



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Türk Propolisinin Sulu Ekstraktının İnsan
Laringeal Epidermoid Karsinoma (HEp-2) Hücre
Serilerinde Süperoksit Dismutaz (SOD) ve
Katalaz (CAT) Düzeylerine Etkisi**

Javad GHANBARI TAGHIABAD

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON-2014



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Türk Propolisinin Sulu Ekstraktının İnsan
Laringeal Epidermoid Karsinoma (HEp-2) Hücre
Serilerinde Süperoksit Dismutaz (SOD) ve
Katalaz (CAT) Düzeylerine Etkisi**

Javad GHANBARI TAGHIABAD

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON-2014

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Javad GHANBARITAGHIABAD'un hazırladığı "Türk Propolisinin Sulu Ekstraktının İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma (HEp-2) Hücre Serilerinde Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Düzeylerine Etkisi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oybirliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Orhan DEĞER

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Orhan DEĞER

Prof. Dr.

Prof . Dr.

Tarih:/.../201...

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

11/12/2014

Javad GHANBARITAGHIABAD

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi ve deneyimlerini aktaran, her konuda bana yardımcı olmaya çalışan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER başta olmak üzere, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA'ya, Sayın Prof. Dr. Asım ÖREM'e, Sayın Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL'a, Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet AYAR'a,

O.M.Ü. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Abdulkerim BEDİR'e, Doç. Dr. Hasan ALAÇAM'a ve Yrd. Doç Dr. Osman ŞALIŞ'a,

Biyokimya Anabilim Dalındaki başta Arş. Gör. Selim DEMİR'e, Arş. Gör. Kübra AKBULUT'a, Arş. Gör. Ayşe ŞENTÜRK'e, Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN'a, doktora öğrencisi Akın BODUR ve tüm araştırma görevlileri ve öğrenci arkadaşlarıma,

Hayatımın her alanında bana destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Javad GHANBARITAGHIABAD

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER, KISALTMALAR VE ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1.ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Propolis	5
4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	6
4.1. 2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	7
4.1.2.1. Flavonoidler	10
4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri	13
4.2. Serbest Radikaller	13
4.2.1. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları	15
4.2.2. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri	16
4.2.3. Serbest Radikal Türleri	17
4.2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri	17
4.2.3.1.1. Tekli (Singlet) Oksijen ($^1\text{O}_2$)	17
4.2.3.1.2. Süperoksit Radikalleri (O_2^-)	17
4.2.3.1.3. Hidroksil Radikali ($\text{OH}^\cdot$)	18
4.2.3.1.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	18
4.2.3.2. Reaktif Nitrojen Türleri	19
4.2.3.2.1. Nitrik Oksit ($\text{NO}^\cdot$)	19
4.2.3.2.2. Peroksinitrit Anyonu (ONOO^-)	20
4.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri	20

4.3. Oksidatif Stres	22
4.3.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları	22
4.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	23
4.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	25
4.3.2.2. Katalaz (CAT)	25
4.3.2.3. Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz	26
4.4. İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma Hücre Serileri (HEp-2)	26
5. GEREÇ ve YÖNTEM	28
5.1. Gereç	28
5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	28
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
5.2. Yöntem	30
5.2.1. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Maddeler ve Malzemelerin Hazırlanması	30
5.2.1.1. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Maddeler ve Malzemelerin Hazırlanması SOD Aktivite Tayini İçin	31
5.2.1.2. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Maddeler ve Malzemelerin Hazırlanması CAT Aktivite Tayini İçin	32
5.2.1.3. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Maddeler ve Malzemelerin Hazırlanması Protein Tayini İçin	33
5.2.2. Hücre Kültürü	33
5.2.2.1. HEp-2Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	33
5.2.2.2. HEp-2Hücrelerinin Pasajlanması	34
5.2.2.3. HEp-2Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığının Tespiti	34
5.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	34
5.2.3.1. HEp-2 Hücre Serisi İçin Numunelerin Hazırlanması	35
5.2.3.2. HEp-2 Hücre Serisi İçin Standartların Hazırlanması ve Deneyin Yapılışı	35
5.2.3.3. HEp-2 Hücre Serisi İçin Enzim Aktivite Hesaplaması	36
5.2.4. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	37
5.2.4.1. HEp-2 Hücre Serisi İçin Uygun Hücre Sayısı Belirlenmesi	37
5.2.4.2. HEp-2 Hücre Serisi İçin Enzim Aktivite Hesaplaması	38
5.2.5. Protein Tayini	38

5.2.5.1. HEp-2 Hücre Serisi İçin Numunelerin Seyreltilmesi, Deneyin yapılışı ve Sonuçların Hesaplaması	38
5.3. İstatistiksel Analizler	40
6. BULGULAR	41
6.1. HEp-2 Hücre Serisi SOD Aktivite tayini İçin Uygun Hücre Sayısının Belirlenmesi	41
6.1.1. SOD Aktivite Ölçüm Sonuçları	41
6.2. HEp-2 Hücre Serisi CAT Aktivite tayini İçin Uygun Hücre Sayısının Belirlenmesi	43
6.2.1. CAT Aktivite Ölçüm Sonuçları	43
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	49
8.1. Sonuçlar	49
8.2. Öneriler	49
9. Kaynaklar	50
10. ÖZGEÇMİŞ	60

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler	7
Tablo 2. Propolisin içerdiği etken maddeler ve bilinen etkileri	9
Tablo 3. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri	16
Tablo 4. Hücredeki serbest radikal kaynakları	17
Tablo 5. Antioksidan sistem	24
Tablo 6. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları	28
Tablo 7. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları ve ürün kodları	29
Tablo 8. RPMI 1640 Medyum Hazırlığı	31
Tablo 9. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı	35
Tablo 10. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı	37
Tablo 11. Protein Tayini ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı	39
Tablo 12. 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre sayısı	41
Tablo 13. HEP-2 hücrelerinde SOD aktiviteleri için ortalama $\pm$ standart sapma (SD)	42
Tablo 14. 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre sayısı	43
Tablo 15. HEP-2 hücrelerinde CAT aktiviteleri için ortalama $\pm$ standart sapma (SD)	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis	6
Şekil 2. Flavonoidlerin genel yapısı	10
Şekil 3. Flavonoidlerin sınıflandırılması	11
Şekil 4. Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin kimyasal yapısı	12
Şekil 5. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	14
Şekil 6. Hücre ve dokularda ROS'un etkisi	21
Şekil 7. ROS üretiminin ve metabolizmasının başlıca yolları	23
Şekil 8. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği	36
Şekil 9. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği	36
Şekil 10. Protein standart grafiği	39
Şekil 11. HEp-2 hücrelerinde SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı	42
Şekil 12. HEp-2 hücrelerinde CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı	44

KISALTMAR, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ROS	Reaktif oksijen türleri
O₂^{·-}	Süperoksit radikali
H₂O₂	Hidrojen peroksit
OH[·]	Hidroksil radikali
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon S-transferaz
NO[·]	Nitrik oksit radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit anyonu
FBS	Fetal bovin serum
PBS	Fosfat tuz tamponu
RNS	Reaktif azot türleri
RTCA	Real time cell analyzer
DCFH- DA	2', 7'-diklorofluoresan diasetat
Fura-2AM	Fura- 2 asetoksimetil ester
DMSO	Dimetil sülfoksit

Formüller

O₂	Oksijen molekülü
NaCl	Sodyum klorür
KCl	Potasyum klorür
CaCl₂	Kalsiyum klorür
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat

1. ÖZET

Türk Propolisinin Sulu Ekstraktının İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma (HEp-2) Hücre Serilerinde Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Düzeylerine Etkisi

Propolis çeşitli ağaç ve bitki türlerinden arılar tarafından toplanan, içerisindeki antioksidan özelliğe bağlı olarak antibakteriyel, antiviral, antitümör özelliklere sahip doğal reçinemi bir maddedir. Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) antioksidan sistemde yer alan iki önemli enzimdir. Süperoksit dismutaz, süperoksit molekülünün (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümü tepkimesini katalizler. Hidrojen peroksitin hücrel konsantrasyonunun artışı ya da O_2 'nin hücrel seviyelerindeki azalma arayıcılığıyla SOD'un aşırı ekspresyonunun antikanser etkileri indüklediği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Katalaz birçok aerobik organizmada oluşan oldukça aktif bir enzimdir ve peroksizomlarda H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye ayrışmasını kataliz eder. Bu şekilde H_2O_2 'nin toksik etkilerinden hücreleri korumaktadır. Bu çalışmada, propolisin antikanser özelliği dikkate alınarak, insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücrelerinde SOD ve CAT düzeylerinde ne tür değişimlere sebep olduğunun araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada HEp-2 hücreleri kullanılarak Türk propolisinin sulu (WEP) ve etanollü (EEP) ekstraktlarının 500, 1000 $\mu g/mL$ WEP ve 25, 50 $\mu g/mL$ EEP konsantrasyonlarda ilave edildi, SOD ve CAT enzimlerinin aktivitesi 560 nm ve 240 nm'de spektrofotometrik yöntemi ile ölçüldü. Kontrol grubun göre sulu propolis ekstraktının HEp-2 hücrelerinde SOD ve CAT enzimlerinin aktivitesini azalttığı sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan, antiviral, insan laringeal epidermoid, katalaz, propolis, süperoksit dismutaz

2. SUMMARY

Effect of Water Extract of Turkish Propolis on Intracellular Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase Levels in Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma Cell Lines (HEp-2)

Propolis is a natural resinous substance collected by bees from various types of trees and plants and has antibacterial, antiviral, antitumoral features depending on its antioxidant properties. Superoxide dismutase (SOD) and catalase are two important enzymes present in antioxidant system. SOD catalyzes conversion reaction of superoxide molecule ($O_2^{\cdot-}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen (O_2). Different studies reported that excess expression of SOD by cellular increased hydrogen peroxide or cellular decreased O_2 induce various anticancer effects. Catalase is highly active enzyme occurring many aerobic organisms and catalyzes decomposition of H_2O_2 to H_2O and O_2 . It prevents cells from toxic effects of H_2O_2 . In the present study, major aim is to investigate how propolis by considering its anticancer properties causes to alterations on intracellular free superoxide dismutase (SOD) and Catalase levels in human laryngeal epidermoid carcinoma cell lines (HEp-2). Water extract of Turkish propolis (WEP) of 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ and ethanolic extract of Turkish propolis (EEP) of 25-50 $\mu\text{g/mL}$ were treated with HEp-2 cells and activities of the enzymes SOD and CAT were measured spectrophotometrically at 560 nm and 240 nm, respectively. It was concluded that WEP more decreases SOD and CAT activities in HEp-2 cells than control cells.

Key Words: Antioxidant, antiviral, Cancer, Catalase, human laryngeal epidermoid, propolis, superoxide dismutase

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Propolis, tüm dünyada geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanılan, arıların ağaç ve bitkilerden toplayıp ürettiği, doğal, son derece kompleks reçinemsî bir bal arısı ürünüdür (1).

Propolisin bileşimi oldukça karmaşıktır ve bitki orijinine göre değişiklik gösterir. Propolis genellikle, %50 reçine, %30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve % 5 çeşitli diğer bileşiklerden ibarettir. Propoliste bulunan ana kimyasal sınıflar flavonoidler, fenolik ve çeşitli aromatik bileşiklerdir. Propolisin son zamanlarda sağlığı düzeltmek ve hastalıkları önlemek amacıyla gıda ve içeceklerde kullanımı artmıştır. Dolayısıyla propolis fonksiyonel gıda, dizayn edilmiş gıda, terapötik gıda olarak da adlandırılmaktadır. Propolisin bileşimindeki antioksidanlar immün sistemi etkilemekte ve böylece antiinflamatuar, antibakteriyel, antiviral ve antitümöral etkiler göstermektedir (2,3).

Molekül orbitallerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküllere serbest radikal denmektedir (4). Bu serbest radikaller vücutta hem endojen hem de çevresel faktörleri içeren çeşitli mekanizmalar tarafından oluşmaktadırlar (5). Serbest radikaller aynı zamanda reaktif oksijen türleri (ROS) arasında yer almaktadırlar (6). Vücut hücre ve dokuları ROS ve çeşitli radikallere karşı savunabilmek için “antioksidan sistem” olarak adlandırılan bir sistem geliştirmiştir. Antioksidan sistem oksidatif hasar öncesi radikal oluşumunun önlenmesinde veya ROS’lara karşı vücudun savunulmasında görev alır. Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) antioksidan sistemde yer alan iki önemli enzimdir (6).

Yapılan çalışmalarda SOD enziminin ekspresyonunun artışı tümör hücrelerinde büyümeyi, metastazı ve kanser hücrelerinin diğer malignan özelliklerini azalttığı gösterilmiştir. Hidrojen peroksidin hücresel konsantrasyonunun artışı ya da O₂’nin hücresel seviyelerindeki azalma aracılığıyla SOD’un aşırı ekspresyonu tarafından antikanser etkiler indüklendiği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (7).

Katalaz birçok aerobik organizmada oluşan oldukça aktif bir enzimdir ve peroksizomlarda H₂O₂’nin H₂O ve O₂’ye ayrışmasını kataliz eder (8). Bu şekilde H₂O₂’nin toksik etkilerinden hücreleri korumaktadır. Katalazın aktivitesindeki düşüklük hücrelerde hidrojen peroksit birikimine sebep olmaktadır. Bunun sonucunda da protein

ve DNA oksidasyonu gibi sağlığa zararlı bir dizi reaksiyonun oluşumu tetiklenmektedir (9).

HEp-2 hücre serisi insan nazofaringeal mukozasının laringeal karsinoma hücrelerinden üretilir. Yavaş büyüyen tümör grubundandırılar. Propolisin bu hücrelere muhtemel etkisi daha önce Brezilya propolisinin alkolik ekstraktları ile çalışılmıştır (10-11). Larenks kanseri tüm baş ve boyun kanserlerinden biri olup malign baş ve boyun tümörlerinin yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (12).

Literatürde propolisin sulu ekstraktı hazırlanarak HEp-2 hücre serilerinde hücreiçi SOD ve CAT düzeylerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılacak olan bu çalışmada fonksiyonel bir gıda olarak antitümöral etkinliği de bilinen antioksidanlarca zengin Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma hücre serilerindeki (HEp-2) hücreiçi SOD ve CAT düzeylerine etkisi incelenecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Propolis

Propolis kadim tıp dünyasında yaygın bir şekilde kullanılan bir bitki özlü şifa kaynağıdır, son derece kompleks ve reçinemsi ve bitkisel kaynaklı bir arı ürünüdür (1). Bu ürün yüzde yüz doğal ve bal arısının çeşitli ve değişik bitkilerinin florasının yaprak, tomurcuk ve eksudalarından toplanan bir karma üründür (13).

Propolis insan tarafından yüzyıllardır kullanılan bir arı ürünüdür ki bütün adlandırılması yunan bilim adamlarının tarafından yapılmıştır. Pro- için ‘savunma’ ve – polis için ‘şehir’ kelimelerinin bir araya gelmesiyle şehiri ya da kovanın savunması anlamına gelmektedir (14).

Propolis eski çağlarda kullanılan bir tıbbi madde olarak günümüze gelmiştir. Eski Mısır hekimleri propolisi ölümlerinin mumyalaması ile çürümesini engellemek için ve Yunan ve Romalı hekimler propolisin antiseptik ve yaranın kabuk bağlamasında kolaylık sağlama özelliğinden yana kullanmışlardır. Günümüzde de propolis gıda ve kozmetik sektöründe de antiseptik özelliğinden dolayı birçok üründe kullanılıyor (15, 16).

Arılar bitkilerden elde edilen reçineyi tükürük enzimleriyle karıştırıp kısmen sindirirler ve sonra bunu balmumu ile karıştırarak (17) kovanın duvarlarında bulunan delikleri kapatmak için, kovayı soğuğa karşı izole etme, koloniyi hastalığa karşı koruma ve dışardan gelen istilacılara karşı kovayı korumak ve aynı zamanda leşleri bununla mumyalamakta kullanırlar (18, 19).

Propolisin kaynağını oluşturan bitkiler; kavak, hoş, kayın, kestane, söğüt, çam ağaçları ve meşe gibi ağaçlardır (20).

Propolis, biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik özelliklerinden dolayı günümüzdeki çalışmalarda odak nokta haline gelmiştir (21). Sitotoksik, antioksidan, antibakteriyel, antikaryojenik, antiinflamatuvar, antihepatotoksik, nöroprotektif, antimikrobiyal, antiviral aktiviteler gibi birçok farmakolojik ve biyolojik özellik sunmaktadır (22, 23).

4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin renk yelpazeleri elastik görünümlüğüne ve depolama süresine göre sarı, yeşilden koyu kahve rengine kadar değişir (24, 25). Hoş bir kokuya sahip ve insan cildindeki yağlarla ve proteinlerle güçlü bir etkileşim gösterdiğinden, deriden uzaklaştırılması zordur (26).

Propolisin erime noktası 60-69°C arasındadır, soğukta sert ve kırılgan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapıya sahiptir (27, 28). Propolisin zamanla rengi koyulaşabilir ve kırılganlaşabilir (25).

Propolis su ve hidrokarbon çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek oranda çözünürlük gösterir (29).

Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis örnekleri Şekil 1’de gösterilmiştir (30).



Şekil 1. Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propoli

4.1. 2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Propolisin bileşimi bal arıları tarafından çeşitli ağaçlardan toplanan tomurcuk salgılarıyla doğrudan ilişkilidir (31). Propolis, arıların ziyaret ettikleri her bir bölgenin farklı bitki kaynaklarından topladıklarıyla doğrudan bağlantılı ve son derece karmaşık ve değişken kimyasal bileşime sahiptir (32). Bunun sebebi ise arıların arazi koşulları, iklim, su durumu ve çevresel faktörlere göre bölgeden bölgeye değişim gösteren uygun bitkisel kaynaklardan reçine ve bitki eksudaları toplamasıdır (21).

Ham propolisin bileşimi kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle % 50 reçine, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (33). Propoliste bulunan başlıca bileşenler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler (34)

Bileşenler	Ana maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoidler	45-55
	Terpenler	
	Kumarinler	
	Fenolik asitler ve esterleri	
Mum ve yağ asitleri	Arılardan veya bitkilerden	25-35
	Çoklu doymamış yağ asitleri	
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	10
Polen	Proteinler	5
	Serbest aminoasitler	
	Vitaminler (A, B, C, E, PP, vs)	
	Eser elementler (Cu, Mn, Fe, Zn, Al, Ag, Ca, Mg, Co, vs)	
Diğer maddeler	Ketonlar	5
	Laktonlar	
	Kinonlar	
	Steroidler	
	Şekerler	

Propolis magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), iyot (I), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn) ve demir (Fe) gibi elementlerle B1, B2, B6, C ve E vitaminleri ile çok sayıda yağ asidi içermektedir. Bunlara ek olarak suksinat dehidrogenaz, glukoz-6fosfataz, adenzin trifosfataz ve asit fosfataz gibi enzimler de yapısında yer almaktadır (35).

Propolis, arıların ziyaret ettiği ekolojik flora nedeniyle oldukça kompleks ve değişik bir kimyasal kompozisyona sahiptir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda değişik propolis örneklerinde; yağ asitleri, fenolik asitler ve esterleri, flavonoidler (flavonlar, flavononlar, flavonoller, dihidroflavonoller, kalkonlar) terpenler, β -steroidler, aromatik aldehitler ve alkoller, seskiterpenler ve stilben türevleri gibi 200'den fazla bileşik tespit edilmiştir (22).

Tablo 2'de propolisin yapısında bugüne kadar tanımlanan etken maddeler ve bilinen etkileri gösterilmiştir.

Tablo 2. Propolisin içerdığı etken maddeler ve bilinen etkileri (25, 36 - 38)

Krizin: Tümör hücre toksisitesi, anti-helicobacter pylori
Apigenin: Gastrik ülserin iyileştirilmesi
Akasetin: Ateş düşürücü
Kuersetin: Antiviral, kılcal damarların güçlendirilmesi, antitümöral aktivite, spazmolitik, antihistaminik, ülser iyileştirici
Kaempferid: Spazmolitik, anti-mycobacterium phlei, mikroorganizmaların asit direncine karşı etkili
Kaemperol-7,4-dimetil eter: Antifungal
Baicalin: Antigenotoksik
Galangin: Bakteriyostatik aktivite, antibakteriyel ve antifungal, anti-helicobacter pylori
Pinosembrin: Bakteriyostatik aktivite, antifungal, antimikrobiyal, lokal anestezi, anti-helicobacter pylori
Pinobanksin: Antibakteriyel ve antifungal
Pinobanksin-3-asetat: Antibakteriyel ve antifungal
Pinostrobin: Lokal anestezi
3,4 -dihidroksiflavonidler: Kılcal damarların güçlendirilmesi
Flavan-3-ol: Kılcal damarların güçlendirilmesi
Pektolinarinenin: Spazmolitik
Luteolin: Antiviral, gastrik ülserin iyileştirilmesi
Luteolin 3,4-dimetil eter: Spazmolitik ve hipokoleretik
Artepillin C: Antitümöral, antilökemik etki
Eriodiktol: Kalp yetmezliğini iyileştirici etki, akut kalp yetmezliğini önleyici etki
Pinosilvin (3,5-dihidroksistilben): Bacillus subtilis ve Bacillus cereus' u inhibe edici, mycobacterium phlei ve M. semegmatis'e karşı etkinlik
Ferulik asit: Antibakteriyel etki, aglutinant etki, kollojenik etki
Isoferulik asit: Staphylococcus aureus'a karşı etkinlik
Benzoik asit: Bakteriostatik ve bakterisid etki, balzamik ve antiseptik aktivite
Sinnamik asit: Staphylococcus aureus'a karşı etkinlik
Isopentil ferulat: İnfluenza virusa karşı etkinlik (A/Hong Kong (H3N2))
p-Kumarik asit benzil esteri: Antimikrobiyal ve antifungal etkinlik
Kafeik asit: Antiviral, antibakteriyel aktivite, ateş düşürücü özellik
Prenil kafeat: Gizli kontakt alerjen
3-metil-2-enil kafeat: Antiviral aktivite
Kafeik asit fenetil ester: Antitümöral ve antigenotoksik
Metil kafeat: Tümör sitotoksitesi ve inhibisyonu
Diterpenoid klerodan: Antitümöral aktivite, antibakteriyel özellik
Bisabolol: Ateş düşürücü özellik

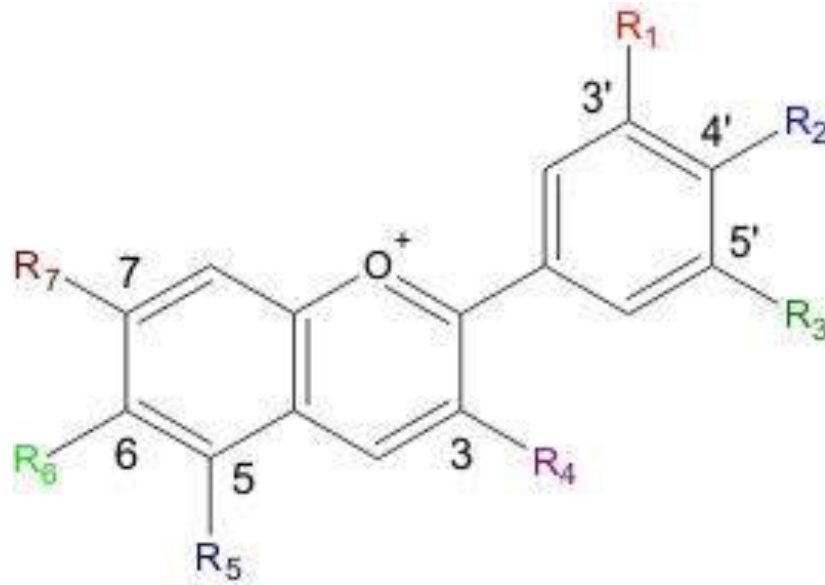
4.1.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler düşük molekül ağırlıklı bitkisel pigmentler olarak uzun zamandır bilinmektedir. Çeşitli bitkisel kaynaklı gıdalar ve içeceklerde (meyveler, sebzeler, çay, kakao, şarap gibi) dağılmış olan polifenolik bileşik grubundandır (38).

Doğada 4000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur ki bitkilerden izole edilmiştir. Birçoğu, bir bitkinin meyve, yaprak ve çiçek gibi kısımlarında bulunan ve bunların rengine, kokusuna ve aromasına tesir etmektedir (39). Bugüne kadar poropolisten 38'den fazla flavonoid izole edilmiştir (40).

Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri oldukça geniş bir alan oluşturmaktadır. Serbest radikal yakalayıcısı olmaları, enzim aktivitelerini düzenlemeleri, hücre çoğalmasını inhibe etmeleri, antibiyotik, antiallerjen, antiviral, antitümör, antimutajen, antiülser ve antiinflamatuvar ilaç gibi hareket etmeleri ile insan sağlığına birçok faydası olup araştırmacıların ilgisini çekmektedirler (41, 42).

Flavonoidler oksijen içeren heterosiklik altı üyeli halkayı çevreleyen, iki aromatik halkaya sahiptir. Aslında flavonoidler difenilpropanın türevleri olarak da nitelendirilmektedir (34). Flavonoidlerin genel yapısı Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidler hidrojen verici, radikal süpürücü antioksidanlardır. Demir iyonları ile kompleks oluşturan flavonoidler, hidroksil radikali oluşturan Fenton reaksiyonunu baskılar. Flavonoidler alerji, inflamasyon, virusler, hipertansiyon, eklem iltihapları, mutasyonlar ve karsinojenler, kanser ve AIDS'e karşı aktivite gösterirler(43). Ayrıca hidrolazlar, cAMP fosfodiesteraz, lipaz, α -glukosidaz gibi enzimleri de inhibe ettikleri bilinmektedir (42).

Flavonoidler antioksidan aktiviteler, metal şelatlama ve antiproliferatif, antikarsinojenik, antibakteriyel, antiinflammatuar, antialerjik ve antiviral etkileri insan sağlığı açısından günümüzde bilinmektedir (41).

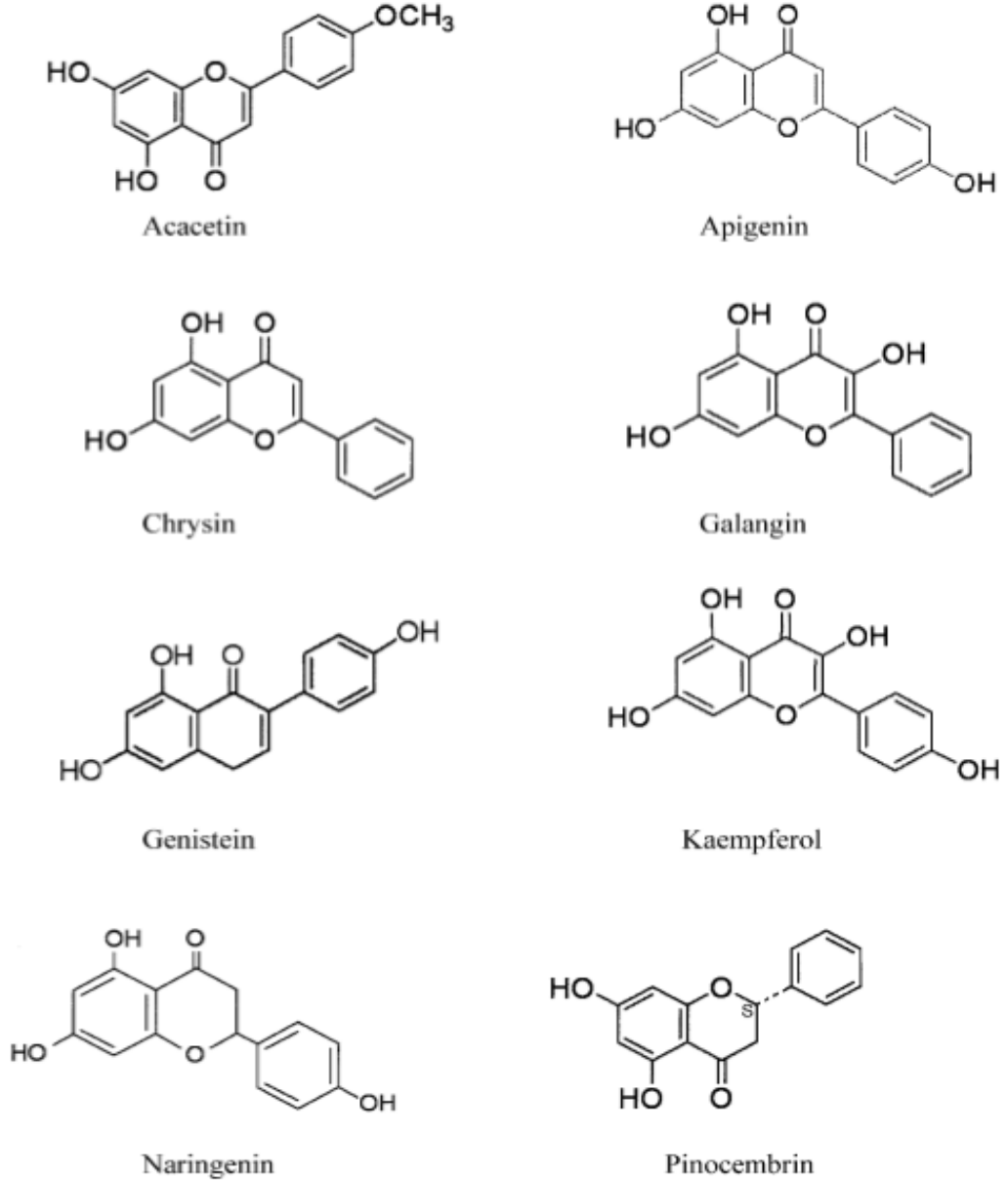
Flavonoidler içerdikleri C halkasındaki değişimlere göre altı ana alt gruba ayrılabilirler. Bu gruplar: flavanoller (kateşinler), flavonlar, flavanoller, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyanidinlerdir (43). Şekil 3'te flavonoidlerin sınıflandırılması verilmiştir.

Class	General structure	Flavonoid	Substitution Pattern	Dietary Sources	TEAC (mM)
Flavanol		(+)-catechin	3,5,7,3',4'-OH	Tea (camellia sinensis) ⁶	2.4
		(-)-epicatechin	3,5,7,3',4'-OH	Tea ⁶	2.5
		Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate	Tea ⁶	4.75
Flavone		chrysin	5,7-OH	Fruit skins	1.43
		apigenin	5,7,4'-OH	Parsley, celery	1.45
		rutin	5,7,3',4'-OH, 3-rutinoside	Red wine ⁵ , buckwheat ⁷	2.4
		luteolin	5,7,3',4'-OH	citrus, tomato skin ⁸	2.1
		luteolin glucosides	5,7,3'-OH, 4'-glucose	Red pepper ¹¹	1.74
Flavonol		kaempferol	3,5,7,4'-OH	Leek, broccoli, endives	1.34
		quercetin	3,5,7,3',4'-OH	grapefruit, black tea	4.7
		myricetin	3,5,7,3',4',5'-OH	Onion, lettuce, broccoli	3.1
		tamarixetin	3,5,7,3'-OH,4'-OMe	tomato, tea, red wine	3.1
				berries, olive oil, appleskin	
Flavanone (dihydroflavon)		naringin	5,4'-OH,7-rhamnogluco	Citrus, grapefruit	0.24
		naringenin	5,7,4'-OH	Citrus fruits	1.53
		taxifolin	3,5,7,3',4'-OH	Citrus fruits	1.9
		eriodictyol	5,7,3',4'-OH	Lemons ^{6,4}	1.8
		hesperidin	3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoside	Oranges ⁹	1.08
Isoflavone		genistin	5,4'-OH, 7-glucose	Soybean ¹⁰	1.24
		genistein	5,7,4'-OH	Soybean ¹⁰	2.9
		daidzin	4'-OH, 7-glucose	Soybean ¹⁰	1.15
		daidzein	7,4'-OH	Soybean ¹⁰	1.25
Anthocyanidin		apigenidin	5,7,4'-OH	Colored fruits	2.35
		cyanidin	3,5,7,4'-OH,3,5-OMe	Cherry, raspberry, strawberry	4.42

Şekil 3. Flavonoidlerin sınıflandırılması (44)

Propolisten galangin, kaempferol, kuersetin, pinosembrin, pinostobin ve pinobanksin gibi birçok flavonoid izole edilmiştir. Propolisin fenolik bileşikleri arasında başlıca; sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve esterleri, ferulik asit yer almaktadır (45).

Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin kimyasal yapıları Şekil 4'te gösterilmiştir (46).



Şekil 4. Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin kimyasal yapısı

4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri

Propolisinin farklı kimyasal içeriği ve çeşitli biyolojik aktiviteleri, farklı coğrafyaların çeşitli bitki örtülerine bağlıdır. Propolisin sahip olduğu bu özellikler, birçok ülkede bilim adamlar ve araştırma gurupları tarafından incelenip ve bu konuyla ilgili çok sayıda yayınlar yapılmıştır (47).

Arjantin, Avusturya, Şili, Çin, Macaristan, Yeni Zelanda, Güney Afrika, Tayland, Ukrayna, Uruguay, Amerika ve Özbekistan gibi ülkelerde propolis üzerine araştırmalar yapılmıştır. Japonya’da farklı coğrafik merkezlerden elde edilen propolis örnekleri, yapılan bir antioksidan aktivite karşılaştırılmasında, total polifenolik ve flavonoid içeriği, antioksidan aktivitesine bağlı olduğunu gösterilmiştir(48).

Brezilya’da propolisinin antibakteriyel (49, 50), antifungal (51), antianjiogenik, sitotoksik (52), antiülser (53), hepatoprotektif, analjezik ve anti-inflamatuar aktivitesi (54) belirlenirken, Bulgaristan propolisinde antifungal ve bakterisidal aktivitesi belirlenmiştir (55). Günümüze kadar, Türk propolisinin antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antikarsinojenik, yara iyileştirici gibi bazı biyolojik aktiviteleri incelenmiştir (56 - 58).

Propolisin içeriğinde bulunan flavonoidlerin mide, kolon, akciğer, ağız, prostat ve cilt gibi kimyasal kaynaklı kanserlerin gelişimini engellediğini tespit edilmiştir (59).

Propolisin immünomodülatör, hepatoprotektif, antiviral, apoptotik, radyoprotektif, antiproliferatif, karaciğer, kalp ve beyni koruma gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri de bilim adamlar ve araştırma guruplar tarafından çok sayıda yayınlar yapılmıştır (60, 61).

4.2. Serbest Radikaller

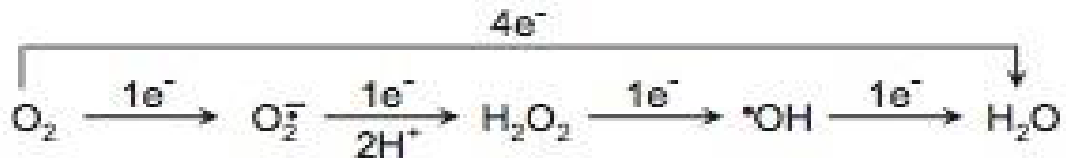
Molekül orbitallerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküller serbest radikal denmektedir. Bu radikaller katyon, anyon veya nötral olabilirler (4). Serbest radikaller eşlenmemiş elektronlar içerdiklerinden dolayı oldukça kararsız olup, reaktiftirler. Kararlı hale gelebilmek için diğer moleküllerden ya elektron alırlar ya da diğer moleküllere elektron verirler (62).

Molekölün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle ($R^{\cdot}$, $R^{\cdot-}$) gösterilmiştir ve bu şekilde radikalleri ayırt edebiliriz (63). Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^+ gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle, oksidasyon reaksiyonları meydana gelir (64).

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar (65). Bu etki ile birlikte pek çok hücrede kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğu söylenmektedir (66).

Organizmalardaki serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir. Ancak azot, karbon ve kükürt kaynaklı serbest radikaller de oluşabilmektedir (67).

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROS, RNS) elektron taşıma zinciri gibi hücre içi metabolik süreçler sırasında üretilir (68). Şekil 5'te reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 5. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu

Moleküler oksijen tüm aerobik organizmaların yaşamı için oldukça önemlidir. Normal hücrelerde gerçekleşen oksijenden ATP üretimi sürecinde oksijen suya indirgenmektedir (69). Elektron taşıma zincirinde meydana gelen elektron sızıntısıyla moleküler oksijenin tamamı suya dönüşmek yerine % 1-3'lük bir kısmı da süperoksit radikaline ($O_2^{\cdot-}$) dönüşmektedir (4).

4.2.1. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları

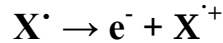
Serbest radikaller, diğer moleküllerle çeşitli şekillerde reaksiyona girerler.

1. İki serbest radikal karşılaştıklarında, her ikisinin de ortaklanmamış elektronları bir kovalent bağ oluşturacak şekilde birleşirler ve radikal özelliklerini kaybederler (70).

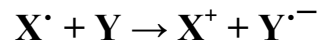


2. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir bileşikle reaksiyona girdiğinde yeni bir radikal oluşur:

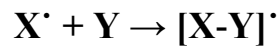
Radikal, ortaklanmamış elektronunu eşlemek üzere radikal olmayan başka bir bileşikten elektron alabilir (okside edici radikal).



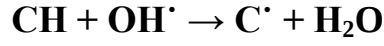
Radikal, ortaklanmamış elektronunu radikal olmayan bir bileşiğe verebilir (redükte edici radikal).



Radikal, radikal olmayan bir bileşiğe katılabilir.



Radikal, C-H bağından bir hidrojen atomu koparabilir.



Ancak bu reaksiyonların sonunda, radikal olmayan bileşik radikal hale gelir. Bu nedenle serbest radikallerin radikal olmayan bileşiklerle reaksiyonları birbirini izleyen zincir reaksiyonları şeklinde olur.

Bu özellikleri ile reaktif oksijen türleri; tablo 3'te verildiği gibi radikaller ve radikal olmayanlar olarak iki ana başlık altında incelenmektedir (71).

Tablo 3. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (71)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit, $\text{O}_2^\bullet$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $\text{OH}^\bullet$	Hipokloröz asit, HOCl
Peroksil, $\text{RO}_2^\bullet$	Ozon, O_3
Alkoksil, $\text{RO}^\bullet$	Singlet Oksijen, $\text{O}^\bullet$
Hidroperoksil, $\text{HO}_2^\bullet$	Peroksinitrit, $\text{ONOO}^\bullet$
Nitrik oksit, $\text{NO}^\bullet$	Hidroperoksit, L(R)OOH

4.2.2. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri

Serbest radikaller hücrelerde endojen veya ekzojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak meydana gelmektedirler (72). Tablo 4'te hücredeki serbest radikal kaynakları verilmiştir.

Tablo 4. Hücredeki serbest radikal kaynakları

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları (Ör. Parasetamol, CCl ₄)
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler: Ksantin oksidaz	Güneş ışığı
Triptofan dioksijenaz	X- ışınları
Galaktoz oksidaz	UV- ışınları
Siklooksijenaz	Isı şoku
Lipooksijenaz	Glutasyonu okside eden maddeler
Mono aminooksidaz	Sigara dumanı
Fagositik hücreler	Ozon
Nötrofiller, monosit ve makrofajlar	Kükürtdioksit

4.2.3. Serbest Radikal Türleri

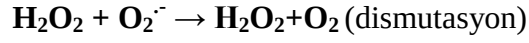
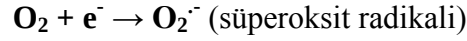
4.2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

4.2.3.1.1. Tekli (Singlet) Oksijen (¹O₂)

Eşleşmemiş elektronu olmadığı için reaktif değildir ancak çeşitli moleküller için oksidan olabilir (73).

4.2.3.1.2. Süperoksit Radikalleri (O₂⁻)

Çeşitli hastalıklarında patofizyolojisinden sorumlu tutulan süperoksit radikali genellikle hücrenin mitokondrisinde gerçekleşen elektron taşıma zincirindeki elektron kaçağı ile birlikte oksijenden üretilmektedir. Bu radikal diğer radikallere kıyasla çok daha az reaktif ve seçiciliği daha fazladır. Biyolojik sistemlerde ömrü birkaç saniyedir (4, 69).



Süperoksit radikali kendi başına reaktif olmamakla birlikte dismutasyon adı verilen reaksiyonu sonucu H_2O_2 oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu H_2O_2 metal iyonları varlığında oldukça reaktif olan hidroksil radikali oluşturmak için ayrışmaktadır (74, 75).

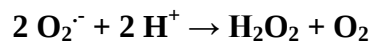
4.2.3.1.3. Hidroksil Radikali ($\text{OH}^\cdot$)

Son derece reaktif bir radikaldir. Fenton, Haber-Weiss ve peroksitnitrit reaksiyonları sonucu oluşurken, suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşur. Yarılanma ömrü kısadır. Başlıca lipitler, proteinler, karbonhidratlar, sitokromlar ve nükleik asitler de olmak üzere hemen tüm hücre makromoleküllerine zarar verir. DNA'nın baz ve şekerlerine zarar vererek DNA zincir kırılmalarına sebep olur. Eğer hasar fazla ise onarıcı sistemler tarafından onarılamayıp, hücre ölümüne sebep olabilirler. Oluştugu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına ve sonuç olarak büyük hasara sebep olabilir (73, 76, 77).

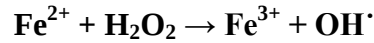


4.2.3.1.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

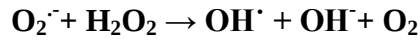
Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. O_2^- radikalinin, hidrojenle verdiği reaksiyona 'Dismutasyon Reaksiyonu' adı verilir ve dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanır (78, 79). Reaksiyon şu şekilde ifade edilir:



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen bileşikleri kapsamına girer. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu, $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan $\text{OH}^{\cdot}$ radikali oluşturur (71).



Fenton Reaksiyonu

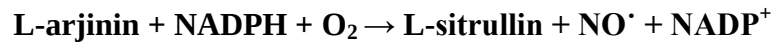


Haber – Weiss Reaksiyonu

4.2.3.2. Reaktif Nitrojen Türleri

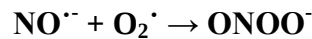
4.2.3.2.1. Nitrik Oksit ($\text{NO}^{\cdot}$)

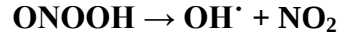
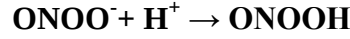
$\text{NO}^{\cdot}$ enzimatik olarak nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir.



$\text{NO}^{\cdot}$ eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen birçok biyomolekül ile kolayca tepkimeye giremez, öte yandan peroksil, alkil gibi diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek daha az reaktif moleküller oluşturur.

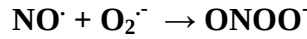
Yüksek miktarlarda $\text{O}_2^{\cdot-}$ yapımı $\text{NO}^{\cdot}$ ile paraleldir ve birbirlerini etkileyerek $\text{OH}^{\cdot}$ ve $\text{NO}_2^{\cdot}$ oluşumuna neden olurlar. Tepkime sırasında ise peroksinitrit ($\text{ONOO}^{\cdot}$) ve peroksinitröz asit (ONOOH) ara ürünleri oluşur (80).





4.2.3.2.2. Peroksinitrit Anyonu (ONOO⁻)

Nitrik oksit ve süperoksit anyonu oksidatif olarak daha aktif olan peroksinitrit (ONOO⁻) anyonunu önemli miktarda üretmek için reaksiyona girerler. İki radikalın birleşimiyle ortaya çıkan bu güçlü oksidan ajan DNA kırılması ve lipid peroksidasyonuna neden olan toksik özelliğe sahiptir (4).



4.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller oldukça reaktif moleküllerdir. Birçok biyomolekül ile reaksiyona girerek çeşitli bileşikler oluştururlar. Bu bileşikler çoğu kez toksik özellikler taşımaktadırlar.

1. Serbest radikallerin proteinler üzerindeki etkileri: Proteinlerin serbest radikal hasarına karşı duyarlılığı, aminoasit bileşimine, proteinin aktivasyonundan veya yapısının düzenlenmesinden sorumlu aminoasitlerin yerleşimine, hasarlı proteinin onarılabiliğine bağlıdır. Peptid bağları, prolin ve lizin gibi aminoasitler serbest radikallerden oldukça kolay etkilenirler (81).

2. Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA üzerindeki etkileri: İyonize radyasyondan kaynaklanan hücre mutasyonları ve ölüm, serbest radikallerin DNA ile reaksiyonu ile oluşur. Bu olaydan özellikle hidroksil radikali sorumlu tutulmaktadır. Nükleik asit baz değişimleri ve DNA'da zincir kırılmaları sitotoksiste'ye neden olurlar. Tamir sistemlerindeki yetersizlik sonucu mutasyonlar gelişir (82,83).

3. Serbest radikallerin lipidler üzerindeki etkisi: Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Lipid peroksidasyonunu başlatan

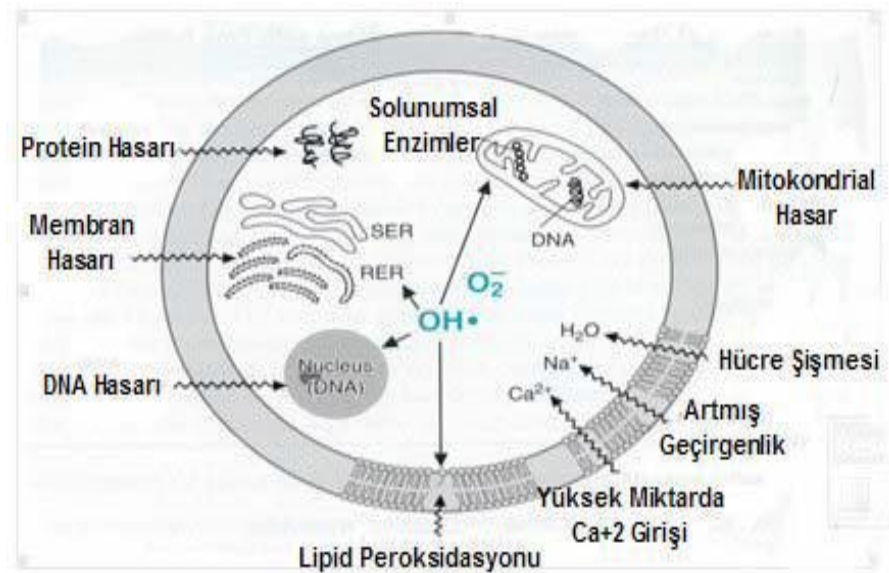
radikaller, superoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikal ve alkoksil radikali'dir. Demir iyonları özellikle lipid peroksidasyonunda önemli bir rol oynarlar (84).

Lipid peroksidasyonu iki tiptir:

a. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu: Herhangi bir radikalın poliansatüre yağ asidindeki metilen karbonundan hidrojen atomunu uzaklaştırması.

b. Enzimatik lipid peroksidasyonu: Siklooksijenaz ve lipooksijenaz reaksiyonları sonucunda oluşan hidroperoksitler ve endoperoksitler.

Oksidatif hasarın derecesini membranın lipid protein oranı, fosfolipidlerin miktarı, yağ asitlerinin bileşimi ve doymamışlık derecesi ve membranın akışkanlığı etkiler. Membran lipid peroksidasyonu sonucunda; hücrenin membran yapısındaki hasar membran transport sistemlerinde bozulmaya yol açar. Bunu iyon dengelerinin bozulması ile hücre içi kalsiyum artışı ve buna bağlı proteazların aktivasyonu izler. Hücre içi organellerde de oluşan lipid peroksidasyonuna bağlı membran hasarını ve çeşitli litik enzimlerin salgılanması ve buna bağlı hasar artışları izler (85). Hücre ve dokularda ROS'un etkisi Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Hücre ve dokularda ROS'un etkisi(79)

4.3. Oksidatif Stres

Sağlıklı bireylerde normal metabolizma sonucunda oluşan ROS'lar vücudun savunma mekanizması olan antioksidan sistemle uzaklaştırılır. Sağlıklı vücutta, oksijen radikalleri ile antioksidan savunma mekanizması tam bir denge halinde çalışır. Bu dengenin radikallerin lehine bozulmasıyla ortaya çıkan duruma ise oksidatif stres denir (86).

Serbest tiyol oksidasyonu ve protein disüflitlerinin ortaya çıkması, ATP havuzundaki azalma, serbest sitozolik kalsiyumun yükselmesi, sitoskelet elemanlarının bütünlüğünün kaybolması, plazma membranı geçirgenliğinin artması, plazma membranında artmış peroksidasyon, sitozolik bileşenlerin hücre dışına çıkması ve artmış DNA hasarı oksidatif stresin bulguları arasında gösterilebilir (87).

Oksidatif stresin oluşumu doku hasarına, DNA, protein, lipid ve karbohidrat yapılarında modifikasyonlara sebep olabilmektedir (65).

Oksidatif stres, ateroskleroz, diyabet, kanser, kronik inflamasyon hastalıkları, santral sinir sistemi bozuklukları gibi fizyopatolojik olaylarda, hücre yaşlanmasında ve dolayısıyla hücresel yıkım, hücre hasarı ve hücre ölümünde rol oynayan önemli bir mekanizma olarak son yıllarda büyük önem kazanmıştır (88).

4.3.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar, oksidan moleküllerin organizmaya olan zararlı etkilerini dört yolla engeller:

A. Süpürücü (scavenging) etki: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olur.

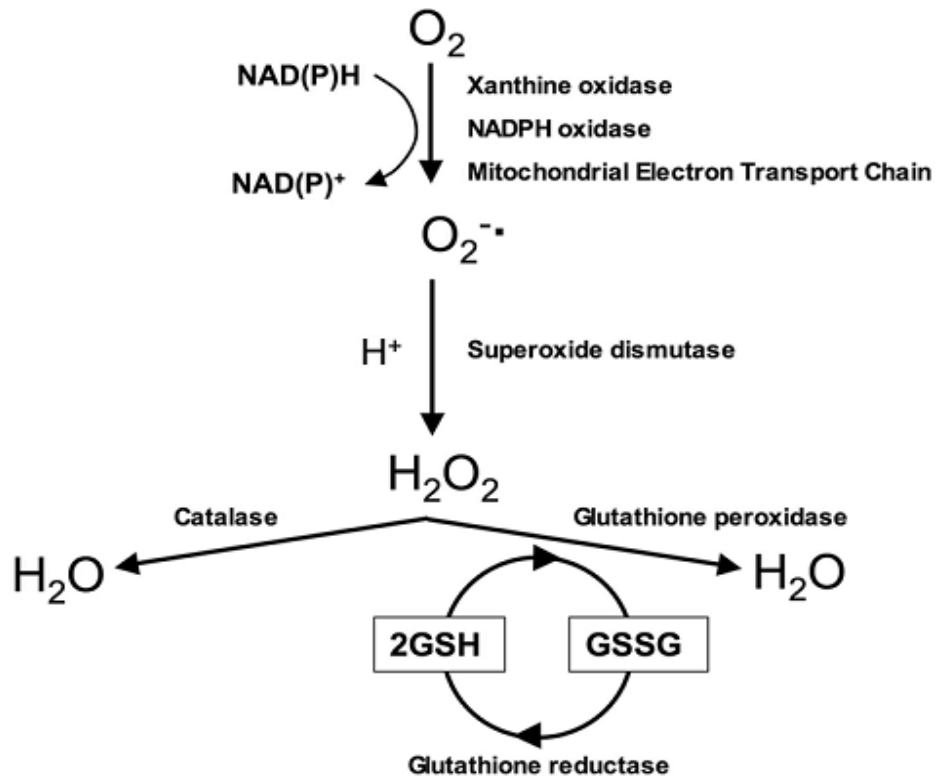
B. Bastırıcı (quencher) etki: Bu etki, oksidan maddelere bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olmaktadır ve çoğunlukla flavonoidler tarafından yapılmaktadır.

C. Onarıcı (repair) etki: Oksidanların oluşturduğu hasarı ortadan kaldırma şeklinde etki göstermektedir.

D. Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen bu etki hemoglobin ve E vitamini tarafından yapılır (89).

4.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Aerobik canlılarda, ROS oluşumuyla birlikte, ROS'un zararlı etkilerini önlemek amacıyla antioksidan savunma sistemleri ya da kısaca antioksidan olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları da gelişmiştir (90). Biyolojik sistemlerde ROS üretiminin ve metabolizmasının başlıca yolları Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. ROS üretiminin ve metabolizmasının başlıca yolları

Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır . İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar SOD, CAT ve GPx enzimleridir. Süperoksit dismutazın yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğu için bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. Hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır. Bu nedenle hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan esas olarak E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin,

seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karoten, γ -glutamat, β -glutamat, glukoz, sistein sorumludur (91, 92).

Antioksidanların oksidatif strese karşı koruyuculukları, reaktif oksijen bileşiklerine karşı reaktivitelerine bağlıdır. In vitro çalışmalarda flavonoidler, basit fenolik asitler ve karotenoidler gibi doğal bileşiklerin çok etkili serbest reaktif oksijen süpürücüleri olduğu ancak bunların kendilerinin de reaktif sekonder radikaller olabileceğine ilişkin bulgular elde edilmiştir. Bu sekonder radikaller hücre içine ulaşır burada lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hedeflerde sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açabilecek değişiklikler yapabilir. Gıdalarda bulunan antikarsinojen özellikteki bileşiklerin antioksidan özellik taşıdığı bilinmektedir. Bu bileşiklerin işlevleri; serbest radikallerin süpürülmesi, antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesini artırma ya da redoks homeostazındaki biyokimyasal olayları etkilemektir. Birçok rahatsızlığa karşı koruyucu olduğu varsayılan antioksidanlar ile ilgili çalışmalar in vitro koşullarda yapılmış olup, in vivo çalışmalardan elde edilen bilgiler sınırlıdır. Antioksidan etkinin kansere karşı koruyucu rolü henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır (93).

Normal koşullarda antioksidanların aktiviteleri ve hücre içi düzeyleri arasında bir denge söz konusudur. Bu denge organizmaların sağlıklı yaşam sürdürebilmesi için gereklidir. Tablo 5'te yer alan enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların oksidatif strese karşı koruma özellikleri birçok makalede yer almaktadır (4).

Tablo 5. Antioksidan sistem.

Enzimatik		Non-enzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon	Bilirubin	
Katalaz (CAT)	α -tokoferol (Vit E)	Ürik asit	
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbik asit (Vit C)	Melatonin	
Glutasyon redüktaz (GR)	β -karoten	Laktoferrin	
Glutasyon S-transferaz (GST)	Flavonoidler	Albumin	
Mitokondriyal sitokrom oksidaz	Seruloplazmin	Transferrin	

4.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

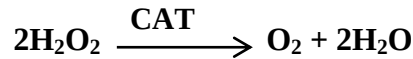
SOD (EC 1.15.1.1, EC SOD) enzimi iki süperoksit radikalının H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümü reaksiyonunu katalizler (94).



Organizmada toplam SOD miktarının yaklaşık 3.5 ila 4 g arasında olduğu tahmin edilmektedir (95). SOD enziminin üç tane izoformu vardır. Bu izoformlardan CuZn SOD sitozolde, Mn-SOD mitokondri matriksinde ekstraselüler SOD (SOD-Ex) ise ekstraselüller matrikste bulunur. CuZn SOD'in iki alt grubu, Mn-SOD'un dört alt grubu vardır. SOD-Ex ise tetramerik yapıdadır. Bu izoformlar geçiş metalleri (Cu^{+2} , Mn^{+2}) içerir ve bu geçiş metalleri iki süperoksit molekülü arasında hızlı bir elektron değişimini gerçekleştirmekte rol oynar. H_2O_2 , SOD tarafından oluşturulurken hücreler lipid, protein ve DNA'nın oksidatif hasarını önlemek amacıyla zararlı olan bu molekülü elimine eder. H_2O_2 'nin eliminasyonu katalaz veya glutatyon peroksidaz tarafından sağlanır (96).

4.3.2.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT: EC 1. 11. 1. 6) çeşitli canlı organizmalarında bulunan ve yapısında dört tane hem grubu ihtiva eden bir çeşit hemoproteindir. Bu enzim canlı hücrelerin peroksizomlarında bulunur ve hidrojen peroksidi substrat olarak kullanarak suya dönüşümü reaksiyonunu katalizler (97).



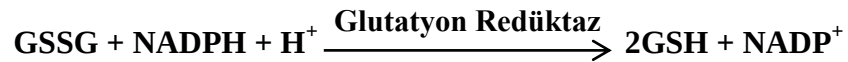
CAT fenoller ve alkoller gibi farklı substratların detoksifikasyonunda görev yapar. Katalazın antioksidan rolüne örnek olarak Cu^{+2} ve Fe^{+3} tarafından katalizlenen Fenton reaksiyonu tarafından H_2O_2 'den $\text{OH}^{\cdot}$ oluşum riskini azaltması verilebilir. CAT in vivo şartlarda sık sık peroksidaz aktivitesi sergiler. Memelilerde bu temel olarak karaciğerde, eritrositlerde ve böbreklerde meydana gelir. Kan ve hepatik hücrelerde oksijen dehidrogenazların faaliyetlerinden dolayı üretilen H_2O_2 'yi CAT uzaklaştırır (98).

Fizyolojik şartlarda CAT, H₂O₂ konsantrasyonunu kontrol eder. H₂O₂'nin hücrelerde birikimini engeller ve hücreleri oksidatif tehlikelere karşı korur. H₂O₂'nin düşük konsantrasyonlarında CAT ile GPx ortaklaşa hareket eder (99).

4.3.2.3. Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz

Tiyol grubu taşıyan bir tripeptit olan glutasyon (GSH), serbest radikallerin yıkıcı etkilerini azaltan veya önleyen birçok enzimin (transferaz, peroksidaz gibi) substratı olarak görev yapar. GSH hücre membranını lipid peroksidasyonuna karşı korur. Birçok hücrede bulunan GSH hücre içindeki tekli oksijen, süperoksit anyonu ve hidroksi radikalleri gibi zararlı oksidanlarla enzim katalizi olmadan tepkimeye girebilir (100).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)(EC 1.11.1.9) dört Se atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Substratı olan GSH ile H₂O₂'nin suya dönüşümünü ve okside glutasyonu (GSSG) katalizler. Glutasyon redüktaz ise NADPH varlığında okside glutasyonu (GSSG) indirgeyerek glutasyon ve NADP⁺ oluşumunu sağlar (73).



4.4. İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma Hücre Serileri (HEp-2)

Larenks kanseri, baş boyun kanserlerinden sıklıkla görülmekle birlikte malign baş boyun tümörlerinin yaklaşık % 25'ini oluşturmaktadır (12). Bu kanser türü son zamanlarda görülme oranı artmaktadır (101). Tüm kanserlerin yaklaşık % 2.7'sini ve kansere bağlı ölümlerinse % 2.1'ini oluşturmaktadır (12). Skuamöz hücreli karsinom tüm malign tümörlerin % 85-90'ını temsil etmektedir (102).

HEp-2 hücre serisi insan nazofaringeal mukozasının laringeal karsinoma hücrelerinden üretilir. Yavaş büyüyen tümör grubundandır (103).

Larenks kanseri, diğ er kanser türlerinden erken teşhis edilme oranı fazladır ki bunun sebebi de ses ve solunumda yaptığı değişikliklerdir. Değişik ülkelerde zamana ve maruz kalınan risk faktörlerine göre hastalığın şekli değişebilmektedir. Larenks kanser gelişimine tütün, alkol, meslek icabı kalınan risk faktörleri (asbest,  imento tozu, katran, tekstil lifleri, sülfirik asit), diyet ve vitamin eksikliği, radyasyona maruz kalma, viral risk faktörleri, gastroözofageal (larengofarengeal) reflü gibi etkenler sebep olabilmektedir (104, 105).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları.

Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	Üretici Firma
Spektrofotometre	Aquamam, Molecular Devices
Spektrofotometre	Shimadzu, UV-vizible
Homojenizator	Ultra-Turrax T-25
Sonikatör	Sonics Vibra-Cell
Su banyosu	Memmert
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	Roche Diagnostics GmbH
CO2 inkübatörü	Hera Cell 240, Heraeus
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5810
Mikropipetler (20, 100, 200, 1000 µL)	Eppendorf
Hassas terazi	Mettler Toledo AB204-S
pH metre	Hanna instrument HI 2211
Çalkalayıcı inkübatör	Eppendorf Centrifuge 5810
Derin dondurucu -80°C	Nuaire
Steril falkon tüpler (15 mL, 50 mL)	Cellstar
Steril Pipet uçları (10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Grenier bio-one
Cam malzemeler (beher, erlen, balon joje, cam şişe)	Isolab
Membran filtresi	
Vorteks	Agilent Econofilter
Steril pastör pipet	Windaus, IKA Vortex Genius 3
Steril enjektör	
UV lamba	
Etüv	
Eppendorf tüpler	
Parafilm	

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları ve ürün kodları.

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma, ürün kodu ve saflığı
Penisilin streptomisin (20 mL)	Biological Industries, 1245637, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Sodyum piruvat solüsyonu (100 mL)	Biological Industries, 1250700, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Fetal Bovin Serum (500 mL)	Biological Industries, 716779, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Tripsin EDTA Solüsyonu (100 mL)	Biological Industries, 1302762, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Ksantin	Sigma, X-0626
EDTA	Carlo Erbo Reagent, Code No 303227
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma, 97596L5
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Merck, Art 6398
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma, Lot#058K0726
Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Merck, Art 1216
Bakır klorür (CuCl_2)	Lancaster, 13167
Ksantin oksidaz	Sigma, Lot#SLBB1574V
Etanol	Sigma, Lot#34870, %99,8
Kloroform	Merck, UN 1888, %99
Potasyum klorür (KCl)	Merck, Art 4935
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, WN 1789, %37
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck, Art 4871
Triton X-100	Merck, Art 11869
Na_2HPO_4	Merck, F1021786125, Darmstadt, Almanya
H_2O_2	Sigma, BCB7137V, İsviçre
RPMI 1640	Biological Industries, 1311911, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
NaHCO_3	Merck, K31437329, Darmstadt, Almanya

5.2. Yöntem

5.2.1. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Maddeler ve Malzemelerin Hazırlanması

Propolisin Sulu Ekstraktlarının (WEP) Hazırlanması: Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan propolis örnekleri toz haline getirilip karıştırıldı ve Türk propolisi toz karışımı elde edildi. 100 g toz propolis 1000 mL saf su ile çözüldü. İyice vortekslendikten sonra sıcakta sürekli çalkalanarak en az 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda çalkalayıcı inkübatörden çıkarılan ekstrakt, süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirildi. Bu şekilde hazırlanan 100 mg/mL'lik konsantrasyondaki stok propolis ekstraktından seyreltme yoluyla çeşitli konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı (25-50 µm/mL).

Propolisin Etanolik Ekstraktlarının (EEP) Hazırlanması: Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan propolis örnekleri toz haline getirilip karıştırıldı ve Türk propolisi toz karışımı elde edildi. 200 g toz propolis % 70'lik 1000 mL etanol ile çözüldü. İyice vortekslendikten sonra sıcakta sürekli çalkalanarak en az 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda çalkalayıcı inkübatörden çıkarılan ekstrakt, süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirildi. Bu şekilde hazırlanan 200 mg/mL'lik konsantrasyondaki stok propolis ekstraktından seyreltme yoluyla çeşitli konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı (6.25-12.5 µm/mL).

PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu), pH 7.4, 1 L: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 1.36 g KH₂PO₄ tartılarak 800 mL kadar saf su ile çözünmesi sağlandı. pH metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlanarak saf su ile son hacim 1 litreye tamamlandı. 0.22 µm'lik steril filtre ile filtre edildi ve +4°C'de saklandı.

RPMI 1640 Medyum Hazırlanması: Fetal Bovin Serum, -70° 'den 37°C'ye alınarak çözülmesi sağlandı. Penisilin/streptomisin ve Sodyum pirüvat -70° 'den oda sıcaklığına alınarak çözülmesi sağlandı. 100 mL RPMI 1640 medyumunun hazırlanması için Tablo 8'deki miktarlardaki solüsyonlar hücre kültürü kabini içinde steril şartlara dikkat edilerek karıştırıldı ve RPMI 1640 ile 100 mL'ye tamamlanarak 0.22 µm'lik steril filtre ile filtre edildi ve +4°C'de saklandı.

Tablo 8. RPMI 1640 Medyum Hazırlığı

Madde	Hacim	Final konsantrasyon
FBS (fetal sığır serumu)	10 mL	% 10
Penisilin/Streptomisin,100x	1 mL	% 1 (1x)
Sodyum Pürivat, 100 mM	1 mL	% 1 (1 mM)
RPMI 1640	RPMI 1640	

% 70 Etanol Hazırlanması: % 100'lük etanolden 7 mL alındı, üzerine 3 mL saf su konularak hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

5.2.1.1. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Maddeler ve Malzemelerin Hazırlanması SOD Aktivite Tayini İçin

Sonikasyon Tamponu (Tris Tamponu): 50mM Tris, 5mM EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit), 10 µg/ml PMSF (Fenil Metil Sülfenil Flurür), Tris ve EDTA'yı 75 ml saf suda çözerek, ayrıca PMSF'yi 1mL etanol da çözerek karıştırıldı ve pH metreyle asit ve baz ilavesi ile pH'sı 7.6 ayarlandı. Son hacmi 100 mL tamamlandı.

PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu), pH 7.4, 1 L: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 1.36 g KH₂PO₄ tartılarak 800 mL kadar saf su ile çözünmesi sağlandı. pH metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlanarak saf su ile son hacim 1 litreye tamamlandı. 0.22 µm'lik steril filtre ile filtre edildi ve +4⁰C'de saklandı.

0.3 mM ksantin Çözeltisi: 3.65 mg ksantin alındı ve 80 mL deiyonize suda çözüldü.

0.6 mM EDTA Çözeltisi: 8.93 mg EDTA alındı ve 40 mL deiyonize suda çözüldü.

150 µM NBT Çözeltisi: 4.9 mg NBT alındı ve 40 mL deiyonize suda çözüldü. NBT çözeltisi SOD reaktif karışımına en son eklendi.

400 mM Na₂CO₃ Çözeltisi: 1.01 g Na₂CO₃ alındı ve 24 mL deiyonize suda çözüldü.

% 0.1'lik Bovin Serum Albumin (BSA) Çözeltisi: 12 mg BSA'dan alındı ve 12 mL deiyonize suda çözüldü. Yukarıdaki beş çözelti karıştırılarak SOD reaksiyon karışımı elde edildi.

2 M Amonyum Sülfat Çözeltisi: 2.64 g amonyum sülfat 10 mL deiyonize suda çözüldü. Ksantin oksidaz enziminin dilüsyonunda kullanıldı.

0,8 mM CuCl₂ Çözeltisi: 5.37 g CuCl₂ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanılır.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3,3 U/mL'lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL'ye amonyum sülfat çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

5.2.1.2. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Maddeler ve Malzemelerin Hazırlanması **CAT Aktivite Tayini İçin**

Homojenizasyon Tamponu: Tris-HCL 50 mM pH:7,4 (litrede 500 mikrolitre olacak şekilde triton x 100 olmalı). Tampon soğuk olmalı.

Sonikasyon Tamponu (Tris Tamponu): 50 mM Tris, 5 mM EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit), 10 µg/ml PMSF (Fenil Metil Sülfenil Flurür), PMSF'nı 1mL etanolde çözüldü ve 75 mL saf suda çözülerek pH metreyle asit ve baz ilavesi ile pH 7.6'ya ayarlandı. Son hacmi 100 mL tamamlandı.

Fosfat Tamponu (pH=7.0 ; 50 mM): 6.81 g KH₂PO₄ deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. 8.9 g Na₂HPO₄.2H₂O deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7.0'ye ayarlandı.

Hidrojen Peroksit: 135 µL %30'luk H₂O₂'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL'ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

5.2.1.3. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Maddeler ve Malzemelerin Hazırlanması Protein Tayini İçin

Reaktif I: %2 CuSO₄.5H₂O: 2 g CuSO₄.5H₂O bir miktar distile suda çözülüp hacmi distile su ile 100mL'ye tamamlandı.

Reaktif II: %2 Sodyum Potasyum Tartarat: 2 g Sodyum potasyum tartarat bir miktar distile suda çözülüp hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Reaktif A: 0,1 N NaOH Çözeltisinde %2 Na₂CO₃: 2 g Na₂CO₃, 100 mL 0,1 N NaOH çözeltisinde hazırlandı.

Reaktif B: Alkali Bakır Reaktifi: Reaktif I, Reaktif II, Reaktif A sırası ise 1:1:100 oranında karıştırıldı, taze hazırlandı.

Folin-Ciocalteu's Fenol Reaktifi: 2 N Folin reaktifi 1:1 oranında distile su ile seyreltildi, taze hazırlandı.

Standartlar: Sığır Serum Albümini: 0.02 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.2 mg/mL Konsantrasyonlarında albümin standartları hazırlandı.

5.2.2. Hücre Kültürü

Bütün hücre kültürü çalışmaları hücre kültürü kabininde (air flow kabin), steril ortamda gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce kabin % 70'lik etanol ile silindi. UV ışıktan etkilenmeyen ve kabin içerisinde kullanılacak olan malzemeler kabin içerisine konularak 15 dakika UV ışığa maruz bırakıldı. Çalışma sonunda kabin % 70'lik etanol ile tekrar silindi. Kabinin kapağı kapatıldı. Kabin ve hücre kültürü odası 1 saat UV ışığa maruz bırakıldı.

5.2.2.1. HEp-2Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Çalışmada O.M.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan temin edilen HEp-2 hücreleri kullanıldı. HEp-2 hücreleri fetal sığır serumu ile takviye edilmiş penisilin/streptomisinli RPMI 1640 besiyerinde, % 5'lik CO₂ ortamında, 37°C'de, 25 cm²'lik flakslarda, inkübatörde çoğaltıldı.

5.2.2.2. HEp-2Hücrelerinin Pasajlanması

Hücreler flaskın yüzeyini % 70-80 kadar kaplayınca pasajlama yapıldı. Pasajlama için öncelikle flasktaki besiyeri uzaklaştırıldı. ~2-3 mL steril PBS alınarak flaska aktarıldı. Hücreler yıkanarak PBS uzaklaştırıldı. ~1 mL Tripsin-EDTA solüsyonu flaska ilave edildi ve 3-5 dakika süreyle CO₂ inkübatöründe bekletildi. Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra Tripsin-EDTA'nın üzerine ~3-4 mL RPMI 1640 medyum ilave edildi ve karıştırıldı. RPMI 1640 medyum ile hücreler 15 mL'lik falkon tüpte toplandı ve 130 g'de, oda sıcaklığında, 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 25 cm²'lik flasklara uygun sayıda hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi de 5 mL'ye tamamlandı.

5.2.2.3. Hep-2Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığının Tespiti

Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 10 µL'si 10 µL tripan blue ile karıştırılarak karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışım pipet ile tekrar karıştırılarak 10 µL alınarak Neubauer hematositometre lamına aktarıldı. Işık mikroskobu altında 10x objektif kullanarak canlı ve ölü hücreler sayıldı. Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanlar sarı-yeşil renkte, ölü olanlar mavi renkte görüldü. Mikroskopla bakıldığında hematositometrede 16 küçük karenin dört köşede bulunduğu görülür. Çapraz köşelerde bulunan hücreler sayılır ve mililitredeki canlı ve ölü hücre sayısı; sayılan hücre sayısı x seyreltme oranı x 10⁴ bağlantısı kullanılarak hesaplandı.

5.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in (106) geliştirdiği yöntemin modifiye edilmesi sonucu yapıldı. Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz ile oluşan süperoksitlerin SOD tarafından kullanılarak, nitroblue tetrazolium (NBT)'dan mor renkli formazan boyası oluşumunun engellenmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar yüksek ise ortamdan o kadar çok O₂⁻ kaldırılacağı için reaksiyondan sonra oluşan rengin şiddetinde azalma gözlenir. Reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorbansı 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

5.2.3.1. HEp-2 Hücre Serisi İçin Numunelerin Hazırlanması

3.5×10^6 HEp-2 hücre pleytlere koyuldu, 24 saat inkübasyon sonrası üzerine istenilen konsantrasyonlarda yukarıda söylediğimiz gibi propolis ekstraktları (EEP için: 25, 50 $\mu\text{g/mL}$, WEP için: 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) ilave edildi, 72 saatlik inkübasyon edildi.

HEp-2 hücreler alınıp 15'lik falkonlara aktarıldı, 400 g'de 10 dk frensiz modda santrifüj edildi ve üzerlerindeki sıvılar atılıp ve sadece hücreler kaldı, sonra falkonların hepsinin üzerine 2 mL 50 mM sonikasyon tamponu soğukta ilave edildi ve 1 dk 80 kHz ile sonike edildi ve 1,5 mL eppendorflara aktarıldı ve 5 dk 1467 g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi, süpernatantları atıldı.

500 μL HEp-2 hücre süspansyonu alındı ve 500 μL etanol ve 500 μL kloroform soğukta eklendi ve tekrar 15 dk 15493 g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı ve hepsini en alt orana seyretildi (yani 5×10^6 hücreye) PBS ile ayarlandı. Ardından Lowry metodu ile protein tayini yapıldı.

5.2.3.2. HEp-2 Hücre Serisi İçin Standartların Hazırlanması ve Deneyin yapılışı

8, 7, 5, 4, 3.5, 2.5, 1.5, 0.75, 0.125 U/mL'lik SOD standartları kullanıldı. SOD standartları pH'sı 7.4 olan PBS çözeltisi ile dilüe edilerek hazırlandı. Standart ve köre etanol, kloroform aşaması uygulanmadı. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 9'e göre hazırlandı.

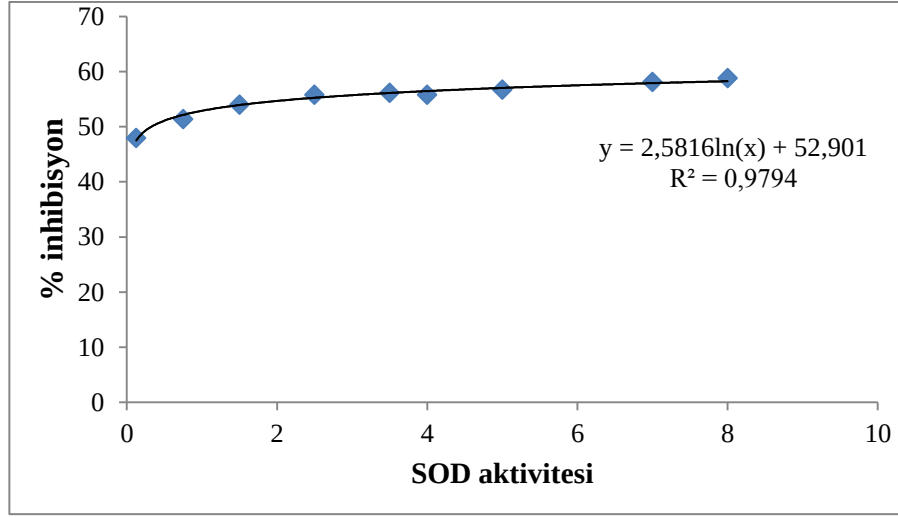
Tablo 9. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Miktar (mL)
Standart/Dilüe Numune	0.25
SOD reaksiyon karışımı	1.25
Ksantin oksidaz	0.025
25°C'de 20 dakika su banyosunda karanlıkta inkübasyon	
Bakır klorür	0.5
560 nm'de spektrofotometrik ölçüm	

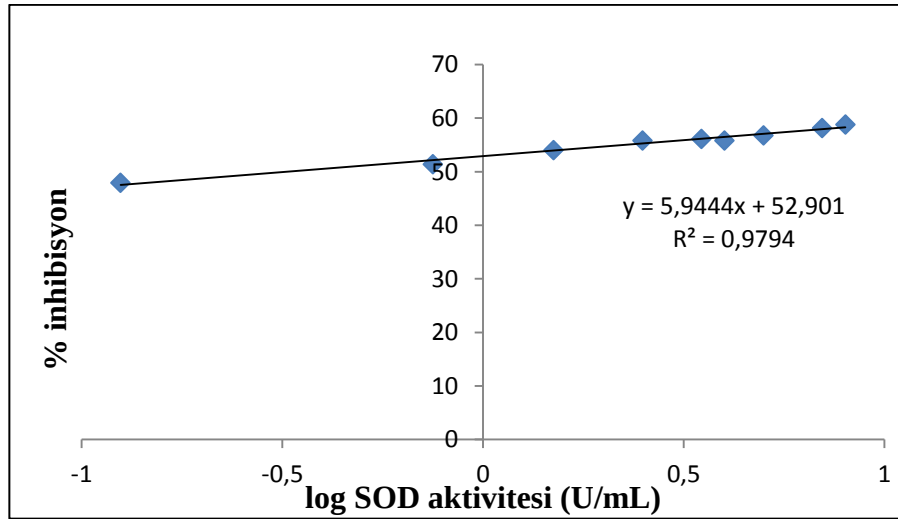
5.2.3.3. HEp-2 Hücre Serisi İçin Enzim Aktivite Hesaplaması

Hesaplamalara göre % inhibisyon cinsinden yapıldı ve Şekil 8 ve Şekil 9'deki standart grafikler kullanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

$$\% inhibisyon = \frac{A_{Kör} - A_{numune}}{A_{Kör}} \times 100$$



Şekil 8. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği



Şekil 9. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği

5.2.4. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi (107) yöntemi modifiye ederek kullanıldı. Bu yöntemin temeli H_2O_2 'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

5.2.4.1. HEp-2 Hücre Serisi İçin Uygun Hücre Sayısı Belirlenmesi

3.5×10^6 HEp-2 hücre pleytlere koyuldu, 24 saat inkübasyon sonrası üzerine istenilen konsantrasyonlarda yukarıda söylediğimiz gibi propolis ekstraktları (EEP için: 25, 50 μ g/mL, WEP için: 500, 1000 μ g/mL) ilave edildi, 72 saatlik inkübasyon edildi.

HEp-2 hücreler alınıp 15'lik falkonlara aktarıldı, 400 g'de 10 dk fırınsız modda santrifüj edildi ve üzerlerindeki sıvılar atılıp ve sadece hücreler kaldı, sonra falkonların hepsinin üzerlerine 4 mL homojenat tamponu ilave edildi ve soğukta 30 – 40 saniye homojenize edildi ve 1'er mL'lik eppendorflara aktarıldı ve üzerlerine 300 μ L kloroform ilave edildi ve 10000 g'de 30 dk $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi, süpernatantları atıldı.

HEp-2 hücreleri üzerine 2 mL 50 mM sonikasyon tamponu soğukta ilave edildi ve 1 dk 80 kHz ile sonike edildi ve 1.5 mL'lik eppendorflara aktarıldı ve 5 dk 1467 g'de $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi, süpernatantları atıldı. Daha sonra Lowry metodu ile protein tayini yapıldı.

HEp-2 hücre homojenatları fosfat tamponu ile 3 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Kuartz küvetlere Tablo 10'a göre pipetlemeler kör ve numune karışımları için ayrı ayrı yapıldı.

Tablo 10. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	0.75	-----
Numune	1.5	1.5
H_2O_2	-----	0.75

H₂O₂ eklenir eklenmez kuartz kuvvetler altüst edildi ve 240 nm’de 180 s süreyle her 10 s’de bir absorbanslar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Absorbanslardaki düşüşün dakikada 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa numune dilüsyonları yeniden ayarlanmalıdır.

5.2.4.2. HEp-2 Hücre Serisi İçin Enzim Aktivite Hesaplaması

CAT aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 10 s’lik düşüş için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$K = (2.3/10) \times \log(A_1/A_2) \text{ s}^{-1} \quad (1)$$

Burada;

A₁= Başlangıç absorbansı

A₂= Son absorbanstır.

Eş. 1’e göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından HEp-2 hücrelerinde mg protein başına CAT aktivitesi hesaplandı.

5.2.5. Protein Tayini

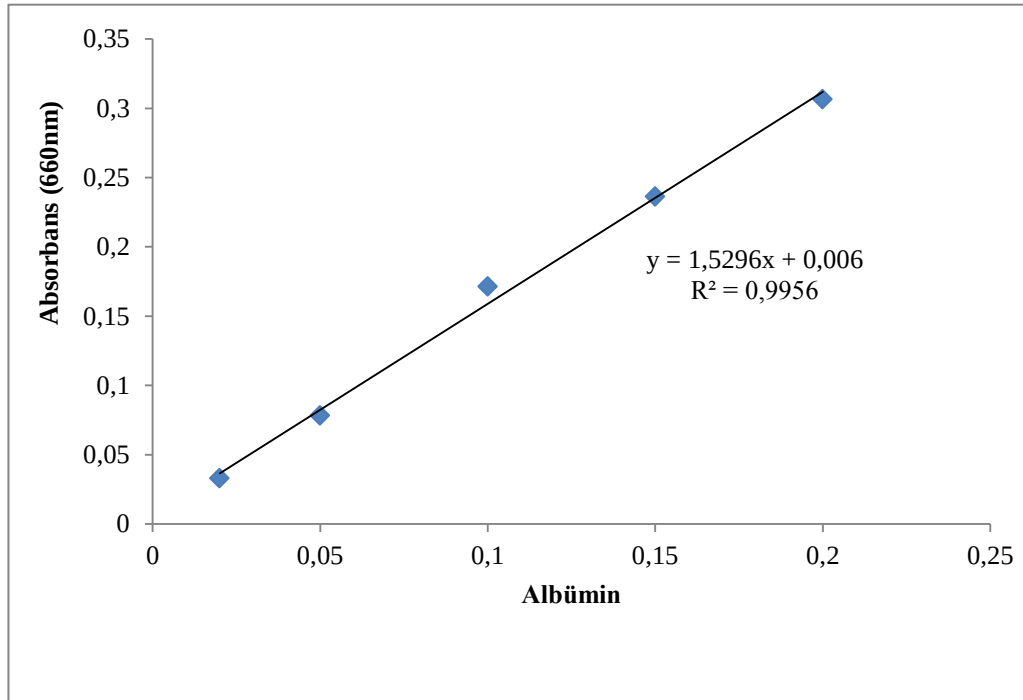
Hazırlanmış hücreler protein tayini Lowry metodu ile yapıldı. Bu metodun prensibi proteinin ilk önce alkali ortamda bakır iyonları ile muamele edilmesine ve daha sonra Folin-Ciocalteu’nun fenol reaktifinin (Fosfotungstik-fosfomolibdik asit) bakır ile muamele edilmiş proteinlerde yer alan tirozin ve triptofan amino asitleri tarafından indirgenmesi esasına dayanır. Folin-Ciocalteu’nun fenol reaktifinin (Fosfotungstik-fosfomolibdik asit) protein ile reaksiyonu sonucu oluşan mavi rengin optik dansitesi spektrofotometrede 660 nm’ de ölçülür.

5.2.5.1. HEp-2 Hücre Serisi İçin Numunelerin Seyreltilmesi, Deneyin yapılışı ve Sonuçların Hesaplaması

Lowry metodunun hassasiyeti 2-100 µg arasındadır. Bu nedenle numunelerimiz 20 kat distile su ile seyreltilmiştir. Aşağıdaki, tablo11’e göre pipetlemeler yapıp 660 nm’de absorbansları okunarak standart grafik yardımı ile 20’ye çarpılarak sonuçlar bulunmuştur.

Tablo 11. Protein Tayini ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı

	Kör	Standart(µL)	Numune(µL)
Distile Su	100	-	95
Standart	-	100	-
Numune	-	-	5
Reaktif B	500	500	500
Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk. Bekletildi.			
Folin reaktifi (1 N)	50	50	50
Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dk. Bekletildi.			
660 nm’de absorbansları okundu.			



Şekil 10. Protein standart grafiği

5.3. İstatistiksel Analizler

Veriler SPSS 11 (Statistical Package for the Social Sciences) bilgisayar paket programına aktarılarak, istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Elde edilen değerler, aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm S.D$) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi için One Way ANOVA ve post-hoc Tukey analizleri kullanıldı. SOD ve katalaz düzeyleri verilerinin propolis ilave edilen hücreler ile propolis ilave edilmeyen grubun karşılaştırılması yapıldı ve $p < 0.05$ olanlar anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. HEp-2 Hücre Serisi SOD Aktivite tayini İçin Uygun Hücre Sayısının Belirlenmesi

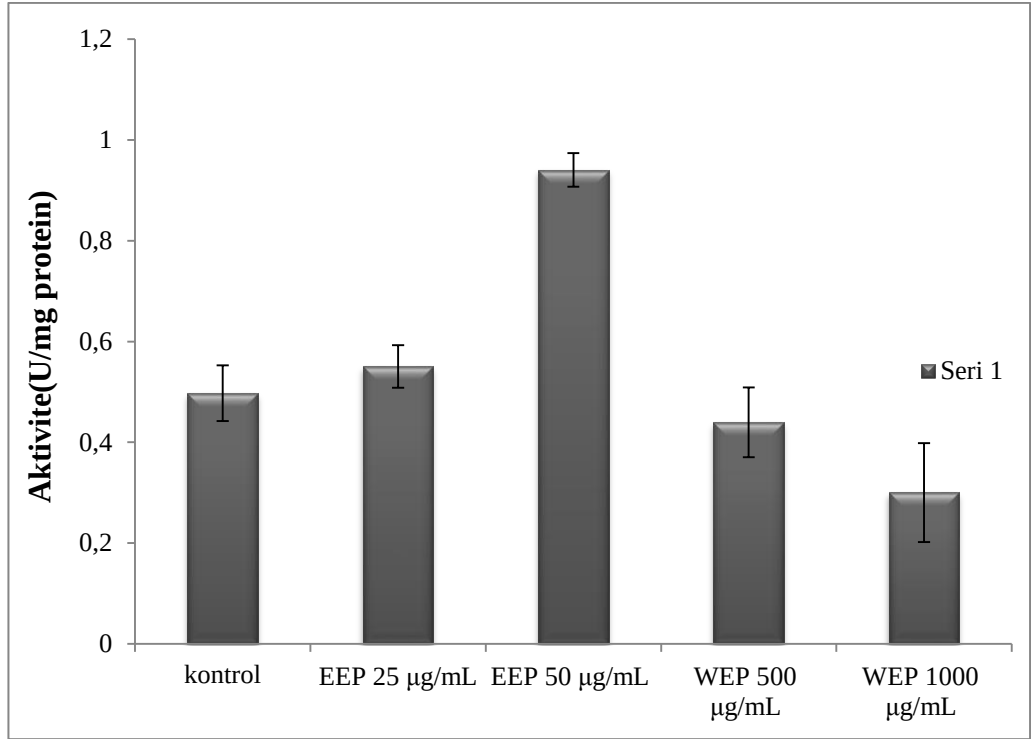
Hücre içi SOD düzeylerindeki değişimleri görmek için her pleyte 3.5×10^6 HEp-2 hücresi koyuldu, 24 saat inkübasyon sonrası üzerine istenilen konsantrasyonlar (EEP için: 25, 50 $\mu\text{g/mL}$, WEP için: 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) ilave edildi, 72 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen hücre sayısı tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre sayısı

Kontrol	EEP	EEP	WEP	WEP
	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
12.2×10^6	8.5×10^6	5×10^6	10.7×10^6	9.8×10^6

6.1.1. SOD Aktivite Ölçüm Sonuçları

Tablo 13’te HEp-2 hücrelerinde yapılan SOD aktivite ölçümleri sonucunda kontrol grubunda ortalama SOD aktivitesi $0,50 \pm 0,055$ U/mg protein, EEP 25 $\mu\text{g/mL}$ grubunda ortalama SOD aktivitesi $0,55 \pm 0,042$ U/mg protein, EEP 50 $\mu\text{g/mL}$ grubunda ortalama SOD aktivitesi $0,94 \pm 0,033$ U/mg protein, WEP 500 $\mu\text{g/mL}$ grubunda ortalama SOD aktivitesi $0,44 \pm 0,069$ U/mg protein ve WEP 1000 $\mu\text{g/mL}$ grubunda ortalama SOD aktivitesi ise $0,30 \pm 0,098$ U/mg protein olarak bulundu. HEp-2 hücrelerinde yapılan SOD aktivitesi ölçümlerinin ortalama değerlerinin ve istatistiksel olarak anlamlılık derecelerinin gruplara dağılımı şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11. HEp-2 hücrelerinde SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı

Tablo 13'te verilen sonuçlarına One Way ANOVA ve post-hoc Tukey analizlerine göre SOD düzeyleri açısından; EEP 50 µg/mL ve WEP 1000 µg/mL konsantrasyonda kontrol arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$). EEP hücreiçi SOD aktivitesini arttırırken, WEP azalttı.

Tablo 13. HEp-2 hücrelerinde SOD aktiviteleri için ortalama $\pm$ standart sapma (SD)

Antioksidan	Kontrol	EEP 25 µg/mL	EEP 50 µg/mL	WEP 500 µg/mL	WEP 1000 µg/mL
SOD (U/mg protein)	0,50 $\pm$ 0,055	0,55 $\pm$ 0,042	0,94 $\pm$ 0,033*	0,44 $\pm$ 0,069	0,30 $\pm$ 0,098*

***Kontrol grubundan anlamlı derecede farklı (Tukey-HSD) testi.**

6.2. HEp-2 Hücre Serisi CAT Aktivite tayini İçin Uygun Hücre Sayısının Belirlenmesi

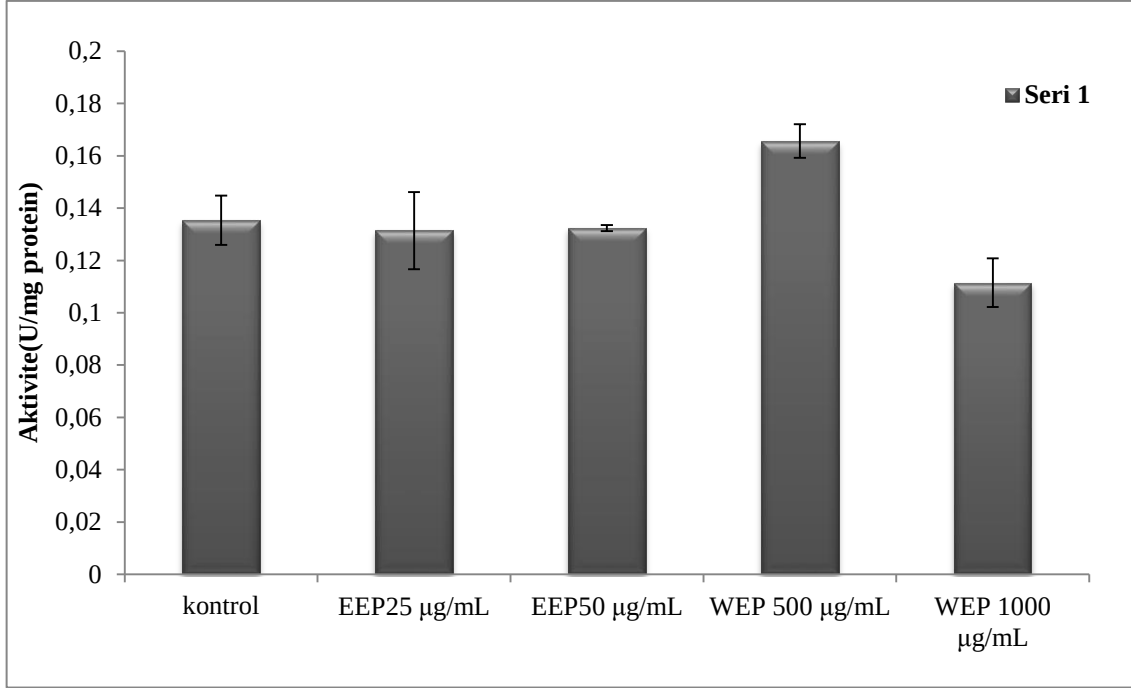
Hücre içi CAT düzeylerindeki değişimleri görmek için her pleyte 3.5×10^6 HEp-2 hücresi koyuldu, 24 saat inkübasyon sonrası üzerine istenilen konsantrasyonlar (EEP için: 25, 50 $\mu\text{g/mL}$, WEP için: 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$) ilave edildi, 72 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen hücre sayısı tablo 14’ de verilmiştir.

Tablo 14. 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre sayısı

Kontrol	EEP 25 $\mu\text{g/mL}$	EEP 50 $\mu\text{g/mL}$	WEP 500 $\mu\text{g/mL}$	WEP 1000 $\mu\text{g/mL}$
11.4×10^6	7.9×10^6	6.2×10^6	10.1×10^6	9.1×10^6

6.2.1. CAT Aktivite Ölçüm Sonuçları

Tablo 14’te HEp-2 hücrelerinde yapılan CAT aktivite ölçümleri sonucunda kontrol grubunda ortalama CAT aktivitesi $0,135 \pm 0,009$ U/mg protein, EEP 25 $\mu\text{g/mL}$ grubunda ortalama CAT aktivitesi $0,131 \pm 0,015$ U/mg protein, EEP 50 $\mu\text{g/mL}$ grubunda ortalama CAT aktivitesi $0,132 \pm 0,001$ U/mg protein, WEP 500 $\mu\text{g/mL}$ grubunda ortalama CAT aktivitesi $0,166 \pm 0,006$ U/mg protein ve WEP 1000 $\mu\text{g/mL}$ grubunda ortalama CAT aktivitesi ise $0,111 \pm 0,009$ U/mg protein olarak bulundu. HEp-2 hücrelerinde yapılan CAT aktivitesi ölçümlerinin ortalama değerlerinin ve istatistiksel olarak anlamlılık derecelerinin gruplara dağılımı şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. HEp-2 hücrelerinde CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı

Tablo 15'te verilen sonuçlarına One Way ANOVA ve post-hoc Tukey analizlerine göre CAT düzeyleri açısından; WEP 500 µg/mL ve WEP 1000 µg/mL konsantrasyonda kontrol arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$). WEP 500 µg/mL hücreiçi CAT aktivitesini artırırken, WEP 1000 µg/mL azalttı.

Tablo 15. HEp-2 hücrelerinde CAT aktiviteleri için ortalama ± standart sapma (SD)

ANTİOKSIDAN	Kontrol	EEP 25 µg/mL	EEP 50 µg/mL	WEP 500 µg/mL	WEP 1000 µg/mL
katalaz (U/mg protein)	0,135 ± 0,009	0,131 ± 0,015	0,132 ± 0,001	0,166 ± 0,006*	0,111 ± 0,009*

***Kontrol grubundan anlamlı derecede farklı (Tukey-HSD) testi.**

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde kanserin önlenmesinde veya tedavi edilmesinde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi, insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Birçok bitkinin antitümör ve bağışıklığı uyarıcı etkisinin yanı sıra birçok biyolojik aktivitelere de sahip olduğu gösterilmiştir. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arı ürünleridir. Arı ürünleri hem tedavi amacıyla kullanılır (apiterapi) hem de besleyici gıda olarak tüketilir (59)

. İnsanoğlu arı ürünlerinden biri olan propolisi çok eski çağlardan beri farklı amaçlar için kullanmıştır. Eski Mısır ve Romalı hekimler bu üründen mumyalarda ve çeşitli yaraların iyileştirilmesinde faydalanmışlardır. Ancak insanlık için propolisin faydalarının henüz çok azı aydınlatılabilmektedir (14).

Dünyanın değişik bölgelerinden toplanan propolis örneklerinden 160'dan fazla bileşik tanımlanmış ve bu bileşikler propolisin botanik ve coğrafik orijinine göre değişmektedir. Propolis günümüzde Arjantin, Avusturya, Şili, Çin gibi ülkelerde kullanılmasına rağmen Brezilya dünya piyasasında propolis konusunda söz sahibi olan ülkelerin başında gelmektedir. Güneybatı Brezilya'dan toplanan yeşil renkli olan propolis her yıl artan şekilde tüm dünya ülkelerine ihraç edilmektedir. Bu nedenle yeşil Brezilya propolisi üzerine çok sayıda ayrıntılı çalışma yapılmıştır (11).

Propolis ve propolisin aktif bileşenlerinin hem in vivo hem de in vitro tümör modellerinde antikarsinogen ve antitümör etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Propolis bileşenlerinden olan kafeik asit fenil ester, artepilin C, naringenin, galangin, genistein ve pluketoin A antitümör ajanlarından en umut vericileridir (59). Propolis ve bileşenlerinin antitümör etkisiyle ilgili son yıllarda çok sayıda yayın olması yeni antitümör ajanların geliştirilmesinde oldukça yararlı olmaktadır. Türk propolisinin ise antikarsinogenik etkisi gösterilmiştir (108).

Propoliste bulunan flavonoidler ve çeşitli fenolik bileşikler çok önemli farmakolojik özellikleri olan bileşiklerdir. Serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında oldukça etkili olduklarından dolayı biyomoleküllerin oksidasyonunu engellerler. Propolisin, önemli farmakolojik özelliklerinden dolayı inflamasyon, diyabet, kanser ve

kalp hastalıklarından korunmada ve genom kararlılığının sürdürülmesinde önemli rolü olabileceği düşünülmektedir (109).

Propolisin terapötik aktivitesinin başlıca flavonoidlere bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Propolisin içeriğinde bulunan flavonoidlerin kanser hücrelerinin apoptozisini, farklılaşmasını, çoğalmasını etkilediği ve kanser kemoprevansiyonunda önemli rol oynayabileceği bilinmektedir (59).

Propolisin tümör hücrelerindeki hücre büyümesinin engellenmesi ve apoptozis ile ilgili mekanizmaları son yıllarda çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (15). Apoptozis olarak bilinen programlanmış hücre ölümü, kanser gelişimi için doğal bir bariyer görevi görmektedir. Çünkü bu süreç mutasyona uğramış potansiyel zararlı hücreleri ortadan kaldırmaktadır. Bu durumu destekleyici çalışmalara sık rastlanmaktadır (110).

Son zamanlarda geliştirilen doğal propolisin suda çözünür formlarının hem oral hem de parenteral olarak uygulanabilir. Ayrıca geliştirilmiş tıbbi etkinliğe de sahip olduğu düşünülmektedir (111).

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Trabzon ilinden toplanan propolis örnekleri ile daha önce çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Çakıroğlu çalışmasında çeşitli çözücülerle (su, etanol, DMSO, gliserol ve aseton) hazırlanan Türk propolis ekstraktlarının çözünürlüğünü, toplam polifenol ve flavonoid içeriğini ve antioksidan özelliklerini ortaya koymuştur. Elde edilen bulgulara göre propolisin en iyi DMSO'da, daha sonra sırasıyla etanol, aseton ve gliserolde, en az suda çözüldüğü kanaatine varılmış ve yapılan HPLC analizleriyle de bu sonuçlar desteklenmiştir (40). Akbulut çalışmasında Türk propolisinin sulu ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücre serilerinde hücre içi serbest kalsiyum ve hidrojen peroksit düzeylerine etkisini incelemiştir. Elde ettiği bulgulara göre, H₂O₂ tayini için kullanılan DCFH-DA konsantrasyonunun optimum 10 µM, kalsiyum tayini için kullanılan Fura-2AM konsantrasyonunun optimum 0.5 µM olduğunu göstermiştir (112).

Paramasivan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, neferin tarafından mitokondriyal-ROS üretimi HepG-2 hücrelerinde kaspas-bağımlı apoptoza neden olduğunu incelemişler, SOD ve CAT enzimlerin aktivitesini HepG-2 hücrelerinde azalma etkisini görmüşler. Ayrıca SOD enziminin HepG-2 hücrelerinde süperoksit

radikallerini ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen önemli bir enzim olduğunu ve CAT enziminde hidrojen peroksidin (H_2O_2) su ve moleküler oksijene dönüşümünü sağladığını bildirilmiştir (113).

Bizde bu çalışmayla yola çıkarak, propolisin antikanser özelliği dikkate alınarak, insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücrelerinde SOD ve CAT düzeylerinde ne tür değişmelere sebep olduğunun incelemek amacıyla başlamıştık.

Çalışmamızda hücelere çeşitli konsantrasyonlarda (EEP için: 25, 50 $\mu g/mL$, WEP için: 500, 1000 $\mu g/mL$) propolis miktarı ilave ettik ve 72 saatlik inkübasyon yaptıktan sonra elde edilen sonuçlar, kontrol grubuna göre diğer grupların canlı kalan hücre sayısında Tablo 12 ve Tablo 14'te görüldüğü üzere bir azalma gözlenmiştir. Bu da HEp-2 hücrelerine propolis ilave eddikten sonra hücre çoğalmasına karşı olabileceğine bağlı olabilir.

Çalışmamızda antioksidan sisteminde yer alan SOD ve CAT enzimlerinin aktiviteleri hesaplanmıştır. HEp-2 hücrelerine propolis verildikten sonra SOD ve CAT aktivitelerinde azalma görüldü. Bu azalmalar Tablo 13 ve Tablo 15'te verilmiştir. Bu azalmanın HEp-2 hücrelerinde propolisten kaynaklanabileceğini ve aynı zamanda hücrelerin büyümesine engel olabileceğini düşünebiliriz.

Bufalo ve arkadaşları Brezilya yeşil propolisinin etanolik ekstraktlarının in vitro sitotoksik etkisine bakmışlardır. Belirli zaman periyotlarında propolis inkübasyonu sonrasında canlı kalan hücre sayısına göre değerlendirme yaparak farklı propolis konsantrasyonlarında zamana ve doza bağımlı olarak canlı hücre sayısında azalma gözlemlemişlerdir (11).

Bufalo ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada ise propolisin etanolik ekstraktlarının 5 ve 10 $\mu g/100 \mu L$ 'sinin hücre canlılığına etkisi olmazken 25, 50 ve 100 $\mu g/\mu L$ konsantrasyonlarının HEp-2 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığını ortaya koymuşlardır. Bu konsantrasyonların aynı zamanda hücre morfolojisinde değişimlere sebep olduklarını belirtmişlerdir (103).

Kamiya ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre Brezilya kırmızı propolisinin MCF-7 (insan göğüs kanseri) kanser hücrelerinde apoptozisi ilerletme etkisi gösterdiği belirtilmiştir (114).

Frozza ve arkadaşlarının kırmızı propolisin HEp-2 ve Hela hücreleri üzerinde sitotoksik etkisine bakmışlardır. Propolisin 10-150 µg/mL konsantrasyon aralığında hidroalkolik ekstraktları kullanılmış ve yüksek konsantrasyonlarda normal hücrelere oranla tümör hücrelerinde inhibitör etkisinin daha anlamlı olduğunu göstermişlerdir (1).

Frozza ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kırmızı propolisin etanolik ekstraktlarının doza bağımlı olarak HEp-2 hücrelerinde apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir (115).

Hui-fen ve arkadaşları Propolisin etkin maddelerinden olan caffeic Acid Penetil Ester (CAPE)'in tümör ve metastaz üzerinde etkilerini incelemişler elde ettiği bu sonuçta propolis içeriğinin etkileriyle kanser hücrelerinin yayılım hızının, kanser türlerine göre yüzde 47-52 arasında oranlara kadar azaldığı gözlenmiştir (116).

Prof. M. Demestre, Alman, Amerikalı ve İtalyan üniversitelerinden bilim adamlarıyla beraber propolis ekstraktının uzun dönemli etkilerini incelemişlerdir. Bu uzun süreli deneyin sonucunda; propolisin 100 günlük kullanım sürecinde tümör büyümesinin önemli oranda baskılandığı bu oranın kanser türlerine göre küçük sapmalar gösterdiği, ortalama değerin ise yüzde 47, 5 olduğu açıklanmıştır (117).

Mok-Ryeon ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada propolisin etkin maddelerinden CAPE ve quertin'in etkileri ortaya çıkarılmıştır. Buna göre bu etkin maddeler tümörlerin kendi kan yollarını inşa etmesini engelleyerek, tümör gelişmesinin ve dayanıklılığının önünü kesebileceği gösterilmiştir (118).

Yukio Sugimoto ve arkadaşlarının araştırmasına göre, Akciğer Kanseri'nin ilerlemesine karşı propolis kullanımının engelleme etkisi gösterebileceği incelemiştir. Çalışmada tütün bazlı kanserojenlere 7 hafta yoğun şekilde maruz bırakılmasıyla fare akciğerlerinde tümör oluşumları sağlanmıştır. Daha sonra 16 hafta boyunca günlük 100mg/kg oranında propolis ağız yoluyla veriliyor. Sadece kanserojene maruz bırakılıp propolis verilmeyen farelerdeki tümör sayısı(ortalama 12,3), kanserojen sonrası propolis uygulanan farelerdeki tümör sayısına(ortalama 3,5) göre 4 kat civarında fazla olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, propolisin kemopreventif içerik olarak akciğer kanseri vakalarında insanlarda kullanılabileceği önerilmiştir.(119).

HEp-2 hücrelerinde SOD ve CAT enzim aktivitelerini sulu propolis ekstraktının azaltması, propolisin kanser kemoterapisinde bir ümit olabileceğini göstermektedir.

8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

8.1. Sonuçlar

1. HEP-2 hücre kültürü ile ilgili çalışmalarda her bir flaska 3.5×10^6 HEP-2 hücre kullanılması uygun bulunmuştur.
2. HEP-2 hücrelerin çoğalmasında en iyi grupta kontrol grubu olduğu anlaşılmıştır.
3. SOD aktivite ölçümünde en iyi azalma WEP 1000 µg/mL’de olduğu anlaşılmıştır.
4. SOD aktivite ölçümünde EEP 50 µg/mL ve WEP 1000 µg/mL konsantrasyonları ile kontrol arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0.05$).
5. CAT aktivite ölçümünde en iyi azalma WEP 1000 µg/mL’de olduğu anlaşılmıştır.
6. CAT aktivite ölçümünde WEP 500 µg/mL ve WEP 1000 µg/mL konsantrasyonları ile kontrol arasında anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0.05$).
7. Bu bulgular ışığında, propolisin antikanser etkisini açıklamada katkı sağlayıp, insan laringeal epidermoid karsinomlarına etkisine ilişkin mevcut sınırlı sayıdaki literatüre katkı sağlanmıştır.

8.2. Öneriler

1. SOD ve CAT aktivite çalışmalarında farklı propolis konsantrasyonlarında (yüksek ve düşük) WEP ve EEP’li çalışılabilir.
2. SOD ve CAT aktivite tayini için başka kanser hücrelerde de çalışılabilir.
3. Apoptozisi teyid etmek için çalışmalar yapılabilir (Flow sitometrik DNA analizi).
4. SOD ve CAT reaktif oksijen radikalleri ile birlikte çalışarak korelasyonlarına bakıla bilir.

9.Kaynaklar

1. Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JA, Roesch-Ely M (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol* 52: 137-142.
2. Sforcin JM (2007). Propolis and immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 113: 1-14.
3. Orsolic N (2010). A review of propolis antitumor action in vivo and in vitro. *J ApiProduct ApiMedical Sci* 2 (1):1-20.
4. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
5. Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54: 176–186.
6. Sorg O (2004). Oxidative stres: a theoretical model or biological reality?. *C R Biologies* 327: 649-662.
7. Lo'pez-La'zaro M (2007). Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Letters* 252: 1-8
8. Nordberg J, Arn'er ESJ (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad Biol Med* 31: 1287–1312.
9. Yang B, Hao F, Li J, Chen D, Liu R (2013). Binding of chrysoidine to catalase: spectroscopy, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies. *J Photochem Photobiol B: Biol* 128: 35-42.
10. Buffalo MC, Candeias JMG, Sousa JPB, Bastos JK, Sforcin JM (2010). *Natural Product Research* 24: 1710-1718.
11. Bufalo MC, Candeias JMG, Sforcin JM (2007). In vitro cytotoxic effect of Brazilian Green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (Hep-2) cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 6: 483-487.
12. Rizo WF, Ferreira LE, Colnaghi V, Martins JS, Franchi LP, Takahashi CS, Beleboni RO, Marins M, Pereira PS, Fachin L (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of coronaridine from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC in a

- human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2). *Genet Mol Biol* [Epub ahead of print]
13. Gulcin I, Bursal E, Sehitoglu MH, Bilsel M, Goren AC (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol* 48: 2227-2238.
 14. Ghisalberti, E.L., 1979, Propolis: a review, *Bee World*, 60: 59-84 p. 84.
 15. Sforcin JM, Bankova V (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 133: 253-260.
 16. Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P (2010). Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine* 17: 132-138.
 17. Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S: Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 67-73, 2002.
 18. Pietta, P.G Gardana, C Pietta A.M.: Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73 Suppl. 1: 7–20, 2002.
 19. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankava, V., Christov, R., Popov, S.: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235-240, 1999.
 20. Bonvehi, J. and Coll, V.: Study on propolis quality from China and Uruguay. *Zeitschrift für Naturforsch*, 55: 778-784, 2000.
 21. Cheng H, Qin ZH, Guo XF, Hu XS, Wu JH (2013). Geographical origin identification of propolis using GC–MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Res Int* 51: 813–822.
 22. Pereira, A.D., de Andrade, S.F., de Oliveira Swerts, M.S., Maistro, E.L.: First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2580-2584, 2008.
 23. Barbaric M, Miskovic K, Bojic M, Loncar MB, Smolicic-Bubalo A, Debeljak Z, Medic-Saric M (2011). Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J Ethnopharmacol* 135: 772-778.

24. Pierini GD, Granero AM, Nezio MS, Centurion ME, Zon MA, Fernandez H (2013). Development of an electroanalytical method for the determination of lead in Argentina raw propolis based on bismuth electrodes. *Microchem J* 106: 102-106.
25. Burdock, G.A.: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363, 1998.
26. Thirugnanasampandan R, Raveendran SB, Jayakumar R (2012). Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. *Asian Pac J Trop Biomed* 2: 651-654.
27. Woo KS, Park JS (1997). Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects. In *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Mizrahi, A. and Lensky, Y. (Eds) New York Plenum Press. pp 125-128.
28. Khalil ML (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 7: 22-31.
29. Schmidt, J.O.: Bee products Chemical composition and application by Mizrahi, A., Lensky, Y.(Eds), *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Plenum Pres, New York, 1997, pp. 15-26.
30. <http://tr.ikipedia.org/iki/Propolis>. (Erişim Tarihi 05/01/2014)
31. Kanbur, M., Eraslan, G., Silici, S.: Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 909-915, 2009.
32. Turkez H, Yousef MI, Geyikoglu F (2010). Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food Chem Toxicol* 48: 2741-2746.
33. Sforcin JM (2007). Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 113: 1-14.
34. Cuesta, A., Rodriguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J.: In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 71-80, 2005.
35. Yousef MI, Kamel KI, Hassan MS, El-Morsy AM (2010). Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits. *Food Chem Toxicol* 48: 1846–1852.

36. Duran, G.G.: In vitro koşullarda propolisin antibakteriyel, antifungal ve leyişmanyasidal etkilerinin araştırılması, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Hatay, 2007.
37. Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S.: Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19: 1479- 1484, 1996.
38. Cořkun T (2005). Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 48: 69-84.
39. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425.
40. Çakıroğlu TN (2010). Çeşitli çözücülerde Türk propolisinin çözünlüğünün incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
41. Merken HM, Beecher GR (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Chromatogr A* 897: 177-184.
42. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *IPS* 1: 25-4.
43. Merken, H.M. and Beecher, G.R.: Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3), 2000.
44. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584, 2002.
45. Kolankaya, D., Selmanoęlu, G., Sorkun, K., Salih, B.: Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 78: 213-217, 2002.
46. Volpi N, Bergonzini G (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42: 354-361.
47. Laskar RA, Sk I, Roy N, Begum NA (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem* 122: 233–237.

48. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* 84: 329–339.
49. Bankova, V., De Castro, S.L. and Marcucci, M., 2000, Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, 31: 3-15 p. 20
50. Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., et al., 2002, Effects of compounds found in propolis on streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity, *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 1302-09 p. 151.
51. Murad, J.M., Calvi, S.A., Soares, A.M.V.C., et al., 2002, Effect of propolis from brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophage against *Paracoccidioides brasiliensis*, *Journal Of Ethnopharmacology*, 79: 331-34 p. 180.
52. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Prasain, J.K., et al., 1998, Chemical constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities, *Journal of Natural Product*, 61: 896–00 p. 24.
53. Dohle, G., 2010, Male infertility in cancer patients, review of the literature, *International Journal of Urology*, 10: 11-11 p. 58.
54. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., et al., 2001, Hepatoprotective and antihelicobacter pylori activities of constituents from brazilian propolis, *Phytomedicine*, 8: 16-23 p. 23.
55. Bayankova, L., Derejian, S., Koumanova, R., et al., 2003, Inhibition of helicobacter pylori growth in vitro by bulgarian propolis: preliminary report, *Journal Of Medical Microbiology*, 2: 417-19 p. 26.
56. Kolankaya, D., Selmanoglu, G., Sorkun, K., 2002, Protective effects of Turkish propolis on alcoholinduced serum lipid changes and liver injury in male rats, *Food Chemistry*, 78: 213-17 . 150.
57. Özcan, M., Ünver, A., Ceylan, D.A., Yetisir, R., 2004, Inhibitory effect of pollen and propolis extracts, *Nahrung/Food*, 48: 188–194 p. 196.
58. Popova, M, Silici, S., Kaftanoğlu, O., Bankova, V., 2005, Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition, *Phytomedicine*, 12, 221- 28 p.205.
59. Orsolic N (2010). A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *JAAS* 1: 1 – 20.

60. Gong S, Luo L, Gong W, Gao Y, Xie M (2012). Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. *Food Chem* 134: 583-588.
61. Montoro A, Soriano JM, Barquinero JF, Almonacid M, Montoro A, Verdu G, Sahuquillo V, Villaescusa JI, Sebastia N (2012). Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. *Food Chem Toxicol* 50: 216-221.
62. Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49: 3-8.
63. Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T.: Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107 (6): 526-545, 1987.
64. Aliyazıcıoğlu Y, Değer O, Ovalı E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y, Karahan S C (2005). Effects of turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K- 562 cell lines. *International Immuno* 5: 1652-1657.
65. Altan N, Dinçel AS, Koca C (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stress. *Türk J Biochem* 31 (2): 51-56.
66. Koca N, Karadeniz F (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16: 32-37.
67. Eroğlu Doğan E (2008). Bazı flavonoidlerin drosophila melanogaster’de antigenotoksik aktivitesi ve antioksidan etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
68. Sosa V, Moline T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 12: 376-390.
69. Kalyanaraman B (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 1: 244-257.
70. Halliwell, B.: Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52: 253-265, 1994.
71. Özden, S.: Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2006.
72. Kavas C (2008). Kurşun aracılı doku hasarında flavonoidlerin rolü. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

73. Koca, N., Karadeniz, F. Serbest Radikal Olusum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 32–37.
74. Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46: 200-206.
75. Fantel AG (1996). Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis. *Teratology* 53: 196-217.
76. Yılmaz, Z. (2006). Öğrenme ve Hafızanın Sekillendiği Beyin Bölgelerinde Alkolün Olusturduğu Hasarlarda Propolisin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dönü Üniversitesi, Malatya.
77. Jakus, V. (2000). The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy* 101 (10), 541–551.
78. Akyol, M.A.: Tavşan modelinde laparoskopik iskemik precondition manevrasının oksidatif stres üzerine etkisinin araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Afyonkarahisar, 2007.
79. Tokaç, D.: Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2007.
80. Antemen, Ş.E.: Beta Talasemide Oksidatif Stres, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2005.
81. Trelstad RL, Lawley KR, Holmes LB. Nonenzymatic hydroxylations of proline and lysine on reduced oxygen derivatives. *Nature* 1981; 289: 310-5.
82. Kanofsky JR. Singlet oxygen production by biological systems. *Chem Biol Interact* 1989; 70: 1-28.
83. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 1990; 4: 2587-97.
84. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.
85. Konukoğlu, D.: Serbest Radikaller Ve Önemleri. *Aile Hek Derg* 1997; 1(4): 197-200.
86. Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:1-19.

87. Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C.: Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79: 2056-2068, 2006.
88. Sorg, O.: Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327: 649-662, 2004.
89. Meral R, Doğan IS, Kanberoğlu (2012). Fonksiyonel Gıda Bileşeni Olarak Antioksidanlar. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2: 45-50.
90. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* 2nd ed. Clarendon Press, Oxford 1996, pp 10-19, 86-130.
91. Gürsoy Ş (2008). Düzenli spor yapan öğrenci gruplarında egzersizin total antioksidan kapasite ve serum lipid profili üzerine etkisi. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Malatya.
92. Halliwell B (1991). Drug antioxidant effects. *Drugs*. 42(4): 569 – 605.
93. Breinholt, V.M., Molck, A.M., Svendsen, G.W., Daneshvar, B., Vinggaard, A.M., Poulsen, M., Dragsted, L.O.: Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3- ethylimidazole (4,5-f)-quinoline (IQ) on preneoplastic lesions and on oxidative damage, hormonal status, and detoxification capacity in the rat. *Food Chemical Toxicology*, 41: 1315-1323, 2003.
94. Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya; 49.
95. Marklund SL (1984). Properties of extracellular superoksit dismutase from human lung. *Biochem J* 220: 269.
96. Helle RA, Jesper BN, Fleming N (1997). Antioxidative Enzyme Activities in Human Eritthrocytes. *Clin Chem* 43: 562-568.
97. Çimen Ç, Öter Ç, Demir H, Savran A (2005). Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi. *YYÜ Veteriner Fakültesi* 16: 15-20.
98. Kulikowska-Karpinska E, Moniuszko-Jakoniuk J (2003). The Antioxidative Barrier in the Organism. *Polish Enviromental Studies* 13: 5-13.
99. Lardiniois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG (1996). Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1295: 222-238.

100. Polat, A. (2004). Safra Kanal Ligasyonu Yapılmış Sıçanlarda Aspirinle Olusturulan Mide Dokusu Hasarında Melatonin Etkileri. Uzmanlık Tezi, Dönüş Üniversitesi, Malatya.
101. Liu R, Tang W, Kang Y, Si M (2009). Studies on best dose of X-ray for Hep-2 cells by using FTIR, UV-vis absorption spectroscopy and flow cytometry. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 73: 601-607.
102. Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Jacobson AS, Werner JA, Suarez C, Leemans CR, Bradley PJ, Rinaldo A (2007). Evolution of the management of laryngeal cancer. *Oral Oncol* 43: 431-439.
103. Bufalo MC, Candeias JM, Sousa JP, Bastos JK, Sforcin JM (2010). In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEp-2 cells. *Nat Prod Res* 24: 1710-1718.
104. Ünal R, Mehel DM, Ünal M (2000). Larenks kanserlerinde etyoloji ve patogenezi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi* 17 (2): 61-68.
105. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, Lefebvre JL (2003). Cancer of the larynx. *Crit Rev Oncol Hematol* 47: 65-80.
106. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497.
107. Aebi HE (1987). Catalase. In Bergmeyer HU, *Methods of Enzymatic Analysis* 3: 273-285.
108. Erdogan S, Ates B, Durmaz G, Yilmaz I, Seckin T (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food Chem Toxicol* 49: 1592-1597.
109. Ferguson LR.: Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475: 89-111, 2001.
110. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of Cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
111. Orsolic N, Basic I (2003). Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol* 84: 265-273.
112. Akbulut K (2014). Türk propolisinin sulu ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücre serilerinde hücre içi serbest kalsiyum ve

hidrojen peroksit düzeylerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

113. Poornima P, Quency RS, Padma VV (2013). Neferine induces reactive oxygen species mediated intrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells. *Food Chem* 136: 659-667.
114. Kamiya T, Nishihara H, Hara H, Adachi T (2012). Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Endoplasmic Reticulum Stress. *J Agric Food Chem* 60: 11065–11070.
115. Frozza CO, Ribeiro T, Gambato G, Menti C, Moura S, Pinto PM, Staats CC, Padilha FF, Begnini KR, de Leon PM, Borsuk S, Savegnago L, Dellagostin O, Collares T, Seixas FK, Henriques JA, Roesch-Ely M (2013). Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. *Food Chem Toxicol* 63: 194-205.
116. Hui-Fen L, Yu-Ywan C, Jun-Jen L, Ming-Ling H, Hui-Ju S, Hung-Jen J Chwen-Jen L, Chwen-Jen S, Ming-Shi S, Yu-Jen C (2003). Inhibitory Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Angiogenesis, Tumor Invasion, and Metastasis. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7907-7912.
117. M. Demestre, S. M. Messerli, N. Celli, M. Shahhossini, L. Kluwe, V. Mautner, H. Maruta¹(2009). CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)-based Propolis Extract (Bio 30) Suppresses the Growth of Human Neurofibromatosis (NF) Tumor Xenografts in Mice. *Phytother.* 23: 226–230.
118. Mok-Ryeon A, Kazuhiro K, Shigenori K, Tsutomu N, Kazuhiko K, Yoshihiro U, Hitoshi H, Hideko N, Toshiro O (2009). Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol. Nutr. Food*, 53: 643 – 651.
119. Yukio S, Yoshinori I, Ryoji K, Yasushi K, Miyuki N, Maria AH, Kiyoshi O, Hiroyuki S, Hideo Y, Chiaki K (2003). Inhibitory effects of propolis granular A. P. C on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Letters* 193: 155–159.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı: GHANBARİTAGHİABAD Javad

Uyruğu: İran

Doğum tarihi ve yeri: 11/09/1984 Miandoab

Medeni hali: Bekar

Telefon: 0462 3777889

E-Posta: javad.vip83@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece

Mezun Olduğu Kurumun Adı

Mezuniyet Yılı

Doktora/Uzmanlık

Yüksek Lisans

Lisans

Azad İslamik üniversitesi Urmia

Veterinerlik labratuvar Bilimleri

2010

Lise

Miandoab Rahe Danesh Lisesi

2002

YABANCI DİL

Türkçe, Farsça, İngilizce, Arapça