
- Şekil 11** : LB'li Propolisin ve Soğanın çalışmamızda kullandığımız bakterilerin üzerine etkisi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Deneylerde kullanılan cihazlar ve yararlanım amaçları

Tablo 2: Deneylerde kullanılan kimyasallar ve yararlanım amaçları

Tablo 3: Deneylerde kullanılan sarf malzemeler ve yararlanım amaçları



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Gram (+)	: Gram pozitif
Gram (-)	: Gram negatif
3T3	: Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
TGF-α	: Transforming growth factor alpha
TGF-β	: Transforming Growth Factor beta
TNF-α	: Tumor necrosis factor alpha
IL-1	: İnterlökin-1
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
ECM	: Ekstrasellular Matriks
O₂	: Oksijen
EGF	: Epidermal growth factor
ILGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
HLA-II	: Human leukocyte antigen-II
TGF-β	: Fibroblast büyüme faktörü beta
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
HIF	: Hipoksiyle indüklenen faktör
H	: Hidrojen
P	: Fosfor
CL	: Klor
DNA	: Deoksiribo Nükleik asi
RNA	: Ribo Nükleik asit
Nm	: Nanometre

CO₂	: Karbondioksit
L	: Lactobacil
µm	: Mikrometre
S	: Staphylococcus
Ca	: Kalsiyum
Fe	: Demir
Mn	: Mangan
Cu	: Bakır
XTT	: Cell Proliferation Assay Kit
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
EEP	: Propolisin etanolik ekstraktlarının
PBS	: Phosphate Buffered Saline
Ph	: Power of Hydrogen
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FBS	: Fetal Bovine Serum
MTT	: Cell Proliferation Assay Kit
UV	: Ultraviyole
ATCC	: American Type Culture Collection
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
LB	: LB Borth (Miller)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Geçmişten günümüze doku bütünlüğünün veya travmatik olarak bozulmasına yara denir. Yaralanan dokunun kendisini iyileştirmeye çalışması fizyolojik bir durumdur. Deforme deri yenilenmesi; travma ile başlayan hücrenin yapısal ve biyokimyasal değişimlerin doku yenilenmesini meydana getirmesidir Sezgin, (2012).

Dünya üzerinde hızlı yara iyileşmesi, iz azaltıcı pomadlar ve solüsyonlar üretilmekte ve bu nevi ilaçların çokluğu ve etkileri azımsanmayacak kadar çoktук. Yara iyileşmesi çeşitliliğine göre ortalama 3 hafta ile 8 ay arasında değişmektedir Şahin (2012). “Antibiyotik direncinin pik yaptığı ve yeni ilaçların olmadığı bir süreçte, kapanmayan yaraların tedavisi, antibiyotik direnci yüksek mikroorganizmaların ortadan kaldırılması açısından “geleneğe dönmenin” bir neden kapısı daha açılacak gibi görünmektedir” Konuk (2015).

Bu çalışmada, Yapışkan gurubundan fibroblast 3T3 ekzotel hücrenin post-operatif dönemde kesilme vb. durumlarda deforme olan fibroblast hücrenin iyileşme sürecinde iz kalması ve enfeksiyon kapmasının önüne geçilmesini ve sentetik antibiyotiklerin neden olduğu direnç mekanizmasına karşın doğal madde olan propolis ve soğan karışımının kullanılması amaçlanmıştır.

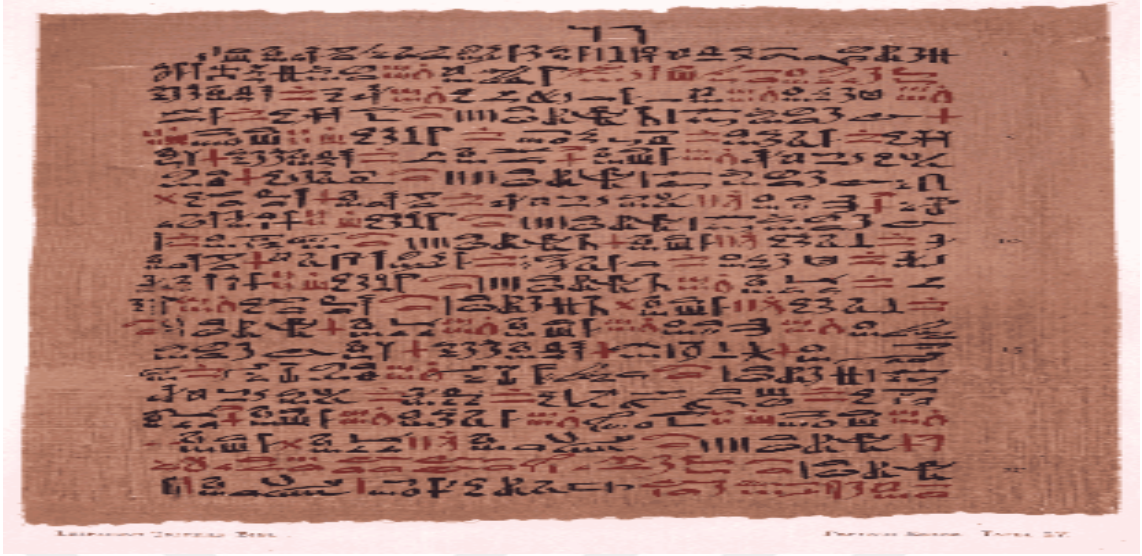
2. GENEL BİLGİLER

2.1. YARA

Tıbbın/Hekimliğin en eski, en temel, en önemli konusudur (Altındaş, 2017). Yara; Dıştan mekanik bir etki sonucu oluşan ve bir organın ya da bir dokunun yapısını ya da biçimini bozan oluşumlara denir. Yaraların kapanma ve iyileşmesi, deforme olan dokunun yenilenme ve düzelme evresiyle fiziksel gözle görülür doğal yenilenme olarak tanımlanabilir. Deri yüzeysel ve iç yapısal oluşumu, dış çevreden gelecek ezilme, kesik, yaralanmaya karşı koruyucu elastik yapıdan oluşur (Kuranel, 2012).

Yara iyileşmesine ait ilk bilgiler M.Ö.2250 yıllarına aittir. Bu dönemde Sümerler tarafından geliştirilmiş çeşitli nedenlerle oluşan yaralar ve yara bakımına ait bilgiler mevcuttur. Sümerler tarafından yazılan kitabelerde yaraların önce su ve sütle yıkanıp bal ile kapatıldığı bildirilmektedir Daha sonraki dönemlerde M.Ö. 1700’lü yıllarda Mısır’da Ebers Papirüslerinde çeşitli hastalıklara ait reçeteler görülmüştür (Şekil 1). Bu reçetelerin büyük bir kısmı yara iyileşmesine aittir (Sezgin, 2012).

Şekil1: Ebers papirüslerinde yara iyileşmesinin anlatıldığı papirüs



Ondokuzuncu yüzyıla kadar yara iyileşmesi açısından çok büyük bir gelişim yaşanmamıştır. 19. yüzyılın ortalarından itibaren yara üzerindeki mikroorganizmaların tanımlaması ve sepsis kavramının gelişmesi ile birlikte yara iyileşmesi ve yara bakımının önemi iyice kavranmaya başlanmıştır. Yirminci yüzyılın başlarında İlya Metchnikoff yaptığı çalışmalarda yaralı bölgede ortaya çıkan inflamasyonun, kolonize olan bakterileri fagosite etmek için bağışıklık sistemi hücrelerini bölgeye davet eden bir mekanizmayı ortaya koymuştur. Metchnikoff bu çalışması ile 1908 Nobel Tıp Ödülü almış olup yara iyileşmesi konusundaki ilk modern yaklaşıma adım atmıştır (George-Broughton ve ark, 2006).

2.2. Yara Çeşitleri

Yaralar aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır:

A. Yarayı oluşturan etkenlere göre yara tipleri

1. Travmatik yaralar

Kesi yaraları, laserasyon yaraları, delici yaralar, abrasyon yaraları, avulsiyon yaraları, silah mermisi yaraları, kırık fragmanlarının ekspozisyonu ile ortaya çıkan yaralardır.

2. Vasküler nedenli yaralar

Arteriel yetmezlik yaraları, venöz yetmezlik yaraları, lenfatik yaralardır.

3. Nörojenik yaralar (trofik bozukluklar sonrası, duyu bozuklukları-nöropatik bozukluklar sonrası gelişen yaralar)

4. Basınç yaraları

Hava, kimyasal maddeler ile yaralanmalarıdır.

5. Termal yaralar

Yanık, donuk yaralanmasıdır.

6. Hayvan ısırıkları ile oluşan yaralar

7. Hastalıklar sırasında ortaya çıkan yaralar

Malign, metabolik, enfeksiyon, hematolojik hastalıklardır.

B. Yaranın derinliğine göre yara tipleri

Yüzeysel ve derin yaralardır.

C. Yaranın oluşma zamanına göre yara tipleri

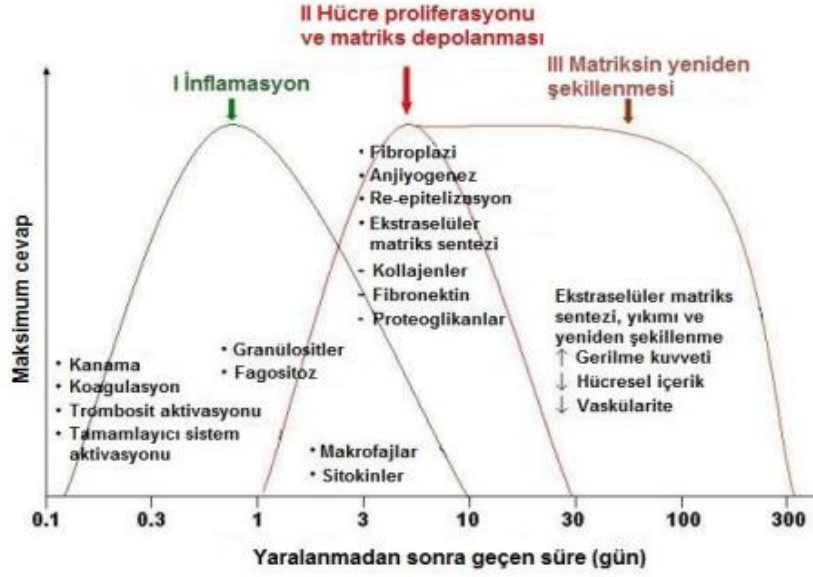
Akut ve kronik yaralardır (Kaltalıoğlu,2012).

2.3. Yara iyileşmesi

2.3.1. Yara iyileşmesinde evreler

Yaralanma anından itibaren, hızlı bir hemostaz ile sonuçlanacak çeşitli olaylar gerçekleşir. Travmatik yaralanma cilt yapısında, yara kenarının retraksiyonu ve doku kontraksiyonu ile sonuçlanan değişikliklere neden olur. Bu durum küçük venüller ve arteriyollerin sıkışmasına yol açar. Aynı zamanda damarlar yaklaşık 10 dakika boyunca yoğun refleks vazokonstriksiyonuna uğrarlar. Trombositler kopmuş damarların lümenlerinde kümeleşmeye başlarlar (Trott, 1997)

Şekil- 2: Yara iyileşmesinin aşamaları.



2.3.2. İnflamatuvar Faz

Trombositlerden trombüs oluşur. Bunlardan salınan growth faktörler makrofaj ve nötrofiller için kemotaktik etkilidir. Makrofaj ve nötrofiller nekrotik doku ve bakterilerin yaradan uzaklaşması için çalışır. Yara İyileşmesinde en etkili makrofajlardır (Başak, 2017). Yara oluşumu ile beraber başlar, bu evrede hemostaz oluşur ve enflamatuvar materyaller yığıntı oluşturur (Kılıçoğlu ve ark., 2005).

İyileşme süreci yaralanmayı takiben trombositlerin kollojenle temas ettikleri anda başlar. Trombosit adhezyonu, agregasyonu ve pıhtılaşma faktörlerinin salınımı sonucunda fibrin pıhtısı oluşur. Fibrin pıhtısı iyileşmenin ileri dönemlerinde geçici ekstraselüler matris oluşumuna katkıda bulunur (Sezgin, 2012)

Bu hücreler, inflamatuvar cevapta ve başlangıçtaki fibroblast ve kollajen oluşumunda önemli rol oynarlar. Bu hücrelerin ilk sorumluluğu fagositoz ve yara enkazının kaldırılmasıdır. Makrofajlar bunların dışında yara iyileşmesi için gerekli TGF- β , TNF- α , IL-1, PDGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi faktörleri salgırlar (Kaltalıoğlu, 2012).

2.3.3. Erken Enflamasyon

Yaralanmadan hemen sonra ilk gözlenen hücelere olan nötrofillerin yaralanan bölgede oluşumu enflamasyonla artan vasküler permeabilite ve prostoglandinler, interlökin-1, tümör nekroz faktörü-a, kompleman sistemi gibi değişim faktör aktivesiyle

uyarılır. Makrofajlar, lenfositler ve fibroblastlar da aynı uyarılarla yara bölgesine gelerek benzer faktörlerin etkisiyle iyileşme süreci başlar.

Yara bölgesinde bakterilere karşı, fagositoz görevinde nötrofillerden daha sonra makrofajlar fagositoza devam eder. Oluşan bu evrede, yarada bakteriyel kontaminasyon görülüyorsa nötrofillerde görülmeye bilir, ancak makrofajlar ve lenfositlerin varlığı yaşamsaldır.

Yara ilk oluşumunda makrofajların artışı, yara bölgesinde hücre artıklarının fagositozuna yöneliktir, aynı zamanda yara alanındaki makrofajlardan salınan sitokinler anjiyogenezi ve fibroplaziyi uyarır. Aktive makrofajlardan, oluşan sitokinlerle uyarılan lenfositlerin salgıladıkları lenfokinler yara bölgesinde fibroblast migrasyonunu, proliferasyonunu ve kollajen sentezini düzenler.

Yara bölgesinde azalan enflamatuar oluşumu yara iyileşmesini ters etki yaptığı klinik deneylerle gösterilmiştir. Diabetes mellitusta gözlenen enflamatuar hücrelerinin azalan aktivasyonu Diabetes mellitus hastalarında yara iyileşmesinde olumsuz etkilemektedir. Kortikosteroid tedavisinde, körelmiş enflamasyon hücre migrasyonunu, proliferasyonunu ve anjiyogenezi menfi etki göstermektedir. (Anonim 2016c).

2.3.4. Geç Enflamasyon

Makrofajlar yara iyileşmesinin en önemli hücreleridir. Yaralanmadan 48-72 saat sonra makrofajlar baskın hale geçmektedir. Yara bölgesinden salgılanan çeşitli kemotaktik maddelerin etkisi ile kapillerlerden ekstravasküler alana geçen monositler fibronektin ve serum faktörlerinin etkisi ile aktive makrofajlara dönüşürler (Fırıncioğulları, 2006).

Makrofajlar mikroorganizmaların, yabancı cisimlerin ve ölü dokuların fagositozunda ve salgıladıkları TGF- β , PDGF, İnterlökin-1 (IL-1), ILGF-1, Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor; FGF) gibi önemli sitokinler aracılığıyla yara iyileşmesinin diğer basamaklarında rol almaktadırlar. Makrofajların ayrıca hücre dışı zar (Ekstrasellular Matriks; ECM) sentezi ve salgıladıkları kollajenaz, elastaz ve sitokinlerle ECM yıkımında da rol oynadıkları gösterilmiştir. Makrofajlar; fibroblast proliferasyonu, kollajen üretimi ve diğer iyileşme işlemlerini stimüle eden sitokinlerin

ana kaynağıdır. Bunlar arasında Tümör nekroz faktor- α (TNF- α), PDGF, TGF- β , IL-1, Insulin-like Growth Factor-1, TGF- α ve FGF vardır. TGF- β kendi üretimini makrofaj düzeyinde otokrin yolla denetler ve makrofajların FGF, PDGF, TNF ve IL-1 salgılamasını uyarır (Lawrence, 1998), (Can Z, 2001).

Hipertrofik skarlarda bol miktarda makrofaj olduğu ve salgıladıkları fibroblast aktive edici PDGF, TGF- β gibi sitokinler aracılığıyla hipertrofik skar ve keloid oluşumunda rol oynayabildikleri ileri sürülmüştür (Niessen ve ark., 1999; Castagnoli ve ark., 1994; Elias ve ark., 1982)

Yara bölgesinde IL-1 düzeyleri düşük ise artmış (Ekstrasellular Matriks; ECM) ECM birikimi ve skar oluşumu gözlelenebilmektedir. Aynı şekilde keloid hastalarında lezyonun şiddetiyle orantılı azalmış IL-1 düzeyleri saptanmıştır (Lowry, 1993; Postlethwaite ve ark., 1983). 2.3.5. Proliferasyon Fazı

Yara iyileşmesi mesenşimal hücrelerin yaraya migrasyonuna ihtiyaç duyar. Mezenşimal hücre kemotaksisi, proliferasyonu, anjiyogenezi ve epitelizasyonu yaralanmadan sonra 2-4 gün içinde başlar. Fibroblastlar 2-3 hafta boyunca lineer şekilde artan kollajen sentezi yapar. Bunların tamamı sitokinler aracılığıyla düzenlenir. Yara iyileşmesi (Ekstrasellular Matriks; ECM) ECM'i oluşturan fibrin, fibronektin ve vitronektin hücre göçü için bir yapı iskelesi oluşturarak granülasyon dokusu oluşumuna katkı sağlar. Hücrelerin bu moleküllere bağlanabilme ve ayrılabilme kapasiteleri göç etmelerini mümkün kılar. Fibroblastların üzerinde sergilenen uygun fibronektin ve integrin reseptörleri granülasyon dokusu oluşumunda hız kısıtlayıcı rol oynar. Geçici matriks içine hücre göçü fibroblastlar, endotel hücreleri, keratinositler ve diğer hücreler tarafından salınan kollajenaz (MMP-1), jelatinaz (MMP-2), stromelizin (MMP-3) gibi proteolitik enzimlere bağlıdır. Yara iyileşmesi döneminde kalıcı granülasyon dokusu, (Ekstrasellular Matriks; ECM) ECM yetersiz yıkım veya aşırı matriks sentezi hipertrofik skar ve keloid oluşumuna neden olabilmektedir. Yaralanmadan sonra 7. günden itibaren aktin fibrilleri oluşmaya başlar; 9. günde ise yara bölgesindeki tüm fibroblastlar kollajen sentez fenotiplerini kaybederek sıkıca demetlenmiş aktin lifleri içeren miyofibroblastlara dönüşürler (Niessen ve ark., 1999; Monaco ve Lawrence, 2003; Clark, 1993).

Miyofibroblastlar normal yara iyileşmesi sırasında geçici bir süre granülasyon dokusunda görülmekte ve reepitelizasyonun tamamlanması ile muhtemelen apoptozla 3. haftadan sonra ortadan kaybolmaktadırlar (Lawrence, 1998; Clark, 1993)

PDGF'ün bu dönüşümde etkili olduğu ve miyofibroblastların yara kontraksiyonunda rol aldıkları düşünülmektedir. Miyofibroblastlar normal yara iyileşmesi sırasında geçici bir süre granülasyon dokusunda görülmekte ve reepitelizasyonun tamamlanması ile muhtemelen apoptozla 3. haftadan sonra ortadan kaybolmaktadırlar (Ehrlich ve ark., 1994; Clark, 1993).

2.3.6. Kollajen Sentezi

Cerrahi travma sonucu aktive olan makrofajlar, fibroblastik proliferasyon ve transformasyon yanında neovaskülarizasyonu ve kollajen sentezini de uyaran bazı mitojen maddeler serbestleştirirler. Kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonu sonucunda oluşan yeni damar yapılarının belirlenmesi, başka bir deyişle neovaskülarizasyonu (anjiogenezis), inflamasyon evresinin tamamlanmasında belirgin bir özelliktir. TNF- α uyarısı ile neovaskülarizasyon yara kenarlarından başlar ve O₂ gradientini yükselterek fagositozu artırır (Pekcici Çuhadar, 2007; Kurt, 2001).

Endotelial hücreler ise yara kenarındaki sağlam venüllerden veya anjiogenez sonucu oluşan yeni kapillerden ortaya çıkar. Makrofajlardan salınan büyüme faktörleri, sitokinler ve kemotaktik faktörler; fibroblastların proliferasyonu ve yeni kollajen sentezini uyarırlar. Endotel hücreleri de makrofajlardan salınan sitokinlerden etkilenir ve tomurcuklanma yoluyla yaranın orta kısımlarına doğru ilerler ve yeni damar oluşumlarını başlatırlar. Makrofaj ve fibroblastların yaşamlarını sürdürebilmeleri ve yara iyileşmesinin ilerleyebilmesi için gerekli oksijen bu yeni oluşan kan damarlarıyla sağlanır (Kurt, 2001; Eryılmaz, 1996; Erbil, 2002; Kapan, 2006).

Skar dokusunun oluşumu sadece kollajen sentezine bağlı olmayıp aynı zamanda oluşan kollajenin yeniden yapılanması, düzenlenmesi ve kollajen demetleri arasında bağlantıların yeniden kurulmasıyla mümkündür. Bu durumun düzenli bir şekilde yürüyebilmesi için kollajen sentezinin yanında kollajen katabolizmasının da gerektiğinde devreye girmesi gerekmektedir. Kollajen molekülleri sıralı bir şekilde yıkılır. Önce kollagenaz bir polipeptid zincirinin spesifik bölgesinden tek bir proteolitik ayrışma yapar. Sonra bir seri proteaz reaksiyon ürünleri ile etkileşerek onları fagosite edilecek küçük parçalara böler. Majör olarak makrofaj ve fibroblastlarca üretilen kollagenaz, nötrofil ve epitelial hücrelerince de üretilmektedir (Green ve ark., 2008; Vorauer- Uhl ve ark., 2002; Mouës ve ark., 2008).

2.3.7. Yara Kontraksiyonu

Yara kontraksiyonu yeterli mobilitesi olan bölgelerde yara kapanmasında en etkin mekanizmadır.

Doku kaybı olan yaralarda ,yara bölgesi;çevre dokunun bütün kalınlığına sentrpedal olarak defektin geometrik merkezine ilerler. Bu olay yara oluşumundan 5-7 gün içinde başlar ve dinamik bir olaydır.Hücre ve matriksin karşılıklı etkileşimi sonucudur. Bu olaydaki kontraktıl kuvvetin kaynağı Fibroblast (myofibroblast) hareketidir.Kontraksiyon oranı ilk 2-8 hafta en fazladır. Bunun aşırı olması hipertrofik skar ve distorsiyon sebebidir.Bu sonuçlar yara bölgesinde yapı ve fonksiyon bozukluğuna yol açar. Patolojik yara kontraksiyonunun önlenmesi için geniş, açık yaralarda tam tabaka deri graft'i;cerrahi girişimin uygun planlanması;eksternal fiksator kullanımı gibi işlemler yararlıdır (Doğantürk, 2017).

2.3.8. Anjiogenezis

Bifosfonatlar kanser hastalarında antianjiogenetik özellikleri sayesinde tümör hücresinin proliferasyonunu baskılayarak tümöral hücrelerin yayılmasını önlemede kullanılırlar. (Santini, 2003). Kemik remodelasyonu ile anjiyogenez arasında oldukça yakın ilişki vardır. Bifosfonatların kemikte remodelasyonu baskılaması kemikte anjiyogenezin bozulmasına neden olmaktadır. Vaskülarizasyonun bozulması sonucu en ufak travmayı takiben yara iyileşmesinde aksaklık meydana gelmektedir (Santini, 2006).

Anjiyogenez, damarlanma manasında kullanılmaktadır. Anjiyogenez büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörlerinin rol oynadığı karmaşık bir olaydır. Endotel hücreleri bu olayda temel rol oynamaktadır. Anjiyogenez, hipoksi ve enflamasyon uyarısı sonucu aktivator faktörlerin artması ve inhibitör faktörlerin azalması ile başlamaktadır.

2.3.9. Reepitelizasyon

Epidermisin temel görevi iç ve dış ortam arasında bir bariyer oluşturmaktır. Dış ortamdan zararlı maddelerin girişini önlerken elektrolit ve sıvı kaybına da engel olur (Smith ve ark., 1997; Yormuk, 2001)

Yaralanma sonrasında derinin bariyer fonksiyonunun yeniden oluşturulması için epitelin yenilenmesi gerekir. Reepitelizasyon yaralanmadan sonra saatler içinde başlar. Primer olarak kapatılmış insizyonel cerrahi yaralarda reepitelizasyon 24-48 saatte

tamamlanır. Tam kat doku hasarlarında reepitelizasyon sadece yara kenarlarından gerçekleşebilmektedir.

Reepitelizasyon, abrazyonlar ya da yüzeysel yanıklar gibi parsiyel doku kayıplarının iyileşmesinde çok daha önemlidir. Bu tür yaralanmalarda epitelyal hücreler yara kenarlarından ve deri eklerinden (saç follikülü, sebace bezler, kıl follikülleri ve ter bezleri) köken alırlar. Bu deri ekleri dermisin altına dek uzandıklarından kısmi kalınlıktaki yaralanmalardan sonra sağlam kalırlar. Çevredeki epidermis veya deri eklerinden gelen epidermal hücreler, eskarı canlı dokudan ayırarak yara yüzey bütünlüğünü sağlarlar (Lawrence, 1998; Yormuk, 2001; Monaco ve Lawrence, 2003; Peled ve ark., 2000).

Epitelizasyon sırasındaki hücreysel ayrılma, migrasyon, proliferasyon ve differansiyasyon yaralanmadan sonraki saatler içinde başlar. Reepitelizasyonun en erken bulgusu yara kenarı boyunca bazal hücre tabakasında kalınlaşmadır. Tek tabaka olarak ilerleyen hücreler bazal hücrelere daha çok benzer şekilde farklılaşırlar. Yara kenarından başlayarak yeni bir bazal membran oluşur. Hücreleri yeni bazal membrana bağlayan yeni hemidesmozomlar oluşur. Yeni bazal hücrelerde proliferasyon çok tabakalı epidermis oluşturulurken devam eder. Sonuçta yeni yüzey hücreleri keratinize olmaya başlar (Yormuk, 2001).

Reepitelizasyonda EGF, TGF- α , PDGF ve ILGF-1 gibi sitokinler rol alırlar. Reepitelizasyonun tamamlanması ile ECM yapımı azalırken hücre apoptozu artar. Epitelyal kapanma zamanının 3 haftadan daha uzun sürmesi hipertrofik skar gelişimi için önemli bir risk faktörü oluşturur. Bu nedenle özellikle yüz, eklem ve elde oluşan geniş doku kayıplarının 2-3 hafta içinde kapatılması önerilir. Hipertrofik skar ve keloidlerde epidermis kalınlığı artmış, keratinosit proliferasyon ve diferansiyasyon oranı artmış olarak bulunmaktadır. Hipertrofik skar keratinositlerinde artmış human leukocyte antigen-II (HLA-II) sunulumu etiyolojide immünolojik faktörlerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Niessen ve ark., 1999; Castagnoli ve ark., 1994; Al-Attar ve ark., 2006; Garner, 1998).

2.3.10. Remodeling Faz

İyileşmenin bu evresinde akut ve kronik zarar görmüş hücreler azalarak, Bol hücreli granülasyon dokusunun yerini daha az hücreli yara dokusu alır. Yara oluşumundan yaklaşık 3 hafta sonra kollojen yapımı ve yıkımı arasında denge seviyesine ulaşılır.

Böylece olgunlaşma evresi olarak adlandırılan iyileşmenin son evresi başlamış olur. Kollojen miktarında artma olmaksızın kollojen liflerinin çevresel mekanik faktörlere bağlı olarak yeniden şekillenmesi 2 yıldan fazla süren bir süreç gerektirir. Bu aşamada yara gerim kuvveti devamlı artmaktadır. Bu evrenin ana özelliği iyileşmenin erken evresinde sentezlenen Tip III kollojenin yıkılarak yerini Tip I kollojene bırakmasıdır. Kollojenleri parçalayan kollojenaz, fibroblastlarca sentezlenir (Sezgin, 2012)

Ayrıca makrofajlar da uyarıldıklarında kollojenaz sentezleyebilmektedirler. Taze yaranın yara gerilim kuvvetinde 10-14 gün boyunca çok az bir artış görülür. Bu dönemden sonra yara gerim kuvveti hızla artar. 4. haftada sağlam dokunun yara gerilim kuvvetinin %70'ine ulaşır. Bu dönemden sonra artış hızı yavaşlar ve yıllar geçse bile asla yaralanmadan önceki değerine ulaşamaz. Ancak yaralanmadan önceki kuvvetinin %80'i kadar olabilir. Yara iyileşmesinde istenmeyen durumlardan olan hipertrofik nedbe ya da keloid gibi oluşumlar bu aşamada ortaya çıkar (Stadelmann ve ark., 1998).

2.4. Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Birçok nedenle açılan yaralarda, normal fizyolojik süreçte gelişmesi gereken olaylar zincirine etki eden durumlardan dolayı iyileşme problemi ortaya çıkmaktadır. Yara iyileşmesi bozulduğunda kronik yara haline gelmektedir. Zinciri bozan bu faktörler lokal, sistemik veya sistemik bir hastalığın lokal etkileri olabilmektedir. Yara iyileşmesinde; beslenme bozukluğu, metabolik hastalıklar, konjenital yara iyileşme bozuklukları, alkolizm, steroid kullanımı, kanser kemoterapisi, ileri yaş, uzak malignite, diyabet gibi sistemik faktörler; enfeksiyon, yabancı cisim, iskemi, malignite, sigara, venöz yetmezlik, mekanik travma, toksinler ve radyasyon gibi lokal faktörler etkilidir (Cotran ve ark., 1999).

2.4.1. Beslenme

Yara bölgesindeki yüksek metabolik aktivite oksijen ve beslenme ihtiyacını artırır. Ortamdaki düşük pH, laktat artışı ve azalmış oksijen basıncı yeni kan damarı oluşumu için uyarıcı faktörlerin salgılanmasına neden olur. Bu aşamada anjiogenez kritik bir öneme sahiptir. bFGF, TGF- β ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok büyüme faktörü anjiogenez'i güçlü olarak uyarır. Anjiogenezin doku oksijen seviyelerine bağlı olarak aktiflenen oksijen duyarlı proteinler yoluyla düzenlenen anjiogenik ve antianjiogenik gen transkripsiyonu ile anjiogenezin doğrudan kontrol

edildiği düşünülmektedir. Örneğin yakın zamanda bulunan oksijen bağlayabilen hipoksiyle indüklenen faktör (HIF) endotel hücrelerinden VEGF sentezini arttırmaktadır (Knighton ve ark., 1983; LaVan ve Hunt, 1990)

Oksijen, dünyada en çok bulunan moleküldür. Travma, ödem, oklüzyon gibi dokuda beslenme ve dolaşım bozukluğu meydana getirebilen durumlarda doku tarafından üretilen bazı metabolitlerle reaksiyona girerek serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadır. Organizmadaki serbest radikaller dokuda daha fazla hasar meydana getirebilmektedir (Harris ve ark., 1981).

2.4.2. Enfeksiyon

Nötrofiller enfeksiyon karşısındaki ön savunma duvarını oluştururlar. İlk 3 gün boyunca yara bölgesinde egemen hücre olarak bulunurlar. Yaranın temizlenmesi için ürettikleri enzimler ve serbest radikaller aracılığıyla bakterileri ve yabancı maddeleri fagositoz yolu ile ortadan kaldırır (King, 2001; Komesu ve ark., 2004; Akut, 2003; Pollard ve Earnshaw, 2004; Cockbill, 2002)

Yara bölgesinde bulunan mast hücreleri de salgıladıkları aktif aminler aracılığıyla çevre kan damarlarından yara alanına hücre göçünü hızlandırır (Diegelmann ve Evans, 2004).

1 gr. dokuda 105 ten fazla organizma oluşumuna yara enfeksiyonu denir. 4-6 haftadan uzun sürede iyileşmeyen yaralara kronik yara denir (Başak, 2017)

2.4.3. Diğerleri

İyileşmeyi etkileyen Diğer faktörler şunlardır:

- a.** Yaş
- b.** Cins ve Irk
- c.** Hormonlar
- d.** Zedelenmenin özelliği ve lokalizasyonu, doku tipi
- e.** Yara bölgesi üzerine sürekli travma iyileşmeyi olumsuz etkiler.
- f.** Isı ve nem
- g.** Kan akımı, anemi, hematoma, oksijen ve sigara dokunun oksijen basıncını düşürerek olumsuz etkiler.
- h.** Denervasyon, iyonize radyasyon, mekanik stresler

- i.** Cerrahi teknik; cerrahi işlemler sırasında doku zedelenmesi en aza indirilmeli, hemostaz iyi yapılmalı, ölü boşluk bırakılmamasına dikiş gerginliğine dikkat edilmelidir.
- j.** İlaçlar(Glikokortikosteroidler, sitotoksik ilaçlar, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar ajanlar, enzimatik debritleme, Histamin vs.)
- k.** Diyabet, sarılık, obezite, ödem, genetik ve immunoloji ve diğer kronik hastalıklar (Deniz, 2010).



2.5. BAKTERİ

Bakteriler çok küçük, basit yapılı, genetik materyali özel bir membranla çevrilmemiş tek hücreli organizmalardır. Bu nedenle prokaryot olarak tanımlanırlar. Bakteriler, genel olarak şekillerine göre üç grupta toplanır; çubuk şeklinde olanlar basil, yuvarlak veya oval olanlar kok ve helikal yapıda olanlar spirillum olarak tanımlanmaktadır. Herbir bakteri türü, çift, zincir, küme tarzında veya tek tek görülebilir (Arda, 1985).

2.5.1 Bakterilerin genel özellikleri

Bakteriler *peptidoglikan*'dan yapılı bir hücre duvarı ile çevrilidir. Hücre duvarındaki komponentlerin farklı olmasından dolayı bakteriler çeşitli boyalarla farklı boyanma özelliklerine sahiptir. Bakteriler genel olarak ikiye bölünmek sureti ile çoğalmaktadırlar. Bakteriler beslenmeleri için organik, inorganik maddeleri kullanabilir. Ayrıca fotosentez yapma yeteneğine sahip bakteriler bulunmaktadır. Bir çok bakteri flagella adı verilen yapıları ile aktif olarak hareket edebilmektedir. Bakteriler oksijenli (aerob) veya oksijensiz ortamda (anaerob) üreyebilirler (Arda, 1985).

2.5.1.1. Gram Pozitif Mikroorganizmaların Özellikleri

Peptidoglikan tabaka Gram-pozitif bakterilerde Gram-negatif bakterilerinkine göre daha kalındır ve Gram pozitif bakterilerde hücre duvarının %55-60'ını oluşturur. Bir çok Gram-pozitif bakterinin hücre duvarında ayrıca teikoik asit adı verilen bir polisakkarit bulunmaktadır. Teikoik asit, peptidoglikan tabakaya yada Sitoplazmik membrana bağlıdır. Hücre içine iyon giriş ve çıkışında ve normal hücre bölünmesinde de rol oynayabilmektedir (Arda, 1985).

2.5.1.2. Gram Negatif Mikroorganizmaların Özellikleri

Gram negatif bakteri hücre duvarı üç katmanlı bir yapıdan meydana gelmiştir. En dışta 0.006-0.02 mikrometre kalınlıkta protein, fosfolipid ve lipopolisakkaritten oluşan dış membran, ortada, peptidoglikan karakterinde ve 0.0015-0.003 mikrometre kalınlıkta orta membran ve en içte de protein ve fosfolipid yapıda 0.007-0.008 mikrometre kalınlıkta iç membran bulunmaktadır. Gram negatif bakterilerde bulunan peptidoglikan tabaka hücre duvarının %5-10'u kadardır (Arda, 1985).

2.5.2.1. Hücre Duvarı Dışındaki Yapılar

Kapsül (Mikrokapsül, Mukoid Tabaka)

Bazı bakterilerde hücre viskoz bir madde ile çevrilmiştir. Bakteri hücrelerini saran bu yapıya kapsül denir. Kalınlığı bakteri türlerine göre 0.2 – 10 μ m arasında değişir. Bakterilerde kapsül genellikle polisakkarit yapıdadır. Polisakkarit kapsüller genellikle bir veya birkaç şekerden oluşan basit polimerlerdir (Arda, 1985).

Kapsülün en önemli fonksiyonları, bakterinin bulunduğu ortamdaki yüzeylere (barsak epiteli, ağız mukozası vs.) tutunmasını ve bakterileri fagositoza karşı koruma sağlayabilmesidir (Arda, 1985).

Flagella

Flagella, son derece ince, saç benzeri, Sitoplazmik membran ve hücre duvarına bağlı çıkıntılardır. Flagella, basal komponent, kıvrım yeri (çengel) ve hücre duvarı dışında uzanan uzun bir filament olmak üzere üç kısımdan oluşur. Basal komponent, flagellanın Sitoplazmik membranda tutunmasını sağlayan ve birbirinden 12-15 nm uzaklıkta iki çift diskten meydana gelir. Üstteki çift halkalar, Gram negatif bakterilerde vardır. Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan tabakanın fazla ve sağlam olması nedeniyle üst diskler bulunmamaktadır (Arda, 1985).

Fimbria (Pilus)

Fimbria'lar flagelladan daha kısa (0.1-2.0 μ m) ve ince olup birçok Gram-negatif bakteri türünün yüzeyinde bulunur, Gram pozitif bakterilerde ender rastlanır. Hareket ile ilgileri yoktur. Hareketli ve hareketsiz bakterilerde bulunabilirler (Arda, 1985).

Hücre duvarı

Hücre duvarı bakteri hücrelerine karakteristik görünümünü veren kompleks bir yapıdır. Hassas olan Sitoplazmik membranı saran hücre duvarı, onu çevre koşullarında meydana gelen değişikliklerden korumaktadır (Arda, 1985).

Hücre duvarının ana fonksiyonu hücre içindeki ozmotik basıncın hücre dışından daha fazla olduğu durumlarda bakteri hücrelerini parçalanmaya karşı dayanıklı tutmaktır. Bu da bakterilerin yüksek veya alçak ozmotik basınç, dondurma ve çözme gibi çok farklı fiziksel koşullara maruz bırakılması halinde, hücrelerin şekillerini korumaları ile kolayca kanıtlanmaktadır (Arda, 1985).

2.5.2.2. Hücre Duvarı Altındaki Yapılar

Bakterilerde dış yapının altında aktif ve canlı bir Sitoplazma bulunmaktadır. Sitoplazmik membran, Sitoplazma, ribozom, mezozom, nukleoid (çekirdek), Sitoplazmik granüller (lipid, polisakkarit, sülfür), pigment ve endosporlar bakterilerde başlıca hücre içi strüktürlerdir (Arda, 1985).

Sitoplazmik Membran

Plazma membranı, hücre Sitoplazmasını saran ve hücre duvarının iç kısmında bulunan ince bir zarıdır. Sitoplazmik membranın kuru ağırlığının % 60'ını protein, % 40'ını lipid teşkil eder. Sitoplazmik membran, Sitoplazmayı koruyan yarı geçirgen ve selektif bir membrandır. Hücre içine girecek besin maddelerini ve hücreden çıkan artıkları kontrol eder. Dışarıdan alınacak besin maddeleri pasif veya aktif transport yolu ile hücreye girerler (Arda, 1985).

Sitoplazma

Sitoplazma, bakterilerde Sitoplazmik membran içindeki organik ve inorganik maddelerden oluşan sıvı karakterdeki bir yapıdır. Canlı ve biyolojik olarak aktif olan Sitoplazmanın belli bir yapısı yoktur. Sitoplazmanın %80'i sudur ve içinde çeşitli iyonlar (H, P, CL), aminoasit, protein, lipokompleks, peptid, purin, pirimidin, glukoz, riboz, vitamin, nükleotid, koenzim, disakkarit vs. bulunur. Ayrıca mezozom, ribozom, Sitoplazmik granüller ve endosporlar Sitoplazmada yer alırlar. Ökaryotik hücrelerde olduğu gibi prokaryotlarda Sitoplazmik akım yoktur (Arda, 1985).

Bakterilerde Sitoplazma içerisinde nüklear bölgede tek ve sirküler bir DNA molekülü bulunur ve bakterial kromozom bakteri için gerekli genetik bilgiyi taşır (Braun, 1965).

Ribozomlar

Bakteri hücrelerinin Sitoplazmasında binlerce bulunan bu küçük yapılar hücreye granüler görünüm vermektedir. Yapılarında % 60 RNA ve % 40 protein bulunur. Büyüklükleri 20 nm kadardır. Ribozomlar, bakteri için gerekli proteinlerin ve enzimlerin sentezlendikleri ünitelerdir (Attardi ve Amaldi, 1970).

Sitoplazmik granüller, genellikle organik depo maddeleridir. Sitoplazmik granül sayısı besi yeri ve üreme durumuna göre azalır veya çoğalır. En çok rastlanılan

sitoplazmik granüller volutin, lipid, polisakkarit ve sülfür granülleridir (Arda, 1985).Endosporlar

Bacillaceae familyasında Bacillus ve Clostridium cinslerine bağlı Gram pozitif bakteriler, gerekli besin maddelerinin yokluğunda hücre içinde endospor adı verilen yuvarlak şekilli cisimler oluştururlar. Spor oluşumu bu familyanın önemli ve ayırıcı bir özelliğidir. Kalın bir duvara sahip bu oluşumlar çok az su içerirler ve oldukça dayanıklıdır. Ortamda serbest kaldıklarında, yüksek sıcak ve kuru ortamda ve toksik kimyasal maddelere maruz kaldıklarında canlılıklarını sürdürebilirler (Arda, 1985).2.5.3. Escherichia coli genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar

E. coli Enterobacteriaceae familyasının bir üyesidir. İnsan ve hayvanların barsak kanalında hem normal florada bulunur hem de bazı enfeksiyonlara neden olurlar. “Bergey’s Manuel of Systemetic bacteriology” adlı eserde bu familyada *E. coli*’den başka, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Proteus* ve *Erwinia* cinsleri de bulunmaktadır. Familyada yer alan mikroorganizmalardan bir kısmı insan ve hayvanlar için, bir kısmı da bitkiler için patojendir.

Ülkemizde ve dünyada çok yaygın olan bu mikroorganizmalar, büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu familyaya ait hastalık etkenlerinin tam olarak tanımlanması için biyokimyasal yöntemler, serolojik analizler, faj tiplendirmesi ve daha detaylı biyokimyasal testler geliştirilmiş ve rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulamaya sokulmuştur (Arda ve ark., 1992).

E. coli, Gram negatif, çomak veya çomakçık şeklinde, hareketli, sporsuz, kapsüllü bir bakteridir. Hem barsak florasında hem de barsak enfeksiyonlarına neden olan ve barsaklardan dışkı ile atılabilen bir bakteri olduğu için dışkı ile kontamine her türlü materyalde (su, toprak, gıda, alet-ekipman vs.) bulunabilmektedir. *E. coli*, genel olarak, buzağı septisemisi, kuzu septisemisi, kanatlı hayvanların kolibasillozisi, domuz yavrulunun koli basillozisi, taylarda *kolibasillozisi*, *koligranüloma*, *mastitis* gibi hastalıklarda primer veya sekonder etken olarak bulunabilmektedir (Arda ve ark., 1992).

Gıdalarda ve sularda *E. coli* bulunması fekal bulaşma indikatörü olarak önemlidir. Gıda maddelerinde sık olarak görülür (Tayyar ve Hecer, 2013).

2.5.4. Lactobacillus sp. genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar

Lactobacil'ler bakteri klasifikasyonunda, Gram pozitif spor oluşturmeyen çomaklar grubu içinde yer alırlar. Bu grupta *Lactobacillus*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Brochotrix*, *Renibacterium*, *Kurthia*, *Caryophanon* cinsleri bulunmaktadır. *Lactobacil*'ler değişik uzunlukta, çubuk ve bazen kok şeklinde veya ender olarak zincir şeklinde bulunan spor yapmayan, hareketsiz, Gram pozitif ve katalaz negatif bakterilerdir. Enzimatik olarak karbonhidratlardan süt asiti oluşturanları (homoenzimatik bakteri) ve süt asiti yanında sirke CO₂ ve alkol oluşturanları da (hetero-enzimatik bakteri) vardır. Mikroaerofil veya fakültatif aerob laktobasiller karbondioksite karşı dirençli olmayanlarının yanı sıra yaşamları için de gereksinimleri vardır. Optimal üreme sıcakları 25-30 C ler arasında olmasına rağmen 0 Cde veya altında çoğalan *Lactobacil*'ler de vardır. *Lactobacil*'ler genel olarak apatojeniktir ve ürettikleri laktik asit ve bazı antibiyotik maddelerle koruyucu etkileri mevcuttur. Ancak insanlarda *L. aseii subs. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. salivarius* Yerde, suda, göllerde ve organik artıklarda ve bağırsak florasında çok sayıda bulunurlar. Genel olarak 3 grupta incelenirler. Bunlar; Obligat homofermentatif *Lactobacil*'ler, fakültatif heterofermentatif *Lactobacil*'ler, obligat Heterofermentatif *Lactobacil*'lerdir (Tayyar ve Hecer, 2013).

Lactobacil'ler intestinal florada çeşitli metabolit ve antimikrobiyal maddeler sentezleyerek patojen mikroorganizmaların sindirim sisteminde hastalık oluşturmalarını engellemektedirler. Ayrıca *Lactobacil*'lerin kanser hücreleri üzerinde anti-tümoral aktiviteleri vardır. *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* bu tip bir etki meydana getirmektedir. İnsanlarda kolon kanseri üzerine yapılan çalışmalarda, laktik asit bakterilerince fermente edilmiş mandra ürünlerinin tüketildiği bölgelerde kolon kanserinin daha az görüldüğü tespit edilmiştir (Tayyar ve Hecer, 2013; Arda ve ark., 1997).

2.5.5. Staphylococcus aureus genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar

Staphylococcus cinsi *Micrococcaceae* familyasında yer almaktadır. *Staphylococ*'lar Doğada çok yaygın bir biçimde, toprakta, suda, havada, insan ve hayvanların derileri üzerinde ve mükoz membranlarında doğal florayı oluşturan mikroorganizmalarda.

Morfolojik görünümüleri yuvarlar veya oval şekilde olup, küme tarzında düzenlenmiş kok'lardan oluşmuşlardır (Arda ve ark., 1992).

Staphylococ'lar Gram pozitif, kok şeklinde, 1 µm çapında, hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob mikroorganizmadır. Mikroskopta tek tek, çiftler veya düzensiz kümeler şeklinde görülür. Optimum üreme sıcaklıkları 30-37 C arasındadır. *Staphylococcus* cinsi içerisinde en önemli türler *S. aureus* ve *S. Epidermis*'dir (Tayyar ve Hecer, 2013).

S. aureus genel olarak *Staphylococcus* cinsinin özelliklerini taşır. Etken salgıladığı ekzotoksinler ile insan ve hayvanlarda hastalık meydana getirirler. *S. aureus* Sığır, koyun ve domuzlarda mastitis, atlarda yara infeksiyonları, koyunlarda kuzu piyemisi, kanatlılarda sinovitis ve spongilitis, diğer hayvanlarda da dermatite neden olmaktadır (Arda ve ark., 1992).

S. aureus tarafından salgılanan alfa, beta ve gama hemolizin, fibrinolizin, nekrotoksin, hiyalürinidaz gibi çeşitli toksinleri salgılayarak insan ve hayvanlarda gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır. Bulaşma genellikle mezbahalrda kesim sırasında kesim hayvanından ete, mastitisli memeden süte, taşıyıcı insanlardan, alet ve malzemelerden gıdalara işleme sırasında ve sonrasında bulaşır (Tayyar ve Hecer, 2013).

2.5.6. Pseudomonas aeruginosa genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar

Pseudomonas aeruginosa, Gram negatif, basil şeklinde ve hareketli bir bakteridir. monoflagellasyonlu bir bakteridir. Bu bakteri toprakta, suda, insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve aynı zamanda kanalizasyon ve hastaneler gibi ortamlarda bulunur. *Pseudomonas aeruginosa*, oportünistik bir insan patojendir. Sağlıklı bireyleri nadiren bulaşan bakteri bağışıklık sistemi zayıf düşmüş bireylerde mortalite oranı % 40-60 arasındadır. Ayrıca, bakteri polisiklik aromatik hidrokarbonları parçalayabilen ve ramnolipidleri, kinolonları, hidrojen siyanürü, fenazinleri ve lektinleri üretebilen çok önemli bir toprak bakterisidir. Birçok kemoterapötik ajan ve antibiyotik için resistansı mevcuttur (Holt vd., 1994; Zago & Chugani, 2009; de Bentzmann & Plésiat, 2011).

2.5.7. Klebsiella pneumoniae genel özellikleri ve neden olduğu hastalıklar

Enterobacteriaceae familyası içerisinde yer alan *Klebsiella pneumoniae*, doğada toprak ve suda bol miktarda bulunur. Etken Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, fakültatif

anaerob ve çomak şekilli mikroorganizmadır. Etken evcil hayvanlarda oportunist bir etken olarak nazofarinks ve barsakta bulunduğundan immun sistemin zayıfladığı durumlarda hastalık meydana getirebilmektedirler (Podschun ve Ullmann, 1998). Ayrıca köpeklerde sistitis, mastitis ve metritislerden, sığır ve domuzlarda da mastitislerden izole edilmiştir (Arda ve ark., 1997). *Klebsiella pneumonia* insanlarda akciğer zarı yangısına neden olmaktadır (Tayyar ve Hecer, 2013).

2.5.8. Bakterilerin sağlık üzerine olumlu ve olumsuz etkileri ve neden olduğu hastalıklar

Bakteriler biyolojik sınıflandırma yanında gıda endüstrisi ve sağlık açısından önemleri dikkate alınarak 4 grupta incelenebilir.

a) Patojenler: Bulduğu ortamda enfeksiyon ve intoksikasyon oluşturan bakterilerin oluşturduğu gruptur.

b) Bozulma Yapanlar: Gıdalar üzerinde çoğalarak renk ve yapıda bozulmalara, hoşagitmeyen kokuların oluşumuna ve gıdanın besin değerinde kayıplara neden olan gruptur.

c) Yararlılar: Organik bileşiklerin parçalanmasında; yoğurt, peynir, ekmek, sucuk, alkollü içkiler gibi fermente gıdaların üretiminde; antibiyotik, protein ve organik asitler gibi bileşiklerin elde edilmesinde kullanılırlar.

d) İndikatörler: Üzerinde veya üzerinde buldukları ürünlerin yetersiz hijyenik koşullarda işlendiğini, insan, toprak, su veya gübre yoluyla bir bulaşma olduğunu göstermektedir. Gıdalarda hijyenik açıdan güvenli olup olmadığının belirlenebilmesi için fekal kirlenmenin varlığı araştırılır. Bu amaçla normal olarak hastalık yapmayan, dışkıda çok sayıda bulunan ve patojenlere oranla tespiti çok daha kolay gösterge mikroorganizmaların aranması gerekir. Bu tip analizlerde, patojenlerin aranması yerine indikatör mikroorganizmaların (*E. coli* vs.) aranması gereklidir. Böyle bir indikatörün bulunması durumunda gıdanın uygun hijyenik koşullarda işlenmediği veya o gıdaya dışkı bulaştığı, dolayısıyla bağırsak kökenli patojen mikroorganizma olabileceği sonucuna varılır (Tayyar ve Hecer, 2013).

2.6. PROPOLİS

2.6.1. Propolis Tanım ve tarihçesi

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arı ürünleridir. Arı ürünleri birçok hastalıkta, hastalığın ilerlemesinin önüne geçmek, ağrıların azaltılması ve hastalığın tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına *Apiterapi* denilmektedir. Apiterapi, arıcılık kadar eskidir (Hamdy ve ark., 1989).

2000 yıl önce devrin tıp adamları tarafından yazılan Mısır metinlerinde halk arasında hastalıkların tedavisinde arı ürünlerinin kullanıldığına dair açıklamalar bulunmaktadır. Apiterapi; bal, propolis, arı sütü, polen ve arı zehiri kullanımını kapsar (Zumla ve Lulat, 1989).

İnsanoğlu propolisi çok eski çağlardan beri farklı amaçlar için kullanmıştır. Uzun yıllar boyunca propolisten tıpta çeşitli amaçlar için yararlanılmıştır. Günümüze kadar gelen eski Yunan yazıtları propolisin iltihaplanan yaralar ve diş çürükleri için tedavi amacıyla kullanıldığını tanımlarken, Romalılar döneminde yara üzerine konulan lapa benzeri karışımın içerisine katılarak kullanıldığı aktarılmaktadır. Avrupa' daki on ikinci yüzyıl kayıtları, propolisin medikal preparatlarının ağız ve yara enfeksiyonlarının tedavisi ve diş sağlığı için kullanımından bahsetmektedir. Propolis son zamanlarda oldukça popüler hale gelmiştir. Arılar propolisi milyonlarca, insanlar ise binlerce yıldır kullanmaktadır. Arılar ve insanoğlu propolisin birçok yararlı özelliğinden faydalanmışlardır. İnsanlık için bu reçinemi yapının keşfedilen yararları henüz çok az aydınlatılabilmektedir (Ghisalberti, 1979).

Bir arı ürünü olan propolis; bal arıları tarafından ağaçların kabuk ve kozalaklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli polenler, yağlar, özel reçine ve mumsu maddelerden oluşur (Tosi ve ark., 1996).

Propolisin diğer adı *bee glue*'dir ve pro- ve -polis köklerinden oluşur ve kovanın (şehrin) savunması anlamını taşır. Bal arıları reçineyi toplarken çiğneyip tükürük enzimleri ile karıştırarak kısmen sindirirler ve kısmen sindirilmiş materyal, balmumu ile karıştırılarak kovanda kullanılmaktadır. Tükürük enzimleriyle karışan propolisin kimyasal yapısında meydana gelen değişikliklerden dolayı, propolisin standardize edilmesinde güçlükler oluşur. Propolis kovanda çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Arılar propolisi; kovan deliklerinin ve çatlaklarının kapatılmasında, peteklerin tamir

edilmesinde ve birbirine yapıştırılmasında, çeşitli arı hastalıklarından koloninin korunmasında ve hastalık etmenlerinin etkisiz duruma getirilmesinde kullanırlar (Da-Costa ve Pereira, 2002; Burdock, 1998).

Propolis aynı zamanda bir mumyalama maddesidir. Arılar kovana saldıranları öldürüp kovan içinden atamadıklarında, bu canlıları propolis ile mumyalarlar. Böylece, bu mumyalama işlemi ile olması muhtemel bakteri ve maya üremesi durdurulur. Propolisin kaynağını oluşturan bitkiler; kavak (*Populus spp*), kayın (*Fagus sylvatica*), huş (*Betula alba*), kestane (*Castanica sativa*), at kestanesi (*Alnus glutinosa*) gibi bitkiler olabilmektedir. Propolisin; antibakteriyel, antikaryojenik, antiinflamatuar, antioksidatif, tümörisidal ve antimitojenik özellikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Ghisalberti, 1979; Pereira ve ark., 2008).

Propolisin antimikrobiyal etkinliğinin yanı sıra; karaciğer koruyucu, antiülseratif, immün sistemi stimüle edici, antikanserojenik, antiseptik, antimikotik, bakteriyostatik, kanamayı durdurucu, antiviral, spazmolitik, anestezi, antioksidan özelliklere sahip olması günümüzde apiterapi, biokozmetik, ilaç ve gıda sektöründe popüler bir hammadde olarak kullanılmasını beraberinde getirmektedir (Burdock, 1998).

Cildi nemlendirme, yenileme, kırıksıklıkları giderme ve antibakteriyel özelliklerinden dolayı güzellik kremlerinde, çeşitli losyonlarda kullanılarak kozmetik endüstrisinde yer alır. Ayrıca propolis; dişeti, dudak ve ağız iltihaplarını iyileştirebilmek için diş macunları ile ağız yıkama solüsyonlarında da kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda; propolis içeren tablet, toz ve sakız ürünleri marketlerde tüketicinin hizmetine sunulmuştur (Burdock, 1998; Banskota ve ark., 2000).

2.6.2. Propolis fiziksel özellikleri

Propolis yapışkan ve reçineli bir madde olup, rengi kaynağına ve depolama süresine bağlı olarak, sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar değişebilmektedir.



Genel olarak 60-69 °C arasında bir erime noktasına sahiptir. Soğukta sert ve kırılğan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapısı vardır. Şekil 3' de çalışmamızda kullandığımız propolis örnekleri gösterilmiştir. Propolis; su ve hidrokarbon çözücülerde düşük,

alkollerde ise yüksek oranda çözünürlük gösterir (Burdock, 1998).Şekil 3: Çalışmada kullanılan toplanmış ham propolis örnekleri

2.6.3. Propolis kimyasal özellikleri

Coğrafi ve botanik orijin farklılıklarından dolayı ham propolis ekstraktları çok karışık bir kompozisyondadır. Propolis 300'den fazla farklı yapı içermektedir. İçerdiği başlıca kimyasal bileşikler şunlardır; flavonoidler, sinamik asit ve türevleri benzoik asit, sinaptik ve izoferulik asitler, çeşitli aldehitler, ketonlar ve eser elementler, kleredon, diterpenler, seskiterpenler ve tripenler (özellikle de steroidler). Ham propolisin bileşimi kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle % 50 reçine, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır. Ek olarak propoliste B-kompleks vitamini, önemli mineralleri ve eser elementleri de içerir. Propolis Ma, Ca, Fe, Mn, Cu gibi pek çok elementin yanında B₁, B₂ ve C gibi vitaminlerde bünyesinde barındırmakta ve yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Schmidt, 1996; Burdock, 1998; Doğan N ve Hayoğlu H, 2012).

Propolis, arıların ziyaret ettiği ekolojik flora nedeniyle oldukça kompleks ve değişik bir kimyasal kompozisyona sahiptir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda değişik propolis örneklerinde; yağ asitleri, fenolik asitler ve esterleri, flavonoidler (flavonlar, flavononlar, flavonoller, dihidroflavonoller, kalkonlar) terpenler, β -steroidler, aromatik

aldehitler ve alkoller, seskiterpenler ve stilben türevleri gibi yaklaşık 200 kadar bileşik tanımlanmıştır (Pereira ve ark., 2008).

2.6.4. Propolisin biyolojik özellikleri

Propolisin farmakolojik aktivitesi 4 kategoriye ayrılabilir. Bunlar; biyolojik polimerlere bağlanma eğilimi, ağır metal iyonlara bağlanması, elektron taşınmasının hızlandırılması ve serbest radikalleri tutma kabiliyetidir. Bu özelliklerinden dolayı propolis antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antienflamatuar, antihepatotoksik, antikanser, antioksidan, antiülser, immünostimülasyon ve lokal anestetik etkiler göstermektedir.

Propolis antienflamatuar ajan olarak, prostoglandinlerin sentezini inhibe eden, timus bezini aktive eden, fagositik aktiviteyi tetikleyerek savunma sistemine yardımcı olan, hücrel bağışıklığı stimüle eden ve epitelyal dokularda iyileşmeyi olumlu etkileyen özelliklere sahiptir (Bosio ve ark., 2000).

Bazı flavanoidler arının tükürük salgılarına karışan enzimlerle değişikliğe uğramaktadır. Flavanoidlerin bazıları çok çeşitli bakteri türlerine etkili olmaktadır. Flavanoidlerin kalp-damar sistemi üzerine olumlu etkileri olduğu; kan dolaşımını düzenlediği, kılcal damar çatlamlarını azalttığı; mide mukozasını ülserle karşı koruduğu; mide yaralarını küçülttüğü; iç salgı sistemini düzenlediği ve halsizliğe karşı olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir.

Propoliste bulunan fülerik asit, gram (+) ve gram (-) bakterilerine karşı güçlü antibiyotik özelliği göstermekte; pıhtılaşmayı hızlandırarak yaraları hızla iyileştirdiği, cilt rahatsızlıklarında merhem şeklinde kullanımının çok olumlu sonuçlar verdiği ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, propolis doku yenileyici, bakterisid ve fungisid özelliği ile kozmetikte çeşitli kremlerin yapımında da kullanılmaktadır. Propolis kollajen sentezinde önemli bir role sahip olan demir ve çinkoyu da ihtiva etmektedir (Marcucci, 1995).

Propolis vücut fonksiyonları için gerekli bakterilere zarar vermeden enfeksiyonlara karşı, virüs öldürücü ve bakteri saldırılarını önleyici olarak insan ve hayvanlar üzerinde etkili olmaktadır. Propolisin içerdiği bioflavonoidin iltihaplara karşı etkili olduğu ve vücudun güçlenmesinde önemli bir rol oynadığı Avrupa'da yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır (Kumova, 2002).

Propolisin etanolik solüsyonları ağızdaki minör ülserlerin, ağrılı yaraların, ciltteki enfeksiyonların tedavisi için sıklıkla satılan bir üründür. Düşük dozlarda propolis kullanılması güvenlidir; bununla beraber 15g/gün dozajdan fazla kullanıldığında yan etkilerinin görülmesi yaygındır. En yaygın karşılaşılan yan etkiler, ciltte ve mukoz membranlarda irritasyonlara neden olan alerjik durumlardır. Astımlı hastalarda, egzemalı ve ısırğan otuna hassas kişilerin tedavisinde kullanılırken çok dikkatli olunmalıdır (Castaldo ve Capasso, 2002).

2.6.5. Antioksidan

Serbest oksijen radikalleri ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması "oksidatif stres" olarak adlandırılmaktadır. Özellikle savunma mekanizmasında hücrenel antioksidan enzimlerin (süperoksit dismütaz ve glutatyon peroksidaz gibi) önemi büyüktür ve bu enzimlerin yetersizliği veya enzim aktivitelerindeki azalmalar hücre bileşenlerinde onarılmaz hasarlara yol açabilir (Mahmoud ve ark., 2004).

Propolis ve diğer antioksidan maddelerle yapılan çalışmalarda propolisin lipit peroksidasyonunu düşürdüğü ve serbest radikal oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Propolisin yapısında bulunan ve antioksidan olarak kullanılan flavanoidlerin lipit peroksidasyonunu önlediği bildirilmektedir. Flavanoidler, iz elementlerle veya radikallerle şelat yaparak antioksidan özellik göstermektedirler (Prytzyk ve ark., 2003).

Antioksidan etki tipleri dört başlık altında toplanabilir.

1. Toplayıcı etki (scavenging)
2. Baskılayıcı etki (guencher)
3. Zincir kırıcı etki (chain breaking)
4. Onarıcı etki (repairing)

Radikallerin aşırı reaktif yapılarına bağlı olarak, hücrenel bileşenlerdeki karbonhidrat, protein ve lipidlerin oksidasyonuyla sonuçlanacak zararın önlenmesi antioksidanların görevidir. Zincir reaksiyonu, antioksidanlar tarafından ayrıca radikallerin birbiri ile tepkime vermesiyle sonlandırılabilir. Lipid peroksidasyonunun, zar lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan

aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına sebep olduğu düşünülmektedir (Çolak, 2011).

2.6.6. Flavonoidler

Flavonoidler; meyvelerde, sebzelerde, çay, şarap, meyve suyu gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir ve Flavonoidlerin çok sayıda bakteriyeye karşı etkili olduğu bildirilmektedir

Flavonoidlerin serbest radikal toplama kapasitelerinden dolayı gösterdikleri antioksidan özellikleri, onlar hakkında daha pek çok alanda çalışma yapma ihtiyacını beraberinde getirmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin antioksidan özellikleri yanında; hücre preliferasyonu üzerine etkili oldukları, anjiogenezi ve hücreler arası sinyal mekanizmasını inhibe ettikleri ve DNA tamir enzimlerini stimüle ettikleri ortaya konmuştur.

Bugüne kadar propolisten 38' den fazla flavonoid izole edilmiştir. Bunlara galangin, kaempferol, kuersetin, pinosembrin, pinostobin ve pinobanksin örnek olarak verilebilir. Propolisin fenolik bileşikleri arasında başlıca; sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve esterleri, ferulik asit yer almaktadır (Kolankaya ve ark, 2002).

2.6.7. Propolis antimikrobiyal özellikleri

Propolisin antibakteriyel, anti-inflamatuar, iyileşme, anestetik, çürük önleyici, antifungal, antiprotozoal ve antiviral aktiviteler gibi çeşitli terapötik etkileri vardır. In vitro antibakteriyel aktivitesi birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı doğrulandı, bu sonucun propolisin bileşenlerinden esas olarak pinocembrin ve galangin flavonoidlerinin sinerjik etkisi ile olduğu saptandı. Diğer flavonoidlerden örnek olarak chrysin ve kaempferol'un herpes simplex gibi virüslerin intraselüler proliferasyonunu azaltarak antiviral etkisi olduğu gösterildi (Ghisalberti, 1979; Park ve ark., 1998; Marcucci, 1995).

Propolisin birçok diğer farmakolojik ve biyolojik özellikleri not edilmiştir: Kartilaj, kemik ve diş minesini rejenerasyonu; immünolojik özellikleri; karaciğer savunması ve antitoksik etki; antioksidan ve bağışıklık eylemleri bunlardandır (Diaz ve ark., 1997).

2.6.8. Propolis kullanım alanları

Milattan önce 300 yılından beri dünyanın çeşitli bölgelerinde popüler tıpta kullanılmaktadır. Persler, Yunanlılar, Romalılar ve İnkalar da tedavi amaçlı propolis kullanmışlardır. Ancak, propolisin kimyasal bileşimi ve farmakolojik aktivitelerinin korelasyonuna olan ilgi sadece 40 yıl önce başlamıştır (Marcucci, 1995).

Propolis farklı uygarlıklar tarafından uzun zamandan beri kullanılan birkaç doğal ilaçtan biridir. Bu günlerde farklı propolis ürünleri şekerleme, çikolata, şampuan, cilt losyonları, antiseptik karışımlar ve diş macunları içinde dünya çapında ticari ediliyor. Yapılan çalışmaların hepsinin verileri birçok propolis ürününün veya izole bileşiklerinin farklı mekanizmalarla inflasyonu inhibe ettiğini göstermektedir. Bununla beraber propolisin anti-inflamatuar etkileri temel olarak uygulama şekli ve dozajına bağlıdır (Castaldo ve Capasso, 2002; Mirzoeva ve Calder, 1996).

Propolis dermatolojide yara iyileşmesinde, yanıkta ve eksternal ülser tedavisinde, iyileşme süresinin kısalmasında, yara kontraksiyonunda artışta, doku onarımının hızlanmasında önemli derecede kullanılır. Yara iyileşmesi sırasında hasarlı doku onarımında mükemmel bir senkronize hücresel ve moleküler etkileşim meydana gelir (Mandelbaum ve ark., 2003).

2.6.9. Propolis ile İlgili Çalışma Özetleri

Aksoy ve Dığrak (2006) yaptıkları çalışmada, Bingöl ili ve çevresinden toplanan bal ve propolisin antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Bal ve propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterobacter cloaca* ATCC 13047, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Staphylococcus aureus* 6538, *Bacillus subtilis* IMG 22, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Micrococcus luteus* LA 2971, *Mycobacterium smegmatis* RUT, *Bacillus brevis* FMC 3, *Enterobacter aeruginosa* ATCC 27859, *Corynebacterium xerosis* ATCC 373, bakterileri ile *Kluyveromyces marxianus* 332, *Rhodotorula rubra* 116, *Candida albicans* 30114 mantar türleri kullanılarak test edilmiş, bal ve propolis ekstraktlarının Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyal ve mantarlara karşı da antifungal aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir.

Biray ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada; propolisin CCRF-CEM hücre dizisinde sitotoksik ve apoptotik özelliklerini ortaya koymuşlardır. Sitotoksitenin değerlendirilmesi için Tripan mavisi yöntemi ve XTT yöntemleri kullanılmış, apoptozisin değerlendirilmesi için ise, apoptozis esnasında açığa çıkan

oligonükleotidlerin saptanması esasına dayalı Eliza yöntemi ve apoptotik cisimciklerin floresan mikroskopta görüntülenmesini sağlayan Akridin Oranj – Etidyum Bromid boyama tekniği kullanılmıştır. Propolisin sitotoksik etkisinin saptandıktan sonra, propolisin etken maddelerinden Sinamik asit ve CAPE (Kafeik asit fenetil ester)' in sitotoksik özellikleri aynı yöntemlerle değerlendirilmiştir. Sinamik asit herhangi bir sitotoksik etki göstermez iken CAPE' nin doz ve zamana bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve IC50 dozunun 1 µM olduğu tespit edilmiştir. Akridin Oranj - Etidyum Bromid boyama yöntemleri ile CAPE' nin aynı hücre dizisinde apoptozise neden olduğu bulunmuştur.

Hatay (Türkiye) ilinden toplanan propolis örneklerinin ekstraktların antibakteriyal aktiviteleri in-vitro koşullarda 13 farklı türde tarımsal açıdan zararlı olduğu bilinen bakteriler üzerine incelenmiştir. Bu çalışmada ekstraktlar saf metanol ile hazırlanmış ve en yüksek duyarlılık 1/5' lik polen ekstraktının *Agrobacterium tumefaciens* bakterisine karşı 12 mm inhibisyon zonu olarak belirlenmiştir. Propolis örneklerinin 1/10' luk ekstraktı ise *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* bakterisine karşı 17 mm inhibisyon zonu ile en etkili olmuştur. Propolisin 1/1000 ve polenin 1/100' lik ekstraktlarının test mikroorganizmalarının üzerine etkisi gözlemlendiği belirtilmiştir (Basim 2006).

Santos ve ark. (2002) Brezilya'nın belirli bölgelerinden toplanmış propolis örnekleri üzerine bir araştırmalar yapmışlardır. Propolis sulu etanolik ekstraktı ve elde edilen fraksiyonlar periodontit problemine sebep olan bakteriye karşı inhibitör aktivitesi için test edilerek tüm bakteri türlerinin propolis ekstraktlarına karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Basio ve ark. (2000) İtalya'nın Kuzey-Batısındaki bir bölge içinde, farklı alanlardan iki propolis örneği toplamışlar ve bunların etanolik ekstraktlarının 46 *Streptococcus pyogenes* bakterilerine karşı antibakteriyal aktivitesini incelemişler. İki propolis örneğinden biri daha yüksek aktivite gösterirken bu ekstraktın flavonoidlerden pinocembrin ve galangin açısından daha zengin olduğu HPLC kullanılarak kanıtlanmıştır.

Kartal ve ark. (2003) Türkiye'nin Ankara ilinin Kazan ilçesi ve Marmaris bölgelerinden iki propolis örneğinin antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon metodu ile araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivite dört farklı etanolik ekstrakt (%30, %50,

%70, %96 etanol) ile 7 Gram pozitif, 4 Gram negatif ve bir maya kültürüne karşı denenmiştir. Araştırmalarında propolisin antimikrobiyal aktivitesinin kafeik asid ve esterlerden dolayı olduğu sonucuna varmışlardır.

Kujumgiev ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, farklı coğrafik orjinlerden toplanan propolis örneklerinin antibakteriyal (*S. aureus* and *E. coli*), antifungal (*Candida albicans*) ve antiviral (*Avian influenza virüs*) etkilerini belirlemeye yönelik bir araştırma yapmışlardır. Bütün örnekler fungus ve Gram pozitif bakterilere karşı etkili iken en fazla antiviral aktivite gözlenmiştir. Örneklerin farklı kimyasal kompozisyonlarına rağmen bütün örnekler benzer aktivite göstermişlerdir.

Silici ve Kaftanoğlu (2003) Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerine ait illerden (Bursa, İzmir, Kayseri, Sivas, Yozgat, Erzurum, Hatay, Artvin) toplanan propolis örneklerinin antibakteriyal etkilerini *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı incelemişlerdir. İncelenen propolis örneklerinin tümü *S. aureus* bakterisine karşı önemli aktivite gösterirken, *E. coli* bakterisine karşı gözlenen antibakteriyal aktivite daha zayıf bulunmuştur.

Seven ve ark. (2007) propolisin hayvan beslemede kullanımı ile ilgili yaptıkları çalışmada, propolisin doğal bir katkı maddesi kullanımını düşünmüş, antikarsinojen, antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve daha birçok özellikleriyle çok yönlü bir ekstrakt olduğu ve propolisin söz konusu özelliklerinden dolayı gerek organik hayvancılık, gerek hayvan sağlığı ve gerekse alternatif büyütme faktörleri arayışları bakımından yetiştiricilerimizin üzerinde durması gerektiği kanısına varmışlardır.

Lu ve ark. (2005) Tayvan'ın Taipei, Mingchien ve Fanglia bölgelerinden ve çeşitli mevsimsel periyotlarla (Haziran-Temmuz ve Ekim- Kasım) toplanan propolisin etanolik ekstraktlarının (EEP) antimikrobiyal aktivitesini *S. aureus* bakterisine karşı araştırmışlardır. Hücre yaşının, inkübasyon ısısının ve aynı zamanda pH derecesinin etkilerinin önemini vurgulamışlardır. *S. aureus* bakterisine karşı EEP'nin minimum inhibitör konsantrasyonu kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. Ekstraktlar sadece Gram pozitif bakteriler ve funguslara karşı aktivite gösterirken, Gram negatif bakterilere etkili olmadığı saptanmıştır.

Özen ve ark. (2010) Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan propolis örneklerinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacı ile agar dilüsyon yöntemi ve makro tüp dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Propolis örnekleri etanol kontrolü ile

karşılaştırıldığında tüm test edilen anaerobik mikroorganizmalara karşı etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Majiene ve ark. (2007) Litvanya'nın çeşitli bölgelerinden toplanmış 10 farklı propolis örneğinin kimyasal kompozisyonunu ve antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar etanolik ekstraktların Gram pozitif, Gram negatif bakteriler ve mayalara karşı etkili olmasının nedenini propolis örneklerinin içerdiği fenolik bileşiklere bağlamışlardır.

Scazzocchio ve ark. (2006) propolisin etanolik ekstraktlarının (EEP) alt inhibitör konsantrasyonlarının antibakteriyal aktivitesini ve bazı antibiyotiklere ilave edilince antibakteriyal etkisindeki değişimi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Sonuçlara göre, EEP'in tüm klinik starinler üzerine önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Antibakteriyal test ilaçlarına EEP eklenince Ampisilin, gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerinin antimikrobiyal etkisi şiddetli şekilde artarken, Seftrianson, Vankomisin antibiyotiklerinin etkisinde az miktarda artış göstermiş. Eritromisin antibiyotiğinde ise hiçbir değişim gözlenmemiştir. *S. aureus*, değişik antibiyotiklere karşı farklı yollardan direnç göstermektedir. Genetik olarak çok yönlü olmaları bu direncin altyapısının oluşumunda çok önemli rol oynamaktadır (Lina ve ark. 1999).

Apaydın (2015) hazır çorbalardan izole edilen *S.aureus* üzerine 5 farklı antibiyotiğin (Tetrasiklin, Sefksim, Amoksisilin, Ampisilin ve Streptomisin) ve Türkiye'nin 3 farklı bölgesinden (Çorlu, Kırklareli ve Ordu) tedarik edilen propolis ekstraktlarının inhibisyon etkisini incelemiştir. Çorbalardan izole ettiği *S.aureus* bakterilerin Amoksisilin antibiyotiğine karşı tamamının duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Propolis örneklerinin inhibisyon etkilerinin olduğu ve farklı coğrafi bölgelerden elde edilen propolis örneklerinin farklı antimikrobiyal etki gösterdikleri tespit etmiştir.

2.7. SOĞAN

2.7.1. Soğan Tanım ve Tarihçesi

Yöresel dillerde soğan, beyaz küre, İspanyol soğanı, Cepa pulp; Latince’de *Allium cepa* isimleriyle bilinir. Zambakgiller ailesinden (Liliaceae) olan soğan mevsimsel bir bitkidir. Soğan başı (Bulbus Allii cepae) dışında katmanlı zarlar bulunan, 20-30 cm çapında, iki kutup baskılı küresel ya da avakado ya benzer şekildedir. Beyaz, mor veya kırmızı renkli olabilir. Doğada yabani olarak da yetişen tipileride vardır. Kök kısmı 100 cm’ye varan uzunlukta, 30 mm çapında tepe kısmına doğru incelen, hafif şişkin parçadan oluşur. Yaprakları 40 cm’ye yakın uzunlukta ve 20 mm kalınlığında kesildiğinde, kenarlara doğru incelen yarım halka şeklindedir. Yaprakları su borusu şeklinde, içi boş, mavimsi yeşil renktedir. Genellikle 1-2 yıllıktır; köklerinde dibe yakın sapın 1/6’sı çevresel kılıf içindedir. Tohumluk çiçekleri beyaz veya pembe renkli, çoğunluğu bir arada, küreye benzer bir şekil de toplanmış. Tohumları küçük kristal şekilli kömür siyahı renklidir. Dünya da özellikle ılıman iklimli her yerde yetişir. Soğan dünyanın Batı Asya kısmında kısmen, Türkiye’nin her yerinde yetiştirilebilir (WHO, 1999).

2.7.2. Soğan fiziksel özellikleri

Soğanın toprağın yüzeyindeki yeşil yaprağı ve hem de toprağın altındaki baş denilen kısmı yemeklik olarak kullanılır, fakat kokusu ağır ve bir kaçgün kalıcı olabiliyor. Soğanın doğası, sıcak ve rutubetlidir (Anonim, 2017a).

Yemeklik soğan (*Allium cepa L.*) tarihi en eski sebzeler sınıfındadır. Dünyada ve ülkemizde kullanımı çok büyük kitlelere hitap etmesi ve üretim açısından büyük tarım arazilerine sahip olunması gerekmektedir. Yemeklik soğanın anavatanı Orta Asya olup, Doğu Asya ve Orta Avrupa 'ya doğru yayılmıştır. Yemeklerde kullanılan serin iklim sebzesi olan soğanın Sıcaklık değişimine uyumlu doğası dünyada yaygınlaşmasının en sebeplerinden olmuştur (Kaynaş ve Ertan, 1986; Özmen, 1991).

2.7.3. Soğan kimyasal özellikleri

Soğan içeriğinde birçok kimyasal madde bulunduran bir sebzedir. Soğan ekstraktı (*allium cepa*), quercetin içeren bir bioflavonoidlerce zengindir. In vitro çalışmalarda quercetin’in kulak lobülü keloid fibroblastlarında TGF- β ekspresyonunu, fibroblast

proliferasyonunu ve kollajen üretimini önemli oranda düşürdüğü bulunmuştur (Chen ve Davidson, 2005).

Extractum cepae (soğan ekstraktı) (%10), heparin (5000 İÜ/100 gr) ve allantoin (%1) olmak üzere üç aktif madde içermektedir (Dyakov ve ark., 2002; Majewski ve Chadzynska, 1988).

Extractum cepae, *Allium cepae*'dan (soğan zarı) elde edilir. Eski zamanlardan beri, yiyecek dışında, soğan aynı zamanda tedavi amaçla kullanılmaktadır. Extractum cepae topikal jeldeki soğan ekstraktı kimyasal olarak tanımlanmış pek çok aktif maddeyi değişik konsantrasyonlarda içermektedir. Bunlar arasında tiyosülfonatlar, sterol, flavonoid, prostaglandin, lipooksijenazlar, yağ asitleri, lipidler, vitaminler (C, B 1, B2, B6, biotin, nikotinik asit, folik asit ve pantotenik asit), amino asitler, karbonhidratlar ve eser elementler sayılabilir (Majewski ve Chadzynska, 1988; Breu ve Dorsch, 1994)

2.7.4. Soğan biyolojik özellikleri

Kokusunun ağır, kötü ve yakıcı özelliği olduğu bilinmektedir. Soğan ile sık anılan bir diğer özellik de tıpkı sarımsak gibi kükürtlü sebzelerden olmasıdır. Soğan yapısı gereği sıcak ve nemli ortamda kolayca çürüyebilir. Bu nedenle serin bir mekanda ve suyla temas etmeden, kuru bir şekilde muhafaza edilmelidir.

Extractum cepae topikal jel'in antiproliferatif etkisi farklı orijinli insan fibroblast kültürlerinde araştırılmıştır (skar, keloid, embriyo dokusu). Dermal fibroblastlarda maksimal inhibisyon % 43-46 arasında olup, keloid fibroblastlarında % 38 -53 oranlarında inhibisyon sağlanmıştır (Wolfort ve ark., 1996).

Extractum cepae topikal jelle karşı çok iyi veya iyi tolerans bildirilirken, birkaç vakada hafif lokal irritasyon saptanmıştır. Ciddi yan etki bildirilmemiştir. İlacın içinde bulunan üç aktif maddenin fibroblastların proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Chen ve Davidson, 2005).

Extractum cepae'nin, fibroblastların proliferasyonunu ve hücre dışı matriksin yapımını inhibe edici etkileri vardır. Extractum cepae inflamatuvar mediatörlerinin salınımını inhibe ederek antienflamatuvar etki gösterir. Bakterisid etkiye de sahiptir (Majewski ve Chadzynska, 1988; Breu ve Dorsch, 1994)

Hipertrofik skar tedavisinde kullanılan *extractum cepae* topikal jel, tedavideki etkinliği, düşük yan etki, düşük maliyet ve kullanım kolaylığı nedeniyle hipertrofik skarın tedavi basamağında birinci seçenek olmaya adaydır (Fırıncıoğulları, 2006).

Topikal *extractum cepae*'nin fibroblastların proliferasyonunu azaltıcı, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamamış olmasına rağmen hipertrofik skar proflaksisi ve tedavisinde son yıllarda sıklıkla ilk sırada tercih edilmektedir. Topikal *extractum cepae* uygulamasının hipertrofik skar tedavisinde faydalı olduğu bilinmektedir (Dyakov ve ark., 2002).

2.7.5. Soğan Antimikrobiyal Özellikleri

Son yıllarda, soğanın antioksidan ve antimikrobiyal etkisinin belirlenmesiyle ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalarda, soğanın çok güçlü antioksidant ve önemli gıda patojenleri üzerinde antimikrobiyal etkili olduğu belirlenmiştir (Dinçoğlu ve Karacal-Temamoğulları, 2010).

Soğan suyu ya da su özütü in vitro ortamda *E.coli*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus* türleri, *Lactobacillus odontolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Salmonella typhosanın*; soğanın petroleteri özütü ise in vitro ortamda *Clostridium paraputrificum* ve *Staphylococcus aureus*'un gelişmesini engeller. Soğandan elde edilen temel yağlar, *Aspergillus niger*, *Cladosporium werneckii*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum candidum*, *Brettanomyces anomalus*, *Candida lipolitica* gibi mantarlara etkilidir (WHO, 1999).

Ayrıca, Soğan özütü ağızdaki patojen bakterilere karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Gıdalarda mikrobiyolojik kontrolün sağlanmasında soğan doğal korucu madde olarak kullanılabilir (Kaya ve Bilgili, 2001).

2.7.6. Soğan kullanım alanları

Soğan, bütün dünyada olduğu gibi, tüketicilerin gelir düzeyine bağlı olmaksızın her evin mutfağının vazgeçilmez sebzesidir. Soğan, soframızda yoğun şekilde kullandığımız bir gıda maddesidir. Allium ailesinden olan soğan çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda, soğanın antioksidan ve antimikrobiyal etkisinin belirlenmesiyle ilgili birçok araştırma yapılmıştır (Dinçoğlu ve Karacal-Temamoğulları, 2010).

Bugün soğan başlıca yaşa bağlı damar değişikliklerinde ve iştahsızlıkta kullanılır. Soğan tüketimi kalp-damar sağlığını destekleyicidir. Barsak parazit düşürücü, gaz çıkartıcı, balgam söktürücü, güç verici, incinmelerde, cinsel gücü artırıcı, bronşit, kolera, kolik, kulak ağrısı, ateş, yüksek tansiyon, adet kanamasını uyarıcı, sarılık, apse, fistül ve yara tedavisinde kullanılır (WHO, 1999).

Yemeklere lezzet ve tat vermesi bakımından vazgeçilemeyen bir sebze olan soğanın, insan sağlığı üzerinde; metabolizma düzenleyici ve mikrobik hastalıklara karşı bağışıklık sistemini güçlendirici etkileri vardır. Soğan, bol süt yapıcı özelliğinden dolayı bebekli anneler için iyi bir gıda olarak bilinir. Ayrıca, önemli bir enerji kaynağı olması nedeni ile büyüme çağındaki çocukların beslenme programlarında yer verilmesi önerilen soğan, kullanımı çok eski yıllara dayanan bir tıbbi bitkidir (Eker, 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

. Deneyler boyunca kullanılan cihazlar, kimyasallar ve sarf malzemeler Tablo 1, Tablo 2 ve Tablo 3' de listelenmiştir

Tablo- 1: Deneylerde kullanılan cihazlar ve yararlanım amaçları

Adı / Modeli	Deneylerdeki yararlanım amacı
Air flow kabin (Robert- Bosch- Strasse 1)	Hücre kültürü için steril bir ortam sağlamak.
Su Banyosu (Mikrotest)	Hücreleri ve kimyasalları 37 °C'de çözmek için .
Co ₂ inkübatör (Thermo Scientific Forma 371)	Hücrelerin steril inkübasyonunu sağlamak.
Derin Dondurucu -80 ° C (Thermo Scientific Forma 88000 Series)	Hücrelerin saklanması.
Spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go)	96 kuyucuğun okunması.
Mikroskop (Leica DM500)	Hücre kültüründen sonra hücrelerin sayılması.
Santrifüj (Thermo Scientific SL 16)	Deneylerde çöktürme ve homojen karışımlar oluşturmak.
Distile su cihazı (Thermo Scientific Smart2pure)	Ekstreler için alkolü inceltmede.
Derin Dondurucu -20 ° C(Arçelik 1050 T)	Kimyasalların dondurulup saklanması.
Buzdolabı +4 °C (Vestel EKO SC300)	Ekstrelerin saklanması.

Vortex (VWR International Mixers)	Hücrelerin ve ekstraların karışması.
Etüv (Nüve EN 500)	Ekstrelerin istenilen sıcaklığa ulaşması.
Çalkalayıcı İnkübatör (Stuart orbital incubator SI500)	Bakteriler 24 saat inkübasyonu.
Ultrasonic parçalayıcı (Stuart heat-stir SD162)	Soğanın 90 ° C'de kaynayabilmesi.
Alkol Uçurucu (Inovia MD 200)	Ekstrelerde alkolün uçabilmesi.
Hassas Terazı (Radwag S220/C/2)	Ekstreleri ölçmek.
Trinokuler Mikroskop (Soif MC50)	Hücrelerin görüntülenmesi ve takibi.
Otoklav (Nüve OT 100V)	Sterilizasyon.

Tablo- 2: Deneşlerde kullanılan kimyasallar ve yararlanım amaçları

Adı / Katalog Bilgisi	Deneşlerdeki yararlanım amacı
3T3 hücre hattı / American Type Culture Collection, ATCC-Üsküdar Üniversitesinden temin edildi	Deneşlerde kullanılan fibroblast yara hücre hattı.
Propolis / Malatya yöresinden Nisan 2017 balzam şeklinde	Hücrelerde ve bakterilerde etkisi araştırılan ajan.
Soğan / Ümraniye'de herhangi bir pazardan alınmış	Hücrelerde ve bakterilerde etkisi araştırılan ajan.
DMEM Ortamı / Sigma D6429	3T3 hücrelerini büyütme ortamı.
Trypsin-EDTA / Gibco 1815213	Hücrelerin flasktan kaldırılması.
Pen strep / Gibco 18229773	Hücre ortamı bileşeni.
Thiazolyl Blue / ChemCruz J1816	MTT testinde hücre çoğalmasının ölçümü.
Fetal Bovine Serum (FBS) / Capricorn CP16-1299	Hücre ortamı bileşeni.
LB Borth (Miller) / Sigma L2542	Bakterilerin besin ve çoğalma ortamı.
Trypan Blue Stain / Gibco 1384928	Hücreleri sayarken canlı ve ölüleri ölçmek.
Methanol / Merck 603-001-00-X	Soğan ve Propolis ekstraktını çözmede.
Ethanol / Emsure 64-17-5	Soğan ve Propolis ekstraktını çözmede.
Isopropyl Alcohol / J.T.Baker B24B43	Hücreleri plaktan çözmek.
HCl / Emsure	Soğan hücrelerini parçalamak.
Dimethyl Sulfoxide (DMSO) / Biomatik 3K31569	Hücreleri plaktan çözmek.
NaCl / Emsure 7647-14-5	Hücre yıkanmasında (PBS) ortam bileşeni.
KCl / Rokim 7447-40-7	Hücre yıkanmasında (PBS) ortam bileşeni.
Na ₂ HPO ₄ / Molychem 26040	Hücre yıkanmasında (PBS) ortam bileşeni.
KH ₂ PO ₄ / Emsure 7778-77-0	Hücre yıkanmasında (PBS) ortam bileşeni.

Tablo- 3: Deneşlerde kullanılan sarf malzemeler ve yararlanım amaçları

96 Well Cell Culture Plate / Nest 701001	Bakteri ve hücreleri kültüre etme ortamı.
15 ml Centrifuge Tube / Nest 601002	Ekstrakt , bakteri ve hücre hazırlama ortam ekipmanı.
50 ml Centrifuge Tube /Nest 602002	Hücre kültüründe hücre hazırlama ortam ekipmanı.
Serolojik Pipet / Capp 160823B	Hücre kültüründe ekim ve çoğaltma.
25 cm ² flask / TPP 20160473	Hücre kültürü ekim flasksı.
Syringe Filter / AISIMO 170227SF33CA22S	PBS filtrelemek.
Rondo / Fakir model	Soğanı parçalamak.
Rende / Herhangi bir marketten alınan	Propolisi rendelemek.
Mikropipetler / Eppendorf	Konsantrasyonları ve ml ayarlamak için
Cam malzemeler / Isolab	Ekstraları hazırlamak.
Parafilm / Bernis	Koruma amaçlı.
Steril Pipet Ucu 10 µl / Nest 2016001	Oran ayarlamak.
Steril Pipet Ucu 1000 µl / Expell 4130135C	Oran ayarlamak.
Steril Pipet Ucu 200 µl / Axygen 120405-212	Oran ayarlamak.

Steril enjektör / Beybi	Distile suda az miktarları ayarlamak.
Steril eldiven (M) / Tentynit R403 242LN375	Kontaminasyon riskini azaltmak.
Lamel / Isolab DC.75.1.7	Hücre kültüründe hücre saymak için.
Neubauer lamı / Isolab	Hücre sayımında.
Cryotube / Thomas Scientific 5000-0012	-80 ° C' de hücreleri saklamak.
Alüminyum folyo / Herhangi bir marketten	DMSO kaplamak ve MTT son aşama.
Eppendorf tube / Granier Bio-One 616202	Solüsyon hazırlamada.
Pcr tube / Nest 401001	Metanolun uçmasını engellemek.
Sealing / BBI T329-2S	Bakterilerin platede üzerini kapatmak.
Multichannel pipet / Isolab LA 11942	Pleytte eşit oranı ayarlamak.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Çalışmada kullanılan Propolis, Soğan ve Hücre kültüründe kullanılan kimyasal ve malzemelerin hazırlanışı

Propolisin Metanollü Ekstraktının Hazırlanışı: Türkiye'de Malatya yöresinden Nisan 2017'de toplanan balzam şeklindeki propolis örnekleri rendelenip küçük hale getirildi. Elde edilen propolis örneğinden 60 gr tartılıp üzerine %99 olan metanol oranını %95'e düşürmek için 286 ml metanol ve 13,57 ml distile su ile karıştırıldı. 300 ml ve %95'lik metanol propolis çözeltisi elde edildi. Örnekler 2 ayrı behere ayrılıp üzeri parafilmlelenmiştir. Hava akışını sağlayabilmek için parafilm üzerine ufak delikler açılmıştır. Etüvde yaklaşık olarak 5 gün boyunca günde iki kere karıştırılmıştır. Bütün ekstrakt süzme kağıdıyla süzildikten sonra tüplere aktarılarak alkol uçurucu yardımıyla alkolü uçurulmuştur. Bu şekilde hazırlanan stok propolis ekstresinden seyretme yoluyla 0.45 ml'lik filtreden geçilerek hücre kültürüne hazır hale getirildi. Çalışmalarda 1/5 (0.2), 1/10 (0.1), 1/20 (0.05) mg/ml konsantrasyonları kullanılırken 1/40, 1/80, 1/160 şeklinde farklı kontrasyonlarda daha sonra kullanılmak için 4 ° C'de saklanmıştır (w/v).

Propolisin Etanollü Ekstraktının Hazırlanışı: Türkiye'de Malatya yöresinden Nisan 2017'de toplanan balzam şeklindeki propolis örnekleri rendelenip küçük hale getirildi. Elde edilen propolis örneğinden 50 ml etanollü ekstrakt elde etmek için 1 gr balzam şeklindeki propolis ve %99.9 etanol karıştırılmıştır. Örnek 3 gün etüvde bekletilip günde 2 kere karıştırıldıktan sonra fazla alkolü uçurulup 0.45 ml'lik filtreden geçirilmiştir. Etanollü ekstrakt seyreltme yoluyla 1/50 (0.02) ve 1/250 (0.004) mg/ml şeklinde iki ayrı konsantrasyon elde edilmiştir (w/v).

Soğanın Metanollü Ekstraktının Hazırlanışı: Türkiye'de İstanbul Ümraniye ilçesinde herhangi bir pazardan alınan 3 adet soğan soyulduktan sonra rondodan geçirilerek kurutma kağıdının üzerine ince bir tabaka şeklinde yayılarak 2 gün süreyle kurutuldu. Kuru ağırlık hassas terazide tartıldığında yaklaşık olarak 35,25 gr olarak ölçülmüştür. %99.9 olan metanolün içine kuru olarak 5 gr tartılan soğanın içine 140 ml

distile su ve 260 ml metanol eklendi. %65'lik metanol elde edilmiş oldu. Soğanın daha iyi parçalanması için karışımın içine 18,18 ml HCL eklendi. Ertesi gün soğan ekstraktı 30 dk ultrasonic parçalayıcı da bekletildi. Tekrar 90 ° C ve 400 rpm'de 2 saat muamele edildi. 0.45 m'lik filtreyle süzüldü. Metanollü ekstrakt seyretme yöntemiyle değişik konsantrasyonlarda elde edildi. Çalışmalarda 1/100 (0.01), 1/500 (0.002) mg/ml konsantrasyonları kullanılırken hazırlanan diğer konsantrasyonlar 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 ise daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 ° C' de saklanmıştır (w/v).

Soğanın Etanollü Ekstraktının Hazırlanışı: Türkiye'de İstanbul Ümraniye ilçesinde herhangi bir pazardan alınan 3 adet soğan soyulduktan sonra rondodan geçirilerek kurutma kağıdının üzerine ince bir tabaka şeklinde yayılarak 2 gün süreyle kurutuldu. Kuru ağırlık hassas terazide tartıldığında yaklaşık olarak 35,25 gr olarak ölçülmüştür. 50 ml çözelti hazırlamak için 1 gr soğan hassas terazide tartıldı. %99.9 olan etanol %65'e düşürüldü. 40 ml etanol kurutulmuş soğanların üzerine eklendi. Soğan ekstresi 3 gün 37 ° C'de bekletildi. 3 gün sonunda soğan ekstresi süzme kağıdıyla süzüldü. Ertesi gün soğan ekstraktı 30 dk ultrasonic parçalayıcı da bekletildi. Tekrar 90 ° C ve 400 rpm'de 2 saat muamele edildi. 0.45 m'lik filtreyle süzüldü. Etanollü ekstrakt seyretme yöntemiyle 1/50 (0.02), 1/250 (0.004) mg/ml iki ayrı konsantrasyon elde edildi (w/v).

%70'lik Etanol eldesi: %99.9'luk etanolden 70 ml alındı. Üzerine 30 ml distile su ilave edildi ve son hacim 100 ml tamamlanarak sterilizasyonu sağlama da kullanmak için %70'lik etanol çözeltisi elde edildi.

PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4 : 500 ml PBS elde edebilmek için 4 gr NaCl, 0.1 gr KCl, 0.72 gr Na₂HPO₄, 0.12 gr KH₂PO₄ tartılarak üzerine 400 ml distile su eklendi.. Çözeltiyi 0.22 µm filtreden geçirdikten sonra parafilmleyerek 4 ° C' de falcon da ağzı parafilmlelenerek muhafaza edildi.

Dondurma Medium Hazırlanması : Dondurma mediumu hazırlanırken ortam %10 DMSO ve %90 FBS içermelidir. Çalışmada Fetal Bovine Serum -20° C'den alınıp su banyosunda 37° C'ye getirildi. Son hacim 50 ml için 5 ml DMSO ve 45 ml FBS kullanıldı. 4 derecede falconun ağzı parafilmlelenerek bekletildi.

MTT Stok Solüsyonu hazırlanışı : MTT stok solüsyonu 4° C'den alınmıştır. MTT stok solüsyonu 5 mg/ml olmalıdır. Yaklaşık olarak 30 gr Thiazolyl Blue hassas terazide ölçülmüştür. 30 gr Thiazolyl Blue eklenen 15 ml falcona 10 ml DMSO eklendi.. Falcon alüminyum folyo ile kapatılıp falconun ağzı ise parafilmlelenip -20° C 'de muhafaza edildi.

Büyütme Medyumu Hazırlanması : Fetal Bovine Serum -20° C'den alınarak su banyosunda 37° C'ye getirildi. Pen strep -20° C' den su banyosunda 37° C'ye getirildi. Hazırlanan %70'lik etanolle kabin ve -20° C'den çıkartılan kimyasallar steril edildi. Son hacim 50 ml olacak şekilde medyum hazırlamak için 44.5 ml DMEM, %10 final konsantrasyonlu FBS için 5ml FBS ve %1 final konsantrasyonlu Pen strep için 0.5 ml Pen strep, 50 ml'lik falcona eklendi.. Falconun ağzı parafilmlelenerek 4° C'de saklanmıştır.

3.2.2. Hücre Kültürü

Çalışmaların hepsi hücre kültürü kabininde (air flow kabin)' de kabin her açılıp kapandığında çalışma yapılmadan ve yapıldıktan sonra %70'lik etil alkolle silinmiştir. Kabine girerken ve çıkarken yapılan çalışmalarda kabine girilip çıkıldığında dahi eldiven değiştirilmiş ve eldivenli ellere %70'lik alkol sıkılmıştır. Kabine giren ve çıkan pipetler, pipet uçları, ependorf tüpler, 15 ml ve 50 ml falconlar, serolojik pipetler, 25 cm²'lik flaskların hepsi otoklavlanmış ve kabinde ise girip çıkarken %70'lik etanolle steril edildi. Her çalışma tamamlandığında hücre kültürü kabini ve odası UV ışıkla 1 saat boyunca steril edildi.

3.2.3. 3T3 Hücre Hattının temini ve çoğaltılması

Üsküdar Üniversitesi Moleküler Biyoloji bölümü vasıtası ile American Type Culture Collection, ATCC'den temin edildi. Çalışmalarda Sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Hücrelerde büyütme ortamı olarak % FBS, %1 Pen-Strep ve DMEM ortamı ve 37° C CO₂ inkübatör kullanıldı.

3.2.4. Hücrelerin çoğaltılması, pasajlanması, dondurulması

-80 ° C'den cryotube ile çıkarılan hücreler cryo tüple beraber su banyosuna konarak 37 ° C'de çözünmesi sağlanmıştır. Hücre kültürü kabini %70'lik etanolle steril edildikten sonra hücrede alkollenip kabine alınmıştır. 75 µl şeklinde iki ayrı 25 cm² flask içine 3 ml hazır DMEM eklenip üzerine al ver yapılarak hücre hattı cryo tüpden flaska aktarılmıştır. 2 ya da 3 günde bir serolojik pipet yardımıyla üst faz atılır ve aynı flaska yeni DMEM eklenir. -80'den çıkan ilk hücrelerin kendine gelmesi yaklaşık olarak 7 günü almaktadır. Flask yüzeyi %95 oranına ulaştığında hücre flasktan kaldırılır ve pasajlanırlar. Yaklaşık 4 ya da 5 kere pasajlanıp stok yapıldıktan sonra cryo tüplere aktarılarak -80 ° C'de bir sonraki çalışmalar için saklanırlar.

Deney Uygulanış Basamakları:

- 1) Flaskın içerisindeki ortam serolojik pipet yardımıyla atılır.
- 2) 37 °C su banyosunda çözünen Tripsin 2 ml şeklinde flaska ilave edilir.
- 3) Flask CO₂ inkübatöre konulur ve 5 dk beklenir.
- 4) Süre dolduktan sonra tripsin serolojik pipet yardımıyla al ver yapılarak köpürtmeden yıkanır.
- 5) Falcon tüpe 2 ml DMEM eklenir.
- 6) Tripsinle muamele edilen sıvı falconun üzerine eklenir.
- 7) 1300 rpm'de 3 dk boyunca santrifüj edilir.
- 8) Falcondaki üst faz altında DMEM kalmayacak bir şekilde atılır.
- 9) Üzerine tekrar 2 ml DMEM eklenir.
- 10) Yeni flaska 3 ml DMEM eklenir.
- 11) Falconda kalan 2 ml DMEM'li sıvı al ver yapılır.
- 12) 500 µl hücre DMEM karışımı yeni flasktaki DMEM'e eklenir. 37 °C' de inkübe edilmeye devam edilir.
- 13) Hücreler sayılabilir pasajlanabilir platelere ekilebilirler.
- 14) Hücreleri dondurmak için 4 °C' de muhafaza ettiğimiz dondurma mediumundan dondurmak istediğimiz kadar eklenir.

5 dk 4 °C' de, 5 dk -20 °C' de bekletilir. Daha sonra -80 °C' ye kaldırılır.

3.2.5. Hücrelerin çözündürülmesi

-80 ° C'den çıkarılan hücreler deney tekrarı ya da devamı için çözündürülür.

Deneyin Uygulanış Basamakları:

- 1) -80 ° C'den cryo tüp ile çıkartılan hücreler hızlı bir şekilde 37 ° C'de su banyosunda çözülür.
- 2) 25 cm² flask içine 3 ml DMEM eklenir.
- 3) Çözülen cryo tüp içindeki hücre hattı al ver yapılarak 1 ml yeni flask üzerine aktarılır.
- 4) 37 ° C'lik CO₂ inkübatöre alınır.

3.2.6. Neubauer lamı yardımıyla hücrelerin sayılması

Hücrelerin yapılan tüm deneyler için hücreler sayılır. Boş bir plate yardımıyla 10 µl Tripan mavisi ve 10 µl seyreltilmiş hücre üzerine ilave edilir ve al ver yapılır. Neubauer laminin ortasına lamel yerleştirilir ve boşluktan karışım bırakılır. Boyanan hücreler mavi canlı hücreler ise şeffaf şekilde görünürler. Şeffaf hücreler sayılır.

3.2.7. Hücrelerin hesaplanması

Mikroskopla sayılan hücreler 20.000 ile çarpılırlar. Hücreler DMEM ile sayreltilirler. Sonuç olarak 1:5'e seyreltilmiş hücreler 10⁵ oranına getirilir.

3.3. MTT (Canlılık Testi)

Farklı konsantrasyonlarda elde ettiğimiz propolis ve soğan ekstraktlarının 3T3 Fibroblast üzerindeki canlılığının belirlenmesidir.

Canlı olan hücreler sarı renkli MTT (3-[4,5-dimethylthiazol 2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) tuzunda süksinat dehidrogenaz enziminin aktif olduğu hücrelerde mora boyanmasıdır (Darzynkiewicz Z ve ark, 1992).

3.3.1. Metanollü Ekstraktlarda MTT (Canlılık Testi)

Deney Uygulanış Basamakları:

- a) Hücreler flaskta çoğaltıldıktan sonra tripsin 37 °C'de çözündürülür.
- b) Flaska 2 ml tripsin eklenir.
- c) Flask CO₂ inkübatörde 5 dk bekletilir.
- d) Falcona 2 ml DMEM ve 2 ml tripsinli çözelti eklenir.
- e) 1300 rpm'de 3 dk santrifüjlenir.
- f) Üst faz çekip atılır ve üzerine 4 ml DMEM konup hücreler vortexlenirler.

- g) 96'lık boş pleyte 10 µl hücre ve 10 µl tripan mavi eklenir.
- h) Neubauer lamına lamel yerleştirilir ve boşluktan hücre tripan mavisi karışımı eklenir.
- i) 105 oranında hücreler DMEM' le seyreltikten sonra 90 µl olarak pleyte ekilir.
- j) 1 gece CO₂ inkübatörde bekletilir.
- k) Ependorf tüpler kullanılarak herbirine kontrol grubu propolis, 1/5 (0.2), 1/10 (0.1), 1/20 (0.05) mg/ml ve soğan kontrol grubu 1/100 (0.01), 1/500 (0.002) mg/ml 90 µl DMEM ve 10 µl ana stoktan konulup karışım elde edilir.
- l) Ayrı bir pleyte 10 µl DMEM ve üzerine 10 µl metanollü propolis kontrol grubu eklenir al ver yapılır en son kuyucuktan 10 µl atılır.
- m) Ayrı bir pleyte 10 µl DMEM ve üzerine 10 µl 0.2 mg/ml oranında seyreltilmiş propolis ekstraktı eklenir al ver yapılır en son kuyucuktan 10 µl atılır. 0.1, 0.05 mg/ml konsantrasyonları da aynı şekilde devam eder.
- n) Soğan ekstraktı ayrı bir pleyte 10 µl DMEM ve üzerine 10 µl metanollü soğan kontrol grubu eklenir al ver yapılır en son kuyucuktan 10 µl atılır.
- o) Ayrı bir pleyte 10 µl DMEM ve üzerine 10 µl seyreltilmiş soğan ekstraktı eklenir al ver yapılır en son kuyucuktan 10 µl atılır. 0.01, 0.002 mg/ml konsantrasyonları da aynı şekilde devam eder.
- p) İki gün süreyle CO₂ inkübatörde bekletilir.
- q) 5 mg/ml şeklinde hazırlanan MTT stok solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklenir.
- r) 3 saat boyunca pleyt CO₂ inkübatörde bekletilir.
- s) Her bir kuyudan hücreye değmeden 80 µl çekilip atılır.
- t) Hücreleri kaldırmak için tekrar son konsantrasyon %50 olacak şekilde kuyucuklara yetecek miktarda %50 isopropil alkol + %50 DMSO çözeltisi hazırlanır.
- u) Hazırlanan çözeltiden 100 µl kuyucuklara eklenir.
- v) Pleyt ışık girmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılır.
- w) 45 dk beklenir.
- x) 570 nm'de spektrofotometrede okutulur.

3.3.2. Etanollü Ekstraktlarda MTT (Canlılık Testi)

Deney Uygulanış Basamakları:

- a) Hücreler flaskta çoğaltıldıktan sonra tripsin 37 °C'de çözündürülür.
- b) Flaska 2 ml tripsin eklenir.

- c) Flask CO₂ inkübatörde 5 dk bekletilir.
- d) Falcona 2 ml DMEM ve 2 ml tripsinli çözelti eklenir.
- e) 1300 rpm' de 3 dk santrifüjlenir.
- f) Üst faz çekip atılır ve üzerine 4 ml DMEM konup hücreler vortexlenirler.
- g) 96' lık boş pleyte 10 µl hücre ve 10 µl tripan mavi eklenir.
- h) Neubauer lamına lamel yerleştirilir ve boşluktan hücre tripan mavisi karışımı eklenir.
- i) 105 oranında hücreler DMEM' le seyreltikten sonra 90 µl olarak pleyte ekilir.
- j) 1 gece CO₂ inkübatörde bekletilir.
- k) Ependorf tüpler kullanılarak herbirine kontrol grubu propolis, 0.02, 0.004 mg/ml ve soğan kontrol grubu 0.02, 0.004 mg/ml 90 µl DMEM ve 10 µl ana stoktan konulup karışım elde edilir.
- l) Ayrı bir pleyte 10 µl DMEM ve üzerine 10 µl etanollü propolis kontrol grubu eklenir al ver yapılır en son kuyucuktan 10 µl atılır.
- m) Ayrı bir pleyte 10 µl DMEM ve üzerine 10 µl 0.02 mg/ml oranında seyreltilmiş propolis ekstraktı eklenir al ver yapılır en son kuyucuktan 10 µl atılır. 0.004 mg/ml konsantrasyonu içinde aynı şekilde devam eder.
- n) Soğan ekstraktı ayrı bir pleyte 10 µl DMEM ve üzerine 10 µl etanollü soğan kontrol grubu eklenir al ver yapılır en son kuyucuktan 10 µl atılır.
- o) Ayrı bir pleyte 10 µl DMEM ve üzerine 10 µl seyreltilmiş soğan ekstraktı eklenir al ver yapılır en son kuyucuktan 10 µl atılır. 0.02, 0.004 mg/ml konsantrasyonları da aynı şekilde devam eder.
- p) İki gün süreyle CO₂ inkübatörde bekletilir.
- q) 5 mg/ml şeklinde hazırlanan MTT stok solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklenir.
- r) 3 saat boyunca pleyt CO₂ inkübatörde bekletilir.
- s) Her bir kuyudan hücreye değmeden 80 µl çekilip atılır.
- t) Hücreleri kaldırmak için tekrar son konsantrasyon %50 olacak şekilde kuyucuklara yetecek miktarda %50 isopropil alkol + %50 DMSO çözeltisi hazırlanır.
- u) Hazırlanan çözeltiden 100 µl kuyucuklara eklenir.
- v) Pleyt ışık girmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılır.
- w) 45 dk beklenir. 570 nm'de spektrofotometrede okutulur.

3.3.3. Farklı Konsantrasyonlu Metanollü Ekstraklara MTT (Canlılık Testi)

Stok solüsyonunu oranlarken tüplerdeki en yoğun olan ana stoktan yararlanıldı. Son konsantrasyonlar 500 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M elde edildi. Soğan ve propolisin metanollü ekstraktlarına 6 tekrarlı bir şekilde uygulandı.

Deney Uygulanış Basamakları:

- a) Hücreler flaskta çoğaltıldıktan sonra tripsin 37⁰ C'de çözündürülür.
- b) Flaska 2 ml tripsin eklenir.
- c) Flask CO₂ inkübatörde 5 dk bekletilir.
- d) Falcona 2 ml DMEM ve 2 ml tripsinli çözelti eklenir.
- e) 1300 rpm' de 3 dk santrifüjlenir.
- f) Üst faz çekip atılır ve üzerine 4 ml DMEM konup hücreler vortexlenirler.
- g) 96' lık boş pleyte 10 μ l hücre ve 10 μ l tripan mavi eklenir.
- h) Neubauer lamına lamel yerleştirilir ve boşluktan hücre tripan mavisini karışımı eklenir.
- i) 105 oranında hücreler DMEM' le seyreltildikten sonra 90 μ l olarak pleyte 6 tekrarlı 6 kuyucuk ekildi.
- j) 1 gece CO₂ inkübatörde bekletilir.
- k) İlk kuyucuklar kontrol grubu olarak adlandırıldı. 3'er sıraya da 10 μ l propolis kontrol ve 10 μ l soğan kontrol grupları eklendi..
- l) Propolisin 0.2 mg/ml ana stoğundan ependorfa 5 ml konulup üzerine 995 ml DMEM eklenip 500 μ M ana stok elde edildi. İkinci bir ependorfa 100 μ l ana stoktan alınıp 900 μ l DMEM eklendi 50 μ M stoğu elde edildi. Üçüncü ependorfa ikinci ependorftan 200 μ l alınıp üzerine 800 μ l DMEM eklendi 10 μ M ana stok elde edildi. Dördüncü ependorfa üçüncü ependorftan 500 μ l alınıp üzerine 500 μ l DMEM eklendi. 5 μ M stoğu elde edildi. Beşinci ependorfa dördüncü ependorftan 200 μ l üzerine 800 μ l DMEM eklendi. 1 μ M stoğu elde edildi.
- m) Soğanın 0.01 mg/ml ana stoğundan ependorfa 500 μ l üzerine 500 μ l DMEM eklenip 500 μ M ana stok elde edildi. İkinci bir ependorfa 100 μ l ana stoktan alınıp 900 μ l DMEM eklendi 50 μ M stoğu elde edildi. Üçüncü ependorfa ikinci ependorftan 200 μ l alınıp üzerine 800 μ l DMEM eklendi 10 μ M ana stok elde edildi. Dördüncü ependorfa üçüncü ependorftan 500 μ l alınıp üzerine 500 μ l DMEM eklendi. 5 μ M stoğu elde edildi. Beşinci ependorfa dördüncü ependorftan 200 μ l üzerine 800 μ l DMEM eklendi. 1 μ M stoğu elde edildi.
- n) Sırayla kuyucukların üzerine 10 μ l elde edilen dozlardan eklendi.

- o) İki gün süreyle CO₂ inkübatörde bekletilir.
- p) 5 mg/ml şeklinde hazırlanan MTT stok solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklenir.
- q) 3 saat boyunca pleyt CO₂ inkübatörde bekletilir.
- r) Her bir kuyudan hücreye değmeden 80 µl çekilip atılır.
- s) Hücreleri kaldırmak için tekrar son konsantrasyon %50 olacak şekilde kuyucuklara yetecek miktarda %50 isopropil alkol + %50 DMSO çözeltisi hazırlanır.
- t) Hazırlanan çözeltiden 100 µl kuyucuklara eklenir.
- u) Pleyt ışık girmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılır. 45 dk beklenir.
- v) 45 dk beklenir.
- w) 570 nm'de spektrofotometrede okutulur.

3.4. Antimikrobiyal testlerde kullanılan bakterilerin eldesi

Antimikrobiyal deneyde kullanılan bakterilerin tamamı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde yatan hastalardan izole edilmiş klinik suşlardır. *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* kullanıldı. Metanollü, etanollü ve LB kullanılarak 3 ayrı 9 tekrarlı deney yapılmıştır. Güvenlik kabini ve malzemeler her giriş ve çıkışta alkolle dezenfekte edildi.

3.4.1. Metanollü Ekstraktlarda Antimikrobiyal Deneyi

Çalışmalarda Sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. 96 'U' şeklindeki well pleytlere öncelikle soğan ve propolisin çözücü alkolü 10 µl ilave edilip ilk kuyucuğa 10 µl propolis veya soğan ekstraktının konsantrasyonundan ilave edildi. Seri olarak her kuyucukta 10 µl üçer defa karıştırılıp diğer kuyucuğa geçilmiştir. Onikinci kuyucukta 10 µl atılmıştır.

Deney Uygulanış Basamakları:

- a) Boş bir pleyte öncelikle 100 µl LB eklendi daha sonra sırayla bakteriler 100 µl eklendi. Spektrofotometrede ilk OD ölçümleri yapıldı.
- b) Boş kuyucuğun değeri 0,05 kabul edildi.
- c) LB blank olarak adlandırıldı. Ölçülen blank değeri bakterinin değerinden çıkartıldı. Çıkan sonuç elimizde fazla oranda olmasını istediğimiz bakterilerimiz için oranımızı 10 ml olarak belirledik. İsteddiğimiz oran ve boş OD değeri ile

çarpılıp bakterinin OD değerine bölündü.Çıkan sonuç eklenecek bakteri olarak kabul edildi ve kalan 10 ml LB' ye tamamlandı.

- d) Bütün bakteriler 10 ml'ye LB ile seyreltildi.
- e) -80 °C'den çıkarılan bakteriler 37 °C'ye getirildi.
- f) 3 ayrı falcona 10 ml LB ve 100 µl bakteri eklendi..
- g) Bir gece boyunca çalkalayıcı inkübatörde 37 °C'de bekletildi.
- h) Metanolün uçması nedeniyle pcr tüplerine her oran için 12 kuyucukta kontroller ve propolis 0.2, 0.1, 0.05 mg/ml için ve soğanda kontrol 0.01, 0.002 mg/ml için seyreltmeler yapılmıştır. 100 µl kontrol grubu ve 100 µl propolis 0.2, 0.1, 0.05 mg/ml ve soğan kontrol grubu 0.01, 0.002 mg/ml tek tek 12 kuyucuk için seyreltilmiştir. Yaklaşık olarak 87 pcr tüpü kullanıldı. A grubu propolis kontrol, B grubu propolis 0.2 mg/ml, C grubu propolis 0.1 mg/ml, D grubu propolis 0.05 mg/ml, E grubu soğan kontrol, F grubu soğan 0.01 mg/ml, G grubu 0.002 mg/ml ve H grubu sadece 90 µl bakteriden oluşmaktadır. En yoğun konsantrasyon 1. Kuyucuktadır.
- i) Bütün kuyucuklara 10 µl seyreltilen ekstraktlardan konuldu.
- j) Bütün kuyucukların üzerine seyreltilen bakterilerden 90 µl konuldu.
- k) Pleytlerin hepsi 10 sn shake yapıldı.
- l) Spektrofotometrede 600 nm'de ölçülerek ilk ölçümler kayıt edildi.
- m) Pleytlerin tamamı sealing ile kaplandı.
- n) Kaplanan pleytler 24 saat çalkalayıcı inkübatörde bekletildi.

Ertesi gün 600 nm' de ölçülerek sonuçlar değerlendirildi.3.4.2. Metanollü Ekstraktlarda LB ile Seyreltilen Bakterilerin Antimikrobiyal Deneyi

Deney Uygulanış Basamakları:

- a) Boş bir pleyte öncelikle 100 µl LB eklendi daha sonra sırayla bakteriler 100 µl eklendi ve spektrofotometrede ölçüldü.
- b) Boş kuyucuğun değeri 0 kabul edildi.
- c) LB blank olarak adlandırıldı. Ölçülen blank değeri bakterinin değerinden çıkartıldı. Çıkan sonuç elimizde fazla oranda olmasını istediğimiz bakterilerimiz için oranımızı 10 ml olarak belirledik. İsteddiğimiz oran ve boş OD değeri ile çarpılıp bakterinin OD değerine bölündü.Çıkan sonuç eklenecek bakteri olarak kabul edildi ve kalan 10 ml LB'ye tamamlandı.
- d) Bütün bakteriler 10 ml' ye LB ile seyreltildi.

- e) -80°C ' den çıkarılan bakteriler 37°C ' ye getirildi.
- f) 3 ayrı falcona 10 ml LB ve 100 μl bakteri eklendi..
- g) Bir gece boyunca çalkalayıcı inkübatörde 37°C 'de bekletildi.
- h) Propolis ekstraktı LB ile seyreltildiğinde reaksiyona girdiğinden dolayı 0.001 ve 0.01 mg/ml olarak seyreltilip çökeltmenin önüne geçilmiştir. Soğan ekstraktı 0.002 ve 0.01 olarak LB ile seyreltilmiştir. Soğan ve propolisin kontrol grupları da 1 ml kontrol ve 9 ml LB olacak şekilde seyreltilmişlerdir. A grubuna 90 μl bakteri eklendi.. B grubuna propolis kontrol, C grubuna propolis 0.001, D grubuna propolis 0.01, E grubuna soğan kontrol, F grubuna soğan 0.02, G grubuna 0.01 mg/ml soğan konuldu. En yoğun konsantrasyon 1 numaradadır.
- i) Bütün kuyucuklara öncelikle seyreltilen kontrol grupları ardından 10 μl
- j) hazırlanan konsantrasyonlar eklendi..
- k) Bütün kuyucukların üzerine seyreltilen bakterilerden 90 μl konuldu.
- l) Pleytlerin hepsi 10 sn shake yapıldı.
- m) Spektrofotometrede 600 nm'de ölçülerek ilk ölçümler kayıt edildi.
- n) Pleytlerin tamamını sealing ile kaplandı.
- o) Kaplanan pleytler 24 saat çalkalayıcı inkübatörde bekletildi.

Ertesi gün 600 nm' de ölçülerek sonuçlar değerlendirildi.

3.4.3. Etanollü Ekstraktlarda Bakterilerin Antimikrobiyal Deneyi

Deney Uygulanış Basamakları:

- a) Boş bir pleyte öncelikle 100 μl LB eklendi daha sonra sırayla bakteriler 100 μl eklendi ve spektrofotometrede ölçüldü.
- b) Boş kuyucuğun değeri 0 kabul edildi.
- c) LB blank olarak adlandırıldı. Ölçülen blank değeri bakterinin değerinden çıkartıldı. Çıkan sonuç elimizde fazla oranda olmasını istediğimiz bakterilerimiz için oranımızı 10 ml olarak belirledik. İsteddiğimiz oran ve boş OD değeri ile çarpılıp bakterinin OD değerine bölündü.Çıkan sonuç eklenecek bakteri olarak kabul edildi ve kalan 10 ml LB' ye tamamlandı.
- d) Bütün bakteriler 10 ml' ye LB ile seyreltildi.
- e) -80°C ' den çıkarılan bakteriler 37°C 'ye getirildi.
- f) 3 ayrı falcona 10 ml LB ve 100 μl bakteri eklendi..
- g) Bir gece boyunca çalkalayıcı inkübatörde 37°C 'de bekletildi.

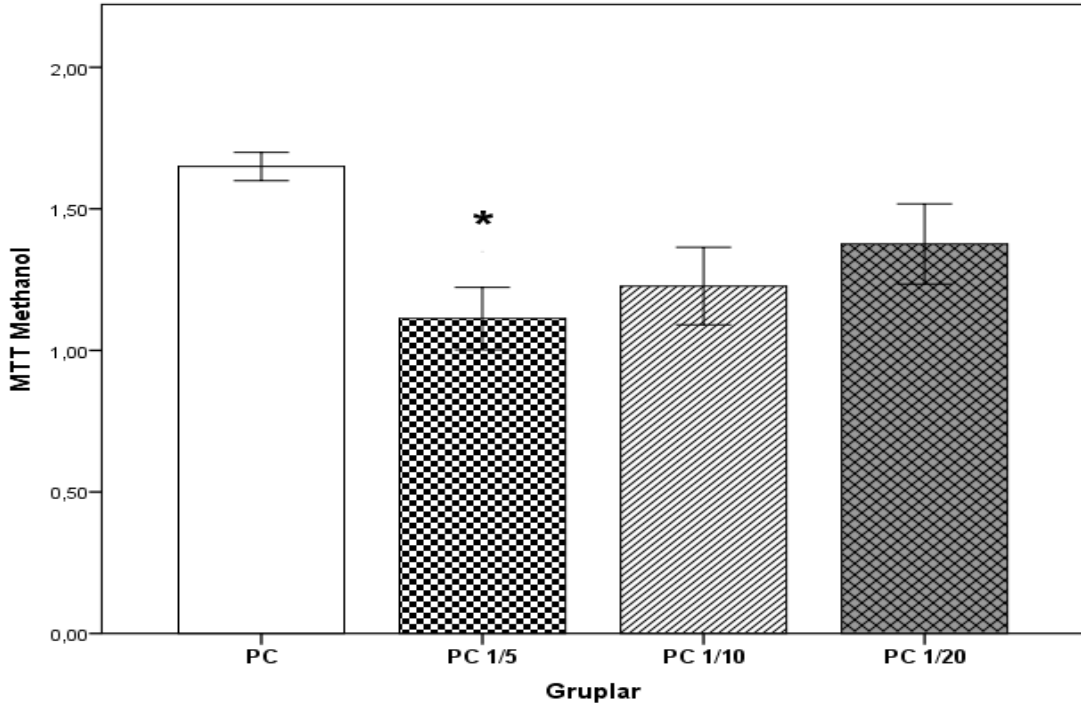
- h)** Propolis ekstraktı etanolle 0.02 ve 0.004 mg/ml oranında seyreltilmiştir. Soğan ekstraktı ise 0.02 ve 0.004 oranında seyreltilmiştir. Pleytin en son kuyucuklarına sadece 90 µl bakteri eklendi.. A grubuna 90 µl bakteri eklendi.. B grubuna propolis kontrol, C grubuna propolis 0.02, D grubuna propolis 0.004, E grubuna soğan kontrol, F grubuna soğan 0.02, G grubuna 0.004 mg/ml soğan konuldu. En yoğun konsantrasyon 1. kuyucuktur.
- i)** Bütün kuyucuklara öncelikle seyreltilen kontrol grupları ardından 10 µl hazırlanan konsantrasyonlar eklendi..
- j)** Bütün kuyucukların üzerine seyreltilen bakterilerden 90 µl konuldu.
- k)** Pleytlerin hepsi 10 sn shake yapıldı.
- l)** Spektrofotometrede 600 nm’de ölçülerek ilk ölçümler kayıt edildi.
- m)** Pleytlerin tamamını sealing ile kaplandı.
- n)** Kaplanan pleytler 24 saat çalkalayıcı inkübatörde bekletildi.
- o)** Ertesi gün 600 nm’de ölçülerek sonuçlar değerlendirildi.

4. BULGULAR

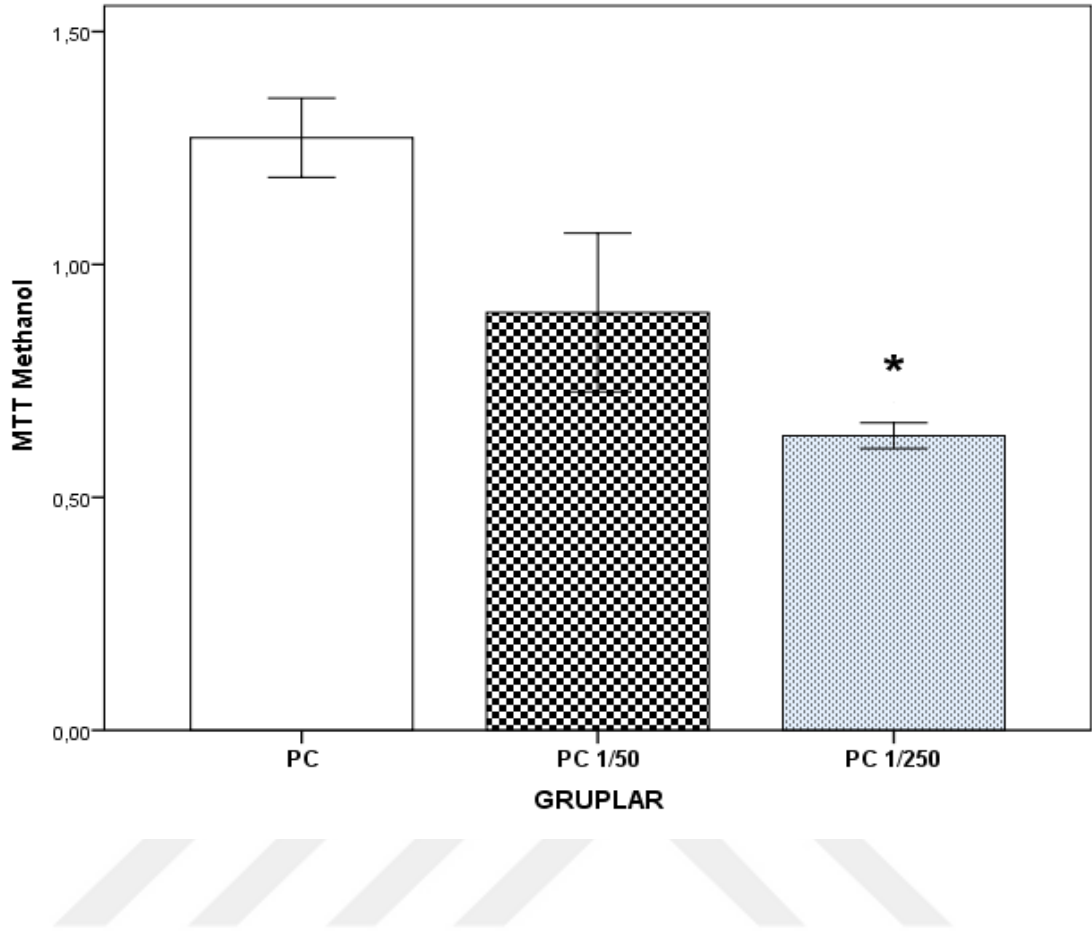
4.1. MTT Testi Kullanılarak Metanollü Propolis ve Soğan Ekstraktlarının Fibroblast 3T3 hücre hattındaki canlılık etkileri

4.1.1. Metanollü propolis ekstraktının Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etkisi

Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine metanollü propolis ekstraktının 2×10^{-1} , 10^{-1} , 5×10^{-2} μM konsantrasyonlarının etkisi şekil 4 'te ve 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarını etkisi ise şekil 5 'te gösterildi.

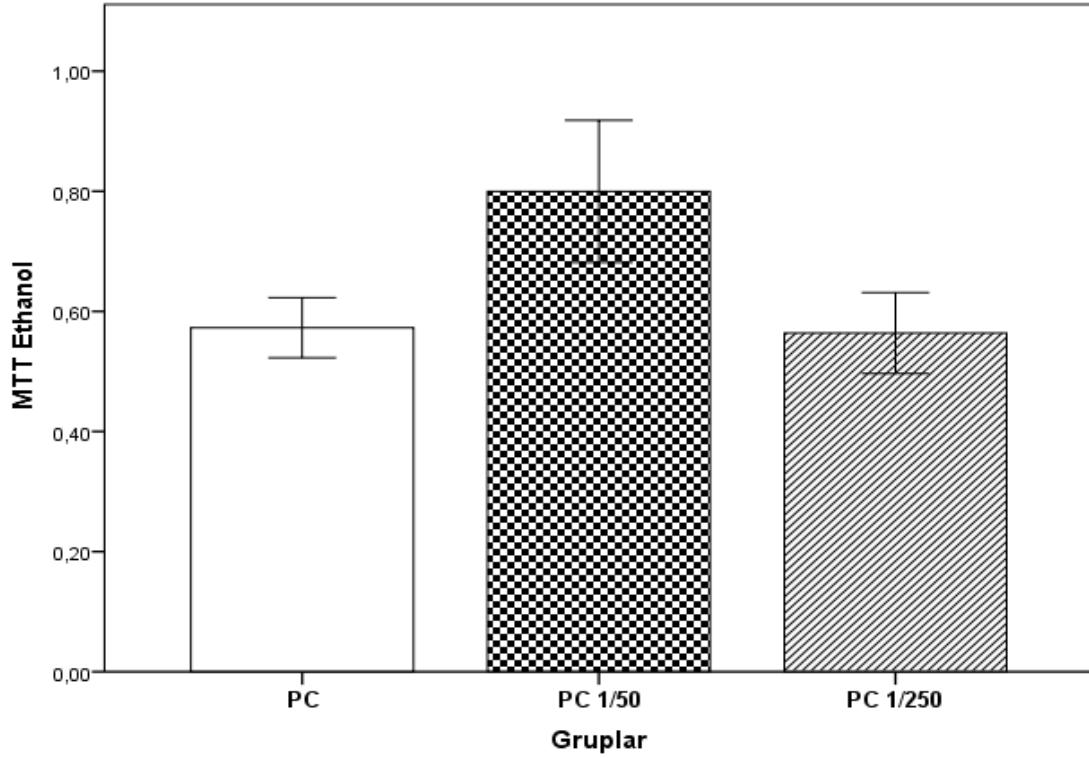


Şekil 4: Metanollü propolis ekstraktının 2×10^{-1} , 10^{-1} , 5×10^{-2} μM konsantrasyonlarının Fibroblast 3T3 hücresi üzerine etkisi (* $p < 0.05$ istatistikçe anlamlı, Tukey test). X eksenine pc (propolis kontrol) ve propolis konsantrasyonlarını (1/5, 1/10, 1/20) ifade ederken, Y eksenine ise Fibroblast 3T3 hücre miktarını ifade etmektedir. Propolisin metanollü ekstraktının 2×10^{-1} , 10^{-1} , 4×10^{-2} μM konsantrasyonlarından sadece 2×10^{-1} μM konsantrasyonu fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine istatistikçe anlamlı etki gösterdi [$F(3,47) = 4.028$, $p < 0.05$ Anova testi] (Şekil 4). Grupların MTT canlılık testi verilerine post-hoc analiz uygulandığında metanollü propolisin 2×10^{-1} μM konsantrasyonu fibroblast 3T3 hücre hattı üzerinde propolis kontrol (PC) grubuna göre daha az hücre canlılığı göstermiştir ($p = 0,010$, Tukey testi)(Şekil 4).



Şekil 5:Metanollü propolis ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarının Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etkisi (* $p < 0.05$ istatistikçe anlamlı, Tukey test). X eksenini pc (propolis kontrol) ve propolis konsantrasyonlarını (1/150, 1/250) ifade ederken , Y eksenini ise Fibroblast 3T3 hücre miktarını ifade etmektedir.

Propolisin metanollü ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarından sadece 4×10^{-3} μM konsantrasyonu fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine istatistikçe anlamlı etki gösterdi [F(2,35)= 0.623, $p < 0.001$ Anova test] (Şekil 5). Grupların MTT canlılık testi verilerine post-hoc analiz uygulandığında metanollü propolisin 4×10^{-3} μM konsantrasyonu fibroblast 3T3 hücre hattı üzerinde propolis kontrol (PC) grubuna göre daha az hücre canlılığı gösterildi ($p=0,001$, Tukey test)(Şekil 5).



4.1.2. Metanollü soğan ekstraktlarının Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etkisi

Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine metanollü soğan ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarının etkisi şekil 6 'da gösterildi.

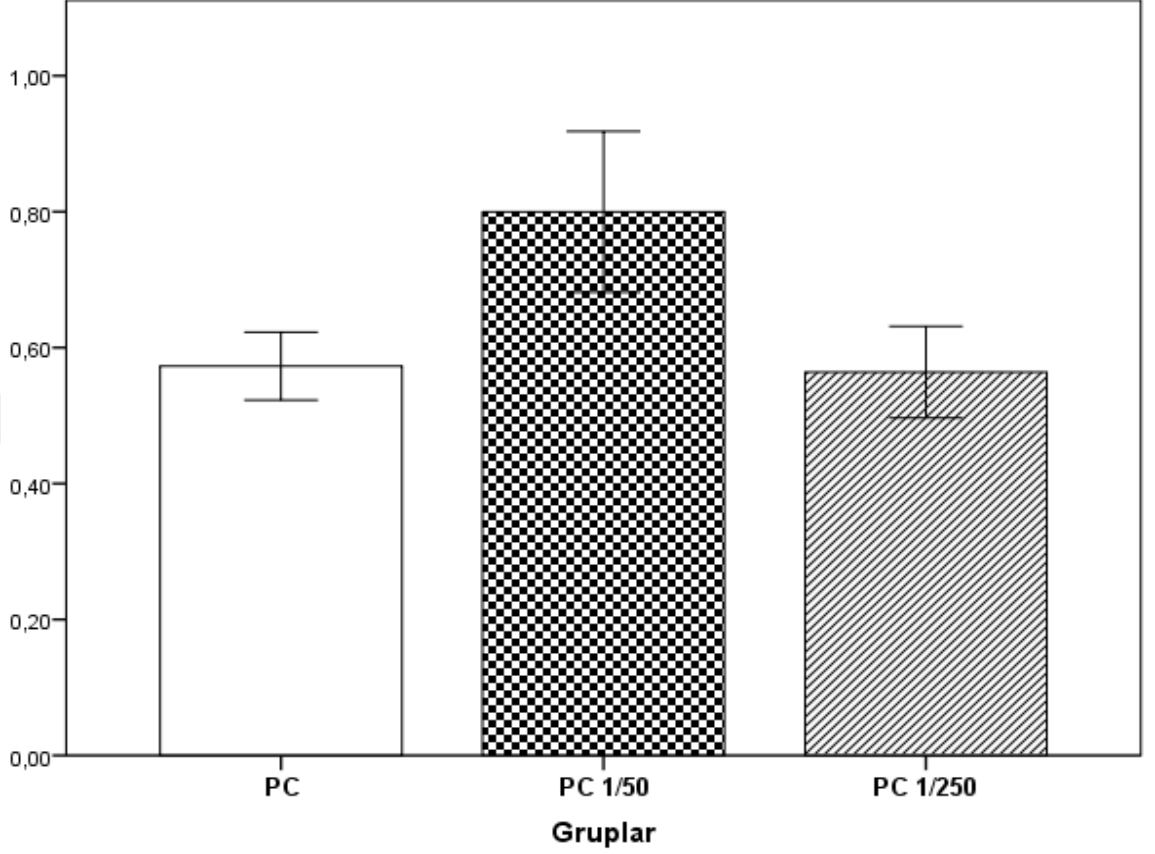
Şekil 6: Metanollü soğan ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarının Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etkisi. X eksenini soğan kontrol ve soğan konsantrasyonlarını (1/50, 1/250) ifade ederken, Y eksenini ise Fibroblast 3T3 hücre miktarını ifade etmektedir.

Metanollü soğan ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarından hiçbiri fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine istatistikçe anlamlı etki yapmamıştır [$F(2,35) = 0.453$, $p > 0.05$ Anova testi] (Şekil 6). Grupların MTT canlılık testi verilerine post-hoc analiz uygulandığında metanollü soğan ekstraktının hiçbir konsantrasyonu fibroblast 3T3 hücre hattı üzerinde kontrol grubuna göre canlılık etkisi göstermedi (Sırasıyla $p = 0.932$; $p = 0.829$ Tukey testi) (Şekil 6).

4.2. MTT Testi Kullanılarak Etanollü Propolis ve Soğan Ekstraktlarının Fibroblast 3T3 hücre hattındaki canlılık etkileri

4.2.1. Etanollü propolis ekstraktının Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etkisi

Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etanollü propolis ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarının etkisi Şekil 7 'de gösterildi.

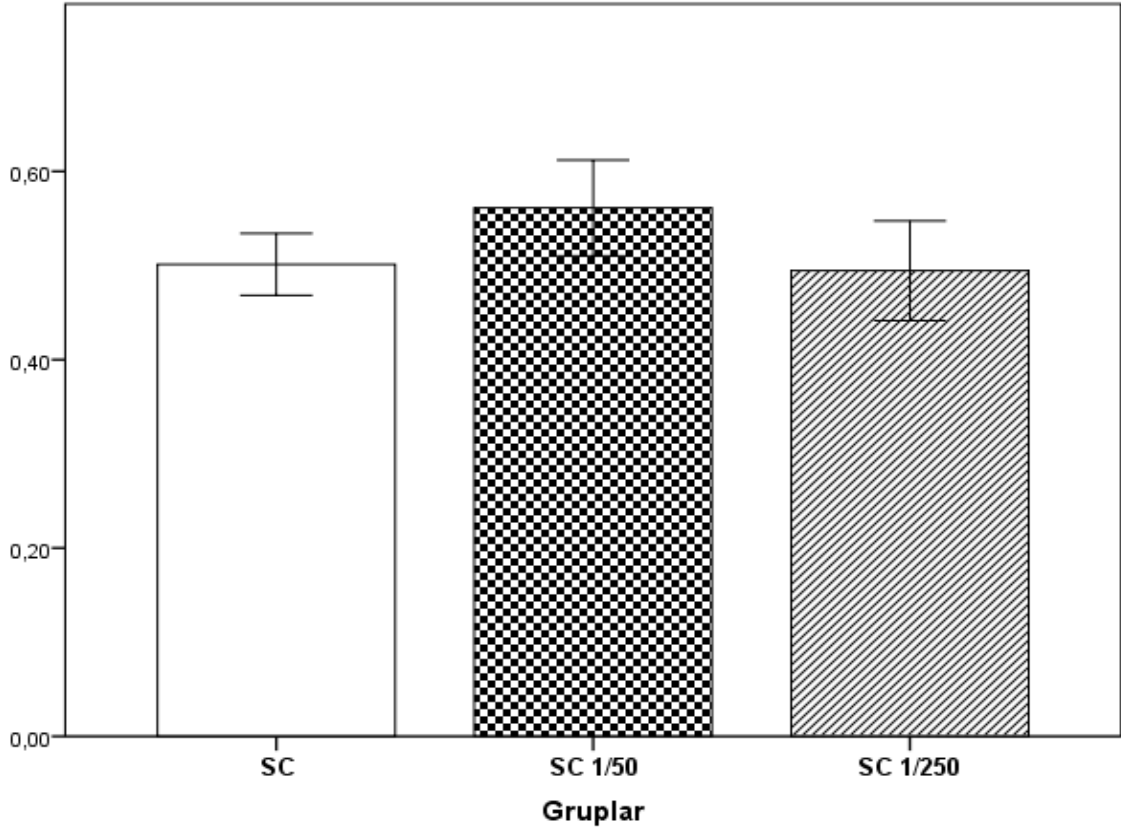


Şekil 7: Etanollü propolis ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarının Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etkisi. X eksenini pc (propolis kontrol) ve propolis konsantrasyonlarını (1/50, 1/250) ifade ederken, Y eksenini ise Fibroblast 3T3 hücre miktarını ifade etmektedir.

Etanollü propolis ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarından hiçbiri fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine istatistikçe anlamlı bir etki göstermedi [$F(2,35) = 2.541$, $p > 0.05$ Anova testi](Şekil 7). Grupların MTT canlılık testi verilerine post-hoc analiz uygulandığında etanollü propolis ekstraktının 2×10^{-2} μM konsantrasyonu kontrol grubuna göre fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine canlılık etkisi gösterse de bu etki istatistikçe anlamlı bir düzeye erişemedi ($p = 0.151$ Tukey testi)(Şekil 7).

4.2.2. Etanollü soğan ekstraktının Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etkisi

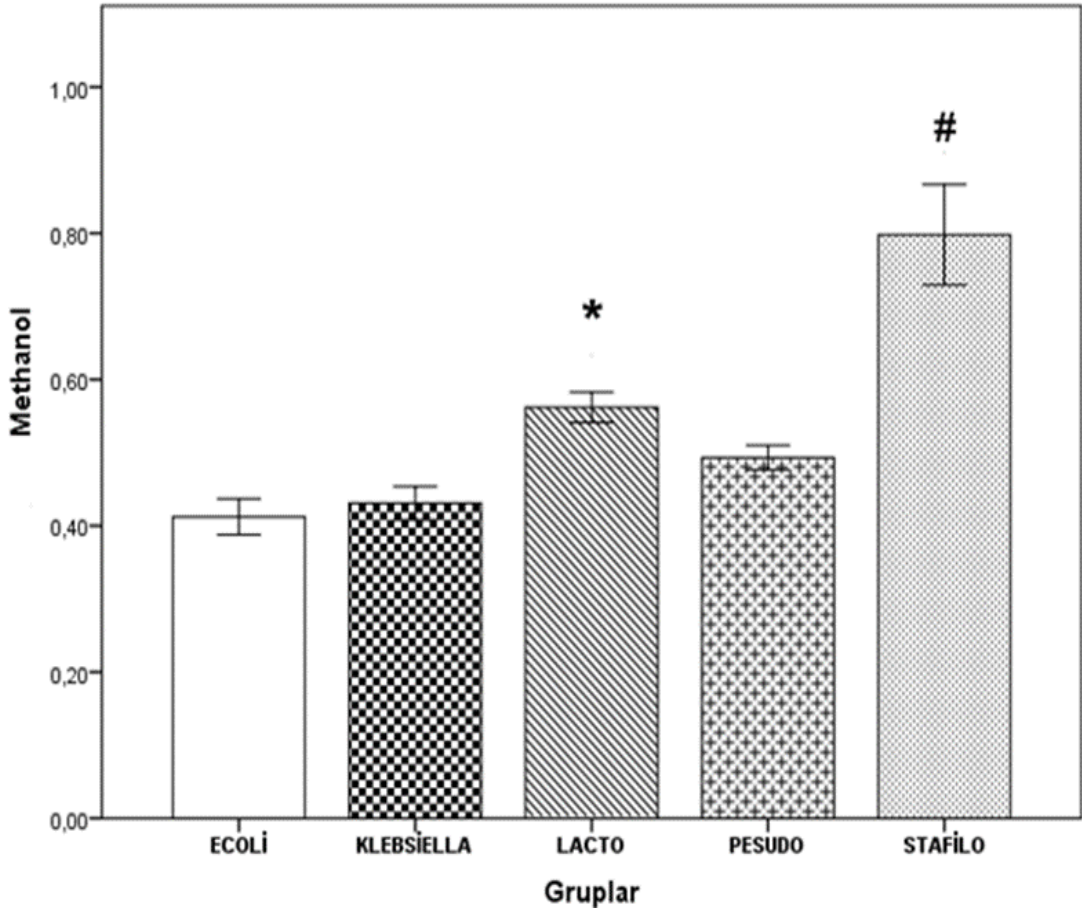
Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etanollü soğan ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarının etkisi şekil 8 'de gösterildi.



Şekil 8: Etanollü soğan ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarının Fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine etkisi. X eksenine sc (soğan kontrol) ve soğan konsantrasyonlarını (1/50, 1/250) ifade ederken, Y eksenine ise Fibroblast 3T3 hücre miktarını ifade etmektedir.

Etanollü soğan ekstraktının 2×10^{-2} , 4×10^{-3} μM konsantrasyonlarından hiçbirisi fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine istatistikçe anlamlı etki göstermedi [$F(2,35) = 0.623$, $p > 0.05$ Anova testi](Şekil 8). Grupların MTT canlılık testi verilerine post-hoc analiz uygulandığında etanollü soğan ekstraktının 2×10^{-2} μM konsantrasyonu kontrol grubuna göre fibroblast 3T3 hücre hattı üzerine canlılık etkisi gösterebilir, bu etki istatistikçe anlamlı bir düzeye erişemedi ($p = 0.637$ Tukey testi)(Şekil 8).

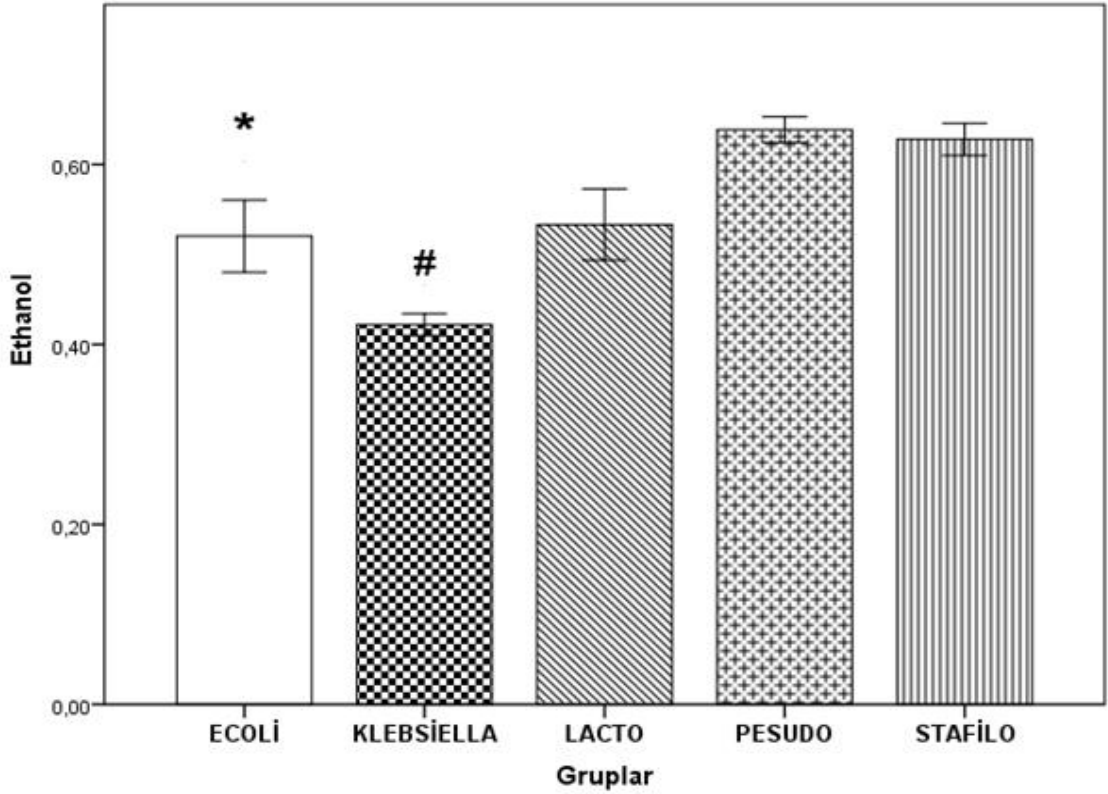
4.2. *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Klebsiella pneumoniae* bakterileri için metanol, metanollü LB ve etanol ile seyreltilmiş antimikrobiyal deney sonuçları Metanollü propolis için 2×10^{-1} mg/ml, 10^{-1} mg/ml, 5×10^{-2} mg/ml konsantrasyonlarını kullandık. Soğan için 10^{-2} mg/ml, 2×10^{-3} mg/ml konsantrasyonlarını kullanıldı. Metanollü LB propolis için 10^{-3} mg/ml, 10^{-2} mg/ml soğan için ise 2×10^{-3} mg/ml, 10^{-2} mg/ml konsantrasyonlarını kullanıldı. Etanollü ekstraktlarda propolis için 1/50-(0.02) mg/ml, 4×10^{-3} mg/ml soğan için ise 2×10^{-2} mg/ml, 4×10^{-3} mg/ml kullanıldı.



Şekil 9: Propolis ve Soğanın *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Klebsiella pneumoniae* bakterileri için metanollü ekstraktlarının sonuçları (* $p < 0.05$ istatistikçe anlamlı etki; # $p < 0.05$ istatistikçe anlamlı etki, Tukey test). X eksenini propolis ve soğan konsantrasyonlarını ifade ederken, Y eksenini ise bakterilerin miktarını ifade etmektedir.

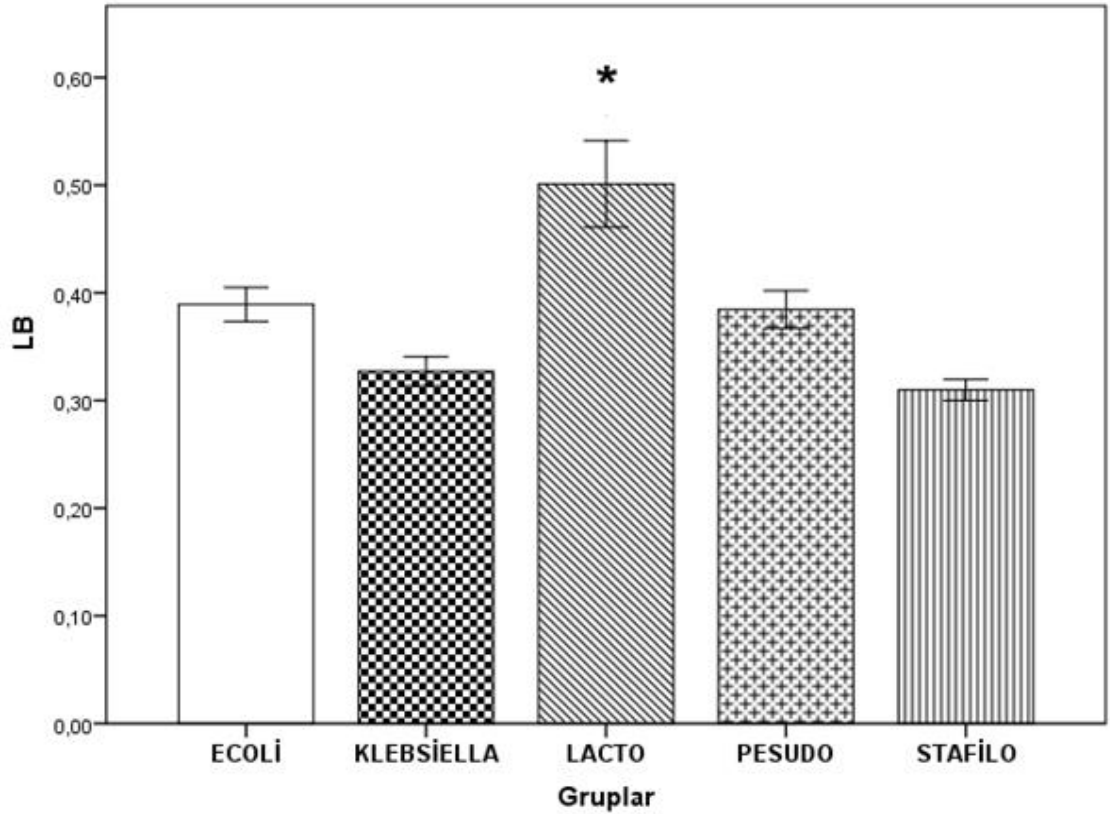
Propolis ve soğanın metanollü ekstraktlarında istatistikçe anlamlı etkiyi *Staphylococcus aureus* ve *Lactobacillus sp.* yapmıştır. [$F(4,59) = 18.570$, $p < 0.01$ Anova

test]. Gruplar post-hoc analizi uygulandığında *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas aureginosa* bakterilerine göre istatistikanlamlı en yüksek lm *Staphylococcus aureus*'ta görülmekte (Sırasıyla $p<0.01$; $p<0.01$; $p<0.01$; $p<0.01$, Tukey test). İstatistikçe anlamlı lm *Lactobacillus sp* de ise *Escherichia coli*'ye göre olduğu görülmekte ($p=0.039$ Tukey test)(Şekil 9).



Şekil 10: Propolisin ve Soğanın *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Klebsiella pneumoniae* bakterileri için etanollü ekstraktlarının sonuçları (* $p<0.05$ istatistikçe anlamlı etki;# $p<0.05$ istatistikçe anlamlı etki,Tukey test). X eksenini propolis ve soğan konsantrasyonlarını ifade ederken, Y eksenini ise bakterilerin miktarını ifade etmektedir.

Propolis ve soğanın etanollü ekstraktlarında ise *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* istatistikçe anlamlı bir etki gösterdi [$F(4,59)= 10.205$, $p<0.01$ Anova test] Gruplar post-hoc analizi uygulandığında *Escherichia coli* suşu sadece *Pseudomonas aeruginosa* suşuna göre anlamlı bir ölüm göstermiştir ($p= 0.031$ Tukey test) (Şekil 11). *Klebsiella pneumoniae* suşunda ise anlamlı ölümün sırasıyla *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* suşlarına göre olduğu görülmekte ($p=0.049$, $p<0.01$, $p<0.01$ Tukey test) (Şekil 10).



Şekil 11: Propolisin ve Soğanın *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Klebsiella pneumoniae* bakterileri için metanol LB ekstraktlarının sonuçları (* $p<0.05$ istatistikçe anlamlı etki Tukey test). X eksenini propolis ve soğan konsantrasyonlarını ifade ederken, Y eksenini ise bakterilerin miktarını ifade etmektedir.

Propolis ve soğanın Metanollü LB ekstraktlarında da istatistikçe anlamlı etkiyi sadece *Lactobacillus sp* yapmıştır [F(4,59)= 11.505, p<0.01 Anova test] Gruplar post-hoc analizi uygulandığında *Lactobacillus sp.* suşu anlamlı ölümü sırasıyla *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* bakterilerine göre yaptığı görülmekte (p<0.001, p<0.01, p<0.01, p<0.01 Tukey test) (Şekil 11).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaralanan dokunun kendisini iyileştirmeye çalışması fizyolojik bir durumdur. Deforme deri yenilenmesi; travma ile başlayan hücrenin yapısal ve biyokimyasal değişimlerin doku yenilenmesini meydana getirmesidir.

Yunanlılar ve Romalılar da deri apselerini iyileştirmede yüzyıllarca ilaç olarak kullanmışlardır. (Semiramis ve ark., 2008)

Bu çalışmada özellikle antiseptik, antibakteriyel, antifungal, antiviral, büzücü, spazmolitik, antiinflamatuvar, anestezi, antioksidan, antiülser, immünomodülatör ve yara iyileştirmesini hızlandırıcı özelliğe sahip propolis ekstraktı ve antidiyabetik, antioksidan, antihipertansif, antitrombotik, hipoglisemik, antiinflamatuvar, yara izi oluşumunu azaltıcı ve antihiperlipidemik özelliğe sahip soğan ekstraktının invitro ortamda fibroblast hücreleri üzerine etkisi canlılıkları anlamlı görüldü.

Yara iyileşmesi üzerine birçok çalışmalar bulunmaktadır. Bizde bu çalışmamızda yara iyileşmesinde doğal alternatif tıbbi çözümler bulmak yara iyileşmesinde iz azaltıcı yara iyileşmesini hızlandırıcı antimikrobiyal ve antibakteriyel etkiler üzerine çalıştık. Bu çalışmamızda özellikle antiseptik, antibakteriyel, antifungal, antiviral, büzücü, spazmolitik, antiinflamatuvar, anestezi, antioksidan, antiülser, immünomodülatör ve yara iyileştirmesini hızlandırıcı özelliğe sahip propolis ekstraktı ve antidiyabetik, antioksidan, antihipertansif, antitrombotik, hipoglisemik, antiinflamatuvar, yara izi oluşumunu azaltıcı ve antihiperlipidemik özelliğe sahip soğan ekstraktının invitro ortamda metanollü ve etanollü iki farklı çözücüde değişik konsantrasyonlar elde ederek fibroblast 3T3 hücresi üzerine etkisini ve canlılıklarını aynı zamanda antimikrobiyal etkisini *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sp.* suşlarını inceledik.

Silver bakterilerin ilginç bir alışkanlığı da birbirleriyle bilgi değişimi sevmeleri ve bu durum farklı iki bakteri türü arasında dahi geçerlidir demiştir bunun sonucunda bir bakteri türü bir gen veya genler vasıtasıyla antibiyotiklere direnç göstermeyi başardığında gen veya genler kopyalanarak diğer bakterilerle aktarılabilir daha çok bakteriler birbirleriyle temas ettikçe giderek çok sayıda bakteri antibiyotiğe direnç göstermeyi öğrenir demiştir (Silver 2011)

Silver makalesinde bakterilerin antibiyotik direncini bakterilerin antibiyotiğe fazla maruz kaldıkça daha fazla direnç sağlayacağını ve bunun için de fazla maruz bırakılmaması gerektiğinden bahsetmiştir aynı zamanda Silver 1987'den 2007'ye kadar patojenik bakterilerin ne kadar hızlı direnç kazandığını göstermiştir. (Silver 2011)

Semiramis ve ark (2008), son 20 yıl içerisinde sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara karşı dirençli hale gelmesi sonucu doğal ilaçların kullanımına karşı eğilim artmıştır.

Antibiyotik direncinin pik yaptığı ve yeni ilaçların olmadığı bir süreçte, kapanmayan yaraların tedavisi, antibiyotik direnci yüksek mikroorganizmaların ortadan kaldırılması açısından “geleneğe dönmeyen” bir neden kapisi daha açılacak gibi görünmektedir Konuk (2015) .demektedir. Bizde bu çalışmamızda doğal antibiyotik Propolis kullanımı , bilim dünyasında giderek artan bir eğilim içerisinde. Kimyasal antibiyotiklerin neden olduğu bakteriyel direncin oluşumuna alternatif olarak doğal antibakteriyel etkili propolis kullanımını desteklemektedir.

Propolis tıpta sıkça kullanılmasının yanı sıra dolaşım sistemi rahatsızlıkları, kanserde, deri hastalıklarında ve tedavisinde de sıkça kullanılmaktadır. Propolis ayrıca antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar etkilere de sahiptirler (Polat ve Koçan, 2006).

Apaydın (2015) Türkiye'nin 3 farklı bölgesinden (Çorlu, Kırklareli ve Ordu) tedarik edilen propolis ekstraktlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. İzole edilen *S.aureus* bakterilerin Amoksisilin antibiyotiğine karşı tamamının duyarlı olduğu tespit edildi. Etanolik Propolis ekstraktlarının inhibisyon etkisi üzerine yapılan analizlerde ise propolis örneklerinin inhibisyon etkilerinin olduğu ve farklı coğrafi bölgelerden elde edilen propolis örneklerinin farklı antimikrobiyal etki gösterdikleri ortaya konmuştur.

Semiramis ve ark (2008) propolis üretimi henüz çok yeni bir konudur. Ülkemizde propolis üretim teknikleri, muhafazası ve işlenmesi ile kullanım biçimi hakkında yapılmış çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Bal arılarının depoladığı propolis, bazı bitkilerin yapışkan salgıları olan zamk, sakız, lipophilic maddeler olabileceği gibi resin, bitki ve ağaçların öz suyu olan sızıntılar da olabilmektedir. Propolis ilaç ve kozmetik sanayii de ve bir çok marketlerde kapsül veya tabletler ya çiğnemek ya da içmek için hazırlanmış granül, boğaz pastilleri,

çiklet gibi ürünleri piyasada bulmak mümkün olmasına rağmen, propolisin kimyasal standardizasyonu henüz gerçekleşmemiştir. Propoliste bulunan balmumunun kaynağının bitkisel mum olduğunu bildirmişlerdir.

Saf propolisin üretilebilmesi için propolis toplanacak kovanın bulunduğu alan, çevrede çeşitli nedenlerle kullanılan boya, metal malzeme, propolis toplanmasında kullanılan metal kaşık, metal kaplar, çivi ve benzeri madde, kullanılan propolis tuzaklarının yapıldığı madde, propolisin depolandığı kap ve ortam propolise ağır metalların karışmasına neden olmakta ve kalitesine etki etmektedir.

Aksoy ve Dığrak (2006) Solhan (Bingöl) ve Kığı'dan(Bingöl) temin edilen balların belirtilen mikroorganizmanın gelişmesini engelleyemediği belirlenmiştir. karakovan balında gelişimi engellenirken, diğer (süzme, petek 1 ve petek 2) bal çeşitlerinin belirtilen mikroorganizmanın gelişimini inhibe etmediği belirlenmiştir demiştir

Bizim çalışmamızı destekler bir araştırma yapan Aksoy ve Dığrak (2006) farklı bölgelerden toplanmış balın antimikrobiyal olmadığını belirtmişlerdir.

Propolis antibakteriyel çalışmamızda farklı sonuçların çıkması kullandığımız Propolislerin kovan içinden sıyrılarak elde edilmesinden kaynaklandığını düşünüyoruz şimdiye kadar literatüre toplama şeklinden bahsedilmemiş Propolis kaynaklarının nasıl elde edildiği bildirilmesi Bizce önemlidir kovan içinden sıyrılarak toplanan propoliste bal kalıntıları, polen parçacıkları veya arı sütü karışmış olabileceğini bilmekteyiz

Literatürlerde antimikrobiyal etkilerin farklı sonuçlar vermesinin bir nedeni olabileceğini düşünüyoruz bunun için literatürleri propolis saflığı ve toplama şeklininde nasıl yapıldığının not edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca propolisin hasat zamanının ve bölgenin de önemli olduğu düşüncesindeyiz bala yakın çita üzerinden veya kenarlarından mı sıyrılmış yoksa kovan içi duvarlarından mı sıyrılmış önemli olduğu anlamını taşımakta olduğunu düşünmekteyiz

Kovandan alınan propolis hamdır ve saflaştırılarak kullanılması gerekir (Semiramis ve ark., 2008). ‘Propolis suda az çözünür. Ham propolisin en pratik çözücüsü %96'lık etanoldur. Ancak %95'lik alkolde de büyük ölçüde erir. Tıbbı amaçlı kullanımlarda %70'lik etanolda erimiş çözelti kullanılırken, kimyasal analiz amaçlı çözücü için %99'luk etanol gerekmektedir’

Buna karşın biz çalışmamızda 3T3 fibroblast hücrelerinin metanollü 1/5 ,1/10 ,1/20 ,1/50 ,1/250 oransal azalışlı propolis ekstraktının anlamlı ve etanollü propolis ekstraktının anlam ifade etmediğini gördük.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Propolisin içerik yapısını etkileyen mevsimsel toplanma zamanı ve kovan içinden hasad şeklinin kimyasal içeriğini etkilediğini anlamaktayız.

Propolis çalışmalarına katkıda bulunmak ve bilimsel veriler sunmak amacıyla doğal antibiyotik özelliği olan propolis toplanma şekli, ekstrak çıkartma ve Mevsim etkileri göz önünde bulundurulmalıdır.

Propolisin etanollü veya metanollü ekstraktının antimikrobiyal etkinliği anlamlı sonuç verirdiğini gördük.

Fibroblast 3T3 hücresinde metanollü propolis ekstraktı anlamlı sonuç verirken etanollü Propolis ekstraktı anlamsız sonuç vermiştir Metanollü veya etanollü soğan ekstraktları anlamlı sonuç vermemiştir.

Tüm dünyada antimikrobiyal direnç hızla artmakta ve hastalık ve ölümlerin sayısının arttığı görülmekte bu nedenle doğal antibiyotik ürünlerinin ilaç modunda kolay kullanılabilir olduğunu destekler düzeydedir.

- A.** Propolis toplama şeklinin (hasad) belirli kurallar çerçevesinde olması gerektiği
- B.** Kimyasal ilaçların bakteri genetiğini etkilediği ve direnç kazandığı için propolis metanollü ekstraktının yara iyileştirici özelliğini ve antibakteriyel metanollü soğan ekstraktlarının karışımlarının sprey modda kullanılması önerilmektedir.

EK 3. ETİK KURUL KARARI



7. KAYNAKLAR

Aksoy Z ve Dığrak M (2006). Bingöl Yöresinden Toplanan Bal ve Propolisin Antimikrobiyal Etkisi Üzerinde in vitro Araştırmalar. Fırat Ü. Fen ve Müh. Bil. Dergisi. 18 (4): 471-478.

Aksoy Z. ve Dığrak M. (2006). Bingöl Yöresinde Toplanan Bal ve Propolisin Antimikrobiyal Etkisi Üzerinde in vitro Araştırmalar Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü. Kahramanmaraş.

Akut, K. N. (2003). Kronik yara bakımı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Al-Attar, A., Mess, S., Thomassen, J. M., Kauffman, C. L., & Davison, S. P. (2006). Keloid pathogenesis and treatment. Plastic and reconstructive surgery, 117(1), 286-300.

Altındaş M. (2017). Yara iyileşmei, 194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/oguz.../YARA%20İYİLESMESİ.ppt Erişim tarihi: 16.09.2017

Anonim, (2017a). Soğan Özellikleri ve Faydaları, <http://sagliknet.blogcu.com/sogan-ozellikleri-ve-faydaları/6113388> Erişim tarihi : 15.09.2017

APAYDIN .H ,PROPOLİSİN HAZIR ÇORBALARDAN İZOLE EDİLEN STAPHYLOCOCCUS AUREUS ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİ , NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 2015

Apaydın H. 2015. Propolisin Hazır Çorbalardan İzole Edilen Staphylococcus aureus Üzerine İnhibisyon Etkisi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi.

Arda M., Minbay A., Leloğlu, N., Aydın, N., Akay Ö. (1992), Özel Mikrobiyoloji. Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum

Arda, M. (1985) Genel Bakteriyoloji 3. Baskı, Vet. Fak. Yayın No: 402, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara

Arda, M., Minbay N., Leloğlu, N., Aydın, N., Akay, Ö., Kahraman, M., Ilgaz, A., İzgür, M., Diker, K.S. (1997), Özel Mikrobiyoloji. Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar, Medisan Yayınevi, Ankara

Attardi, G. And Amaldi, F. (1970): Structure and synthesis of ribosomal RNA Ann. Rev. Biochem., 39: 183-226

Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas A.A.G. & Kadota, S. (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. Journal of Ethnopharmacology, 72(1), 239-246.

Basim E, Basim H ve Özcan M (2006). Antibacterial Activity Of Turkish Polen And Propolis Extracts Against Plant Bacterial Pathogens. Journal of Food Engineering, 77: 992-996.

Başak E. (2017). Yara, iyileşme süreci ve yara tedavileri, <https://www.medikalakademi.com.tr/yara-iyileşme-yaralanma-tedavi/> Erişim tarihi: 16.09.2017.

Biray Ç, Gündüz C, Yılmaz B, Şahin F ve Topçuoğlu N, (2006). Propolis ve Etken Maddelerin Olan Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) ve Sinamik Asitin, İnsan T 51 Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Hücre Dizisi (CCRF-CEM)' de Sitotoksik ve Apoptotik Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Ege Tıp Dergisi, 45(2): 83-92.

- Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O ve Savoia D (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol*. 31(2):174-7.
- Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O., & Savoia, D. (2000). In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in applied microbiology*, 31(2), 174-177.
- Braun, W. (1965) *Bacterial Genetics*. Second ed. W.B. Saunders Comp., Philadelphia
- Breu, W., & Dorsch, W. (1994). *Allium cepa L.(Onion): Chemistry, analysis and pharmacology*. *Economic and medicinal plant research*, 6, 116-116.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, 36(4), 347-363.
- Can Z. Akut yarannın fizyolojisi. Yormuk E. Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi, Ankara: Antıp A.Ş. Yayınları, 2001: 25-39
- Castagnoli, C., Stella, M., Magliacani, G., Ferrone, S., & Richiardi, P. M. (1994). Similar ectopic expression of ICAM-1 and HLA class II molecules in hypertrophic scars following thermal injury. *Burns*, 20(5), 430-433.
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, S1-S6.
- Chen, M. A., & Davidson, T. M. (2005). Scar management: prevention and treatment strategies. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 13(4), 242-247.
- Clark, R. A. (1993). Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *The American journal of the medical sciences*, 306(1), 42-48.
- Cockbill S. (2002). Wounds the healing process. *Hospital Pharmacist*, 9: 255-260.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. (1999). Acute and Chronic inflammation. Chapter 3. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th Ed., Philadelphia: W.B. Saunders Corp., pp. 50-89,
- Çolak, E., (2011). Karbon Tetrakloridin (CCl₄) indüklediği karaciğer hasarı ve oksidatif stres üzerine *Cynara scolymus L.* yaprağı ekstraktının etkileri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Da-Costa, C. C., & Pereira, R. G. (2002). The influence of propolis on the rheological behaviour of pure honey. *Food chemistry*, 76(4), 417-421.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F.(1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*.13(8):795-808. Review.
- Aksoy Z ve Dığrak M (2006). Bingöl Yöresinden Toplanan Bal ve Propolisin Antimikrobiyal Etkisi Üzerinde in vitro Araştırmalar. *Fırat Ü. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*. 18 (4): 471-478.
- de Bentzmann, S. & Plésiat, P., 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1655- 1665.
- Deniz Ç, 2010: Yara iyileşmesinde bitki reçinesi olan sığla yağı (*liquidambar orientalis*) ile kollagenaz içeren pomadların karşılaştırılması, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.
- Diaz, N. J., Quevedo Alvarez, O., & Saucedo, B. L. (1997). Determination of Fe, Mn, Zn and Cu in an ethanolic extract of Cuban propolis. *Rev. Cienc. Quim*, 28, 93-95.
- Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9(1), 283-289.

Dinçoğlu, A. H. Ve Karacal-Temamoğulları F. (2010). Farmacological and toksicological effects of Onion. *Veterinary Sciences*, 5(1), 31-35.

Doğantürk, S. (2017). Yara İyileşmesi, <http://www.geocities.ws/sinandoganturk/yiyles.html> Erişim tarihi :15.09.2017.

Dyakov, R., Petrova, M., Tzolova, N., Argirova, M., & Hadjiiski, O. (2002). Treatment of superficial burns, post-burn scars, and keloids with Contractubex® gel. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 15(2), 70-74.

Ehrlich, H. P., Desmoulière, A., Diegelmann, R. F., Cohen, I. K., Compton, C. C., Garner, W. L., Kapanci, Y. and Gabbiani, G. (1994). Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *The American journal of pathology*, 145(1), 105.

Eker M.M. (2017). Soğan sarımsak hastalık ve zararlıları ile mücadele, https://www.tarim.gov.tr/GKGM/Belgeler/Bitki%20Sa%C4%9Fl%C4%B1%C4%9F%C4%B1%20Hizmetleri/hastalik_zararlilari_ile_m%C3%BCcadele_dokumanlari/sogan-sar%C4%B1msak.pdf Erişim :15.09.2017

Elias, J. A., Rossman, M. D., & Daniele, R. P. (1982). Inhibition of Human Lung Fibroblast Growth by Mononuclear Cells 1–3. *American Review of Respiratory Disease*, 125(6), 701-705.

Erbil Y. (2002). Yara iyileşmesi, Genel Cerrahi Cilt 1. (Ed: Kalaycı G). Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara: 51-60.

Eryılmaz M (1996). Ratlarda iki droglu kemoterapi uygulama protokolünün perioperatif dönemde yara iyileşmesi üzerine etkileri. *Gülhane Askeri Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Ankara.*

Fıncıoğulları, R. (2006). Hipertrofik skar hastalarında Extractum Cepae topikal jel tedavisinin tgf-beta seviyelerine etkisi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi.

Garner, W. L. (1998). Epidermal regulation of dermal fibroblast activity. *Plastic and reconstructive surgery*, 102(1), 135-139.

George-Broughton, I. I., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). A brief history of wound care. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7S), 6S-11S.

Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee world*, 60(2), 59-84.

Green, K. A., Almholt, K., Ploug, M., Rønø, B., Castellino, F. J., Johnsen, M., Bugge, T. H., Rømer, J. and Lund, L. R. (2008). Profibrinolytic effects of metalloproteinases during skin wound healing in the absence of plasminogen. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(8), 2092-2101.

Hamdy, M. H., El-Banby, M. A., Khakifa, K. I., Gad, E. M., & Hassanein, E. M. (1989). antimicrobial effect of honey in the management of septic wounds. In *Proceedings of the Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates*, Cairo, Egypt, 6-10 November 1988, Egypt, pp. 61-67.

Harris, R. J., Symon, L., Branston, N. M., & Bayhan, M. (1981). Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischaemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1(2), 203-209.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, R.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. ISBN: 0-683-00603-7.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, R.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. ISBN: 0-683-00603-7.

<https://tr.khanacademy.org/science/health-and-medicine/current-issues-in-health-and-medicine/antibiotics-and-antibiotic-resistance/a/what-is-antibiotic-resistance>

Kaltalıoğlu, K. (2012). Trombosit kökenli büyüme faktörü'nün yara dokusu oksidatif olayları üzerine etkileri, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Kapan, M. (2006). Yara iyileşmesinde lokal fenitoin (%1) ve üre (%10) uygulamasının etkilerinin karşılaştırılması. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, Ankara.

Kartal M, Yıldız S, Kaya S, Kurucu S ve Topçu G (2003). Antimicrobial Activity of Propolis Samples from Two Different Regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86: 69–73.

Kaya, S. ve Bilgili, A., (2001). Tıbbi Bitkiler ve Kullanılmaları. 20-45. Alınmıştır.. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. S, Kaya, İ. Pirinççi ve A. Bilgili. Editörler. Cilt 1. Baskı 2. Medisan. Ankara.

Kaynaş, K., Ertan, Ü., 1986. Bazı soğan (*Allium cepa* L.) çeşitlerinin hasat sonrası fizyolojisi üzerinde çalışmalar. *Bahçe* 15: 35-46

Kılıçoğlu, B., Kılıçoğlu, S.S., Eren, Ç.V. (2005). Gastrointestinal sistemde yara iyileşmesi Süleyman Demirel üniversitesi, Tıp Fakültesi dergisi, 12(1), 67-76.

King, L. (2001). Impaired wound healing in patients with diabetes. *Nursing Standard*, 15(38), 39-45.

Knighton, D. R., Hunt, T. K., Scheuenstuhl, H., Halliday, B. J., Werb, Z., & Banda, M. J. (1983). Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science*, 221(4617), 1283-1285.

Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., & Salih, B. (2002). Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 78(2), 213-217.

Komesu, M. C., Tanga, M. B., Buttros, K. R., & Nakao, C. (2004). Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*, 11(2), 63-67.

Konuk M.(2015) <http://www.hemsireaktuel.com/HaberDetay.aspx?HaberId=14215> Erişim tarihi : 24.09.2017

Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64 : 235–240.

Kumova, U. (2002). Önemli bir arı ürünü: propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2002(2), 10-23.

Kuranel .E. (2012). *Plantago lanceolata* bitkisinin yara iyileştirici özelliklerinin araştırılması, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

Kurt, Y. (2001). Bombesin ve hiperborik oksijenin yara iyileşmesi üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi. İstanbul.

LaVan, F. B., & Hunt, T. K. (1990). Oxygen and wound healing. *Clinics in plastic surgery*, 17(3), 463-472.

Lawrence, W.T. (1998). Physiology of the acute wound. *Clin Plastic Surg.* 25 (3): 321-340.

Lina, G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch, F ve Etienne J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among *Staphylococci*. *American Society for micr., Antimicrob Agents Chemotherapy*, 43:1062-1066.

Lowry, S. F. (1993). Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Archives of Surgery*, 128(11), 1235-1241.

Lu LC, Chen YW, ve Chou CC (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 213–220.

- Mahmoud, K. Z., Edens, F. W., Eisen, E. J., & Havenstein, G. B. (2004). Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 137(1), 35-42.
- Majewski, S., & Chadzynska, M. (1988). Effects of heparin, allantoin and cepae extract on the proliferation of keloid fibroblasts and other cells in vitro. *Posterpräsentatio MS*, (330/P16), 24-29.
- Majiene D, Trumbeckaite S, Pavilonis A, Savickas A ve Martirosyan DM (2007). Antifungal and Antibacterial Activity of Propolis. *Current Nutrition & Food Science*, 3: 304-308.
- Mandelbaum, S.H., Di Santis, É.P., Mandelbaum M.H.S. (2003) Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I, *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 78(4):393-410.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83-99.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83-99.
- Mirzoeva, O. K., & Calder, P. C. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55(6), 441-449.
- Monaco, J. L., & Lawrence, W. T. (2003). Acute wound healing: an overview. *Clinics in plastic surgery*, 30(1), 1-12.
- Mouës, C. M., Van Toorenenbergen, A. W., Heule, F., Hop, W. C., & Hovius, S. E. (2008). The role of topical negative pressure in wound repair: expression of biochemical markers in wound fluid during wound healing. *Wound repair and regeneration*, 16(4), 488-494.
- Niessen, F. B., Spauwen, P. H., Schalkwijk, J., & Kon, M. (1999). On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plastic and reconstructive surgery*, 104(5), 1435-1458.
- Özan, M., 1996. Ankara garnizonundaki askeri birliklerin içme sularında membran filtrasyon tekniği ile *Pseudomonas aeruginosa* 'nın izolasyonu ve identifikasyonu üzerine araştırmalar. A.Ü. Sağlık Bil. Ens. Bilim Uzmanlığı (Yüksek Lisans) Tezi, Ankara
- Özen T, Kılıç A, Bedir O, Koru Ö, Sorkun K, Tanyüksel M, Kılıç S, Gençay Ö, Yıldız O ve Baysallar M (2010). In Vitro Activity of Turkish Propolis Against Anaerobic Bacteria Causing Oral Infections. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 16 (2): 293-298.
- Özmen, O., 1991. Orta Anadolu Bölgesi 'nde önemli soğan depolarının bulunduğu Afyon, Nevşehir ve Yozgat illerinde depo çürüklüğüne neden olan fungal etmenlerin tanımları, zarar şekilleri, patojenisiteleri ve korunma yolları. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Park, Y. K., Ikegaki, M., Abreu, J. D. S., & Alcıcı, N. M. F. (1998). Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18(3), 313-318.
- Paul M. Glat PM, Longaker MT. Wound Healing. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CH.
- Pekcici Çuhadar S.F. ve Haliloğlu S. (2012). Kobaylarda vitamin C ve vitamin E uygulamalarının yara iyileşmesi ve doku mineral madde düzeyleri üzerine etkileri. *Eurasian J Vet Sci*, 28 (2), 87- 93.
- Peled, Z. M., Chin, G. S., Liu, W., Galliano, R., & Longaker, M. T. (2000). Response to tissue injury. *Clinics in plastic surgery*, 27(4), 489-500.
- Pereira, A. D., de Andrade, S. F., de Oliveira Swerts, M. S., & Maistro, E. L. (2008). First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food and chemical toxicology*, 46(7), 2580-2584.

- Podschun, R. ve Ullmann, U. (1998) *Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors*, Clin Microbiol Rev. , 11(4): 589–603
- Polat G, Koçan D. Propolis ve Antimikrobiyel Etkisi. Türkiye 9. Gıda Kongresi. 2006.
- Pollard, T. D., & Earnshaw, W. C. (2004). Cell biology, Saunders-Elsevier, ISBN 0-7216-3360-9.
- Postgate, J., 1998. Nitrogen Fixation (3rd ed.). Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-64047-3.
- Postlethwaite, A. E., Lachman, L. B., Mainardi, C. L., & Kang, A. H. (1983). Interleukin 1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts. Journal of Experimental Medicine, 157(2), 801-806.
- Prytyk, E., Dantas, A. P., Salomão, K., Pereira, A. S., Bankova, V. S., De Castro, S. L., & Neto, F. R. A. (2003). Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. Journal of Ethnopharmacology, 88(2), 189-193.
- Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M. & Triplett, E.W., 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. Australian Journal of Plant Physiology, 29(8), 829-836.
- Sahin MT, Inan S, Ozturkcan S, Guzel E, Bilac C, Giray G, Muftuoglu S (2012) Comparison of the effects of contractubex® gel in an experimental model of scar formation in rats: an immunohistochemical and ultrastructural study. J Drugs Dermatol., 11(1):74–81.
- Santos FA, Bastos EMA, Uzeda M, Carvalho MAR, Farias LM, Moreira ESA ve Braga FC (2002). Antibacterial activity of Brazilian Propolis and Fractions Against Oral Anaerobic Bacteria. Journal of Ethnopharmacology , 80: 1-7.
- Scazzocchio F, D’Auria FD, Alessandrini D ve Pantanella F (2006). Multifactorial Aspects of Antimicrobial Activity of Propolis. Microbiological Research, 161: 327- 333.
- Schmidt, J.O. (1996). Bee products, Chemical, Composition and Application. In Mirzahi, A., Lensky, Y., eds. Bee Products, Properties, Applications and Apitherapy. New York; Plenum Pres, Vol.15:pp.16–21.
- Semiramis kutluca , Ferhat genç , ali korkmaz Samsun İl Tarım Müdürlüğü, Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayını samsun 2008
- Seven İ, Aksu T ve Seven PT (2007). Propolis ve Hayvan Beslemede Kullanımı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi., 18 (2): 79-84 s.
- Sezgin, S. (2012). Protefix ve propolisin atlarda deneysel olarak oluşturulan yaralarda iyileşme sürecine olan etkilerinin karşılaştırılması, Genelkurmay Başkanlığı, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dişhekimliği Bilimleri Merkezi, Ağız Diş Ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Silici S ve Kaftanoğlu O (2003). Antimicrobial Analysis of Propolis Samples from Different Regions in Turkey. Uludag Arıcılık Dergisi: 3 (3): 16-18.
- Silver, L. L. (2011). Challenges of Antibacterial Discovery. Clinical Microbiology Reviews, 24(1), 71–109. doi:10.1128/CMR.00030-10
- Smith, J. W., Aston, S. J., Beasley, R. W., & Thorne, C. (1997). Grabb and Smith's plastic surgery. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. Pp. :3-12.
- Stadelmann, W. K., Digenis, A. G., & Tobin, G. R. (1998). Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. The American Journal of Surgery, 176(2a Suppl), 26-38.
- Şen, A. ve Halkman, A.K. (2006) Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 4(2): 2-13
- Tatçı Ç. (1999). Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Denizli.

- Tayyar M ve Hecer C. (2013). Gıda Mikrobiyolojisi 3. Baskı. Dora Basım-Yayım Dağıtım, Bursa
- Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., & Bruni, A. (1996). Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy research*, 10(4), 335-336.
- Trott, A. (1997). *Wound and lacerations*, Mosby Inc., USA, 20-38.
- Vorauer- Uhl, K., Fürnschliel, E., Wagner, A., Ferko, B., & Katinger, H. (2002). Reepithelialization of experimental scalds effected by topically applied superoxide dismutase: controlled animal studies. *Wound repair and Regeneration*, 10(6), 366-371.
- WHO (1999). *Monographs on selected medicinal plants*. World Health Organization.
- Wolfort, S. F., Reiken, S. R., Berthiaume, F., Tompkins, R. G., & Yarmush, M. L. (1996). Control of hypertrophic scar growth using antibody-targeted photolysis. *Journal of Surgical Research*, 62(1), 17-22.
- Yormuk, E. (2001). *Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi*, ANTIP A. Ş. Yayınları, Ankara, ISBN 975-7226-20-3, s. 25-39.
- Zago, A. & Chugani, S., 2009. *Encyclopedia of Microbiology; Pseudomonas*. (Ed. Schaechter, M.). ISBN: 978-0-12-373944-5.
- Zumla, A., & Lulat, A. (1989). Honey--a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82(7), 384-385.