

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI

**PROPOLİS'İN KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Fatih ÖZAN

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Hasan YELER

HAZİRAN, 2006

SİVAS

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iii
TABLolar DİZİNİ.....	iv
RESİMLER DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KIRIK İYİLEŞMESİ.....	3
2.1.1. KIRIK İYİLEŞMESİNİN EVRELERİ.....	3
2.1.2. KIRIK TİPLERİ VE SINIFLANDIRMA.....	9
2.1.3. KEMİK İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	10
2.2. PROPOLİS.....	12
2.2.1. PROPOLİS'İN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	13
2.2.2. PROPOLİS'İN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ.....	15
2.2.3. PROPOLİS'İN BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	16
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. PROPOLİS ÖZÜTÜNÜN HAZIRLANMASI.....	20
3.2. PROPOLİS İÇERİĞİNİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ (TLC) İLE BELİRLENMESİ.....	21
3.3. RADYOLOJİK İNCELEME.....	23
3.4. HİSTOLOJİK İNCELEME.....	23
3.5. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ.....	24

4. BULGULAR.....	25
4.1. RADYOLOJİK BULGULAR.....	25
4.1.1. KALLUS ALANI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI.....	25
4.1.2. KEMİK MİNERAL DENSİTE DEĞERLENDİRME SONUÇLARI..	27
4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	33
4.3. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ (TLC) SONUÇLARI.....	46
5. TARTIŞMA.....	48
SONUÇLAR.....	56
ÖZET.....	58
SUMMARY.....	59
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	77
TEŞEKKÜR.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Her bir bileşen için hesaplanan R_f değerlerinin gösterilmesi.47

Şekil 2. Bazı saf bileşenler (B.A.= Benzoik Asit; F.A.= Ferulik Asit; p-com= Para kumarik asit; C.A.= Kafeik Asit; Qer= Quersetin) ve Propolisin TLC tabakası üzerinde karşılaştırılması.....47

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Gruplara ait kallus alanı ortalama değerleri.....	26
Tablo 2. Gruplara ait kallus matriks densite ortalama değerleri.....	28
Tablo 3. Kontrol grubunda haftalara göre damarlanma belirginliğinin.....	41
karşılaştırılması.	
Tablo 4. Kontrol grubunda haftalara göre osteoblastik aktivitenin karşılaştırılması.	41
Tablo 5. Propolis grubunda haftalara göre damarlanma belirginliğinin	
karşılaştırılması.....	42
Tablo 6. Propolis grubunda haftalara göre osteoblastik aktivitenin karşılaştırılması.	42
Tablo 7. Kontrol grubu ile Propolis grubu arasında damarlanma belirginliğinin	
karşılaştırılması.....	43
Tablo 8. Kontrol grubu ile Propolis grubu arasında osteoblastik aktivitenin.....	43
karşılaştırılması.	
Tablo 9. Gruplara ait 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 28. gün damarlanma belirginliği	
sonuçlarının karşılaştırılması.....	44
Tablo 10. Gruplara ait 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 28. gün osteoblastik aktivite	
sonuçlarının karşılaştırılması.....	45

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Kontrol grubuna ait kırık hattının 4. haftadaki üç boyutlu görüntüsü.....	33
Resim 2. Kontrol grubuna ait 4. haftada kırık hattında meydana gelen kallus.....	34
Resim 3. Propolis grubuna ait kırık hattının 4. haftadaki görünümü.....	35
Resim 4. Propolis grubuna ait 4. haftada kırık hattında meydana gelen kallus alanı.	36
Resim 5. Kontrol grubu 7. günde kırık hattının görünümü.....	37
Resim 6. Kontrol grubu 14. günde kırık hattının görünümü.....	38
Resim 7. Kontrol grubu 21. günde kırık hattının görünümü.....	39
Resim 8. Kontrol grubu 28. günde kırık hattının görünümü.....	40
Resim 9. Propolis grubu 7. günde kırık hattının görünümü.....	41
Resim 10. Propolis grubu 14. günde kırık hattının görünümü.....	42
Resim 11. Propolis grubu 21. günde kırık hattının görünümü.....	43
Resim 12. Propolis grubu 28. günde kırık hattının görünümü.....	44

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oral ve maksillofasiyal cerrahide kemik dokusu çalışma sahasının temelini oluşturmaktadır. Diş çekimi, gömülü diş ameliyatları, büyük iltihabi lezyonlar, kist ve tümör eksizyonları sonrası oluşan büyük defektlerin rekonstrüksiyonunda, ortognatik cerrahi, distraksiyon osteogenezisi gibi operasyonlarda, travmatik ve patolojik nedenlere bağlı olarak oluşan çene kemiği kırıklarında, kemiğin komplikasyonsuz ve kısa sürede iyileşmesi, tedavinin başarısında büyük öneme sahiptir. Kemik iyileşmesi sırasında oluşabilecek komplikasyonların en sık görüldüğü dönem, dolayısı ile en kritik iyileşme dönemi, ilk ossifikasyonun olduğu operasyon sonrası birinci aydır. Bu kritik dönemde uygulanacak tedavi programının oluşturabileceği olumlu ya da olumsuz etki, cerrahi işlemin başarısını doğrudan etkileyecektir. Bu nedenlerle kemik iyileşmesini hızlandırmak ve travmatize olmuş dokunun olabildiğince normal haline gelebilmesini sağlamak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Kemik iyileşmesine olumlu ya da olumsuz yönde etki eden pek çok lokal ve genel faktör bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kemik iyileşmesi üzerine etkili olan faktörler arasında serbest radikallerin de bulunduğunu göstermektedir. Biyolojik etkileşimlerin en yoğun gözlemlendiği kırık iyileşmesinin erken döneminde serbest radikallerin meydana geldiğini ve bu radikallerin kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır.

Apiterapi, arı ürünlerinin bir ya da birden fazla hastalığın önlenmesi ya da iyileştirilmesi amacıyla kullanılması şeklinde tanımlanmaktadır. Uzakdoğu ülkelerinde başlayan ve dünyada hızla gelişen arı ürünleri ile tedavi yöntemleri hızla

yaygınlaşmaktadır. Başta Japonya, Doğu Asya ülkeleri, Amerika, Kanada gibi ülkelerde apiterapi merkezleri kurulmuştur.

“Propolis, işçi arıların bitkilerin filiz ve çiçeklerinden topladığı reçinemi maddeleri ve bitki salgılarını başlarında bulunan bezler tarafından salgılanan enzimlerle biyokimyasal değişikliğe uğratarak oluşturdukları kirli sarıdan koyu kahverengine kadar değişen renkte ve oda sıcaklığında yarı katı halde olan bir maddedir” şeklinde tanımlanmıştır.¹ Propolis arıların bitki tomurcuk ve filizlerinden topladığı çok kuvvetli antiviral, antibakteriyel, antifungal etkiye sahip yapışkan organik bir maddedir.^{2,3} Arılar kovan içerisindeki besinleri, yavruyu ve kendilerini çeşitli mikroplardan (virüsler, bakteriler, mantarlar) korumak için propolis toplarlar ve bununla kovanın içerisini dezenfekte ederler.² Propolis’in yapısında bulunan ve büyük önem taşıyan flavonoidler ve terpenler oldukça kuvvetli antioksidan etkili bileşiklerdir.

Propolis’in tıbbi alanda kullanımı çok eski çağlara uzanır. Propolis’in vazelinle karıştırılarak, hazırlanan merhemlerin Boer savaşları sırasında kullanıldığı, yaraları iyileştirdiği belirtilmektedir.⁴ Propolis, Mısır uygarlığında da ölümlerin mumyalanması amacıyla kullanılmıştır.⁴ Anadolu’da ise geleneksel olarak insanlarda ve çiftlik hayvanlarında ayak ve deri problemlerinde, yaraların iyileştirilmesinde ve çıbanlarda kullanılmıştır.

Yaptığımız literatür taraması sonucunda propolisin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanılmadı. Propolisin antioksidan ve yara iyileşmesini hızlandırıcı etkileri olması nedeniyle kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olabileceği düşünülerek böyle bir çalışmanın yapılması planlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KIRIK İYİLEŞMESİ

Dıştan veya içten gelen zorlamalarla kemik dokusunun ayrılmasına, kemiğin anatomik bütünlüğünün ve devamlığının bozulmasına kırık denir.⁵ Kırık iyileşmesi inflamasyon, tamir (proliferasyon) ve yeniden şekillenme aşamaları sonrasında travmatize kemiğin orijinal hale dönmesi olarak tanımlanmaktadır.⁶ Kırık iyileşmesi kırığın oluştuğu anda başlamakta ve olgun, organize kemik dokusu ile kemik uçları bütünleşinceye kadar devam etmektedir.⁷

Kırık oluşumu, kemik ve çevresindeki kas, tendon, ligament, damar, sinir gibi yumuşak dokuları içeren kompleks bir doku zedelenmesine yol açmaktadır.^{8,9} Kırıktan hemen sonra ve onarım fazı süresince lokal dolaşım bozukluğu ve lokal inflamasyonun belirtileri açık bir şekilde görülmektedir. Kırık oluşumu ile birlikte, lokal dolaşım bozukluğu, inflamasyon, ağrı, eklemlerin ve kasların disfonksiyonunu da içine alan bu durum kırık hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Kırık iyileşmesindeki kalıcı bozuklukların, kötü birleşme (malunion) veya birleşmeme (nonunion) gibi kemik iyileşmesi sürecinde karşılaşılabildiği muhtemel durumların kırık hastalığına bağlı olarak geliştiği belirtilmektedir.¹⁰

2.1.1. KIRIK İYİLEŞMESİNİN EVRELERİ

Kırık iyileşmesi dönemleri klasik olarak Cruess'un¹¹ 1975'te tanımladığı 3 dönemden oluşmaktadır:

1. İnflamatuar dönem,
2. Tamir dönemi,
3. Yeniden şekillenme dönemi.

Histolojik olarak iyileşme sürecindeki evreler birbirinden zaman olarak kesin sınırlarla ayrılamamaktadır. Bu üç dönem birbirinin içine girmiş bir şekildedir ve her evre daima kendinden bir önceki veya bir sonraki evre içinde bulunmaktadır.^{5,11,12} En kısa dönem inflamatuvar dönem iken en uzun dönem yeniden şekillenme dönemidir.⁵

2.1.1.A. İnflamatuvar Dönem (1-5 gün)

Tüm doku travmalarında ve kırıklarda, ilk verilen cevap inflamasyondur.^{13,14} İnflamasyon dönemi, kırık iyileşmesi için gerekli temel öğeleri içeren kırık hematomunun ilk oluşumu ve organizasyonunun başlangıç dönemidir.^{5,15,16}

Yaralama sonucunda zedelenme bölgesindeki hücreler, lokal ve sistemik uyarılara karşı duyarlı hale gelmekte, bu hücrelere karşı çeşitli biyokimyasal ve biyofiziksel uyarılar oluşmaya başlamaktadır.¹⁷ Travmanın şiddetine bağlı olarak, kırık uçlarının komşuluğundaki periost ve çevre yumuşak dokular yırtılarak damarlar yaralanmaktadır. Kanamanın durmasını ve pıhtılaşmayı sağlamak için trombositlerin ve trombotik faktörlerin toplanmasıyla moleküler araçlar yaralanma bölgesine salınmakta ve kanın pıhtılaşması ile kırık uçları arasında hematom oluşmaktadır.^{5,11,12} Bu hematom kırık uçlarını ilk aşamada bir arada tutan bir köprü görevini görmektedir.^{5,18}

Kırık oluştuktan sonra geçici bir arteriyoler konstriksiyonu; arteriyol, kapiller ve venüllerin vazodilatasyonu izlemektedir.^{13,14} Bu cevap trombositlerden, ölü ve yaralanmış hücrelerden açığa çıkan inflamatuvar mediatörlere, mast hücreleri ve bazofillerden salınan histamine bağlıdır.^{5,13} Vazodilatasyonla birlikte kan akımı ve kapiller membran permeabilitesinde artış görülmektedir.^{5,6,13} Vazodilatasyon ve plazma eksudasyonuna bağlı olarak, kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem ve kemotaksis oluşmakta, nötrofiller, makrofajlar ve lenfositler ödemli bölgeye göç ederek kırık

alanına hakim olmaktadır. Sirkülasyonda bol miktarda bulduklarından dolayı ilk göç eden hücreler polimorfonükleer lökositler (PMNL) olup bu hücreleri makrofaj ve lenfositler takip etmektedir.^{19,20,21}

Komşu havers sistemleri arasında fazla anastomoz olmadığından, kırık hattının her iki tarafında belirli bir mesafeye kadar olan bölgede dolaşım durmaktadır.²⁰ Kırık bölgesindeki şişlik ve iskemi sonucu bu bölgedeki beslenme bozulmakta ve kemik hücreleri ölmeye başlamaktadır.⁵ Kemik ve yumuşak dokularda travmanın etkisi ile oluşan iskemi, prostaglandinler gibi mediatörlerin salınımı ve ölü hücrelerden açığa çıkan toksinler nedeni ile nekrotik alan genişlemektedir.^{13,17,20} Nekrotik kemik uçlarından ve kırık hematomunda bulunan ölü hücrelerden salınan inflamatuvar mediatörler kapiller membran permeabilitesini artırarak inflamatuvar hücrelerin kırık bölgesine gelmesine yol açmaktadır. İnflamatuvar hücreler nekrotik dokuları rezorbe ederken, aynı zaman nekrotik kemiğin ortadan kaldırılmasından sorumlu olan osteoklastlar da görülmeye başlamakta²² ve sonrasında fibroblastlar bölgede belirerek yeni matriks üretimi ile tamir dönemi başlatmaktadır.^{5,23}

Defekt bölgesinde oluşan kan pıhtısı, bölgede fibrin ağı, fibroblast ve yeni kapiller yapıların gelişimine imkan sağlayan bir iskelet görevi üstlenerek organize olmaya başlamakta ve hematoma 48 saat içinde organize olup fibrinden zengin bir yapı oluşturmaktadır.²⁰ Fibroblastlar, mezenşimal hücreler, osteoprogenitör hücreler, yeni oluşan kapillerler de kırık alanında görülmeye başladıktan sonra, fagositer hücreler ve lizozomal mekanizmalarla nekrotik dokular uzaklaştırılmakta ve kırık uçları arasındaki granülasyon dokusu şekillenmektedir.²² Bu dönemde fibrin ağından kemik yapımı için hücre çoğalması başlamakta ve fibrin matriksi içindeki öncü hücreler, çeşitli

biyokimyasal etkilerle değişik dokuları oluşturmak için farklılaşmaya hazır bulunmaktadır.²⁰ İnflamatuvar dönem, kırık ve kemik elemanlar görülene kadar sürmekte ve günlerce devam etmektedir.^{5,13}

2.1.1.B. Tamir Dönemi (4-40 gün)

Tamir evresi, kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7–12 gün sürmektedir.^{5,13} Tamir evresinin ilk basamağı hematoma organize olmasıdır. Lokal mekanizmalarla uyarılan öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, hücrelerarası madde, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmaya ve düzenlenmeye başlamaktadır.²⁰ Onarım mekanizmasında rol oynayan hücreler mezeneşimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip hücrelerdir. Çoğunlukla kırık bölgesindeki granülasyon dokusu içinden, ayrıca periosteumun osteojenik tabakası ve daha az olarak endosteumdan köken almaktadırlar. Bu hücreler farklılaşmaya başladığında, ilk değişikliğe uğrayan hücreler, kılcal damarlarla hematoma içine giren fibroblastlardır. Fibroblastlar kollajen sentezlerken, kondroblastlar kollajen ve glukozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoid oluştururlar.^{12,24} İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içerdii kollajen miktarı ve tipi ile yakın ilişkidir.^{5,13} Tamir evresinin ilk zamanlarında kırık oluşumu (*kırık kallus*) öncelikli iken, daha ileri evrelerde kemik oluşumu (*kemik kallus*) belirginleşmektedir.^{5,11}

Kemik kalsifikasyonu, kollajen lifler üzerine kalsiyum fosfat kristallerinin birikmesi ile oluşmaktadır. Travmadan bir hafta sonrasına kadar kartilajinöz kemikleşme ve osteoid mineralizasyonu görülmemekte,¹³ bir hafta veya daha sonra yeni sentezlenmiş organik matriks mineralize olmaya başlamaktadır.⁵ Kırık bölgesinde minerallerin görülmeye başlaması ile kalsiyum hidroksiapatit kristallerinin organize

kollajen fibrillerin içinde ve etrafında toplandığı görülmektedir.^{11,12} Zamanla kırığın endosteum ve periostundan gelişen kalsifiye dokunun yoğunluğu artarak kalsifiye kemiği meydana getirmektedir. Radyolojik olarak kaynama kırık hattındaki kallusun mineralize olmaya başlamasından (10–21 gün) sonra görülmeye başlar. Bununla birlikte kallusun 20 günden sonra sertleşmeye başladığı görülmektedir.⁵

Oluşan ilk kallusun yeni kapiller ile tamamlanması 4–12. günler arasında gerçekleşmektedir.²⁵ Oluşmaya başlayan kan damarları 2–3 günde ışık mikroskopunda görünür hale gelmekte ve birinci haftada belirginleşmektedir.¹³ Kanla beslenmenin yeterli olması osteoblastların kallus içinde normal kemik gelişimine elverişli matriksi sağlamalarına yardım etmektedir.^{11,13} Kılcal damar gelişimi osteojenik hücre çoğalması kadar hızlı olmadığından, beslenmenin daha iyi olduğu kemiğe yakın seviyedeki osteojenik öncü hücreler veya fibroblastlar, osteoblastlara dönüşmektedir. Kemiğe yakın olmayan dolaşım yönünden fakir hücreler, bu bölgedeki kılcal damarların gelişim hızı, hücre çoğalmasının hızına uyum gösteremediğinden, kondroblast ve kondrosite dönüşerek kırık dokuyu oluşturmaktadır. Kanlanmanın yeterli olduğu bölgelerde osteoblast haline gelen hücrelerse kemik trabeküllerini oluşturmaktadır.²⁰

Yaralanmadan sonra kallus oluşması ve mineralizasyonu 4–16 hafta arasında süre gerektirir.^{20,24} Kallus oluşumuyla beraber kemikte kaynamanın oluştuğu söylenebilir. Bununla beraber, kaynama henüz son noktasına ulaşmış değildir. Tamir devresinin ortasında, kallusun gereksiz ve etkisiz kısımlarının geri emilimi ile yeniden şekillenme evresi başlamaktadır.²⁰

2.1.1.C. Yeniden Şekillenme Dönemi (25-100 gün)

Kırık iyileşmesinin en son ve en uzun süren dönemidir. Onarım döneminin sonlarında immatür kemiğin yerini lameller kemiğin alması ve gereksiz kallusun rezorpsiyonu ile yeniden şekillenme dönemi başlamaktadır.⁵ Kemik ve kallusun yavaş yavaş şekil değiştirmesi ile karakterize olup, kemik bu dönemde orijinal şeklini almaya başlamaktadır.⁵ Bu dönemde trabeküler kemik oluşmaya başlamakta, aynı zamanda osteoklastik rezorptif faaliyetler ile medullar kanal da kendine has trabeküler yapısını kazanmaya başlamaktadır.^{5,25} Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüştüğü dönemdir.^{11,20}

Yeniden şekillenme evresi için en önemli uyaran fiziksel strestir. 1892’de Wolf, kemik oluşumu ve işlev yani stres arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu kanuna göre, kemiğin işlevsel durumundaki değişiklik, dokuda yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüz ise negatif elektrikle yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin hakim olduğu konveks yüzde rezorpsiyon ve osteoblastik aktivitenin hakim olduğu konkav yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır.^{5,11,13}

Yeniden şekillenme dönemi tamir devresinin ortasında başlayıp, normalde 4–16 hafta sürmektedir.^{12,20} Bununla birlikte yapım ve yıkım olayları ile kırığın yeniden şekillenmesi klinik ve radyolojik kaynama tamamlandıktan sonra bile yıllarca sürebilmektedir.^{5,25}

2.1.2. KIRIK TİPLERİ VE SINIFLANDIRMA

Kırık tipleri şu şekilde sınıflandırılabilir: ^{8,9}

1. Kemik dokusunun sağlamlığına göre:

- Normal kemikte (Travmatik) kırık,
- Hastalıklı kemikte (Patolojik) kırık,
- Stres (Yorgunluk) kırığı,

2. Kırık hattının, kemiği çevreleyen deri ya da mukoza yoluyla dış ortamla ilişkide olup olmamasına göre:

- Kapalı kırıklar,
- Açık kırıklar,

3. Kırık oluşturan kuvvete göre:

- Direkt mekanizma ile olan kırıklar,
- İndirekt mekanizma ile olan kırıklar,
- Direkt ve indirekt mekanizma kombinasyonu ile olan kırıklar,

4. Kırık sayısına göre:

- Tek kırık hattı,
- Multiple kırık hattı,

5. Kırığın derecesine ve kırık hattına göre:

a. *Ayrılmış (deplase) kırıklar:*

- Transvers kırık,
- Oblik kırık,
- Spiral kırık,
- Kopma kırığı,

— Parçalı kırık,

b. Ayrılmamış (non-deplase) kırıklar:

— Çatlak (fissür, linear kırık),

— Yaş ağaç (green stick) kırığı,

— Torus kırığı,

— Çökme kırıkları,

— Kompresyon (sıkışma) kırıkları,

— Dişlenmiş (impakte) kırıklar.

2.1.3. KIRIK İYİLEŞMESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler lokal faktörler ve sistemik faktörler olmak

üzere sınıflandırılabilir:

1. Lokal Faktörler:^{5,9,11,20,24}

— Kemiğin tipi ve yapısı,

— Kırığın özellikleri,

— Kırık bölgesindeki pH, doku oksijen ve karbondioksit basınç değerleri,

— Kırık bölgesindeki kan dolaşımının durumu

— Egzersiz,

— Isı,

— Radyasyon,

— Elektrik akımı,

— Denervasyon.

2. Sistemik Faktörler: ^{5,9,11,20,24}

- Yaş,
- Beslenme durumu,
- Sistemik hastalıklar,
- Hiperoksi,
- Sigara ve alkol,
- Santral sinir sistemi travması,
- İlaçlar,
- Hormonlar.

2.2. PROPOLİS

İşçi arılar propolisi, bitkilerin özellikle tomurcuk ve sürgünlerinden toplarlar. Arı, propolisi toplamayı kararlaştırdığı bitkinin tomurcuklu kısmına konar. Arka ayakları ve üst çenesini kullanarak bir miktar zamksız sızıntıyı kopartır. Bu parça ağızda nemlendirilip yumuşatılarak ve bu sırada bazı enzimler eklenerek pelet haline getirilir. Pelet, ön ve orta bacakların yardımı ve bacak hareketleri ile arka bacaklardaki polen sepetçisine paketlenir. Polen sepetçisi yeteri kadar propolis ile doldurulduğunda kovana taşınır. Propolis genç işçi arılar tarafından 25–30 dakikada boşaltılır ve hemen gerekli yerde kullanılır. İşçi arılar bir seferinde ortalama 10 mg propolisi kovana taşıyabilir.²

Koloni başına propolis veriminin 50 ile 250 g arasında olduğu bildirilmektedir; ancak bunun 600 g'a kadar çıkarılabileceği ileri sürülmektedir. Üretilen propolisin temizliğini kontrol etmek için basit bir test yapılmaktadır. Sert ve katı haldeki propolis iyice ezildikten sonra bir miktar ılık su ile birlikte cam bir kavanozda iyice çalkalanır, yabancı maddelerin dibine birikmesi sağlanır.²

Propolis bileşimindeki majör ve minör bileşikler çevredeki floraya bağlı olarak değişebilmektedir. Propolisin toksik olmaması, başka ilaçlara göre önemli bir avantajdır. Buna karşın propolisin tam zararsız bir ilaç şekli olduğu da henüz kesin olarak tespit edilememiştir.

Günümüzde propolis dünya ticaretinde düzenli olarak alınıp satılan bir ürün haline gelmiştir. Propolisten üretilen kapsül, tablet, çiğnemek ya da içmek için hazırlanmış granül ilaçlar, boğaz pastilleri, diş macunları, çiklet gibi ürünleri Avrupa pazarlarında bulmak mümkündür.²

Propolisin toplanmasında sıcaklık derecesi önemli bir rol oynar. Yüksek sıcaklık dereceleri propolisi yumuşattığından toplanması, taşınması ve diğer kullanma ile ilgili işlemler kolaylaşır.²⁶ Arılar sabahın erken saatlerinde propolis toplamazlar. Genel olarak saat 10'dan sonra toplama işi başlar. Saat ilerledikçe ve sıcaklık derecesi arttıkça propolis toplama çalışmaları hızlanır. Tek arka ayakla veya her iki ayakla akşamüzeri, propolis taşıyan bu gibi arılar işaretlenmiş ve görülmüştür ki, ertesi gün tarlacı arı grubuna katılmakta ve öğlene kadar güneşlenmektedirler. Çünkü propolis yükünün boşaltılması için onu güneşte yumuşatmak gerekmektedir.²⁷

Bütün yaz mevsiminde propolis toplandığı belirtilmekle beraber en çok sonbaharda kovana propolis taşındığı belirtilmektedir. Çünkü soğuk kış mevsiminin başlamasından önce propolis ile yapılacak birçok tamirat, yapıştırma gibi işler vardır. Yine bir yılda propolis toplamak için uygun gün sayısı 50 civarındadır. Propolis toplanması için en uygun mevsim, nektar alımının olmadığı yaz sonu ve sonbahardır.

Arı kolonisinin mikroplara karşı kendilerini koruyabilmeleri ürettikleri antibiyotiklere bağlı değildir. Bu onların en etkin bir şekilde bu konu ile ilgili bitkileri seçme imkânlarına bağlıdır. Bir başka deyişle aktif propolis taşıyıcı bitkileri bulmalarına bağlıdır.

2.2.1. PROPOLİS'İN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

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, sinnamik asit ve türevleri benzoik asit, sinaptik ve izoferulik asitler, çeşitli aldehitler, ketonlar ve eser elementler, kleredon, diterpenler, seskiterpenler ve tripenler (özellikle de steroidler).^{28,29,30,31}

Propolisin temel komponentlerinin flavonoitler olduğu tespit edilmiştir.³¹ Propolisin flavonoit yapısı toplandığı bitkiye bağlı olarak bazı farklılıklar da gösterebilmektedir. Propoliste bulunan bütün komponentlerden flavonoitlerin oranı %25'in üzerindedir. Flavonoitler polifenolik bileşiklerdir.³² Serbest radikal temizleme özelliklerinden dolayı antioksidandırlar ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederler.^{32,33} Alternatif olarak metal şelat oluşturmalarından ötürü de antioksidan olabilecekleri belirtilmektedir.^{32,34}

Propolisin içerdiği mineral maddeler şunlardır: Mangan, çinko, barit, titan, bakır, kurşun, nikel, kobalt, wanadyum, krom, kalay (0-110,60 mg/100g), kalsiyum, fosfor, potasyum, kükürt, sodyum, klor, demir, magnezyum, molibden, alüminyum, silisyum, civa, selen, sirkonyum, flor, antimon.³⁵ Mangan ve çinkonun miktarlarının başka elementlerle mukayese edildiğinde çok daha yüksek miktarlarda olduğu ifade edilmiştir.³⁵

Propoliste vitaminlerin miktarları düşüktür ve çok değişkenlik gösterirler. Propolis B₁, B₂, B₆, C, E, nikotinik ve pantotenik asit vitaminlerini içermektedir.³⁵

Propolis serin, glikol, aspargin ve glutamik asitleri, alanin, triptofan, fenilalanin, levsin, sistin, lizin, histidin, arginin, prolin, trionin olmak üzere 8–17 kadar aminosit ihtiva etmektedir. Vahonina³⁶ arıların propolisi bitkilerden toplarken tükürük bezlerinden salgılanan maddelerin propolise karıştığına işaret etmiştir. Bu maddeler ise bazı doymamış yağ asitleri ve 10 hidroksi-2 dekononiktir. Bu madde arıların mandibular bezlerinden salgılanır ve arı sütünün temel yapı taşıdır; bu maddelerin propolisteki miktarı %7,2'dir.³⁶

Propolisin yapısında bulunan ve buraya kadar gösterilen maddeler propolis mekanik karışımlardan ve balmumundan temizlendikten sonra tespit edilmiştir.

2.2.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin rengi reçinemsi bir madde olarak sarı yeşilden kahverengiye veya koyu kırmızıya değişir. Depolama esnasında kararmakta, güneş ışınlarının etkisiyle ise elastikiyetini kaybetmektedir. Sıcaklık 15⁰C'nin altına düştüğünde ise sertleşir ve kolayca kırılabilen gevrek bir kitle haline gelir. Erime derecesi 80 ile 105⁰C arasında değişir.

Propolis suda çok az çözünür, genellikle alkolde (etanol, metanol) çözünür, çok az miktarda hidrokarbonlarda çözünür. Eter ya da kloroformda tamamen çözünür.²⁸ 65,5 ⁰C'de yumuşar, düşük oda sıcaklığında gevrekleşir.³⁷

2.2.3. 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,³⁸⁻⁴¹ antiviral,^{42,43} antifungal,^{44,45} antiinflamatuvar,⁴⁶⁻⁴⁸ antihepatotoksik,^{49,50} antikanser,^{51,52} antioksidan,^{53,54} antiülser,^{55,56} immünostimülasyon^{57,58} ve lokal anestezik⁵⁹ etkiler göstermektedir.

Propolisin farmakolojik etkileri içeriğindeki farklı maddelerden kaynaklanmaktadır. Antimikrobiyal etki gösteren aktif komponentleri pinosembrin, galangin, kafeik asit fenil ester ve ferülik asittir. Antifungal komponentleri pinosembrin, pinobanksin, kafeik asit fenil ester, benzil ester, sakuranetin ve

pterostilben, antiviral komponentleri ise, kafeik asit fenil ester, luteolin ve kuersetindir.⁶⁰⁻⁶³

Propolis enflamatuar süreçte, nötrofiller tarafından oluşturulan serbest radikalleri yakalar.^{64,65} Ayrıca, antiinflamatuvar etkisini hidrofolat redüktaz inhibisyonu sağlayarak ve prostaglandin sentezini inhibe ederek gösterir. Akut enflamasyonda lipooksijenaz ve siklooksijenaz üretimini baskılar.⁶⁶ Ayrıca, trombosit agregasyonunu ve eikosanoid sentezini inhibe ederek immün sistem düzenleyici etki gösterir.⁶⁷ Toksik olmayan dozlarda bazı antibiyotiklerin antibakteriyel etkisini artırır.⁴⁰ Bakteriyel hücre bölünmesini engeller, bakteriyel hücre duvarı ve sitoplazmasını bozar ve bakteriyel enfeksiyon sırasında fagositleri uyarır.⁶⁷ Propolis, HIV-1 enfeksiyonunu anlamlı bir şekilde inhibe eder. HIV-1 enfekte hastaların lenfositlerinin immün yanıtını geliştirir.⁶⁸

Ayrıca propolisin antiinflamatuvar özelliğinin olduğu⁶⁹, dermatitlere karşı antibakteriyel krem olarak kullanıldığı⁷⁰ ve doku yenileme özelliğine sahip olduğu⁷¹ bildirilmiştir.

Popravko⁷² propolisi ve bitki tomurcuklarından alınan propolisin hammaddesini kullanarak antimikrobiyal etkisini ve buğday tanelerinin filizlenmesini engelleyici etkilerini test etmiştir. Böylece propoliste bulunan biyolojik aktif maddelerin temel kaynağının bitkilerden sentezlenen koruyucu maddeler olduğu ve bu maddelerin arıların spesifik biyosentetik ürünü olmadığını ispat etmiştir.

Propolisin bu faydalı özelliklerinin yanında toksik ve alerjik özellikleri de araştırılmıştır.⁷³⁻⁷⁵ Propolis kullanan kişilerde zehirlenme belirtisine rastlanmamıştır. Ancak, literatürde bazı alerjik reaksiyonların bildirildiği vaka raporları bulunmaktadır.⁷⁵⁻

⁷⁷ Günümüzde kişilerin propolise mi, onu kontamine eden diğer arı ürünlerine mi

reaksiyon verdikleri tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle arı ve ürünlerine alerjisi olanlarda, astım, ekzema ve ürtiker gibi alerjik reaksiyonları olan kişilerde dikkatli olunması gerekmektedir.

Kumazawa ve ark.⁷⁸ kamferol ve fenetil kafeat gibi antioksidan içeriğinden dolayı propolisin güçlü antioksidan özelliğinin olduğunu tespit etmişlerdir. Flavonoidlerin propolis içindeki en etkili ve bol bulunan antioksidan madde olduğu belirtilmektedir.⁷⁹ Nieva Moreno ve ark.⁸⁰ Arjantin propolisinde antioksidan aktivite ile flavonoid içeriğinin belirgin biçimde ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Öte yandan flavonoid içeriği ve inhibe olan malondialdehit (MDA) yüzdesi arasında pozitif ilişki olduğunu da saptamışlardır. Bununla beraber, flavonoid içeriğinden başka, diğer içeriklerin de antioksidan özelliğe neden olduğu belirtilmektedir.⁸¹

Russo ve ark.⁸² kafeik asit fenetil ester (CAPE)'den arındırılmış propolis ekstraktının antioksidan özelliğini araştırdıkları bir çalışmada CAPE'li ve CAPE'siz propolis ekstraktlarının doza bağımlı olarak serbest radikal temizleme etkisinin olduğunu, xantin oksidaz aktivitesinin belirgin biçimde inhibe edildiğini ve antilipoperoksidatif kapasitenin olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada CAPE'li ekstraktın CAPE'siz olana göre daha aktif olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonucunda CAPE'nin propolisin antioksidan etkinliğinde çok önemli bir role sahip olduğu ifade edilmiştir.⁸² Ayrıca propolisin sahip olduğu güçlü antioksidan etkinliğin yüksek konsantrasyonda kafeik asit ve fenetil kafeat içermesine bağlı olduğu bulunmuştur.⁸³

Song ve ark.⁸⁴ yaptıkları çalışmada propolisin östrojen reseptörleri aracılığı ile zayıf östrojenik etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Natarajan ve ark.⁸⁵ propolisin aktif komponenti olan kafeik asit fenetil ester'in, NF-κB aktivasyonunun potansiyel spesifik

inhibitörü ve hücre proliferasyonunu ve apoptozisi antioksjenaz aktivitesi ile module ettiğini belirtmektedirler.

Cardile ve ark.⁸⁶ yaptıkları çalışmada insan kıkırdak dokusu ve kondrosit kültüründe propolis ekstraktının kronik enflamasyonda salınan anahtar moleküller olan nitrik oksit (NO) ve glikozaminoglikanlar (GAGs) üzerine olan etkilerini incelemiştir. Çalışmanın sonunda propolis ve onun aktif komponenti olan kafeikasit fenetil ester (CAPE)'nin IL-1 β üzerine çok ciddi etkileri olduğu bulunmuş. Çalışmanın sonucunda, propolis ekstraktının sahip olduğu aktif komponentlerden dolayı kıkırdak dokuyu koruyucu ve çok iyi serbest radikal temizleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir.⁸⁶

Yapılan çalışmalara göre, propolisin içerdiği kuersetin, luteolin (flavonoitler), artepillin-C, kafeik asit ve kafeik asit fenetil ester gibi maddelerin anti tümöral etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir.^{87,88}

İnsan lenfosit kültüründe yapılan çalışmada 1 ml konsatrasyonda propolise maruz kalan hücrelerde mikronükleus (MN) oluşum oranının kontrol gurubuna göre 2–3 kat daha fazla olduğu; bununla beraber mitotik indekste (MI) ters etkiye neden olduğu bulunmuştur.⁸⁹ Propolis uygun dozlarda kullanıldığında antikarsinojenik özellik gösteren bir yapıdır, kanser tedavisinde de propolisin etanol ekstraktının kullanılabilceği belirtilmektedir.⁹⁰

Propolis antienflamatuar ajan olarak, prostoglandinlerin sentezini inhibe eden, timus bezini aktive eden, fagositik aktiviteyi tetikleyerek savunma sistemine yardımcı olan, hücresel bağışıklığı stimüle eden ve epitelyal dokularda iyileşmeyi olumlu etkileyen özelliklere sahiptir.^{82,91}

Propolis, akut ve kronik durumlarda antiinflamatuvar etkinlik göstermektedir. Propolis'in yapısındaki bileşikler arasında sadece CAPE ve galanginin anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olduğu görülmüştür; bununla beraber CAPE'nin etkisinin daha fazla olduğu belirtilmektedir.⁸⁶ Ağızda oluşan kronik ve akut inflamatuvar durumlarda, periodontitiste, sinüzitte, alt ve üst solunum yolu hastalıklarında ve deri ülserlerinde kullanım nedeni bu tip özelliklere sahip olması olarak açıklanmaktadır.^{92,93,94}

Propolisin kokaine benzer etkinlikte anestetik⁹⁵, biyolojik dokular üzerine rejeneratif^{96,97} ve birçok tip kanser hücresi üzerine anti neoplastik etkinliği^{98,99} vardır.

Propolisin terapötik aktivitelerinin, içerdiği flavonoidlere bağlı olduğu ifade edilmektedir.¹⁰⁰ Ayrıca flavonoidlerin immün sistemi indükledikleri^{101,102} güçlü oksijen radikal temizleme özelliğinin olduğu da rapor edilmiştir.

Propolis doku yenileyici, bakterisid ve fungusid özelliği ile kozmetikte çeşitli kremlerin yapımında da kullanılmaktadır.¹⁰³ Propolis kollajen sentezinde önemli bir role sahip olan demir ve çinko da ihtiva etmektedir.^{104,105}

Propolisin etanolik solusyonları 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 ısırgan otuna hassas kişilerin tedavisinde kullanılırken çok dikkatli olunmalıdır.¹⁰⁶

3. MATERYAL VE METOD

Araştırmanın deneysel kısmı Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi. Araştırmada 300–350 g. ağırlığında ortalama 5 aylık 48 adet genç erişkin erkek Wistar albino rat kullanıldı. Denekler kontrol grubu ve propolis grubu olarak iki gruba ayrıldı. Her bir grup 7, 14, 21. ve 28. günlerde ratlar sakrifiye edilmek üzere 4 alt gruba ayrıldı.

Denekleri anestezi altına almak için 3mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 90 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) intramüsküler olarak uygulandı. Anestezi altındaki deneklerin sağ fibulalarında manuel angulasyon stresi uygulanarak kırık oluşturuldu ve her hangi bir ortopedik sabitleme yöntemi uygulanmadı.

3.1. Propolis Özütünün Hazırlanması

1g propolis (S.S. Trabzon Merkez Tarımsal Kalkınma Kooperatifi Ürünü) tartılarak 10 mL dimetilsulfoksit (DMSO) ile karıştırılarak çözüldü. Çözünmenin iyi sonuç vermesi için karışım 24 saat süreyle 37⁰C'de Lab-Therm-Shaker (Braun, Melsungen AG-Germany) marka ultraviyole lambalı dairesel çalkalayıcı etüvde bırakıldı. Ardından karışım Nuvemix karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra süzgeç kâğıdından süzülerek kaba partiküllerinden arındırıldı. Daha sonra elde edilen süzölmüş karışım 47mm çaplı, 0,2µm porlara sahip dairesel şekilli filitreden (Schlecher&Schvell Membranfilter) geçirilerek steril hale getirildi. %2,5'luk konsantrasyon elde edilene kadar, süzülen propolis ekstraktına steril serum fizyolojik eklendi. Bu karışım ratlarda deneysel kırık oluşturulmadan hemen önce elde edildi.

Propolis grubuna %2,5'luk sıvı propolis ekstraktı kırık oluşturulduktan sonra kırık bölgesine I.M. olarak kırık oluşturulduktan sonra bir kere 0.5 cc olmak üzere uygulandı. Kontrol grubuna ise hiçbir ilaç uygulanmadı. 7, 14, 21. ve 28. günlerde sakrifiye edilen ratların sağ alt ekstremiteleri kalça seviyesinden ayrılarak radyolojik ve histopatolojik değerlendirmeye alındı.

3.2. Propolis İçeriğinin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) İle Belirlenmesi

Herhangi bir biyolojik etkinliği olan doğal veya sentetik karışımların içeriğini belirlemede Gaz Kromatografisi (GC), Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) veya Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) gibi analiz teknikleri kullanılır. Tüm bu yöntemler, örnek içindeki bileşenlerin silika jel gibi sabit bir faz üzerinde farklı tutunma/alıkonma özelliğine göre ayrılmasına dayanır. İnce tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography-TLC) bu temeli esas alan en basit kromatografik ayırma yöntemidir. TLC kullanılarak bir karışımın içindeki ana bileşenler nitel olarak belirlenebilir. Nicel analiz için TLC-densitometrik yöntem uygulanabilir. Eğer analizi yapılacak örneğin içeriği tahmin ediliyor veya literatür bilgileri mevcutsa TLC analizi bileşenler hakkında kaba da olsa bilgi verir.

Propolis özütünün TLC analizinde silika jel GF₂₅₄ TLC tabakaları kullanıldı. Bu tabakalarda alüminyum levha üzerine silika jel kaplıdır (Merck, Darmstadt); ayrıca doğal bileşiklerin analizinde büyük kolaylıklar sağlar. 5 mg propolis 500 µL metanolde çözülerek bir kapiller yardımıyla tabaka üzerine tabakanın altından 1cm yüksekliğinde bir noktaya uygulandı (5-10 µl). Diğer taraftan tabaka üzerinde ayırmayı yapacak olan organik çözücü karışımı hazırlandı. Propolis özütünün tabaka üzerinde yürütülmesi için 100 ml petrol eteri/etil asetat (7:3) karışımı hazırlanarak TLC tankı içine kondu ve

kapağı kapatılarak tankın çözücü buharıyla doymun hale gelmesi sağlandı. Daha sonra örnek uygulanmış tabaka, çözelti seviyesinin uygulama noktasının altında kalmasına dikkat edilerek tank içine daldırıldı. Çözelti seviyesi TLC tabakasının üst kısmına 1 cm kalıncaya kadar beklendi ve tabaka tanktan alındı. Tabaka üzerinde ayrılan propolis özütü bileşenleri UV lambası (250–365 nm) altında belirlendi. Her bir bileşenin alıkonma faktörü (R_f) aşağıdaki eşitlikten hesaplandı.

$$R_f = \text{Bileşenin tabaka üzerinde aldığı yol (cm)} / \text{Çözücünün aldığı yol (cm)}$$

R_f değeri bileşenin nitel analizi için kullanılan önemli bir parametredir. Aynı şartlar altında saf bileşenlerin R_f değeri ile karşılaştırılarak maddenin ne olduğuna karar verilir.

Bu çalışmada bileşenlerin R_f değerleri için referans, saf bileşenlerle karşılaştırılarak ve literatür verileri kullanılarak değerlendirildi.¹⁰⁷

Nitel analizde ikinci bir yöntem ise bileşenleri bir reaktifle etkileştirerek renklendirmek ve renk karakterine bağlı olarak bileşeni tanımlamaktır. R_f değerleri belirlendikten sonra renklendirici reaktif tabaka üzerine püskürtülür ve oluşan renk standart maddelerin rengi ile karşılaştırılır. Bu amaçla %5 (v/v) H_2SO_4 içeren 100 ml etanol çözeltisi hazırlandı ve tabaka üzerine püskürtülerek 100 °C'lik etüvde kurutuldu. Bileşenlerin renkleri literatür verileri ile karşılaştırıldı.

3.3. Radyolojik İnceleme

Ratların sağ alt ekstremiteleri kalça seviyesinden ayrıldıktan sonra %10'luk tamponlanmış nötral formaldehit solüsyonu içine konuldu ve bilgisayarlı tomografi (BT) çekimleri yapıldı. BT çekimleri "Philips Brilliance™ CT Systems" marka cihaz ile gerçekleştirildi. Pilot görüntüler elde edildikten sonra, 2 mm kesit kalınlığı kullanılarak

kallus dokusunun her iki tarafında sağlam kemik dokusu dahil olmak üzere 130 kV ve 150 mA'de tarama yapılarak aksiyel kesitler elde edildi. Elde edilen kesitlerde kallus alanlarının sınırları çizilerek belirlendi ve belirlenen bölgelerin yüzey alanları ve kemik mineral dansite (KMD) değerleri hesaplandı. BT'de KMD ölçümü Hounsfield skalası kullanılarak yapıldı. + 1000'den – 1000'e kadar uzanan bu skalada suyun attenuasyon değeri 0 olarak kabul edilmiş, attenuasyon değeri yüksek olan kalsifikasyon, kemik gibi yapılar skalanın pozitif tarafında, attenuasyon değeri sudan küçük hava gibi yapılar ise skalanın negatif tarafında dizilmişlerdir.¹⁵⁸

3.4. Histopatolojik İnceleme

Kallus dokusunu içeren kemik doku örnekleri %10'luk tamponlanmış nötral formaldehit solüsyonunda 48 saat tespit edildi. Doku örnekleri daha sonra asetik asit ve formik asit içeren asit solüsyonunda dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrasında kırık hattına komşu kemik fragmanlarının ve çevre çizgili kas liflerini de içine alacak şekilde kemiğin uzun eksenine paralel parçalara ayrıldı. Artan dereceli etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilen ve ksilolde şeffaflaştırılan dokular parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan alınan 4–6 µm kalınlığında kesitler hemotoksilen eozin (H.E.) ile boyandıktan sonra Nikon Optiphot marka ışık mikroskopunda incelenerek uygun alanların fotoğrafları çekildi.

3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmamızın verileri SPSS (ver 10.0) programına yüklenerek, verilerin değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi, Kruskal-Wallis testi, Tukey testi, Ficsher Kesin Khi Square testi ve 2x2 düzenlerde Khi Square testi uygulanmıştır. Veriler

tablolarda aritmetik ortalama \pm standart sapma ve denek sayısı yüzdesi şeklinde belirtilmiş olup yanılma düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. RADYOLOJİK BULGULAR

4.1.1. Kallus Alanı Değerlendirme Sonuçları

Kontrol grubundaki hayvanların günlere ait alan değerleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Günlere ait alan değerleri ikişerli olarak karşılaştırıldığında 7. gün ile 21. ve 28. gün, 14. gün ile 21. ve 28. gün, 21. gün ile 28. gün arasındaki farklılık önemli bulunurken, 7. gün ile 14. gün arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır.

Propolis grubundaki hayvanların günlere ait alan değerleri karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Günlere ait alan değerleri ikişerli olarak karşılaştırıldığında 7. gün ile 21. ve 28. gün, 14. gün ile 21. ve 28. gün, 21. gün ile 28. gün arasındaki farklılık önemli bulunurken, 7. gün ile 14. gün arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır.

Her iki gruptaki hayvanların 7. gün alan değerleri karşılaştırıldığında farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Her iki gruptaki hayvanların 14., 21. ve 28. günlerdeki alan değerleri karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 1). 28. gün radyolojik görüntülerinde propolis grubunda kallus alanının ve kallus yoğunluğunun kontrol grubunda göre daha fazla olduğu görülmektedir (Resim 1 ve Resim 2)

Tablo 1. Gruplara ait kallus alanı ortalama değerleri

	KONTROL GRUBU X + Se	PROPOLİS GRUBU X + Se	SONUÇ
7. GÜN	0,23 ± 0,08	0,35 ± 0,10	p= 0,065 p> 0,05
14. GÜN	0,42 ± 0,07	0,60 ± 0,80	p= 0,008 p< 0,05
21. GÜN	0,63 ± 0,16	0,97 ± 0,28	p= 0,019 p< 0,05
28. GÜN	0,90 ± 0,14	1,35 ± 0,28	p= 0,05 p< 0,05
SONUÇ	KW= 19,60 p=0,00; p<0,05	KW=20,17 p=0,000 p<0,05	

4.1.2. Kemik Mineral Dansite Değerlendirme Sonuçları

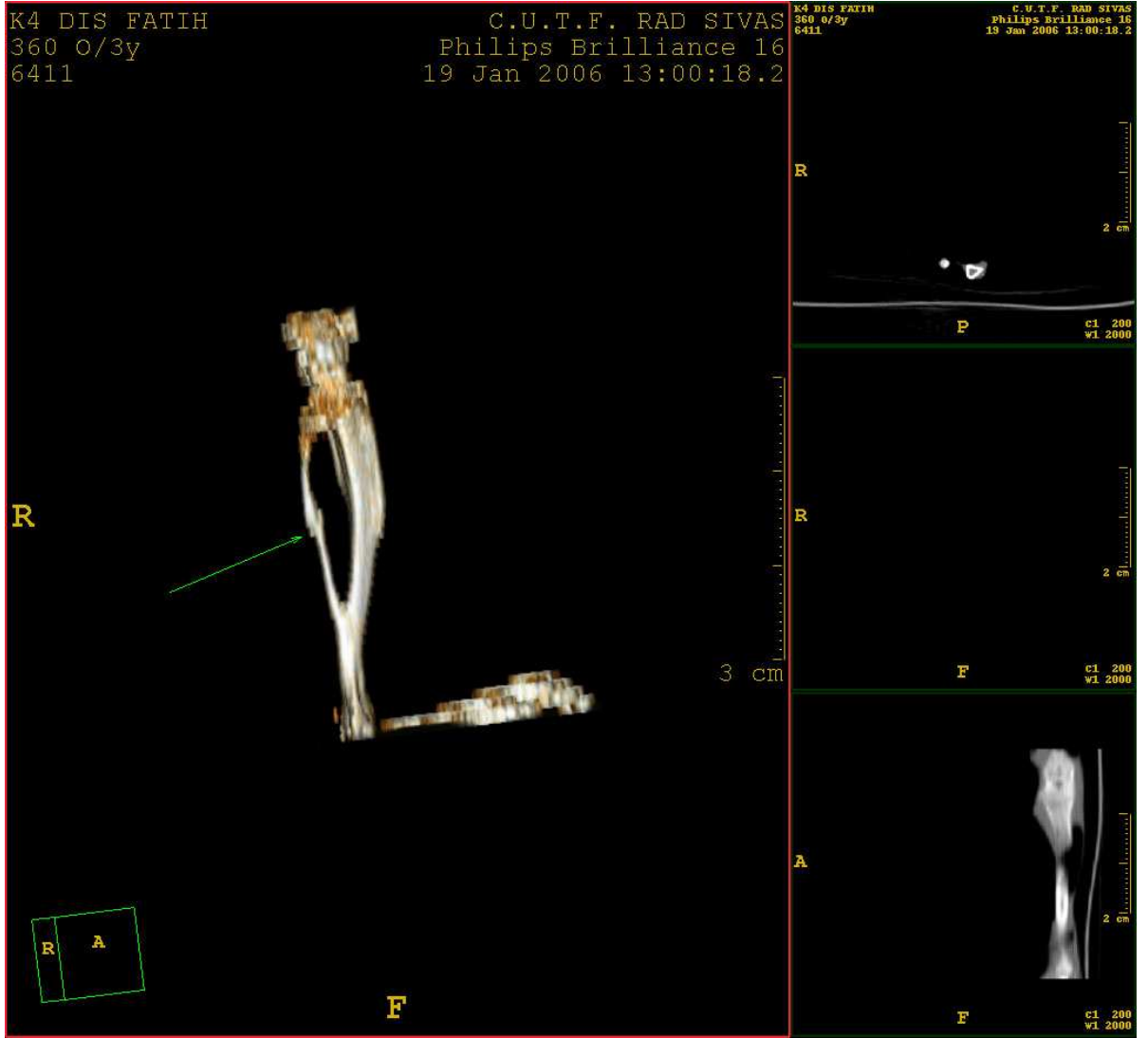
Kontrol grubunda değişik günlerde llen KMD değerleri karşılaştırdığında ölçüm değerleri arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Haftalara ait yoğunluk değerleri ikişerli karşılaştırdığında 7. gün ile 14., 21. ve 28. günler, 14. gün ile 21. ve 28. günler, 21. gün ile 28. günler arasındaki farklılık önemli bulunmuştur.

Propolis grubunda değişik günlerde llen KMD değerleri karşılaştırdığında farklılık önemli bulunmuştur. Günlere ait yoğunluk değerleri ikişerli karşılaştırdığında 7. gün ile 21. ve 28. gün arası, 14. gün ile 21. ve 28. gün arası, 21. gün ile 28. gün arası farklılık önemli bulunurken, 7. gün ile 14. gün arası, 14. gün ile 21. gün arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır.

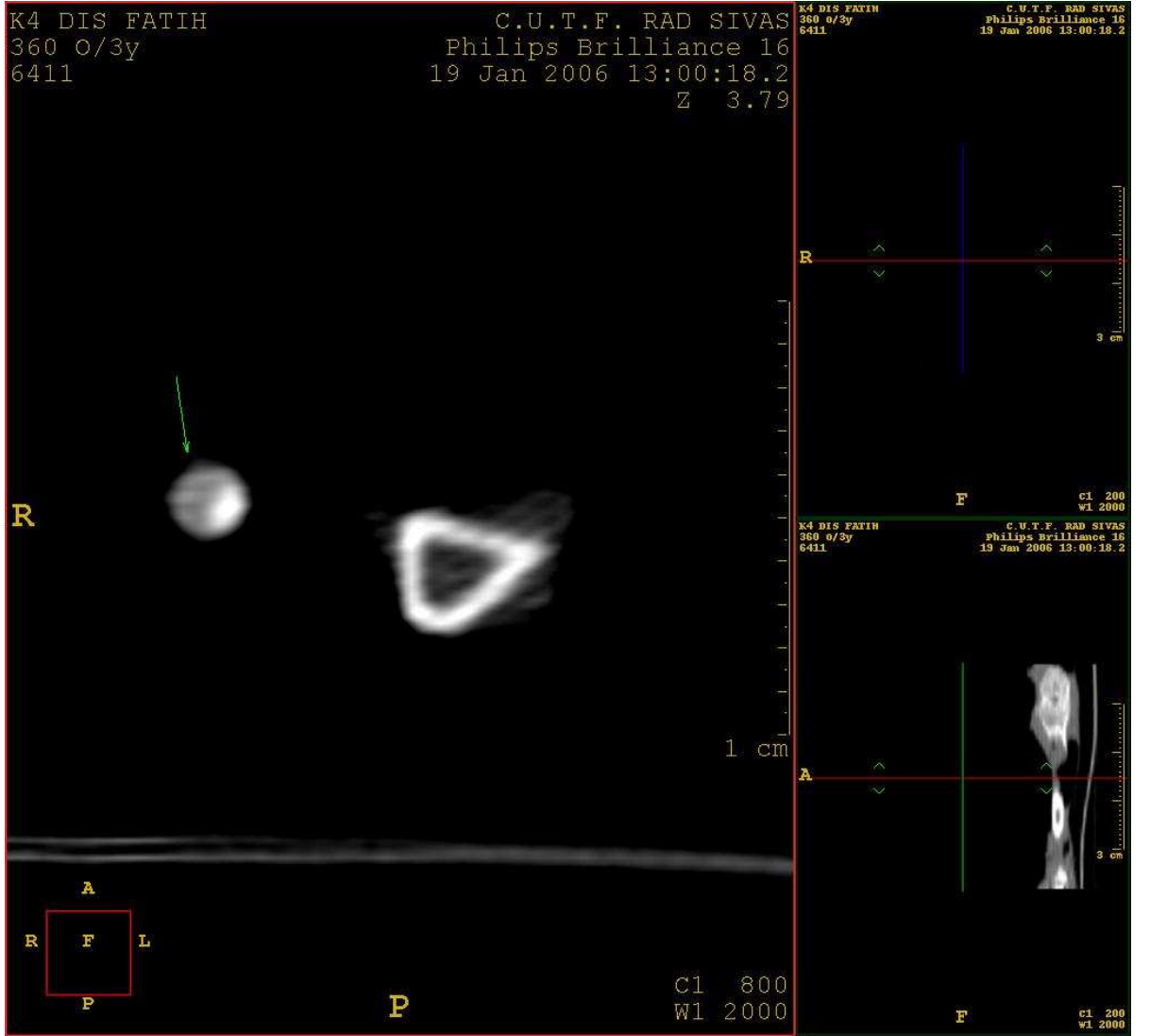
Her iki gruptaki hayvanların 7., 14., 21. ve 28. günlere ait yoğunluk değerleri karşılaştırdığında gruplar arası fark önemli bulunmuştur ($p < 0,05$; Tablo 2).

Tablo 2. Gruplara ait kallus matrisi dansite ortalama değerleri

	KONTROL GRUBU X + Se	PROPOLİS GRUBU X + Se	SONUÇ
7. GÜN	230,16 ± 7,13	254,66 ± 9,43	p= 0,006 p< 0,05
14. GÜN	259,83 ± 10,32	278,50 ± 10,44	p= 0,012 p< 0,05
21. GÜN	277,00 ± 6,22	300,83 ± 9,04	p= 0,004 p< 0,05
28. GÜN	307,66 ± 13,41	355,50 ± 30,92	p= 0,016 p< 0,05
SONUÇ	KW= 21,39 p=0,00; p<0,05	KW=21,7 p=0,00; p<0,05	



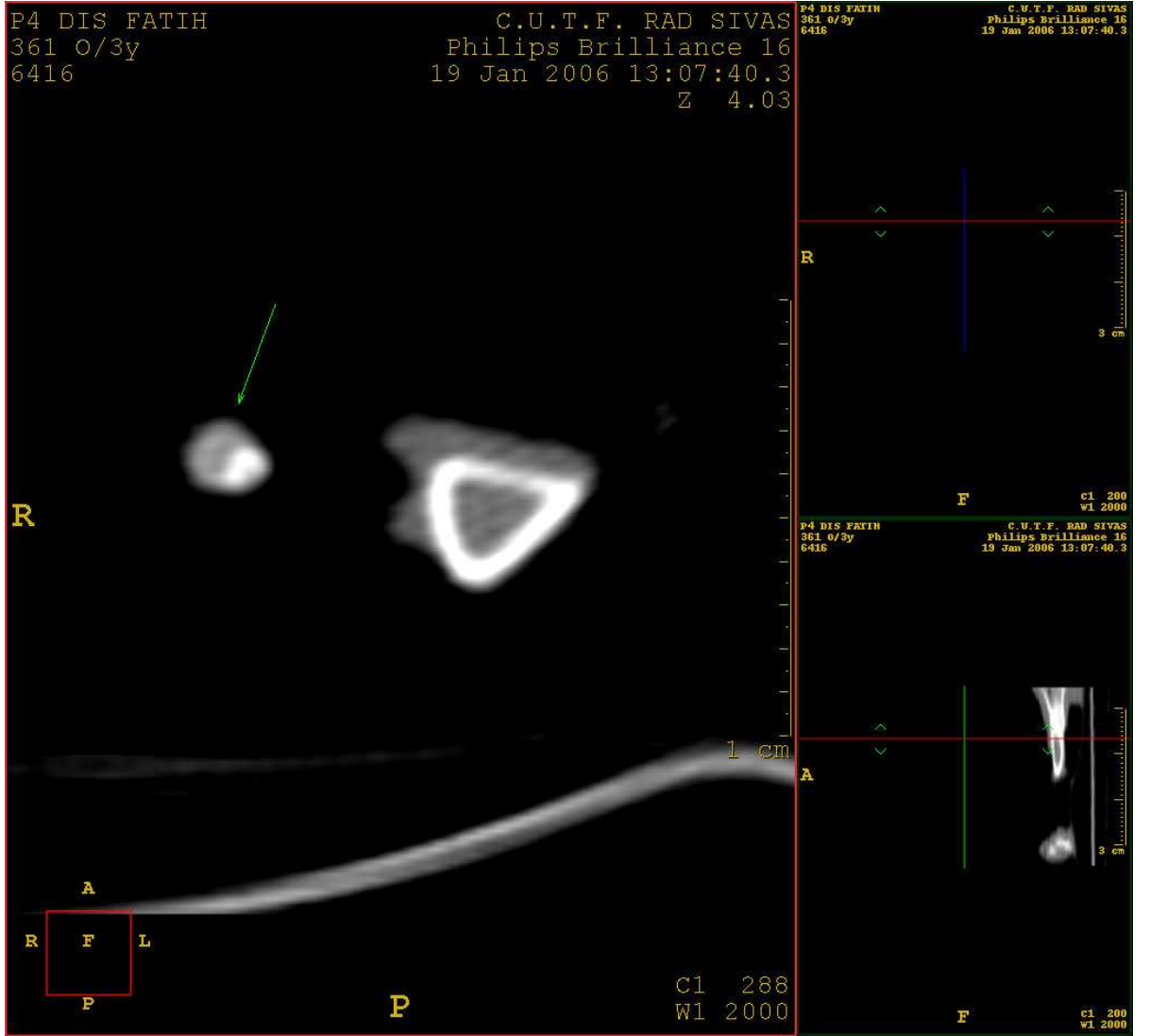
Resim 1. Kontrol grubuna ait kırık hattının 4. haftadaki üç boyutlu görüntüsü (okla gösterilen).



Resim 2. Kontrol grubuna ait 4. haftada kırık hattında meydana gelen kallus (okla gösterilen).



Resim 3. Propolis grubuna ait kırık hattının 4. haftadaki görünümü (okla gösterilen).



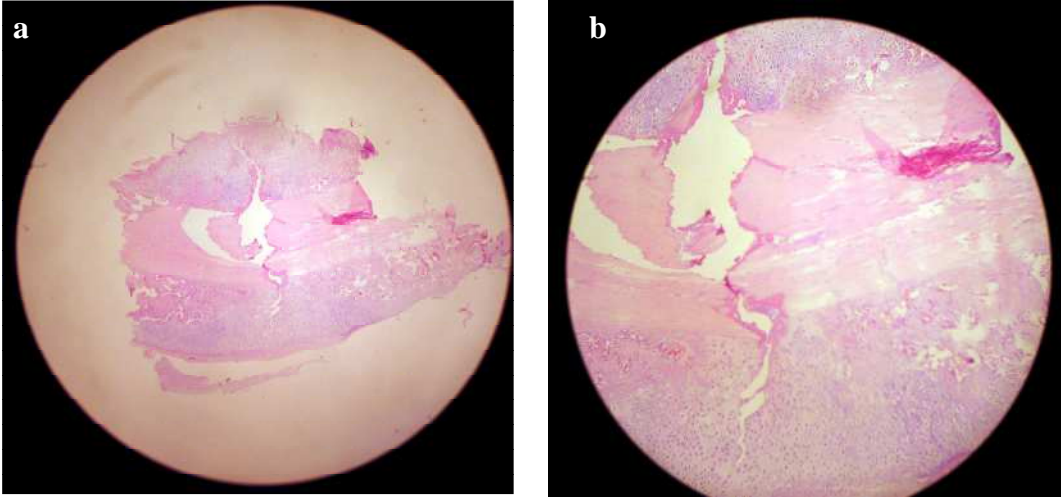
Resim 4. Propolis grubuna ait 4. haftada kırık hattında meydana gelen kallus alanı (okla gösterilen).

4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Histopatolojik bulgular, kırık alanlarının ışık mikroskobu görüntüleri, hem grup içi hem de gruplar arası günlere göre damarlanma ve osteoblastik aktivite durumları aşağıda sunulmuştur.

4.2.1. KONTROL GRUBU 7. GÜN

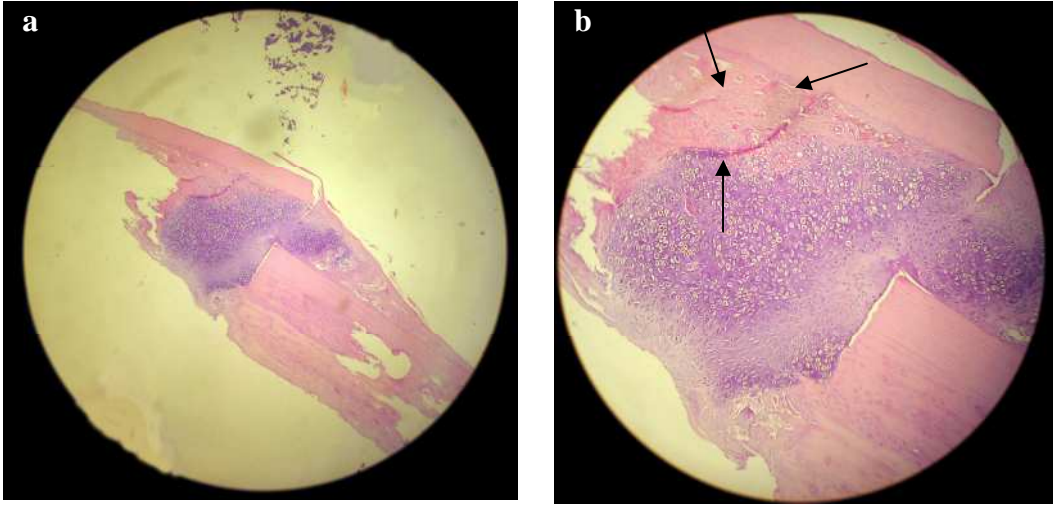
7. gün sonunda kontrol grubu hayvanlarında genel olarak kırık hattını kuşatan, kırıkta bulunan komponenti hücreden zengin, geniş bir periosteal fibrokarilejinöz kallus oluşumu görülmüştür. Damarlanma oldukça belirgin durumdadır, osteoblastik aktivite henüz belirgin değildir (Resim 5).



Resim 5. Kontrol grubu 7. günde kırık hattının görünümü. a) Genel görünüm (HE X40); b) Aynı alanın detayı: Periosttan kaynaklanan karilejinöz kallus (HE X100).

4.2.2. KONTROL GRUBU 14. GÜN

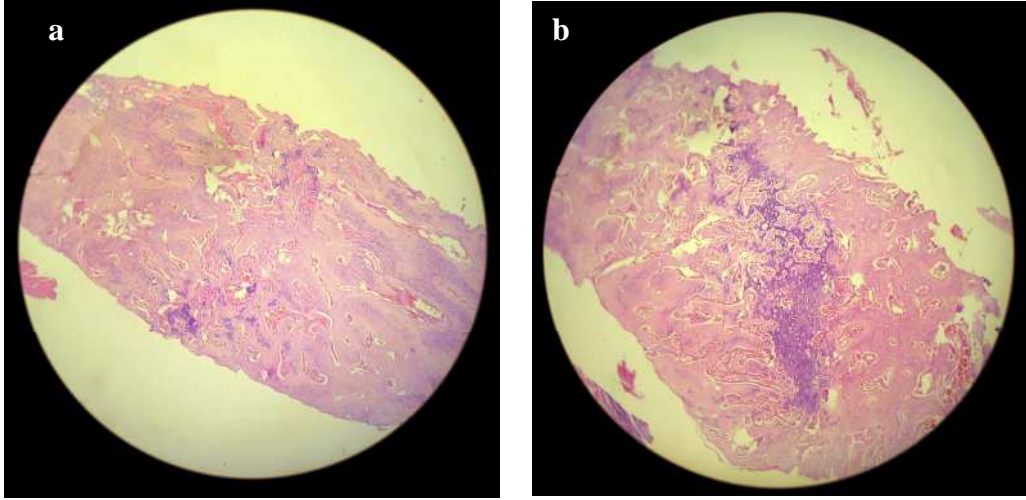
14. gün sonunda kontrol grubu hayvanlarında intramedullar kırık hattını tamamen dolduran, kondrositlerden zengin, karilejinöz kallus oluştuğu görülmektedir. Çevrede damar proliferasyonu dikkati çekmektedir. Osteoblastik aktivite henüz başlamamıştır.



Resim 6. Kontrol grubu 14. günde kırık hattının görünümü: Periost kaynaklı karilejinöz kallus kırık hattını doldurmaktadır. a) Genel görünüm: (HEX40); b) Detay: Burada kallusun üstündeki bölgede damarlanma artışı da dikkati çekmektedir (oklarla gösterilen) (HE X 100)

4.2.3. KONTROL GRUBU 21. GÜN

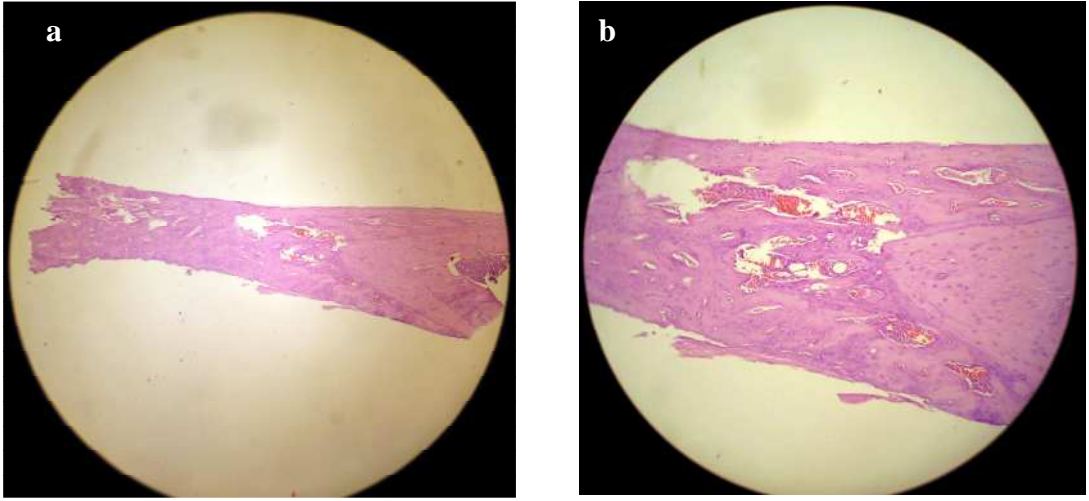
21. gün sonunda kontrol grubu hayvanlarında intramedullar kallusta osteoblastik aktivite başlamış, çok az kırıkta kalmış ve osseöz kallus yönünde değişim belirginleşmiştir. Ayrıca kallusa ait elemanlar arasında zengin damar proliferasyonu dikkati çekmektedir.



Resim 7. Kontrol grubu 21. günde kırık hattının görünümü: Kırıkta dokusu azalmaya ve kallus kemikleşmeye başlamıştır: Osteokarilejinöz Kallus. a) Genel görünüm. (HEX40); b) Başka bir alandan detay (HE X 100)

4.2.4. KONTROL GRUBU 28. GÜN

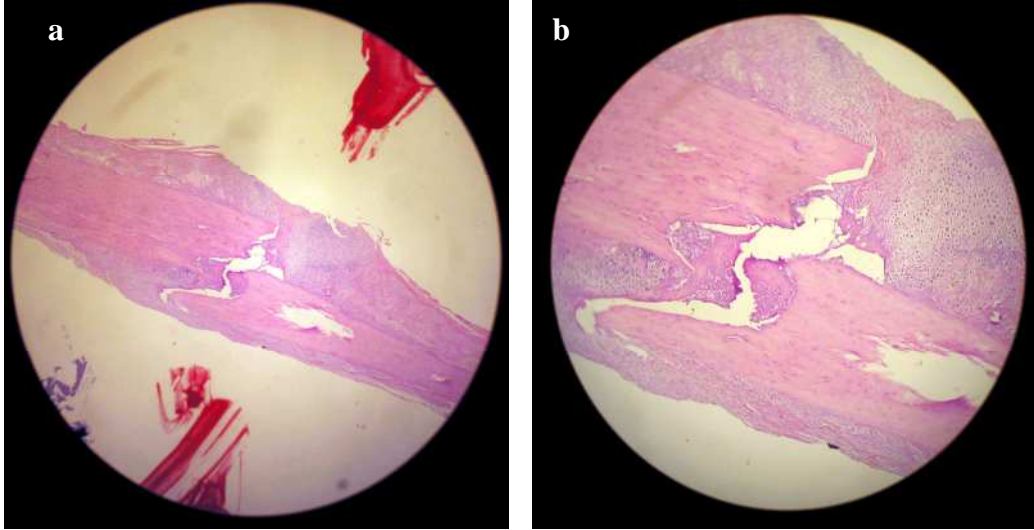
28. gün sonunda kontrol grubu hayvanlarında osseöz kallus oluşumu görülmüştür. Daha çok intramedullar alandaki osseöz kallus kırık ucunu iki yandan kuşatmaktadır. Yeni oluşan kemik trabekülleri arasında bol damarlanma vardır. Büyüme planındaki gibi enkondreal kemikleşme göstermektedir.



Resim 8. Kontrol grubu 28. günde kırık hattının görünümü: Osseöz kallus.
a) Genel görünüm (HE X 40); b) Kırık ucuna yakın alandan detay (HE X 100).

4.2.5. PROPOLİS GRUBU 7. GÜN

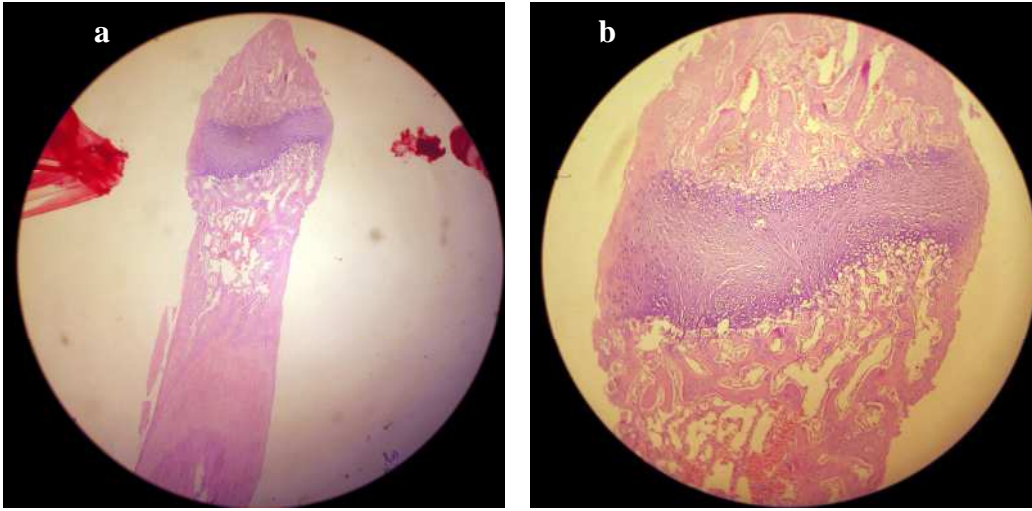
7. gün sonunda propolis grubunda oluşmuş subperiosteal karilejinöz kallusunun bir miktar intramedullar kırık hattına doğru ilerlediği dikkati çekmektedir. Damarlanma ve osteoblastik aktivite belirgin değildir.



Resim 9. Propolis grubu 7.günde kırık hattının görünümü: Periosttan gelişen karilejinöz kıkırdak biraz daha erkenden kırık hattına girmiştir. a) Genel görünüm: (HE X40); b) Aynı alanın detayı (HE X100).

4.2.6. PROPOLİS GRUBU 14. GÜN

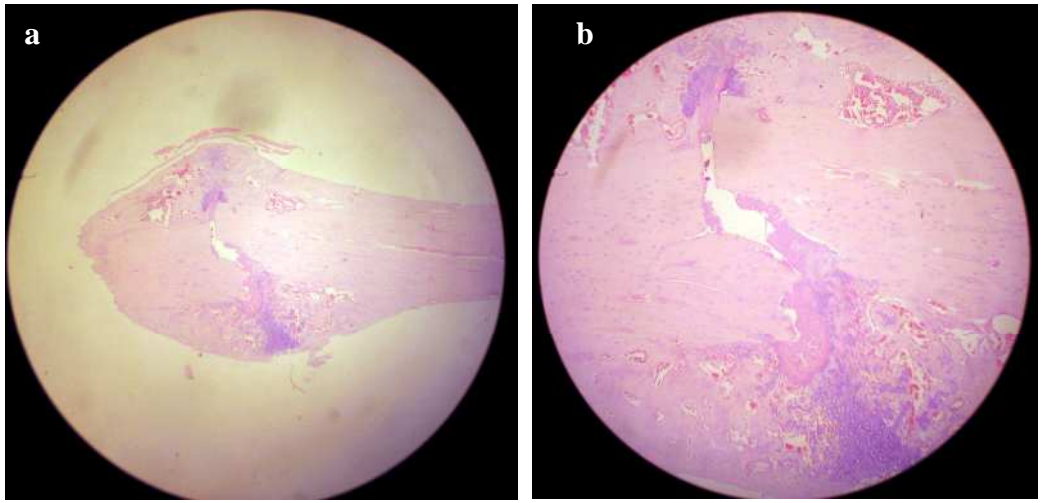
14. gün sonunda propolis grubunda kırık hattını intramedullar bölgede dolduran, kartilejinöz kallus görülmektedir. Kallus bir enkondreal kemikleşme çizgisi gibi aşağı ve yukarı doğru enkondreal ossifikasyona benzer tarzda kemikleşmeye başlamıştır. Kemikleşme çevresinde bir miktar osteoblastik aktivite ve hafif damarlanma dikkati çekmektedir.



Resim 10. Propolis grubu 14. günde kırık hattının görünümü: Kartilejinöz kallus kırık hattını tamamen doldurmuştur. a) Genel görünüm (HE X40). b) Aynı alanın detayı (HE X100).

4.2.7. PROPOLİS GRUBU 21. GÜN

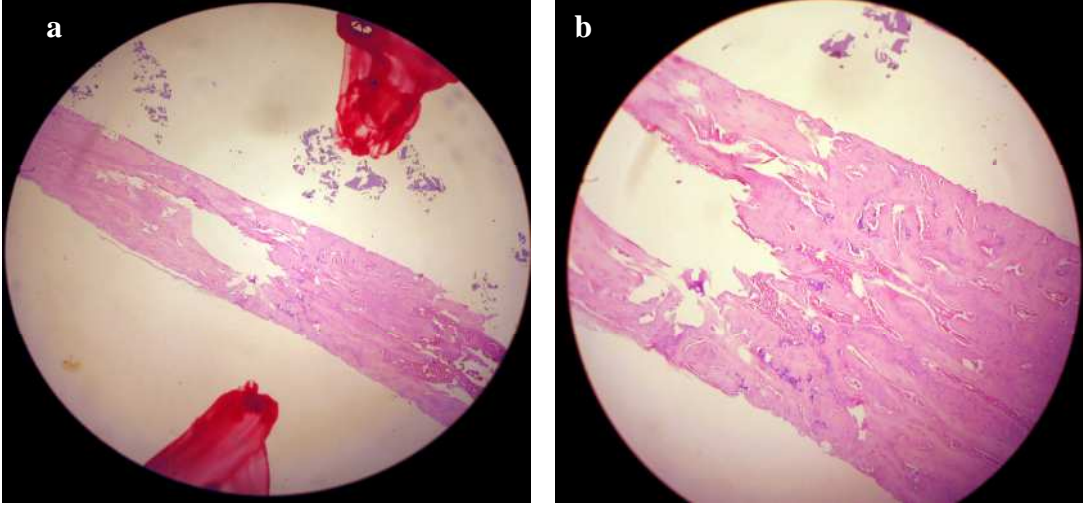
21. gün sonunda propolis grubunda bir öncekine benzer yapıda intramedullar kallusun hemen hemen tamamen ossifiye olduğu ve kırık dokusunun çok azaldığı dikkati çekmektedir. Kemik trabekülleri arasında bol damar mevcuttur. Kırık çizgisinde ayrıca eozinofilik amorf madde, kallus elemanları çevresinde kuvvetli osteoblastik aktivite bulunmaktadır.



Resim 11. Propolis grubu 21. günde kırık hattının görünümü: Kartilajinöz kallusta ortadan kemikleşme başlamıştır. a) Genel görünüm: (HE X40); b) Detay (HE X100).

4.2.8. PROPOLİS GRUBU 28. GÜN

28. gün propolis deney grubunda kırık hattında kırık dokusu çok azalmış ve intramedullar osseo kallus oluşmuştur. Damarlanma belirgin, osteoblastik aktivite hafif derecede belirgin görünümündedir.



Resim 12. Propolis grubu 28. günde kırık hattının görünümü: Kallus hemen hemen kemikleşmiştir. a) Genel görünüm (HE X40); b) Detay (HE X100), burada kallusun kontrol grubuna göre büyüklüğü ve damar zenginliği dikkati çekmektedir.

Kallus alanı kesitlerin ışık mikroskobu altında histopatolojik incelenmesi sonucunda kontrol grubu ve propolis grubu arasındaki damarlanma ve osteoblastik aktivite arasındaki farklılıklar aşağıdaki tablolarda sunulmuştur (Tablo3-10).

Tablo 3. Kontrol grubunda haftalara göre damarlanma belirginliğinin karşılaştırılması.

Haftalar	Belirgin değil		Belirgin		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
7. gün	5	83,3	1	16,7	6	100
14. gün	0	0	6	100	6	100
21. gün	3	50	3	50	6	100
28. gün	3	50	3	50	6	100
Toplam	11	45,8	13	54,2	24	100

Sadece 7. gün ile 14. gün arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p=0,015$, $p<0,05$); diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4. Kontrol grubunda haftalara göre osteoblastik aktivitenin karşılaştırılması.

Haftalar	Belirgin değil		Belirgin		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
7. gün	0	0	6	100	6	100
14. gün	3	50	3	50	6	100
21. gün	5	83,3	1	16,7	6	100
28. gün	2	33,3	4	66,7	6	100
Toplam	10	41,7	14	58,3	24	100

Sadece 7. gün ile 21. gün arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,015$, $p<0,05$); diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 5. Propolis grubunda haftalara göre damarlanma belirginliğinin karşılaştırılması.

Haftalar	Belirgin değil		Belirgin		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
7. gün	4	66,7	2	33,3	6	100
14. gün	4	66,7	2	33,3	6	100
21. gün	3	50	3	50	6	100
28. gün	4	66,7	2	33,3	6	100
Toplam	15	62,5	9	32,5	24	100

Damarlama açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 6. Propolis grubunda haftalara göre osteoblastik aktivitenin karşılaştırılması.

Haftalar	Belirgin değil		Belirgin		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
7. gün	0	0	6	100	6	100
14. gün	1	16,7	5	83,3	6	100
21. gün	1	16,7	5	83,3	6	100
28. gün	2	33,3	4	66,7	6	100
Toplam	4	16,7	20	83,3	24	100

Propolis grubunda günler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 7. Kontrol grubu ile Propolis grubu arasında damarlanma belirginliğinin karşılaştırılması.

Gruplar	Belirgin değil		Belirgin		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Propolis Grubu	15	62,5	9	37,5	24	100
Kontrol Grubu	11	45,8	13	54,2	24	100
Toplam	26	54,2	22	45,8	48	100

Genel toplamda propolis grubu ile kontrol gurubu arasında damarlanmanın belirgin olması ve olmaması açısından fark önemsiz bulunmuştur ($X^2= 1,34$; $p=0,247$ $p>0,05$).

Tablo 8. Kontrol grubu ile Propolis grubu arasında osteoblastik aktivitenin karşılaştırılması.

Gruplar	Belirgin değil		Belirgin		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Propolis Grubu	4	16,7	20	83,3	24	100
Kontrol Grubu	10	41,7	14	58,3	24	100
Toplam	14	29,2	34	70,8	48	100

Genel toplamda propolis grubu ile kontrol gurubu arasında osteoblastik aktivitenin belirgin olması ve olmaması açısından fark önemsiz bulunmuştur ($X^2= 3,63$; $p=0,057$ $p>0,05$).

Tablo 9. Gruplara ait 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 28. gün damarlanma belirginliği sonuçlarının karşılaştırılması.

Gruplar	7. Gün		14. Gün		21. Gün		28. Gün	
	Belirgin değil Sayı %	Belirgin Sayı %	Belirgin değil Sayı %	Belirgin Sayı %	Belirgin değil Sayı %	Belirgin Sayı %	Belirgin değil Sayı %	Belirgin Sayı %
Propolis	4 66,7	2 33,3	4 66,7	2 33,3	3 50	3 50	4 66,7	2 33,3
Kontrol	5 83,3	1 16,7	0	6 100	3 50	3 50	3 50	3 50
Toplam	9 75,0	3 25,0	4 33,3	8 66,7	6 50	6 50	7 58,3	5 41,7
	p= 1,00 p>0,05		p=0,061 p>0,05		p=1,00 p>0,05		p=1,00 p>0,05	

Damarlanma açısından kontrol grubu ile propolis grubu karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 10. Gruplara ait 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 28. gün osteoblastik aktivite sonuçlarının karşılaştırılması.

Gruplar	7. Gün		14. Gün		21. Gün		28. Gün	
	Belirgin değil Sayı %	Belirgin Sayı %	Belirgin değil Sayı %	Belirgin Sayı %	Belirgin değil Sayı %	Belirgin Sayı %	Belirgin değil Sayı %	Belirgin Sayı %
Propolis	0	6 100	1 16,7	5 83,3	1 16,7	5 83,3	2 3,3	4 66,7
Kontrol	0	6 100	3 50	3 50	5 83,3	1 16,7	2 33,3	4 66,7
Toplam	0	6 100	4 33,3	8 66,7	6 50	6 50	4 33,3	8 66,7
			p=0,545 p>0,05		p=0,08 p>0,05		p=1,00 p>0,05	

Osteoblastik aktivite açısından kontrol grubu ile propolis grubu karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

4.3. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ SONUÇLARI

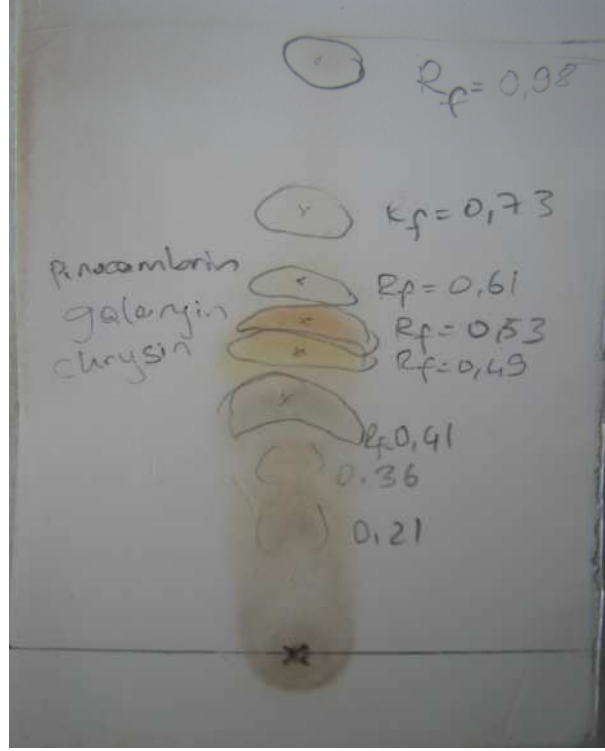
TLC tabakası üzerindeki bileşenler ve hesaplanan R_f değerleri Şekil 1'de görülmektedir. Şekil 1'den de görülebileceği gibi 6 ana bileşen gözlenmektedir. Her bir bileşen için hesaplanan R_f değerleri de Şekil 1'de verilmiştir. Çalışma şartlarında propolis içinde bulunabilecek kimyasalların pek çoğu mevcut olmadığından elde edilen veriler literatür verileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

$R_f = 0,98$ olan ve $R_f = 0,73$ olan bileşenlere ait literatür verisi mevcut değildir. Ancak $R_f = 0,61$ pinocembrin, $R_f = 0,53$ galangin ve $R_f = 0,49$ chrysin olarak tanımlandı.

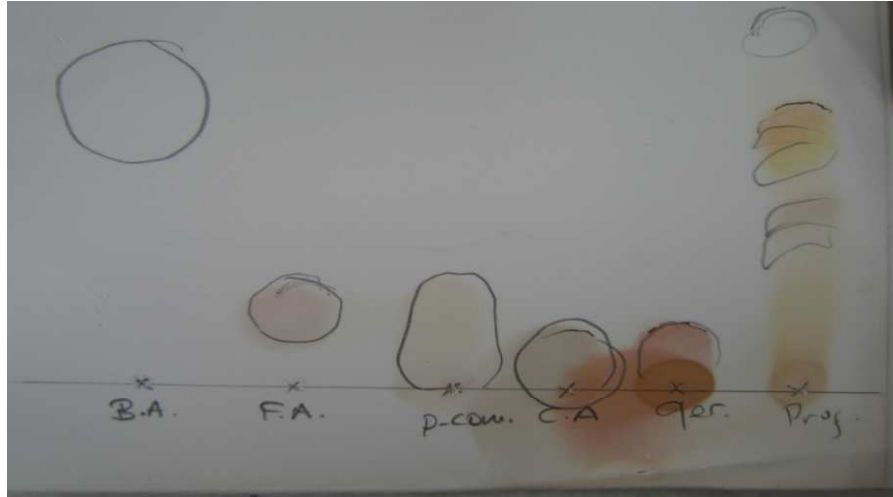
R_f değerlerinin yanı sıra sülfürik asit boyaması sonrasında ilgili bileşenlerin renkleri de tanımlanan türleri doğrulamaktadır.

Şekil 1'den görüleceği üzere $R_f = 0,61$ olan pinocembrin boyama öncesi sarı iken boyama sonrası sarı-portakal olarak gözlemlendi. Yine $R_f = 0,53$ olan galangin boyama öncesi koyu sarı iken boyama sonrası turuncu rengi ile kolayca tanımlandı. Chrysin ise ($R_f = 0,49$) boyama sonrası oluşan sarı rengeyle tanımlandı. $R_f = 0,41$ değerine sahip ve boyama sonrası pembe-turuncu-gri bölge ise tanımlanamamıştır.

Propolisin metanol özütü mevcut saf kimyasallarla karşılaştırmalı olarak da TLC üzerine yürütüldü. Bazı saf bileşenlerin ve propolisin TLC tabakası Şekil 2'de görülmektedir. Benzoik asit (B.A), ferulik asit (F.A.), p-kumarik asit (p-coum), kafeik asit (C.A.) ve kuersetin (Quer) propolis içinde bulunabilen bazı bileşenler olarak rapor edilmektedir¹⁰⁷; ancak çalışmada kullanılan propolis örneğinde bu kimyasallardan kafeik asit ve kuersetinin varlığından bahsedilebilir. Her iki bileşen de uygulama noktasında kahve-turuncu olarak tanımlandı.



Şekil 1. Her bir bileşen için hesaplanan R_f değerlerinin gösterilmesi.



Şekil 2. Bazı saf bileşenler (B.A.= Benzoik Asit; F.A.= Ferulik Asit; p-com.= Para kumarik asit; C.A.= Kafeik Asit; Qer.= Quersetin) ve Propolisin TLC tabakası üzerinde karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Kırık iyileşmesinin biyolojisi ile ilgili son yıllarda çok sayıda çalışma yapılmış olup ve genelde bu çalışmalarda kırık iyileşmesinin hızlandırılması amaçlanmıştır. Önceki kırık iyileşmesi çalışmalarında osteoblastlar en önemli ve hemen hemen tek sorumlu hücre olarak düşünülürken, günümüzde yapılan çalışmalarda kırık iyileşmesinin kırık alanındaki lokal ve multiselüler mediatör mekanizmalara iletilen fiziksel ve biyokimyasal sinyallerle oluşan daha karmaşık bir mekanizma olduğu, bu mekanizmayı da doğrudan veya dolaylı etkileyen pek çok faktörün bulunduğu kabul edilmektedir.⁶² Yapılan çalışmalarda kemik iyileşme problemlerinin ortaya çıkmasını engelleyen, kallus oluşumunu, yeniden şekillenmeyi ve mineralizasyonu etkileyen yardımcı tedavi yöntemlerinin biyolojik bir destek sağlayacağı öne sürülmüştür.^{34,57}

Organizmada fizyolojik ve patolojik tüm metabolik işlemlerin yürütülmesi, yüzlerce enzim ve substratın katıldığı reaksiyonların düzenli ve hızlı bir şekilde sürdürülmesi ile mümkündür. Bu reaksiyonlar sırasında yararlı birçok ürünle birlikte özellikle fazla miktarda oluştuklarında organizma için zararlı etkiler yapabilecek bileşikler de ortaya çıkmaktadır. Bunlardan en önemlileri serbest radikallerdir. Canlı organizma, serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptir. Bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin iyi çalışmamasından dolayı serbest radikallerin vücutta fazlalaştığı görülür. Bu da vücutta bazı hasarlara neden olur. Serbest radikallerin miktarı arttıkça önce yaşlanma hızlanır, hücre ölümü, sonra doku ölümü daha sonra ise beyin damarlarının tahribatına varan hasarlar oluşur.¹⁰⁸

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı, hücre ve dokularda gelişmiş olan antioksidan moleküllerin çeşitliliğine, yaygın dağılımına ve oldukça etkili koruma

sağlamalarına karşın, bazı durumlarda savunma sistemi yetersiz kalmakta ve makromoleküler hasar görülmektedir. Endojen antioksidanların yetersiz kaldığı, serbest radikallerin çok fazla üretildiği enfeksiyon, inflamasyon, travma gibi durumlarda antioksidan savunmayı güçlendirici, patolojik duruma uygun olarak seçilebilecek bir antioksidanın, yeterli doz ve sürede uygulanmasının yararlı ve gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığı altında çeşitli çalışmalarla¹⁰⁹⁻¹¹² güçlü antioksidan etkisinin olduğu ispat edilmiş olan propolisin bu özelliğinden dolayı böyle bir çalışmada kullanılabileceği uygun görülmüştür.

Ayrıca enflamatuvar süreçte nötrofiller tarafından oluşturulan serbest radikalleri yakalaması,^{64,65} hidrofolat redüktaz inhibisyonu sağlayarak ve prostaglandin sentezini inhibe ederek antienflamatuvar etki göstermesi, akut enflamasyonda lipooksijenaz ve siklooksijenaz üretimini baskılaması,⁶⁶ güçlü antioksidan özellik göstermesi,⁷⁸⁻⁸² östrojen reseptörleri aracılığı ile zayıf östrojenik etkisinin olması,⁸⁴ kollajen sentezinde önemli bir role sahip olan demir ve çinko ihtiva etmesi^{104,105} gibi özelliklerinin olması da propolisin bu çalışmada seçilmesinde önemli faktörler olmuştur.

Hayvan modelinden elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabilmesi çok önemlidir. İnsanlarda kırık iyileşmesinin erken dönemleri incelendiğinde, diyafiz kırıklarında görülen onarım hızı ile deneysel kırığın onarım hızı benzerlikler göstermiştir.¹¹³ Bu nedenle deneysel kırık modelinden elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabileceği düşünülmektedir.

Deneysel kırık modeli olarak, Allen ve ark.'nın¹¹⁴ tanımladığı, daha önce yapılan çalışmalarla da^{115,116} güvenilirliği kanıtlanmış olan “manuel angulasyon” yöntemi uygulanmıştır. Kırık oluşturulan bölge olarak fibulanın seçilmesinin nedeni ise,

oluşturulan deneysel kırıktan sonra her hangi bir ortopedik sabitleme yöntemi uygulanmasına gerek kalmaması ve bu şekilde ratların günlük işlevlerini sağlayabilmesidir.

Literatürde histopatolojik değerlendirme günlerinin farklılıklar gösterdiği görülmektedir.¹¹⁷⁻¹²⁰ Erken dönem kemik gelişiminin histopatolojik incelenmesinde genellikle 3. gün, 7. gün, 14. gün, 21. gün, 28. gün, 2. ay ve 3. ay bitimleri esas alınarak incelenecek doku örnekleri elde edilmektedir. Genel olarak kemikleşme sürecinin birinci haftanın sonunda başladığı ve altıncı hafta sonunda kemikleşmenin büyük oranda tamamlandığı kabul edilmektedir.^{121,122} Bu doğrultuda biz de çalışmamızı 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 28. günleri esas alarak gerçekleştirdik.

Birçok çalışmada^{110-112,123} propolisin etanollü ekstraktları elde edilmiş ve bu çözeltide elde edilen formları kullanılmıştır. Etanolün toksik özelliğinden dolayı biz daha az toksik olduğu belirtilen^{124,125} ve bu özelliğinden dolayı da hücre kültürü çalışmalarında kullanılan dimetil sülfoksidi (DMSO) çözücü olarak kullandık.

Yerli ve yabancı literatürün taranması sonucunda propolisin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirildiği deneysel veya klinik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle uygulama programı (uygulama dozu, uygulama süresi ve uygulama rejimi) ilk defa bu çalışmada denenmiştir. Farklı çalışmalarda kırık bölgesine çeşitli büyüme hormonlarının enjektör ile uygulanarak kırık iyileşmesine olan etkilerinin incelenmesi ve olumlu cevaplar alınmasından dolayı propolisin lokal olarak uygulandığında etkili olabileceği düşünülmüştür. Bunların yanı sıra propolisin taneciksiz, akışkan, toksik olmayan sıvı formunun elde edilebilmesi ve lokal olarak enjektör ile uygulanabilmesi de bu çalışmanın böyle planlanmasına imkan sağlamıştır.

Yassı ve uzun kemiklerin iyileşmesi sırası ile membranöz ve enkondriyal kemikleşme ile olmaktadır. Kallus, yeniden şekillenme safhasında oluşmaktadır ve kallus içindeki kondrositler, fibula gibi uzun kemiklerin iyileşmesi sırasında oluşan enkondriyal kemikleşme aşamasında kemik dokuya dönüşmektedir. Normal ratlarda kemik iyileşmesi çok hızlı olmaktadır ve kortikal bütünleşme 4 hafta içinde oluşmaktadır.¹²⁶ Bu nedenle bu çalışmada 4 hafta süre yeterli görülmüştür.

Korkusuz ve ark.¹²⁷ tavşan tibialarında kırık oluşturarak yaptıkları çalışmalarında, konvansiyonel radyografi ile kallus dokusunun 28. günde belirginleştiğini, buna karşılık kantitatif bilgisayarlı tomografide bu dokunun 15. günde gözlenebildiğini ve mineralizasyonun radyografide görüldüğünden daha erken bir dönemde başladığını göstermişlerdir. Konvansiyonel radyografilerin kırık iyileşmesi hakkında bilgi verdiğini, ancak bunun mekanik sağlamlılığı değerlendirmede yetersiz kaldığını belirtmişlerdir. Kallus dokusunun mineralizasyonu ve organizasyonu hakkında bilgi verecek, konvansiyonel radyografinin ötesinde kırık iyileşmesini kantitatif olarak değerlendirecek gelişmiş yöntemlere gereksinim olduğu belirtilmektedir.¹²⁷ Bu bilgiler ışığı altında, bu çalışmada oluşan kallus alanı ve mineralizasyonu radyolojik olarak değerlendirmek amacı ile konvansiyonel radyografi yerine, daha gelişmiş bir değerlendirme yöntemi olan bilgisayarlı tomografi kullanılmıştır.

Andreassen ve Oxlund¹²⁸ rat büyüme hormonu (rGH)'nun sağlam tibial diyafiz bölgesine ve kırılmış tibial diyafiz bölgesine enjeksiyonu ile lokal etkilerini araştırmışlardır. 14 gün boyunca her gün büyüme hormonu enjeksiyonu yapılmış ratlarda, çalışmanın sonucunda kırıktaki eksternal kallus boyutları ve eksternal kallus

hacmi incelenmiş ve hormon uygulanan hayvanlarda kallus hacminin arttığı, rGH'nun lokal enjeksiyonunun çok iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Nielsen ve ark.¹²⁹ yaptıkları çalışmada ratta oluşturdukları tibial kırık hattının çevresine dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) enjeksiyonu yapmışlar ve kırık hattında kallus-kemik oluşumunun arttığını bulmuşlardır.

Edwards ve ark.¹³⁰ ratların femur kemiklerinde oluşturulan kırık hattına perkutanöz recombinant insan kemik morfogenezik faktörü (rh-BMP) uygulamışlar. Ratlar histolojik incelemeleri için 1., 2., 3. ve 4. haftalarda sakrifiye edilmişler. Bu çalışmanın histolojik bulguları incelendiğinde kırık hattındaki kallusun çalışma grubunda daha büyük olduğu, kırık hattının her iki tarafında periosteal kemik oluştuğu, oluşan kemik alanındaki vaskülarizasyonun iyi olduğu görülmüş. Bu çalışmanın sonucunda perkutanöz uygulanan rh-BMP'nin kırık iyileşmesini hızlandırdığı tespit edilmiştir.

Inui ve ark.¹³¹ tavşan femurunda oluşturulmuş 10 mm uzunluğundaki defekte taşıyıcı ile birlikte fibroblast büyüme faktörü (FGF) yerleştirmişler ve 6 hafta içinde FGF yerleştirilmiş defekte yeni kemik ve kartilaj oluştuğu gözlemlenmiş. Çalışmanın sonucunda FGF'nin oluşan kallus miktarını arttırdığı rapor edilmiştir.

Schmidmaier ve ark.¹³² rat femurunda oluşturulan kemik kırığının iyileşmesini inceledikleri çalışmalarında rGH hem sistemik hem de lokal olarak uygulamışlar ve kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda rGH'nin hem lokal hem de sistemik uygulanmasının kemik iyileşmesini arttırdığı ifade edilmiştir.

Kumazawa ve ark.⁷⁸ kaempferol ve fenetil kafeat gibi antioksidan içeriğinden dolayı propolisin güçlü antioksidan özelliğinin olduğunu tespit etmişlerdir. Flavonoidlerin, propolis içindeki en etkili ve bol bulunan antioksidan madde olduğu

belirtilmektedir.⁷⁹ Moreno ve ark.⁸⁰ Arjantin propolisinde antioksidan aktivite ile flavonoit içeriğinin belirgin biçimde ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Öte yandan flavonoit içeriği ve inhibe MDA yüzdesi arasında pozitif ilişki olduğunu da saptamışlardır. Bununla beraber, flavonoit içeriğinden başka, diğer içeriklerin de antioksidan özelliğe neden olduğu belirtilmektedir.⁸¹ Çalışmamızda kullandığımız propolis örneğinin TLC yöntemi ile yapılan içerik tayininde flavonoit yapılardan pinocembrin, galangin, chrysin, kafeik asit ve kuersetin'e rastlanılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu flavonoitlerin antioksidan özellikleri tespit edilmiştir.^{82,133-137}

Cardile ve ark.⁸⁶ yaptıkları çalışmada insan kıkırdak dokusu ve kondrosit kültüründe propolis ekstraktının kronik enflamasyonda salınan anahtar moleküller olan nitrik oksit (NO) ve glikozaminoglikanlar (GAGs) üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda propolis ve onun aktif komponenti olan kafeikasit fenetil ester (CAPE)'nin interlökin-1 β (IL-1 β) üzerine çok ciddi etkileri olduğu bulunmuştur. Propolis ekstraktının sahip olduğu aktif komponentlerden dolayı kıkırdak dokuyu koruyucu ve çok iyi serbest radikal temizleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir.⁸⁶

Propolisin kokaine benzer etkinlikte anestetik⁹⁵, biyolojik dokular üzerine rejeneratif^{96,97} ve birçok tip kanser hücresi üzerine anti neoplastik etkinliği^{98,99} vardır.

Volpert ve Elstner¹³⁹ farklı etanolik ve sulu propolis ekstraktlarının lökositler ve lökositlerin myeloperoksidaz, nikotinamid adenin dinükleoit fosfat (NADPH) oksidaz ve lipoksijenaz gibi bazı önemli enzimler üzerine etkilerini incelemişlerdir. Lökosit myeloperoksidaz ve NADPH oksidaz aktivitelerinin propolis ekstraktı tarafından inhibe edildiği tespit edilmiş ve bu etkinliğin propolisin çok iyi radikal temizleme özelliğine bağlanmıştır.

Öztürk ve ark.¹⁴⁰ korneal epitelyal yara iyileşmesinde, topikal asetilkolin ve topikal propolis (sulu ekstraktı) uygulanmasının etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmada hem asetilkolinin hemde propolisin korneal epitelyal yara iyileşmesini hızlandırdığını bulmuşlardır.

Filho ve ark.¹⁴¹ propolisli ağız gargarasının modifiye Kazanjiyan metodu ile yapılan sulkoplasti işleminden sonra yara iyileşmesi üzerine etkilerini sitolojik ve klinik olarak araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda propolisin sulandırılmış alkol solusyonlu ağız gargarasının ağız içi cerrahi yaraların iyileşmesine yardımcı olduğu, antienflamatuar etki gösterdiği ve ağrı kesici etkinliğe sahip olduğu, yara yerine çok az irritan etki gösterdiği ve yara yerinin sitolojik incelemesinde de ağız içi yarada epitelizasyonun oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Filho ve Carvalho¹⁴² propolisin diş çekim soketi ve cilt yaralarının iyileşmesi üzerine etkilerini histolojik olarak incelemişler ve çalışmalarının sonucunda propolisin sulandırılmış alkol solusyonununun diş çekimi sonrası oluşan epitelyal yara iyileşmesini hızlandırdığı; fakat diş çekim soketinin iyileşmesi üzerine her hangi bir etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Stojko ve ark.¹⁴³ oluşturdukları kemik dokusu kaybı bölgesine propolisin etanolik ekstraktını uygulamışlar ve kontrol grubuna göre ossifikasyonun hızlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Bizim de yaptığımız bu çalışmada kırık hattının iyileşmesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, propolis grubunda kallusun hem daha erken geliştiği hem de daha çabuk osseöz forma dönüştüğü, osteoblastik aktivitenin daha yüksek olduğu, kallus alanının daha büyük ve kallus yoğunluğunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca

diğer arařtırmacıların¹²⁸⁻¹³² kırık iyileşmesi üzerine farklı büyüme hormonlarının (TGF- β , FGF, rGH, rh-BMP) etkilerini inceledikleri çalışmalarında bu hormonların kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışmada da kırık bölgesine enjekte edilen, lokal olarak uygulanan propolisin kırık iyileşmesini hızlandırdığına dair bulgular elde edilmiştir.

Propolisin kimyasal yapısının farklılığından kaynaklanan problemler biyolojik çalışmalarda karşımıza çıkmaktadır. Propolisin kimyasal içeriğinin belirlenmesi, çalışmalarda propolisin standardize edilmesini sağlayacaktır. Ayrıca propolisin kimyasal içeriğinin belirlenmesi ile propolisin içerdiği özel kimyasalların ve bunlarla ilişkili biyolojik aktivitelerin tespiti de sağlanabilecektir.

SONUÇLAR

Propolisin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

1. Radyolojik değerlendirme;

a. Kallus alanı değerlendirme sonuçlarına göre;

-Propolis grubunda kallus alanının 7. gün hariç diğer tüm günlerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu, gittikçe yükselen bir seyir izlediği görülmüştür.

b. Kallus matriks dansite değerlendirme sonuçlarına göre;

-Propolis grubunda KMD değerlerinin tüm günlerde kontrol grubu değerlerine göre arttığı, bunun sonucunda mineralizasyonun hızlandığı görülmüştür.

2. Histopatolojik kesitlerde;

Propolis grubunda kontrol grubuna göre;

-Kemik öncüsü hücrelerinin farklılaşmasının daha çabuk olduğu tespit edilmiştir.

-Kallusun haftalık periyotlar halindeki dönemlerinde kontrol grubuna göre daha hızlı prokallustan fibrokartilejanöz ve osseöz kallusa geçtiği görülmüştür.

-Osteoblast miktarının ve osteoblastik aktivitenin arttığı; fakat bu artma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

-Vaskülarizasyonun kontrol grubuna nazaran az olduğu; fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

-7. gün ve 14. günler sonunda kırıkta bulunan miktarının fazla ve hücreden zengin olduğu, 21. günden itibaren hızla azaldığı ve 28. günde hemen hemen hiç kalmadığı görülmüştür.

-28. günde kırık uçları arasındaki alanın tamamen reorganize kemikle dolduğu tespit edilmiştir. Kallusun daha büyük ve daha kalın olduğu da dikkati çekmektedir.

ÖZET

Kemik kırığı oluştuğunda yüksek miktarda serbest radikaller oluşmaktadır. Geçmişte yapılan çalışmalarla serbest radikalleri temizleme özelliği ispatlanan propolisin, farklı alanlarda yararlı olduğu gösterilmiştir; fakat şu ana kadar propolisin kırık iyileşmesi üzerine etkileri incelenmemiştir. Çalışmamızın amacı propolisin kırık iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmaktır.

Propolisin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada kırık sekiz adet rat kullanılmıştır. Ratlar iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup hiçbir işlem yapılmamış kontrol grubu olarak, diğer grup propolis grubu olarak kullanılmıştır. Her bir grup kendi arasında 7., 14., 21. ve 28. günler olmak üzere dört alt gruba ayrılmıştır. Tüm ratların sağ fibulaları manuel angulasyon yöntemi ile kırılmıştır. Deney grubuna %2,5 konsantrasyonda propolis 0,5 cc miktarında, kırık oluşturulduktan hemen sonra sadece bir kere olmak üzere uygulandı. 7., 14., 21. ve 28. günler sonunda ratlar sakrifiye edildiler ve ratların sağ alt ekstremiteleri radyolojik ve histopatolojik değerlendirme için kalça seviyesinden ayrıldı.

Bu çalışmadan elde edilen radyolojik ve histopatolojik veriler propolisin kırık iyileşmesini hızlandırdığını ve kemik kalitesini arttırdığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Propolis, kırık iyileşmesi, antioksidan, fenolik bileşikler

SUMMARY

When bone fractures, free radicals occur in a great amount. It has been found that propolis, which was proved to be effective in scavenging free radicals through past studies, is beneficial in various fields, but up to now effect of propolis on fracture healing has not been evaluated. Our purpose is to evaluate the effects of propolis on fracture healing.

Fourtyeight rats were used to evaluate the effect of propolis on fracture healing in this study. There was two groups; first group was used as the control group without any application, second group was as the propolis group. Each of these groups were divided into four subgroup as 7th, 14th, 21st, and 28th day. The right fibula of all rats were fractured through manuel angulation. The experimental group was started to be administered propolis 2,5% extract one time just after fracture achieved, amount of 0,5 cc. At the end of 7th, 14th, 21st, and 28th days rats were sacrificed and rats' right lower extremities were separated from hip level and then taken for radiological and histopathological evaluation.

Radiological and histopathological data obtained from this study showed that propolis accelerated bone healing and increased bone quality.

Keywords: Propolis, fracture healing, antioxidant, phenolic compounds

KAYNAKLAR

1. Anonim, 1989, Propolis Tasarısı. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara.
2. Tarım Ve Köyişleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı ANKARA – 2004 Çiftçi Eğitim Serisi Yayınları No: 2004/2.
3. Miyataka H., Nishiki M., Matsumoto H., Fujimoto T., Matsuka M. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. Biol Pharm Bull 1997;20:496–501.
4. http://www.kontak.it/e_storia.htm
5. Ege R: Travmatoloji. 5. baskı, Bizim Büro Basımevi, Ankara, s:2–61,2001.
6. Baldık Y, Talu U, Altinel L, Bilge H, Toker A: Bone healing regulated by nitric oxide: an experimental study in rat. Clin Orthop 2002;404:343–352.
7. Kılıçoğlu SS: Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. AÜ Tıp Fak Mecm 2002 55:143–150.
8. http://www.medicine.ankara.edu.tr/surgical_medicine/orthopaedics/turkish/dersler/bekirik.htm kadro7kus/khkgb.htm Ekim, 2003
9. http://www.medicine.ankara.edu.tr/surgical_medicine/orthopaedics/turkish/kadro/kus/khkgb.htm Ekim, 2003
10. Müler ME: Manuel of Internal Fixation, 3th ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p:1-3, 1991.
11. Cruess RL: Healing of bone, tendon and ligament: Rockwood CA. In: Green DP: Fractures, 2th ed., JB Lippincott Co, Philadelphia, p:147-167,1984.
12. Brinker MD, Miller MD: Bone. In: Miller MD: Review of Orthopaedics, 2th ed., W B Saunders Company, Philadelphia, p:1-22,1996.

13. Brand RA, Rubin CT: Fracture healing. In: Evans CMcM: Surgery of the Musculoskeletal System, 2th ed., Churchill-Livingstone, New York, p:93-114,1990.
14. Corbett SA, McCarthy ID, Batten J, Hukkanen M, Polak JM, Hukkanen M, Polak JM, Hugles SP: Nitric oxide mediated vasoreactivity during fracture repair. Clin Orthop 1999;365:247–253.
15. Durak K, Bilgen OF, Kaleli T: Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haemostasis in rabbits. J Int Med Res 1996;24:419–424.
16. Göktürk E: Sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesine etkisi. Acta Orthop Traumatol Turc 1997;31:353–356.
17. Frost HM: The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. Clin Orthop 1989;248:283–293.
18. Berecekcioğlu M, Uğraş S, Dilek ON, Tercan M, Özyazgan İ: Serbest radikaller. Sendrom 1998;10:85–96.
19. Hulth A: Current concepts of fracture healing. Clin Orthop 1989;249:265–284.
20. Kılıçoğlu SS: Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. AÜ Tıp Fak Mecm 2002;55:143–150.
21. Steiling H, Munz B, Werner S, Brachle M: Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. Exp Cell Res 1999;247:484–494.
22. Cornel CN, Lane JM: Newest factors in fracture healing. Clin Orthop 1992;277:297–311.

23. Baldık Y, Talu U, Altinel L, Bilge H, Yoker GA: Nitrik oksidin keik iyileşmesi üzerine olan etkisinin radyolojik incelenmesi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2000;34:190–197.
24. Frost HM: The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II: *Clin Orthop* 1989;248:294–308.
25. Çakmak M: *Ortopedi*. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, s:1–6, 1998.
26. Hepburn ve Kurstjens,1984 Hepburn H.R., Kurstjens M. On the strenthg of Propolis (Bee Glue). *Naturwissenschaften*. 1984;71:591–592.
27. Kaal J. Propolis. *Honey and Bess*. 1992;9–43.
28. Schmidt, J.O. Bee products, Chemical, Composition and Application. In Mirzahi, A., Lenskky, Y., eds. *Bee Products, Properties, Applications and Apitherapy*. New York; Plenum Pres, 1996, Vol.15:pp.16–21.
29. Volpert R., Elstner E., Biochemical Activities of Propolis Extracts. II. Phatodynamic Activities. *Z. Natuforsch*. 1993;48c:858–862.
30. Langer E. And Schilcher H. Propolis-Qualitat und Wirkungen von Prooolis bzw. Propolis-zubereitugen. *Dtsch Apoth Ztg*. 1999;37:51–63.
31. Marucci MC, Ferreres F, Bankova VS. Phenolic compounds from Brazilian popolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 2001;74:105–112.
32. Burak M., Çimen Y. Flavonoitler ve antioksidan özellikleri. *T Klin Tıp Bilimleri*. 1999,19:296–304.
33. Larion D., Armiot J. Flavonoits in food and natural antioxdants in wine. *Current Opinion in Lipidology*. 1999;10:23–28.

34. Guido R.M., Jos B.G., Ronald E. M. , Bast A. Peoxynitrite scavenging by flavonoits. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1997;236:591–593.
35. Shkenderov 1983 Schkenderoff, S. 1983 Arı Ürünleri Kitap Sofya Bulgarca.
36. 1976 Vahonina, T. B. Propolisin Yapısı Özellikleri Pratikte Uygulama İmkanları Eğitim Makalesi 1976 No:24 Moskova (S.114)-Rusça.
37. Jong-Sung P., Kun-Suk W. The usage and compolition of propolis added cosmetics in Korea. Mirzahi, A., Lenskky, Y., eds. Bee Products, Properties, Applications and Apitherapy. New York; Plenum Pres, 1996, Vol.15:pp. 121–123.
38. Popova M, Silici S, Kaftanoğlu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine 2005;12: 221–228.
39. Kartal M, Yıldız S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. J Ethnopharmacol 2003;86:69–73.
40. Stepanović S, Antić N, Dakić I, Švabić-Vlahović M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. Microbiol Res 2003;158:353–357.
41. Bosio K, Avanzini C, D’avolio A, Ozino O, Savoia D. *In vitro* activity of propolis against Streptococcus pyogenes. Lett Appl Microbiol 2000;31:174–177.
42. Amoros M, Simoes CMO, Gire L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against *Herpes simplex* virus type I in cell culture.

- Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod* 1992;55:1732–1740.
43. Amaros M, Lurton E, Boustie J, Gire L, Sauvager F, Cormier M. Comparison of the anti-*Herpes simplex* virus activities of propolis and 3-methyl-butyl-2-enyl caffeate. *J Nat Prod* 1994; 57: 644–647.
 44. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* 2001;44:375–378.
 45. Özcan M, Ünver A, Ceylan DA, Yetişir R. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. *Nahrung/Food* 2004;48:188–194.
 46. Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M, Satoh T. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull* 1997;20:496–501.
 47. Öztürk F, Kurt E, Cerci M et al. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. *Ophthalmic Res* 2000;32:13–18.
 48. Sosa S, Baricevic D, Cinco M, Padovan D, Tubaro A, Della LR. Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbial activities of propolis. *Pharmaceut Pharmacol Lett* 1997;7:168–171
 49. Gonzales R, Corcho I, Ramirez D, Rodriguez S, Ancheta O, Merino N, Gonzales A, Pascual C. Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytotherapy Res* 1995;9:114–117.
 50. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Ishii E, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine* 2001;8:16–23.

51. El-khawaga OY, Salem TA, Elshal MF. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clinica Chim Acta* 2003;338:11–16.
52. Kimoto T, Aga M, Hino K, Koya-Miyata S, Yamamoto Y, Micallef MJ, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Res* 2001;21:221–228.
53. Sun F, Hayami S, Haruna S, Ogiri Y, Tanaka K, Yamada Y, Ikeda K, Yamada H, Sugimoto H, Kawai N, Kojo S. *In vivo* antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamin C and vitamin E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J Agri Food Chem* 2000;48:1462–1465.
54. Irmak MK, Fadıllıoğlu E, Söğüt S, Erdoğan H, Güleç M, Özer M, Yağmurca M, Gözükkara ME. Effects of caffeic acid phenethyl ester and alpha-tocopherol on reperfusion injury in rat brain. *Cell Biochem Funct* 2003;21:283–289.
55. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoits. *Pharmacol Ther* 2002;96:67-202.
56. Kiderman A, Torten R, Furst AL, Reinus K. Bi-lateral eosinophilic ulcers in an infant treated with propolis. *J Dermatolog Treat* 2001;12:29–31.
57. Munker R, Andreeff M. Induction of death (CD95/FAS), activation and adhesion molecules (CD54) on blast cells of acute myeloenous leukemias by TNF- α and IFN- γ . *Cytokines Mol Ther* 1996;2:147–159.
58. Bratter C, Tregel M, Liebenthal C, Volk HD. Prophylactic effectiveness of propolis for immunostimulation: a clinical pilot study. *Forsch Komplementarmed* 1999;6:256–260 (abstract).

59. Paintz M, Metzner J. On the local anaesthetic action of propolis and some of its constituents. *Pharmazie* 1979;34:839–841 (Abstract).
60. Metzner J, Bekemeier H, Schneidewind E, Schwaiberger R. Bioautographische erfassung der antimikrobiell wirksamen inhaltstoffe von propolis. *Pharmazie* 1975;30:799–800.
61. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med* 1994;60:222–227.
62. Aga H, Shibuya T, Sugimoto T, Kurimoto M, Nakajima S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994;58:945–946.
63. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001; 15: 561–571.
64. Volpert R, Elster EF. Interactions of different extracts of propolis with leukocytes and leukocytic enzymes. *Arzneimittelforschung* 1996;46:47–51.
65. Wojcicki J, Amochowiec L, Kadlubowska D, Kownacka A. Study on the antioxidant properties of pollen extracts. *Arch Immunol Ther Exp* 1987;35:725–729.
66. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;55:441–449.

67. Harish Z, Rubinstein A, Golodner M, Elmaliah M, Mizrahi Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Exp Clin Res* 1997;23:89–96.
68. Matsuno T, Jung SK, Matsumoto Y, Saito M, Morikawa J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res.* 1997;17:3565–3568.
69. Buscigho, J.A. 1988. Anti-inflammatgory topical compositions containing lidocaine and diphenhydramine [and propolis]. USA Patent No.4 748 002, 5 pp.
70. Iwasaki, M. 1990. Propolis -containing antibiotic ointments for atopic dermatitis treatment. Japanese Patent No. JP 02 142 734 [90 142 734], 2 pp.
71. Dubaj, J.1988. Agent for the regeneration of damaged tissue containing pantothenic acid zinc, and extract of propolis. Czech Patent No. CS 253 424, 13 pp.
72. 1980 Popravko, S. A., Sokolov I. V. Propolisin Bitkisel Kaynakları Arıcılık Dergisi 1980 No:2-Ruşça.
73. Hay KD, Greig DE. Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;70:584–586.
74. Ledon N, Casaco A, Gonzalez R, Bracho J. Assessment of potential dermal and ocular toxicity and allergic properties of an extract of red propolis. *Arch Dermatol Res* 2002;293:594–596.
75. Callejo A, Armentia A, Lombardero M, Asensio T. Propolis, a new bee-related allergen. *Allergy* 2001;56:579.

76. Gülbahar O, Öztürk G, Erdem N, Kazandı AC, Kokuludağ A. Psoriasiform contact dermatitis due to propolis in a beekeeper. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;94:509–511.
77. Ting PT, Silver S. Allergic contact dermatitis to propolis. *J Drugs Dermatol* 2004;3:685-686.
78. Kumazawa S, TamasakaT, Nakayama T. Antioxidant acitivity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 2004;84:329–339.
79. Scheller S., Wilczok T., Imielski S. Free radical scavenging by ethanolic extract of propolis. *International Journal of Radiation Biology*. 1990;57:461–465.
80. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AT. Comparison of the free radical-scavenging acitivity of propolis from severalregions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*.2000;71:109–114.
81. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AT. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2001;76:165–170.
82. Russo, R. Longo, A. Vanella. Antioxidant activity of propolis: role of ceffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73 Suppl. 1 ;S21-S29.
83. Hamasuk T, Kumazawa S, Fujimoto T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. *Food Sci Technol Res* 2004;10:86–92.
84. Song SY, Jin C, Jung KJ, Park E. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacogy*.2002;82:89–95.
85. Natarajqan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acit phenethyle ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear

- transcription factor NR- κ B. Proceedings of National Academy of Science of the United State of America. 1996;93:9090–9095.
86. Cardile V, Panico A, Gentile B, Borrelli F, Russo A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sciences* 2003;73:1027–1035.
 87. Verma AK, Johnson JA, Gould MN. Inhibition of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene and N-nitrosomethylvera-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* 1998;48:5754–5758.
 88. Deschner EE, Ruperto J, Wonk G. Quercetin and rutin as inhibitors of azocymethanol induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis.* 1991;12:771–775.
 89. Ozkul Y, Silici S, Eroğlu E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine.* 2005;12:742–747.
 90. A.Russo, Cardile V., Sanchez F., Troncoso N., Vanella A., Garbarino J.A. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences* 2004;76:545–558.
 91. Borrelli F, Maffia P, Pinto L. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002;73:S53-S63.
 92. SV Kosenko, TI Kosovich. The treatment of periodontitis with prolonged-action propolis preparations (clinical x-ray research). *Stomatologia Mosk* 1990;69:27–29.
 93. Z Szmeja, B Kulczynski, K Konopki. Therapeutic value of flavonoids in Rhinovirus infections. *Otolaryngol Pol.* 1989;43:180–184.

94. J Serkedjieva, N Manolova, V Bankova. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *J Nat Prod.* 1992;5:294–302.
95. M Paintz, J Metzner. On the local anaesthetic action of propolis and some of its constituents. *Pharmazie.* 1979;34:836–841.
96. A Stojko, S Scheller, Z Obuszko. *Arzneim- Forsch.* 1978;28:35–37.
97. A Stojko, S Scheller, Z Obuszko. Biological properties and clinical application of propolis. VI. Investigation of the influence of ethanol extracts of propolis (EEP) on cartilaginous tissue regeneration. *Arzneimittelforschung. Arzneim- Forsch.* 1977;27:2138–2140.
98. T Kimoto, S Arai, M Kohguchi. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev* 1998;22:506–515.
99. AH Banskota, Y Tezuka, I Saiki. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities *J Nat Prod* 1998;61:896–900.
100. Hausten B. Flavonoits, a class of natural products of high pharmacolohical potency. *Biochemical Pharmacology.* 1983;32:1141–1148.
101. Wleklik M, Zahoska R. Interferon-induciing activity of flavonoits. *Acta Microbiolica Poland.* 1997;32:1141–1148.
102. Orsollic N, Sver L, Terzic S. Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasing ability: a possible mode of antitumor action. 2003;47:156–163.

- 103.** Krell R. 1996. Value-Added Products From Beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124 Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- 104.** Scheller S, Ilewics L, Luciak M. Biological properties and clinical application of Propolis IX. Investigation of the influence of EEP on dental pulp regeneration. *Arzneim Forsch* 1978;28:289–291.
- 105.** Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995;26:83–99.
- 106.** Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002;73:S1-S6.
- 107.** Popova M, Silici S, Kaftanoğlu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*. 2005;12:221–228.
- 108.** Bilaloğlu GV, Harmandar M: Flavonoidler, Bakanlar Matbaacılık Ltd. Şti. p.343–343, İstanbul 1999
- 109.** Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T: Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 2004;84:329-339.
- 110.** Caridile V et al: Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sciences* 2003;73:1027–1035.
- 111.** Nagai T et al: Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry* 2001;75:237–240.
- 112.** Fussa A et al: Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences* 2004;76:545–558.

113. Müller ME: Manuel of internal fixation, 3th ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p:1-3, 1991.
114. Allen HL, Wase A, Bear WT: Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 1980;51:595–600.
115. Sarisozen B, Durak K, Dincer G, Bilgen OF: The effects of vitamins E and C on fracture healing in rats. *J Int Med Res* 2002;30:309–313.
116. Yorgancıgil H, Özerdemoğlu RA, Korkusuz F, Erdoğan N: Nikotinin sıçanlarda kırık iyileşmesi üzerindeki etkileri. *Artroplasti Artroplastik Cerrahi* 1998;9:32–35.
117. Hatcher JE, Lemons JE, Matukas VJ, Compton RC: Laboratory animal studies of apatite and collagen biomaterials. *J Dent Res* 1986;65:347.
118. Block MS, Kent JN: A comparison of particulate and solid forms of hydroxyapatite in dog extraction sites. *J Oral Maxillofac Surg* 1986;44:289–293.
119. Boeto J, Freeman E: Histologic evaluation of durapatite in experimental defects. *J Canad Assoc* 1984;50:239-244.
120. De Vore: Collagene xenografts for bone replacement: The effects of aldehyde-induced cross-linking on degradation rate. *Oral Surg* 1977;43:677-686.
121. Alberius P, Johnell O: Repair of membranous bone fractures and defects in rats. *J Cranio Maxillofac Surg* 1991;19:15-20.
122. Guglielmotti MB et al: Increased osteogenesis in alveolar wound healing elicited by demineralized bone powder. *J Oral Maxillofac Surg* 1990;48:487–491.

123. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T: Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 2004;84:329–339.
124. Aliyazıcıoğlu Y, Değer O, Ovalı E, Barlak Y. Effect of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1652–1657.
125. Al-Shader A et al: Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endo* 2004;30:359–361.
126. Hoshino T, Muranishi H, Saito K, Notoya K, Makino H, Nagai H, Sohma T, Ogawa Y. Enhancement of fracture repair in rats with streptozotocin-induced diabetes by a single injection of biodegradable microcapsules containing a bone formation stimulant, TAK-778. *J Biomed Mater Res.* 2000;51:299–306.
127. Korkusuz F, Akın S, Akkus O, Korkusuz P: Assessment of mineral density and atomic content of fracture callus by quantitative computerized tomography. *J Orthop Sci* 2000;5:248–255.
128. Andreassen TT, Oxlund H. Local anabolic effects of growth hormone on intact bone and healing fractures in rats. *Calcif Tissue Int* 2003;73:258–264.
129. Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H. Local injection of TGF- β increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 1995;65:37–41.
130. Edwards RB 3rd, Seeherman HJ, Bogdanske JJ, Devitt J, Vanderby R Jr, Markel MD. Percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a calcium phosphate paste accelerates healing of a canine tibial osteotomy. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86:1425–1438.

- 131.** Inui K, Maeda M, Sano A, Fujioka K, Yutani Y. Local applicaion fof basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calsif Tissue Int* 1998;63:490–495.
- 132.** Schmidmaieer G, Wildemann B, Heeger J, Gabelein T. Improvement of fractre healing by systemic administration of growth hormone and local aplicaiton of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β 1. *Bone* 2002;31:165–172.
- 133.** Santos AC, Uyemura SA, Lopes JL, Bazon JN, Mingatto FE, Curti C. Effect of naturally occurring flavonoits on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:1455–1461.
- 134.** Rossi A, Longo R, Russo A, Borrelli F, Sautebin L. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia.* 2002;73 Suppl 1:S30–37.
- 135.** Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoits. *Int J Antimicrob Agents.* 2005 Nov;26(5):343–356. Review. Erratum in: *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27:181.
- 136.** Sala A, Recio MC, Schinella GR, Manez S, Giner RM, Cerda-Nicolas M, Rosi JL. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur J Pharmacol.* 2003;461:53–61.
- 137.** Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res.* 2005;160:189–195.

138. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoits. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;33:1061–1080.
139. Volpert R, Elstner EF. Interactions of different extracts of propolis with leukocytes and leukocytic enzymes. *Arzneimittelforschung*. 1996;46:47–51.
140. Ozturk F, Kurt E, Inan UU, Emiroglu L, Ilker SS. The effects of acetylcholine and propolis extract on corneal epithelial wound healing in rats. *Cornea*. 1999;18:466–471.
141. Magro-Filho O, de Carvalho AC. Topical effect of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technique. Cytological and clinical evaluation. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1994;36:102–111.
142. Magro Filho O, de Carvalho AC. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1990;32:4-13.
143. Stojko A, Scheller S, Szwarnowiecka I, Tustanowski J, Ostach H, Obuszko Z. Biological properties and clinical application of propolis. VIII. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on the regeneration of bone tissue. *Arzneimittelforschung*. 1978;28:35–37.

ÖZGEÇMİŞ

5.10.1979 tarihinde Hollanda'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Ankara'da tamamladım. 1997 yılında yüksek öğrenimime başladığım Hacettepe Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesinden 2002 yılında mezun oldum. 2002 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesinde araştırma görevlisi olarak göreve başladım.

TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen ve büyük emekleri olan değerli hocalarım Yard. Doç. Dr. Hasan Yeler'e, Prof. Dr. Zeynep Sümer'e en içten saygılarımı ve Őükranlarımı sunarım.

Tezimin hazırlanmasında büyük emeklerinden dolayı Prof. Dr. Orhan Değer, Doç. Dr. Münevver Sökmen, Teknisyen Ahmet Acar ve Veteriner Hekim Dr. Yücel Yalman'a teşekkürü borç bilirim.