



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**LOKAL ANTİOKSİDAN AJANLARIN RATLARDAKİ
KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Halit FURUNCUOĞLU

**Samsun
Nisan-2016**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

LOKAL ANTİOKSİDAN AJANLARIN RATLARDAKİ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Dt. Halit FURUNCUOĞLU

Danışman

Doç.Dr. Emel BULUT

Samsun

Nisan-2016

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle bana her zaman yol gösterip destekleyen, en zor günlerimde bana sahip çıkan, hayatım boyunca öğrencisi olmaktan daima gurur duyacağım, danışman hocam Sayın Doç.Dr. Emel BULUT'a;

Tezime olan katkılarından dolayı tez izleme jürimdeki Sayın hocalarım Prof.Dr.Nergiz YILMAZ ve Doç.Dr. B. Zuhâl ALTUNKAYNAK' a;

Doktora öğrenimim boyunca bana öğrettikleri herşey, gösterdikleri güleryüz ve yardımları için Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Mahmut SÜMER'e ve Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma;

Çalışmamızı PYO.DIS.1904.12.012 nolu proje ile destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Komisyonuna;

Tezım konusunda değerli fikirlerinden faydalandığım Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Ahmet GÜLER ve Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr. Cevat NİSBET'e, tezimde kullanacağım ekstrelerin hazırlanması ve analizlerinin yapılması konusunda bana yardımcı olan ve laboratuvarını bana açan Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Hasan KOCAOKUTGEN ve asistanı Zeynep OYUKTAŞ'a;

Cerrahi deneylerin yapıldığı DEHAM çalışanlarına, cerrahi deneylerde bana yardımcı olan dostlarım Yrd.Doç.Dr. Akif TÜRER, Dr. Enes ÖZKAN, Dr. Mustafa KAYNAR ve Dt. Halil İbrahim EVMEK'e, yardımlarını esirgemeyen histoloji bölümü öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Mehmet Emin ÖNGER'e ve başta Araş. Gör. Gamze ALTUN ve Araş. Gör. Adem KOCAMAN olmak üzere tüm histoloji bölümü asistanlarına;

En güzel dostlukları yaşatan gelmiş geçmiş tüm bölüm arkadaşlarıma;

Hayatım boyunca her zaman bana duydukları güven, gösterdikleri sevgi ve fedakârlıklar ile beni bugünlere getiren, dualarını hiçbir zaman eksik etmeyen aileme;

Desteklerini her zaman hissettiğim sevgili kayınpederim ve kayınvalideme;

Bir an olsun bana olan desteğini esirgemeyen, kendisine layık olmak için uğraş verdiğim, hayatımda tanıdığım en mükemmel insan, sevgili eşim Fatma FURUNCUOĞLU'na ve her yaptığıyla beni sürekli şaşırtmayı başarabilen, bana gerçek sevgiyi öğreten oğlum Ömer'e;

EN İÇTEN TEŞEKKÜRLERİMLE...

ÖZET

LOKAL ANTIOKSİDAN AJANLARIN RATLARDAKİ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Amaç: Bu çalışmanın amacı antioksidan özelliğe sahip propolis, üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd kanama durdurucunun ratlardaki kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada 64 adet dişi erişkin, Wistar-Albino cinsi rat kullanıldı. Ratların kalvaryalarında 5mm'lik trefin frez ile standart kemik defektleri açıldı. Defektlerin içine defektle aynı boyutta jelatin sünger yerleştirildi. Defekt bölgesi, 16 denekte 0,5 ml serum fizyolojik (SF) ile (Kontrol grubu), 16 denekte 0,5 ml Propolis ile (Propolis grubu), 16 denekte 0,5 ml üzüm çekirdeği ekstresi ile (Üzüm grubu), 16 denekte 0,5 ml Ankaferd kanama durdurucu ile (Ankaferd grubu) irriga edildi. Ardından defektler primer olarak kapatıldı. Gruplardaki deneklerin yarısı 14. günde (Kontrol14, Propolis14, Üzüm14, Ankaferd14), diğer yarısı 28. günde sakrifiye edildi (Kontrol28, Propolis28, Üzüm28, Ankaferd28). Rat kalvaryalarından örnekler alınarak histopatolojik olarak incelendi. Propolis, üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd'in DPPH serbest radikali süpürme aktiviteleri ve toplam fenolik madde miktarları belirlendi.

Bulgular: Histolojik değerlendirme sonucunda primer kemik hacmi Üzüm14 ve Ankaferd14 grubunda Kontrol14 grubundan, Propolis28 grubunda diğer tüm gruplardan; Bağ dokusu hacmi Ankaferd14 grubunda Kontrol14 grubundan, Propolis28 grubunda Kontrol28, Üzüm28 ve Ankaferd28 gruplarından; Yeni damar hacmi Propolis14, Üzüm14 ve Ankaferd14 gruplarında Kontrol14 grubundan, Propolis28 grubunda ise Kontrol28, Üzüm28 ve Ankaferd28 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi en yüksek bulunanlar sırasıyla propolis, üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd, toplam fenolik madde miktarı en yüksek bulunanlar ise sırasıyla propolis, Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresi olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışma sonucunda üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd'in erken dönemde (14 gün), propolisin ise geç dönemde (28 gün) daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ankaferd kanama durdurucu; Antioksidan; Kemik iyileşmesi; Propolis; Üzüm çekirdeği ekstresi

Halit FURUNCUOĞLU, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Nisan-2016

ABSTRACT

THE EFFECT OF LOCAL ANTIOXIDANT AGENTS ON BONE HEALING OF RATS

Aim: The purpose of this study to investigate the effects of propolis, grape seed extract and Ankaferd blood stopper which are antioxidant products on bone healing of rats.

Material and Method: We used 64 Wistar female rats were randomly divided into 4 groups. 5mm in diameter bone defects were created on the calvaria of the rats with trephine. Gelatine sponge was placed on the defect. Irrigation was performed on the defect area with 0.5ml SF in Control group, with 0.5ml Propolis in Propolis group, with 0.5ml grape seed extract in Grape group and with 0.5ml Ankaferd blood stopper in Ankaferd group. Then the defect was closed primarily. Half of the rats were sacrificed on 14th day (Control14, Propolis14, Grape14, Ankaferd14), the other half were sacrificed on 28th day (Control28, Propolis28, Grape28, Ankaferd28). Samples were collected from the calvaria of the rats and examined histopathologically. DPPH free radical scavenging activity and total phenolic content of propolis, grape seed extract and Ankaferd blood stopper were determined.

Results: Primary bone volume of the Grape14 and Ankaferd14 groups were significantly higher compared with the Control14 group, the Propolis28 group was significantly higher compared with all other groups ($p<0.05$). Connective tissue volume of the Ankaferd14 group was significantly higher compared with the Control14 group, the Propolis28 group was significantly higher compared with Control28, Grape28 and Ankaferd28 groups ($p<0.05$). New vessel volume of the Propolis14, Grape14 and Ankaferd14 groups was significantly higher compared with the Control14 group, the Propolis28 group was significantly higher compared with Control28, Grape28 and Ankaferd28 groups ($p<0.05$). Those with the highest DPPH free radical scavenging activity were propolis, grape seed extract and Ankaferd, those with the highest total phenolic content were propolis, Ankaferd and grape seed extract respectively.

Conclusion: We concluded that grape seed extract and Ankaferd are more effective in early periods (14 days) of healing, while propolis in late periods (28 days) of healing.

Keywords: Ankaferd blood stopper; Antioxidant; Bone healing; Grape seed extract; Propolis

Halit FURUNCUOĞLU, Ph.D. Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, April-2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

BMP	: Bone morphogenetic protein
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DPPH	: 2,2-difenilpikrilhidrazil radikali
DPPH-H	: Radikal olmayan 2,2-difenilpikrilhidrazil
EC₅₀	: Etkili konsantrasyon
G	: Gram
GAEs	: Gallik asit eşdeğeri
GPx	: Glutasyon peroksidaz
IGF	: Insulin-like growth factor
IL	: İnterlökin
Kg	: Kilogram
Koah	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LDL	: Low density lipoprotein
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mm³	: Milimetreküp
MÖ	: Milattan önce
Nm	: Nanometre
°C	: Santigrad derece (Celsius)
OMU	: Ondokuz Mayıs Üniversitesi
PDGF	: Platelet-derived growth factor
rhBMP-2	: Recombinant human bone morphogenetic protein-2
RME	: Rapid maxillary expansion
Rpm	: Revolutions per minute
SF	: Serum fizyolojik
SOD	: Süperoksit dismutaz
TGF- α	: Transforming growth factor alpha
TGF- β	: Tissue growth factor-beta
TNF- α	: Tumor necrosis factor alpha
UV	: Ultraviolet

VEGF : Vascular endothelial growth factor

mg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemiğin Tanımı ve Bileşenleri.....	3
2.1.1. Kemik Matriksi.....	3
2.1.2. Kemik Hücreleri	5
2.1.3. Kemik Zarları.....	8
2.2. Kemik İyileşmesi	9
2.3. Serbest Radikaller	11
2.3.1. Serbest Radikallerin Kaynakları.....	12
2.3.2. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri.....	13
2.4. Antioksidanlar.....	15
2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	15
2.4.2. Antioksidanların Etki Mekanizması	17
2.4.3. Antioksidanların Terapötik Etkisi.....	17
2.5. Çalışmamızda Kullanılan Antioksidan Materyaller	18
2.5.1. Propolis	18
2.5.2. Üzüm Çekirdeği Ekstresi.....	23
2.5.3. Ankaferd Kanama Durdurucu.....	26
2.6. Kontrollü Salınım Yöntemleri	28
2.6.1. Kemik İyileşmesinde Kullanılan Kontrollü Salınım Yöntemleri.....	29
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Cerrahi Teknik	31
3.2. Histolojik Değerlendirme	33
3.3. Stereolojik Yöntem	35
3.4. İstatistiksel Analiz.....	36
3.5. Ekstrelerin Hazırlanması.....	36
3.5.1. Propolis	36

3.5.2. Üzüm Çekirdeği Ekstresi	39
3.5.3. Ankaferd Kanama Durdurucu	40
3.6. DPPH Serbest Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini	41
3.7. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini (Folin-Ciocalteu Metodu)	43
4. BULGULAR	44
4.1. Histolojik Bulgular	44
4.1.1 Kontrol Grubu	44
4.1.2 Propolis Grubu	45
4.1.3. Üzüm Grubu	46
4.1.4. Ankaferd Grubu	47
4.2. Stereolojik Bulgular	48
4.2.1. Kemik Hacmi	48
4.2.2. Bağ Dokusu Hacmi	50
4.2.3. Damar Hacmi	52
4.3. DPPH Serbest Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini	53
4.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini (Folin-Ciocalteu Metodu)	55
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	73
EKLER	89
EK 1- Etik Kurul Onayı	89
ÖZGEÇMİŞ	90

1.GİRİŞ

Ağız, diş ve çene cerrahisinde yumuşak doku ve kemik dokusu, çalışma sahasının temelini oluşturmaktadır. Diş çekimi, implant uygulamaları, protetik tedavi öncesi sert ve yumuşak doku düzenlemeleri, kist ve benzeri oluşumların, çene tümörlerinin veya çene kırıklarının tedavisi sonrasında yara iyileşmesinin komplikasyonsuz ve kısa sürede gerçekleşmesi tedavinin başarısında büyük bir öneme sahip olmaktadır.

Kemik dokusu; rejeneratif kapasitesi yüksek ve tam olarak iyileştiğinde orijinal yapı ve fonksiyonuna tekrar sahip olabilen bir yapıya sahiptir (Lindhe ve Meyle, 2008). Ancak bazı durumlarda (örn. Büyük kemik defektleri) kemik iyileşmesi gecikmekte hatta tam iyileşme olmayabilmektedir (Luginbuehl ve ark., 2004).

Kemik iyileşmesi sırasında oluşabilecek komplikasyonların en sık görüldüğü dönem iyileşme safhasının ilk 1-2 haftasıdır. Dolayısı ile bu dönem oldukça kritik bir öneme sahiptir (Kalfas, 2001). Bu kritik dönemde uygulanacak tedavi programının oluşturabileceği olumlu ya da olumsuz etki, cerrahi işlemin başarısını doğrudan etkileyebilmektedir.

Günümüzde yapılan çalışmalarda kemik iyileşmesinin karmaşık bir mekanizma olduğu, bu mekanizmayı da doğrudan veya dolaylı etkileyen pek çok faktörün bulunduğu kabul edilmektedir (Ågren ve ark., 2014; Ding ve ark., 2014).

Kemik iyileşme mekanizmasını etkileyen faktörlerden biri de oksidatif stresdir (Prasad ve ark., 2003). Oksidatif stres, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin dokuda çoğalarak, kendilerini nötrleyecek olan antioksidanlardan fazla hale gelmesi sonucu dokunun hasar görme riskiyle karşılaştığı durum olarak tanımlanmaktadır (Chandra ve ark., 2015). Oksidatif stresin ortadan kaldırılabilmesi için serbest radikallerin antioksidan maddeler tarafından etkisiz hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla antioksidan maddeler vücudun oksidatif strese karşı zayıf kaldığı durumlarda eksojen olarak kullanılabilir (Durak ve ark., 1996).

Kemik iyileşmesinin biyolojisi ile ilgili son yıllarda çok sayıda çalışma yapılmış olup, genelde bu çalışmalarda kemik iyileşmesinin hızlandırılması amaçlanmaktadır (Gao ve ark., 2015; Saito ve ark., 2015; Watanabe ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda, kemik iyileşme problemlerinin ortaya çıkmasını engelleyen,

kallus oluşumunu, yeniden şekillenmeyi ve mineralizasyonu destekleyen yardımcı tedavi yöntemlerinin biyolojik bir destek sağlayacağı ne sürülmektedir (Munker ve Andreeff, 1996; Haenen ve ark., 1997). Bunun sonucu olarak kemik iyileşmesini desteklemek ya da geliştirmek için çeşitli biomateryallerden faydalanılmaktadır (Carneiro ve ark., 2005).

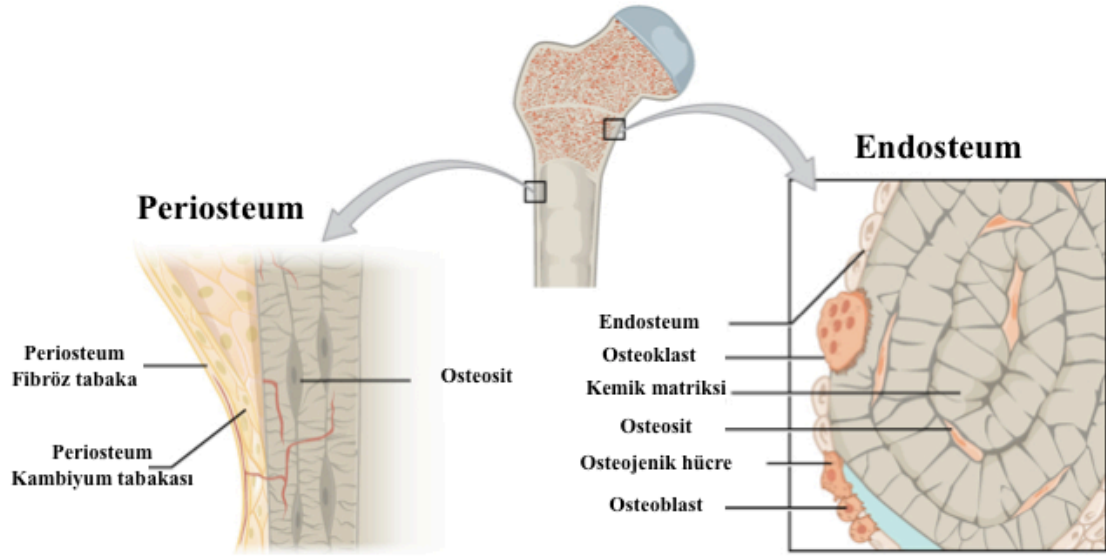
Yardımcı tedavi yöntemleri olarak doğal kaynaklı ve antioksidan özelliğe sahip olan propolis (Sun ve ark., 2000; Gavanji ve Larki, 2015) ve üzüm çekirdeği ekstresi (Jovanovic ve ark., 1994; Monagas ve ark., 2003) ve Ankaferd kanama durdurucudan (Goker ve ark., 2008; Kosar ve ark., 2009; Hasgul ve ark., 2014; www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008_1.pdf, 2015) faydalanılmaktadır.

Bu çalışmada lokal olarak uygulanan ve antioksidan özelliğe sahip doğal kaynaklı ürünler olan propolis, üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd kanama durdurucunun ratlardaki kemik iyileşmesi üzerine olan etkileri araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemiğin Tanımı ve Bileşenleri

Kemik; mineralize organik matriks ve içerisinde gömülü olan hücrelerden meydana gelmektedir. Metabolik olarak ise kemik; aktif hücrelerin rijid bir iskelet yapı üzerine entegre olmuş dinamik yapıdaki biyolojik bir dokudur (Kalfas, 2001). Kemiğin dış yüzü periosteum, iç yüzeyi (medulla) ise endosteum denilen bir zarla döşelidir (Netter ve ark., 1987) (Şekil 1).



Şekil 1. Kemiğin bileşenleri (<http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, 2015)

2.1.1. Kemik Matriksi

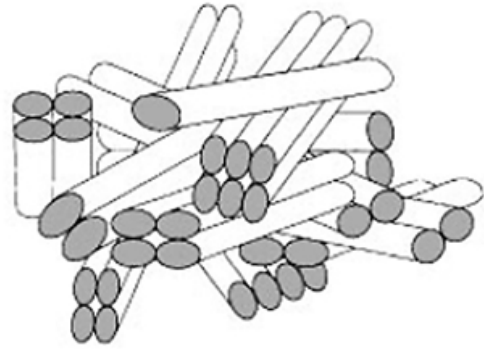
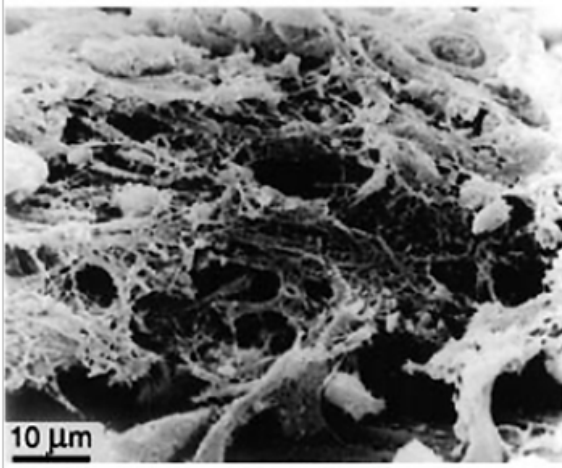
Kemik matriksi organik (%30) ve inorganik bileşenlerden (%70) oluşmaktadır. İnorganik kısmı ise başlıca hidroksiapatit ve kalsiyum, fosfat gibi tuzlardan meydana gelmektedir (Hall, 2005). Vücuttaki kalsiyumun % 99'u, fosforun % 85'i, magnezyum ve sodyumun % 40-60'ı iskelet sisteminde bulunmaktadır. Kalsiyum ve fosfat; hidroksiapatit kristalleri şeklinde olup, kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte iç içe organize olmuş olarak bulunmaktadır. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, osteoid mineralizasyonu sayesinde, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır (Junqueira LC, 2003).

Matriksin organik kısmı ise başlıca kollajenden meydana gelmektedir ve organik matriksin yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır (Hall, 2005). Geri kalanı ise

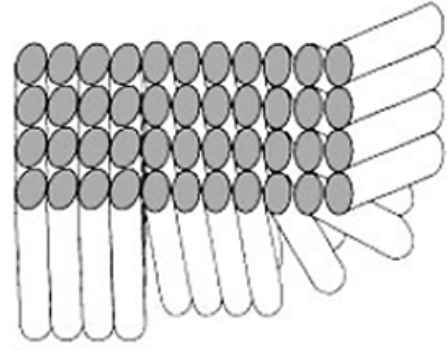
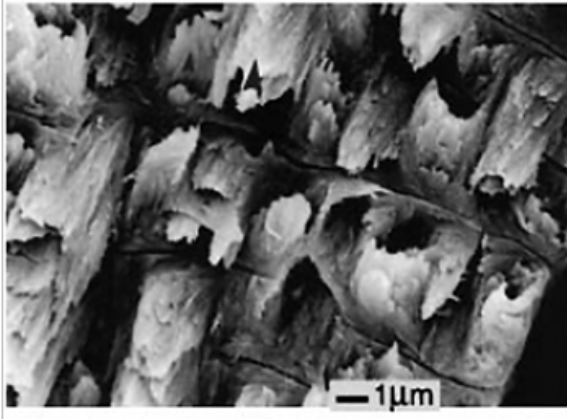
hiyaluronik asit ve kondroitin sülfat gibi proteoglikanlardan meydana gelen ve ana madde olarak adlandırılan homojen bir sıvıdan oluşmaktadır (Hall, 2005). Kollajen aynı yönde ilerleyen ince lifler halinde bulunmaktadır ve bu özellik kemiğe gerilme direnci sağlarken kesme gerilimi oluşmasını da engellemektedir. Sıvı olan ana maddenin fonksiyonu ise tam olarak bilinmemektedir (Hall, 2005).

Kollajen dizilimlerine göre mikroskopik olarak iki farklı kemik tipi tanımlanmaktadır;

- Örgülü kemik (Woven bone), Kollajen liflerinin rasgele dizilmesiyle karakterizedir ve mekanik olarak zayıf olmaktadır (Şekil 2).
- Tabakalı kemik (Lamellar bone), kollajen tabakalar halinde düzenli bir paralel hizalama halindedir ve mekanik olarak güçlü olmaktadır (Kierszenbaum, 2002) (Şekil 3).



Şekil 2. Örgülü kemik (Beniash'dan, 2011)



Şekil 3. Tabakalı kemik (Beniash'dan, 2011)

Kollajenin lifli yapısı kemiğe gerilme direnci sağlarken, hidroksiapatit kristalleri ise kemiğin basınç altında dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Bu özellikler sinerjik etki göstererek kemiğin dayanıklılığını artırmaktadır (Hall, 2005).

Kemik matriksi dinamik bir yapıya sahip olup, tam bileşimi zamana ve beslenmeye bağlı olarak değişebilmektedir (Junqueira LC, 2003).

2.1.2. Kemik Hücreleri

Kemikte dört farklı tip hücre yer almaktadır: Osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar (Kierszenbaum, 2002).

Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör kelimesi yunanca kökenli bir sözcüktür. Osteon: kemik; pro: önce; genesis: soy anlamına gelmektedir. Periosteumun iç kenarında, endosteumda ve haversian kanallarında bulunmaktadırlar. Osteoprogenitör hücreler mezenşim kökenlidirler. Bu hücrelerin bir kısmı osteoblast hücrelerine farklılaşmakta, bir kısmı ise bölünerek kemik büyümesinde aktif olarak rol almaktadır. Oksijen konstantrasyonunun düşük olduğu durumlarda ise kondrojenik hücrelere dönüşebilmektedirler. (Gartner ve Hiatt, 2007)

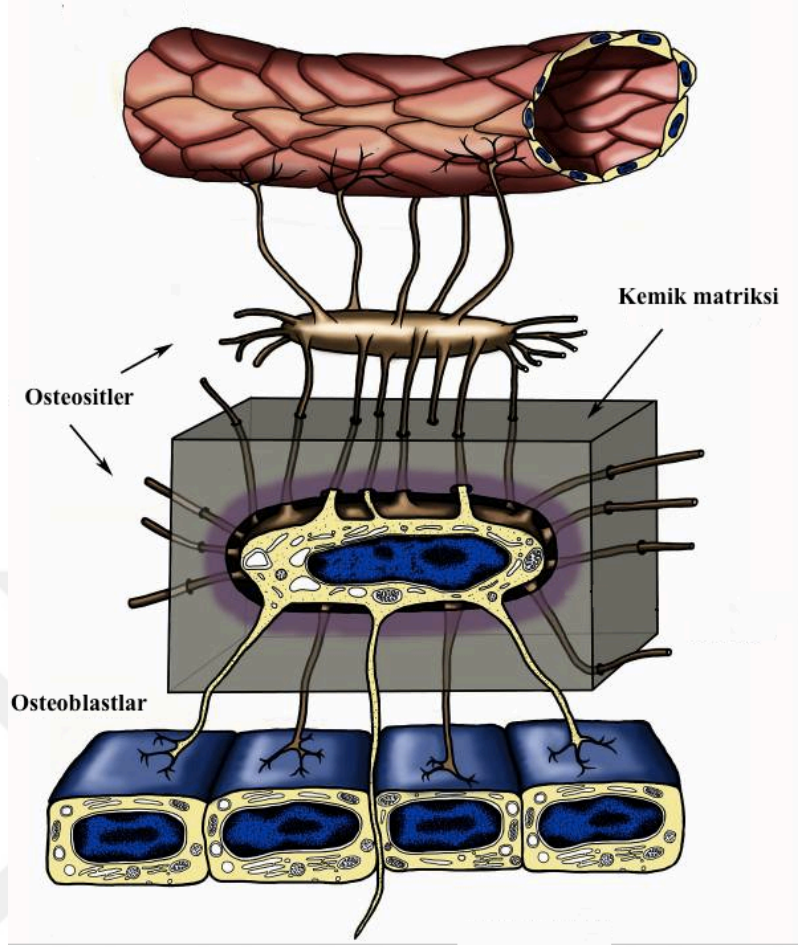
Osteoblastlar

Osteoblast kelimesi yunanca kökenlidir ve osteon: kemik; blastano: çimlenmek anlamına gelmektedir. Osteoblast; tek ve iri bir nükleusa sahip bir hücre olup ve kemik organik matriksini sentezlemektedir (Şekil 4). Kübik ya da alçak prizmatik şekilli olabilmektedir. Osteoblastlar kollajen (Tip I), osteoid doku, glikoprotein, proteoglikan

ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, osteoprotegerin gibi bazı önemli proteinleri salgılamaktadırlar. Ayrıca kemik rejenerasyonu için önemli olan, BMP (bone morphogenic protein), IGF-I, IGF-II, TGF- β , IL-1, PDGF gibi sinyal proteinlerini salgılamaktadırlar. Kemik yapımı durmaya başladığında bazı osteoblastlar kendi oluşturdukları matris içinde kalarak osteositlere, bazıları ise periosteum ve endosteum örtücü yüzey hücrelerine dönüşmektedir (Kierszenbaum, 2002; Junqueira LC, 2003).

Osteositler

Osteosit olgunlaşmış kemikte en sık rastlanan hücredir ve yıldız şekillidirler (Şekil 4). Ortalama yarı ömrü 25 yıldır. Osteositler bölünmemektedirler. Osteositlerin bir kısmı osteoprogenitör hücrelerden bir kısmı ise osteoblastlardan derive olmaktadır. (Tate ve ark., 2004). Kemik matrisi içindeki lakün olarak isimlendirilen küçük boşluklara yerleşmiş halde bulunmaktadır. Osteositlerin diğer osteositlerle ağ oluşturmalarını sağlayan sitoplazmik uzantıları bulunmaktadır. Lakünlerde bulunan kanaliküller vasıtasıyla diğer lakünlere ve kan damarlarına bağlanmaktadır. Lokal çevre faktörlerinden etkilenmektedirler ve bunun sonucunda siklik adenosin monofosfat (cAMP), osteokalsin ve IGF faktörlerini salgılamaktadırlar. Bu faktörler öncül osteoblastların sayısının artmasını ve kemikte kemik apozisyonu ve remodelingin başlamasını sağlamaktadır. Osteositlerin diğer görevi ise ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun düzenlenmesinde aktif rol almalarıdır (Kierszenbaum, 2002; Junqueira LC, 2003).



Şekil 4. Osteoblastlar ve osteositler (Dallas ve ark., 2013'den uyarlanmıştır)

Osteoklastlar

Osteoklast kelimesi Yunanca kökenli olup osteon: kemik; klast: parçalanmış anlamına gelmektedir. Osteoklastlar kemik dokusunu rezorbe eden hücrelerdir. Bu fonksiyon kemiklerdeki tamir ve yeniden şekillenme için çok önemlidir. Bu hücreler; kemikte organik ve inorganik matriksi ve kalsifiye kartilajı rezorbe etmektedir. Bunun için kollajenaz ile diğer proteolitik enzimleri salgılamaktadır. Bu işlem sonunda ortaya çıkan eroziv alanlara "Howship Lakünaları" denmektedir. Osteoklastlar, kemik iliğindeki granülositik makrofaj öncülerinden köken alan monositlerin füzyonuyla oluşmaktadır ve 4-40 çekirdekli olabilmektedir. IL-1, IL-3, IL-6 ve IL-11, TNF- α ve TGF- α 'nın osteoklast oluşumunda etkisi olduğu düşünülmektedir. Osteoklastlar hormonlara karşı da çok duyarlıdır. Parathormon, kalsitonin ve osteoblast stimüle edici faktör bağlayan reseptörleri bulunmaktadır. Remodelling için kemik yapımı gibi kemik yıkımı da çok önemlidir. Bu yüzden remodelling osteoklastlar ve osteoblastların

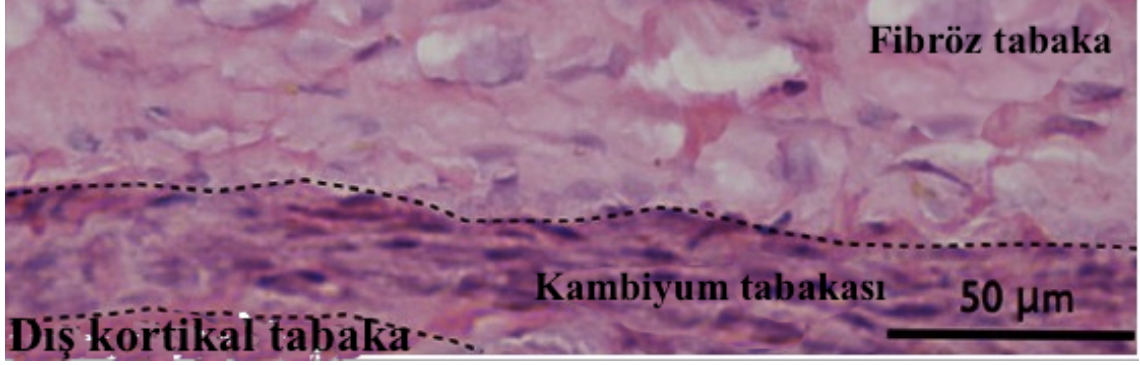
koordineli bir şekilde çalışması sonucu gerçekleşebilmektedir (Kierszenbaum, 2002; Junqueira LC, 2003)

2.1.3. Kemik Zarları

Periosteum

Periosteum; kemiğin dış yüzeyini örten, yüksek vaskülarite ve rejeneratif potansiyele sahip, hücresel olarak zengin bir bağ dokusudur (Singh ve Kiran, 2015). Periostun çift katmanlı yapısını ilk olarak Blaisdell 1925 yılında yayınladığı makalede açıklamaktadır ve iç kısımdaki katmanın osteoblast benzeri hücrelerden oluştuğunu bildirmektedir (Lin ve ark., 2014). Periostun fibröz tabaka olarak isimlendirilen dış katmanı ise sinir ve mikrovasküler ağ ile birlikte fibroblastlar, kollajen ve elastinden oluşmaktadır (Allen ve ark., 2004). Bu bileşenler periosta mekanik stabilite sağlamaktadır.

İç kısımdaki kambiyum katmanının yüksek oranda hücre içerdiği ve bu hücrelerin kemik yapımı ve tamirinden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Allen ve ark., 2004). Bu katmanda özellikle erişkin mezenkimal iskelet progenitor hücreler, osteoblastlar, daha küçük ve daha izodiyametik fibroblastlar ve sempatik sinirler bulunmaktadır (Allen ve ark., 2004). Bu özellikler periosta rejeneratif kapasite kazandırmaktadır. Kemik yaşlandıkça osteoblast sayısının azalmasına bağlı olarak kambiyum katmanında belirgin bir atrofi ve incelme görülmektedir (Allen ve ark., 2004). Periost üzerinde yüksek vaskülariteye sahip olmasından dolayı, birçok endotelial perisit bulunmaktadır (Diaz-Flores ve ark., 1992). Perisitler kapiller endotelial hücreler ile fiziksel temasta bulunan hücrelerdir. Özel kültür koşulları altında bu hücreler osteoblastlar gibi birçok hücre tipine diferansiye olabildikleri bildirilmektedir (Reilly ve ark., 1998). Bu nedenle perisitler periosttaki osteoprogenitor hücre deposu olarak değerlendirilebilmektedir (Diaz-Flores ve ark., 1992) (Şekil 5).



Şekil 5. Periostun katmanlarının histolojik görüntüsü (Frey ve ark., 2013' den uyarlanmıştır)

Endosteum

Kemik iliği boşluğunu çevreleyen ince bir bağ dokusu tabakasıdır. Periosteumdan daha incedir ve tek tabaka osteojenik hücre içermektedir. Bu tabakanın kemik doku yanında, hemopoetik hücreleri yapabilme özelliği bulunmaktadır (Kierszenbaum, 2002; Junqueira LC, 2003).

2.2. Kemik İyileşmesi

Kemik iyileşmesi belli aşamaları olan dinamik bir olaydır. Birçok kemik defekti kendi kendine iyileşebilmektedir. Kendi kendine iyileşemeyecek kadar büyük olan kemik defektleri kritik boyutlu kemik defekti olarak tanımlanır (Hollinger ve Kleinschmidt, 1990). Kemik iyileşme kalitesi değişik materyallerin uygulanmasıyla geliştirilebilmektedir. Bu amaçla kullanılan birçok materyal bulunmakta ve bunların önemli bir kısmı da doğal ürün olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu doğal ürünler mineraller ya da değişik bitkilerden ve hayvanlardan elde edilmiş olabilmektedir (Lindblad, 2008).

Kemik iyileşmesi 3 safhada gerçekleşmektedir: (Bigham-Sadegh ve Oryan, 2015)

- Erken enflamatuar dönem
- Tamir dönemi
- Yeniden şekillenme dönemi

Enflamatuar dönemin ilk birkaç saat/gününde; öncelikle kırık bölgesinde hematoma oluşmaktadır. Enflamatuar hücreler (makrofajlar, monositler, lenfositler ve polimorfonükleer hücreler) ve fibroblastlar prostaglandin aracılığıyla kemiğe infiltre

olmaktadır. Bunun sonucu granülasyon dokusu oluşmakta ve vasküler doku büyümesi ve mezenkimal hücre göçü görülmektedir. Bu dönemde başlıca besin ve oksijen kaynağı, hasar sonucu açığa çıkan kansellöz kemik ve kasları olmaktadır. Bu ilk 1 haftalık dönemde antiinflamatuvar ya da sitotoksik ilaç kullanımı inflamatuvar cevabı geciktirebilmekte ve kemik iyileşmesini inhibe edebilmektedir. (Kalfas, 2001).

Tamir döneminde; fibroblastlar vasküler büyümeye yardımcı olacak stromayı oluşturmaya başlamaktadırlar. Bu dönemde nikotin varlığı kapiller büyümeyi inhibe edebilmektedir (Rubenstein ve ark., 1991; Daftari ve ark., 1994; Riebel ve ark., 1995; Silcox ve ark., 1995). Yapılan araştırmalar sigara bağımlılarında birleşme oranında anlamlı derecede bir azalma meydana geldiğini bildirmektedir (Brown ve ark., 1986; Blumenthal ve ark., 1988; Bishop ve ark., 1996).

Vasküler büyüme gerçekleşirken bir yandan da kollajen matriks sentezlenmektedir. Osteoid salgılanmakta ve mineralize olmaktadır, böylece tamir bölgesinde yumuşak kallus oluşmuş olur. Daha sonra bu kallus kemikleşir ve segmentler arasında örgülü kemik (woven bone) köprüsü oluşmaktadır. (Schindeler ve ark., 2008)

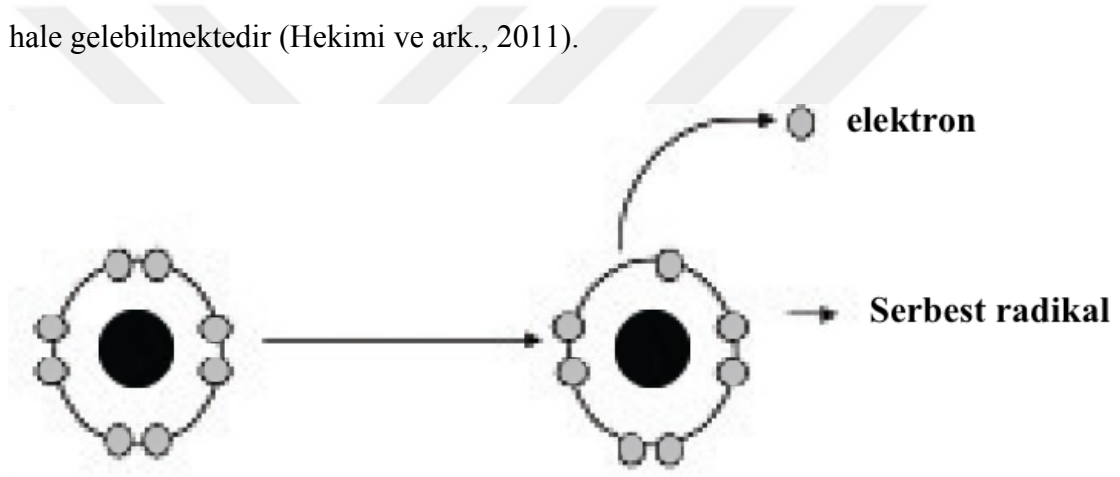
Yeniden şekillenme döneminde; kemik orijinal şekil, yapı ve mekanik dayanıklılığını geri kazanmaktadır. Bu dönem yavaşça ilerlemekte ve aylar-yılları bulabilmektedir.

Kemik iyileşmesinin en kritik dönemi ilk 1-2 haftadır. Bu süre zarfında kemiğin iyileşme potansiyeli çeşitli biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal ve patolojik mekanizmalardan etkilenebilmektedir (Kalfas, 2001). Sigara kullanımı, malnutrisyon, diyabet gibi sistemik etkenler kemik iyileşmesini olumsuz etkilemektedir. Steroid kullanımı, sitotoksik ajanlar ve non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar özellikle ilk hafta iyileşme üzerine zararlı etkiler göstermektedir. İlk 2-3 hafta içinde iyileşme bölgesinin radyasyona maruz kalması hücre proliferasyonunu inhibe edebilmektedir ve akut vaskülit gelişmesini tetikleyerek kemik iyileşmesi için tehlike oluşturmaktadır (Kalfas, 2001). Kemik iyileşme mekanizmasını etkileyen faktörlerden biri de oksidatif strestir (Prasad ve ark., 2003). Oksidatif stres, serbest radikal olarak adlandırılan reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin, dokuda çoğalarak kendilerini nötrleyecek olan

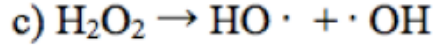
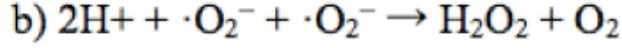
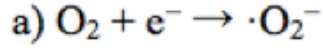
antioksidanlardan fazla hale gelmesiyle dokunun hasar görme riskiyle karşılaştığı durumdur (Chandra ve ark., 2015).

2.3. Serbest Radikaller

İnsan vücudunda üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türleri serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır (Lobo ve ark., 2010). Serbest radikaller eşlenmemiş bir elektrona sahip olduklarından dolayı oldukça reaktiftirler(Şekil 6). Reaktif olmaları sebebiyle domino etkisi yaratacak şekilde diğer yapılarla etkileşime girerek zincir reaksiyonlar başlatabilmektedir (Şekil 7). Serbest radikallerin başlıca tehlikeli olduğu durum; DNA ya da hücre membranı gibi önemli hücre komponentleriyle reaksiyona girdiğinde meydana gelebilecek hasarlardır. Böyle bir durumda hücre işlev yapamaz hale gelebilmektedir (Hekimi ve ark., 2011).



Şekil 6. Serbest radikal oluşumu (Pai ve ark., 2014a'dan uyarlanmıştır)



Şekil 7: a) Moleküler oksijenden bir elektron kopmasıyla süperoksit radikaline dönüşmesi, b) Süperoksitten hidrojen peroksit oluşması, c) Hidrojen peroksitten hidroksil radikali oluşması (Turrens'den, 2003)

2.3.1. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikalleri oluşturan mekanizmalar; endojen sistemler ya da eksojen uyaranlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Vücudumuzun değişik fizyokimyasal ya da patolojik etkenlere maruz kalması sonucu serbest radikal meydana gelmesi eksojen mekanizmalar olarak adlandırılırken, endojen sistemler; fagositik hücreler, oksidan enzimler vb. sebeplerden dolayı serbest radikal meydana gelmesi endojen sistemler olarak açıklanabilmektedir (Lobo ve ark., 2010)(Şekil 8).

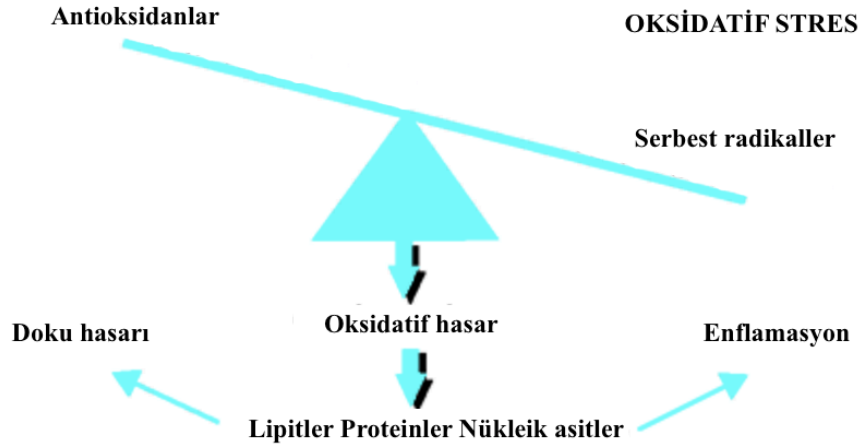
Serbest radikaller vücut içerisinde normal fizyolojik işlemler sırasında meydana gelebildiği gibi cerrahi işlemler sonrasında fagositik hücrelerin cerrahi yara bölgesine nüfuz etmesiyle de meydana gelebilmektedir. Fagositoz işlemi sırasında fagositlerin mikrobisidal aktivitesini artırmak amacıyla fagosit oksidaz enzimi salgılanmaktadır. Bu enzim moleküler oksijeni süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi toksik etki gösteren serbest radikallere indirgemektedir. Oluşan bu serbest radikaller fagosite edilmiş mikroorganizmalara karşı mikrobisidal aktiviteyi artırmaktadır (Kılıçturgay, 2003). Daha sonra ortamdaki serbest radikaller antioksidanlar tarafından inaktive edilmektedir. Ancak bazen bu olay kontrol dışına çıkmakta ve inaktive edilebilecek olandan daha fazla serbest radikal üretilmesi sonucu ortamda serbest radikaller çoğalabilmektedir ve oksidatif stresin artmasına neden olabilmektedir (Goddio, 1989).

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları (Ör.Parasetamol, CCl ₄)
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler; ➤ Ksantin oksidaz ➤ İndolamin dioksijenaz ➤ Triptofan dioksijenaz ➤ Galaktoz oksidaz ➤ Siklooksijenaz ➤ Lipooksijenaz ➤ Mono aminooksidaz	Güneş ışığı
Fagositik hücreler; ➤ Nötrofiller ➤ Monosit ve makrofajlar ➤ Eozinofiller ➤ Endotelial hücreler	X- ışınları
Otooksidasyon reaksiyonları (Fe ⁺² , epinefrin)	UV- ışınları
	Isı şoku
	Glutasyonu okside eden maddeler
	Ortam havası ➤ Sigara dumanı ➤ Ozon ➤ Kükürtdioksit ➤ Egzos gazları

Şekil 8. Hücredeki serbest oksijen radikali kaynakları (Tekkes'den, 2006)

2.3.2. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri

Serbest radikaller düşük-orta konsantrasyonlarda hücre sel cevap ve immun sistem için faydalı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Valko ve ark., 2007). Serbest radikallerin fazlalığı ve antioksidan korunma veya onarım mekanizmalarının yetersizliği, oksidatif strese neden olmaktadır (Şekil 9). İyonize radyasyon, dış kaynaklı stresler, UV ışınları, ısı, kemoterapötik ajanlar, kimyasal karsinojenler ve tümör başlatıcıları, nükleik asitlerle, proteinlerle ve membran fosfolipitleri ile reaksiyona girerek radikallerin aracılık ettiği oksidatif hasarı kolaylaştırmaktadırlar (Hekimi ve ark., 2011).



Şekil 9. Oksidatif stresin oluşum mekanizması (Kelly, 2003'den uyarlanmıştır)

Pek çok hastalığın etyolojisinde serbest radikallerin etkili olduğuna dair ipuçları elde edilmiştir (Yen ve ark., 1997). Bu hastalıklar arasında ateroskleroz (damar sertleşmesi), koroner kalp rahatsızlıkları, hipertansiyon (Bahorun ve ark., 2006), astım, koah (Caramori ve Papi, 2004), Alzheimer (Christen, 2000), akciğer kanseri ve diğer tümörler (Valko ve ark., 2004), romatizmal hastalıklar (Mahajan ve Tandon, 2004), renal hastalıklar (Galle, 2001), göz hastalıkları (Santosa ve Jones, 2005), diabet ve diabet komplikasyonlarının gelişimi (Maritim ve ark., 2003), AIDS (Zhang ve ark., 1997) gibi birçok patolojik durum bulunmaktadır.

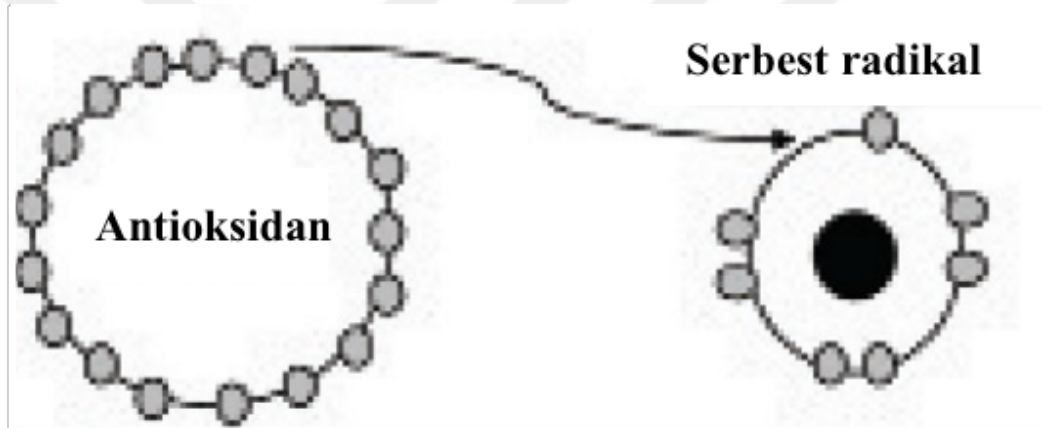
Kimyasal ve yapısal olarak zararlı maddelere mesleki maruziyet (pestisitler, zehirli kimyasal atıklar, sigara dumanı, egzoz benzin, kentsel hava kirleticileri ozon ve radyasyon, ve fiziksel stres gibi) insan hayatı üzerinde benzer etki yapmaktadır. Bu zararlı maddeler vücutta aşırı miktarda serbest radikal oluşmasına neden olmaktadır. Vücuttaki serbest radikallerin fazlalığı; lipidler, proteinler ve DNA'nın oksidatif bozulması, prokarsinojenlerin aktivasyonu, hücrel ve antioksidan savunma sistemlerinin engellenmesi, sülfhidrilleri tükenmesi, değişmiş kalsiyum homeostazı, gen ekspresyonunda değişiklikler ve anormal proteinlerin endüksiyonu gibi olumsuz sonuçlara sebep olabilmektedir. (Ames ve Krovoza, 1992; Kehrer, 1993; Stohs ve Bagchi, 1995).

Uygun antioksidan müdahalesi, radikal toksisitesini azaltarak veya inhibe ederek, kronik hastalıkların ve yaşlanmanın semptomlarını geciktirecek ya da hafifletecek şekilde koruyucu etki göstermektedir. Bu amaçla antioksidan vitamin ve ilaçların kullanımı gündeme gelmektedir. İnsanlarda farmakolojik ajan olarak

antioksidanların kullanımı ile ilgili deneyimler sınırlı olmasına rağmen, deneysel veriler serbest radikalleri yok eden veya azaltan antioksidanların kullanımının, yaşam süresini uzatabileceği ihtimalini göstermektedir (Akkuş, 1995).

2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar; sağlıklı hücrelerin oksidasyona uğramasını engelleyen moleküllerdir (Sies, 1997). Bu maddeler aktif serbest radikaller ile reaksiyona girerek, radikal fonksiyonunun antioksidana transferini sağlamaktadır. Bunun sonucunda serbest radikaller inaktive edilmiş olmaktadır (Şekil 10). Bu nedenle antioksidanların ortamdaki miktarı, serbest radikallerin meydana getireceği doku hasarının önüne geçilmesinde oldukça önemli olmaktadır (Akkuş, 1995).



Şekil 10. Antioksidandan serbest radikale elektron transferiyle serbest radikalın inaktive edilmesi (Pai ve ark., 2014b'den uyarlanmıştır)

2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanları birçok kategoride sınıflandırmak mümkündür: Yapılarına göre, enzimatik ve nonenzimatik; Çözünürlüklerine göre, suda çözünenler ve yağda çözünenler; Yerleşimlerine göre, intrasellüler (hücre içi) ve ekstrasellüler (hücre dışı) gibi birçok kategoride sınıflandırmak mümkündür. Ayrıca antioksidanları kaynaklarına göre sınıflandırdığımızda; Endojen kaynaklı ve Eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak ikiye ayırmak mümkün olmaktadır (Valko ve ark., 2007).

Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidan vücutta üretilip sürekli hazır bulunan antioksidanlardır. Endojen antioksidanlar enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılır (Pham-Huy ve ark., 2008).

Endojen antioksidan sistemin enzimatik kısmını başlıca süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimler oluşturmaktadır (Willcox ve ark., 2004).

Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar ise lipoid asit, glutatyon, L-arginin, koenzim Q10, melatonin, ürik asit, bilirubin, metal şelatlayıcı protein, transferrin vb. olarak bildirilmektedir (Dröge, 2002).

Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar vücutta üretilmeyip vücuda dışarıdan alınan vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olarak bildirilmektedir (Pham-Huy ve ark., 2008).

Bu gruptaki antioksidanlar sentetik ve doğal antioksidanlar olmak üzere iki temel grupta incelenebilmektedir.

Sentetik Antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar özellikle yiyeceklerin raf ömrünü uzatmak amacıyla üretilen antioksidanlardır. Ayrıca kızartma yağlarında kullanılacak antioksidanların kaynama derecesinde etkilerinin ortadan kalkmaması için dayanıklı antioksidanlar üretilmiştir. Kimyasal prosesler sonucu üretilen sentetik antioksidanların başlıcaları; Bütillenmiş Hidroksianisol (Sheela ve ark., 2006), Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) ve tert-Bütil Hidrokinon (TBHQ) ve Gallatlar'dır (Marmesat ve ark., 2010).

Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar hemen hemen tüm bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hatta hayvansal dokularda dahi bulunmakta olup çoğunlukla polifenolik yapıdaki maddeler olarak tanımlanmaktadır. Bu antioksidanların en önemlileri; tokoferoller, sesamol, sesamolin, karnosik asit, rosmarinik asit, polifenoller, flavonoidler, karotenoidler ve askorbik asittir (Pokorny ve ark., 2001).

Serbest radikal üretimi endojen antioksidan sistemin kapasitesinden daha fazla olursa ikincil defans mekanizması olan eksojen antioksidanlar devreye girmektedir. Vitamin C ve E gibi antioksidan vitaminler serbest radikallere karşı etki göstermekte ve serbest radikalleri etkisiz hale getirmektedirler (Halliwell, 1994).

Meyve ve sebzelerde başta polifenoller ve flavonoidler olmak üzere bir dizi antioksidan bileşikler bulunmaktadır (Potter, 1997). Örneğin siyah üzüm (*vitis vinifera*) (Bagchi ve ark., 2000; Monagas ve ark., 2003) ve arıların kovan içi temizliğinde kullandığı propolis zengin bir flavonoid içeriğine sahiptir (Vennat ve ark., 1995). Flavonoidlerin; antioksidan, antibakteriyel, antiviral, anti-inflamatuar, antitümör ve anti-tümör aktivitesi, ayrıca bazı enzimlerin aktive ve inaktive edilmesi gibi birçok fizyolojik özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir (Rice-Evans ve Packer, 1998).

2.4.2. Antioksidanların Etki Mekanizması

Antioksidan ajanlar serbest radikallere karşı dört yolla etki göstermektedir.

Bunlar;

- Süpürücü/Temizleyici etki gösterenler: Yeni serbest radikal oluşumunu engellemekte ve mevcut serbest radikalın etkisini azaltmaktadırlar. Örnek; glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD),
- Giderici etki gösterenler: Serbest radikallerle etkileşime girip, onlara bir hidrojen aktararak nötralize eden ve inaktif hale getiren bileşiklerdir. Örnek; vitaminler, flavonoidler, ve antosiyanidinler.
- Zincir Kırıcı etki gösterenler: Zincirleme reaksiyonları durdurarak oksidan etkiyi engellemektedirler. Örnek; bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin.
- Tamir Edici etki gösterenler: Serbest radikallerin yaptığı hasarı tamir ederek etki göstermektedirler. Örnek; DNA tamir enzimleri, metionin sülfoksit redüktaz (Willcox ve ark., 2004).

2.4.3. Antioksidanların Terapötik Etkisi

Son yıllarda yapılan çalışmalarda antioksidan terapinin osteoklastik aktiviteyi inhibe edici, osteoblastik aktiviteyi ise uyarıcı etkiye sahip olduğunu bildirmektedir (Uysal ve ark., 2009; Kara ve ark., 2012; Ozdemir ve ark., 2012). Antioksidanlar tümör

hücrelerine tüm aşamalarda inhibitör etkisi yaparken sağlıklı hücreleri de oksidatif strese karşı korumaktadır (Halliwell ve ark., 1992). Bu kemoprotektif bileşenler aşağıdaki mekanizmayla oksidatif stres ve kimyasal kaynaklı karsinogenezi inhibe etmektedir (Hocman, 1989);

- Toksinlerin ve karsinojenlerin üretilmemesi için metabolik fonksiyonların modülasyonu.
- Detoksifikasyonu yollarının geliştirilmesi.
- Biyolojik makromoleküllerin nihai kanserojen ile etkileşimini önlenmesi.

2.5. Çalışmamızda Kullanılan Antioksidan Materyaller

2.5.1. Propolis

Propolis kelimesi eski yunan dilinde pro (ön, giriş) ve polis (şehir) anlamına gelmektedir ([https://tr.wikipedia.org/wiki/Polis_\(%C5%9Fehir](https://tr.wikipedia.org/wiki/Polis_(%C5%9Fehir), 2015).

Propolis arıların bitki ve ağaçlardan topladığı özütler ile ürettiği reçinemi bir karışımdır. İçerisinde polenler, çeşitli yağlar ve mumsu maddeler bulunmaktadır. Rengi koyu sarıdan kahverengiye kadar değişebilmektedir (Crane, 1991) (Şekil 11).



Şekil 11. Ham propolis

Arılar İçin Propolisin Önemi

Propolis arılar tarafından çok farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Propolisin asıl rolü arıları hastalıklara karşı korumaktır. Kovan sıcak (34°C), nemli (%40-65) ve kapalı bir ünite olup, mikroorganizmaların üreyebilmesi için mükemmel bir ortam olmaktadır. Propolis nedeniyle kovan bakteri ve fungusları korunurken, genç larvalar da hastalıktan korunmaktadır. Arılar, kraliçe arı yumurtalarını bırakmadan önce petek gözlerini ve kovanın iç duvarını propolis ile astarlayarak o bölgenin bakterilerden arınmasını sağlamaktadır. Ayrıca; kovan içinde ölmüş ve kovan dışına çıkarılmayan (fare, böcek vb.) zararlı etkenleri propolisin koruyucu astarı ile kaplayarak mumyalamaktadırlar. Bu astar zararlıların bozulması ile ortaya çıkacak bakteriyel ya da viral enfeksiyonlara karşı koloniyi korumaktadır (Marcucci, 1995; Gençay ve Sorkun, 2002). Kovan içinde görev yapan arılar koloniyi enfeksiyonlara karşı korumak amacıyla dışarıdan gelen işçi arıları propolis ile fırçalayarak temizledikten sonra kovana almaktadır (Kumova, 2002).

Propolisin ikinci rolü; kovanın güçlendirilmesini sağlamaktır. Arılar propolisle kovanın dışa açılan bölgelerindeki boşlukları doldurmakta, çatlakları kapatmakta ve kovana korunaklı bir hale getirmektedir (Hepşen ve ark., 1996; Gençay ve Sorkun, 2002).

Propolisin İçeriği

Propolisin içeriği kovandan kovana, bölgeden bölgeye, mevsimden mevsime göre değişmektedir (Toreti ve ark., 2013). İçeriğinde temel olarak reçineler (% 50), balmumu (% 30), esansiyel yağlar (% 10), ve polen (% 5) bulunmaktadır. Propolis biyokimyasal olarak da zengin bir içeriğe sahiptir. İçerisinde polifenoller, flavonoidler, fenolik asitler ve bunların esterleri, fenolik aldehit ve ketonlar, terpenler, steroller, vitaminler, amino asitler gibi 300'den fazla bileşik olduğu bildirilmektedir (Khalil, 2006; Trusheva ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2009). Propolisin içeriği toplandığı bölgenin florasına göre değiştiğinden dolayı farklı coğrafi bölge ve floraya sahip bölgelerden toplanan propolisin biyokimyasal etkileri de değişebilmektedir (Markham ve ark., 1996; Park ve ark., 2002; Mohammadzadeh ve ark., 2007).

Propolis'in Kimyasal Özellikleri

Propolis flavonoidler ve çeşitli fenolik bileşikler gibi çok önemli farmakolojik aktif bileşenler ihtiva etmektedir (Vennat ve ark., 1995) (Şekil 12). Bu bileşenler

sayesinde serbest radikal süpürücü etki göstererek lipitler ve önemli diğer yapıları oksidatif hasardan korumaktadırlar (Willcox ve ark., 2004).

Bileşikler	Tanımlanan Bileşik Sayısı (ad)
Flavanoidler	38
Hidroksiflavonlar	27
Hidroksiflavononlar	11
Kalkonlar	2
Benzoik Asit ve Türevleri	12
Asitler	8
Esterler	4
Benzaldehit Türevleri	2
Sinamil ve Sinamik Asit ile türevleri	14
Alkoller, Ketonlar, Fenoller	8
Heteroaromatik Bileşikler	12
Terpen ve Sekuterpen ve Türevler	7
Alifatik Hidrokarbonlar	6
Sekuterpen ve Triterpen Hidrokarbonlar	11
Steroller ve Steroid Hidrokarbonlar	6
Mineraller	22
Şeker	7
Aminoasitler	24

Şekil 12. Propoliste belirlenen bileşik grupları ve sayıları (Kumova'dan, 2002)

Propolisin içerdiği mineral maddeler: 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 olarak sıralanabilmektedir (Shkenderov ve Ivanov, 1983).

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. Vahonina 1976 yılında yaptığı bir çalışmada arıların propolisi bitkilerden toplarken tükürük bezlerinden salgılanan maddelerin propolise karıştığına işaret etmiştir. Karışan bu maddeler ise bazı doymamış yağ asitleri ve 10

hidroksi-2 dekononik olduğunu bildirmiştir. Bu maddeler arıların mandibular bezlerinden salgılanmakta ve arı sütünün temel yapıtaşını oluşturmaktadır. Bu maddelerin propolisteki miktarı ise %7,2'dir (Özan, 2006).

Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis sarı-kahverengi renge sahip reçinemsî bir maddedir. Kendine özgü bir kokusu bulunmaktadır. Oda sıcaklığında gevrekleşirken, 65,5°C'de yumuşak bir hal almaktadır (Jong-Sung ve Kun-Suk, 1997). Derin dondurucuya konulduğunda hemen katılaşmaktadır (Ghisalberti, 1979; Schmidt ve Buchmann, 1992; Houghton, 1998; Woisky ve Salatino, 1998; Kumova, 2002). Propolis suda çok az çözünmektedir, genellikle alkolde (etanol, metanol) ve çok az miktarda da hidrokarbonlarda çözünmektedir. Eter ya da kloroformda ise tamamen çözünmektedir (Schmidt, 1996).

Propolisin Biyolojik Özellikleri

Propolisin içeriğinde bulunan flavonoidler sayesinde propolisin antibakteriyel (Kujumgiev ve ark., 1999; Koo ve ark., 2000; Popova ve ark., 2005), antiviral (Amoros ve ark., 1994), antifungal (Ota ve ark., 2001), antiinflamatuvar (Wang ve ark., 1993; Sosa ve ark., 1997), antihepatotoksik (Banskota ve ark., 2001), antikanser (Matsuno, 1995; El-khawaga ve ark., 2003), antioksidan (Basnet ve ark., 1997), antiülser (Kiderman ve ark., 2001), immünostimülasyon (Bratter ve ark., 1999) ve lokal anestezik (Özan, 2006) etkileri bulunmaktadır.

Propolisin insanlar tarafından farmasötik amaçlarla kullanımı MÖ 300 yıllarına kadar uzanmaktadır (Lustosa ve ark., 2008) ve halen de alternatif tıpta kullanılmasına devam edilmektedir (Gavanji ve Larki, 2015).

Propolisin antibakteriyel etkisi bulunmaktadır. Anaerob bakterilere karşı etkilidir. Propolis herpetik erozyonların tedavisinde topikal olarak uygulanabilir (Baumann, 2007). Propolis erozyon ya da yaraların re-epitelizasyonunu artırmak ve enfeksiyona karşı yarayı korumak amacıyla topikal olarak kullanılabilir. Claus ve ark. (Claus ve ark., 2000) yaptıkları çalışmada serum lipoproteinlerini oksidasyondan koruduğunu bildirilmektedir. Propolis kan glukoz ve lipid metabolizmasını ayarlayabilmekte ve lipid peroksidasyonunun azalmasına yol açmaktadır (Fuliang ve ark., 2005; Khalil, 2006).

Propolis son zamanlarda popülaritesini artırmaktadır. Hem daha sağlıklı olmak için hem de kalp hastalığı, diabet, enflamasyon ve kanseri önlemek için yiyecek ve içeceklerde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Mishima ve ark., 2005). Ayrıca; dermatolojik ürünlerde yara iyileşmesi, doku rejenerasyonunun artırılması gibi amaçlarla propolisten faydalanılmaktadır. Bu özelliğinden dolayı propolis farmasötik ve kozmetik ürünlerde de yer almaktadır (Mohammadzadeh ve ark., 2007). Propolisin bilinen bir dezavantajı ise arı ürünlerine karşı alerjisi olan bireylerde kullanılmasının riskli olabilmesidir. Nadiren kaşıntı ve kızarıklık görülebilmektedir (Reddy ve ark., 2011).

Propolisin Doku İyileşmesine Olan Etkisi

Pereira ve ark. (2012) tarafından ratlar üzerinde yapılan çalışmada propolis içerikli (%10) olan alveolex'in kemik defekti tamirini stimüle ettiği ancak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı bildirilmektedir. McLennan ve ark. (2008) diyabetli ratlarda yaptıkları bir çalışmada ise propolisin yumuşak doku yara iyileşmesini hızlandırabildiğini bildirmektedirler.

Propolis ucuz ve toksisitesi olmayan bir ajan olarak pürülan ya da pürülan olmayan ciddi yaraların tedavisinde efektif olarak kullanılmaktadır (De Castro, 2001). Propolisin doku rejenerasyonu ile ilişkili olan ana bileşenleri; yağ asitleri, terpenik bileşikler, β -steroidler, flavonoidler, vitamin ve mineral tuzları olarak bildirilmektedir (Burdock, 1998; De Castro, 2001).

Propolis Özütünün Elde Edilme Yöntemleri

Yakın zamana kadar propolis çalışmalarında çözücü olarak genellikle etanol kullanılmaktaydı. Yapılan testlerde propolis için kullanılan çözücülerin (çoğunlukla etanol) belirgin bir inhibitör etki etki gösterebildiği bildirilmiştir (Netikova ve ark., 2013). DMSO'nun propolis çözücüsü olarak kullanılmasıyla ilgili çalışmalar 2005 yılına uzanmaktadır (Netikova ve ark., 2013). Walgrave ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada propolis çözücüsü olarak DMSO'nun etanol yerine tercih edilmesi gerektiğini savunmuş ve dermatit tedavisinde etanolün cilt tahrişi, yağ tabakasının yok olması, cilt kuruluğu ve çatlaklara neden olduğuna dikkat çekmiştir. Bu nedenle günümüzde propolis ekstresi için DMSO kullanılmaya başlanmıştır.

2.5.2. Üzüm Çekirdeği Ekstresi

Üzüm çekirdeği ekstresi, siyah üzüm çekirdeklerinden elde edilen bir antioksidan olup, bir tür flavonoddur (Monagas ve ark., 2003)(Şekil 13). Üzüm, kullanım alanının fazla olması, toprak ve iklim açısından fazla seçici olmaması, çok yıllık olması ve çoğalma yöntemlerinin kolay olması gibi nedenlerle dünyada yetiştiriciliği en yaygın yapılan bitkilerden biridir. Dünya üzüm üretiminde %24 ile İtalya ilk sırada, Türkiye ise %12 ile 5. sırada yer almaktadır.(Payan, 2007).



Şekil 13. Siyah üzüm (https://en.wikipedia.org/wiki/Vitis_vinifera, 2015)

İlk olarak, 1936 yılında limon kabuklarından elde edilen flavonoidli bir preparatın P vitamini aktivitesi göstermesi, kılcal damar geçirgenliği ve kırılabilirliğini azaltmada kullanılması flavonoidlere önem verilmesini sağlamıştır. Böylece, flavonoidlere olan ilgi 1940'lı yıllardan itibaren artmaya başlamıştır. Gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalara göre flavonoidlerin çok yönlü farmakolojik ve biyokimyasal etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Ünlü, 2001).

Bir flavonoid çeşidi olan proantosiyanidinler üzerinde araştırmalar yapılmıştır (Matthews ve ark., 1997; Wu ve ark., 2004). Proantosiyanidinler siyah üzüm dışında bitki aleminde geniş bir alana yayılmaktadırlar. Kakao, kahve, elma, ham badem ve

yaban mersini, ahududu, çilek gibi meyvelerde bulunmaktadır. Proantosiyanidinlerin kaynağının diğer bir kolunu da meşe ağacı kabuğu ve çam ağacı kabuğu oluşturmaktadır (Altıok, 2003). Shi ve ark. (2003) tarafından yapılan araştırmada proantosiyanidinlerin, C vitamininden 50 kat, E vitamininden 20 kat daha güçlü antioksidan etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Üzüm çekirdeği ekstresinin sağlığa yararlı etkilerinin çoğu yüksek oranda proantosiyanidin içeriği sayesinde olan güçlü antioksidan etkisinden kaynaklanmaktadır (Bagchi ve ark., 2000).

Bir proantosiyanidin bir antioksidan olarak tanımlanması için iki temel şartı karşılaması gerekmektedir;

1. Proantosiyanidin okside edilecek substrata göre düşük konsantrasyonlarda mevcut olduğunda otooksidasyonu ya da serbest radikale bağlı oksidatif hasarı geciktirmeli, yavaşlatmalı ya da önlemeli;
2. Serbest radikaller süpürüldükten sonra kalan ürünler moleküller arası hidrojen bağlamasıyla daha fazla oksitlenmeye karşı stabil olmalıdır (Shahidi ve Wanasundara, 1992).

Biyoflavonoidler ve proantosiyanidinlerin, biyolojik, farmakolojik ve tıbbi özellikleri geniş bir şekilde araştırılmıştır (Suzuki, 1993; Jovanovic ve ark., 1994; Rice-Evans ve ark., 1996). Serbest radikal süpürücü ve antioksidan aktivitesinin yanı sıra proantosiyanidinler damar genişletici, antikanserojen, anti-alerjik, anti-inflamatuar, antibakteriyel, kardiyoprotektif, bağışıklık uyarıcı, antiviral ve östrojenik aktivitelere sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca oldukça sitotoksik aktif serbest oksijen radikalleri oluşmasına sebep olan fosfolipaz A2, siklooksijenaz ve lipoksijenaz gibi enzimlerin inhibitörü olduğu bildirilmektedir (Suzuki, 1993; Jovanovic ve ark., 1994).

Üzüm çekirdeği ekstresinin herhangi bir toksik etki göstermeden (Wren ve ark., 2002) kolesterol düşürücü etkisi (Preuss ve ark., 2000), insan kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi (Ye ve ark., 1999), kardiyoprotektif özellikleri (Sato ve ark., 2001) ve dermal yara iyileşmesinde anjiyogenez artıracı etkisi (Khanna ve ark., 2001) olduğu bildirilmiştir.

Siyah üzümün sahip olduğu bu özelliklerin haricinde, içerisinde üzümle birlikte 5 farklı bitki özütü bulunan Ankaferd isimli ilaç kanama durdurucu etkisiyle öne çıkmaktadır (www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008_1.pdf, 2015).

Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Doku İyileşmesine Etkisi

Üzüm çekirdeği ekstresinin içindeki etken maddelerden olan proantosiyanidinlerin yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmektedir (Hupkens ve ark., 1995; Salah ve ark., 1995). Chis ve ark. (2009) yaptığı bir çalışmada diyabetik rat modelinde üzüm çekirdeği ekstresinin antioksidan defans mekanizmasını güçlendirdiği bildirilmektedir. Hemmati ve ark. (2011) yaptığı bir çalışmada ise topikal üzüm çekirdeği ekstresinin tavşanlarda yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmektedir.

Üzüm çekirdeğinden elde edilen proantosiyanidinler, kapiler duvarını stabilize etmekte ve permeabilededeki artıştan koruyarak, ödem oluşumunu baskılamaktadır (Robert ve ark., 1990).

Üzüm çekirdeği ekstresi damarları güçlendirmek ve morarmayı önlemek için kullanılmaktadır. Üzüm çekirdeği ekstresi farelerde yara kontraksiyonunu artırmakta ve yaranın kapanmasını hızlandırmaktadır. Yara kenarlarında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve bir glikoprotein olan tenascin seviyesini artırırken, bağdoku oluşmasını sağlamaktadır (Baumann, 2007).

Yapılan bir araştırmada kalsiyum oranı düşük diyet uygulanan ratlarda üzüm çekirdeği ekstresinin kemik oluşumunu uyardığı tespit edilmiştir. Bu sonucun üzüm çekirdeği ekstresinin zayıf kemik için tedavi edici özelliği olduğunu ortaya koyduğu belirtilmektedir (Kamitani ve ark., 2004).

Yapılan in vitro ve in vivo araştırmalar üzüm çekirdeği ekstresinin normal hücrelere karşı sitotoksik etki göstermeksizin çeşitli kanser hücrelerinin çoğalmasına karşı inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Ye ve ark., 1999; Yamakoshi ve ark., 2002; Mittal ve ark., 2003). Bu kanser çeşitleri; meme kanseri (Eng ve ark., 2003; Mantena ve ark., 2006), prostat kanseri (Dhanalakshmi ve ark., 2003; Tyagi ve ark., 2003), cilt kanseri (Meeran ve Katiyar, 2007), akciğer kanseri (Akhtar ve ark., 2009), kolorektal kanser (Kaur ve ark., 2008; Hsu ve ark., 2009) ve pankreas kanseri olarak bildirilmektedir (Chung ve ark., 2012). Proantosiyanidinlerin kemoprotektif özellikleri, serbest radikaller ve onların yaptığı oksidatif hasara karşı olan etkilerinden

kaynaklanmaktadır (Ye ve ark., 1999). Bileşimin güçlü antioksidan etkinliğinden kaynaklanan anti-tümör destekleyici etkisi kanıtlanmıştır (Zhao ve ark., 1999).

Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL), serbest radikaller tarafından oksitlenmesi ateroskleroz başlangıcı ile ilişkilendirilir. Proantosiyanidinler, aterosklerotik lezyonlardaki LDL-pozitif hücrelerin sayısını azaltmaktadır. Ayrıca, LDL'deki kolesterol linoleatın oksidasyonunu baskılayarak aorttaki ateroskleroza azaltmayı sağlamaktadır (Robert ve ark., 1990).

2.5.3. Ankaferd Kanama Durdurucu

Yara iyileşmesi üzerinde etkisi bilinen bir diğer madde olan Ankaferd kanama durdurucu, kanama durdurucu özelliğinden faydalanmak amacıyla kullanılan bir ajan olarak tanımlanmaktadır (www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008_1.pdf, 2015).

Ankaferd kelimesi anka ve ferd kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur. Bu kelimelerden “Anka” fars mitolojisinde “Simurg”, doğu kültüründe “Zümrüdü Anka” batı kültüründe ise “phoenix” adıyla anılan bir kuşun ismidir. Mitolojide bu kuşun her türlü yarayı iyileştirebilecek özelliğinden bahsedilmektedir. “Ferd” kelimesi ise arapça kökenli bir kelime olup tek, eşi benzeri olmayan anlamlarına gelmektedir. Ürün T.C. Sağlık Bakanlığı'ndan ruhsatlı ilk Türk ürünü olmasıyla öne çıkmaktadır. (www.ankaferd.com.tr, 2015). Ankaferd'in ticari olarak ampul, tampon ve sprey formları bulunmaktadır (Şekil 14).



Şekil 14. Ankaferd'in değişik ticari formları (<http://www.ankaferd.com/pdf/ABSGenelBrosur.pdf>, 2015)

Ankaferd'in İçeriği

Ankaferd, her biri ayrı spesifik özeliklere sahip beş ayrı bitkinin özünden üretilmektedir. Bu bitkiler; *Vitis vinifera* (zm), *Glycrrhiza glabra* (Meyan), *Urtica dioica* (Isırgan), *Thymus vulgaris* (Kekik) ve *Alpinia officinarum* (Havlıcan) den oluşmaktadır (Goker ve ark., 2008). Bu bitkilerin ağırlık olarak ankaferd içinde bulunma oranları sırasıyla 7:8:5:6:7'dır (Goker ve ark., 2008).

G. glabra; antibakteriyel (Fukai ve ark., 2002), antiinflamatuvar, antithrombin, antiülser, antiviral, antifungal, antiplatelet, antioksidan, antiatherosklerotik, ve antitümör özelliklerine sahip olmaktadır (Goker ve ark., 2008).

V. vinifera; antibakteriyel (Fukai ve ark., 2002), antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle bilinmektedir (Hemmati ve ark., 2011).

Alphina officinarum (Havlıcan); bitkinin antibakteriyel (Fukai ve ark., 2002) ve antispazmotik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Healthcare, 2007). Halk arasında ateş, soğuk algnlığı, öksürük, ağız ve farenksin enfeksiyon ve enflamasyonlarında kullanıldığı bildirilmektedir (Healthcare, 2007).

Urtica dioica (Isırgan); antibakteriyel (Janssen ve Scheffer, 1985), antiinflamatuvar, antifungal ve antiviral etkiler göstermektedir (Bombardelli ve ark., 1997; Lichius ve Muth, 1997).

Thymus vulgaris; hem gram pozitif hem de negatif bakterilere karşı bakteriostatik etki gösterdiği bildirilmektedir (Abu-Ghazaleh, 2000; Essawi ve Srour, 2000). Tüm bu bitkilerin, hücresel proliferasyon, kan hücreleri, endotel ve vasküler dinamikler üzerinde etkileri bulunmaktadır (Matsuda ve ark., 2006; Sheela ve ark., 2006)

Ankaferd'in Biyolojik Etkileri

Ankaferd hemostatik aktivitesinin yanısıra antioksidan (Hasgul ve ark., 2014), antineoplastik (Goker ve ark., 2008), antienfeksiyöz (Fisgin ve ark., 2009; Turhan ve ark., 2009), antibakteriyel (Kosar ve ark., 2009) ve antifungal (Kosar ve ark., 2009; <http://www.ankaferd.com/pdf/ABSGenelBrosur.pdf>, 2015) etkilere de sahip olduğu bildirilmektedir.

Ankaferd'in hücrel ve vasküler proliferasyona etkisi olduğu ve doku beslenmesini arttırdığı belirtilmektedir (Kosar ve ark., 2009; www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008_1.pdf, 2015). Bulut ve ark. (2014) tarafından diyabetik ve sağlıklı ratlar üzerinde yapılan çalışmada Ankaferd'in kemik iyileşmesini arttırdığı bildirilmiştir. İşler ve ark. (2010) Ankaferd'in erken dönem kemik dokusu iyileşmesi üzerine etkilerini rat modelinde, tibiada oluşturdukları kemik defektinde değerlendirmiştir. Çalışmanın sonucunda Ankaferd uygulanan grupta anlamlı derecede düşük iltihap ve nekroz oranı izlenmiş, yeni kemik yapımı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Etki Mekanizması

Ankaferd kanama durdurma etkisini; protein ağ oluşturarak eritrosit agregasyonunu artırarak hemostaza katkı sağlamakta ve bu etkisini normal hemostatik sürece müdahale etmeden göstermektedir (Goker ve ark., 2008; Odabas ve ark., 2011).

Ankaferd; kanama bölgesinde fibrinojen ve diğer protein moleküllerinin aglütinasyonunu sağlayarak bir protein ağı oluşmasını sağlamaktadır. Trombositler ve eritrositler bu ağ üzerinde kümeleşirler ve eritrosit agregasyonu gerçekleşmektedir. Böylece hemostaz sağlanmaktadır. Bu işlem esnasında pıhtılaşma faktörleri etkilenmemekte ve fizyolojik hemostatik süreç devam etmektedir (www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008_1.pdf, 2015).

2.6. Kontrollü Salınım Yöntemleri

Doku mühendisliğindeki gelişmelerle kaybedilen dokuların rekonstrüksiyonu için uygulanan maddelerin etki süresini uzatmak amacıyla kontrollü salınım yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Bu yöntemle etken maddelerin bir fiziksel ya da kimyasal engel sayesinde ortama salınmasını yavaşlatmak ve serum yarılanma sürelerinin artırılması amaçlanmaktadır (Kirker-Head, 2000). Örneğin cerrahi yara bölgesine uygulanacak bir ilacın etkisinin uzun sürmesi için uygulanacak ilaç rezorbe olabilen jelatin süngere emdirildikten sonra yara bölgesine yerleştirilip kapatıldığında ilacın etki süresi artırılmaktadır. Burada örnek verilen rezorbe olabilen jelatin süngerin taşıyıcı matriks olarak kullanılabilmesi için öncelikle uygulanacak ilaca uygun olması gerekir (Burg ve ark., 2000; Kirker-Head, 2000; Geiger ve ark., 2003).

Taşıyıcı sistemlerin sahip olması gereken diğer özellikler;

- Biyouyumlu olması, düşük immünojenite ve antijenite göstermesi
- Biyoçözünür olması.
- Baskı ve gerilme stresine dayanıklılık
- Hücre invazyonu ve vaskülarizasyon için yeterli porözite
- Steril halde bulunabilmesi
- Osteojenik aktiviteye katkı sağlayacak efektif dozdaki ilacın zaman

içinde kontrollü salınması

- Operasyon bölgesine yerleştirilebilmesi
- Kolay hazırlanabilir olması (Burg ve ark., 2000; Kirker-Head, 2000;

Geiger ve ark., 2003)

2.6.1. Kemik İyileşmesinde Kullanılan Kontrollü Salınım Yöntemleri

Klinik ve deneysel araştırmalarla taşıyıcı özelliğe sahip maddeler araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda BMP-2, TGF- β , FGF gibi büyüme faktörlerinin kontrollü ilaç salınım metoduyla kullanımının osteojenik hücre farklılaşması ve kemik rejenerasyonunu artırıcı etkileri kanıtlanmıştır (Narayani ve Rao, 1994; Tabata ve ark., 1998). Taşıyıcı matriks olarak biyogüvenilir özelliğe sahip olan jelatin süngerler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Cortesi ve ark., 1998; Yamamoto ve ark., 2000).

Taşıyıcı matriksler organik ve inorganik yapıda bulunabilmektedirler. Organik yapıdaki taşıyıcı matriksler;

- Kollajen
- Demineralize kemik matriksi
- Hidrojeller
- Kollajen olmayan proteinler
- Diğer organik matriksler olarak sayılabilir
- Polimerler

İnorganik taşıyıcı matriksler ise;

- Hidroksiapatit
- Trikalsiyum fosfat
- Titanyum

- Diğer inorganik matrikslerdir (Kirker-Head, 2000)

Çalışmamızın hipotezine göre; kemik iyileşmesindeki en kritik dönem olan ilk 2 hafta içerisinde serbest radikallerin kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemesi ihtimaline karşı antioksidan özelliğe sahip olan Propolis, Üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd kanama durdurucunun kullanılmasıyla kemik iyileşmesinin hızlandırılması amaçlanmaktadır.



3. MATERYAL VE METOT

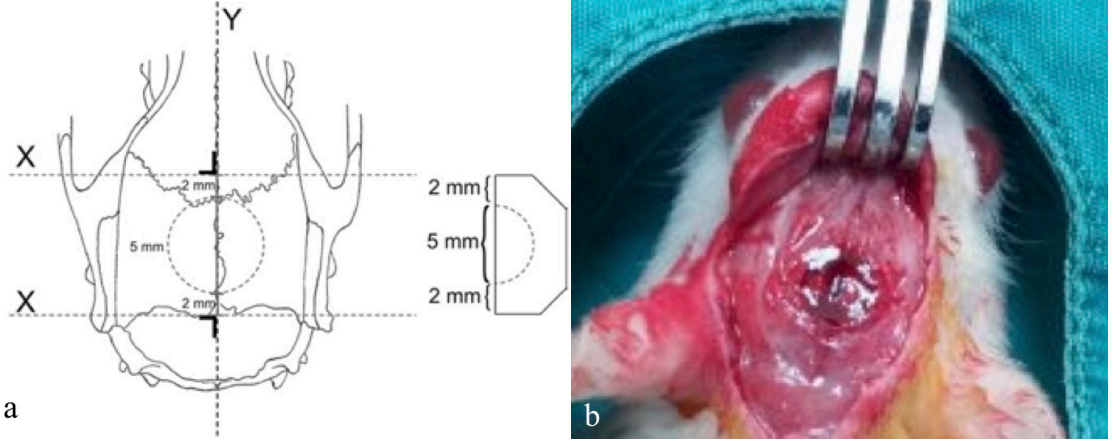
Çalışmamız için OMÜ Deneş Hayvanları Etik Kurulundan onay alındı (Onay no: 2012/22). Çalışmamızda kullanılan ekstrelerin hazırlanma ve deneşel işlemleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Diş Hekimliği Fakültesi ve OMÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde, çalışmanın cerrahi deneşel işlemleri OMÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde, histolojik ve stereolojik incelemesi ise OMÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.1. Cerrahi Teknik

Bu çalışmada 64 adet diş erişkin, ortalama ağırlığı 250-300 g Wistar-Albino cinsi rat kullanıldı. Denekler, $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamı sağlayacak şekilde otomatize edilmiş ve bağıl nem oranı %40-60 olan odada, standart plastik kafeslerde saklandı. Hayvanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Bu gruplar;

- 1: Kontrol grubu (16 rat) (Kontrol)
- 2: Propolis ekstresi uygulanan grup (16 rat) (Propolis)
- 3: Üzüm çekirdeğı ekstresi uygulanan grup (16 rat) (Üzüm)
- 4: Ankaferd kanama durdurucu uygulanan grup (16 rat) (Ankaferd)

Tüm deneklere 22-50mg/kg Ketamin HCl (Ketalar®, Parke Davis, Berlin, Germany) ve 5-10mg/kg Ksilazin Hidroklorur (Rompun®, BayerAG, Leverkusen, Germany) intraperitoneal enjeksiyonu ile genel anestezi uygulandı. Aseptik hazırlıktan sonra deneklerin kalvaryumunda semilüner insizyon yapılarak tam kalınlık flep kaldırıldı ve ratların kalvaryalarında trefin frez ile tam kalınlık standart kemik defektleri (5 mm) serum fizyolojik irrigasyonu ile dönen enstrümanla şekil 15'de görüldüğü gibi oluşturuldu.



Şekil 15. a) Ratların kalvaryalarında açılan defektin konumu (Mariano ve ark.'dan, 2010), b) Deneklerin kalvaryalarında açılmış olan defekt

Ardından açılan bu defektlere uygulanan materyallerin defekt bölgesindeki etkisinin uzaması amacıyla defekt boyutunda emilebilir jelatin sünger (Gelopack, Septodont, İngiltere) yerleştirildi (Şekil 16) ve 1.grup olan kontrol grubunda 0.5ml serum fizyolojik, 2.grupta 0,5ml propolis, 3.grupta 0.5ml üzüm çekirdeği ekstresi, 4.grupta 0.5ml Ankaferd topikal olarak uygulandı (Şekil 17).



Şekil 16. Açılan defekte kontrollü salınım amacıyla jelatin sünger yerleştirilmesi



Şekil 17. Defekt bölgesine antioksidan ajan uygulanması

Açılan flep 3.0 vicril ile primer olarak kapatıldı. Operasyonları takiben hayvanlara 5 gün süreyle i.m yol ile antibiyotik olarak cefazolin sodium (Sefazol, Eczacıbaşı, Türkiye) (50mg/kg) ve analjezik olarak metamizol sodyum (Novalgin, Aventis, Türkiye) verildi.

3.2. Histolojik Değerlendirme

Gruplarda bulunan 16'şar hayvandan rasgele seçilen 8'i 14. günde derin eter anestezisi verilerek sakrifiye edildi ve Kontrol14, Propolis14, Üzüm14 ve Ankaferd14 grupları oluşturuldu. Geriye kalan 8'i ise 28.günde derin eter anestezisi verilerek sakrifiye edildi ve Kontrol28, Propolis28, Üzüm28 ve Ankaferd28 grupları oluşturuldu. Ardından nekropsi işlemine geçildi ve defekt açılan bölgedeki kemikten örnekler alınıp OMÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji bölümünde histolojik ve stereolojik olarak değerlendirildi. Gruplardan elde edilen kalvaryaya örnekleri %10'luk formolde (10ml % 40'lık formaldehit, 90ml distile su) 1 hafta süresince fikse edildi. Sonrasında dokular % 5'lik formik asit solüsyonu içerisinde üç günde bir değişti oda sıcaklığında 21 gün süreyle kontrol edilerek dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrası distile su ile yıkanan dokular alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından ksilen serileri ile şeffaflaştırma işlemi yapılarak parafine gömülme suretiyle bloklandı (Tablo 1).

Tablo 1. Parafin takip protokolü

İşlem	Kullanılan Madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	7 gün
Dekalsifikasyon	% 5 formik asit	21 gün
Dehidratasyon	% 70 alkol	1 saat
	% 80 Alkol	1 gece
	% 96 Alkol	1 saat
	% 96 Alkol	1 saat
	% 100 Alkol	1 saat
	% 100 Alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen	½ saat
	Ksilen	½ saat
İnfiltrasyon	Ksilen-parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Bloklar 1/40 örnekleme ile 7 µm kalınlığında transvers seri kesitler alınarak histolojik yapıyı değerlendirmek için cam lamalar üzerine alındı. Elde edilen kesitler bir gece 60°C etüvde ve ksilende deparafinize edildikten sonra dehidratasyon işlemi uygulanarak hematoksilin-eozin (Harris'in Hematoksileni) yöntemi ile boyandı (Tablo 2). Boyanan tüm kesitler Kanada balsamı ile kapatıldı.

Tablo 2. Boyama protokolü

İşlem	Kullanılan Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C Etüv	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen	5 Dakika
	Ksilen	5 Dakika
	Ksilen	5 Dakika
Rehidratasyon	% 100 Alkol	5 Dakika
	% 96 Alkol	5 Dakika
	% 80 Alkol	5 Dakika
	% 70 Alkol	5 Dakika

Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Boyama	Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Diferansiyasyon	Asit-Alkol	1 Saniye
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
	Akarsu	5 Dakika
	% 80 Alkol	1 Saniye
Yıkama	% 96 Alkol	1 Saniye
	% 96 Alkol	1 Saniye
	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	

Preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX50, Tokyo, Japonya) 4'lük (x4) büyütmelemlerde incelendi. Sistemden dijital kamera ile alınan görüntülerin stereolojik analizleri bilgisayarda Adobe Photoshop 7.0 programı ile yapıldı.

3.3. Stereolojik Yöntem

Sistemik rastgele örnekleme kuralına göre ilgilenilen doku hacmini ve alanını hesaplamak için koronal olarak alınan, eşit uzaklıkta (1/40) paralel ve seri kesitler kullanıldı (Gundersen, 1986). Bu aralık, stereolojinin temel prensiplerinden olan etkinlik prensibine göre, bir örnekten elde edilen sonuçların "hata katsayısı" göz önünde bulundurularak belirlendi (Sahin ve ark., 2001). Yine kurallar dahilinde sistematik rastgelelik göz önüne alınarak ilgili organdan geçen tüm seri kesit görüntüleri ışık mikroskobu altında x10 büyütmelemlerde elde edildi. Elde edilen resimler üzerinde greftlenen alanda oluşan bağ dokusu hacmi, primer kemik hacmi, damar dokusu hacmi hesaplandı. Tüm hacim değerlendirmeleri; eşit aralıklı ve paralel dilimlere ayrılmış bir yapının hacmini hesaplama yöntemi olan Cavalieri prensibine göre yapıldı.

Cavalieri prensibinin uygulanması esnasında kullanılan noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta aralığı kesit görüntüleri için 10 mm (10000 mikrometre) olarak düzenlendi. Kesit görüntüsü üzerine rastgele biçimde yerleştirilen ilgili noktalı alan ölçüm cetvelindeki noktalardan, ilgilenilen alanla kesişenler sayıldı. Tüm

hesaplamaların ardından, primer kemik hacmi, bağ doku hacmi ve damar dokusu hacmi değerlendirildi. İlgili yapıların hacmi (V); düşen toplam nokta sayısı (Σp), bir noktanın temsil ettiği alanın [a(p)] ve kesit kalınlığının (t) çarpımı ile aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$V = \Sigma p \times [a(p)] \times t$$

3.4. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel değerlendirmeler SPSS yazılımında (SPSS 21.0 for Windows) yapıldı. Elde edilen verilere Tukey ve One-Way Anova testleri yapıldı.

3.5. Ekstrelerin Hazırlanması

3.5.1. Propolis

Propolis Üretimi

Yararlanılan propolis Samsun-Havza bölgesinden 2012 yılının yaz aylarında elde edildi. Üretim yapılan bölge çam ağacı, akasya ağacı, kekik ve dağ yoncası bitkileri bakımından zengindir. Propolis üretimi için arı kovanının örtü kapağı yerine beyaz pamuklu bez konuldu ve arının Propolis taşımaya başladığı dönemde bu bez üst kapakla birlikte hafif açık bırakıldı. İşçi arılar daha fazla Propolis taşıyıp bu açıklığı kapatmaya çalıştıkça bez üzerinde biriken Propolis ile birlikte alınıp dondurucuya konuldu. 24 saat sonra bez dondurucudan alınıp ovalanarak üzerindeki Propolis toplandı. Propolisin her türlü metal ile teması engellendi ve ekstraksiyon yapılabilmek üzere buzdolabında saklandı.

Propolis Ekstresi

1g propolis tartılarak üzerine 10 ml DMSO (Merck, Almanya) eklendi (Şekil 18-19). Karışımın iyi çözünmesi amacıyla karışım 24 saat süreyle 37°C'de inkübatörde (Nüve, Türkiye) bırakıldı (Şekil 20).



Şekil 18. Ham propolisin tartılması ve DMSO



Şekil 19. Propolisin DMSO içinde çözülmesi



Şekil 20. Elde edilen karışımın 24 saat süreyle 37°C’de bekletilmesi

Ardından çözelti karıştırıldıktan sonra süzgeç kâğıdından süzülerek kaba partiküllerinden arındırıldı (Özan, 2006). Daha sonra elde edilen süzölmüş karışım 33mm çaplı, 0,22µm porlara sahip enjektör filtresinden (Millex-GV, Merck, Almanya) geçirilerek steril hale getirildi (Katsuda ve ark., 2015) (Şekil 21).



Şekil 21. Elde edilen karışımın steril hale getirilmesi amacıyla kullanılan 33mm çaplı, 0,22µm porlara sahip enjektör filtresi

3.5.2. Üzüm Çekirdeği Ekstresi

Siyah Üzüm Çekirdeklerinin Ekstraksiyonu

Organik olarak üretilmiş olan siyah üzümlerin (*vitis vinifera*) yetiştirildiği yer Zonguldak-Kilimli ilçesidir. Elde edilen siyah üzümlerin çekirdekleri ayrıldıktan sonra toz ve partiküllerden arındırmak amacıyla saf soğuk su ile yıkandı ve açık havada üzeri kapalı vaziyette 24 saat boyunca kurutularak ve ekstraksiyona hazır hale getirildi. Üzüm çekirdeklerinden proantosiyanidin Pekić ve ark. (1998) tarafından tanımlanan metot esas alınarak ekstre hazırlandı. Ekstraksiyon için hazır hale getirilen bütün ve kırılmamış üzüm çekirdeklerinden 10 g tartıldı (Şekil 22). Daha sonra bir mezürde hazırlanmış ekstraksiyon çözücüsü (aseton-su, 3:7) ilave edildi (Şekil 23). Elde edilen karışım manyetik karıştırıcı ile 45°C ve 700rpm'de 24 saat bekletildi. Daha sonra elde edilen sulu ekstre bir süzgeç kağıdı yardımı ile çekirdeklerinden ayrıldı. Kolloidal halde bulunan ekstre santrifüj cihazında 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi (Şekil 24). Evaporatörde 45°C ve 200 rpm'de vakum altında 30 dk muamele edilmek suretiyle çözücünün büyük bir kısmı uçuruldu. Daha sonra elde edilen süzölmüş karışım 0,22µm porlara sahip enjektör filtresinden (Millex-GV, Merck, Almanya) geçirilerek steril hale getirildi (Katsuda ve ark., 2015) (Şekil 21).



Şekil 22. Üzüm çekirdeklerinin tartılması



Şekil 23. Aseton-su karışımının üzüm çekirdekleri üzerine eklenmesi



Şekil 24. Karışımın berrak hale gelmesi için 3000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmesi

3.5.3. Ankaferd Kanama Durdurucu

Ankaferd kanama durdurucu ise 2 ml'lik ampuller halinde Ankaferd İlaç Kozmetik A.Ş.'den (Türkiye) hazır olarak temin edildi.

3.6. DPPH Serbest Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini

Ticari bakımdan temin edilebilen ve kararlı bir organik azot radikal bileşiği olan 2,2-difenilpikrilhidrazil radikali(DPPH), bitki özütleri ve yiyecek maddelerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntem, DPPH'in metanolde hazırlanan çözeltilerinin bir hidrojen verici antioksidan madde varlığında radikal olmayan DPPH-H'a dönüşümünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. DPPH'in 517 nm'deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmaya orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel veya nicel olarak belirlenir (Prior ve ark., 2005). Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalının rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal temizleme aktivitesi olarak gösterilir. Yöntem hızlıdır, 30 dakikalık analiz süresi ve insan gücü açısından kolaydır, ayrıca çok özel cihaz ve reaktifler gerektirmediğinden dolayı da tercih edilir. DPPH'nin serbest radikal olması, havadan, ısı ve ışıktan kolayca etkilenebilmesi nedeniyle analizlerin oldukça seri ve en az 3 kez tekrarlanması gerekmektedir. Tekrarlanan denemelerin ortalamaları alınmak suretiyle sonuçlar elde edilir (Payan, 2007).

Propolis, üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd'in serbest radikal giderme aktivitesi Blois'in (Charles, 2012) uyguladığı metoda göre belirlenmektedir. 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH', 0,1 mg 100 ml metanolde) çözeltisinin 1 ml si ile 3 ml farklı konsantrasyonda (50-500 µg/ml) hazırlanmış ekstre ve standart antioksidan maddelerin çözeltileri ile vortex cihazıyla iyice karıştırıldı (Şekil 25). 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilen çözeltiler 517 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü (Şekil 26). Kör olarak her ajanın kendi çözücüsü kullanıldı.



Şekil 25. Antioksidan ajanların kendi çözücülerıyla 3 farklı konsantrasyonda (1/1, 1/10, 1/100) karıştırılması



Şekil 26. Çözeltilerin 517 nm’de absorbans ölçümlerinin yapılması

Örneklerin radikal giderme aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı (Charles, 2012).

$$\text{DPPH}^{\cdot} \text{ giderme aktivitesi } \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀: kontrolün absorbansı

A₁: Örnek absorbansı (ekstre ve standart madde)

3.7. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini (Folin-Ciocalteu Metodu)

Metot, suda ve diğer organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor menekşe renkli kompleks 750 nm'de maksimum absorbands oluşturur. Sonuçların karşılaştırılması amacıyla standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı.

Ekstreler içindeki toplam fenol miktarları Folin-Ciocalteu Metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edildi. Bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asit, %50'lik metanolde çözüldü. 0,5 ml örnek, 2,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (hacimce %10'luk, suda) ve 7,5 ml sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik, a/h, suda) deney tüpünde karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Çözeltilerin absorbands değerleri 750 nm'de spektrofotometrede okunmuş, toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplandı (Öztürk ve ark., 2004).

4. BULGULAR

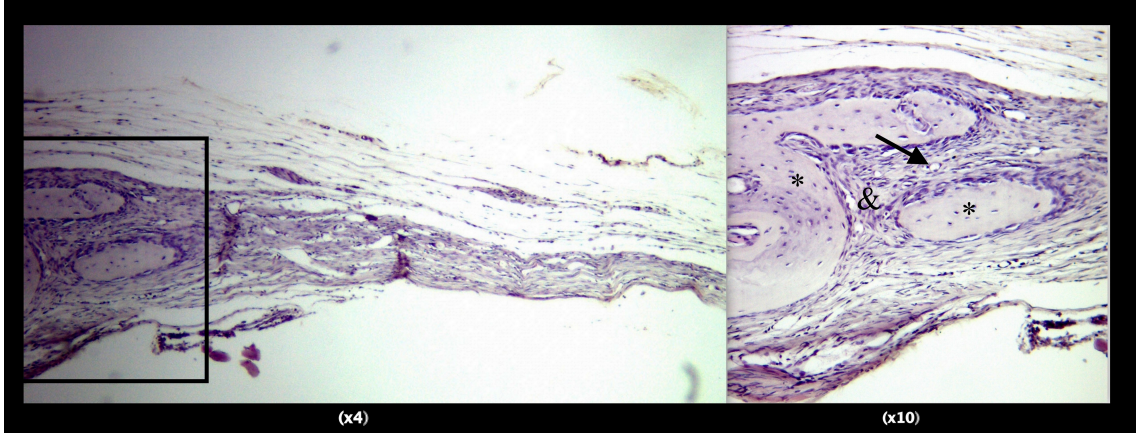
4.1. Histolojik Bulgular

4 grupta 14. gün sonunda 4 grupta ise 28. gün sonunda defekt alanındaki primer kemik, bağ dokusu ve damar alanı 4 kez büyütme (x4) ve 10 kez büyütme (x10) ile elde edilen histolojik görüntülerde değerlendirilmiştir.

4.1.1 Kontrol Grubu

Kontrol14 Grubu

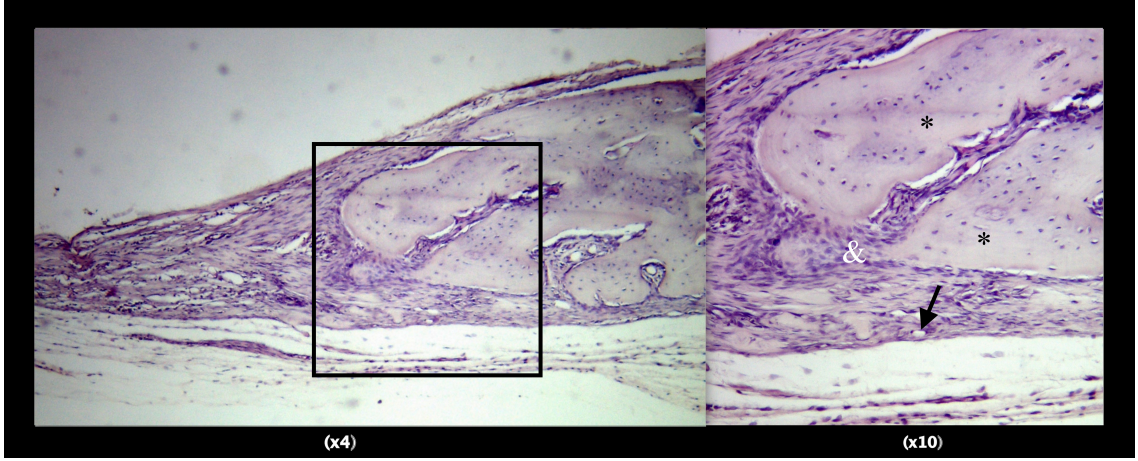
Defekt bölgesinde bağ dokusu, yeni damar ve primer kemik oluşumu izlenmektedir. Bağ dokusu içinde primer kemik dokusu odağı belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 27).



Şekil 27. Kontrol14 grubunun histolojik görüntüsü. Yeni damar (→), bağ dokusu (&), primer kemik (*) işaretleriyle gösterilmiştir

Kontrol28 Grubu

Defekt bölgesindeki bağ dokusu, primer kemik ve yeni damar oluşan bölgeler izlenmektedir (Şekil 28).

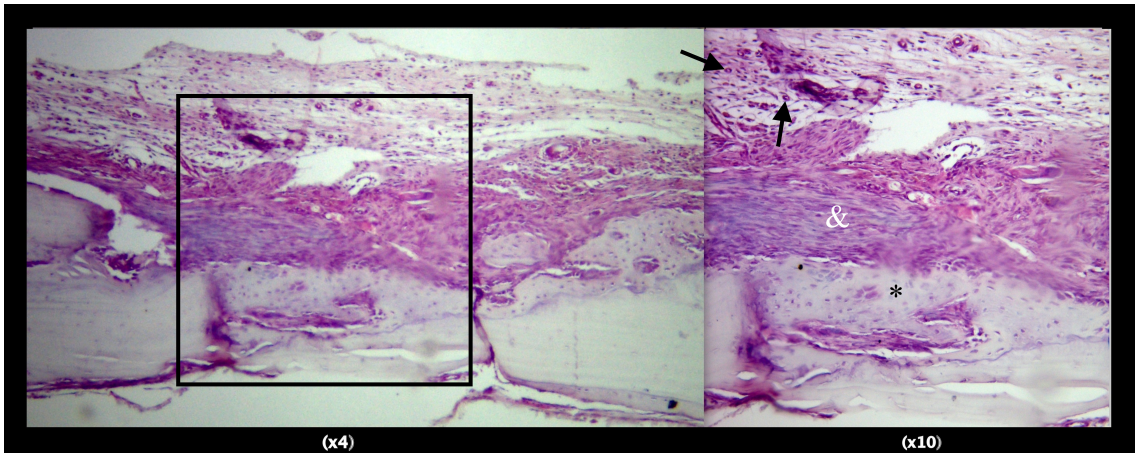


Şekil 28. Kontrol28 grubunun histolojik görüntüsü. Yeni damar (→), bağ dokusu (&), primer kemik (*) işaretleriyle gösterilmiştir

4.1.2 Propolis Grubu

Propolis14 Grubu

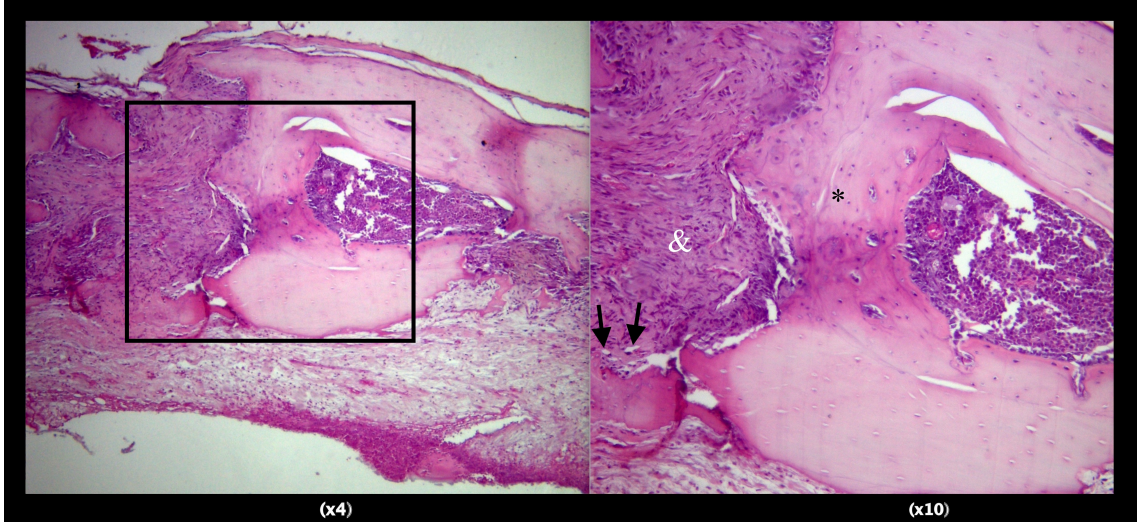
İyileşme bölgesinde bağ dokusu, yeni damar ve primer kemik oluşumu izlenmektedir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bağ dokusu ve primer kemik oluşumundaki artış belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 29).



Şekil 29. Propolis14 grubunun histolojik görüntüsü. Yeni damar (→), bağ dokusu (&), primer kemik (*) işaretleriyle gösterilmiştir

Propolis28 Grubu

İyileşme bölgesinde bağ dokusu, yeni damar ve primer kemik oluşumu izlenmektedir. Kontrol grubu ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında bağ dokusu ve primer kemik oluşumundaki artış belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 30).

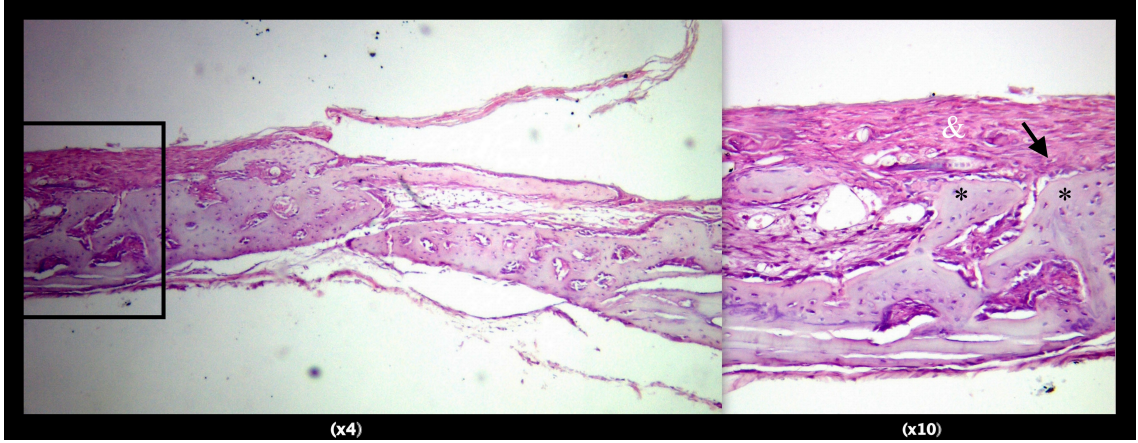


Şekil 30. Propolis28 grubunun histolojik görüntüsü. Yeni damar (➔), bağ dokusu (&), primer kemik (*) işaretleriyle gösterilmiştir

4.1.3. Üzüm Grubu

Üzüm14 Grubu

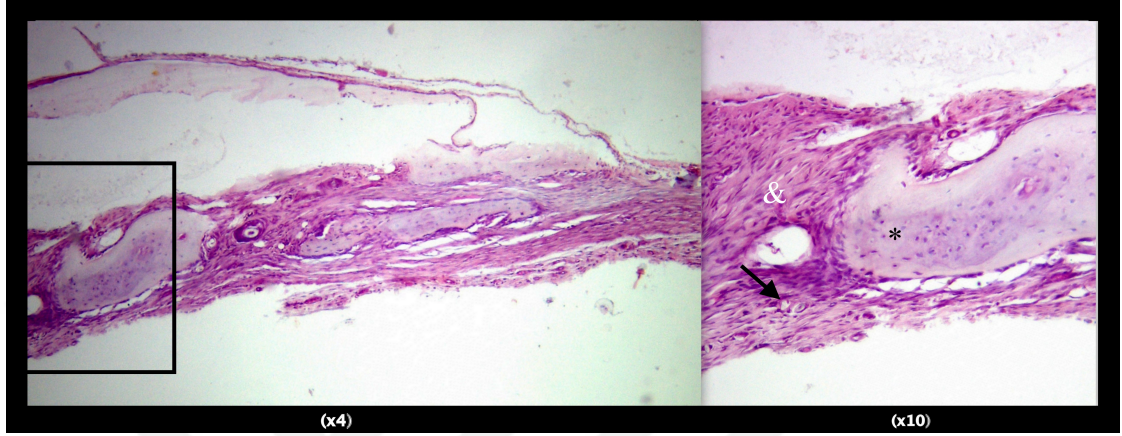
İyileşme bölgesinde bağ dokusu, primer kemik ve yeni damar alanları izlenmektedir. Oluşan primer kemik miktarının kontrol grubuna nazaran belirgin şekilde arttığı gözlenmektedir (Şekil 31).



Şekil 31. Üzüm14 grubu histolojik görüntüsü. Yeni damar (➔), bağ dokusu (&), primer kemik (*) işaretleriyle gösterilmiştir

Üzüm28 Grubu

İyileşme bölgesinde bağ dokusu, primer kemik ve yeni damar alanları izlenmektedir. Primer kemik alanları bağ dokusu içerisinde adacıklar halinde görülmektedir (Şekil 32).

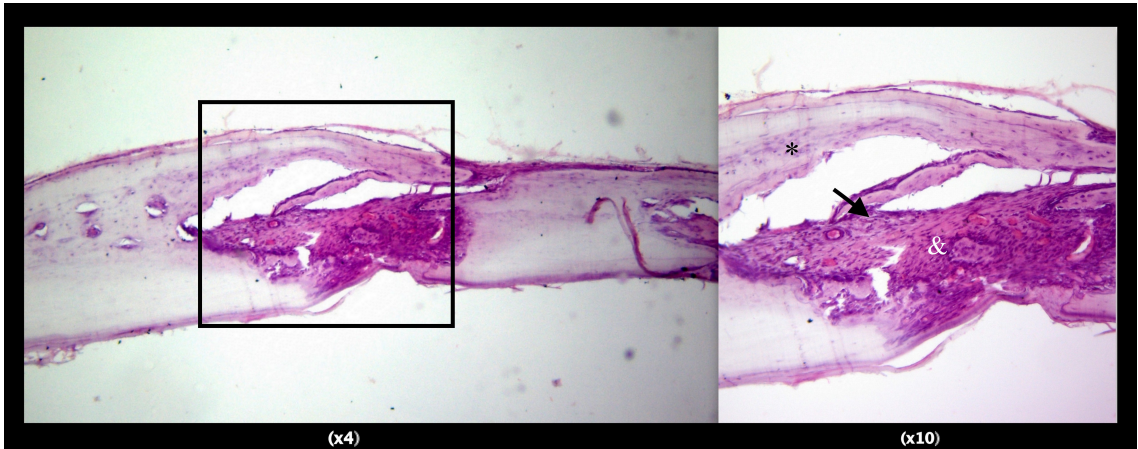


Şekil 32. Üzüm28 grubu histolojik görüntüsü. Yeni damar (→), bağ dokusu (&), primer kemik (*) işaretleriyle gösterilmiştir

4.1.4. Ankaferd Grubu

Ankaferd14 Grubu

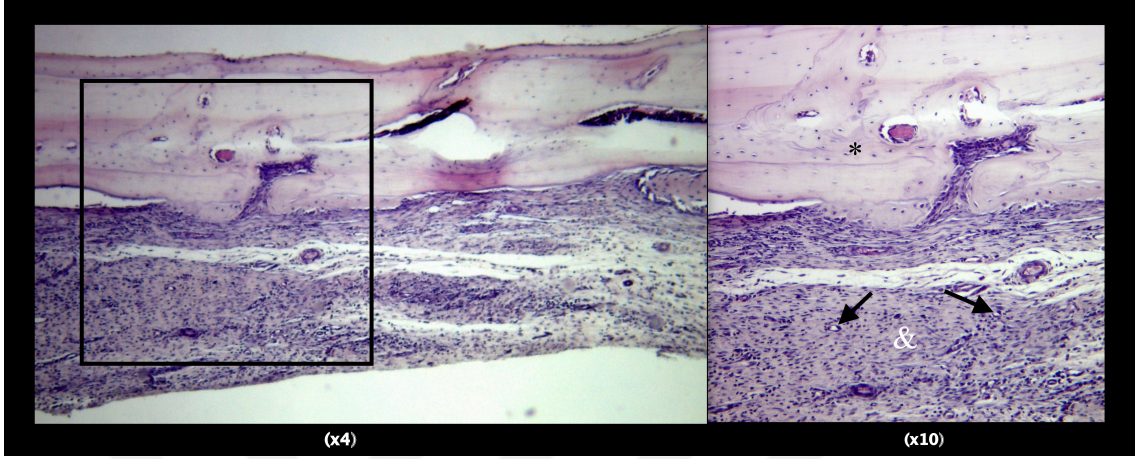
İyileşme bölgesindeki bağ dokusu, primer kemik ve yeni damar bölgeleri izlenmektedir. Primer kemik bölgeleri arasında kalan ve kemikleşmeye devam eden bağ dokusu görülmektedir (Şekil 33).



Şekil 33. Ankaferd14 grubu histolojik görüntüsü. Yeni damar (→), bağ dokusu (&), primer kemik (*) işaretleriyle gösterilmiştir

Ankaferd28 Grubu

İyileşme bölgesindeki bağ dokusu, primer kemik ve yeni damar bölgeleri izlenmektedir (Şekil 34).



Şekil 34. Ankaferd28 grubu histolojik görüntüsü. Yeni damar (→), bağ dokusu (&), primer kemik (*) işaretleriyle gösterilmiştir

4.2. Stereolojik Bulgular

4.2.1. Kemik Hacmi

14. günde sakrifiye edilen gruplar ele alındığında primer kemik hacmi; Üzüm14>Ankaferd14>Propolis14>Kontrol14 olarak tespit edilmiştir (Şekil 35). Ankaferd14 ve Üzüm14 gruplarında primer kemik hacmi Kontrol14 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Ankaferd14: $0,148\text{mm}^3$, Üzüm14: $0,192\text{mm}^3$, Kontrol14: $0,074\text{mm}^3$) (Tablo 3).

Propolis14 grubunda Kontrol14 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da primer kemik hacmi daha yüksek bulunmuştur ($p>0.05$) (Propolis14: $0,118\text{mm}^3$, Kontrol14: $0,074\text{mm}^3$) (Tablo 3).

28. günde sakrifiye edilen gruplar ele alındığında primer kemik hacmi; Propolis28>Üzüm28>Kontrol28>Ankaferd28 olarak tespit edilmiştir (Şekil 35). Propolis28 grubunda primer kemik hacmi tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Propolis28: $0,233\text{mm}^3$, Üzüm28: $0,119\text{mm}^3$, Kontrol28: $0,077\text{mm}^3$, Ankaferd28: $0,065\text{mm}^3$) (Tablo 3).

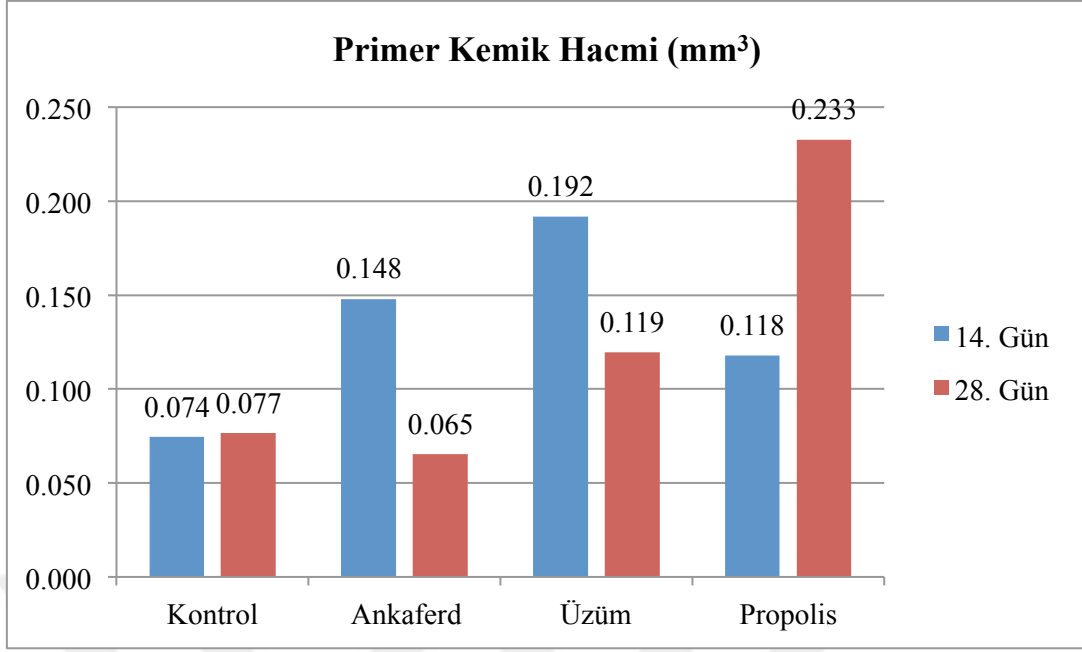
Üzüm28 grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Kontrol28 grubuna göre primer kemik oluşumu daha yüksek bulunmuştur ($p>0.05$) (Üzüm28: $0,119\text{mm}^3$, Kontrol28: $0,077\text{mm}^3$) (Tablo 3).

Tablo 3. Gruplara göre 14. gün ve 28. gün sonunda oluşan primer kemik hacimleri

Süre	Gruplar	Ortalama Primer Kemik Hacmi (mm^3)	Minimum (mm^3)	Maksimum (mm^3)	Standart Sapma
14. Gün	Kontrol	0,074	0,046	0,085	0,016
	Ankaferd	0,148	0,102	0,201	0,037
	Üzüm	0,192	0,168	0,211	0,019
	Propolis	0,118	0,098	0,144	0,018
28. Gün	Kontrol	0,077	0,061	0,094	0,014
	Ankaferd	0,065	0,057	0,078	0,008
	Üzüm	0,119	0,086	0,142	0,021
	Propolis	0,233	0,201	0,298	0,042

Ankaferd28 grubunda primer kemik hacmi Kontrol28 grubundan daha az olarak tespit edilmiştir.

Tüm gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında primer kemik hacmi Propolis28>Üzüm14>Ankaferd14>Üzüm28>Propolis14>Kontrol28>Kontrol14>Ankaferd28 olarak tespit edilmiştir (Şekil 35). Propolis28 grubunda primer kemik hacmi Üzüm14 grubu hariç diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Üzüm14 grubunda primer kemik hacmi Propolis28 ve Üzüm14 grupları hariç diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ankaferd14 grubunda primer kemik hacmi Ankaferd28, Kontrol14 ve Kontrol28 gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 35).



Şekil 35. Gruplara göre 14. gün ve 28. gün sonunda oluşan primer kemik hacimleri

4.2.2. Bağ Dokusu Hacmi

14. gün sakrifiye edilen gruplar arasında yeni bağ doku hacmi; Ankaferd14>Propolis14>Üzüm14>Kontrol14 olarak tespit edilmiştir (Şekil 36).

Ankaferd14 grubunda yeni bağ doku hacmi Kontrol14 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Ankaferd14: $0,285\text{mm}^3$, Kontrol14: $0,139\text{mm}^3$) (Tablo 4).

Propolis14 ve Üzüm14 grubunda yeni bağ doku hacmi Kontrol14 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek bulunmuştur ($p > 0.05$) (Propolis14: $0,277\text{mm}^3$ Üzüm14: $0,244\text{mm}^3$) (Tablo 4).

28. gün sakrifiye edilen gruplar arasında yeni bağ dokusu hacmi; Propolis28>Ankaferd28>Üzüm28>Kontrol28 olarak tespit edilmiştir (Şekil 36).

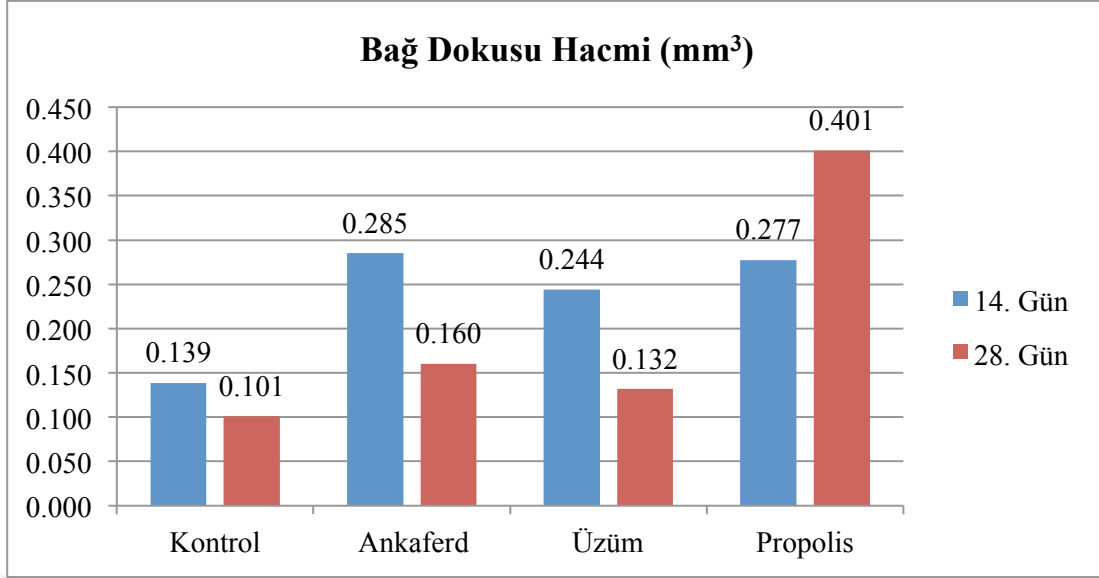
Propolis28 grubunda yeni bağ doku hacmi tüm 28 gün gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Propolis28: $0,401\text{mm}^3$, Ankaferd28: $0,160\text{mm}^3$, Üzüm28: $0,132\text{mm}^3$, Kontrol28: $0,101\text{mm}^3$) (Tablo 4).

Ankaferd28 ve Üzüm28 grubunda yeni bağ doku hacmi Kontrol28 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek bulunmuştur ($p>0.05$) (Ankaferd28: $0,160\text{mm}^3$, Üzüm28: $0,132\text{mm}^3$, Kontrol28: $0,101\text{mm}^3$) (Tablo 4).

Tablo 4. Gruplara göre 14. gün ve 28. gün sonunda oluşan bağ doku hacimleri

Süre	Gruplar	Ortalama Bağ Dokusu Hacmi (mm^3)	Minimum (mm^3)	Maksimum (mm^3)	Standart Sapma
14. Gün	Kontrol	0,139	0,108	0,189	0,030
	Ankaferd	0,285	0,186	0,366	0,069
	Üzüm	0,244	0,194	0,313	0,047
	Propolis	0,277	0,210	0,337	0,058
28. Gün	Kontrol	0,101	0,079	0,140	0,025
	Ankaferd	0,160	0,119	0,195	0,030
	Üzüm	0,132	0,100	0,157	0,022
	Propolis	0,401	0,254	0,486	0,093

Tüm gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında yeni bağ doku hacmi Propolis28>Ankaferd14>Propolis14>Üzüm14>Ankaferd28>Kontrol14>Üzüm28>Kontrol28 olarak tespit edilmiştir (Şekil 36). Propolis28 grubunda yeni bağ doku hacmi tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ankaferd14 grubunda yeni bağ doku hacmi Propolis14, Propolis28 ve Üzüm14 grupları hariç diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Propolis14 grubunda yeni bağ doku hacmi Kontrol14, Kontrol28, Ankaferd28 ve Üzüm28 gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Üzüm14 grubunda yeni bağ doku hacmi Kontrol28 ve Üzüm28 gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 36).



Şekil 36. Gruplara göre 14. gün ve 28. gün sonunda oluşan bağ doku hacimleri

4.2.3. Damar Hacmi

14. gün sakrifiye edilen gruplar ele alındığında yeni damar hacmi; Propolis₁₄=Üzüm₁₄>Ankaferd₁₄>Kontrol₁₄ olarak tespit edilmiştir (Şekil 37).

Üzüm₁₄, Propolis₁₄ ve Ankaferd₁₄ gruplarında yeni damar hacmi Kontrol₁₄ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Üzüm₁₄: 0,033mm³, Propolis₁₄: 0,033mm³, Ankaferd₁₄: 0,026mm³, Kontrol₁₄: 0,008mm³) (Tablo 5).

28. gün sakrifiye edilen gruplar arasında yeni damar hacmi; Propolis₂₈>Üzüm₂₈>Ankaferd₂₈>Kontrol₂₈ olarak tespit edilmiştir (Şekil 37).

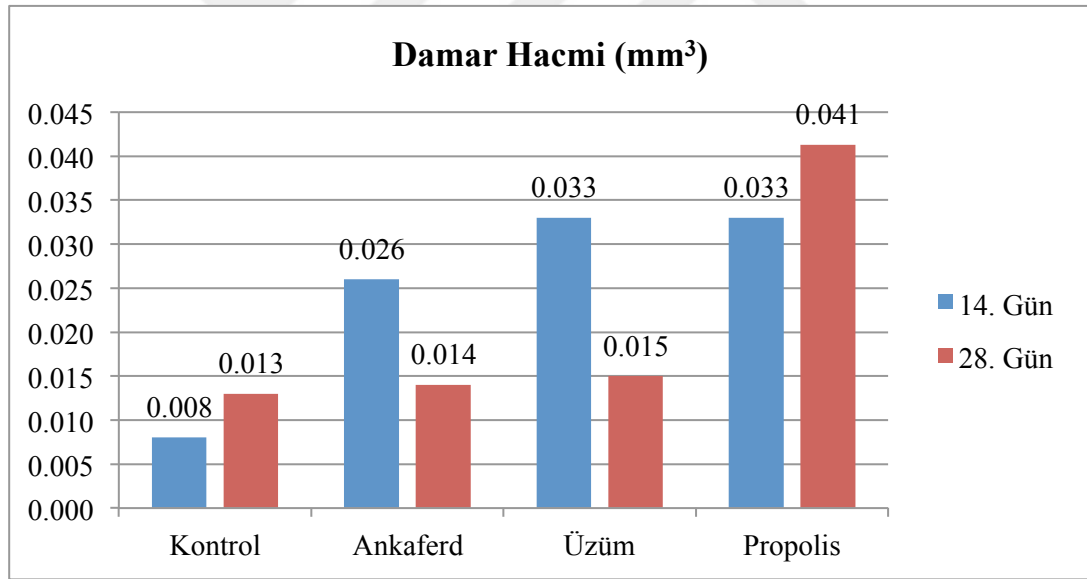
Propolis₂₈ grubunda yeni damar hacmi tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Propolis₂₈: 0,041mm³, Üzüm₂₈: 0,015mm³, Ankaferd₂₈: 0,014mm³, Kontrol₂₈: 0,013mm³) (Tablo 5).

Tüm gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında yeni damar hacmi Propolis₂₈>Propolis₁₄=Üzüm₁₄>Ankaferd₁₄>Üzüm₂₈>Ankaferd₂₈>Kontrol₂₈>Kontrol₁₄ olarak tespit edilmiştir (Şekil 37). Propolis₂₈ grubunda yeni damar hacmi Propolis₁₄ ve Üzüm₁₄ grupları hariç diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Propolis₁₄, Ankaferd₁₄ ve Üzüm₁₄ gruplarında yeni damar hacmi Kontrol₁₄, Kontrol₂₈, Ankaferd₂₈ ve Üzüm₂₈

gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 37).

Tablo 5. Gruplara göre 14. gün ve 28. gün sonunda oluşan yeni damar hacimleri

Süre	Gruplar	Ortalama Damar Hacmi (mm ³)	Minimum (mm ³)	Maksimum (mm ³)	Standart Sapma
14. Gün	Kontrol	0,008	0,006	0,011	0,002
	Ankaferd	0,026	0,020	0,033	0,005
	Üzüm	0,033	0,026	0,041	0,006
	Propolis	0,033	0,039	0,028	0,005
28. Gün	Kontrol	0,013	0,010	0,015	0,002
	Ankaferd	0,014	0,010	0,017	0,003
	Üzüm	0,015	0,014	0,017	0,001
	Propolis	0,041	0,031	0,052	0,008



Şekil 37. Gruplara göre 14. gün ve 28. gün sonunda oluşan yeni damar hacimleri

4.3. DPPH Serbest Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini

Çalışmamızda deneklere lokal olarak uygulanan antioksidan ajanlar ile kontrol grubunda kullanılan serum fizyolojik (SF) için DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi tayini yapıldı. Farklı dozlarda kullanılan materyalin DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi spektrofotometredeki (750 nm) absorbansına göre değerlendirildi (Tablo 6).

Elde edilen sonuç aşağıdaki formüle göre hesaplanıp değişik dozda kullanılan materyallerin DPPH serbest radikalini süpürme yüzdesi hesaplandı (Tablo 6). Bu sonuçlara göre SF kullanıldığında doz arttıkça DPPH serbest radikal miktarı azalmaması SF'nin radikal süpürücü aktiviteye sahip olmadığını göstergesidir. Diğer materyallerde ise doz arttıkça DPPH radikalini azalması bu materyallerin radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

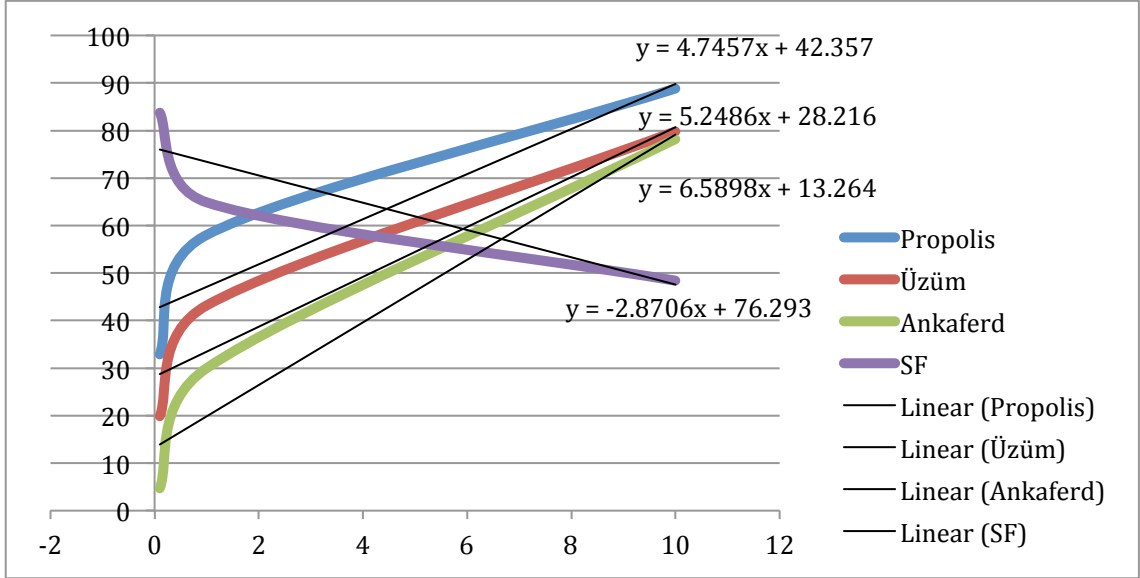
$$\text{DPPH' giderme aktivitesi \%} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀: kontrolün absorbansı (DPPH), A₁: Örnek absorbansı (ekstre ve standart madde)

Tablo 6. Kullanılan materyallerin spektrofotometre absorbans değerleri ve DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi

Materyal	Doz	Absorbans (750nm)	Dpph Serbest Radikalini Süpürme Aktivitesi %
Propolis	10mg/ml	0,2263	88,82
	1mg/ml	0,8495	58,03
	0,1mg/ml	1,3582	32,90
Üzüm	10mg/ml	0,4085	79,82
Çekirdeği	1mg/ml	1,1496	43,20
Ekstresi	0,1mg/ml	1,6214	19,89
Ankaferd	10mg/ml	0,4404	78,24
	1mg/ml	1,4169	29,99
	0,1mg/ml	1,9288	4,70
SF	10mg/ml	1,0451	48,36
	1mg/ml	0,7106	64,89
	0,1mg/ml	0,3287	83,76

Etkili konsantrasyon (EC₅₀) hesaplanabilmesi amacıyla, elde edilen verilerle doza bağımlı olarak kullanılan materyallerin DPPH serbest radikalini süpürme yüzdelere ilişkin grafiği çıkarıldı (Şekil 38). Grafikte yer alan eğrilerin formülleri hesaplanarak ilgili EC₅₀ değeri hesaplandı (Tablo 7). Ancak SF'nin radikal süpürücü aktiviteye sahip olmaması nedeniyle EC₅₀ değeri hesaplanamadı.



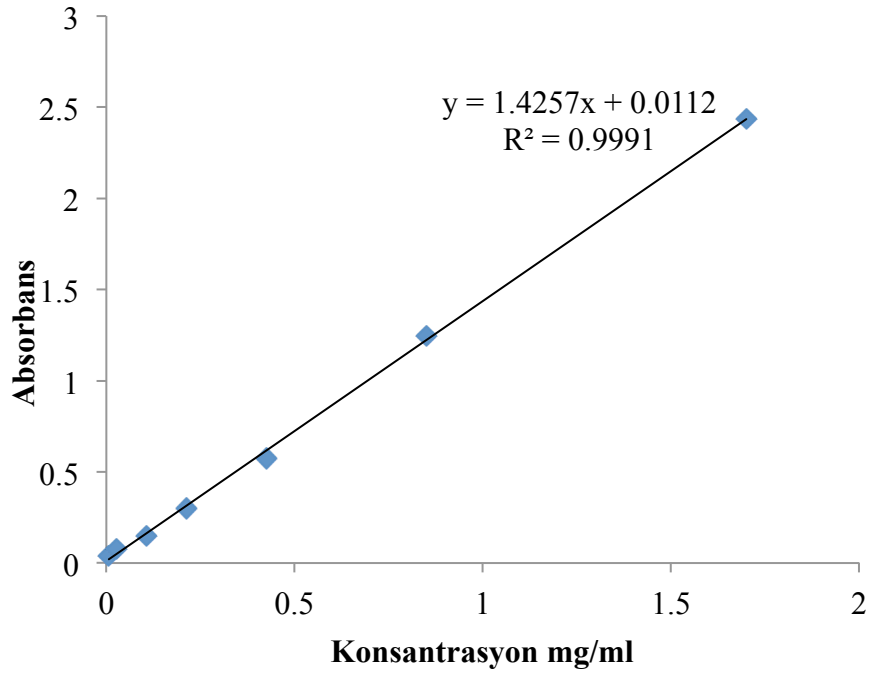
Şekil 38. Kullanılan materyallerin doza bağımlı olarak serbest radikal süpürme aktiviteleri (x: µg/ml, y: %DPPH_(süpürülen))

Tablo 7. Etkili konsantrasyon (EC₅₀) değeri

Gruplar	EC ₅₀ (µg/ml)
Kontrol (SF)	-
Ankaferd	5,57
Üzüm	4,15
Propolis	1,61

4.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini (Folin-Ciocalteu Metodu)

Çalışmamızda deneklere lokal olarak uygulanan antioksidan ajanlar ile kontrol grubunda kullanılan SF için toplam fenolik madde miktarı tayini (Folin-Ciocalteu Metodu) yapıldı. Spektrofotometre (700 nm) ile yapılan ölçüm sonuçları standart olarak kabul edilen gallik asite göre hesaplandı (Şekil 39). Bu amaçla gallik asit kalibrasyon grafiğinden faydalanarak kullanılan materyallerin içerdikleri toplam fenolik madde miktarları mg GAEs/g (mg gallik asit eşdeğeri/g) cinsinden hesaplandı (Tablo 8).



Şekil 39. Gallik asit kalibrasyon grafiği

Tablo 8. Kullanılan materyallerin spektrofotometre absorbans değerleri ve toplam fenolik madde miktarı

Gruplar	Absorbans (700 nm)	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mgGAEs/g)
Kontrol (SF)	0,5673	39
Ankaferd	3,9025	272,93
Üzüm	3,8494	269,21
Propolis	3,9323	275,02

5. TARTIŞMA

Kemik iyileşmesi karmaşık bir mekanizmaya sahiptir ve bu mekanizmayı doğrudan veya dolaylı etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır (Ågren ve ark., 2014; Ding ve ark., 2014). Bunlardan bazıları, osteoporoz, obezite, sigara kullanımı ve alkolizmdir (Gaston ve ark., 1999; Hernigou ve Schuind, 2013). Kemik iyileşme mekanizmasını etkileyen faktörlerden biri de oksidatif strestir (Prasad ve ark., 2003). Oksidatif stres, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin dokuda çoğalarak, kendilerini nötrleyecek olan antioksidanlardan fazla hale gelmesi sonucu dokunun hasar görme riskiyle karşılaştığı durum olarak tanımlanmaktadır (Chandra ve ark., 2015). Oksidatif stres ayrıca enfeksiyon, enflamasyon ve travma gibi aşırı serbest radikal üretimi olduğu durumlarda da meydana gelebilmektedir (Guney ve ark., 2011). Oksidatif stresin ortadan kaldırılabilmesi için serbest radikallerin antioksidan maddeler tarafından etkisiz hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla endojen antioksidan maddelerin oksidatif strese karşı zayıf kaldığı durumlarda antioksidan maddeler eksojen olarak kullanılabilir (Durak ve ark., 1996).

Antioksidanları kaynaklarına göre sınıflandırdığımızda; Endojen kaynaklı ve Eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak ikiye ayırmak mümkündür (Valko ve ark., 2007). Endojen antioksidan vücutta üretilip sürekli hazır bulunan antioksidanlardır (ör: süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, lipoid asit, glutatyon, L-arginin, koenzim Q10) (Willcox ve ark., 2004; Pham-Huy ve ark., 2008). Eksojen antioksidanlar vücutta üretilmeyip vücuda dışarıdan alınan vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olarak bildirilmektedir (Pham-Huy ve ark., 2008). Bu gruptaki antioksidanlar sentetik ve doğal antioksidanlar olmak üzere iki temel grupta incelenebilmektedir. Sentetik antioksidanlar özellikle yiyeceklerin raf ömrünü uzatmak amacıyla üretilen antioksidanlardır. Kimyasal prosesler sonucu üretilen sentetik antioksidanların başlıcaları; Bütillenmiş Hidroksianisol (Sheela ve ark., 2006), Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) ve tert-Bütil Hidrokinon (TBHQ) ve Gallatlar'dır (Marmesat ve ark., 2010). Doğal antioksidanlar hemen hemen tüm bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hatta hayvansal dokularda dahi bulunmakta olup çoğunlukla polifenolik yapıdaki maddeler olarak tanımlanmaktadır. Bu antioksidanların en önemlileri; tokoferoller, sesamol, sesamolin, karnosik asit, rosmarinik asit, polifenoller, flavonoidler, karotenoidler ve askorbik asittir

(Pokorny ve ark., 2001). Bu antioksidan maddeler çoğunlukla meyve, sebze ve hayvansal ürünlerde bulunabilirler (Soya, çay, üzüm, limon, lavanta, ginseng, meyan, propolis vb.) (Türsen, 2006). Son yıllarda propolis ve üzüm ekstresi ile ilgili çokça çalışma yapılmaktadır. Ancak bu çalışmalar genellikle bu maddelerin yumuşak doku iyileşmesi üzerindeki ya da sistemik etkilerini araştırmaktadırlar (Altan ve ark., 2013; Barud Hda ve ark., 2013). Propolis veya üzüm ekstresinin lokal olarak uygulandığı ve kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle çalışmamızda propolis ve üzüm ekstresi kullanılmasına karar verilmiştir. Bununla birlikte T.C. Sağlık Bakanlığı'ndan ruhsatlı ilk Türk ürünü olmasıyla öne çıkan ve tamamen bitkisel bir ürün olan ankaferd kanama durdurucu ile ilgili yapılan çalışmalarda bu ürünün antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Hasgul ve ark., 2014). Ankaferdin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalar oldukça azdır (Isler ve ark., 2010; Şanser ve ark., 2011). Bu sebeplerden dolayı Ankaferd, propolis ve üzüm ekstresini; antioksidan özellikleri ile lokal olarak uygulandığında kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve birbirleriyle karşılaştırmak için bu çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde bu materyaller arasında herhangi bir karşılaştırma yapılan çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle çalışmamız literatüre orjinal bir bakış açısıyla katkı sağlayacaktır.

Kemik oluşumunun genellikle 1. Hafta sonunda başlayıp 6. Haftaya kadar devam ettiği bildirilmektedir. Kemik iyileşmesinin en kritik dönemi ilk 1-2 haftadır. Bu süre zarfında kemiğin iyileşme potansiyeli çeşitli biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal ve patolojik mekanizmalardan etkilenebilmektedir (Kalfas, 2001). Çalışmamızda lokal olarak uygulayacağımız antioksidan ajanların ratlardaki kemik iyileşmesine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla deney planlaması yapılmıştır. Ratların yaşam süresinin planlanması amacıyla literatür taranmış ve bu konuda farklı uygulamalar olduğu görülmüştür. Akita ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada ratların kalvaryalarında 4mm'lik kemik defekti açılarak bu defektlere insan mezenşimal kök hücre emdirilmiş fosfat salin solusyonu, kemik morfojenik protein ve fibroblast büyüme faktörü uygulanmıştır. Deneklerin yaşam süreleri ise 2, 4 ve 8 hafta olarak belirlenmiştir. Nagata ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ratların kalvaryalarında 5mm'lik kemik defektleri oluşturulmuştur ve bu defektlere otojen greft ve trombosit zengin plazma değişik konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Deneklerin

yaşam süresi 30 gün olarak belirlenmiştir. Pryor ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada ratların kalvaryalarında 6mm'lik bilateral kemik defekti açılmıştır. Bu defektlere trombositten zengin plazma uygulanmış ve operasyonu takiben 4. ve 8. haftalarda ratlar sakrifiye edilmiştir. Defekt boyutuyla ilgili olarak ortak bir görüş olmadığından dolayı çalışmamızda defekt çapının ortalama 5mm olarak belirlenmesi uygun görülmüştür. Yaşam süresi bakımından ise kemiğin en kritik iyileşme dönemi olan ilk iki haftadaki etkilerini değerlendirmek amacıyla bir grup denek için yaşam süresinin 14 gün, uyguladığımız antioksidan ajanların uzun vadede kemik iyileşmesine etkisi olup olmadığını değerlendirmek amacıyla kalan deneklerin yaşam süresinin 28 gün olması uygun görülmüştür.

Gruplardaki rat sayılarını belirlemek amacıyla yapılan güç analizi sonucu %99 güven aralığında, %5 duyarlılığa sahip olacak şekilde basit tesadüfi örnekleme yöntemi kullanılarak örnek büyüklüğü n=8 rat olarak belirlenmiştir.

Propolis ekstresi elde edilirken değişik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Propolisin ekstraksiyonunda en yaygın olarak kullanılan yöntem etanol çözeltilisidir (Batista ve ark., 2012). Propolis ekstresi elde edilirken kullanılan çözücülerden bir diğeri DMSO'dur (Netikova ve ark., 2013). Yakın zamana kadar propolis çalışmalarında DMSO kullanımı pek yaygın değildir. Yapılan testlerde propolis için kullanılan çözücülerin (çoğunlukla etanol) belirgin bir inhibitör etki gösterebildiği bildirilmiştir (Netikova ve ark., 2013). DMSO'nun propolis çözücüsü olarak kullanılmasıyla ilgili çalışmalar 2005 yılına uzanmaktadır. Walgrave ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada propolis çözücüsü olarak DMSO'nun etanol yerine tercih edilmesi gerektiğini savunmuş ve dermatit tedavisinde propolisin etanol ekstresinin cilt tahrişi, yağ tabakasının yok olması, cilt kuruluğu ve çatlaklara neden olduğuna dikkat çekmiştir. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda propolis uygulayacağımız bölge cerrahi olarak oluşturulacak kemik defekti bölgesi olduğundan çalışmamızda propolis ekstraksiyonu yaparken çözücü olarak DMSO kullanılması uygun görülmüştür.

Propolis arıların bitki ve ağaçlardan topladığı özütler ile ürettiği reçinemsî bir karışımdır (Crane, 1991). Propolisin içeriğinde bulunan flavonoidler sayesinde propolisin antimikrobiyal (Koo ve ark., 2000; Popova ve ark., 2005), antiviral (Amoros ve ark., 1994), antifungal (Ota ve ark., 2001), antienflamatuar (Wang ve ark., 1993;

Sosa ve ark., 1997), antihepatotoksik (Banskota ve ark., 2001), antikanser (Matsuno, 1995; El-khawaga ve ark., 2003), antioksidan (Basnet ve ark., 1997), antiülser (Kiderman ve ark., 2001), immünostimülasyon (Bratter ve ark., 1999) ve lokal anestezi (Özan, 2006) etkileri bulunmaktadır. Propolisin yeni özelliklerini keşfetmek amacıyla günümüzde bilimsel çalışmalarda propolise sıklıkla yer verilmektedir (Barud Hda ve ark., 2013; Netikova ve ark., 2013).

Propolisin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalara nadiren rastlanmaktadır. Pereira ve ark. (2012) tarafından 28 rat üzerinde yapılan çalışmada Alveolex (Propolis %10, İyodoform %5, Balmumu, Rezin) isimli ticari bir ürün ile rhBMP-2'nin (rekombinant İnsan kemik Morfogenetik Protein-2) kemik iyileşmesine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla ratların kalvaryalarında 5mm'lik defektler hazırlanmış ve bu defektlere sırasıyla Alveolex+rhBMP-2, sadece rhBMP-2, sadece Alveolex yerleştirilmiş, kontrol grubunda ise defekt boş bırakılmıştır. 30 gün sonra denekler sakrifiye edilmiş ve deneklerden alınan örnekler histolojik olarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda Alveolex+rhBMP-2 ve sadece rhBMP-2nin uygulanan gruplarda yeni oluşan kemik miktarı diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı, sadece Alveolex uygulanan grupta ise yeni oluşan kemik miktarı kontrol grubundan fazla olmak birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir. Alveolex ile rhBMP-2'nin birlikte kullanıldığı gruptaki yeni oluşan kemik miktarı sadece rhBMP-2 uygulanan gruptan istatistiksel olarak anlamlı olmasa da fazla olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda Propolis14 grubunda primer kemik hacmi Kontrol14 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olarak tespit edilmiştir ve bu yönüyle literatürdeki bu çalışmayla uyumlu bir sonuç elde edilmiştir. Ancak ratların yaşam süreleri göz önüne alındığında Pereira ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmayı Propolis28 grubuyla kıyaslamak daha iyi olacaktır. çünkü Pereira ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada ratların yaşam süreleri 30 gün, bizim çalışmamızda ise 28 gündür. Bizim çalışmamızda Propolis28 grubundaki primer kemik hacmi Kontrol28 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu bağlamda Pereira ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmayla karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda literatürdeki bu çalışmadan farklı bir sonuç elde edilmiştir. Bu farkların nedeni olarak Alveolex'in propolis içeriğinin düşük (%10) olması, propolisin etkilerinin incelendiği dokuların farklı iç yapılara sahip olması ya da

propolisin farklı kaynaklardan elde edilmesi gösterilebilir. Ayrıca yapılan bu çalışmalardan elde edilen verilerde görülen farklılıkların nedeni olarak ekstraksiyonda kullanılan farklı çözeltiler (Etanol veya DMSO) olması şeklinde değerlendirilebilir.

Propolisin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalardan bazılarında propolis sistemik olarak uygulanmıştır. Guney ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ratların sağ femurlarında deneysel kırık oluşturulup kirshner teli ile fikse edilmiş. Ardından ratlara 3-6 hafta boyunca oral yoldan 200mg/kg/gün propolis (etanol ekstresi) verilmiş ve propolisin kemik iyileşmesine olan etkisi incelenmiştir. Deney sonucunda kemik mineral dansitesi, propolis uygulanan gruplarda hem 3 haftalık hem de 6 haftalık grupta kontrol grubuna göre daha yüksek bulunduğu, histolojik sonuçlara göre ise sadece 3 haftalık grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildiği bildirilmiştir. Altan ve ark. (2013) tarafından 24 rat üzerinde yapılan çalışmada propolisin deneysel olarak hızlı maksiller genişletme (HMG, Rapid maxillary expansion) uygulanan ratlardaki kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 3 gruba ayrılan ratlardan 1. gruba hiçbir şey yapılmamış, 2. gruba sadece HMG yapılmış, 3. Gruba ise HMG yapıldıktan hemen sonra başlamak üzere oral yoldan propolis etanol ekstresi (100mg/kg/gün, Trabzon kaynaklı) ekspansiyon süresince (5 gün) verilmiş. 12 günlük konsolidasyon periyodunun ardından ratlar sakrifiye edilmiş ve ratların midpalatal suturları cerrahi olarak çıkarılarak histolojik incelemeye alınmıştır. Histolojik sonuçlara göre osteoblast, osteoklast ve kapiller sayısı bakımından propolis uygulanan grup diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Oluşan primer kemik miktarı bakımından propolis uygulanan gruptaki primer kemik miktarı diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Enflamatuar hücre yoğunluğu bakımından ise propolis uygulanan grup diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise propolis oral yoldan uygulanmamış direkt olarak cerrahi bölgesine bir sefer lokal olarak uygulanmıştır. Ayrıca etki süresinin artırılması amaçlanarak defekt bölgesine jelatin sünger yerleştirilmiş ve propolisin sünger tarafından emilmesi sağlanmıştır. Çalışma sonucunda Prop28 grubundaki yeni oluşan primer kemik hacmi, bağ dokusu hacmi ve yeni damar hacmi tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek

bulunmuştur. Propolis14 grubunda ise primer kemik hacmi, bağ doku hacmi ve yeni damar hacmi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek bulunmuştur. Bu bilgilerden yola çıkarak propolisin oral yoldan uygulandığı çalışmalarla lokal olarak uygulamış olduğumuz çalışmamızı kıyasladığımızda elde ettiğimiz sonuçların bu çalışmalarla uyumlu olduğu belirlenmiştir. Uzun süreli olarak oral yoldan uygulanan propolisle bir sefere mahsus cerrahi bölgesine lokal olarak uygulanan çalışmalardan elde edilen sonuçların benzer olmasının nedeni olarak çalışmamızda uyguladığımız propolisin etki süresini uzatmak amacıyla defekt içine yerleştirilen jelatin süngerin propolisi emerek ortamdan uzaklaşmasını geciktirmesinin etkili olabileceği değerlendirilebilir.

Propolisin osteoklast oluşumu ve olgunlaşması üzerinde inhibisyon etkisi olabileceği bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Toker ve ark., 2008; Pileggi ve ark., 2009). Ayrıca Toker ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada ratlarda oluşturulan periodontitis sonucu meydana gelen kemik kaybı üzerinde propolisin etkileri incelenmiş ve propolis uygulaması sonucu tüm ratlarda osteoklast aktivitesinin azaldığı, bunun tam tersi olarak istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde osteoblast seviyesinin arttığı ve alveoldeki kemik kaybının azaldığı bildirilmiştir. Bilindiği üzere kemik rezorpsiyonu genellikle osteoklast ve makrofajların varlığıyla ilişkilidir. Bizim çalışmamızda da propolisin primer kemik oluşumunu diğer gruplara göre geç dönemde artırmış olmasının nedeni osteoklast aktivitesini inhibe etmiş olması olabilir.

Propolisle ilgili çalışmalar daha çok propolisin yumuşak dokuların iyileşmesi üzerindeki etkilerini incelemeye yöneliktir. Barud Hda ve ark. (2013) tarafından 24 rat kullanılarak yapılan çalışmada ratların sırt bölgelerine 6mm çapında yuvarlak insizyonlar yapılarak propolis içeren biyoselüloz membranla yara bölgeleri kapatılmış ve kontrol grubuna göre daha iyi yara iyileşmesi sağlandığı bildirilmiştir. Kilicoglu ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada sistemik olarak uygulanan propolisin (100mg/kg/gün) ratlarda yapılan kolon rezeksiyonu sonrası anastomozdaki etkisini araştırmışlar ve propolisin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kolonun basınç dayanımının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca propolisin enflamatuvar cevabı inhibe ederek anastomoz bölgesindeki iyileşmeyi desteklemekle kalmayıp fibroblastların kollajen sentezlemesini de teşvik ettiği bildirilmiştir. Batista ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada iki farklı propolisin

etanol ekstratı eritilmiş lanolin ve vazelin (3:7) ile karıştırarak %20 propolis içerikli iki farklı krem elde edilmiş ve bu kremlerin ratlardaki yara iyileşmesine olan etkileri incelenmiştir. Çalışmada 20 adet erkek wistar türü rat kullanılmış ve ratların sırt bölgelerinde 1,2 cm yuvarlak kesi yapılarak deri dokusu kaldırılmış yara bölgelerine 15 gün boyunca steril enjektör kullanılarak propolis içerikli 2 farklı krem (1ml) ile tedavi uygulanmıştır. Araştırma sonucunda propolis kremlerin karaciğer ve böbrekte herhangi bir toksisite göstermediği bildirilmektedir. Propolis içerikli kremlerin kullanıldığı deneklerde epitelizasyonun kontrol grubuna göre daha hızlı olduğu belirtilmektedir. 2009 yılında 28 rat üzerinde yapılan bir çalışmada ratların sırt bölgesinde 2 adet 7 mm'lik kare şekilli deri defektleri oluşturulduğu ve günlük olarak bu defektlerden birine propolisli krem diğerine propolis içermeyen baz krem uygulandığı bildirilmiştir. Propolisin yara iyileşmesine olan etkisinin incelendiği çalışmadaki ratlar 4 gruba ayrılmış ve gruplar operasyonu takip eden 4.,7.,10. ve 14. günde sakrifiye edildiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda propolis uygulanan bölgelerden 4., 7. ve 10. günlerde alınan örneklerde yeni hücre yapımının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunduğu bildirilmiştir. 14. günde ise tüm gruplarda yara iyileşmesinin tamamen sona erdiği bildirilmiştir (Sehn ve ark., 2009). Bizim çalışmamız sonucunda Propolis14 grubunda ise primer kemik hacmi, bağ doku hacmi ve yeni damar hacmi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek bulunmuştur. Propolis28 grubundaki yeni oluşan primer kemik hacmi, bağ dokusu hacmi ve yeni damar hacmi tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bilgiler ışığında propolisin kemik dokusu dışındaki dokularda da iyileşmeye olumlu yönde etkisi olduğu ve bu bağlamda çalışmamızdan elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu sonucuna varılabilir.

Üzüm çekirdeği ekstresi, üzüm (*vitis vinifera*) meyvesi ya da çekirdeğinden elde edilen antioksidan özelliğe sahip olan bir tür flavonoiddir (Monagas ve ark., 2003). Üzüm çekirdeği ekstresi elde edilecek üzümün (yetiştirdiği yer vb.gibi) farklı özelliklere sahip olabileceği gibi üzüm çekirdeklerinin elde edilme yöntemleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Payan (2007) tarafından yapılan çalışmada üzüm çekirdeklerinin en verimli ekstraksiyonunu elde edebilmek için Pekić ve ark. (1998) tarafından tanımlanan teknik kullanılarak aseton, etil asetat, etanol ve metanolün saf olarak ya da değişik oranlarda sulu çözeltileri kullanılmıştır. Ekstraksiyon veriminin en yüksek olduğu

çözeltilinin aseton:su (3:7) olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple biz de çalışmamızda üzüm çekirdeklerinin ekstraksiyonunu yaparken Pekić ve ark. (1998) tarafından tanımlanan teknikte aseton:su (3:7) karışımını kullandık.

Üzüm çekirdeği ekstresi ile ilgili son yıllarda birçok çalışma yapılmıştır ancak üzüm çekirdeği ekstresinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışma üzüm çekirdeği ekstresinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesi bakımından ilk defa uygulanmıştır. Literatürde üzüm çekirdeği ekstresi ile yapılan ve üzüm çekirdeği ekstresinin kemik gelişimi üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Kamitani ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada düşük kalsiyum içerikli diyet uygulanan ratlarda 3 hafta üzüm çekirdeği ekstresi destekli diyetin mandibula gelişimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda üzüm çekirdeği ekstresi destekli diyet uygulanan grupta diğer gruplara göre trabeküler kemik yoğunluğu ve trabeküler kemik mineral içeriği, kortikal kemik yoğunluğu, kortikal kemik enine kesit alanı ve kortikal kemik mineral içeriği istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre üzüm çekirdeği ekstresinin ratlarda mandibula kemik yoğunluğu ve kemik oluşumunu artırdığı bildirilmiştir. Yine buna benzer planlanan çalışmalarda üzüm çekirdeği ekstresinin mandibula kondilindeki kemik yoğunluğu ve kemik oluşumunu artırdığı bildirilmiştir (Kojima ve ark., 2004; Ishikawa ve ark., 2005). Yahara ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada üzüm çekirdeği ekstresinin düşük kalsiyumlu diyet uygulanan ratlardaki tibia diafizi üzerindeki etkileri 3 nokta bükme testi kullanılarak incelenmiş ve üzüm çekirdeği ekstresi destekli diyet uygulanan grupta kemik dayanıklılığı diğer gruplara nazaran daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise üzüm çekirdeği ekstresi oluşturulan kemik defekti bölgesine lokal olarak uygulanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre Üzüm14 grubundaki primer kemik hacmi Kontrol14 grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Üzüm28 grubunda ise primer kemik hacmi Kontrol28 grubundan istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olarak tespit edilmiştir. Üzüm28 grubundaki primer kemik hacmi Üzüm14 grubundan da düşük olarak tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak 14.güne kadar oluşmuş olan primer kemiğin 28 gün dolmadan sekonder kemiğe dönüşmüş olması şeklinde değerlendirilebilir. Bu bilgiler ışığında 14.günde primer kemik hacminin istatistiksel olarak artmış olması üzüm çekirdeği

esktresinin kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu açıdan bakıldığında elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Ancak 28.gündeki primer kemik hacminin düşük olarak belirlenmesi 14.günden sonra primer kemik oluşma miktarının azaldığı şeklinde de değerlendirilebilir. Bu açıdan bakıldığında üzüm çekirdeği esktresinin ilk 14 günde kemik iyileşmesi için olumlu etki yaparken 14.günden sonra inhibe edici etki göstermiş olabileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Yapılmış olan bu çalışmalar bizim çalışmamızdan üzüm çekirdeği esktresi uygulama şekli, süresi, üzüm çekirdeği esktresi kaynağı ve ekstraksiyon metodu bakımından farklılıklar içerdiğinden dolayı elde edilen sonuçlarla ilgili net bir yorum getirmek mümkün olamamaktadır. Bu konuda daha geniş bilgiye sahip olmak için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Üzüm çekirdeği esktresi kullanılarak yapılan çalışmalardan bazılarında üzüm çekirdeği esktresinin yumuşak dokularda oluşturulan defektlerin iyileşmesine olan etkileri incelenmektedir. Khanna ve ark. (2001) tarafından 9 rat üzerinde yapılan bir çalışmada hazır olarak satın alınan üzüm çekirdeği esktresinin (InterHealth Nutraceuticals, USA) yara iyileşmesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla ratların dorsal bölgelerine iki adet simetrik konumda 16x8mm'lik dikdörtgen şekilli tam kalınlık flep kaldırarak yumuşak doku defekti oluşturulmuş ve defektler sekonder iyileşmeye bırakılmıştır. Defektlerden birine topikal olarak içinde 25 µl üzüm çekirdeği esktresi (100 mg/ml) olan 2,5 mg salin 5 gün boyunca uygulanmıştır. Diğer defekte ise aynı sürede sadece salin uygulanmış. 5 gün sonra defektler dijital görüntüleme yöntemiyle incelenmiş ve ardından denekler sakrifiye edilmiştir. Dijital görüntüleme sonuçlarına göre üzüm çekirdeği esktresi uygulanan defekte yara iyileşmesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha hızlı gerçekleştiği bildirilmiştir. Histolojik sonuçlara göre üzüm çekirdeği esktresi uygulanan grupta bağ doku depozisyonu ve epidermis formasyonu kontrol grubuna göre daha gelişmiş olarak tespit edildiği ve üzüm çekirdeği esktresi uygulanan grupta histolojik organizasyonun daha tatminkar olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise üzüm çekirdeği esktresi ratlarında kalvaryalarında açılan kemik defektlerine cerrahi sırasında lokal olarak uygulanmıştır. Denekler için yaşam süresi 14 gün ve 28 gün olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda Üzüm14 grubunda yeni bağ dokusu hacmi Kontrol14 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olarak tespit edilmiştir. Üzüm28 grubunda

yeni bağ dokusu hacmi Kontrol28 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında elde edilen sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak bulunmuştur.

Ankaferd kanama durdurucu özellikle diş hekimliğinde kanama durdurucu olarak kullanılan, 5 farklı bitki özütünden elde edilen doğal bir üründür (www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008_1.pdf). Asıl kullanım amacı kanama durdurucu olmasına rağmen yapılan çalışmalarda Ankaferd'in antioksidan (Hasgul ve ark., 2014), antineoplastik (Goker ve ark., 2008), antienfeksiyöz (Fisgin ve ark., 2009; Turhan ve ark., 2009), antibakteriyel ve antifungal (Kosar ve ark., 2009) etkilere sahip olduğu bildirilmektedir. Ankaferd'in kemik iyileşmesine olan etkilerini inceleyen çalışmaların sayısı oldukça azdır. Şanser ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ratların kalvaryalarında kemik defekti oluşturulmuş ve defekt bölgesine topikal olarak 0,5 ml Ankaferd uygulanmıştır. 2 hafta arayla suturlar açılıp defekt bölgesi 0,5 ml Ankaferd ile yıkanıp tekrar primer olarak kapatılmıştır. Çalışma sonucunda Ankaferd uygulanan grupta defektin yüzey alanının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı, bunun sonucu olarak Ankaferd'in kemik yapımına olumlu yönde katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda ise ratların kalvaryalarında standart olarak 5 mm'lik yuvarlak kemik defektleri oluşturulmuş ve bu defektlere lokal olarak uygulanacak olan Ankaferd'in etkisi uzatmak amacıyla defektle aynı şekil ve boyutta jelatin sünger yerleştirilmiştir. Ardından defektlere 0,5 ml Ankaferd topikal olarak uygulanmış ve flep primer olarak kapatılmıştır. Ankaferd14 grubunda primer kemik hacmi Kontrol14 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bakımdan elde ettiğimiz sonuçlara göre literatürle uyumlu olarak Ankaferd'in kemik iyileşmesine olumlu yönde katkıda bulunduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda Ankaferd14 grubundaki yeni bağ dokusu ve yeni damar hacmi Kontrol14 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir. Ankaferd28 grubundaki yeni bağ dokusu ve yeni damar hacmi Kontrol28 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olarak tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre 14. güne kadar Ankaferd primer kemik, yeni bağ dokusu ve yeni damar hacmi bakımından literatürle uyumlu olarak kemik iyileşmesine olumlu yönde katkı yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca Şanser ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada 2 hafta arayla fleplerin açılıp Ankaferd uygulanması suretiyle ekstra cerrahi işlemlerle Ankaferd'in

etki süresi uzatılmaya çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda ise Ankaferd'in etki süresini uzatmak amacıyla kontrollü salınım yöntemi olarak da kullanılabilen jelatin süngerler defekt bölgelerine yerleştirilmiştir. Bu sebepten ötürü bizim çalışmamızda ikinci ve üçüncü cerrahi işleme gerek duyulmamıştır. Araştırmacıların yaptıkları çalışmalarında flebin sürekli açılıp kapanmasından dolayı kemik iyileşmesinin olumsuz yönde etkilenmesi ihtimal dahilindedir. Yaptığımız çalışmada propolis, Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresinin rat kalvaryalarında oluşturulan 5mm'lik kemik defekti üzerine lokal olarak uygulandığında kemik iyileşmesine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda Üzüm14 grubundaki primer kemik hacmi Propolis14 ve Kontrol14 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ankaferd14 grubunda primer kemik hacmi Kontrol14 grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara göre 14.günde elde edilen sonuçlara göre primer kemik hacmi en yüksek bulunan gruplar sırasıyla Üzüm, Ankaferd, Propolis olarak belirlenmiştir. 28. gün sonunda elde edilen verilere göre primer kemik hacmi bakımından Propolis grubu Ankaferd, Üzüm ve Kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Mihmanli ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada Ankaferd'in insan lenfositleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda Ankaferd28 grubundaki primer kemik hacmi Kontrol28 grubundakinden daha az olarak tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak Ankaferd'in uzun dönemde kemik iyileşmesine olumsuz etki yapabileceği düşünülebilir. Elde edilen verilerin daha iyi anlaşılabilmesi için bu konuda ileri düzeyde çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Ticari bakımdan temin edilebilen ve kararlı bir organik azot radikal bileşiği olan DPPH, bitki özütleri ve yiyecek maddelerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntem, DPPH'in metanolde hazırlanan çözeltilerinin bir hidrojen verici antioksidan madde varlığında radikal olmayan DPPH-H'a dönüşümünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (Payan, 2007). Shrikanta ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada antioksidan kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla Hindistan'da üretilen üzüm çekirdeklerinin DPPH serbest radikalini süpürücü etkisi araştırılmış ve üzüm çekirdeklerinin su-alkol (%80) ekstresinin EC₅₀ değeri 0,41mg/ml olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise siyah üzüm çekirdeklerinin su-aseton (%30) çözeltilisinin EC₅₀ değeri 4.15µg/ml

olarak tespit edilmiştir. Literatür bilgileriyle kıyaslandığında bizim kullandığımız siyah üzüm çekirdeklerinin antioksidan kapasitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak farklı çalışmalarda kullanılan siyah üzümün cinsi, üretim bölgesi, üretim zamanı, ekstraksiyon metodu ve çözeltilisinin de farklı olması sonuçlar arasındaki farklılıkların sebebi olabilir. Uğur ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada Ankaferd'in DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi testinde antioksidan özellik göstermediğini belirtmişlerdir. Ancak bizim çalışmamızda Ankaferd'in EC₅₀ değeri 5,57µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu açıdan elde ettiğimiz sonucun literatürle uyumlu olmadığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak DPPH çözeltisi hazırlanırken kullanılan çözücünün farklı olması olabilir. Nitekim Uğur ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada DPPH'ın etanol çözeltisini kullanmıştır, bizim çalışmamızda ise DPPH çözeltisi için metanolden faydalanılmıştır.

DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi tayini sonuçlarına göre etkili konsantrasyonu en düşük olan sırasıyla propolis, üzüm çekirdeği ekstresi, Ankaferd olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubuna uygulanan SF'nin ise DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bir başka açıdan bakılacak olunursa, ortamdaki DPPH serbest radikalinin %50'sini nötrlemek için gereken antioksidan konsantrasyonu en düşük olan sırasıyla propolis, üzüm çekirdeği ekstresi, Ankaferd olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızdaki stereolojik sonuçlarla karşılaştırıldığında hem erken dönemde hem de geç dönemde deneklere radikal süpürücü etkiye sahip olan bir materyalin uygulanması kontrol grubuna göre primer kemik hacmi, bağ dokusu hacmi ve damar hacminde anlamlı bir artışa sebep olmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız materyaller arasında DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi testine göre en güçlü antioksidan kapasiteye sahip olanın propolis olduğu belirlenmiştir. Propolisi üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd izlemektedir. Propolisin DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesinin yüksek olması geç dönemdeki primer kemik hacmi, bağ dokusu hacmi ve damar hacminin Ankaferd ve Üzüm gruplarından daha yüksek olmasına katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Erken dönemde primer kemik hacminin Ankaferd ve Üzüm gruplarında propolis grubundan yüksek olarak tespit edilmesine rağmen Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresinin DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi propolisten düşük olarak belirlenmiştir. Bağ dokusu ve damar hacmi bakımından erken dönemde antioksidan gruplar arasında anlamlı bir

fark olmamasına rağmen DPPH serbest radikalini süpürme aktivitelerinin farklı olması bu parametrenin nicelik bakımından farklı olmasının sonuca etki etmediğini göstermektedir.

Toplam fenolik madde miktarı tayini (Folin-Ciocalteu Metodu) fenolik ve polifenolik antioksidanların miktarını belirlemek için kullanılan ve sonuçların kolorimetrik metodla elde edildiği in vitro deneydir. Materyallerin içerdikleri toplam fenolik madde miktarları mgGAEs/g cinsinden belirlenir ve karşılaştırma bu parametre üzerinden yapılır (Singleton ve ark., 1999). Alencar ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada Brezilya kırmızı propolisinin etanol ekstresinin toplam fenolik madde içeriği 232mgGAEs/g olarak bildirilmiştir. Marquele ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada Brezilya propolisinin toplam polifenol içerik miktarı 13.3mgGAEs/g olarak bildirilmiştir. Silici (2008) tarafından yapılan çalışmada Türkiye'nin çeşitli illerinde üretilmiş olan propolislerin etanol ekstresinin toplam fenolik madde içerikleri belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre Kayseri ve Sivas (kavak) illerinden elde edilen propolisin toplam fenolik madde içeriği 127mgGAEs/g, Mersin Karabucak'tan (ökaliptus) elde edilen propolisin toplam fenolik madde içeriği 125mgGAEs/g, Bursa'dan (kestane) elde edilen propolisin toplam fenolik madde içeriği 87mgGAEs/g olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise Samsun Havza ilçesinden elde edilen propolisin toplam fenolik madde içeriği 275mgGAEs/g olarak tespit edilmiştir. Literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında bizim çalışmamızda kullandığımız propolisin toplam fenolik madde miktarının yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ky ve Teissedre (2015) tarafından yapılan çalışmada akdeniz bölgesinde yetişen 3 farklı siyah üzümün çekirdeğinde üretilen su ve su-alkol ekstralarının toplam fenolik içerikleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, sulu ekstresi hazırlanan Grenache üzümü çekirdeğinde 128mgGAEs/g, Syrah üzüm çekirdeğinde 215mgGAEs/g, Carignan üzüm çekirdeğinde 186mgGAEs/g, su-alkol (%70) ekstresi hazırlanan Grenache üzümü çekirdeğinde 195mgGAEs/g, Syrah üzüm çekirdeğinde 207mgGAEs/g, Carignan üzüm çekirdeğinde 215mgGAEs/g toplam fenolik madde tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda Zonguldak Kilimli'de üretilmiş olan siyah üzüm çekirdeklerinin su-aseton (%30) çözeltisinin toplam fenolik madde miktarı 269mgGAEs/g olarak tespit edilmiştir. Literatür bilgileriyle karşılaştırıldığında

çalışmamızda kullanılan üzüm çekirdeklerinin toplam fenolik bileşik miktarı yüksek olarak tespit edilmiştir.

Literatürde Ankaferd'in toplam fenol miktarı üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada Ankaferd'in toplam fenolik madde miktarı 272mgGAEs/g olarak tespit edilmiştir. Bu açıdan Ankaferd'in toplam fenolik madde miktarı ilk defa bizim çalışmamızda ortaya konmuştur.

Çalışmamızda propolis, Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresinin toplam fenolik madde miktarı kontrol grubunda uygulanan SF'den yüksek olarak tespit edilmiştir. Stereolojik inceleme sonuçlarıyla kıyaslandığında bu sonuç toplam fenolik madde miktarının hem erken dönemde hem de geç dönemde primer kemik hacmi, bağ dokusu hacmi ve damar hacmi üzerinde olumlu etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Ancak propolisle Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresini karşılaştırdığımızda toplam fenolik madde miktarının birbirine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar toplam fenolik madde miktarlarının Propolis, Ankaferd ve Üzüm grupları arasındaki stereolojik inceleme sonuçlarının farklılığın açıklanmasında yeterli bir veri oluşturmadığını göstermektedir.

Bu sonuçlara göre ilk 14 gün sonunda üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd, 28 günün sonunda ise propolis primer kemik hacmi bakımından en iyi sonuçları vermiştir. İleride yapılacak çalışmalarda Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresinin erken dönemdeki avantajını, propolisin ise geç dönemdeki avantajını kullanmak adına bu materyallerin belli oranda karışımlarının kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırılması faydalı olabilir.

Yeni bağ dokusu ve yeni damar hacmi bakımından değerlendirildiğinde Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresinin hem erken dönemde hem de geç dönemde propolisten belirgin bir üstünlüğü olmadığı belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Propolis, üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd'in kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin incelendiği bu çalışmada;

- Kontrol grubuna göre primer kemik hacminin artmasında Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresinin erken dönemde propolisten daha etkili olduğu, geç dönemde ise propolisin daha etkili olduğu belirlenmiştir.

- Ankaferd grubunda ise geç dönemde primer kemik hacmi kontrol grubundaki primer kemik hacminden de daha az olarak tespit edilmiştir.

- Deneklere uygulanan materyaller hem erken dönemde hem de geç dönemde kontrol grubuna nazaran yeni bağ dokusu hacminin artmasını sağlamışlardır. Ankaferd'in bu artışın olmasında erken dönemde diğer gruplara nazaran daha etkili olduğu gözlenmiştir. Geç dönemde ise propolisin daha yüksek yeni bağ dokusu hacmi oluşmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

- Deneklere uygulanan materyaller hem erken dönemde hem de geç dönemde kontrol grubundan daha yüksek miktarda yeni damar hacmi oluşmasına neden olmuştur. Erken dönemde yeni damar hacminin artmasında propolis ve üzüm çekirdeği ekstresinin daha etkili olduğu, geç dönemde ise propolisin daha etkili olduğu belirlenmiştir.

- Hem primer kemik hacmi hem yeni bağ dokusu hem de yeni damar hacmi bakımından Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresi gruplarında zamanla ters orantılı bir gelişim gözlenmiştir. Yani geç dönem hacimleri her 3 parametrede de erken dönemden daha düşük çıkmıştır. Bunların sebebi olarak erken dönemde oluşan bağ dokusunun ve primer kemiğin geç dönemde yerini hızlı bir şekilde sekonder kemiğe bırakmış olduğu düşünülmektedir. Ancak bu konunun tam olarak anlaşılabilmesi için yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir. Yapılacak çalışmalarda denek hayvanlarının yaşam sürelerinin çeşitliliği artırılarak (7, 14, 21 ve 28 gün) Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresinin bu süre zarfında primer kemik hacminde yaptığı değişikliklerin izlenmesi mümkün olabilir.

- Elde ettiğimiz sonuçlara göre Propolis, üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd kemik defeklerine lokal olarak uygulandığında kemik iyileşmesine katkı sağlayabilmektedir. Ancak Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresinin erken dönemde,

propolisin ise geç dönemde daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Kullandığımız antioksidan maddelerin birbirlerine olan avantajlarının optimize edilmesi adına bu materyallerin çeşitli oranlarda karıştırılmasıyla yeni çalışmalar yapılabilir.

- Çalışmamızın sonuçlarını elde ederken daha kesin ve objektif bir sonuç elde etmek amacıyla stereolojik inceleme yapılmıştır. Bu konuda ileride yapılacak çalışmalara da öncü olacağı düşünülmektedir.

- DPPH serbest radikal giderme aktivitesi en yüksek olanlar sırasıyla propolis, üzüm çekirdeği ekstresi ve Ankaferd olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna uygulanan SF'nin ise DPPH serbest radikali giderme aktivitesi bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızdaki stereolojik sonuçlarla karşılaştırıldığında hem erken dönemde hem de geç dönemde deneklere radikal süpürücü etkiye sahip olan bir materyalin uygulanması kontrol grubuna göre primer kemik hacmi, bağ dokusu hacmi ve damar hacminin artmasında etkili olduğu belirlenmiştir.

- DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesinin miktarıyla stereolojik sonuçlar arasında bir korelasyona rastlanmamıştır. En yüksek DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesine sahip olan propolis geç dönemde en yüksek primer kemik, yeni bağ dokusu ve yeni damar hacminin oluşmasını sağlarken, erken dönemde Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresi daha yüksek primer kemik, yeni bağ dokusu ve yeni damar hacminin oluşmasını sağlamıştır. Bu da kullanılan materyallerin DPPH serbest radikalini süpürme niteliğine sahip olmasının önemli olduğunu, nicelik bakımından farklı olmasının sonuca etki etmediğini göstermektedir.

- Toplam fenolik madde miktarları en yüksek olanlar sırasıyla propolis, Ankaferd, üzüm çekirdeği ekstresi ve SF olarak tespit edilmiştir. Stereolojik inceleme sonuçlarıyla kıyaslandığında bu sonuç toplam fenolik madde miktarının hem erken dönemde hem de geç dönemde primer kemik hacmi, bağ dokusu hacmi ve damar hacmi üzerinde olumlu etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Ancak propolisle Ankaferd ve üzüm çekirdeği ekstresini karşılaştırdığımızda toplam fenolik madde miktarının birbirine oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar toplam fenolik madde miktarlarının Propolis, Ankaferd ve Üzüm grupları arasındaki stereolojik inceleme sonuçlarının farklılığın açıklanmasında yeterli bir veri oluşturmadığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abu-Ghazaleh BM. Inhibition of *Aeromonas caviae* and *A. sobria* by sodium chloride, citric acid, ascorbic acid, potassium sorbate and extracts of *Thymus vulgaris*. *Jpn J Infect Dis.* 2000;53(3):111-115.
- Ågren P-H, Mukka S, Tullberg T, Wretenberg P, Sayed-Noor AS. Factors affecting long-term treatment results of displaced intraarticular calcaneal fractures: a post hoc analysis of a prospective, randomized, controlled multicenter trial. *J Orthop Trauma.* 2014;28(10):564-568.
- Akhtar S, Meeran SM, Katiyar N, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit the growth of human non-small cell lung cancer xenografts by targeting insulin-like growth factor binding protein-3, tumor cell proliferation, and angiogenic factors. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):821-831.
- Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T, Akino K. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound Repair Regen.* 2004;12(2):252-259.
- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Place, Mimoza Yayınları, Published 1995; 3-95.
- Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007;113(2):278-283.
- Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone.* 2004;35(5):1003-1012.
- Altan BA, Kara IM, Nalcaci R, Ozan F, Erdogan SM, Ozkut MM, Inan S. Systemic propolis stimulates new bone formation at the expanded suture: a histomorphometric study. *Angle Orthod.* 2013;83(2):286-291.
- Altıok E. Production of proanthocyanidins from grape seeds. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Y.Lisans Tezi, 2003;53.
- Ames BN, Krovoza J. Pollution, pesticides, and cancer. *Environ: Environ. L. & Pol'y J.* 1992;16(79).
- Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J Nat Prod.* 1994;57(5):644-647.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* 2000;148(2-3):187-197.

- Bahorun T, Soobrattee M, Luximon-Ramma V, Aruoma O. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update*. 2006;1(2):25-41.
- 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(1):16-23.
- Barud Hda S, de Araujo Junior AM, Saska S, Mestieri LB, Campos JA, de Freitas RM, Ferreira NU, Nascimento AP, Miguel FG, Vaz MM, Barizon EA, Marquete-Oliveira F, Gaspar AM, Ribeiro SJ, Berretta AA. Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:1-10.
- Basnet P, Matsuno T, Neidlein R. Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*. 1997;52(11-12):828-833.
- Batista LL, Campesatto EA, Assis ML, Barbosa AP, Grillo LA, Dornelas CB. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev Col Bras Cir*. 2012;39(6):515-520.
- Baumann LS. Less-known botanical cosmeceuticals. *Dermatol Ther*. 2007;20(5):330-342.
- Beniash E. Biomaterials--hierarchical nanocomposites: the example of bone. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2011;3(1):47-69.
- Bigham-Sadegh A, Oryan A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. *Int Wound J*. 2015;12(3):238-247.
- Bishop RC, Moore KA, Hadley MN. Anterior cervical interbody fusion using autogeneic and allogeneic bone graft substrate: a prospective comparative analysis. *J Neurosurg*. 1996;85(2):206-210.
- Blumenthal SL, Baker J, Dossett A, Selby DK. The role of anterior lumbar fusion for internal disc disruption. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1988;13(5):566-569.
- Bombardelli E, Morazzoni P, Carini M, Aldini G, Maffei Facino R. Biological activity of procyanidins from *Vitis vinifera* L. *BioFactors*. 1997;6(4):429-431.
- Bratter C, Tregel M, Liebenthal C, Volk HD. Prophylactic effectiveness of propolis for immunostimulation: a clinical pilot study. *Forsch Komplementarmed*. 1999;6(5):256-260.
- Brown CW, Orme TJ, Richardson HD. The rate of pseudarthrosis (surgical nonunion) in patients who are smokers and patients who are nonsmokers: a comparison study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1986;11(9):942-943.

- Bulut E, Bas B, Altunkaynak BZ, Bekçioglu B, Erdem Koç G, Gönülol E, Önger ME, Kaplan S. Efficacy of Ankaferd Blood Stopper on bone healing in diabetic rats: a stereological and histopathological study. *Biotech Histochem.* 2014;89(7):535-543.
- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998;36(4):347-363.
- Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2000;21(23):2347-2359.
- Caramori G, Papi A. Oxidants and asthma. *Thorax.* 2004;59(2):170-173.
- Carneiro E, Garcia RB, Oliveira RC, Moraes FG, Menezes R, Letra A, Canova GC, Cestari TM, Granjeiro JM. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. *J Appl Oral Sci.* 2005;13(2):157-162.
- Chandra K, Salman AS, Mohd A, Sweety R, Ali KN. Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and In vitro anti-arthritic potential of costus speciosus rhizome extract. *Inter J Pharma Phyto Res.* 2015;7(2):383-389.
- Charles DJ. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. Place, Springer Science & Business Media, Published 2012; 12-13.
- Chis IC, Ungureanu MI, Marton A, Simedrea R, Muresan A, Postescu ID, Decea N. Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2009;6(3):200-204.
- Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American journal of clinical nutrition.* 2000;71(2):621-629.
- Chung YC, Huang CC, Chen CH, Chiang HC, Chen KB, Chen YJ, Liu CL, Chuang LT, Liu M, Hsu CP. Grape-seed procyanidins inhibit the in vitro growth and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Pancreas.* 2012;41(3):447-454.
- Claus R, Kinscherf R, Gehrke C, Bonaterra G, Basnet P, Metz J, Deigner HP. Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzneimittelforschung.* 2000;50(4):373-379.
- Cortesi R, Nastruzzi C, Davis SS. Sugar cross-linked gelatin for controlled release: microspheres and disks. *Biomaterials.* 1998;19(18):1641-1649.
- Crane E. The plant resources of honeybees. *Apiacta.* 1991;26(57-64).
- Daftari TK, Whitesides TE, Jr., Heller JG, Goodrich AC, McCarey BE, Hutton WC. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine (Phila Pa 1976).* 1994;19(8):904-911.

- Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* 2013;34(5):658-690.
- De Castro S. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical Sciences.* 2001;3(49-83).
- Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C. Inhibition of NF-kappaB pathway in grape seed extract-induced apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. *Int J Oncol.* 2003;23(3):721-727.
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;275):280-286.
- Ding L, He Z, Xiao H, Chai L, Xue F. Factors affecting the incidence of aseptic nonunion after surgical fixation of humeral diaphyseal fracture. *J Orthop Sci.* 2014;19(6):973-977.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews.* 2002;82(1):47-95.
- Durak K, Bilgen OF, Kaleli T, Tuncel P, Ozbek R, Turan K. Antioxidant effect of alpha-tocopherol on fracture haematoma in rabbits. *J Int Med Res.* 1996;24(5):419-424.
- El-khawaga OA, Salem TA, Elshal MF. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clin Chim Acta.* 2003;338(1-2):11-16.
- Eng ET, Ye J, Williams D, Phung S, Moore RE, Young MK, Gruntmanis U, Braunstein G, Chen S. Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds. *Cancer Res.* 2003;63(23):8516-8522.
- Essawi T, Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2000;70(3):343-349.
- Fisgin NT, Cayci YT, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, Tulek N. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper®. *Fitoterapia.* 2009;80(1):48-50.
- Frey SP, Jansen H, Doht S, Filgueira L, Zellweger R. Immunohistochemical and molecular characterization of the human periosteum. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013(341078).
- Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 2002;73(6):536-539.
- Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff SE. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacol Res.* 2005;51(2):147-152.

- Galle J. Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2001;16(11):2135-2137.
- Gao Y, Li C, Wang H, Fan G. Acceleration of bone-defect repair by using A-W MGC loaded with BMP2 and triple point-mutant HIF1alpha-expressing BMSCs. *J Orthop Surg Res*. 2015;10:83.
- Gartner LP, Hiatt JL. *Colour textbook of histology*. 3rd ed ed, Place, WB Saunders, Published 2007:153.
- Gaston P, Will E, Elton RA, McQueen MM, Court-Brown CM. Fractures of the tibia. Can their outcome be predicted? *J Bone Joint Surg Br*. 1999;81(1):71-76.
- Gavanji S, Larki B. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida Albicans*. *Chin J Integr Med*. 2015:1-7.
- Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(12):1613-1629.
- Gençay Ö, Sorkun K. Propolis hakkında neler biliyoruz. *Teknik Arıcılık*. 2002;75:17-21.
- Ghisalberti E. Propolis: a review. *Bee world*. 1979;60(2):59-84.
- Goddio A. Oxygen derived free radicals in plastic surgery—therapeutic interest of fighting free radicals: the superoxide dismutases. *European Journal of Plastic Surgery*. 1989;12(3):111-116.
- Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, Kirazli S, Akman U, Ozturk Y, Firat HC. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res*. 2008;36(1):163-170.
- Gundersen H-JG. Stereology of arbitrary particles. *Journal of microscopy*. 1986;143(1):3-45.
- Guney A, Karaman I, Oner M, Yerer MB. Effects of propolis on fracture healing: an experimental study. *Phytother Res*. 2011;25(11):1648-1652.
- Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;236(3):591-593.
- Hall ACG, John E. *Textbook of medical physiology*. Place, W.B. Saunders, Published 2005:985
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344(8924):721-724.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992;119(6):598-620.

- Hasgul R, Uysal S, Haltas H, Akyol S, Yuksel Y, Gurel A, Armutcu F. Protective effects of Ankaferd blood stopper on aspirin-induced oxidative mucosal damage in a rat model of gastric injury. *Toxicol Ind Health*. 2014;30(10):888-895.
- Healthcare T. PDR for herbal medicines. 4th ed. ed, Place, Thomson Healthcare, Published 2007; 467-8.
- Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol*. 2011;21(10):569-576.
- Hemmati AA, Aghel N, Rashidi I, Gholampur-Aghdami A. Topical grape (*Vitis vinifera*) seed extract promotes repair of full thickness wound in rabbit. *Int Wound J*. 2011;8(5):514-520.
- Hepşen İF, Tilgen F, Er H. Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*. 1996;3(4):386-391.
- Hernigou J, Schuind F. Smoking as a predictor of negative outcome in diaphyseal fracture healing. *Int Orthop*. 2013;37(5):883-887.
- Hocman G. Prevention of cancer: vegetables and plants. *Comp Biochem Physiol B*. 1989;93(2):201-212.
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990;1(1):60-68.
- Houghton P. Beeswax & Propolis (For Pleasure and Profit). *International Bee Research Association*. 1998;18:15
- Hsu CP, Lin YH, Chou CC, Zhou SP, Hsu YC, Liu CL, Ku FM, Chung YC. Mechanisms of grape seed procyanidin-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2009;29(1):283-289.
- <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, 2015.
- <http://www.ankaferd.com/pdf/ABSGenelBrosur.pdf>, 2015.
- https://en.wikipedia.org/wiki/Vitis_vinifera, 2015.
- [https://tr.wikipedia.org/wiki/Polis_\(%C5%9Fehir](https://tr.wikipedia.org/wiki/Polis_(%C5%9Fehir), 2015.
- Hupkens P, Boxma H, Dokter J. Tannic acid as a topical agent in burns: historical considerations and implications for new developments. *Burns*. 1995;21(1):57-61.
- Ishikawa M, Maki K, Tofani I, Kimura K, Kimura M. Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle. *Eur J Oral Sci*. 2005;113(1):47-52.

- Isler SC, Demircan S, Cakarer S, Cebi Z, Keskin C, Soluk M, Yuzbasioglu E. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper on early bone healing. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(4):409-414.
- Janssen AM, Scheffer JJ. Acetoxychavicol Acetate, an Antifungal Component of *Alpinia galanga*. *Planta Med.* 1985;51(6):507-511.
- Jong-Sung, Park, and Woo Kun-Suk. The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea. *Bee Products.* Springer US, 1997. 121-124.
- Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society.* 1994;116(11):4846-4851.
- Junqueira LC CJ. *Basic Histology.* McGraw-Hill, 2003;10th ed.144-146.
- Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurgical focus.* 2001;10(4):7-10.
- Kamitani Y, Maki K, Tofani I, Nishikawa Y, Tsukamoto K, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on mandibles in developing rats. *Oral Dis.* 2004;10(1):27-31.
- Kara MI, Erciyas K, Altan AB, Ozkut M, Ay S, Inan S. Thymoquinone accelerates new bone formation in the rapid maxillary expansion procedure. *Arch Oral Biol.* 2012;57(4):357-363.
- Katsuda Y, Niwano Y, Nakashima T, Mokudai T, Nakamura K, Oizumi S, Kanno T, Kanetaka H, Egusa H. Cytoprotective effects of grape seed extract on human gingival fibroblasts in relation to its antioxidant potential. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134704.
- Kaur M, Mandair R, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Nutr Cancer.* 2008;60 Suppl 1:2-11.
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23(1):21-48.
- Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med.* 2003;60(8):612-616.
- Khalil ML. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2006;7(1):22-31.
- Khanna S, Roy S, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(1):38-42.
- Kiderman A, Torten R, Furst AL, Reinus K. Bi-lateral eosinophilic ulcers in an infant treated with propolis. *J Dermatolog Treat.* 2001;12(1):29-31.

- Kierszenbaum AL. Histology and cell biology: an introduction to pathology. St. Louis, Mosby Inc. . 2002:131.
- Kilicoglu SS, Kilicoglu B, Erdemli E. Ultrastructural view of colon anastomosis under propolis effect by transmission electron microscopy. *World J Gastroenterol.* 2008;14(30):4763-4770.
- Kılıçturgay K. İmmünoloji.(pp 86-92). Bursa, Nobel & Güneş Yayınevi. 2003;Yenileştirilmiş 3. Baskı.203.
- Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;43(1):65-92.
- Kojima K, Maki K, Tofani I, Kamitani Y, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on rat mandibular condyle. *J Musculoskeletal Neuronal Interact.* 2004;4(3):301-307.
- Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol.* 2000;45(2):141-148.
- Kosar A, Cipil HS, Kaya A, Uz B, Haznedaroglu IC, Goker H, Ozdemir O, Ercetin S, Kirazli S, Firat HC. The efficacy of Ankaferd Blood Stopper in antithrombotic drug-induced primary and secondary hemostatic abnormalities of a rat-bleeding model. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009;20(3):185-190.
- Kujungiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999;64(3):235-240.
- Kumar N, Ahmed KM, Dang R, Shivananda T, Das K. GC-MS analysis of propolis of Indian origin. *Journal of Young Pharmacists.* 2009;1(1):46-48.
- Kumova U. Önemli bir arı ürünü: propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi.* 2002;2002(2):10-24.
- Ky I, Teissedre PL. Characterisation of Mediterranean grape pomace seed and skin extracts: polyphenolic content and antioxidant activity. *Molecules.* 2015;20(2):2190-2207.
- Lichius JJ, Muth C. The inhibiting effects of *Urtica dioica* root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the mouse. *Planta medica.* 1997;63(4):307-310.
- Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res.* 2014;93(2):109-116.
- Lindblad WJ. Considerations for determining if a natural product is an effective wound-healing agent. *Int J Low Extrem Wounds.* 2008;7(2):75-81.

- Lindhe J, Meyle J. Peri - implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(s8):282-285.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118-126.
- Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;58(2):197-208.
- Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(3):447-454.
- Mahajan A, Tandon VR. Antioxidants and rheumatoid arthritis. *J Indian Rheumatol Assoc*. 2004;12:139-142.
- Mantena SK, Baliga MS, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2006;27(8):1682-1691.
- Marcucci M. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995;26(2):83-99.
- Mariano R, Messoria M, de Moraes A, Nagata M, Furlaneto F, Avelino C, Paula F, Ferreira S, Pinheiro M, de Sene JP. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(1):72-78.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38.
- Markham KR, Mitchell KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*. 1996;42(1):205-211.
- Marmesat S, Morales A, Velasco J, Dobarganes MC. Action and fate of natural and synthetic antioxidants during frying. *grasas y aceites*. 2010;61(4):333-340.
- Marquele FD, Di Mambro VM, Georgetti SR, Casagrande R, Valim YM, Fonseca MJ. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;39(3-4):455-462.
- Matsuda H, Ando S, Kato T, Morikawa T, Yoshikawa M. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg Med Chem*. 2006;14(1):138-142.

- Matsuno T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Zeitschrift für Naturforschung c*. 1995;50(1-2):93-97.
- Matthews S, Mila I, Scalbert A, Pollet B, Lapiere C, Hervé du Penhoat CL, Rolando C, Donnelly DM. Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997;45(4):1195-1201.
- McLennan SV, Bonner J, Milne S, Lo L, Charlton A, Kurup S, Jia J, Yue DK, Twigg SM. The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):706-713.
- Meeran SM, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells through alterations in Cdk1-Cdk-cyclin cascade, and caspase-3 activation via loss of mitochondrial membrane potential. *Exp Dermatol*. 2007;16(5):405-415.
- Mihmanli A, Ulker Z, Alpsoy L, Ezirganli S. Evaluation of cytotoxicity of a new hemostatic agent Ankaferd Blood Stopper® using different assays. *Hum Exp Toxicol*. 2012;31(8):780-787.
- Mishima S, Inoh Y, Narita Y, Ohta S, Sakamoto T, Araki Y, Suzuki KM, Akao Y, Nozawa Y. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Bioorg Med Chem*. 2005;13(20):5814-5818.
- Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis*. 2003;24(8):1379-1388.
- Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamedi M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*. 2007;103(3):729-733.
- Monagas M, Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Laureano O, Ricardo da Silva JM. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem*. 2003;51(22):6475-6481.
- Munker R, Andreeff M. Induction of death (CD95/FAS), activation and adhesion (CD54) molecules on blast cells of acute myelogenous leukemias by TNF-alpha and IFN-gamma. *Cytokines and molecular therapy*. 1996;2(3):147-159.
- Nagata MJ, Messori M, Pola N, Campos N, Vieira R, Esper LA, Sbrana M, Fucini S, Garcia V, Bosco A. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Orthop Res*. 2010;28(4):468-473.

- Narayani R, Rao KP. Controlled release of anticancer drug methotrexate from biodegradable gelatin microspheres. *J Microencapsul.* 1994;11(1):69-77.
- Netikova L, Bogusch P, Heneberg P. Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens. *J Food Sci.* 2013;78(9):M1421-1429.
- Netter FH, Crelin E, Kaplan F, Woodburne R. *Musculoskeletal System: Anatomy. Physiology, Metabolic Disorders (Netter Collection of Medical Illustrations, Volume 8, Part 1) Third edition, Saunders.* 1987:171.
- Odabas ME, Erturk M, Cinar C, Tuzuner T, Tulunoglu O. Cytotoxicity of a new hemostatic agent on human pulp fibroblasts in vitro. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(4):e584-587.
- Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses.* 2001;44(9-10):375-378.
- Özan F. Propolis' in Kırık İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Ağız diş ve çene cerrahisi anabilim dalı, Sivas, 2006;12-20.
- Ozdemir H, Kara MI, Erciyas K, Ozer H, Ay S. Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: a morphometric and histopathological study. *J Periodontal Res.* 2012;47(1):74-80.
- Öztürk N, Tunalier Z, Koşar M, Başer K. *Petroselinum crispum*, *Anethum graveolens* ve *Eruca sativa*'nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler.* 2004:29-31.
- Pai V, Shukla P, Kikkeri N. Antioxidants in dermatology. 2014b;5(2):210-214.
- Pai V, Shukla P, Kikkeri NN. Antioxidants in dermatology. *Indian Dermatol Online J.* 2014a;5(2):210-214.
- Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem.* 2002;50(9):2502-2506.
- Payan A. Üzüm meyvesi çekirdeğinden antioksidan eldesi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya, 2007;34-46.
- Pekić B, Kovač V, Alonso E, Revilla E. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chemistry.* 1998;61(1):201-206.
- Pereira NT, Issa JP, Nascimento C, Pitol DL, Ervolino E, Cunha MR, Pedrazzi V. Effect of alveolex on the bone defects repair stimulated by rhBMP-2: Histomorphometric study. *Microsc Res Tech.* 2012;75(1):36-41.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.

- Pileggi R, Antony K, Johnson K, Zuo J, Shannon Holliday L. Propolis inhibits osteoclast maturation. *Dent Traumatol*. 2009;25(6):584-588.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon MH. *Antioxidants in food: practical applications*. Place, CRC press, Published 2001; 288.
- Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*. 2005;12(3):221-228.
- Potter JD. Cancer prevention: epidemiology and experiment. *Cancer Lett*. 1997;114(1-2):7-9.
- Prasad G, Dhillon MS, Khullar M, Nagi ON. Evaluation of oxidative stress after fractures. A preliminary study. *Acta Orthop Belg*. 2003;69(6):546-551.
- Preuss HG, Wallerstedt D, Talpur N, Tutuncuoglu SO, Echard B, Myers A, Bui M, Bagchi D. Effects of niacin-bound chromium and grape seed proanthocyanidin extract on the lipid profile of hypercholesterolemic subjects: a pilot study. *J Med*. 2000;31(5-6):227-246.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(10):4290-4302.
- Pryor ME, Susin C, Wikesjo UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodontol*. 2006;33(6):455-460.
- Reddy KK, Grossman L, Rogers GS. Common complementary and alternative therapies with potential use in dermatologic surgery: risks and benefits. *J Am Acad Dermatol* 2011;68(4):e127-e135.
- Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;346:95-103.
- Rice-Evans C, Packer L. *Flavonoids in health and disease*. Place, Marcel Dekker, Published 1998:541
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933-956.
- Riebel GD, Boden SD, Whitesides TE, Hutton WC. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(20):2198-2202.
- Robert L, Godeau G, Gavignet-Jeannin C, Groult N, Six C, Robert AM. The effect of procyanidolic oligomers on vascular permeability. A study using quantitative morphology. *Pathol Biol (Paris)*. 1990;38(6):608-616.

- Rubenstein I, Yong T, Rennard SI, Mayhan WG. Cigarette smoke extract attenuates endothelium-dependent arteriolar dilatation in vivo. *Am J Physiol.* 1991;261(6 Pt 2):H1913-1918.
- Sahin B, Aslan H, Unal B, Canan S, Bilgic S, Kaplan S, Tumkaya L. Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: a stereological study. *Image Anal Stereol.* 2001;20(9):13.
- Saito W, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Sekiguchi H, Aikawa J, Fujimaki H, Takaso M. Acceleration of callus formation during fracture healing using basic fibroblast growth factor-kidney disease domain-collagen-binding domain fusion protein combined with allogenic demineralized bone powder. *J Orthop Surg Res.* 2015;10:59.
- Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 1995;322(2):339-346.
- Şanser G, Bahadır B, Kalayci M, Ankarali H, Erdem O, Karakaya K, Açıköz B. Effects of Ankaferd Blood Stopper® on bone regeneration in rat calvarial defects. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.* 2011;31(2):390-396.
- Santosa S, Jones PJ. Oxidative stress in ocular disease: Does lutein play a protective role? *Canadian Medical Association Journal.* 2005;173(8):861-862.
- Sato M, Bagchi D, Tosaki A, Das DK. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(6):729-737.
- Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):459-466.
- Schmidt J, 1996. Bee Products: Chemical Composition and Application. , Proceedings Of An International Conference On Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy, Tel Aviv, Israel, pp. 15-26.
- Schmidt J, Buchmann S. Other products of the hive. *The Hive and the Honey Bee,* Hamilton, Illinois. 1992:928-977.
- Sehn E, Hernandez L, Franco SL, Goncalves CC, Baesso ML. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Anal Chim Acta.* 2009;635(1):115-120.
- Sheela M, Ramakrishna M, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *International immunopharmacology.* 2006;6(3):494-498.
- Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *J Med Food.* 2003;6(4):291-299.


- Shkenderov S, Ivanov T. Bee products. Sofia, Bulgaria; 1983:283
- Shrikanta A, Kumar A, Govindaswamy V. Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *J Food Sci Technol*. 2015;52(1):383-390.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-295.
- Silcox DH, 3rd, Daftari T, Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC, Whitesides TE, Jr. The effect of nicotine on spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(14):1549-1553.
- Silici S. Farklı botanik orijine sahip propolis örneklerinde biyolojik olarak aktif bileşiklerin belirlenmesi Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2008;24 (1-2):120-128.
- Singh AK, Kiran P. The periosteum eversion technique for coverage of denuded root surface. *J Indian Soc Periodontol*. 2015;19(4):458-461.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 152-178.
- Sosa S, Baricevic D, Cinco M, Padovan D, Tubaro A, Della Loggia R. Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbial activities of propolis. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 1997;7(4):168-171.
- Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(2):321-336.
- 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 vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J Agric Food Chem*. 2000;48(5):1462-1465.
- Suzuki N. Antioxidative activity of some biologically active compounds with active oxygen species. *Spectrum*. 1993;6:21-27.
- Tabata Y, Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Aoyama I, Tamura M, Ikada Y. Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogels. *Biomaterials*. 1998;19(7-9):807-815.
- Tate MLK, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(1):1-8.
- Tekkes Y. Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, Yüksek Lisans Tezi, 2006;10.

- Toker H, Ozan F, Ozer H, Ozdemir H, Eren K, Yeler H. A morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2008;79(6):1089-1094.
- Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013(697390).
- Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chem Cent J.* 2007;1:13.
- Turhan N, Kurt M, Shorbagi A, Akdogan M, Haznedaroglu IC. Topical Ankaferd Blood Stopper administration to bleeding gastrointestinal carcinomas decreases tumor vascularization. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(11):2874-2877.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt 2):335-344.
- Türsen Ü, 2006. Deri Yaşlanmasının Topikal Ajanlarla Önlenmesi. *Dermatose*, pp. 267-283.
- Tyagi A, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits EGF-induced and constitutively active mitogenic signaling but activates JNK in human prostate carcinoma DU145 cells: possible role in antiproliferation and apoptosis. *Oncogene.* 2003;22(9):1302-1316.
- Uğur A, Saraç N, Çankal DA, Özle M. The antioxidant and antimutagenic activities of Ankaferd blood stopper, a natural hemostatic agent used in dentistry. *Turk J Med Sci.* 2016;46:1-7.
- Ünlü MC. Çeşitli İçeceklerdeki Antioksidan Kapasitenin Araştırılması. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2001;38.
- Uysal T, Ustdal A, Sonmez MF, Ozturk F. Stimulation of bone formation by dietary boron in an orthopedically expanded suture in rabbits. *Angle Orthod.* 2009;79(5):984-990.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry.* 2004;266(1-2):37-56.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
- Vennat B, Arvouet-Grand A, Gross D, Pourrat A. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from a propolis extract. *Journal de pharmacie de Belgique.* 1995;50(5):438-444.

- Walgrave SE, Warshaw EM, Glesne LA. Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis*. 2005;16(4):209-215.
- Wang L, Mineshita S, Ga I, Shigematsu T, Matsuno T. Antiinflammatory effect of propolis. *Jpn J Pharmacol Ther*. 1993;24:223-226.
- Watanabe T, Nakada H, Takahashi T, Fujita K, Tanimoto Y, Sakae T, Kimoto S, Kawai Y. Potential for acceleration of bone formation after implant surgery by using a dietary supplement: an animal study. *J Oral Rehabil*. 2015;42(6):447-453.
- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2004;44(4):275-295.
- Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*. 1998;37(2):99-105.
- Wren AF, Cleary M, Frantz C, Melton S, Norris L. 90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats. *J Agric Food Chem*. 2002;50(7):2180-2192.
- Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*. 2004;52(26):7846-7856.
- Yahara N, Tofani I, Maki K, Kojima K, Kojima Y, Kimura M. Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005;5(2):162-169.
- Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(5):599-607.
- Yamamoto M, Tabata Y, Hong L, Miyamoto S, Hashimoto N, Ikada Y. Bone regeneration by transforming growth factor beta1 released from a biodegradable hydrogel. *J Control Release*. 2000;64(1-3):133-142.
- Ye X, Krohn RL, Liu W, Joshi SS, Kuszynski CA, McGinn TR, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ, Bagchi D. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 1999;196(1-2):99-108.
- Yen G-C, Chen H-Y, Peng H-H. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997;45(1):30-34.
- Zhang Z, Inserra PF, Watson RR, Garewal H. Antioxidants and AIDS. *Antioxidants and Disease Prevention*. 1997:31-43.
- Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*. 1999;20(9):1737-1745.

EKLER

EK 1- Etik Kurul Onayı




T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : B.30.2.ODM.0.20.09.00-050.04 -29
Konu : Araştırma Projeniz hk. 27/03/2012

Doç. Dr. Emel BULUT
Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

2012/22 numaralı "LOKAL ANTİOKSİDAN AJANLARIN RATLARDAKİ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ" konu başlıklı Projeniz; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.03.2012 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılara ait olmak kaydıyla ve 6 aylık dönemler halinde Çalışma Raporu verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.


Prof. Dr. Feriät KOLBAKIR
HADYEK Başkan

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Halit FURUNCUOĞLU

Doğum Yeri: Kadıköy/İstanbul

Doğum Tarihi: 04.10.1984

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (YDS: 85)

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Ümraniye İstiklal İlkokulu (1995)

Yenibosna Altınyıldız İlköğretim Okulu (1999)

Cağaloğlu Anadolu Lisesi (1999-2003)

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2003-2009)

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi AD (2010-2016)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Özel Güney Hastanesi, İstanbul (2009-2010)

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Tokat (2012-2013)

Özel muayenehane, Sinop (2013-)

E-posta: dthalit@yahoo.com