



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOĞU KARADENİZ PROPOLİS
ÖRNEKLERİNİN HERPES SİMPEKS VİRÜS
TİP 1 ÜZERİNE ANTİVİRAL ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Merve CORA

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA

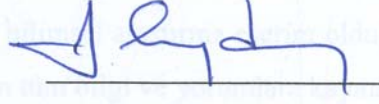
TRABZON-2018

ONAY

Bu tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Faruk AYDIN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Merve CORA'nın hazırladığı "Doğu Karadeniz Propolis Örneklerinin Herpes Simpleks Virüs Tip 1 Üzerine Antiviral Etkilerinin Değerlendirilmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

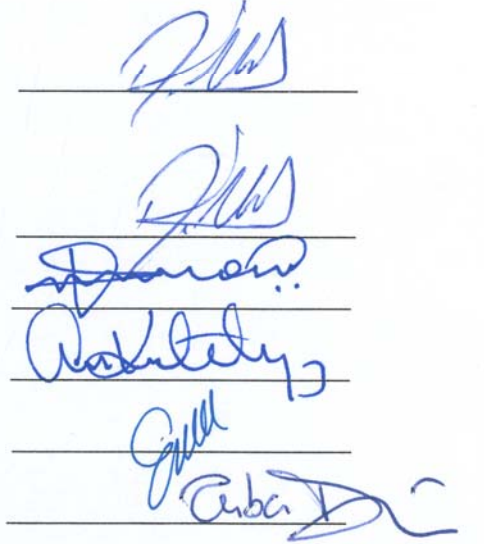
Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA

Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ

Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK

Doç Dr. Emel UZUNOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER



Tarih: / /2018

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

.....
Prof. Dr. Ersan KALAY

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 aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

27/09/2018

Merve CORA

İthaf

Maddi ve manevi desteklerini her an yanımda hissettiğim, her iki alemde de yanımda olmasını dilediğim geniş aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Akademik hayata adım attığım yüksek lisans eğitimimde danışmanlığımı üstlenen, doktora eğitimimde de danışmanım olmaya devam eden, bu zorlu yolda yürürken önümü görmeme yardımcı olan sevgili hocam Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya, tecrübe ve önerileriyle çalışmalarımıza yeni ufuklar açan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Faruk AYDIN'a ve bölüm hocalarımız Prof. Dr. Ali Osman KLIÇ, Prof. Dr. İlknur TOSUN, Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU, Doç. Dr. Kurtuluş BURUK, Dr. Öğr. Üyesi Esra ÖZKAYA'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisansta eğlendiren ve bir o kadar da düşündüren derslerini zevkle dinlediğim, doktora tezim için Herpes Simpleks Virüs Tip-1 temin eden ve hücre kültürü bilginin temellerini atan değerli Karadeniz Teknik Üniversitesi emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Murat ERTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Afrikan yeşil maymun böbrek hücreleri'ni (VERO) temin ettiğimiz Erciyes Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ'ye cömertliğinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmamda kullanmam için elindeki propolis örneklerini veren, laboratuvarının kapılarını bana açan, kendisine danıştığım da problemlerimi çözen değerli hocam Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya, yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Zehra CAN, Öğr. Gör. Gülşah OKUMUŞ ve yüksek lisans öğrenci Ceren BİRİNCİ'ye çok teşekkür ederim.

Hücre kültüründe karşılaştığım problemlerin çözümünde bana yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Ersan KALAY, Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER ve Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Cihan İNAN'a yardımları için teşekkür ederim.

Akademik hayata adım attığımdan beri yanımda olan, karşılaştığım problemlerde bana yardımcı olan, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, anlayışlı, nazik, güler yüzlü arkadaşlarım Dr. Ahu REİS, Arş. Gör. Gülşen ULUÇAM ATAY, Arş. Gör. İnci DURUKAN ve Dilek KOCABAŞ'a çok teşekkür ederim. Uzun yılları birlikte geçirdiğimiz arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKÇİ, Dr. Mujib

ABDULKADIR ABDURRAHMAN, Dr. Sana TABBOUCHE, Dr. Jaleel SAMANJE'ye teşekkür ederim.

Tecrübelerini benimle paylaşan, yardımlarını esirgemeyen hoşsohbet arkadaşlarım Arş. Gör. Öznur GEDİKLİ, Arş. Gör. Ceren SÜMER, Arş. Gör. Ceren SARI, Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU, Arş. Gör. Esra ŞEKERCİ, Arş. Gör. İdris ER. Arş. Gör. Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU, Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN'a teşekkür ederim. Arş. Gör. Serbülen ÜNSAL'a değerli vaktini bana ayırdığı ve yardımları için teşekkür ederim.

Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA yönetimindeki TDK-2016-5602 sayılı projeyi destekleyerek bu tezin yapılmasına katkı sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

En sıkıntılı anlarımda bana anlayış gösteren, her zaman destek olan, ne olursa olsun bana sevgi, şefkat ve güler yüz ile yaklaşan sevgili annem Neriman TOKDEMİR ve canım babam Ahmet Naci TOKDEMİR'e bu günlere gelmemde yardımcı oldukları için çok teşekkür ederim.

Karşılaştığım zorlukları aşmama yardımcı olan, başaramayacağımı düşündüğüm anlarda elimden tutup yola devam etmemi sağlayan, bana sürekli moral vererek emin adımlarda hedefime ulaşmamı sağlayan, geniş akademik bilgi ve tecrübesini bana aktaran sevgili eşim Doç. Dr. Ömer Necati CORA'ya çok teşekkür ederim.

En sıkıntılı zamanımda bile beni güldürmeyi başaran, iş stresini üzerimden atan, varlığıyla hayatımı şenlendiren sevgili oğlum Ahmed Faruk CORA'nın varlığına sonsuz şükrediyorum.

Merve CORA

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xii
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ	4
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Propolis	6
4.1.1. Tarihçe	6
4.1.2. Propolisin Kompozisyonu	8
4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri	11
4.1.3.1. Bağışıklık Sisteminin Düzenlenmesi	12
4.1.3.2. Antimikrobiyal Aktivite	12
4.1.3.3. Anti-Tümöral Aktivite	13
4.1.3.4. Anti-Enflamatuar Aktivite	14
4.2. Herpes Simpleks Virüs	14
4.2.1. Tarihçe	14
4.2.2. Virüsün Yapısı	15
4.2.3. Viral Genomun Yapısı	15
4.2.4. Viral Yaşam Döngüsü	16
4.2.5. Epidemiyoloji ve Bulaş	17
4.2.6. Klinik Sendromlar	18
4.2.7. Laboratuvar Tanısı	20

4.2.7.1. Hücre Kültürü	20
4.2.7.2. İmmüno Floresan Boyama	20
4.2.7.3. Tzanck Yayması	20
4.2.7.4. Viral DNA Tespiti	21
4.2.7.5. Serolojik Yöntemler	21
4.2.8. Tedavi	22
4.3. Virüs Sayısının Hesaplanması, Sitotoksisite ve Antiviral Aktivite Belirlenmesinde Kullanılan Testler	22
4.3.1. TCID ₅₀ Testi	22
4.3.2. Plak Testi	22
4.3.3. Tripan Mavis Testi	23
4.3.4. MTT Testi	23
4.3.5. RT-PCR Testi	23
5. GEREÇ ve YÖNTEM	25
5.1. Gereç	25
5.1.1. HSV-1 ve Propolis Örnekleri	25
5.1.2. Kimyasallar ve Besiyeri	25
5.1.3. Sarf Malzemeler	26
5.1.4. Cihazlar	26
5.1.5. Çözeltiler ve Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	26
5.2. Yöntem	28
5.2.1. VERO Hücrelerinin Stoktan Alınarak Çoğaltılması	28
5.2.2. VERO Hücrelerinin Pasajlanması	28
5.2.3. VERO Hücrelerinin Dondurulması	28
5.2.4. Pleytlere Hücre Ekimi Yapılması	29
5.2.5. Hücre Kültüründe HSV-1'in Üretilmesi	29
5.2.6. TCID ₅₀ Testi	30
5.2.7. Plak Testi	30
5.2.8. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması	31
5.2.8.1. Propolis Ekstraktlarının Etanol Kullanılarak Hazırlanması	32
5.2.8.2. Propolis Ekstraktlarının Distile Su Kullanılarak Hazırlanması	32
5.2.9. HPLC-UV İle Fenolik Bileşenlerin Tayini	33

5.2.9.1. HPLC-UV Koşulları	33
5.2.9.2. HPLC-UV Analizinde Kullanılan Standartlar	33
5.2.10. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi	34
5.2.11. Sitotoksosite Deneyleri	34
5.2.11.1. Tripan Mavisi Yöntemi	34
5.2.11.2. MTT Yöntemi	35
5.2.12. Antiviral Aktivite Testleri	36
5.2.12.1. MTT Yöntemi	36
5.2.12.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	37
5.2.12.3. Plak Azalma Testi	38
5.2.13. İstatistiksel Analiz	39
6. BULGULAR	40
6.1. Plak Testi Sonucu	40
6.2. TCID ₅₀ Testi Sonucu	41
6.3. Sitotoksosite Deneyleri Sonuçları	41
6.3.1. Tripan Mavisi Testi Sonuçları	41
6.3.2. MTT Testi Sonuçları	50
6.4. Propolis Ekstraktlarının HPLC-UV Analizi Sonuçları	54
6.5. Propolis Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları	55
6.7. Antiviral Aktivite Testlerinin Sonuçları	55
6.7.1. MTT Yöntemi Sonuçları	55
6.7.2. RT-PCR Yöntemi Sonuçları	59
6.7.3. Plak Azalma Testi Sonuçları	61
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	63
8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	76
9. KAYNAKLAR	78
10. ETİK KURUL ONAYI	93
11. ÖZGEÇMİŞ	96

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Propolis içindeki biyoaktif bileşikler ve biyolojik aktiviteleri	10
Tablo 2.	Pleyte göre kullanılması gereken hücre ve besiyeri miktarı	29
Tablo 3.	HPLC-UV gradient programı	33
Tablo 4.	Toplam fenolik madde tayininde yapılan pipetleme işlemi	34
Tablo 5.	RT-PCR’da kullanılan mastermix kompozisyonu	38
Tablo 6.	RT-PCR’da kullanılan primer ve probler	38
Tablo 7.	TCID ₅₀ testinde 96 kuyucuklu pleytte pozitif ve negatif görülen kuyucuklar	41
Tablo 8.	Propolislerin etanol ekstraktlarının HPLC-UV analizi sonuçları	54
Tablo 9.	Propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları	55
Tablo 10.	Plak azalma testinde kuyucuklarda görülen plak sayıları	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	HSV-1 genom haritası	16
Şekil 2.	Pazar propolis su ekstraktının tripan mavisi sitotoksite testi sonucu	42
Şekil 3.	Pazar propolis etanol ekstraktının tripan mavisi sitotoksite testi sonucu	43
Şekil 4.	Ardahan propolis su ekstraktının tripan mavisi sitotoksite testi sonucu	43
Şekil 5.	Ardahan propolis etanol ekstraktının tripan mavisi sitotoksite testi sonucu	44
Şekil 6.	Uzungöl propolis su ekstraktının tripan mavisi sitotoksiste testi sonucu	44
Şekil 7.	Uzungöl propolis etanol ekstraktının tripan mavisi sitotoksite testi sonucu	45
Şekil 8.	Pazar propolis su ekstraktının MTT testi sonucu	50
Şekil 9.	Pazar propolis etanol ekstraktının MTT testi sonucu	51
Şekil 10.	Ardahan propolis su ekstraktının MTT testi sonucu	51
Şekil 11.	Ardahan propolis etanol ekstraktının MTT testi sonucu	52
Şekil 12.	Uzungöl propolis su ekstraktının MTT testi sonucu	52
Şekil 13.	Uzungöl propolis etanol ekstraktının MTT testi sonucu	53
Şekil 14.	Asiklovirin MTT testi sonucu	53
Şekil 15.	Pazar propolis etanol ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virus içeren hücreler üzerine antiviral etkisi	57
Şekil 16.	Pazar propolis su ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virus içeren hücreler üzerine etkisi	57
Şekil 17.	Ardahan propolis etanol ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virus içeren hücreler üzerine etkisi	58
Şekil 18.	Ardahan propolis su ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virus içeren hücreler üzerine etkisi	58

Şekil	Sayfa
Şekil 19. Uzungöl propolis etanol ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virus içeren hücreler üzerine etkisi	59
Şekil 20. Uzungöl propolis su ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virus içeren hücreler üzerine etkisi	59
Şekil 21. Propolislerin etanol ekstraktlarının RT-PCR sonucu	60
Şekil 22. Propolislerin su ekstraktlarının RT-PCR sonucu	61



RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Brezilya propolislerinin görüntüsü	11
Resim 2. Tzanck yaymasında görülen çok çekirdekli dev hücre	21
Resim 3. Plak testinin görüntüsü	40
Resim 4. HSV-1'in VERO hücrelerinde oluşturduğu plakların mikroskop görüntüsü	41
Resim 5. Ardahan propolis etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının VERO hücrelerine 24 saat muamele edilmesi	46
Resim 6. Ardahan propolis etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının VERO hücrelerine 48 saat muamele edilmesi	47
Resim 7. Pazar propolis etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının VERO hücrelerine 72 saat muamele edilmesi	48
Resim 8. Pazar propolis etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının VERO hücrelerine 96 saat muamele edilmesi	49

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

APEE	Ardahan propolis etanol ekstraktı
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's besiyeri
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
FBS	Fetal bovine serum
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HPLC-UV	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-Ultraviyole
HSV	Herpes simpleks virüs
IL	İnterlökin
MOI	Enfeksiyon çokluğu
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NF-kB	Nükleer faktör-Kappa B
NK	Doğal öldürücü
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
pfu	Plaque forming unit
PPEE	Pazar propolis etanol ekstraktı
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
TCID	Tissue culture infectious dose
TLR	Toll benzeri reseptör
UPEE	Uzungöl propolis etanol ekstraktı
VERO	Afrikan yeşil maymun böbrek hücreleri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

Simgeler

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
#	Sayı
%	Yüzde

Formüller

CO_2	Karbondioksit
Na_2CO_3	Sodyum karbonat



1. ÖZET

Doğu Karadeniz Propolis Örneklerinin Herpes Simpleks Virüs Tip 1 Üzerine Antiviral Etkilerinin Değerlendirilmesi

Propolis arıların bitkilerden topladıkları materyalleri kendi tükürüklerindeki enzimler ile karıştırarak oluşturdukları reçinemi bir maddedir. İnsanlar yüzyıllardan beri propolisi geleneksel tedavi yöntemlerinde hastalıkları iyileştirmek ya da hastalık belirtilerini hafifletmek amacıyla kullanmaktadır.

Herpes Simpleks Virüs Tip 1 (HSV-1) oldukça bulaşıcı, dünyada yaygın ve endemik olan bir virüstür. Çoğu HSV-1 enfeksiyonu çocukluk döneminde kazanılır ve ömür boyu kalıcıdır. HSV-1 enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan ilaçlar tekrarlayan enfeksiyonda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle virüs için yeni ilaç ve aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesinden elde edilen üç farklı propolis örneğinin (Pazar, Ardahan ve Uzungöl propolisleri) HSV-1 üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Propolislerin etanol ve su ekstraktları hazırlanarak toplam fenolik madde miktarları belirlenmiş, fenolik bileşenleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiştir. Pazar, Ardahan ve Uzungöl propolislerinin etanol ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 44.188, 124.682, 166.908 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g propolis, su ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 5.868, 6.078, 20.474 mg GAE/g liyofilize örnek olarak hesaplanmıştır. HPLC analizinde tespit edilen bileşenlerin en fazla Ardahan propolisinin etanol ekstraktında mevcut olduğu görülmüştür.

Ekstraktların Afrikan yeşil maymun böbrek hücreleri (VERO) hücrelerine sitotoksik olmayan konsantrasyonları belirlenerek antiviral aktivite testlerinde bu konsantrasyonlar kullanılmıştır. Ekstraktların antiviral etkileri 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve plak azalma testi ile araştırılmıştır. MTT testinde Ardahan ve Uzungöl propolislerinin etanol ekstraktlarının 50 µg/mL'deki etkileri, RT-PCR testinde tüm propolislerin etanol ekstraktlarının 100 µg/mL'deki etkileri, plak azalma testinde Ardahan propolisinin etanol ekstraktının 50 ve 100 µg/mL'deki etkisi ile Uzungöl propolisinin etanol ekstraktının 100 µg/mL'deki etkisi istatistiksel olarak

anlamalı bulunmuştur ($p<0.05$).Propolislerin su ekstraktlarının HSV-1 üzerine etkisi görülmemiştir. Elde edilen sonuçlar Ardahan ve Uzungöl propolislerinin HSV-1 tedavisinde kullanılabilecek birer aday olduklarını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: HPLC, HSV, MTT, propolis, RT-PCR



2. SUMMARY

Determination of Antiviral Effects of Some Eastern Black Sea Propolis Samples Against Herpes Simplex Virus Type 1

Propolis is a resinous substance in which the materials that the bees gather from the plants mix with the enzymes in their own saliva. In traditional medicine people have been using propolis for centuries to treat diseases or alleviate symptoms.

HSV-1 is a highly contagious, widespread and endemic virus in the world. Most HSV-1 infections are acquired during childhood and are persistent for life. Medications used in the treatment of HSV-1 infection are insufficient for recurrent infections. Therefore it continues to develop new drugs and vaccines to treat the HSV-1 infections.

In this study, it was aimed to investigate the effect of three different propolis samples obtained from Eastern Black Sea Region (Pazar, Ardahan and Uzungöl propolis) on HSV-1. Ethanol and water extracts of propolis were prepared and the total amount of phenolic substances was determined. The phenolic components were analyzed by HPLC. The total amount of phenolic substances in the ethanol extracts of Pazar, Ardahan and Uzungöl propolis extracts was calculated as 44.188, 124.682, 166.908 mg GAE/g propolis, total phenolic substance amounts in water extracts were 5.868, 6.078, 20.474 mg GAE/g lyophilized samples, respectively. The components found in HPLC analysis were found to be present the most in Ardahan propolis ethanol extract.

Non-cytotoxic concentrations of extracts were determined in VERO cells and these concentrations were used in antiviral activity assays. The antiviral effects of the extracts were investigated by MTT, RT-PCR and plaque reduction test. The effects of ethanol extract of Ardahan and Uzungöl propolis at 50 µg/mL in MTT, the effects of ethanol extract of all propolis at 100 µg/mL in RT-PCR, the effects of ethanol extract of Ardahan propolis at 50 and 100 µg/L and ethanol extract of Uzungöl propolis at 100 µg/mL in plaque reduction assay were found statistically significant ($p < 0.05$). The effect of water extracts on HSV-1 was not observed. The results show that Ardahan and Uzungöl propolis are candidates for HSV-1 treatment.

Key Words: HPLC, HSV, MTT, propolis, RT-PCR

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Arılar bitkilerden bal ve arı poleni dışında, bitki reçinelerini kullanarak propolis adı verilen bir madde üretirler. Topladıkları reçineyi polen ve balmumu ile karıştırarak propolisi oluştururlar ve bu maddeyi inşaat malzemesi (kovanın iç yüzeyinin düzleştirilmesi, bal peteklerindeki deliklerin mühürlenmesi), savunma (kovana yabancı böceklerin girmesinin engellenmesi) ve kovayı koruma (izinsiz giren ve ölen böceklerin çürümesinin engellenmesi) amacıyla kullanırlar. Propolis aynı zamanda antiseptik ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı koloniyi hastalıklara karşı korur (1).

Yüzyıllardan beri propolis geleneksel tıpta tedavi amaçlı kullanılmakla birlikte, son yıllarda dünya genelinde propolise olan ilgi artmış, propolisin kimyasal kompozisyonu ve biyolojik özellikleri ile ilgili çalışmalar yapılarak propolisin antimikrobiyal, anti-enflamatuar, anti-tümöral, immünomodülatör ve antioksidan aktiviteleri olduğu açık şekilde ortaya koyulmuştur (2).

Herpesviridae ailesi memeli, kuş, sürüngen, amfibi, balık ve çift kabuklu yumuşakçaları enfekte edebilen yaklaşık 90 adet tür içermektedir. İnsan herpes virüsleri çeşitli özelliklerine göre dokuz tipe ayrılmaktadır: Herpes Simpleks Virüs Tip 1 ve 2 (HSV-1 ve HSV-2), Varicella Zoster Virüs (VZV), Epstein-Barr Virüs (EBV), Sitomegalovirüs (CMV), Human Herpes Virüs 6 (HHV-6), Human Herpes Virüs 6 (HHV-7) ve Human Herpes Virüs 8 (HHV-8) (3).

HSV-1 oldukça bulaşıcı, dünyada yaygın ve endemik olan bir virüstür. Çoğu HSV-1 enfeksiyonu çocukluk döneminde kazanılır ve ömür boyu kalıcıdır. HSV-1 enfeksiyonlarının büyük bir kısmı oral herpestir. Oral herpes enfeksiyonu çoğunlukla asemptomatiktir ve HSV-1 ile enfekte olan kişilerin çoğu enfekte olduklarının farkında değildir (4). HSV-1 oral herpes dışında genital herpes, eritema multiforme, herpetik dolama, egzema herpetikum gibi enfeksiyonlara da neden olabilir (5).

Dünyada 50 yaş altındaki 3.7 milyar kişide veya popülasyonun ~%67'sinde HSV-1 enfeksiyonu olduğu tahmin edilmektedir. Aynı zamanda HSV-1 enfeksiyon prevalansının en yüksek Afrika'da (~%87), en düşük Amerika'da (%40-50) olduğu düşünülmektedir (4).

HSV-1 enfeksiyonu yaralar, tükürük ve ağızın içinde veya çevresindeki yüzeyde bulunan HSV-1 virüsü ile direkt temas etmekle bulaşmaktadır. Görüntünün normal

olduğu ve belirti bulunmadığı zamanlarda bile HSV-1 oral veya cilt yüzeyinden bulaşabilmektedir. Bununla birlikte bulaşma riskinin bulunduğu asıl zaman ortamda aktif yaraların bulunduğu zamandır. Çok nadir de olsa genital HSV-1 enfeksiyonu doğum esnasında anneden bebeğe bulaşabilmektedir (4, 5).

Asiklovir, famsiklovir, valasiklovir gibi çeşitli antiviral ilaçlar HSV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilaçlar belirtilerin şiddetini azaltmakta ve primer enfeksiyonda etki göstermektedir fakat tekrarlayan enfeksiyonlarda yetersiz kalmaktadır (2, 3). İlacın uzayan kullanımı dirençli virus suşlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu sonuçlar bilim insanlarını herpes virüsler için yeni ilaç ve yeni ilaç hedefleri bulunması için arayışa sürüklemektedir (6).

Bazı ülkelerde bulunan propolis türlerinin HSV üzerine antiviral etkisinin araştırıldığı az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda Hatay propolisi, Kanada propolisi ve Brezilya propolisinin HSV üzerine etkinliği araştırılmıştır, ancak Karadeniz Bölgesinde bulunan propolislerin virüs üzerine etkinliğini gösteren mevcut bir çalışmaya rastlanmamıştır (7-10). Bu çalışmada, Doğu Karadeniz propolis örneklerinin su ve etanol ekstraktlarının HSV-1 üzerine in vitro etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Propolis

Propolis, bal arıları tarafından kovanlarında oluşan çatlakları ve delikleri kapatmak için bir nevi çimento olarak kullanılan maddedir. Normal şartlarda propolis yumuşak, esnek ve oldukça yapışkan bir madde iken dondurulduğunda sert ve kırılgan hale gelir. Bazı propolisler 60-70°C’de sıvı hale geçerken bazı propolis örnekleri sıvı hale gelmek için daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyar (11). Arıların propolisi hangi bitkilerden ya da bitkinin hangi bölümlerinden topladığı merak konusu olarak araştırılmış ve kavak, söğüt, huş, karaağaç, kızılğış, kayın, atkeşanesi ve çam ağaç türlerinin propolis için en iyi kaynaklar olduğu belirlenmiştir. Propolisin rengi toplandığı bitkilere bağılı olarak yeşilden kahverengi ve kırmızıya kadar değışkenlik gösterir. Bir arı kolonisi yılda ortalama 150-200 g propolis üretir. Bununla birlikte bu üretim miktarı arı türüne bağılı olarak değışkenlik gösterir (12).

Propolis bal arıları tarafından kovanlarını korumak (boşlukların doldurulması, kovanın çatlamasının engellenmesi, kovanın iç yüzeyinin pürüzsüz hale getirilmesi) için ürettikleri bir madde olarak düşünülmesine rağmen, propolis larva ve bal peteklerini mikrobiyal enfeksiyonlara karşı koruyucu antiseptik özelliğinin de olduğu anlaşılmıştır. Kovan içini kaplayan propolis sayesinde, birbiri ile sıkı temas halinde bulunan bal arılarının taşıdıkları enfeksiyonun kovan içerisinde yayılımı engellenir. Aynı zamanda kovanın içini ince bir tabaka halinde kuşatan propolis, kovanın nem ve hava akımı dengesinin sağlanmasında da etkin rol oynar (12).

4.1.1. Tarihçe

Propolis yeni keşfedilmiş bir madde değildir ve arının evcilleştirilmesinden bu yana, yaklaşık M.Ö. 300 tarihinden itibaren, insanlar tarafından kendi yararları için kullanılmaktadır (13). Propolis kelimesi Antik Yunancada bulunan “*πρόπολις*” kelimesinden köken alır, “pro” kelimesi “girişinde” ve “polis” kelimesi “şehir” anlamına gelir (12, 14). Eski Mısırlıların propolis üreten arıları vazolar ve diğerk aksesuarların üzerine tasvir ettikleri ve propolisi birçok hastalığı hafifletmek, hatta ölüleri mumyalamak için kullandıkları bilinmektedir (15). Eski Yahudiler tzori’yi (“propolis” kelimesinin İbranice karşılığı) ilaç olarak görmüşlerdir. Tzori ve onun tedavi edici özelliklerinden Eski Ahit’te bahsedilmektedir. Eski Ahit’te “Gilead

Balsamı” olarak nitelendirilen maddenin propolis ile aynı madde olduğu, bu balsamın Sheba Kraliçesi tarafından Kral Süleyman’a armağan olarak verildiği belirtilmektedir. Gilead Balsamı, Kudüs’te bulunan Kutsal Tapınak’ta günde iki kere kullanılan tütünün bir bileşeni olarak kullanılmıştır. Bu madde Yahudiler tarafından 1500 yıl boyunca ölü deniz etrafında yetiştirilmiş, aroması ve tıbbi özellikleri nedeni ile ün kazanmıştır (12, 16). Yunanlılar propolisi parfümlerde, yara ve ülserin tedavisinde kullanırken, Romalılar propolisin tümörleri dağıtma, kronik ülseri iyileştirme, kas ağrılarını yatıştırma özelliği olduğunu keşfetmiş ve açık yaralarda iltihap oluşumunda ve apselerin tedavisinde propolisi ilaç olarak kullanmışlardır (12, 17). Arapların ve Perslerin de propolis hakkında geniş bilgi sahibi olduğu ve bu toplumlar tarafından tedavi amaçlı kullanıldığı İbn-i Sina’nın eserlerinden ve Farsça el yazmalarından anlaşılmaktadır (12). İnkaların da propolisi ateş düşürücü ajan olarak kullandıkları görülmektedir (13).

Orta Çağ’da propolisin önemini kaybettiği ve ilaç olarak kullanımının azaldığı bilinmektedir. Bu dönemde oldukça az sayıda el yazmasında propolis ve kullanım alanından bahsedildiği, fakat bu bilgilerin oldukça sığ kaldığı görülmektedir. Bununla birlikte geleneksel tıpta propolisin bitkisel ilaç olarak kullanımı devam etmiştir. Avrupa’da Rönesans ile birlikte eski bilgiler ve ilaçlara olan ilgi artmış ve bu ilgi ile birlikte propolise karşı duyulan merak da artmıştır. On yedinci yüzyılda propolis merhemlerin ana bileşeni olarak İngiltere’de farmakope içerisinde yerini almıştır. On dokuz ve 20. yüzyıllarda kimya alanındaki gelişmelere paralel olarak propolis ile ilgili çalışmalar da artmış, özellikle propolisin kimyasal kompozisyonunu anlamaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (12). Propolis Gürcistan’da geleneksel tıpta bazı hastalıkların tedavisinde, İkinci Dünya Savaşı sırasında (1939-1945) yaraların tedavisinde kullanılmıştır. 1969’da Sovyet Sosyalist Cumhuriyet Birliğinde, propolisin insan ve hayvanların tedavisinde kullanılmasının uygun olduğuna karar verildiği, tüberküloz ve akciğer hastalıklarının tedavisinin yanında iştah açıcı olarak da kullanıldığı görülmektedir (13).

Propolis uzun yıllardan bu zamana popülerliğini kaybetmeden günümüze ulaşabilmiştir. Günümüzde akne karşıtı kremler, yüz ve vücut kremleri, ağız bakımında kullanılan kozmetiklerin yanı sıra, yiyecek ve içeceklerde gıda takviyesi olarak kullanılmaya devam etmektedir (13).

4.1.2. Propolisin Kompozisyonu

Propolis çeşitli bitkilerin farklı kısımlarından toplanarak arıların tükürük enzimleri ile işlenerek ortaya çıkan bir maddedir (14). Farklı coğrafik bölgelerden toplanan çok sayıdaki propolis üzerinde yapılan analizler, propolisin toplandığı yerin çevresel koşulları, bitki örtüsü, toplandığı mevsim ve arı türüne bağlı olarak kimyasal kompozisyonunun değişiklik gösterdiğini, bu yüzden standardize edilmesinin oldukça zor olduğunu ortaya koymuştur. Marcuci ve ark.'larının yaptıkları çalışmalarda propolisin içerisinde 300'den fazla madde olduğu ortaya koyulmasına rağmen, son çalışmalarda propolisin yapısında fenil propanoik asit türevi parçası içeren özgün pinokembrin/pinobanksin türevleri, yaygın kavak flavonoidlerinin metillenmiş, esterlenmiş veya hidroksillenmiş türevleri gibi propolisin içerisinde daha önce bahsedilmeyen başka maddelerin de olduğu ortaya koyulmuştur (13, 14, 18).

Propolis arılar tarafından üretilen en önemli maddelerden biridir. Reçine (%50), bal mumu (%30), esansiyel yağlar (%10), polen (%5) ve diğer organik bileşiklerden (%5) oluşur (19, 20). Fenolik bileşikler, esterler, flavonoidler, terpenler, beta-steroidler, aromatik aldehytler ve alkoller propoliste bulunan önemli organik bileşenlerdir (21). Ayrıca pinokembrin, akasetin, krisin, rutin, uteolin, kaemferol, apigenin, mirisetin, kateşin, naringenin, galangin ve kuersetin adı verilen 12 farklı flavonoid, çeşitli asitler; kafeik asit, sinamik asit, p-kumarik asit, çikoric asit, fulrik asit, resveratrol adı verilen bir stilben türevi de propolislerin içerisinde tespit edilmiştir (14, 22). Bunlardan başka B1, B2, B6, C ve E vitaminlerini, magnezyum, kalsiyum, potasyum, sodyum, bakır, çinko, manganez ve demir minerallerini içermektedir. Süksinik dehidrojenaz, glukoz-6-fosfataz, adenosin trifosfat ve asit fosfataz gibi az sayıda enzim de propolis içerisinde bulunmaktadır (19).

Polifenoller ve vitaminler gibi esansiyel ve esansiyel olmayan bileşenler propolisin içerisinde doğal olarak bulunmakta ve biyoaktif olarak tanımlanmaktadır. Propolis sağlık için faydalı olma özelliğini bu bileşenlerden almaktadır. Fenolik bileşikler propolisin içinde genellikle flavonoidler şeklinde varlığını göstermektedir. Propolis antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, anti-enflamatuar, antifungal ve yara iyileştirme özelliğini bu fenolik bileşenler sayesinde ortaya koymaktadır (19).

Ilıman bölgelerden elde edilen propolisler *Populus* spp. türünün tomurcuklarından elde edildiği için genel olarak kavak türü propolis olarak adlandırılırlar. Bu propolislerin biyolojik aktiviteyi sağlayan ana bileşenleri flavonoidler, fenolik asitler ve esterleridir. *Betula verrucosa* Ehrh. türünden köken alan huş propolisi Rusya'da bulunup kavak propolisinden farklı flavon ve flavonoller içerirken, *Cupressus sempervirens* türünden üretilen Adeniz propolisi Akdeniz ikliminin görüldüğü yerlerde bulunup yüksek miktarda diterpenler içerir. Tropikal alanlarda ise çok farklı tipte propolislere rastlanmaktadır. Brezilya'da farklı türlerden köken alan 13 farklı tipte propolis bulunmaktadır. Bunların arasında *Baccharis dracunculifolia* türünden köken alan yeşil propolis (Resim 1), *Dalbergia ecastaphyllum* türünden köken alan kırmızı propolis (Resim 1) ve *Hyptis divaricata* türünden köken alan kahverengi propolisler bulunmaktadır. Yeşil propolis fenilpropanoid türevleri ve diterpenler bakımından zenginken kırmızı propolis oldukça fazla sayıda flavonoid içermektedir. Bunların dışında *Clusia* sp. çiçeklerinden üretilen tropikal propolise Küba ve Venezuela'da rastlanırken, tropik bir ağaç olan *Macaranga tanarius* türünden üretilen pasifik propolisi Pasifik Okyanusu'nun tropikal adalarında görülmektedir (23).

Biyoaktif bileşiklerce zengin fakat balmumu bakımından fakir bir propolis ekstraktı hazırlamak için kullanılan en iyi çözücü etanoldür. Bileşenlerden çok az bir kısmı suda çözünmesine rağmen su ile hazırlanan propolis ekstraktlarının bakterisidal ve fungisidal etkisinin yanında, yara iyileştirme özelliğine sahip olduğu da gösterilmiştir. Propolis ekstraktı hazırlarken çözücü seçimi daha çok ekstraktın hangi amaçla kullanılacağı ile ilişkilidir. İlaç ve yemek sanayisinde çözücü olarak etanol ve su tercih edilirken kozmetik sanayisinde su bazlı emülsiyonlarda çözünmeyi arttırmak için glikol ekstraktları tercih edilmektedir (24).

Tablo 1. Propolis içindeki biyoaktif bileşikler ve biyolojik aktiviteleri (Pasupuleti'den, 19)

Biyoaktif Bileşik	Biyolojik Aktivite
Fenolik Bileşen: 2,2-dimetil-8-prenilkromen	Antimikrobiyal
Fenolik Bileşen: 4-hidroksi-3,5-diprenil sinamik asit (artepilin C)	Antimikrobiyal, anti-enflamatuar, Anti-kanser
Fenolik Bileşen: 3-prenil sinamik asit alil ester	Antimikrobiyal
Fenolik Bileşen: Kaempferid	Anti-tümör, anti-kanser
Fenolik Bileşen: Propolis benzofuran	Anti-fungal
Terpenoid: İzokupressik asit	Anti-fungal
Terpenoid: 13C- simfiyoretikülük asit	Anti-tümör
Terpenoid: Uzun zincirli yağ asitlerinin esterleri, (3-hidroksistearik asit (n = 11) prokrım a; 3-hidroksistearik asit (n = 13), prokrım b ve bir pentasiklik triterpenoid (lupeol))	Antioksidan, antimikrobiyal, anti-tümör
Terpenoid: Farnesol	Anti-fungal
Flavonoid: Apigenin	Antibakteriyel, anti-enflamatuar
Flavonoid: Akasetin	Anti-alerjik, anti-kanser
Flavonoid: Kuersetin	Anti-kanser, anti-alerjik, antibakteriyel, anti-enflamatuar
Flavonoid: Galangin	Anti-kanser, antioksidan
Flavonoid: Pinocembrin	Antimikrobiyal, anti-kanser
Flavonoid: Krisin	Antibakteriyel, anti-enflamatuar, anti-kanser
Flavonoid: Fisetin	Antibakteriyel, anti-alerjik, anti-kanser
Flavonoid: Kafeik asit fenetil ester (CAPE)	Anti-tümör, anti-kanser
10-hidroksil-2-dekonoik asit	Antibiyotik, anti-tümör



Resim 1. Brezilya propolislerinin görüntüsü. A; Brezilya kırmızı propolis. B; Brezilya yeşil propolis (Santos'tan, 25)

4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri

Kaynağı, toplandığı mevsim, toplandığı yerin florası, arı türüne bağlı olarak propolisin özellikleri değişiklik gösterdiğinden tek bir tip propolis değil de binlerce tip propolis olduğu ve hepsinin birbirinden farklı işlevlere sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar dışında toplandıktan sonra propolise yapılan muamele ve propolis ekstraktlarının hazırlandığı çözücülere bağlı olarak da biyolojik olarak aktif bileşenlerin aktivitesi de değişmektedir. Belirtilen tüm şartlara bağlı olmakla birlikte propolis hücresel ve moleküler düzeyde birçok aktiviteye sahiptir (14).

İnsanlara veya hayvanlara uygulandığında propolisin belirgin bir yan etkisinin olmadığı, propolis ile muamele edilen sıçanların serumlarındaki enzim aktiviteleri (laktat dehidrojenaz ve aspartat aminotransferaz) ve lipid seviyelerinde (kolesterol, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol, trigliseritler ve toplam lipid) kontrol grubuna göre değişiklik görülmediği ortaya koyulmuştur (26). Hücre kültüründe V79 hücreleri, Wistar sıçanı kemik iliği hücreleri ve Çin hamsteri yumurtalık hücrelerine propolis uygulandığında genotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (24, 27, 28). Propolisin koruyucu etkisinin olduğu da bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda diatrizoatın neden olduğu toksik etkiden böbrekleri, fibrozisin patogenezinin karaciğeri, anti-kanser özelliğini kaybettirmeden doksorubisinin neden olduğu toksisiteden testisleri koruduğu ortaya koyulmuştur (29-31). Bununla birlikte oldukça az sayıdaki çalışmada propolis alerjisi gösterilmiş, özellikle arıcılarda ve uzun süre propolise maruz kalan kişilerde bu durumun görüldüğü belirtilmiştir (24).

4.1.3.1. Başışıklık Sisteminin Düzenlenmesi

Hayvanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda propolisin sulu ve etanolik ekstraktlarının başışıklık sistemi üzerine etkileri araştırılmaya devam etmektedir. Hırvatistan propolisinin sulu ekstraktının makrofajların anti-tümöral aktivitesini düzenlediğı ve lenfosit aktivasyon faktörlerini arttırdığı, Brezilya propolisinin etanolik ekstraktının lenfomaya karşı doğal öldürücü (NK) hücrelerinin aktivitesini yükselttiğı, Brezilya yeşil propolisinin toll benzeri reseptör (TLR)-2 ve TLR-4 ekspresyonu ve interlökin (IL)-1 β üretimini yükselttiğı gösterilmiştir (32-34). Brezilya propolisinin makrofajların *Leishmania braziliensis*'i öldürme kapasitesini düzenlediğı ve farelerde tümör nekrozis faktör (TNF) α üretimini arttırdığı tespit edilmiştir (35). Propolisin ve CAPE ve kuersetin gibi bazı fenolik bileşenlerinin farelerin akciğerlerindeki tümör nodüllerinin sayısını azalttığı, bununla birlikte propolisin antimetastatik aktivitesinin fenolik bileşenlerinden daha fazla olduğı belirlenmiştir (24). Propolisteki fenolik bileşiklerin sinerjistik etkisinin bu sonucu ortaya çıkardığı düşünölmüştür (36). Hücre költüründe yapılan bir çalışmada Brezilya propolisinin Nökleer Faktör-Kappa B (NF- κ B) aktivasyonu yolağıyla sitokin ve kemokin ekspresyonunu indüklediğı görölmüştür (37).

Propolisin insanlardaki başışıklık sistemi üzerine farklı etkilerinin olduğı gözlenmiştir (38). Yüksek dozdaki sinamik asitin TNF- α ve IL-10 üretimini inhibe ettiğı görölürken, aynı dozdaki sinamik asitin monositlerin fungisidal aktivitesini arttırdığı görölmüştür (39).

Farklı deney modelleri ve antiijenler kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalarda propolisin ve bileşenlerinin antikör üretimini arttığı gösterilmiştir. Bu veriler propolisin aşılarda adjuvan olarak kullanılabılme kapasitesinin olduğunu düşöndürmektedir (24).

4.1.3.2. Antimikrobiyal Aktivite

Propolisin antimikrobiyal özelliğı yaygın bir şekilde araştırılmış ve çalışmalar sonunda antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğı ortaya koyulmuştur. Kenya, Brezilya ve Kanada propolislerinin kullanıldığı farklı çalışmalarda propolisin farklı bakteri türleri (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus sp.*) üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğı gösterilmiştir (40, 41). Doğı Avustralya'da üretilen propolisin güçlü anti-stafilokok

etkisi olduğu, bununla birlikte Gram negatif bakterilere karşı düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir (42). Propolisin Gram pozitif bakterilere karşı Gram negatif bakterilerden daha etkili olduğu görülmüş, bu durumun Gram negatif bakterilerdeki dış zardan veya bakterilerin salgıladığı hidrolitik enzimlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (24).

Propolisin aynı zamanda anti-fungal özelliğe sahip olduğu, Brezilya propolis ekstraktının 20 µg/mL konsantrasyonda *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* ve *Candida albicans* türlerinde hücre ölümünü indüklediği, hastaların vajinal sürüntü örneklerinden izole edilen farklı maya türlerinde üremeyi baskıladığı tespit edilmiştir (43, 44). Propolisin aflatoksijenik mantarları baskıladığı, *Aspergillus flavus* izolatlarında konidyumların oluşumunu azalttığı da belirlenmiştir (45). Fransa propolisinin de *C. albicans* ve *C. glabrata* türlerine karşı anti-fungal aktivitesi olduğu ortaya koyulmuştur (46).

Propolisin anti-parazitik aktivitesi de araştırılmış, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani* ve *Leishmania amazonensis* türlerine karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (47-49).

Propolisin antiviral aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Brezilya propolisinin HSV-2, influenza virüsü ve Newcastle hastalığı virüsü'ne karşı etkili olduğu gösterilmiştir (50-52). Ticari olarak üretilen propolis ürünlerinin HSV-1 ve HSV-2'ye karşı antiviral aktivitelerinin olduğu, Dang hemorajik ateşi virüsü enfeksiyonunda kullanıldığında hastanede yatış süresini kısalttığı belirlenmiştir (53, 54).

4.1.3.3. Anti-Tümöral Aktivite

Propolisin anti-tümöral aktivitesi ve sitotoksik etkisi araştırılmış ve propolisin tümör hücrelerine karşı apoptozisi indüklemeye, hücre döngüsünün durdurulması, matriks metalloproteinazların inhibisyonu, anti-anjiyogenez etkisi ve metastazın engellenmesi gibi aktivitelerinin olduğu ortaya koyulmuştur (55-58).

Tayland'ın Phayao şehrinden elde edilen propolisin antiproliferatif etkisi olduğu, Türkiye'de yapılan bir çalışmada kullanılan propolisin hepatoselüler karsinom (HepG2), kolon adenokarsinoması (WiDr), insan servikal kanser hücre hattı (HeLa), meme adenokarsinoması (MCF-7) ve prostat adenokarsinoması (PC3) hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesinin olduğu, Polonya propolisinin malign melanom hücreleri (Me 45) ve kolorektal kanser (HCT 116) hücrelerinde proliferasyonu engellediği gösterilmiştir

(59-61). İran propolisinin insan gastrik kanser hücre hatlarında sitotoksik ve anti-proliferatif etkisinin olduğu, Brezilya propolisinin ise kolon kanserine karşı koruyucu etkisinin olduğu hayvan deneylerinde tespit edilmiştir (62, 63).

4.1.3.4. Anti-Enflamatuar Aktivite

Propolis ve kafeik asitin Raw 264.7 makrofajlarda nitrik oksit (NO) üretimini engellediği, p38 mitojen-aktif protein kinaz (MAPK), JNK1/2 ve NF-kB yollarını baskıladığı; artemisin C'nin aynı hücrelerde oksijen ve nitrojen reaktif ürünlerinin ve sitokinlerin üretimini engellediği, NF-kB üretimini bloke ettiği gösterilmiştir (64, 65).

Yeşil propolis prostaglandin sentezini inhibe eder, timüs bezlerini aktive eder, fagositik aktiviteyi artırarak bağışıklık sistemine yardım eder, hücresel bağışıklığı stimüle eder ve epitel dokunun iyileşmesini hızlandırır. Yeşil propolisin içindeki prenil flavonoidler ve sinamik asit, siklooksijenaz ve lipooksijenaza karşı inhibitör etki göstererek propolise anti-enflamatuar özellik kazandırır. Bunlar dışında CAPE de araşidonik asitin hücre zarından salınımını inhibe ederek anti-enflamatuar özellik gösterir (66).

Konsantrasyon, alım süresi ve deney koşullarına bağlı olarak propolis pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar aktivite gösterebilir. Bu durumda propolisten inhibitör veya stimülatör etki göstermesi beklenebilir. Propolisin etkinliği ile ilgili klinik olarak çok az veri mevcuttur (24).

4.2. Herpes Simpleks Virüs

Herpes virüsler Herpesviridae ailesinde yer alan, insan ve hayvanları enfekte eden 100'ün üzerinde türü tanımlanmış virüslerdir. Üç alt aileye ayrılır; Alfaherpesvirinae, Betaherpesvirinae ve Gamaherpesvirinae. İnsanlarda hastalık yapan sekiz türü tanımlanmıştır. Bunlardan HSV-1, HSV-2, ve VZV Alfaherpesvirinae alt ailesinde, CMV, HHV-6 ve HHV-7 Betaherpesvirinae alt ailesinde, EBV ve HHV-8 Gamaherpesvirinae alt ailesinde yer alır (67).

4.2.1. Tarihçe

Herpes virüs enfeksiyonlarının varlığı antik Yunan dönemlerine kadar dayanmaktadır. HSV lezyonlarının kutanöz yayılımını tanımlayan kişi Hipokrat olarak bilinir. Herpetik deri lezyonlarının yayılımına atıfta bulunarak “sürünmek” veya

“emeklemek” anlamına gelen “herpes” yunanca kelimesi ile bu hastalığı isimlendirmişlerdir. Bununla birlikte HSV enfeksiyonun bir bireyden diğerine bulaşabileceği ancak 1893’te Vidal tarafından farkedildi. Yirminci yüzyılda HSV ile ilgili çalışmalar hız kazandı. 1919’da Lowenstein HSV’nin bulaşıcı olduğunu doğruladı. 1920 ve 1930’larda HSV’nin sadece deriyi değil merkezi sinir sistemini de enfekte edebildiği gösterildi. 1930’larda HSV’ye karşı oluşan konak bağışık yanıtın incelenmesi sonucunda HSV’nin latent kalabilme özelliği tespit edildi. Sonraki zamanlarda yapılan çalışmalar ise antiviral ve aşı geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır (68).

4.2.2. Virüsün Yapısı

HSV viryonu 186 nm çapındadır, zarftaki glikoprotein çıkıntıları ile boyutu 225 nm’ye ulaşır (69). Viryon dört tabakalı bir yapıya sahiptir. Bu yapılar içten dışa doğru çekirdek, kapsid, tegüment ve zarftır. Çekirdek çift iplikli deoksiribonükleik asit (dsDNA) genomunu içerir. İkozahedral yapıdaki kapsid 100 nm boyutundadır ve 162 kapsomerden oluşur. Kapsid, tegüment adı verilen amorf bir protein tabakası ile çevrelenmiştir (70, 71). Tegüment kapsidin çekirdeğe transferi ve diğer organellerle işbirliğinde görev alan (UL36, UL37, ICP0), viral DNA’nın çekirdeğe girmesinde rol alan (VP1-2, UL36), erken genlerin transkripsiyonunda rol alan (VP16), hücresel protein biyosentezinin baskılanması ve mRNA bozulmasında görev alan (VHS, UL41) 26 protein içerir. Zarf ise 11 glikoprotein (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM) ve iki glikozillenmemiş protein (UL20 ve US9) içeren çift tabakalı lipidden oluşur (69).

4.2.3. Viral Genomun Yapısı

Viral nükleokapsid lineer dsDNA’dan bir kopya içerir. Genom açık okuma bölgelerinin (ORFs) büyük çoğunluğunu içeren uzun benzersiz bölgeleri bölen veya çevreleyen tekrarlayan bölgelere sahiptir. Bu tekrarlayan bölgeler birbirine göre ters dönebilir ve böylece konformasyonel izomerlerin oluşmasına yol açar. 152 kbp uzunluğunda olan HSV-1 genomu benzersiz uzun (U_L) ve benzersiz kısa (U_S) olmak üzere iki benzersiz bölgeye sahiptir. L ve S bölgelerinin arasında ve sonlarında *a*, *b* ve *c* adı verilen tekrarlı diziler bulunur (72, 73). DNA replikasyonu esnasında U_L ve U_S segmentleri yüksek bir hızda ters dönerek dört genom izomerinin oluşmasına neden olurlar. Bu dört izomerin HSV-1 popülasyonunda oluşma sıklığı birbirine eşittir. Genom 90 civarında protein kodlar. Protein kodlayan genlerin çoğu U_L ve U_S

[illegible]

4.2.4. Viral Yaşam Döngüsü

Glikoprotein C ve B'nin hücre yüzeyindeki glikozaminoglikanları, özellikle heparan sülfat ile etkileşime girmesi ile virüs hücreye tutunur. Virüs hücreye tutunduktan sonra viral zarf ile plazma zarı birleşir ve tegüment ile kaplı viral kapsid çekirdeğe taşınır. Yapılan çalışmalar kapsidin çekirdeğe mikrotübüller aracılığı ile taşındığını göstermiştir. Tegümentte mikrotübüllerle ilişkili motor proteinlere bağlanmayı sağlayan US3, UL36, UL37, ICP0, UL14, UL16 ve UL21 proteinleri bulunur. Eğer kapsidin etrafında tegüment yoksa ya da var olan tegümentte bu proteinler bulunmuyorsa kapsid motor proteinlere bağlanamaz (69). Kapsid çekirdek zarına ulaştığında UL36 tegüment proteininin sinyali ile Nup358 ve Nup214 nükleoporinleri kapside direkt ve indirekt olarak bağlanır (76). Bu etkileşim viral DNA'nın importin β aracılı yolla çekirdeğe girebilmesi için gereklidir (77). Viral genomun transkripsiyonu ve replikasyonu çekirdekte gerçekleşir (69).

Viral mRNA konak hücrenin RNA-polimeraz II enzimi ile sentezlenir. Viral proteinler ardışık transkripsiyonel kaskadları (α , β ve γ genleri) ve bir dizi posttranslasyonel modifikasyonları düzenler. α genlerinden kodlanan proteinlerin fonksiyonu β genlerini aktive etmektir. β genlerinden kodlanan proteinler ve enzimler viral genomun replikasyonunda, nükleotid metabolizmasının düzenlenmesinde, erken α genlerinin baskılanmasında ve geç γ genlerinin aktive edilmesinde görevlidir. α genlerinin ekspresyonunun regülasyonunun aksine, β ve γ genlerinin ekspresyonu daha farklı olduğu için bu genlerin ekspresyonunun başlaması, süresi ve ekspresyon seviyesi birbiri ile çakışmamaktadır (69).

Viral DNA replikasyonunun başlaması ile geç γ genlerinin ekspresyonu, özellikle kapsid proteinlerinin miktarı artar ve öncü viryonlar meydana getirilir. Kapsid oluşumu ve viral genom paketlenmesi çekirdekte gerçekleşir. Kapsid nükleer por aracılığıyla veya çekirdekten tomurcuklanarak çekirdekten ayrılır (69). UL36 ve UL37 proteinleri ile kapsid sitoplazmaya transfer edilir (78). Viryon sitoplazmada olgunlaşır ve dış tabaka meydana gelir. Viryon ekzositoz ile hücreden salınırken zarf tabakasının oluşumu da sağlanır (69).

Litik enfeksiyon dışında HSV-1 hücrede latent enfeksiyon da oluşturabilir. HSV-1 sinir hücrelerine giderek bu hücrelerin çekirdeklerine yerleşir. Viral DNA sirküler formda kalır, litik genler eksprese edilmez, latentle ilişkili transkriptler (LATs) sentezlenir ve bir kısım mRNA'lar oluşturulur. HSV-1'in latent enfeksiyon oluşturmada, reaktif olması ve tekrarlayan hastalık meydana getirmesinde rol oynayan mekanizmalar incelenmeye devam etmektedir (69).

4.2.5. Epidemiyoloji ve Bulaş

Enfeksiyon oluşturabilmek için HSV'nin deri ile temas etmesi gerekir. HSV'nin bireyde meydana getirdiği enfeksiyon bireyin bağışıklık sistemine bağlı olarak değişiklik gösterir. Virüs dünya genelinde görülür, mevsimsel dağılım göstermez ve sadece insanları enfekte eder (79). HSV-1 latent enfeksiyon oluşturabildiği için enfekte kişi ömür boyu bulaş kaynağıdır (80). Herpetik lezyonlar veya oral sekresyonlar ile temas HSV-1 enfeksiyonuna neden olabilir. Lezyon varlığında viral yük 100 ile 1000 kat fazla olduğundan semptomatik hastalardan bulaşma riski daha fazladır. Primer enfeksiyonu takiben HSV bazen dışkıdan da geri kazanılabilir (81). Glokomlu HSV-1

negatif olan bir hastaya kornea transplantasyonu sonucu oküler HSV-1 aktarıldığı da gösterilmiştir (82). Oral-genital temas yolu ile HSV-1 iletimi de genital HSV-1 enfeksiyonuna neden olmaktadır (83, 84).

HSV-1 oldukça bulaşıcıdır ve tedavisi henüz bulunamamıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre 50 yaşın altındaki 3.7 milyon kişinin (dünya nüfusunun ~%67'si) HSV-1 ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. HSV-1 de genital herpesin önemli aktörleri arasına girmektedir. Amerika, Avrupa ve Batı Pasifik'te 15-49 yaşlarında 140 milyon kişinin genital HSV-1 enfeksiyonuna sahip olduğu düşünülmektedir. Gelişmiş ülkelerde daha iyi hijyen ve yaşam koşullarından dolayı çocukluk döneminde HSV-1 enfeksiyonunun görülme sıklığı daha düşüktür. Bununla birlikte cinsel olarak aktif döneme girdiklerinde enfeksiyona yakalanma oranları artmaktadır. 2012 yılındaki verilere göre 0-49 yaş arasındaki kişilerde HSV-1 prevalansı ABD'de kadınlarda %49, erkeklerde %39, Afrika'da kadınlar ve erkeklerde %87; Doğu Akdeniz'de kadınlar ve erkeklerde %75, Avrupa'da kadınlarda %69, erkeklerde %61; Güneydoğu Asya'da kadınlarda %59, erkeklerde %58, Batı Pasifik'te kadınlarda %74, erkeklerde %73'tür (85).

Primer veya tekrarlayan HSV enfeksiyonunda hücrelerde virüs aracılı hücre ölümü ve ilişkili enflamatuvar yanıt görülür. Viral enfeksiyon esnasında hücre çekirdeklerinde kromatin yoğunlaşarak hücrenin şişmesine neden olur ve bunu nükleer dejenerasyon izler. Plazma zarları kırılarak enfekte olan hücreler çok çekirdekli dev hücreler oluşturur (79).

4.2.6. Klinik Sendromlar

Herpesvirüslerin iki önemli biyolojik özelliği konağın sinir sistemine yerleşip çoğalabilmesi ve latent enfeksiyon oluşturabilmesidir. HSV'nin nörovirulan özelliği virüsün deriden ziyade öncelikle duyuşal sinir sisteminde enfeksiyon oluşturmaya neden olur. HSV genel olarak çevresel sinir sistemini enfekte etmekle birlikte, merkezi sinir sisteminde de litik enfeksiyon oluşturabilir. Primer enfeksiyon esnasında virüs duyuşal gangliyonlar vasıtasıyla trigeminal, servikal ve lumbosakral gangliyonlara taşınarak burada latent enfeksiyon oluşturur. Virüsün latent enfeksiyon oluşturmaya için viral replikasyonun olması gerekli değildir. Bu nedenle semptom yokluğunda da virüs latent enfeksiyon oluşturabilir. Latent haldeki virüs reaktif hale gelerek nöronlarla deri

ve diğer mukozal bölgelere taşınarak tekrarlayan enfeksiyonlara neden olur. Tekrarlayan enfeksiyonlarda lezyon varlığında da, asemptomatik enfeksiyonda da virüs atılımı devam eder ve bu süre zarfında virüs başka bir konağa bulaşabilir (86).

HSV çoğunlukla deri ve müköz membranları enfekte eder. İnkübasyon süresi 2-12 gündür. Primer enfeksiyonda virüs atılımı ortalama 7-10 gün olmakla birlikte 23 güne kadar atılım görülebilir. İntraoral lezyonlar primer enfeksiyonu gösterirken dudaktaki lezyonlar tekrarlayan enfeksiyon anlamına gelir. HSV-1'in deride neden olduğu diğer enfeksiyonlar atopik dermatitli hastalarda egzama herpetikum, güreşçilerde herpes gladiatorium, herpetik dolama, Darier ve Sezary sendromu ile ilişkili geniş lezyonlar ve eritema multiformedir (79, 80).

Gebelikte genital HSV enfeksiyonu ortaya çıktığında gebelik evresine bağlı olarak fetal kayıp, erken doğum ve yeni doğan HSV enfeksiyonuna neden olabilir. Üçüncü trimesterde ya da doğumdan 4-6 hafta sonra riskli dönemdir ve vertikal bulaş oranı %30-50 arasındadır. Eğer doğum esnasında gebede genital lezyonlar varsa sezeryan önerilir, fakat tekrarlayan enfeksiyonda sezeryan önerilmez (87).

Yenidoğanda HSV-1 enfeksiyonu nadir olarak görülür. Anneden bulaş çoğunlukla vajinal doğum ile gerçekleşir. Görülen enfeksiyonların tamamına yakını asemptomatiktir. Yenidoğanda deri, göz ve ağızda lokal enfeksiyon, ensefalit ve dissemine enfeksiyon şeklinde ortaya çıkar (79). Yüksek morbidite ve mortalite görülür (87).

HSV herpetik kerakonjunktivite de neden olabilir. Hastalığın ilerlemesi ile korneada ülserler gelişir. Tekrarlı enfeksiyon yaygındır (79).

HSV ensefaliti sporadik ölümcül ensefalitin en yaygın nedeni olarak düşünülmektedir (79). Herpes simpleks ensefalitinde önemli miktarda mortalite ve nörolojik morbidite görülür (87). Tedavi edilmeyen hastaların %70'i ölümler, hayatta kalan hastaların sadece %2-5'i normal nörolojik işlevlerine geri dönmektedir (79). Bu yüzden mümkün olduğunca erken antiviral tedaviye başlanması gerekir (87).

Tüm bu hastalıkların dışında HSV sinir sisteminin hemen her yerini etkileyerek menenjit, miyelit ve radikülite neden olabilir (79).

Bağıışıklık sistemi baskılanmış olan bireylerde HSV-1 şiddetli primer enfeksiyona ve sıklıkla tekrarlayan enfeksiyonlara neden olur. Bu hastalarda özofagus, gastrointestinal sistem veya solunum yolunu da içeren ilerleyici hastalık gelişebilir (79, 87).

4.2.7. Laboratuvar Tanısı

4.2.7.1. Hücre Kültürü

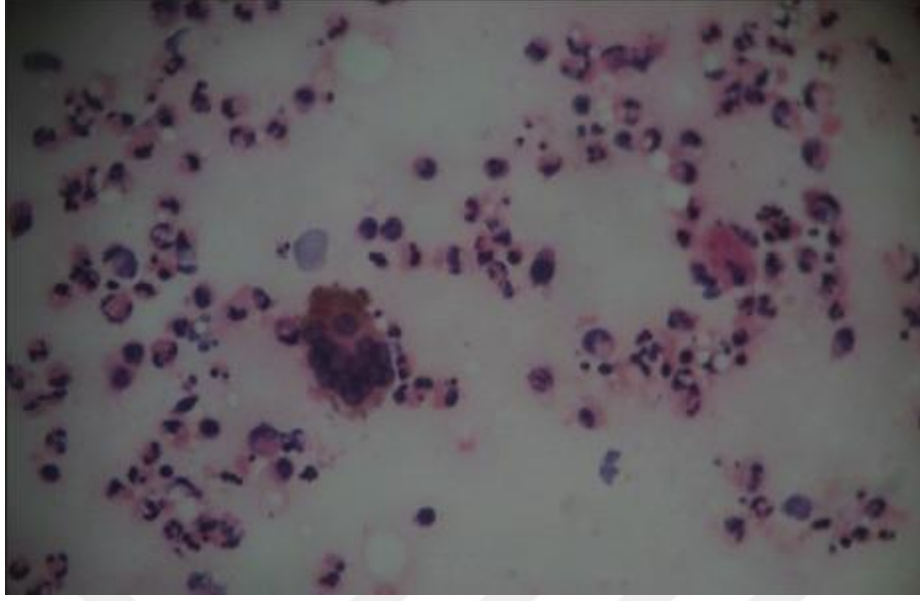
Hücre kültürü HSV-1 tanısında altın standarttır. Testin özgüllüğü %100 iken duyarlılığı örneğin alındığı lezyonun evresine bağlı olarak %50-75 arasında değişir (88). Virüsün üretilebilmesi için örneğin veziküllerden alınmış olması gerekir, kabuklaşmış lezyonlardan virüs üretimi yapılamaz (80). Viral izolasyonun zamanını kısaltmak amacıyla günümüzde laboratuvarlarda tanıda daha çok Shell-vial hücre kültürü tercih edilmektedir. Bu yöntem ile 16-48 saatte sonuç verilebilir. Bu teknik hızlı ve özgül bir yöntem olmakla birlikte geleneksel hücre kültür metoduna göre duyarlılığı daha düşüktür ve daha pahalıdır (88).

4.2.7.2. İmmünofloresan Boyama

Hücre kültürü için laboratuvarda altyapı bulunmadığında veya virüs laboratuvara ulaşana kadar inaktive olduğunda alternatif bir yöntem olarak antijen tespiti kullanılır. Bu yöntemin duyarlılığı hücre kültürü ile aynı veya daha fazladır (88).

4.2.7.3. Tzanck Yayması

Genital enfeksiyonda HSV epitel hücrelerinde sitopatik değişimler meydana getirir. Hücreler genişler, içlerinde inklüzyon cisimleri oluşur, çoğunlukla da çok çekirdekli dev hücreler meydana getirirler (Resim 2). Gelen örnek Wright-Giemsa boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenir. Bu metodun duyarlılığı düşüktür ve HSV-1 ile HSV-2 ayrımı yapılamaz. Alternatif başka bir yöntem bulunmadığında ve hızlı tanı gereken durumda bu yöntem başvurulabilir. Bununla birlikte negatif görülen örneklerin başka bir test ile yeniden çalışılması ve takip edilmesi gerekir (88).



Resim 2. Tzanck yaymasında görülen çok çekirdekli dev hücre (Gupta'dan, 89)

4.2.7.4. Viral DNA Tespiti

Polimeraz zincir reaksiyonundaki (PCR) son gelişmeler, otomatize sistemlerin ve kitlerin geliştirilmesi, HSV'nin rutin tanısında PCR'nin daha çok kullanılmasını sağlamıştır. Bu yöntemin duyarlılığı altın standart olarak kabul edilen hücre kültüründen daha fazladır. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) yönteminin bulunması, kapalı sistemlerde örneğin el değmeden hazırlanması PCR ile yalancı pozitif sonuç verilme olasılığını minimize etmiştir. RT-PCR için gerekli olan ekipmanlar oldukça pahalı olmakla birlikte, çok küçük hacimlerde çalışılması ve kitle çalışıldığında teknik anlamda minimum uzmanlık gerektirmesi bu metodu birçok laboratuvar için maliyet etkin hale getirmektedir (88, 90).

4.2.7.5. Serolojik Yöntemler

HSV tanısında virüs nötralizasyon, kompleman fiksasyon, pasif hemaglütinasyon, ELISA, kompleman aracılı sitoliz, antikor bağımlı hücre ölümü, radyoimmunoassay gibi birçok farklı serolojik yöntem kullanılabilir (91). Serolojik yöntemler ile HSV tanısı sadece primer enfeksiyon ve epidemiyolojik çalışmalar için uygundur (80). HSV'ye özgül antikorlar primer enfeksiyondan sonra birkaç hafta boyunca gelişir ve süresiz olarak kalır. Bu süre zarfında serolojik yöntemler ile antikor tespiti yapılabilir (91). Bununla birlikte tekrarlayan enfeksiyonda antikor titrelerinde her

zaman anlamlı bir yükselme olmadığından tekrarlayan enfeksiyon tanısı için yetersiz kalırlar (80).

4.2.8. Tedavi

HSV için kullanılan antiviral ilaçlar primer ve tekrarlayan enfeksiyonu önler ve hastalığın süresini kısaltır. Bununla birlikte hiçbir ilaç tedavisi latent enfeksiyonu ortadan kaldıramaz (80).

Asiklovir, valasiklovir, pensiklovir, famsiklovir, foskarnet, sidofovir HSV-1'in tedavisinde kullanılan ajanlardır. Asiklovir, valasiklovir, pensiklovir ve famsiklovir guanozin analogu gibi davranarak viral DNA sentezini inhibe eder. Oral, intravenöz veya topikal uygulanabilir. Asiklovir daha çok topikal uygulanırken valasiklovir oral olarak kullanılır. Foskarnet ise pirofosfat analogudur, viral DNA polimerazın pirofosfat bağlanma bölgesini kapatarak etkisini gösterir. Daha çok intravenöz olarak uygulanır. Sidofovir monofosfat nükleotid analogudur, DNA sentezi sırasında zincire eklenerek zincirin uzamasını durdurur. Oral, intravenöz veya intraoküler olarak kullanılır (87).

HSV için geliştirilmiş ve kullanımına onay verilmiş bir aşı henüz mevcut değildir. Bu nedenle aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir (80).

4.3. Virüs Sayısının Hesaplanması, Sitotoksik Etki ve Antiviral Aktivite Belirlenmesinde Kullanılan Testler

4.3.1. TCID₅₀ Testi

TCID₅₀ testi, bir kültürdeki hücrelerin %50'sinin enfekte olduğu noktayı belirleyen bir son nokta seyreltme testidir. Bu yöntem enfekte ve enfekte olmamış hücreler arasındaki oranın kalitatif ölçümünün yapılmasını sağlar. TCID₅₀ yönteminde, belirlenmiş sayıda kuyucuğa analiz edilecek virüse duyarlı hücreler ekilerek hücreler belirli miktardaki virüs dilüsyonları ile enfekte edilir. Enfeksiyonun gerçekleşmesi için uygun süre beklenir ve kuyucuklar sitopatik etkinin varlığı veya yokluğu açısından değerlendirilir. Kuyucukların %50'sinin enfekte olduğu virüs miktarı Spearman-Kärber veya Reed-Muench metoduna göre belirlenir (92, 93).

4.3.2. Plak Testi

Konfluent olmuş tek tabaka hücreler konsantrasyonu bilinmeyen litik bir virüsün sayılabilecek aralığa (5-100 viriyon arasında) girecek şekilde hazırlanan seri

dilüsyonları ile enfekte edilir. Enfekte edilen hücreler viral enfeksiyon esnasında virüsün yayılmasını önlemek amacıyla hareketsizleştirici bir besiyeri (agaroz, metil selüloz, karboksimetil selüloz içeren besiyeri) ile kaplanır. Virüsün üreme özellikleri ve kullanılan hücreye bağlı olarak 2-14 gün arasında plaklar oluşur. Ortamdaki besiyeri uzaklaştırılır. Nötral kırmızısı veya kristal viyole ile hücreler boyanarak oluşan plaklar çıplak gözle veya mikroskop altında sayılır (94).

4.3.3. Tripan Mavisi Testi

Bu test bir hücre süspansiyonunda mevcut olan canlı hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılır. Hücre süspansiyonu boya (tripan mavisi, eozin veya propidyum gibi) ile basitçe karıştırılır. Canlı hücreler sağlam hücre zarlarından dolayı boyaları dışlarken ölü hücreler boyaları içeri alır. Hücreler mikroskop altında incelendiğinde canlı hücreler şeffaf bir sitoplazmaya sahipken ölü hücrelerin sitoplazması mavi renkte görülür (95).

4.3.4. MTT Testi

Çeşitli tetrazolyum bileşikleri canlı hücrelerin tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın kullanılanlarından biri de MTT'dir. MTT testi çoklu taramalarda kullanılabilmesi için 96 kuyucuklu pleyte uygun olarak geliştirilmiş ilk homojen hücre canlılığı testidir. MTT firmanın önerileri doğrultusunda uygun çözücüde hazırlanır, hücrelere son konsantrasyonu 0.2-0.5 mg/mL olacak şekilde ilave edilir. Hücreler 1-4 saat etüvde inkübe edilir. Bu süre zarfında MTT canlı hücreler tarafından alınarak formazan kristallerine dönüştürülür. Formazan kristalleri dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözülerek mor renkli ürün elde edilir. Formazan miktarı (canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılı olduğu kabul edilir) spektrofotometrede 570 nm'deki absorpsiyon değişimi kaydedilerek hesaplanır (96).

4.3.5. RT-PCR Testi

RT-PCR seçilen genlerin tespit edilmesi ve ekspresyon miktarlarının hesaplanmasında kullanılmaktadır. RT-PCR'ın konvansiyonel PCR'dan farkı ürünlerin reaksiyon gerçekleşirken tespit edilmesidir. RT-PCR'da floresan dedektörler reaksiyona eklenerek amplifikasyonun her döngüsünde oluşan floresan ölçülür. RT-PCR ilk ortaya çıktığında floresan boya olarak etidiyum bromür kullanılırken, zaman içinde daha duyarlı ve daha az toksik olan boyalar (floresan işaretli probalar) teste adapte edilerek

kullanılmaya başlanmıştır. Bu testte amplifikasyon tamamlandıktan sonra numuneler soğutulur ve daha sonra yavaşça ısıtılır. DNA'ya bağlanan boyanın salındığı sıcaklık (ürünün erime sıcaklığı; T_m) floresan ölçülerek belirlenir. T_m değerleri kullanılarak elde edilen ürünün erime eğrisi çizilir. Bu eğri amplikonların kimliğini doğrulamak için kullanılır. Amplifikasyon ilerledikçe boya veya prob tarafından üretilen floresans floresan taban çizgisinin üzerine çıkmaya başlar. Buna eşik değeri döngüsü (C_T) denir. Hedef DNA'nın başlangıç miktarı ne kadar fazlaysa C_T değeri o kadar düşük olur. Bu prensip RT-PCR'ın temelini oluşturur. Miktarı bilinen DNA'nın seri dölüsyonları kullanılarak standart eğri oluşturulur ve analiz edilen örnekteki DNA miktarı bu standartlara göre belirlenir (97).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. HSV-1 ve Propolis Örnekleri

HSV-1 Wal suşu, orijinal olarak Sheffield Üniversitesi'nden (İngiltere) temin edilerek saklanan virüs koleksiyonundan temin edildi.

Afrikan yeşil maymun böbrek hücreleri (VERO) Erciyes Üniversitesi öğretim üyesi Prof Dr. Aykut Özdarendeli'den temin edilerek çoğaltıldı. Çoğaltılan hücreler Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında çoğaltılarak sıvı azot tankında saklandı.

Rize'nin Pazar ilçesinden, Ardahan'dan ve Trabzon'un Uzungöl bölgesinden elde edilerek Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalında muhafaza edilen propolis örnekleri çalışmaya dahil edildi.

5.1.2. Kimyasallar ve Besiyeri

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler DMSO (Amresco, ABD), steril DMSO (Sigma Aldrich, ABD), agaroz (Sigma Aldrich, ABD), MTT (Sigma Aldrich, ABD), flukanazol (Sigma Aldrich, ABD), kristal viyole (Merck, Almanya), Dulbecco's Modified Eagle's besiyeri (DMEM) (PAN-Biotech, Almanya), Dulbecco's fosfat tampon solüsyonu (PBS) (PAN-Biotech, Almanya), tripsin/EDTA (Wisent Bioproducts, Kanada), fetal bovine serum (FBS) (PAN-Biotech, Almanya), penisilin (10000 U/mL)-streptomisin (10 mg/mL) (PAN-Biotech, Almanya), tripan mavisi (Sigma Aldrich, ABD), etanol (C₂H₅OH) (Alkokim, Türkiye), formaldehit, ExiPrep™Plus Viral DNA/RNA Kit (Bioneer Corporation, ABD), LightCycler®480 Probes Master mix (2X) (Roche Diagnostics Corporation, ABD), asiklovir, gallik asit (Sigma Aldrich, ABD), protokatekuik asit (Sigma Aldrich, ABD), p-OH benzoik asit (Sigma Aldrich, ABD), kateşin (Sigma Aldrich, ABD), klorogenik asit (Sigma Aldrich, ABD), vanilik asit (Sigma Aldrich, ABD), kafeik asit (Sigma Aldrich, ABD), şiringik asit (Sigma Aldrich, ABD), epikateşin (Sigma Aldrich, ABD), p-kumarik asit (Sigma Aldrich, ABD), ferulik asit (Sigma Aldrich, ABD), rutin (Sigma Aldrich, ABD), myrisetin (Sigma Aldrich, ABD), fisetin (Sigma Aldrich, ABD), kuersetindir (Sigma Aldrich, ABD).

5.1.3. Sarf Malzemeler

Falkon tüpleri (15 ve 50 mL), mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ve 2 mL), vidalı kapaklı tüp (2 mL), otomatik pipet ucu (10 µL, 100 µL, 1000 µL), otomatik pipet (10 µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL) (Gilson, ABD), mezür (100 mL), mavi kapaklı cam şişeler (100, 250, 500 ve 1000 mL), parafilm, sekiz kanallı otomatik pipet (5-50, 30-300 µL) (Brand Transferpette, Almanya), selüloz asetat filtre (0.22 µm por çaplı) (Sartorius AG, Almanya), serolojik pipetler (5, 10, 25 mL) (Sarstedt, Almanya), pastör pipeti (Nest ABD), hücre kültür pleytleri (6, 12, 24 ve 96 kuyucuklu) (SPL Life Sciences, Kore), Hücre kültür flaskları (T25 ve T75) (SPL Life Sciences, Kore), filtre kağıdı (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Almanya) ve pudrasız eldiven (Isolab, Almanya) kullanıldı.

5.1.4. Cihazlar

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalına ait 37°C'lik CO₂'li etüv (Panasonic Healthcare Co. Ltd., Japonya), biyogüvenlik kabini (Bio II Advance 6 Class II, Telstar, İspanya), VersaMax ELISA mikrolept okuyucu (Molecular Devices, ABD), 4°C buzdolabı (Profilo), -20°C derin dondurucu (Bosch, Almanya), -80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific mod U570 premium, Thermo, ABD), pastör fırını (Nüve, Türkiye), vorteks (Isolab, Almanya), dikey model otoklav (Kermanlar, Türkiye), çalkalayıcı (Isolab, Almanya), evaporatör (Fisher Scientific, Almanya), liyofilizatör (TEKNOSEM, Türkiye), su banyosu (Mettler GFL 1086, Almanya), manyetik karıştırıcı (Stuart, Türkiye), ExiPrep 16 Plus viral DNA izolasyon cihazı (Bioneer Corporation, ABD), LightCycler® 480 RT-PCR cihazı (Roche Diagnostics Corporation, ABD), mikrodalga fırın (Beko, Türkiye), buz makinesi (Scotsman AF 80, İtalya), terazi (KERN & SOHN GmbH, Almanya), hassas terazi (Sartorius Laboratory, Almanya), deiyonize su cihazı (Barnstead, Türkiye, soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Almanya), ters faz mikroskop (markasız), sıvı azot tankı (IC 20R, International Cryogenics Inc., ABD), pipet pompası (Isolab, Almanya), hematositometre (Bruker, ABD), HPLC-UV (Thermo Scientific Surveyor™, USA) cihazları kullanıldı.

5.1.5. Çözeltiler ve Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Üretim Besiyeri: %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve flukanazol olacak şekilde yüksek şekerli DMEM kullanılarak hazırlandı.

İdame Besiyeri: %2 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve flukanazol olacak şekilde yüksek şekerli DMEM kullanılarak hazırlandı.

Dondurma Besiyeri: %20 FBS, %10 DMSO, %1 penisilin-streptomisin ve flukanazol olacak şekilde yüksek şekerli DMEM kullanılarak hazırlandı.

Fiksasyon Çözeltisi: %10'luk formaldehit. %36'lık stok formaldehit solüsyonundan 5.56 mL alınarak üzerine 14.44 mL steril distile su ilave edilerek hazırlandı. Kullanılncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi.

Kristal Viyole: %0.5 konsantrasyonunda hazırlandı. Çözücü olarak %10'luk etanol kullanıldı. Kullanılncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi.

MTT: 5 mg/mL konsantrasyonunda çözücü olarak steril distile su kullanılarak hazırlandı. Kullanılmadan önce 0,22 µm'lik filtre kullanılarak steril edildi. Küçük miktarlarda bölünerek kullanılncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Tripan Mavisi: 10 mg/mL konsantrasyonunda, çözücü olarak steril distile su kullanılarak hazırlandı. Kullanılmadan önce 0,22 µm'lik filtre kullanılarak steril edildi.

Asiklovir: 5 mg/mL konsantrasyonunda DMSO'da çözülerek hazırlandı. Kullanılmadan önce 0,22 µm'lik filtre kullanılarak steril edildi. Küçük miktarlarda bölünerek kullanılncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Flukanazol: 5 mg/mL konsantrasyonunda DMSO'da çözülerek hazırlandı. Küçük miktarlarda bölünerek kullanılncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi. Hücre kültürü vasatında 2.5 µg/ml konsantrasyonunda kullanıldı.

Gallik asit, protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, kafeik asit, şiringik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, t-sinamik asit: %50-50 metanol-saf suda 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı. HPLC-UV analizi için 1-2-5-10-20-30 ppm olacak şekilde %50-50 metanol-saf su ile seyreltilerek kullanıldı.

Kateşin, epikateşin, rutin, mirisetin, resveratrol, daidzein, luteolin, hesperitin, krisin, pinokembrin, CAPE: %100 metanol ile 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı. HPLC-UV analizi için 1-2-5-10-20 pm olacak şekilde %100 metanol ile seyreltilerek kullanıldı.

5.2. Yöntem

5.2.1. VERO Hücrelerinin Stoktan Alınarak Çoğaltılması

Dondurulmuş hücre içeren kriyojenik vial alınarak 37°C'lik su banyosunda hızlıca çözüldü. Çözünen hücreler 15 mL'lik falkona koyularak üzerine 10-12 mL %10 FBS içeren besiyeri eklendi ve 1200 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Süpernatant dökülerek pelletin üzerine bir miktar besiyeri eklendi ve pastör pipeti ile al-ver yapılarak pelletin çözülmesi sağlandı. Falkondaki tüm hücreler T25 flask içerisine alınarak üzerine 6 mL üretme besiyeri eklendi ve 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.

5.2.2. VERO Hücrelerinin Pasajlanması (Miktarlar T25 içindir)

Flasktaki besiyeri atık kutusuna döküldü. 1X'lik PBS'ten 3-5 mL alınarak flaska eklendi, ters yüz edildi, flask boşaltıldı. 1-1.5 mL tripsin-EDTA alınarak flaskın hücrelerin olduğu yüzeyine döküldü. Hücrenin bulunduğu tüm yüzeye yayılması sağlandı. Flask kapatılarak 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüve kaldırıldı ve 10 dk inkübe edildi. Üretim besiyeri hazırlandı. Flask alınarak içerisine bir miktar besiyeri eklendi. Al-ver yaparak hücreler tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Flasktaki tüm sıvı alındı ve 15 mL'lik falkona koyuldu. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Falkona 3 mL besiyeri eklendi ve al-ver yapılarak pellet çözöldü. Thoma lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra hücre süspansiyonundan 1 mL alınarak yeni flaska koyuldu ve üzerine 4 mL üretim besiyeri eklendi. Flask kapatılarak 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.

5.2.3. VERO Hücrelerinin Dondurulması (Miktarlar T25 içindir)

Konfluent olmuş VERO hücrelerini içeren flask alınarak içindeki besiyeri boşaltıldı. Flaska 3-5 mL PBS eklenerek yıkama yapıldı. PBS döküldükten sonra hücrelere 1-1.5 mL tripsin-EDTA ilave edilerek 2-3 dk 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde bekletildi. Böylece hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Flaska tripsin-EDTA'yı inaktive etmesi için 5 mL besiyeri eklendi. Flasktaki tüm hücreler pipetleme yapıp birbirinden ayrıldıktan sonra alınarak 15 mL'lik falkona koyuldu, 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek pellete %20 FBS içeren DMEM eklendi. Pellet çözöldükten sonra 900 µL alınarak kriyoviallere koyuldu. Üzerine 100 µL steril DMSO eklenerek -80°C'de yavaşça dondurulduktan sonra sıvı azot tankına kaldırıldı.

5.2.4. Pleytlere Hücre Ekimi Yapılması

Konfluent olmuş VERO hücrelerini içeren flask alınarak içindeki besiyeri boşaltıldı. Flaska 3-5 mL PBS eklenerek yıkama yapıldıktan sonra 1-1.5 mL tripsin-EDTA eklenerek 2-3 dk 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için flaska 5 mL besiyeri eklenerek al-ver işlemi ile hücreler zeminden koparılıp birbirinden ayrılmaları sağlandı. Tüm hücreler 15 mL'lik falkona alınarak 1200 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Pellet 2-3 mL besiyerinde çözülerek tripsinize edilen flask sayısı ve kullanılacak olan pleyte göre Tablo 2'deki oranlara bakılarak üretme besiyeri ilave edilerek pleytteki kuyucuklara uygun miktarda besiyeri dağıtıldı. Pleytler 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.

Tablo 2. Pleyte göre kullanılması gereken hücre ve besiyeri miktarı

Kuyucuk/Pleyt	Besiyeri/Kuyucuk (mL)	Besiyeri/Pleyt (mL)	T25 Flask/Pleyt
96	0.1	11-12	1
24	1	25-26	1.5
12	2	24-25	2
6	4	24-25	2.5

5.2.5. Hücre Kültüründe HSV-1'in Üretilmesi

Bir adet konfluent olmuş VERO hücrelerini içeren T25 flask tripsinize edilerek hücreler falkona koyuldu ve 1200 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Pellet 6 mL %10 FBS içeren besiyeri ile çözüldü. Hücre süspansiyonundan iki adet T75 flaska 2'şer mL, iki adet T25 flaska 1'er mL koyuldu. T75 flasklara 13-15 mL, T25 flasklara 5-6 mL üretme besiyeri eklendi. 37°C'lik etüvde hücreler konfluent oluncaya kadar inkübasyona bırakıldı. İdame içeren besiyeri hazırlandı. 1 mL virüs içeren ve -80°C'de saklanan tüplerden bir adet alınarak hızlıca çözüldü. 1 mL virüse 9 mL %2 FBS içeren besiyeri eklendi. Konfluent olmuş hücre içeren bir adet T75 flaskın içindeki besiyeri dökülerek flask PBS ile yıkandı. PBS dökülerek %10 oranında sulandırılan virüs süspansiyonundan 3 mL yıkanan T75 flaska koyuldu. Virüslerin koyulduğu T75 flask kapatılarak etüve koyuldu. Flask 10-15 dakikada bir etüvden alınarak virüs içeren sıvı ile tüm hücrelerin ıslatılması sağlandı. Bu şekilde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolunca flaskın içindeki besiyeri dökülerek flaska 15 mL idame besiyeri eklenerek inkübasyona bırakıldı. Bir

günlük inkübasyondan sonra flaskın ağzı parafilmlelenerek -80°C'ye kaldırıldı ve bir gün bekletildi. Flask -80°C'den alınarak biyogüvenlik kabinine koyuldu ve kendi kendine çözülmesi sağlandı.

Flaskın içindeki besiyeri al-ver yapılarak flaskın duvarındaki tüm hücreler süspanse edildi. Hücre süspanسیونunun tamamı falkona koyularak buz üzerine koyuldu. Sonikatörün probu önce su ile 30 sn sonra etil alkol ile 30 sn muamele edilerek kurutuldu. Sonikatör ısı verdiği için bir behere buz koyularak hücreleri içeren falkon buza koyuldu. 50 amp'de 30 sn sonikasyon yapıldı. Falkon 1500 rpm'de 5 dk çöktürülerek süpernatanttaki virüsler viallere koyuldu ve -80°C'de saklandı.

5.2.6. TCID₅₀ Testi

Konfluent olmuş VERO hücreleri içeren 96 kuyucuklu pleyt alınarak içindeki besiyeri boşaltıldı. Tüm kuyucuklara 200 µL idame besiyeri koyuldu. İlk sıradaki kuyucuklara stok virüsten 20 µL koyuldu. Al-ver işleminin ardından kuyucuklardan 20 µL alınarak sonraki kuyucuklara aktarıldı. Kuyucuklar bitene kadar işlem tekrar edildi. Böylece 96 kuyucuklu pleyte virüs dilüsyonları hazırlandı. Pleyt 37°C'de üç gün inkübe edildi. Mikroskopta enfeksiyonun görüldüğü kuyucuklar tespit edildi. TCID₅₀ değeri Spearman-Karber metoduna (92) göre aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi.

Spearman-Karber Metodu:

$$M = x_k + d [0.5 - (1/n) (r)]$$

x_k = En yüksek dilüsyon dozu

r = “-” yanıtların toplamı

d = Dilüsyonlar arası aralık

n = Dilüsyon için kullanılan kuyucuk sayısı

5.2.7. Plak Testi

Flasklarda üretilen VERO hücreleri konfluent olduğunda hücreler tripsinize edilerek tripan mavisi ile sayım yapıldı. Altı kuyucuklu pleytin her kuyucuğuna 10⁵ hücre ekildi. Kuyucuklardaki besiyeri hacmi üretme besiyeri ile 4 mL'ye tamamlanarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. %3'lük agaroz, distile su ile

hazırlanarak otoklavda steril edildi. Hazırlanan agaroz kullanılıncaya kadar steril şekilde muhafaza edildi.

-80°C’de saklanan, 1 mL virüs içeren tüplerden bir adet alınarak 37°C’lik su banyosunda çözüldü. Steril ependorflara 0.9 mL idame besiyeri koyuldu. Stok virüsten 100 µL alınarak ependorflarda 10⁻¹’den 10⁻⁸’e kadar virüs dilüsyonları hazırlandı. %80-90 konfluent olmuş VERO hücreleri içeren altı kuyucuklu pleyt alınarak içindeki besiyeri döküldü. Kuyucuklar PBS ile yıkandı. Kuyucuklara dilüe edilmiş virüslerden 200 µL koyuldu. Kontrol olarak sadece idame besiyeri içeren kuyucuk da teste dahil edildi. 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde bir saat inkübasyona bırakıldı. 10-15 dk arayla pleyt çıkarılıp hafifçe çalkalanarak inkübasyon süresi tamamlandı. %5 FBS ve %1 antibiyotik içeren besiyeri hazırlanarak 45°C’lik su banyosuna koyuldu. Daha önce hazırlanan ve steril halde muhafaza edilen %3’lük agaroz mikrodalgada eritilerek ısınmış olan besiyerine 25 mL besiyeri, 5 mL agaroz olacak şekilde ilave edildi. Donmasını engellemek için agaroz ilave edilen besiyeri kullanılıncaya kadar 45°C’lik su banyosunda bekletildi. Inkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak, kuyucuklara 4 mL agaroz içeren besiyeri eklendi. Pleyt 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde üç gün inkübe edildi. Inkübasyon sonunda pleyt etüvden alınarak kuyucuklara 1 mL fiksasyon solüsyonu ilave edildi ve bir saat 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Süre sonunda pleyt alınarak kuyucuklardaki besiyeri ve fiksasyon solüsyonu boşaltıldı. Kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara kristal viyole ilave edilerek 10 dk boyandı. Süre sonunda kuyucuklardaki boya uzaklaştırılarak düşük basınçlı musluk suyu altında kuyucuklar yıkandı. Mikroskop altında oluşan plaklar sayılarak virüs miktarı belirlendi.

5.2.8. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

Doğu Karadeniz Bölgesinden elde edilen üç farklı propolisin (Ardahan, Uzungöl, Rize-Pazar), çözücünün temas ettiği yüzey alanını artırmak amacıyla ekstraktlar hazırlanmadan önce mümkün olan en küçük tanecikli hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla propolisler -80°C’de üç gün bekletildi. Propolisler temiz plastik bir poşetin içine koyularak bir çekiç yardımıyla parçalandı. Parçalanmış propolisler steril falkonlara koyularak ekstraktlar hazırlanincaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

5.2.8.1. Propolis Ekstraktlarının Etanol Kullanılarak Hazırlanması

Pazar, Ardahan ve Uzungöl propolislerinden yaklaşık 5 g tartılarak steril 50 mL'lik falkonlara ayrı ayrı koyuldu. Son hacim %70'lik etanol ile 40 mL'ye tamamlandı. Falkonlar ısı kullanılmadan 24 saat 250 rpm'de çalkalandı. Süre sonunda karışım önce adi filtre kağıdından süzülerek büyük partiküllerden, daha sonra mavi şerit (çok ince parçacıkları tutabilen) filtre kağıdından süzülerek küçük partiküllerden arındırıldı. Filtre kağıtlarından süzülen ekstraktın son hacmi %70'lik etanol ile 40 mL'ye tamamlandı. 20 mL ekstrakt HPLC analizi ve toplam polifenol miktarının belirlenmesinde kullanılmak üzere ayrı bir steril falkona koyularak 4°C'lik buzdolabına kaldırıldı. 20 mL ekstrakt evaporatöre uygun şişelere koyularak 50°C'de etanol uçuruldu. Ekstrakt hazırlanırken %70'lik alkol kullanıldığından alkol uçtukten sonra kalan su liyofilizasyon ile (-55°C'de 24 saat) ortamdan uzaklaştırıldı. Şişelerin boş ve kuru madde içeren halleri tartı ile tartılarak kaç gram tortu kaldığı hesaplandı. Tortulara 2 mL steril DMSO ilave edilerek çözüldü. Hazırlanan ekstraktlar 2 mL'lik vidalı kapaklı steril tüplere 1 mL olacak şekilde koyuldu. Etiketlenerek kullanılıncaya kadar 4°C'ye kaldırıldı. Ekstraktlar deneylerde DMSO oranı mikroorganizmalara zarar vermeyecek konsantrasyon olan %1'in altında olacak şekilde kullanıldı.

5.2.8.2. Propolis Ekstraktlarının Distile Su Kullanılarak Hazırlanması

Pazar, Ardahan ve Uzungöl propolislerinden yaklaşık 5 g tartılarak cam şişelere ayrı ayrı koyuldu. Üzerlerine 50 mL distile su ilave edildi. Şişelerin ağzı kapatılarak 500-600 rpm'de, 45-50°C'de 24 saat manyetik karıştırıcıda çalkalandı. Süre sonunda şişelere 3 mL gliserol ilave edilerek aynı koşullarda 24 saat daha çalkalandı. Süre sonunda karışım önce adi filtre kağıdından süzülerek büyük partiküllerden, daha sonra sonra mavi şerit (çok ince parçacıkları tutabilen) filtre kağıdından süzülerek küçük partiküllerden arındırıldı. Filtre kağıtlarından süzülen ekstraktın son hacmi distile su ile 40 mL'ye tamamlandı. 20 mL ekstrakt HPLC analizi ve toplam polifenol miktarının belirlenmesinde kullanılmak üzere ayrı bir steril falkona koyularak 4°C'lik buzdolabına kaldırıldı. Hazırlanan ekstraktlardaki su liyofilizasyon ile (-55°C'de 24 saat) ortamdan uzaklaştırıldı. Şişelerin boş ve kuru madde içeren halleri tartı ile tartılarak kaç gram tortu kaldığı hesaplandı. Tortulara 2 mL steril DMSO ilave edilerek çözüldü. Hazırlanan ekstraktlar 2 mL'lik vidalı kapaklı steril tüplere 1 mL olacak şekilde koyuldu.

Etiketlenerek kullanılıncaya kadar 4°C'ye kaldırıldı. Ekstraktlar deneylerde DMSO oranı mikroorganizmalara zarar vermeyecek konsantrasyon olan %1'in altında olacak şekilde kullanıldı.

5.2.9. HPLC-UV İle Fenolik Bileşenlerin Tayini

5.2.9.1. HPLC-UV Koşulları

Analizler ters faz C18 kolonu (150 mm x 4.6 mm, 5 µm; Fortis) kullanarak ve asetonitril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi. A rezervuarında %2 asetik asit (saf suda) ve B rezervuarında %0-30 asetonitril-saf su bulunan gradient program Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. HPLC-UV gradient programı

Zaman (dk)	A: %2 asetik asit (saf suda)	B: %70-30 asetonitril-saf su
0,01	95,00	5,00
3,00	95,00	5,00
8,00	85,00	15,00
10,00	80,00	20,00
12,00	75,00	25,00
20,00	60,00	40,00
30,00	20,00	80,00
35,00	95,00	5,00
50,00	95,00	5,00

5.2.9.2. HPLC-UV Analizinde Kullanılan Standartlar

HPLC-UV analizinde kullanılan gallik asit, protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, şiringik asit, kateşin, epikateşin, kaffeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, rutin, mirisetin, resveratrol, daidzein, luteolin, t-sinamik asit, hesperitin, krisin, pinokembrin ve CAPE standartları 280 nm'de analiz edildi. Ayrıca 280 nm'de normal kalibrasyon metodu öncülüğünde propil paraben iç standart olarak kullanıldı. Hazırlanan propolis numunelerindeki bileşenlerin varlığı ve miktarı kullanılan standartların oluşturduğu pikler ile karşılaştırılarak belirlendi.

5.2.10. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Çalışmada, standart grafiğin hazırlanmasında, fenolik bir madde olan gallik asit standardı kullanıldı. Gallik asitin farklı konsantrasyonları (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 ve 0,015625 mg/mL) hazırlanıp, 760 nm’de absorbansları okundu. Konsantrasyona karşılık bulunan absorbans değerleri kullanılarak grafik çizildi. Çizilen grafiğe göre propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı bulundu, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak asıl numunenin mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g propolis olarak fenolik madde miktarı belirlendi. Yapılan çalışmada pipetleme işlemi Tablo 4’teki gibidir. %10 Na₂CO₃ hariç tüm malzemeler tüplere koyuldu, vortekslendi ve üç dk sonra tüplere %10 Na₂CO₃ ilave edilerek 760 nm’de okundu. Sonuçlar körün absorbans değeri ile karşılaştırılarak elde edildi.

Tablo 4. Toplam fenolik madde tayininde yapılan pipetleme işlemi

Kullanılan Madde	Kör	Standart	Test
Distile su	700 µL	680 µL	680µL
Standart (Değişik konsantrasyonlarda)	-	20 µL	-
Propolis numunesi	-	-	20 µL
0,2 N Folin Reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
%10 Na ₂ CO ₃	400 µL	400 µL	400 µL

5.2.11. Sitotoksikite Deneyleri

Propolis ekstraktlarının VERO hücreleri için sitotoksik olmayan konsantrasyonları tripan mavisi yöntemi ve MTT yöntemi kullanılarak belirlendi.

5.2.11.1. Tripan Mavisi Yöntemi

%80-90 konfluent olmuş VERO hücreleri tripsinize edildi ve tripan mavisi kullanılarak sayıldı. Her kuyucuğa 10⁵ hücre ve 1 mL üretim besiyeri olmak kaydıyla 24 kuyucuklu pleytlere hücre ekimi yapılarak 5-6 saat hücreler pleyte tutununcaya kadar 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

Sulu propolis ekstraktlarından üretim besiyeri ile stok dilüsyon hazırlandı. Sulu propolis ekstraktlarının 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500, 3000 ve 6000 µg/mL’lik konsantrasyonları ve her konsantrasyondan üçer kuyucuk olacak şekilde hazırlandı.

Etanollü propolis ekstraktlarından besiyerinde dilüsyon hazırlanmak istendiğinde, ekstraktın besiyerinde şelat oluşturarak çöktüğü görüldü. Bu yüzden etanollü ekstraktların stok dilüsyonları %70 etanol içeren besiyerinde, kullanılacak konsantrasyondan üç kat fazla olacak şekilde ayarlandı. Etonolün sitotoksik etkisini ortadan kaldırmak amacıyla, pleytteki kuyucuklarda etanol miktarının %5'ten az olması için ilk üç dilüsyon hücre içermeyen besiyerinde yapılarak dördüncü dilüsyon hücre içeren pleyte koyuldu. Etanollü propolis ekstraktlarının 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 µg/mL'lik konsantrasyonları ve her konsantrasyondan üçer kuyucuk olacak şekilde hazırlandı. Negatif kontrol olarak sadece hücre içeren kuyucuklar kullanıldı.

Propolis ekstraktlarının VERO hücrelerine 24, 48, 72 ve 96 saat sonundaki sitotoksik etkisini görebilmek için bu işlemler dört ayrı pleytte yapıldı. Hazırlanan pleytler 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. Süresi dolan pleyt etüvden alınarak kuyucuklardaki besiyeri boşaltıldı. Kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine tripsin ilave edilerek 10 dk etüvde inkübe edildi. Süre sonunda pleyt etüvden alınarak tüm kuyucuklara tripsinin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla besiyeri ilave edildi. Al-ver işlemi ile hücreler kuyucuklardan kaldırılarak, kuyucuklardaki hücreler birbirine karışmayacak şekilde ayrı steril ependorf tüplere koyuldu. Ependorf'taki hücreler tripan mavisi ile boyanarak canlı hücre (içine mavi rengi almamış olan hücreler) sayımı yapılarak sonuçlar kaydedildi. Toplam hücre sayısı; Toplam hücre sayısı = 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10,000 x dilüsyon faktörü formülü kullanılarak hesaplandı. Kontrol grubundaki canlı hücre sayısı ile benzer sayıda canlı hücreye sahip konsantrasyon ve daha düşük konsantrasyonlar sitotoksik olmayan konsantrasyonlar olarak belirlendi.

5.2.11.2. MTT Yöntemi

Flaskta %80-90 konfluent olmuş VERO hücreleri tripsinize edilip tripan mavisi ile boyanıp thoma lamı kullanılarak sayıldı. 96 kuyucuklu pleytin her kuyucuğuna 100 µL üreme besiyeri ile 10⁵ hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin pleyte tutunması için 5-6 saat 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sulu propolis ekstraktlarının 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500, 3000 ve 6000 µg/mL'lik konsantrasyonları ve her konsantrasyondan üç kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu pleytte dilüsyonlar hazırlandı. Etanollü propolis ekstraktlarının 12.5, 25, 50, 100, 200,

400 ve 800 µg/mL’lik konsantrasyonları ve her konsantrasyondan üç kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu pleytte dilüsyonlar hazırlandı. Dilüsyonlar hazırlanırken kullanılan etanolün sitotoksik etkisini görmek amacıyla dilüsyonlardaki etanolün konsantrasyonları da 96 kuyucuklu pleytte hazırlandı. Pozitif kontrol olarak kullanılacak olan asiklovirin sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla asiklovirin 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL’lik konsantrasyonları ve her konsantrasyondan üç kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu pleytte dilüsyonlar hazırlandı. Negatif kontrol olarak sadece hücre içeren kuyucuklar kullanıldı.

Propolis ekstraktlarının VERO hücrelerine 24, 48, 72 ve 96 saat sonundaki sitotoksik etkisini görebilmek için bu işlemler dört ayrı pleytte yapıldı. Hazırlanan pleytler 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.

Süresi dolan pleyt alınarak her kuyucuğa 10 µL MTT ilave edildi. Pleyt 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 3.5 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri boşaltılarak kuyucuklara 100 µL steril DMSO eklendi. Pleytler ışık görmemesi için alüminyum folyo ile sarılarak, oda ısısında, çalkalayıcıda düşük hızda 30 dk çalkalandı. Pleytler spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okutulurken sonuçlar kontrol kuyucukları referans alınarak Microsoft Excel programında değerlendirildi. MTT sitotoksikite deneyi iki kere tekrar edildi.

5.2.12. Antiviral Aktivite Testleri

Propolis ekstraktlarının HSV-1 üzerine antiviral etkileri MTT, RT-PCR ve plak azalma yöntemleri kullanılarak araştırıldı.

5.2.12.1. MTT Yöntemi

Flaskta %80-90 konfluent olmuş VERO hücreleri tripsinize edilip tripan mavisi kullanılarak sayıldı. 96 kuyucuklu pleytin her kuyucuğuna 100 µL üretim besiyeri ile 10⁴ hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin pleyte tutunması için 5-6 saat 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Kuyucuklardaki besiyeri boşaltıldı. Virüs sayısı enfeksiyon çokluğu (MOI) esas alınarak 1MOI, 10MOI ve 100MOI olacak şekilde besiyerinde ayarlanarak üç ayrı pleyte 100 µL virüs ekildi. Virüslerin hücreleri enfekte etmesi için pleytler bir saat 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde, 10 dk ara ile çıkarılıp elle hafifçe sallanarak inkübe edildi. Kuyucuklardaki besiyeri boşaltılarak etanolü propolis ekstraktlarının 100-6.25 µg/mL konsantrasyonları, sulu propolis ekstraktlarının 800-

12.5 µg/mL konsantrasyonları idame besiyeri ile hazırlanarak 100 µL ve üçerli tekrar olacak şekilde kuyucuklara koyuldu. Pozitif kontrol olarak 50 µg/mL konsantrasyonunda asiklovir, negatif kontrol olarak sadece virüs içeren kuyucuklar kullanıldı. Pleytler üç gün 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklara 10 µL MTT eklenerek 3.5 saat 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri boşaltılarak kuyucuklara 100 µL DMSO eklendi. Pleytler karanlık ortamda, oda ısısında, düşük devirde 30 dk çalkalandı. Deneyler iki tekrar olacak şekilde yapılarak spektrofotometrede 570 nm'de kuyucukların absorbands değerleri okundu. Sonuçlar Microsoft Excel programında değerlendirilerek kuyucuklarda hücrelerin canlılık oranları yüzde olarak hesaplandı.

5.2.12.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Konfluent olmuş VERO hücreleri tripsinize edilerek 24 kuyucuklu pleytlere hücre ekimi yapıldı. Hücreler bir gece 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Kuyucuklardaki besiyeri boşaltılarak stoktan alınıp idame besiyerinde 10⁻⁵'e kadar dilüe edilen virüsten 100 µL eklendi ve bir saat 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde, 10 dk ara ile çıkarılıp sallanarak inkübe edildi. Kuyucuklardaki besiyeri boşaltılarak etanollü propolis ekstraktlarının 100-6.25 µg/mL konsantrasyonları, sulu propolis ekstraktlarının 800-12.5 µg/mL konsantrasyonları, pozitif kontrol olarak asiklovirin 50-6.25 µg/mL konsantrasyonlarından 100 µL kuyucuklara koyuldu. Negatif kontrol olarak sadece virüs içeren kuyucuklar kullanıldı. Pleytler üç gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda VERO hücrelerinin parçalanarak hücre içindeki virüslerin açığa çıkması amacıyla pleytler -80°C'lik dondurucuya koyularak 2 gece bekletildi. Dondurucudan alınıp çözödürülen pleytlerdeki virüsün bulunduğu tüm sıvı kısım ayrı ependorflara koyuldu. Viral DNA izolasyonu yapılmaya kadar örnekler -20°C'lik dondurucuda saklandı.

Viral DNA izolasyonu ExiPrep™Plus Viral DNA/RNA Kit kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda Bioneer ExiPrep 16 Plus cihazında gerçekleştirildi.

RT-PCR için mastermix hazırlanarak kullanılmaya kadar -80°C'lik dondurucuda saklandı. Mastermix kompozisyonu ve miktarları Tablo 5'te, kullanılan primerler ve prob Tablo 6'da verildi. RT-PCR 95°C'de 10 dk, 95°C'de 20 sn, 60°C'de 30 sn, 72°C'de 20 sn ve 45 döngü olacak şekilde LightCycler® 480 cihazında gerçekleştirildi.

Sonuçlar değerlendirilirken standart olarak içerisindeki virüs sayısı bilinen stok virüsten hazırlanan 10^{-1} - 10^{-4} arası dilüsyonlar kullanıldı. Çalışılan örneklerdeki viral DNA miktarı standartlara göre belirlendi. Deney iki kere tekrar edildi. Sonuçlar LightCycler® 480 cihazının bilgisayar programında değerlendirilerek elde edildi.

Tablo 5. RT-PCR’da kullanılan mastermix kompozisyonu

Komponent	Miktar (µL)
2X Mastermix	12.5
Primer (10 pmol/µL)	1.5
Prob Mix (10 pmol/µL)	0.5
DNA	5.0
ddw	5.5
Toplam Reaksiyon Hacmi	25

Tablo 6. RT-PCR’da kullanılan primer ve prob lar

Primer/Prob	Sekans (3’→5’)
İleri	GGAGAGGGACATCCAGGACT
Geri	CGGGCCATGAGCTTGTAATA
Prob	HEX-TCACCGCCGAACTGAGCAGACA-BHQ1

5.2.12.3. Plak Azalma Testi

%80-90 konfluent olmuş VERO hücrelerini içeren pleyt alınarak kuyucuklardaki besiyeri boşaltıldı. Kuyucuklar PBS ile yıkanarak PBS döküldü. Sayısı bilinen stok virüs alınarak belirli oranda idame besiyeri kullanılarak dilüe edildi Kuyucuklara dilüe edilmiş virüslerden 200 µL koyuldu. Kontrol olarak sadece idame besiyeri içeren kuyucuk da teste dahil edildi. 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde bir saat inkübasyona bırakıldı. 10-15 dk arayla pleyt çıkarılarak hafifçe çalkalanarak inkübasyon süresi tamamlandı. %5 FBS ve %1 antibiyotik içeren besiyerinde etanollü propolis ekstraktlarının 100-6.5 µg/mL konsantrasyonları hazırlandı. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı. Daha önce hazırlanan ve otoklavlanarak steril halde muhafaza edilen %3’lük agaroz mikrodalgada eritilerek ısınmış olan besiyerine 4 mL besiyeri, 0.5 mL agaroz olacak şekilde ilave edildi. Kuyucuklara 4 mL agaroz

içeren besiyeri eklendi. Pleyt 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde üç gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pleyt etüvden alınarak kuyucuklara 1 mL fiksasyon solüsyonu ilave edildi ve bir saat 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Süre sonunda pleyt alınarak kuyucuklardaki besiyeri ve fiksasyon solüsyonu boşaltıldı. Kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara kristal viyole ilave edilerek 10 dk boyandı. Süre sonunda kuyucuklardaki boya uzaklaştırılarak düşük basınçlı musluk suyu altında kuyucuklar yıkandı. Mikroskop altında oluşan plaklar sayılarak virüs miktarı belirlendi. Deney iki kere tekrar edildi.

5.2.13. İstatistiksel Analiz

Propolislerin HSV-1 üzerine antiviral etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Dunnett Testi ile belirlendi. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Plak Testi Sonucu

Plak testi sonucunda 10^{-5} dilüsyonda sayılamayacak kadar çok plak olduğu görüldü. Bu yüzden 10^{-6} dilüsyondaki virüsler ters faz mikroskopta sayılarak sonuçlar aşağıdaki fomüle göre değerlendirildi (Resim 3). Oluşan plakların mikroskopik görüntüsü Resim 4’te gösterildi.

$$\text{Pfu/mL} = \# \text{ Plaques} / (\text{D} \times \text{V})$$

Plaques: Plak Sayısı

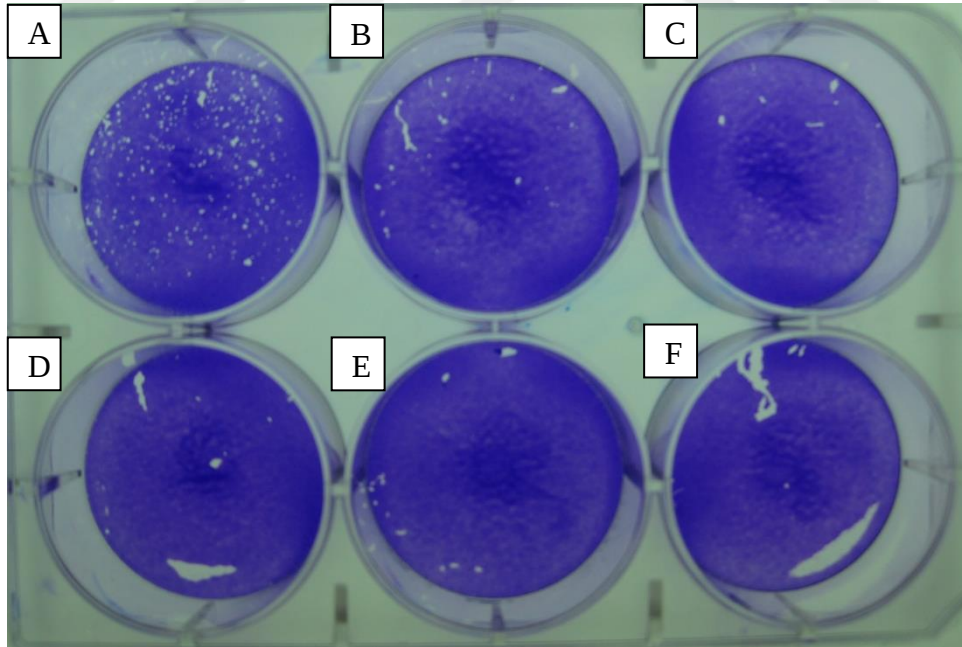
D: Dilüsyon

V: Kuyucuğa eklenen dilüe virüs miktarı

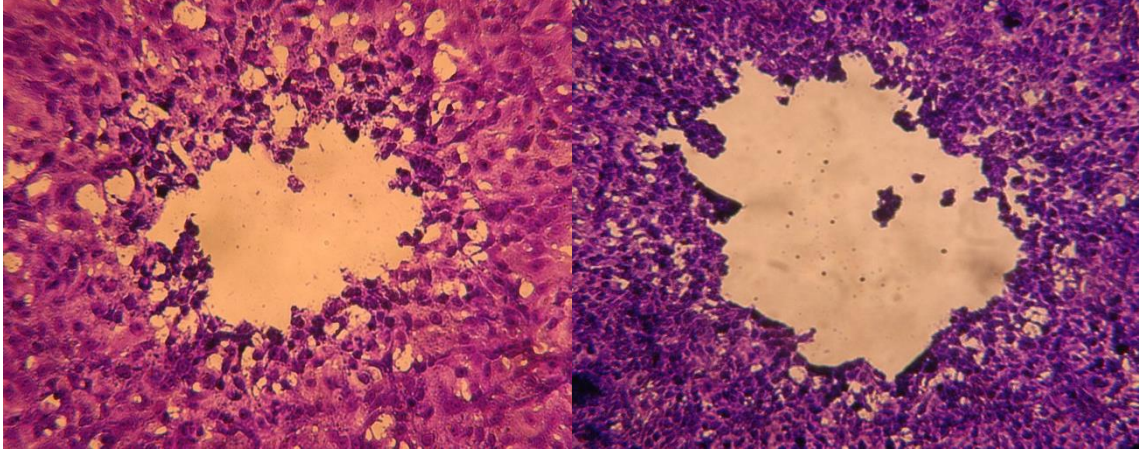
Bu fomüle göre;

$$\text{Pfu/mL} = 48 / 10^{-6} \times 0.2$$

$\text{Pfu/mL} = 2.4 \times 10^8$ olarak bulundu.



Resim 3. Plak testinin görüntüsü. A; stok virüsün 10^{-5} dilüsyonu, B; stok virüsün 10^{-6} dilüsyonu, C; stok virüsün 10^{-7} dilüsyonu, D; stok virüsün 10^{-8} dilüsyonu, E; stok virüsün 10^{-9} dilüsyonu, F; kontrol (sadece hücre)



Resim 4. HSV-1'in VERO hücrelerinde oluşturduğu plakların mikroskop görüntüsü

6.2. TCID₅₀ Testi Sonucu

Üç günlük inkübasyon süresi dolan 96 kuyucuklu pleyt alınarak ters faz mikroskopta incelendi. Virüs ile enfekte olan hücrelerin görüldüğü kuyucuklar işaretlenerek her dilüsyon için pozitif (enfeksiyon var) ve negatif (enfeksiyon yok) kuyucuk sayısı belirlendi (Tablo 7). Elde edilen veriler Spearman-Kärber metoduna göre değerlendirildi. Üretilerek -80°C'ye kaldırılan stok HSV-1'in TCID₅₀/mL oranı 2.81E+08 (2.81x10⁸) olarak bulundu.

Tablo 7. TCID₅₀ testinde 96 kuyucuklu pleytte pozitif ve negatif görülen kuyucuklar

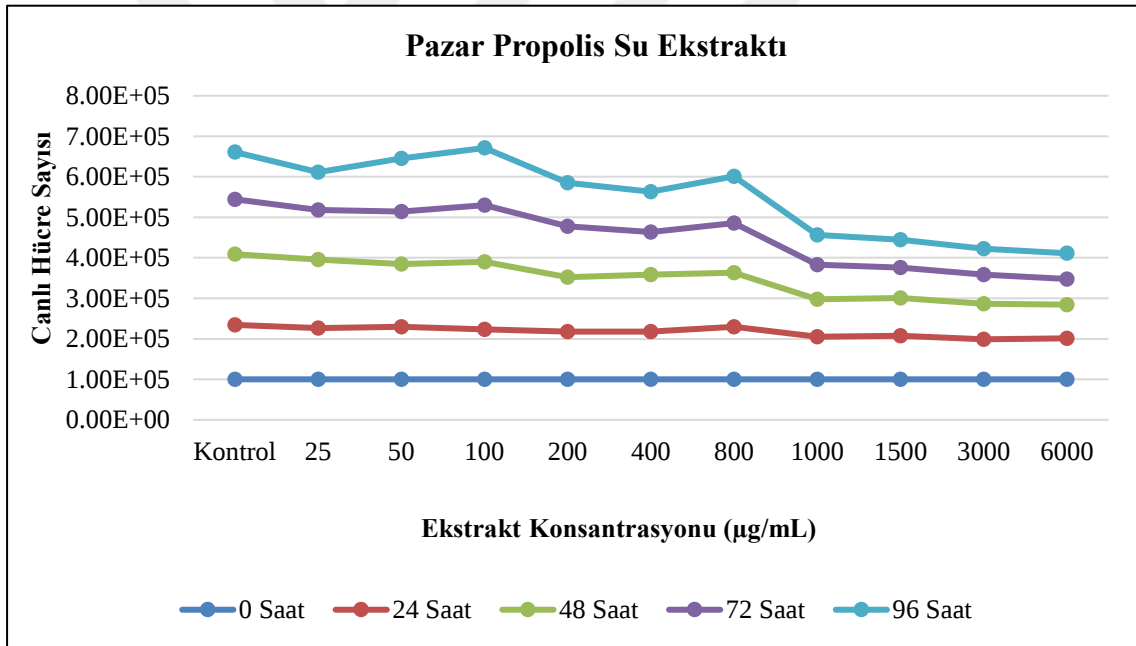
Dilüsyonlar→ Kuyucuklar↓	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Enfekte Kuyucuk Sayısı	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8

6.3. Sitotoksosite Deneyleri Sonuçları

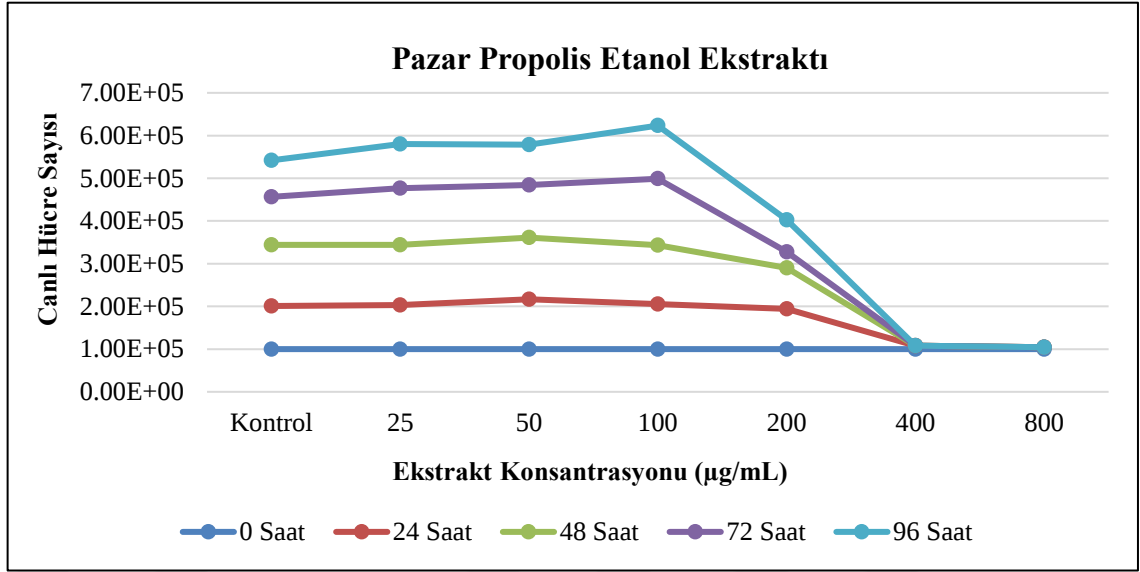
6.3.1. Tripan Mavisi Testi Sonuçları

Her dilüsyondan üç kuyucuk bulunduğundan, kuyucuklardaki hücrelerin sayısı 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda sayılarak ortalamaları alındı. Sonuçlar Microsoft

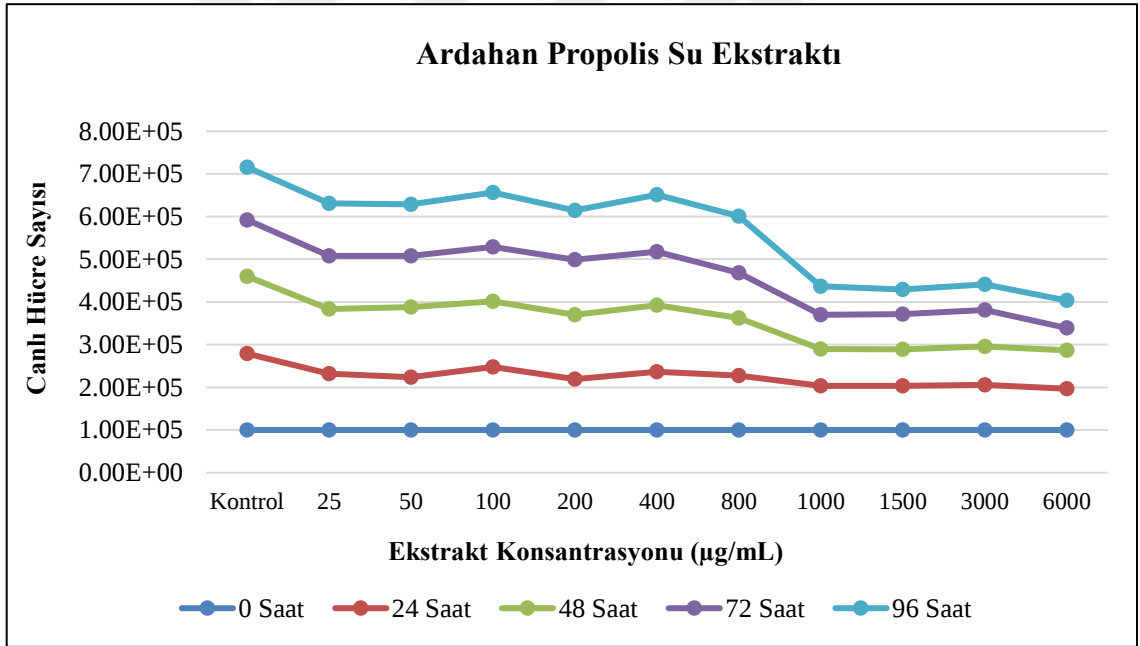
Excel programına kaydedilerek veriler grafiklere dönüştürüldü. Grafikler değerlendirildiğinde etanollü propolis ekstraktlarının 100 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda kontrol ile benzer sayıda hücre içerdiği görülerek bu konsantrasyonların VERO hücrelerine sitotoksik etkilerinin olmadığı belirlendi. Sulu propolis ekstraktlarının ise 800 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda kontrol ile benzer sayıda hücre içerdiği görülerek bu konsantrasyonların VERO hücrelerine sitotoksik etkilerinin olmadığı tespit edildi. Propolis ekstraktlarının tripan mavisi testine göre canlılıklarını gösteren grafikler Şekil 2-7’de verildi. Etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının VERO hücrelerine 24, 48, 72 ve 96 saat muamele edildiğinde hücrelerde meydana gelen değişimlerin görüntüsü Resim 5-8’de gösterildi. Tüm propolislerin görüntüsü benzer olduğundan sadece seçilen resimlere tezde yer verildi.



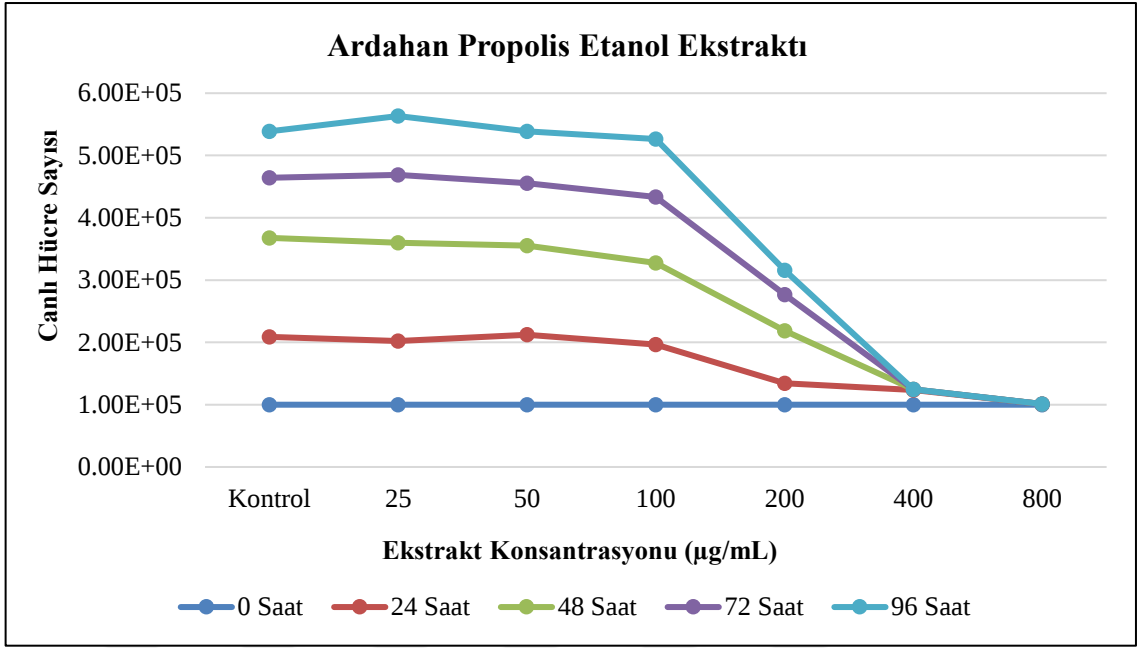
Şekil 2. Pazar propolis su ekstraktının tripan mavisi sitotoksikite testi sonucu



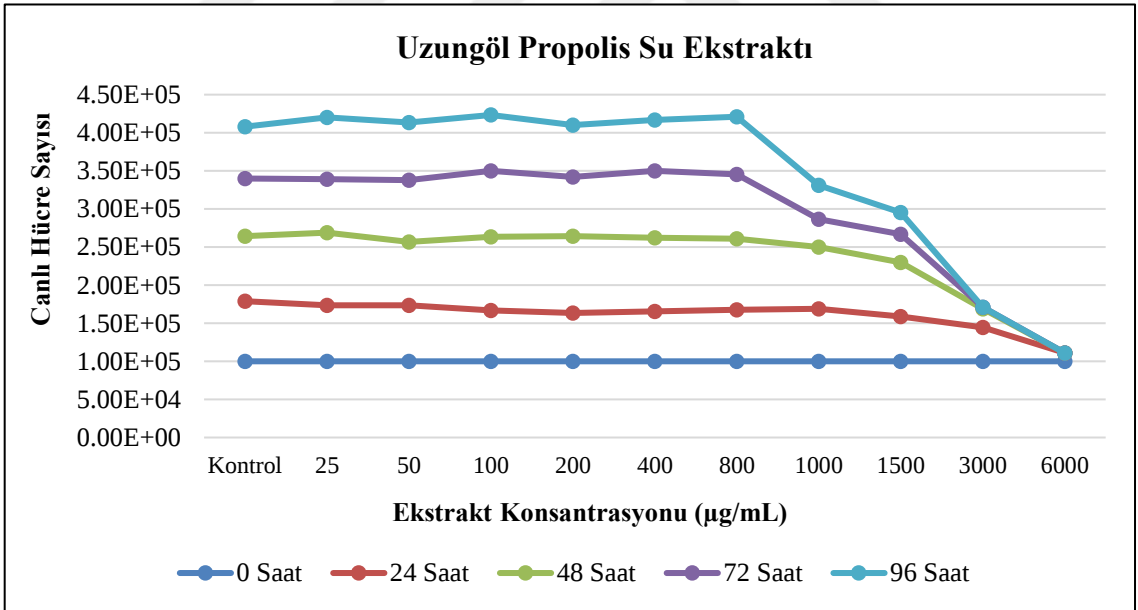
Şekil 3. Pazar propolis etanol ekstraktının tripan mavisi sitotoksite testi sonucu



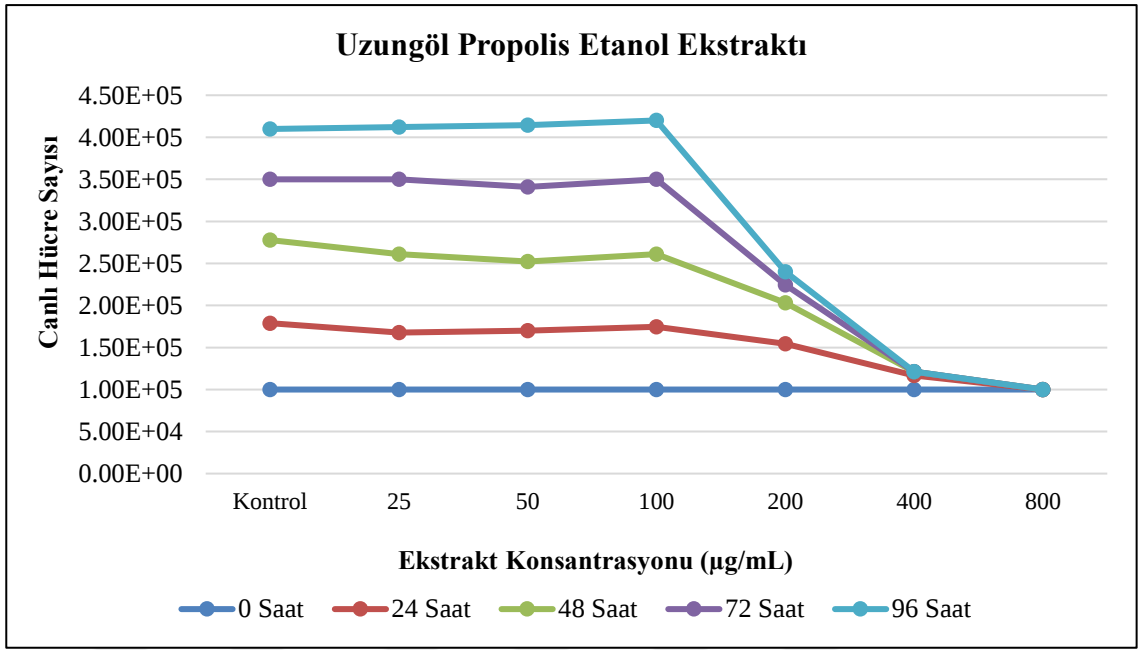
Şekil 4. Ardahan propolis su ekstraktının tripan mavisi sitotoksite testi sonucu



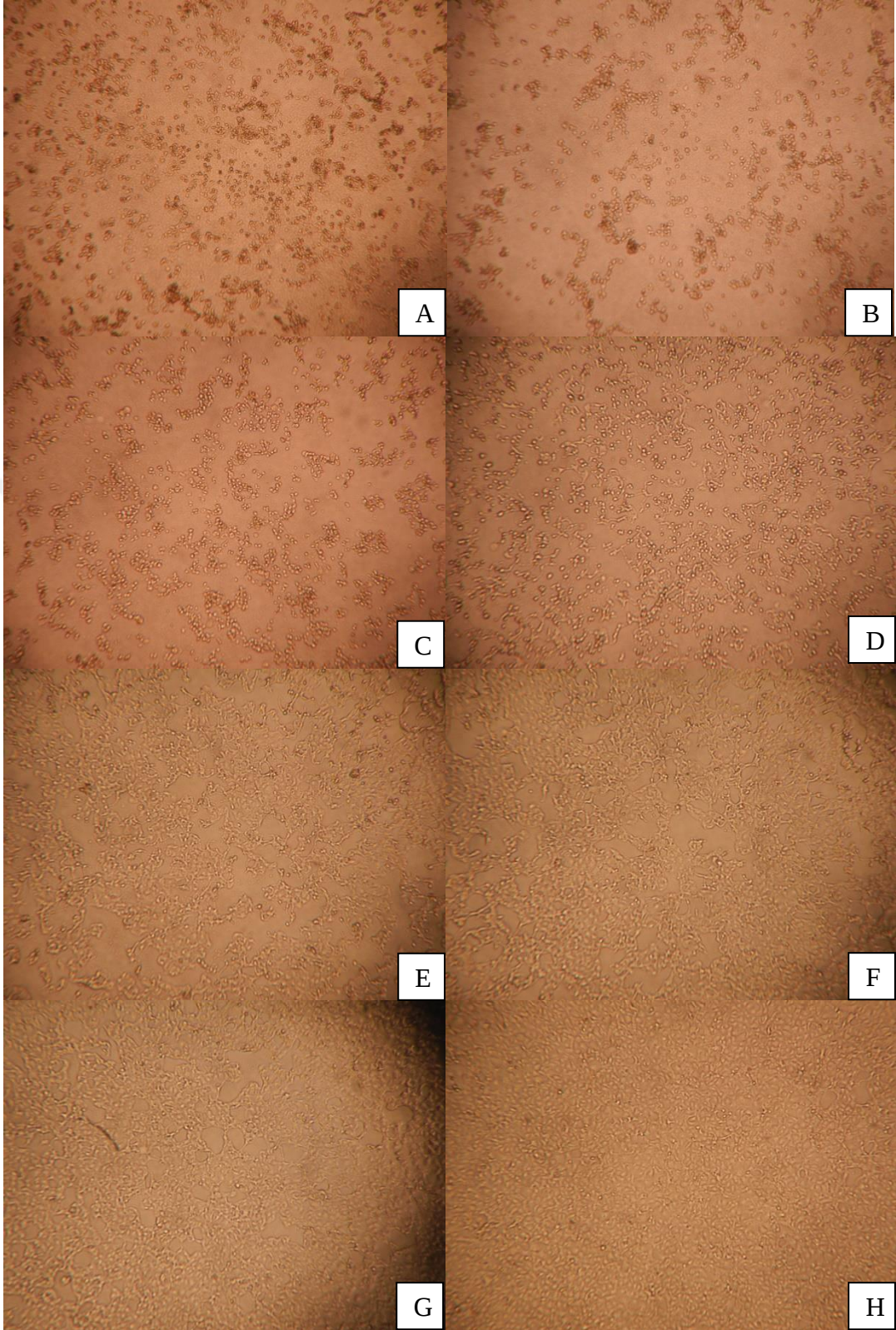
Şekil 5. Ardahan propolis etanol ekstraktının tripan mavisi sitotoksite testi sonucu



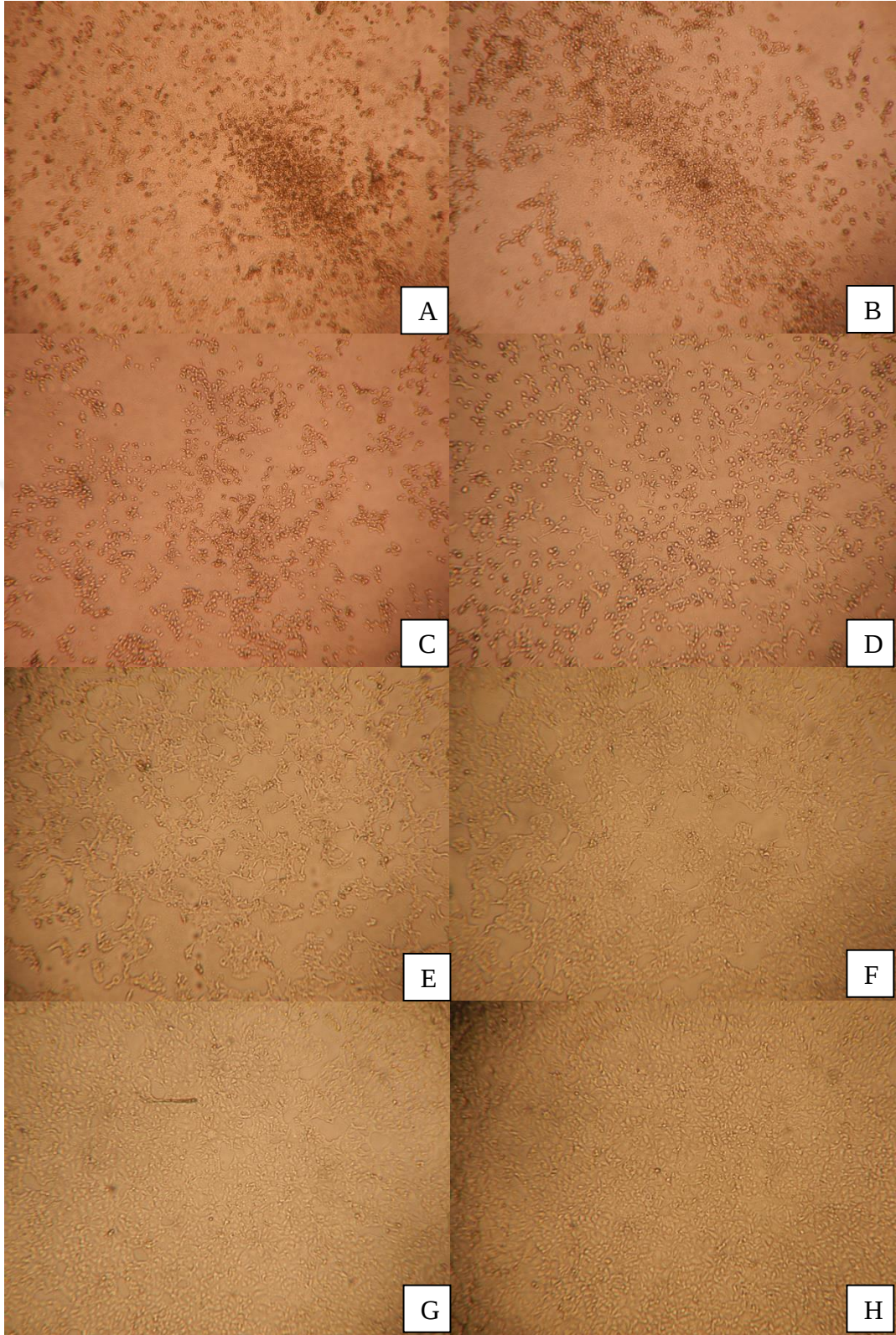
Şekil 6. Uzungöl propolis su ekstraktının tripan mavisi sitotoiksisite testi sonucu



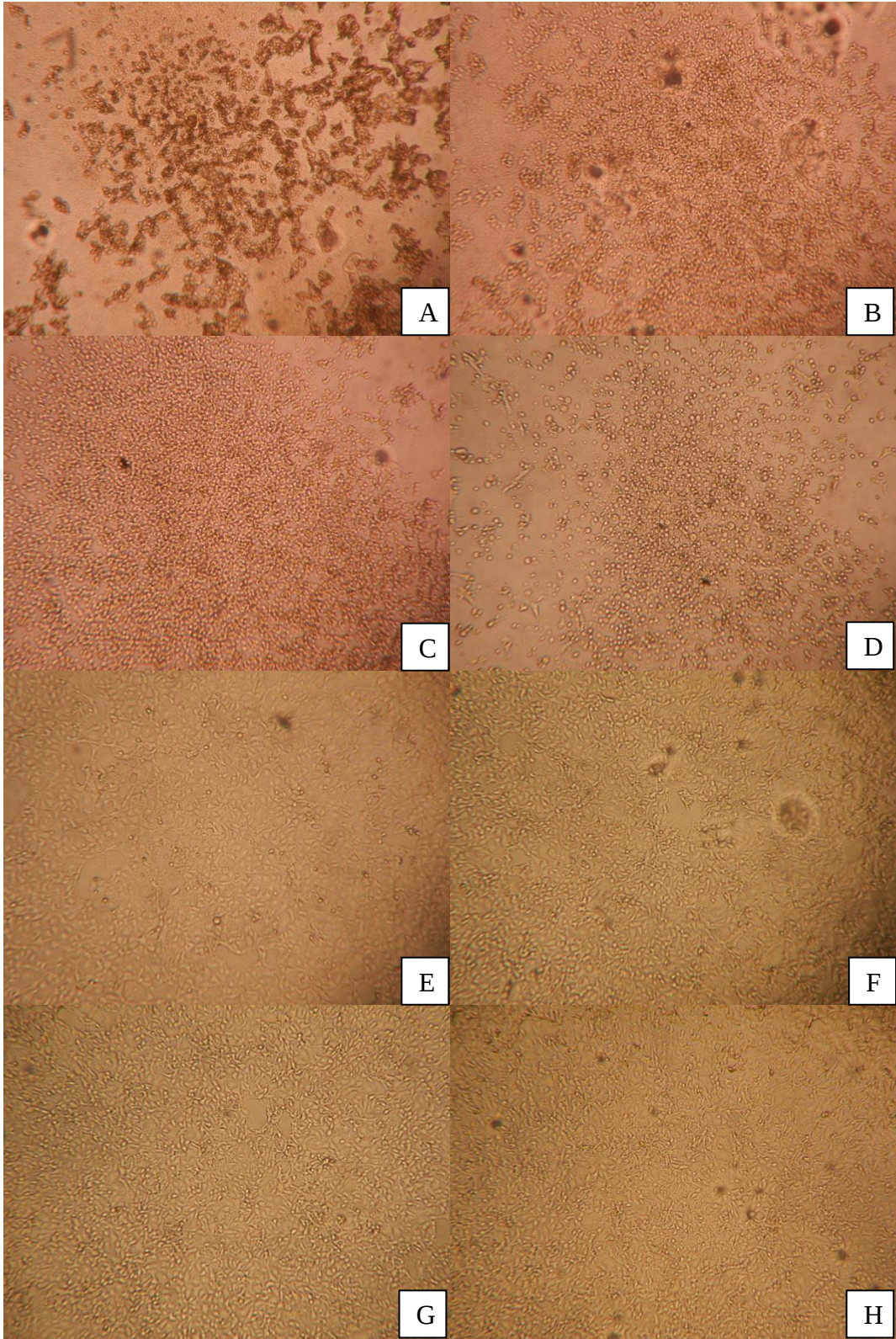
Şekil 7. Uzungöl propolis etanol ekstraktının tripan mavisi sitotoksite testi sonucu



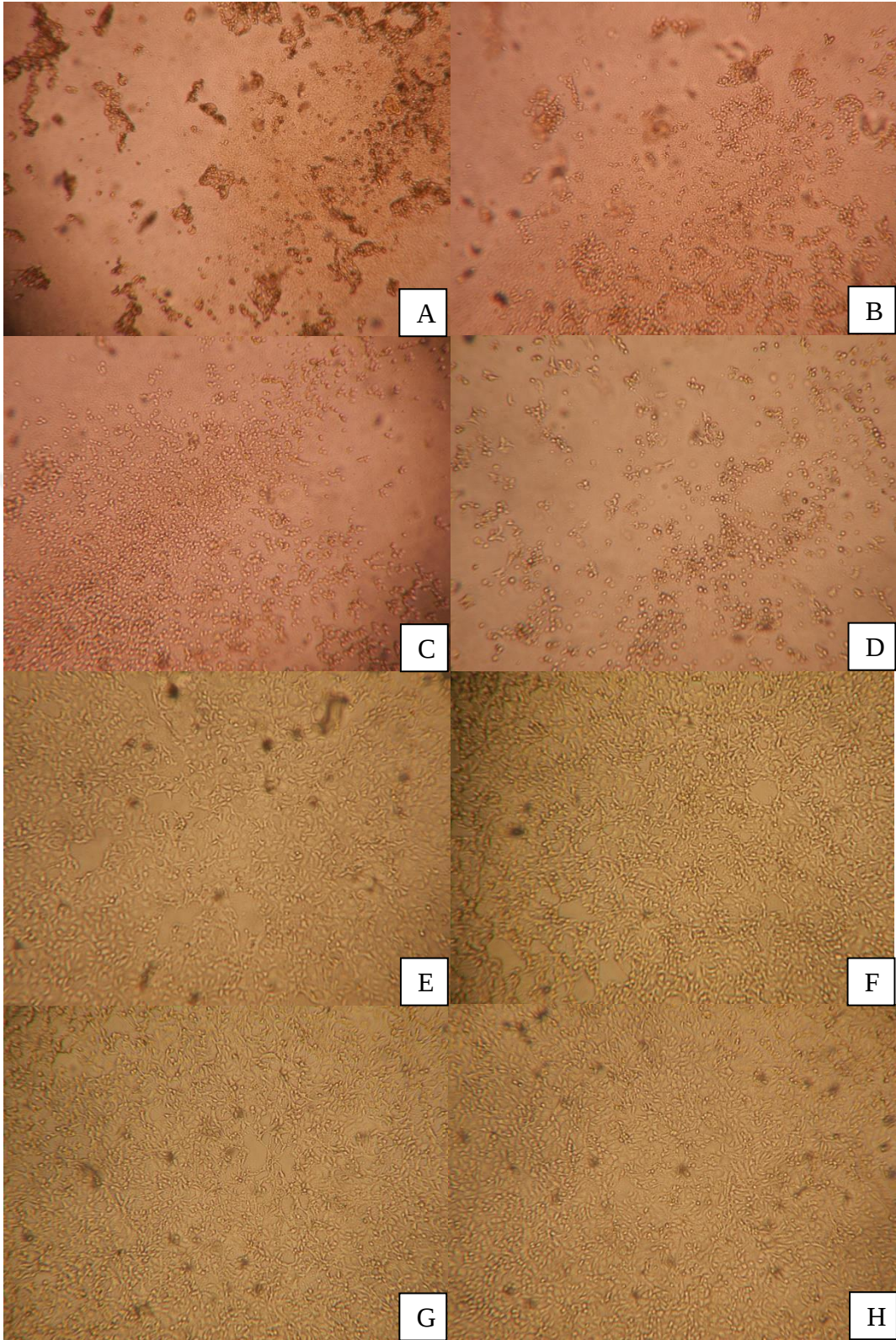
Resim 5. Ardahan propolis etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının VERO hücrelerine 24 saat muamele edilmesi. A; 800 µg/mL, B; 400 µg/mL, C; 200 µg/mL, D; 100 µg/mL, E; 50 µg/mL, F; 25 µg/mL, G; 12,5 µg/mL, H; kontrol



Resim 6. Ardahan propolis etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının VERO hücrelerine 48 saat muamele edilmesi. A; 800 µg/mL, B; 400 µg/mL, C; 200 µg/mL, D; 100 µg/mL, E; 50 µg/mL, F; 25 µg/mL, G; 12,5 µg/mL, H; kontrol



Resim 7. Pazar propolis etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının VERO hücrelerine 72 saat muamele edilmesi. A; 800 µg/mL, B; 400 µg/mL, C; 200 µg/mL, D; 100 µg/mL, E; 50 µg/mL, F; 25 µg/mL, G; 12,5 µg/mL, H; kontrol



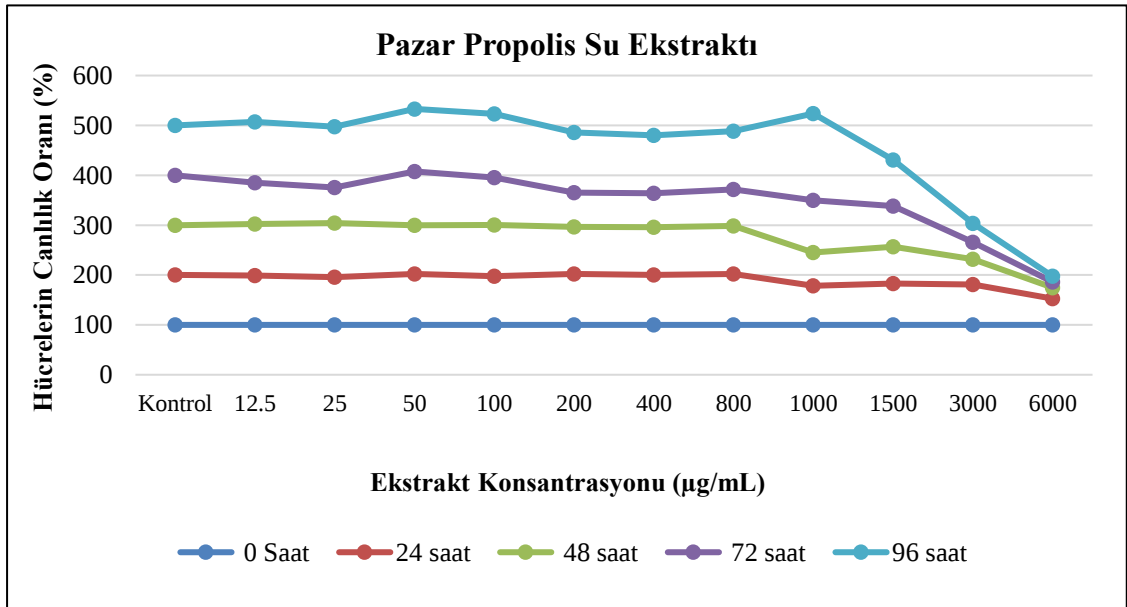
Resim 8. Pazar propolis etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının VERO hücrelerine 96 saat muamele edilmesi. A; 800 µg/mL, B; 400 µg/mL, C; 200 µg/mL, D; 100 µg/mL, E; 50 µg/mL, F; 25 µg/mL, G; 12,5 µg/mL, H; kontrol

6.3.2. MTT Testi Sonuçları

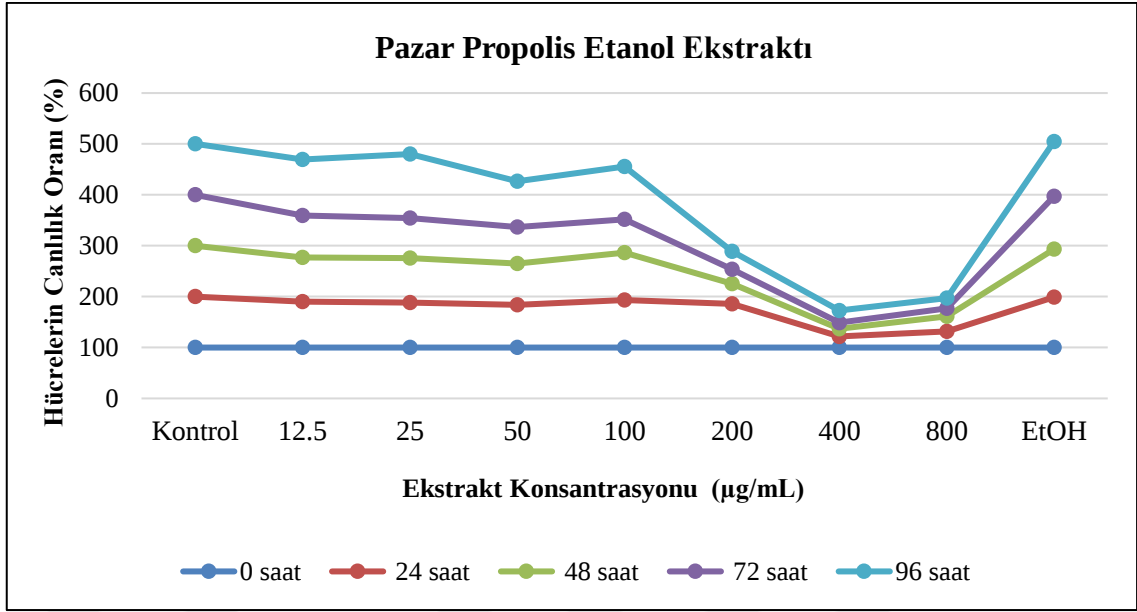
Propolis diüsyonları ile inkübe edilen VERO hücrelerinin canlılığı 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda değerlendirildi. Her dilüsyondan ve kontrolden üçer kuyucuk bulunduğundan kuyucukların spektrofotometrede verdikleri optik dansite (OD) değerlerinin ortalaması alındı. Kontrol kuyucuklarındaki hücrelerin canlılık oranı %100 kabul edilerek propolis dilüsyonlarını içeren kuyucuklardaki hücre canlılığı kontrole göre değerlendirildi.

Pazar, Ardahan ve Uzungöl propolislerinin etanollü ekstraktlarının 100 µg/mL ve aşağısındaki konsantrasyonlarda sitotoksik etkisinin görülmediği tespit edildi. Etanolik ekstraktların dilüsyonları hazırlanırken kullanılan etanol miktarının hücreler üzerine etkisine bakıldığında VERO hücrelerine sitotoksik etki göstermediği belirlendi. Bu durumda dilüsyonlarda sitotoksik etkinin propolis ekstraktlarından kaynaklandığı, etanolün görülen sitotoksistide etkisinin olmadığı anlaşıldı.

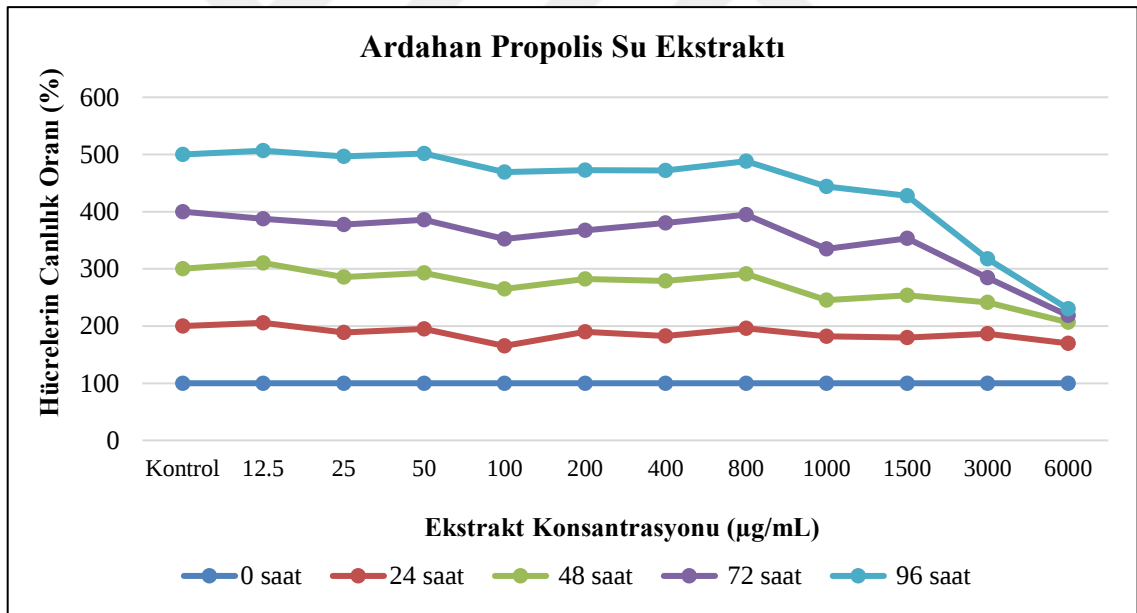
Propolislerin sulu ekstraktlarında dilüsyonlar 800 µg/mL ve aşağısındaki konsantrasyonlarda sitotoksik etkisinin görülmediği belirlendi. Sonuçlar Microsoft Excel programında değerlendirilerek grafik halinde özetlendi (Şekil 8-14).



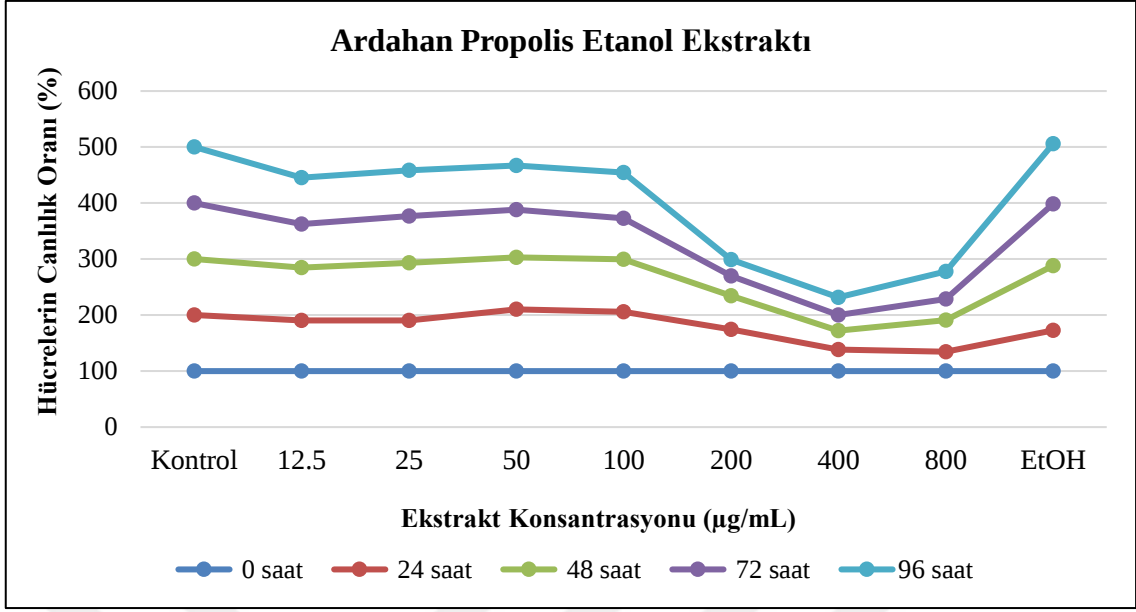
Şekil 8. Pazar propolis su ekstraktının MTT testi sonucu



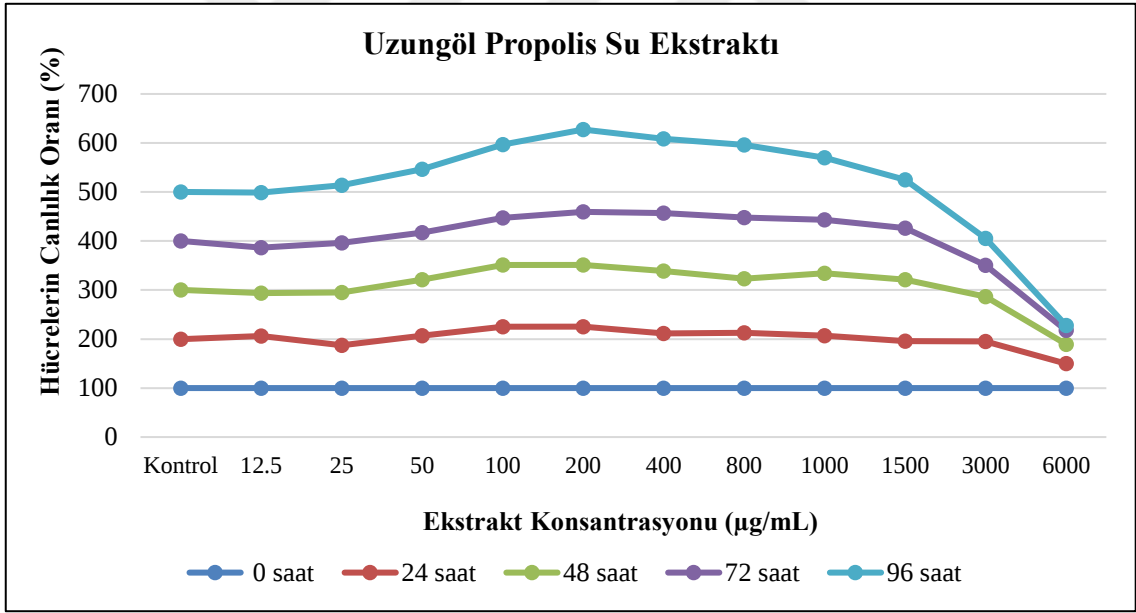
Şekil 9. Pazar propolis etanol ekstraktının MTT testi sonucu



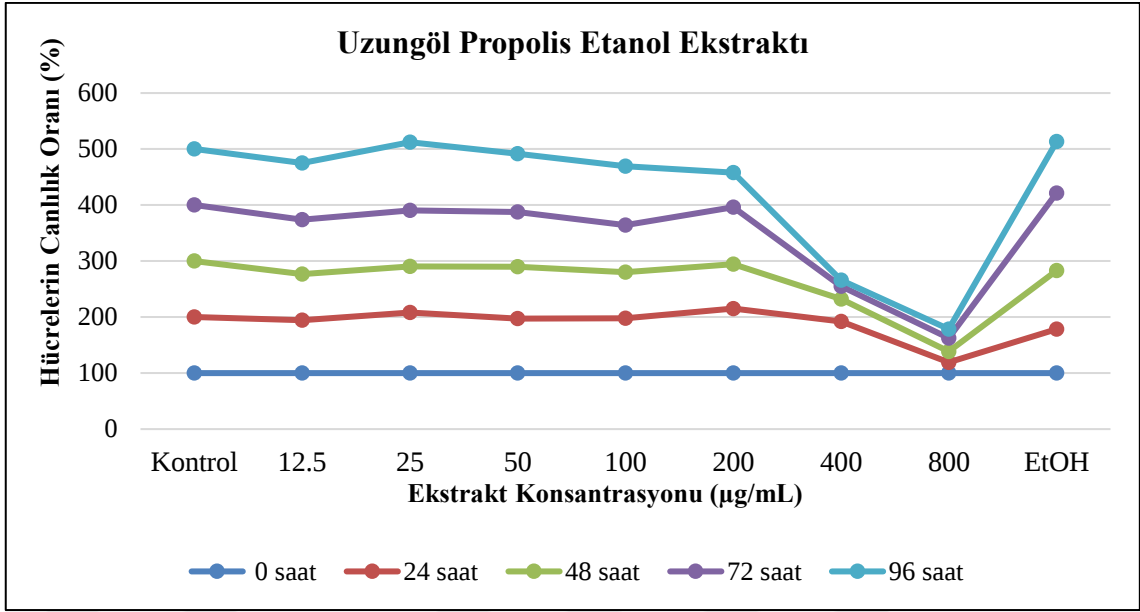
Şekil 10. Ardahan propolis su ekstraktının MTT testi sonucu



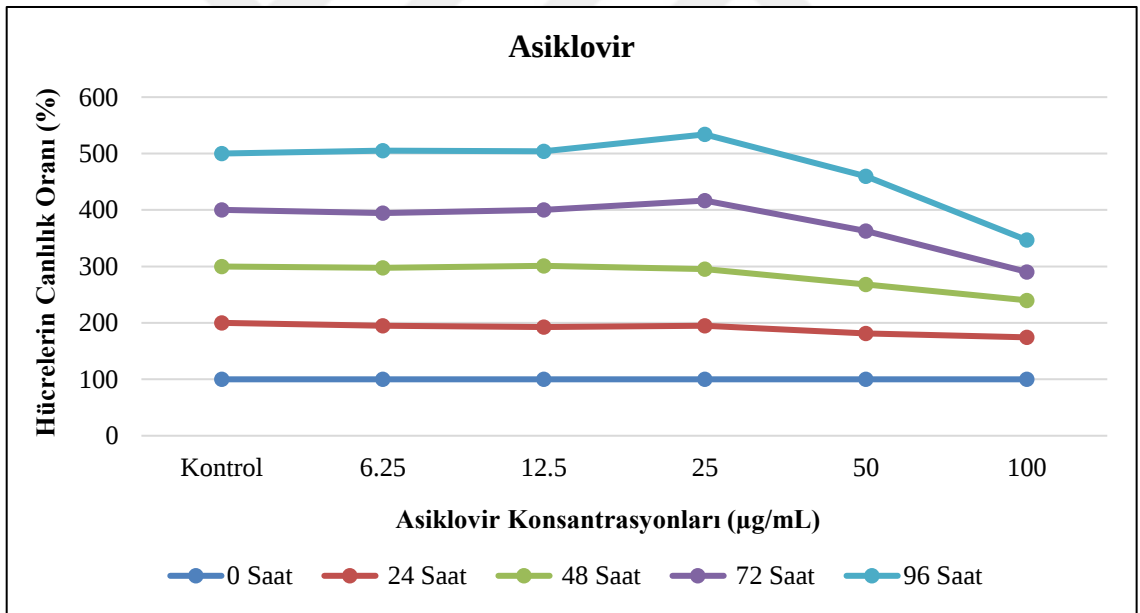
Şekil 11. Ardahan propolis etanol ekstraktının MTT testi sonucu



Şekil 12. Uzungöl propolis su ekstraktının MTT testi sonucu



Şekil 13. Uzungöl propolis etanol ekstraktının MTT testi sonucu



Şekil 14. Asiklovirin MTT testi sonucu

6.4. Propolis Ekstraktlarının HPLC-UV Analizi Sonuçları

Propolis ekstraktlarında HPLC-UV analizinde toplam 19 fenolik bileşenin varlığı araştırıldı. Bu fenolik bileşenlerden gallik asit, protokateuik asit, p-OH benzoik asit, kateşin, epikateşin, myeresetin, rasveratrol ve hesperitin hiçbir ekstraktta tespit edilmedi.

Şiringik asit sadece Ardahan propolisi etanol ekstraktında, daidzein sadece Uzungöl propolisi etanol ekstraktında tespit edildi. Pazar ve Ardahan propolisi etanol ekstraktlarında rutin ve luteolin bulunurken Uzungöl propolisi etanol ekstraktında bulunmadığı görüldü. Luteolin ve ferulik asit en yüksek oranda Pazar propolisi etanol ekstraktında tespit edilirken, kafeik asit, p-kumarik asit, rutin, t-sinamik asit, krisin, pinokembrin ve CAPE bileşenlerinin en fazla Ardahan propolisi etanol ekstraktında bulunduğu tespit edildi. Analiz sonuçları Tablo 8’de özetlendi.

Tablo 8. Propolislerin etanol ekstraktlarının HPLC-UV analizi sonuçları

Standartlar	Pazar Propolis	Ardahan Propolis	Uzungöl Propolis
mg Ekstrakt/g Numune			
Gallik Asit	ND	ND	ND
Protokateuik Asit	ND	ND	ND
p-OH Benzoik Asit	ND	ND	ND
Kateşin	ND	ND	ND
Kafeik Asit	2.03	7.14	3.77
Şiringik Asit	ND	0.34	ND
Epikateşin	ND	ND	ND
p-Kumarik Asit	1.70	2.13	1.40
Ferulik Asit	0.45	0.07	0.37
Rutin	18.03	45.28	N.D.
Mirisetin	ND	ND	ND
Resveratrol	ND	ND	ND
Daidzein	ND	ND	3.64
Luteolin	10.38	0.70	ND
t-Sinamik Asit	0.24	0.66	0.56
Hesperitin	ND	ND	ND
Krisin	19.28	90.57	68.12
Pinokembrin	10.37	40.29	23.53
CAPE	15.70	93.23	46.02

ND; Tespit edilmedi (Not Determined)

6.5. Propolis Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları

Propolislerin etanol ve su ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarları analiz edilerek miktarları mg GAE/g örnek olarak hesaplandı. Etanol ekstraktlarında en fazla fenolik madde miktarının 166.908 ± 0.46 mg GAE/g örnek ile Uzungöl propolisinde, en az ise 44.188 ± 0.48 mg GAE/g örnek ile Pazar propolisinde olduğu belirlendi.

Su ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarı incelendiğinde en fazla 20.474 ± 1.46 mg GAE/g örnek ile Uzungöl propolisinde, en az 5.868 ± 0.36 mg GAE/g örnek ile Pazar propolisinde olduğu tespit edildi. Veriler Tablo 9’da özetlendi.

Tablo 9. Propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları

Etanol Ekstraktı	Ortalama (mg Gallik Asit Eşdeğeri (GAE)/g Örnek)	Standart Sapma
Pazar	44.188	± 0.48
Propolis		
Ardahan	124.682	± 1.36
Propolis		
Uzungöl	166.908	± 0.46
Propolis		
Su Ekstraktı	Ortalama (mg Gallik Asit Eşdeğeri (GAE)/g Liyofilize Edilmiş Örnek)	Standart Sapma
Pazar	5.868	± 0.36
Propolis		
Ardahan	6.078	± 0.53
Propolis		
Uzungöl	20.474	± 1.46
Propolis		

6.7. Antiviral Aktivite Testlerinin Sonuçları

6.7.1. MTT Yöntemi Sonuçları

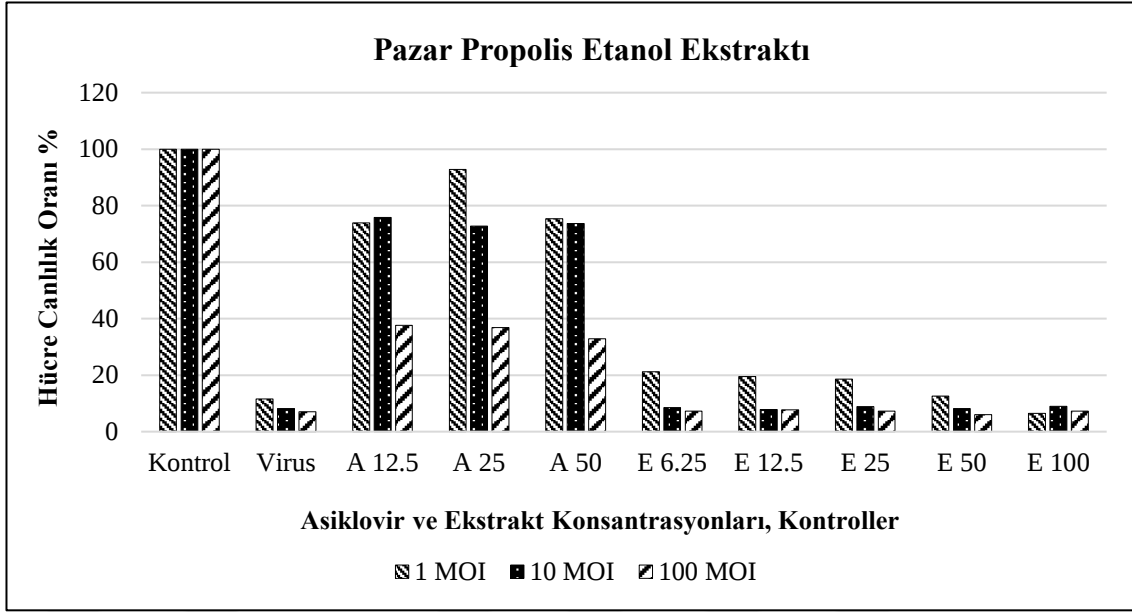
HSV-1 VERO hücrelerinde üretildiğinde litik enfeksiyon oluşturarak hücrelerin parçalanmasına neden olur. Üreme ortamına asiklovir eklendiğinde virüsün üremesi engellendiğinden ortamda var olan hücreler parçalanmaz, büyümeye devam eder. Bu yöntemde 96 kuyucuklu pleyte her kuyucuğa 10^{-4} hücre ekildi ve üzerine 1, 10, 100 MOI olacak şekilde virüs ilave edildi. Sadece hücre olup virüs içermeyen kuyucuklar, sadece virüs içeren kuyucuklar ile virüs ve 12.5-50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında

asiklovir içeren kuyucuklar kontrol olarak kullanıldı. Deney sonunda kuyucuklardaki hücrelerin canlılık oranı % olarak hesaplandı. Sadece hücre içeren kuyucuklardaki canlılık oranı %100 kabul edilerek diğer kuyucuklardaki canlılık oranı bu kuyucuklara göre değerlendirildi.

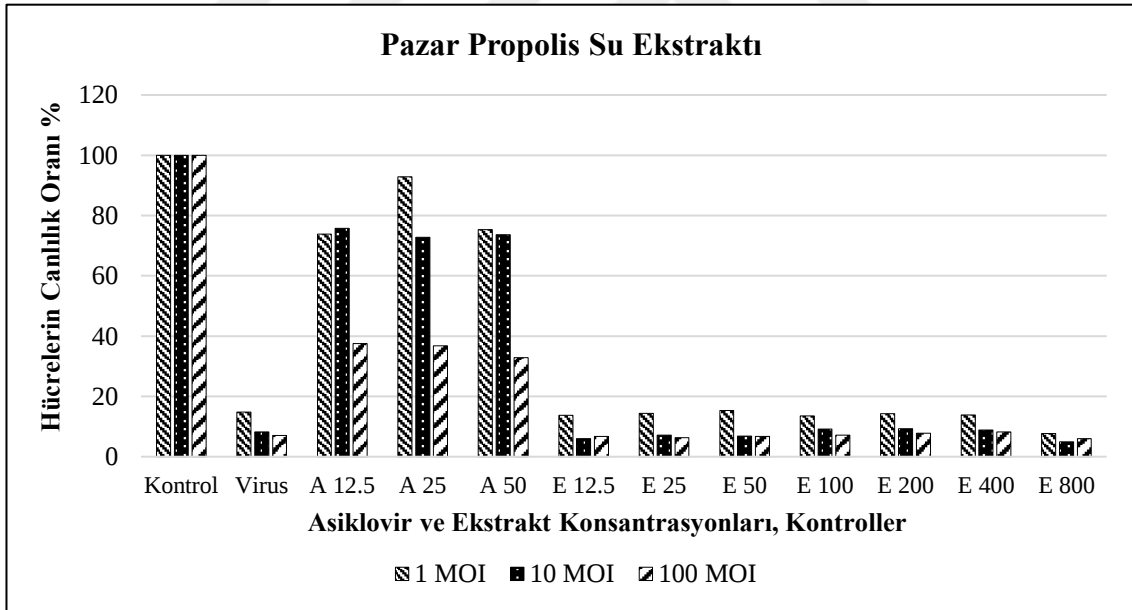
Sadece virüs içeren kuyucuklarda hücrelerin canlılık oranının virüs sayısı arttıkça azaldığı görüldü. Hücrelerin canlılık oranı 1, 10 ve 100 MOI oranında virüs içeren kuyucuklarda sırasıyla %4.8, %8.2 ve %7 olarak hesaplandı.

12.5 µg/mL konsantrasyonunda asiklovir bulunan kuyucuklardaki canlılık oranı 1, 10 ve 100 MOI içeren kuyucuklarda sırasıyla %73.9, %75.8 ve %37.6, 25 µg/mL konsantrasyonunda asiklovir bulunan kuyucuklardaki canlılık oranı 1, 10 ve 100 MOI içeren kuyucuklarda sırasıyla %92.8, %72.8 ve %36.8, 50 µg/mL konsantrasyonunda asiklovir bulunan kuyucuklardaki canlılık oranı 1, 10 ve 100 MOI içeren kuyucuklarda sırasıyla %75.3, %73.6 ve %32.8 olarak tespit edildi.

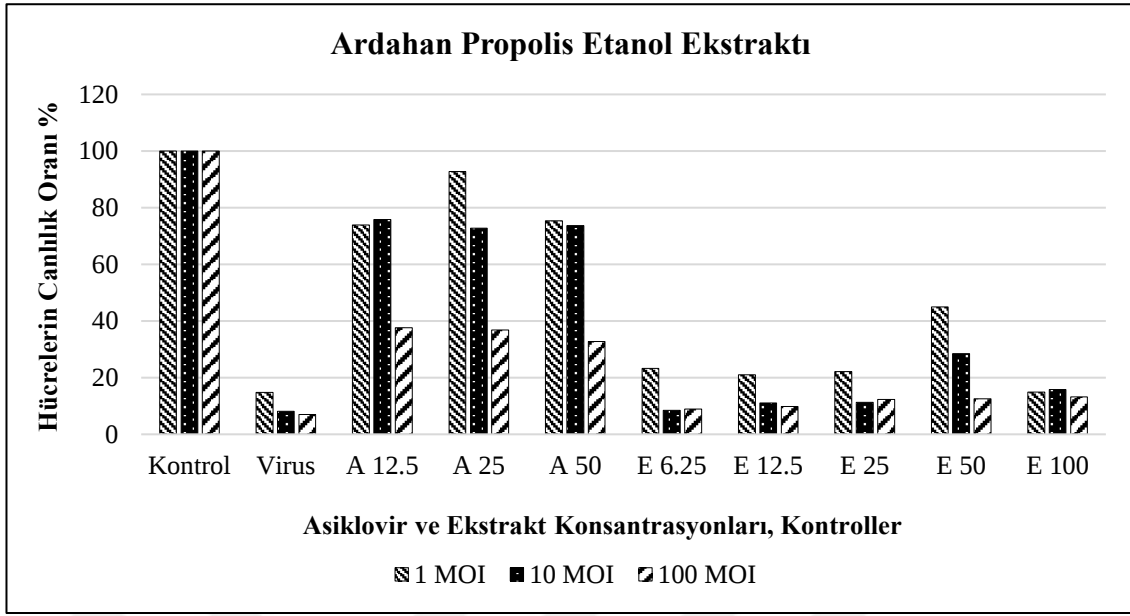
Bütün ekstraktların tüm konsantrasyonlarında virus sayısı arttıkça hücrelerin canlılık oranının azaldığı görüldü. Sulu ekstraktlarda hücrelerin canlılık oranının sadece virus içeren hücrelerdeki canlılık oranı ile benzer olduğu görüldü, böylece sulu ekstraktların HSV-1 üzerinde antiviral etkisinin olmadığı belirlendi. Etanol ekstraktlarında hücrelerin canlılık oranlarının artmış olduğu, en yüksek oranın Uzungöl propolis ekstraktının 50 µg/mL konsantrasyonunda 1 MOI oranında virus içeren kuyucukta olduğu (% 52,5), onun ardından Ardahan propolis ekstraktının 50 µg/mL konsantrasyonunda 1 MOI oranında virus içeren kuyucukların geldiği (% 44,9) tespit edildi. Ardahan ve Uzungöl propolis etanol ekstraktlarının 50 µg/mL konsantrasyonunda 1 MOI ve 10 MOI oranında virus içeren kuyucuklarda gösterdikleri etkiler istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulundu. Ekstraktların antiviral aktivitelerinin MTT testi sonuçları Şekil 15-20'de gösterildi.



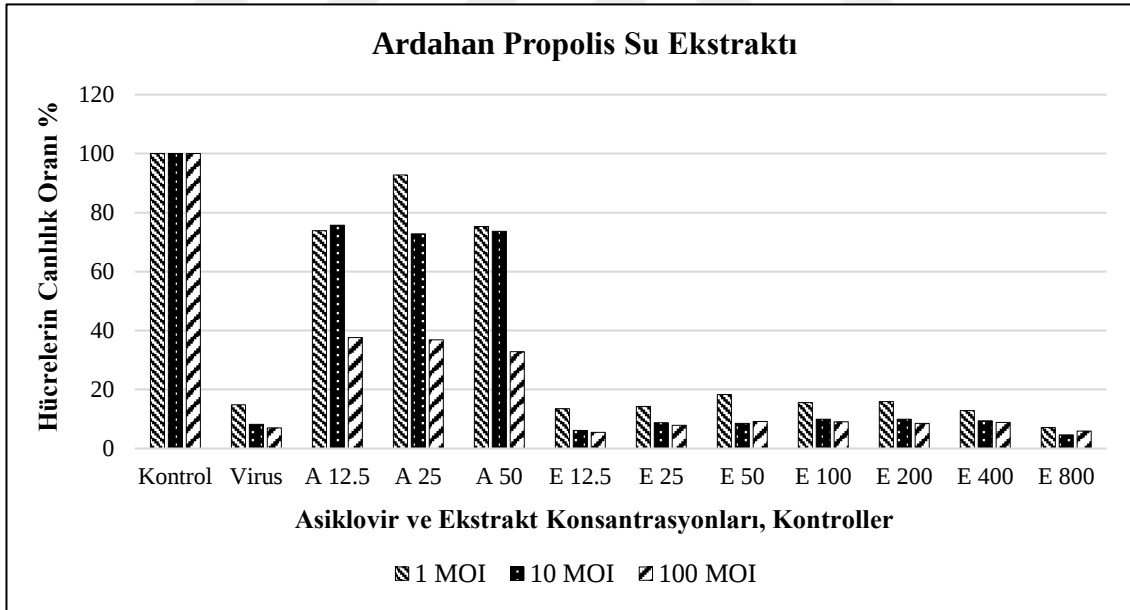
Şekil 15. Pazar propolis etanol ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virüs içeren hücreler üzerine etkisi. Kontrol; sadece VERO hücresi içeren kuyucuklar, virüs; VERO hücreleri ve virüs içeren kuyucuklar, A; asiklovir, E; ekstrakt



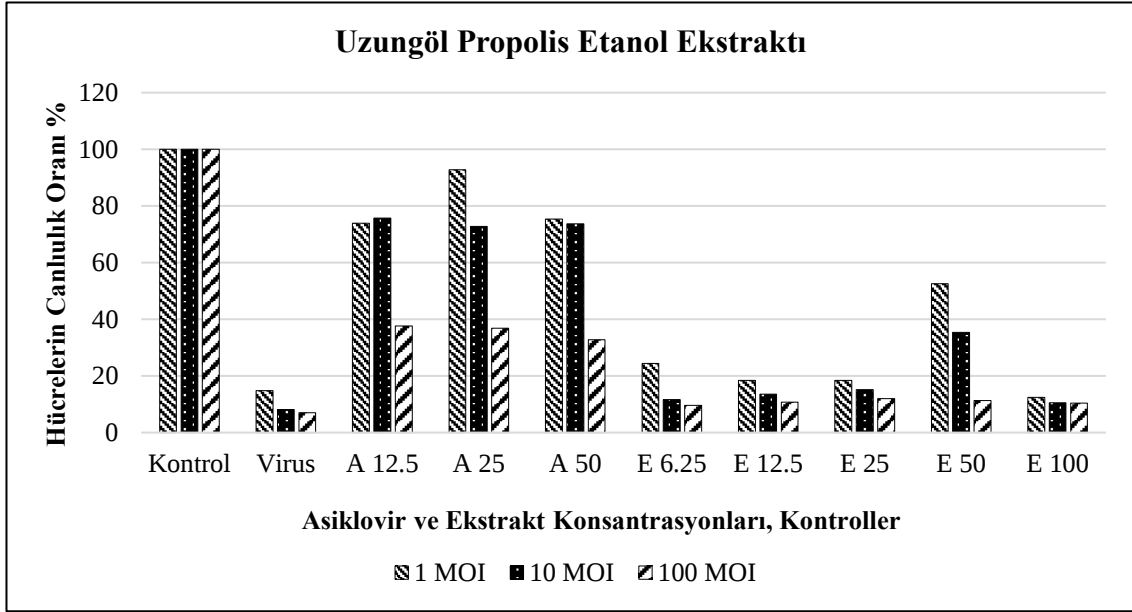
Şekil 16. Pazar propolis su ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virüs içeren hücreler üzerine etkisi. Kontrol; sadece VERO hücresi içeren kuyucuklar, virüs; VERO hücreleri ve virüs içeren kuyucuklar, A; asiklovir, E; ekstrakt



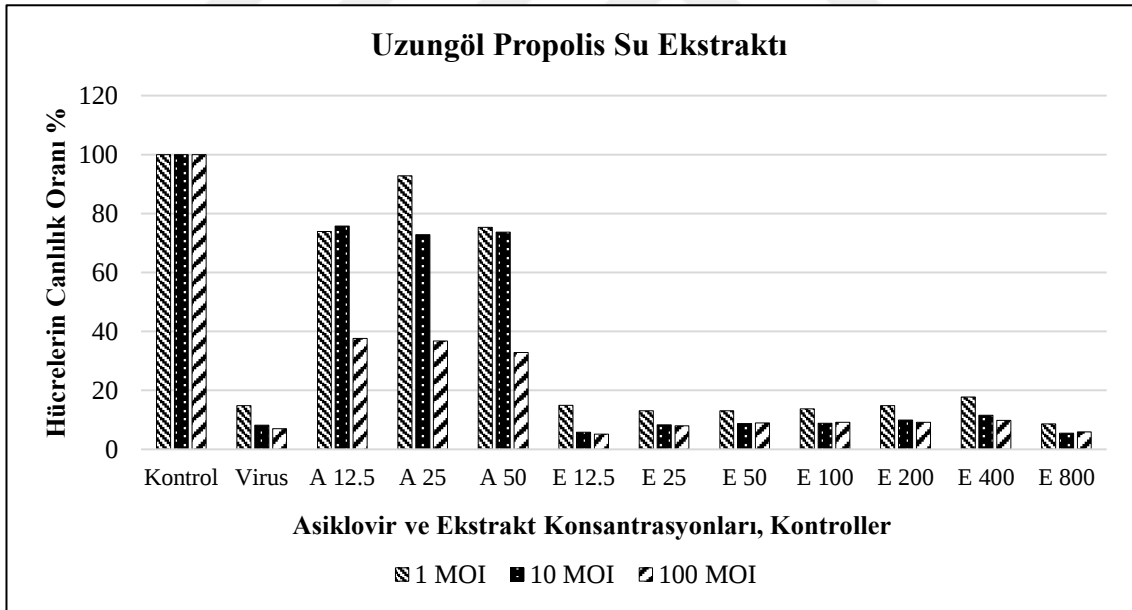
Şekil 17. Ardahan propolis etanol ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virüs içeren hücreler üzerine etkisi. Kontrol; sadece VERO hücresi içeren kuyucuklar, virüs; VERO hücreleri ve virüs içeren kuyucuklar, A; asiklovir, E; ekstrakt



Şekil 18. Ardahan propolis su ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virüs içeren hücreler üzerine etkisi. Kontrol; sadece VERO hücresi içeren kuyucuklar, virüs; VERO hücreleri ve virüs içeren kuyucuklar, A; asiklovir, E; ekstrakt



Şekil 19. Uzungöl propolis etanol ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virüs içeren hücreler üzerine etkisi. Kontrol; sadece VERO hücresi içeren kuyucuklar, virüs; VERO hücreleri ve virüs içeren kuyucuklar, A; asiklovir, E; ekstrakt



Şekil 20. Uzungöl propolis su ekstraktının 1, 10, 100 MOI oranında virüs içeren hücreler üzerine etkisi. Kontrol; sadece VERO hücresi içeren kuyucuklar, virüs; VERO hücreleri ve virüs içeren kuyucuklar, A; asiklovir, E; ekstrakt

6.7.2. RT-PCR Yöntemi Sonuçları

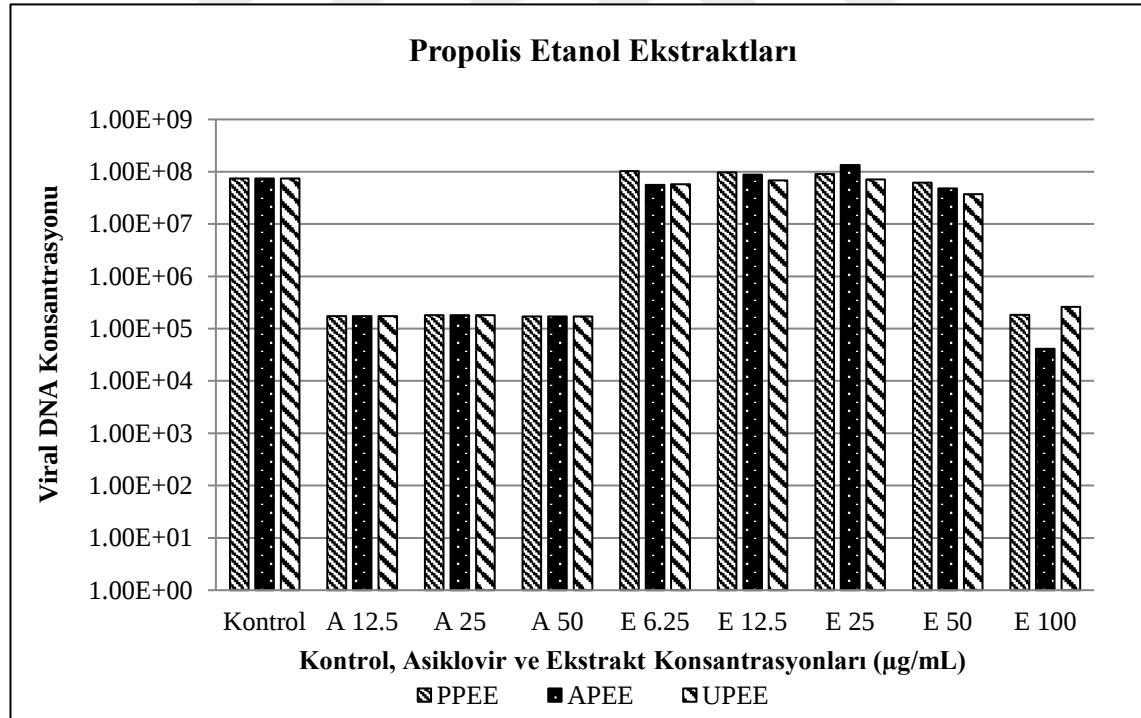
Propolis ekstraktlarının virüsün üremesi üzerine etkisini değerlendirmek için RT-PCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde konfluent olmuş VERO hücrelerini içeren

pleytin kuyucuklarına virüs eklendi. Negatif kontrol olarak sadece virüs, pozitif kontrol olarak 12.5, 25 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında asiklovir kullanıldı. Örneklerdeki viral DNA miktarı, içindeki virüs miktarı bilinen standartlar kullanılarak yapıldı.

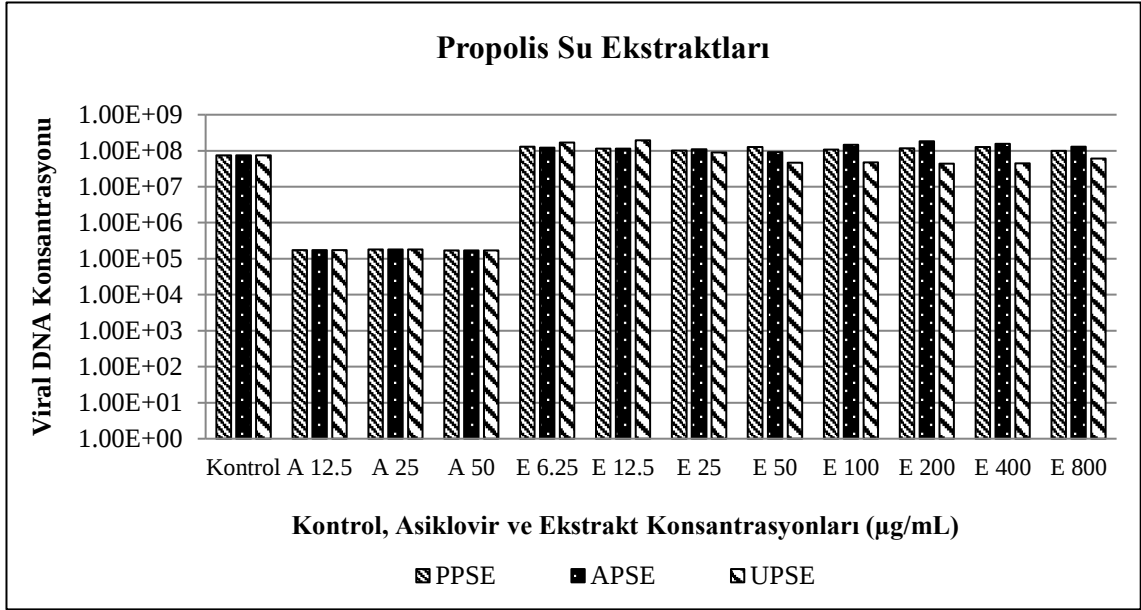
Farklı konsantrasyonlarda kullanılan asiklovirin virüsün üremesini benzer oranda engellediği belirlendi. Sadece virüs içeren kuyucukta virüs üremesinin en fazla olduğu tespit edildi.

Propolislerin su ekstraktları ile negatif kontrol arasında bir fark olmadığı, dolayısı ile sulu ekstraktların virüsün üremesi üzerine bir etkisinin olmadığı görüldü.

Etanolik ekstraktların virüs üzerine 6.25-50 µg/mL konsantrasyonlarında etki göstermedikleri, 100 µg/mL konsantrasyonda asiklovir ile benzer etki gösterdikleri belirlendi. Etanol ekstraktlarının 100 µg/mL’da gösterdikleri etki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Ardahan propolis etanol ekstraktının virüs üzerine en fazla etki gösteren etanolik ekstrakt olduğu anlaşıldı. RT-PCR sonuçları Şekil 21,22’de özetlendi.



Şekil 21. Propolislerin etanol ekstraktlarının RT-PCR sonucu. Kontrol; sadece virüs, A; asiklovir, E; ekstrakt, PPEE; Pazar propolis etanol ekstraktı, APEE; Ardahan propolis etanol ekstraktı, UPEE; Uzungöl propolis etanol ekstraktı



Şekil 22. Propolislerin su ekstraktlarının RT-PCR sonucu. Kontrol; sadece virüs, A; asiklovir, E; ekstrakt, PPSE; Pazar propolis su ekstraktı, APSE; Ardahan propolis su ekstraktı, UPSE; Uzungöl propolis su ekstraktı

6.7.3. Plak Azalma Testi Sonuçları

Propolis ekstraktlarının enfektif virüs partikülleri üzerine etkisini belirlemek amacı ile plak azalma testi yapıldı. MTT yöntemi ve RT-PCR yönteminde sulu ekstraktlarda virüs üzerine etki görülmediğinden bu testte sadece etanolik ekstraktlar değerlendirildi.

%80-90 oranında konfluent olmuş altı kuyucuklu pleytin her kuyucuğuna aynı miktarda virüs koyularak bir saatlik inkübasyondan sonra negatif kontrol kuyucuğuna agaroz içeren besiyeri, pozitif kontrol kuyucuklarına asiklovir koyuldu. Diğer kuyucuklara da test edilen ekstraktların 6.25-100 µg/mL konsantrasyonlarını içeren agarozlu besiyeri koyularak üç günlük inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyeri boşaltılarak kuyucuklar boyandı ve oluşan plaklar mikroskop altında sayıldı.

Pazar propolis etanol ekstraktı plak sayısında belirgin fark oluşturmazken, Uzungöl propolis etanol ekstraktı 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında, Ardahan propolis etanol ekstraktı ise 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında plak sayısında belirgin bir azalma oluşturduğu görüldü. Ardahan propolisi etanol ekstraktının 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlardaki etkileri ile Uzungöl propolisi etanol ekstraktının 100

$\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Ekstrakt konsantrasyonlarının plak sayısına etkileri Tablo 10’da belirtildi.

Tablo 10. Plak azalma testinde kuyucuklarda görülen plak sayıları

Ölçüm	Örnek	Plak Sayısı / Ekstrakt Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)					Negatif Kontrol
		6.25	12.5	25	50	100	
Ölçüm 1	Pazar Propolis	55	53	52	53	52	56
Ölçüm 2	Pazar Propolis	71	71	70	62	60	71
Ölçüm 1	Ardahan Propolis	55	54	38	18	7	56
Ölçüm 2	Ardahan Propolis	64	51	44	23	10	71
Ölçüm 1	Uzungöl Propolis	56	56	54	45	35	56
Ölçüm 2	Uzungöl Propolis	70	64	47	50	33	71
		Plak Sayısı / Asiklovir Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)					56
		1.56	3.125	6.25	12.5	25	
Asiklovir		5	2	1	1	0	

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Propolis arıların bitkilerden topladıkları maddeleri kendi tükürüklerindeki enzimlerle karıştırarak oluşturdukları reçinemsî bir maddedir. Arılar propolis ile kovanlarındaki çatlakları kapatır, boşlukları doldurur, duvarları güçlendirir, yani bu maddeyi bir nevi inşaat malzemesi olarak kullanırlar. Propolis aynı zamanda kovanın nem ve ısı dengesinin korunmasında da rol oynar. Tüm bu özelliklerinin dışında propolis içerdğî bileşenlerden dolayı kovanda patojen bir mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyerek arıları hastalıklara karşı korur. Propolis aynı zamanda kovana giren ve ölen yabancı böceklerin, kovandan çıkarılamayacak kadar büyük olduklarından, kovanda çürümesine engel olur (98).

Propolis eski zamanlardan beri alternatif tıpta kullanılmaktadır. Bir ara popülerliğini kaybetmiş olsa da son zamanlarda propolis üzerine yapılan çalışmalarda artış olmuştur. Bu çalışmalarda propolisin antioksidan, anti-enflamatuar, antiviral, anti-fungal, immun sistemi düzenleme ve anti-kanser gibi birçok özelliğî ortaya koyulmuştur. Propolisin bu farmakolojik özellikleri propolisin kompozisyonu, toplandığı bölge, toplandığı yerin bitki örtüsü, toplandığı mevsim ve arı türüne bağılı olarak değışkenlik gösterir. Tüm bu nedenlerden dolayı propolisin içeriğî oldukça değışken ve komplekstir. Propolisin kimyasal kompozisyonu ve farmakolojik özellikleri ile birlikte rengi, tadı ve kokusu da değışir (98, 99).

Propolisin kimyasal kompozisyonu birçok faktöre bağılı olarak değışkenlik gösterdiğî için içerdğı bileşenler araştırılmaya devam etmektedir. Propoliste en çok fenolik bileşenler bulunmakla birlikte, yaklaşık 300 bileşen tanımlanmıştır. Bileşenlerin cinsi ve miktarı türden türe farklılık gösterebilir. Tanımlanan bu bileşenler arasında fenolik asitler, flavonoidler (flavonlar, flavononlar, flavonollar ve kalkonlar), terpenler, aromatik aldehytler, alkoller, yağ asitleri, stilbenler, steroidler, aminoasitler, lignanlar ve şekerler yer alır (99).

Dünyanın farklı bölgelerinden ve farklı bitkilerden elde edilen propolislerin toplam fenolik madde miktarının araştırıldğı birçok yayın mevcuttur. Brezilya’da yapılan bir çalışmada Brezilya kırmızı propolisinin %70’lik etanol ile hazırlanan ekstraktında toplam fenolik madde miktarı 2.73 mg GAE/100 mL olarak tespit edilmiştir (100).

Almanya, İrlanda ve Çek propolislerinin analiz edildiği bir çalışmada propolislerin ekstraktları %70 etanol kullanılarak hazırlanmıştır. Bu çalışmada Almanya, İrlanda ve Çek propolislerinin toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 46.45, 52.81, 129.83 mg kafeik asit eşdeğeri (CAE)/propolis olarak bulunmuştur (101).

Brezilya'da iki farklı arı türünden (*Melipona quadrifasciata quadrifasciata* ve *Tetragonisca angustula*) elde edilen propolis örneklerinin %80'lik etanol ile hazırlanan ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 3.87 ve 1.26 mg GAE/ g propolis olarak hesaplanmıştır (102).

Brezilya'da propolislerin antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada ekstraktlar %70'lik etanol ile hazırlanmış, toplam fenolik madde miktarları kırmızı propoliste 91.3 mg GAE/g, yeşil propoliste 90.55 mg GAE/g, kahverengi propoliste 55.74 mg GAE/g olarak bulunmuştur (103).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada Hindistan propolisinin etil asetat ve etanolik ekstraktları hazırlanarak toplam fenolik bileşen miktarı analiz edilmiştir. Etil asetat ile hazırlanan ekstraktta toplam fenolik madde miktarı 18.06 mg GAE/g propolis, etanolik ekstraktta ise 34.82 mg GAE/g propolis olarak hesaplanmıştır (104).

Şili'de yapılan bir çalışmada Şili'nin Maule Bölgesinden elde edilen propolis kullanılmıştır. Bu çalışmada propolisteki toplam fenolik madde miktarı 22.82 g GAE/L olarak bulunmuştur (105).

Hindistan'ın 13 farklı bölgesinden toplanan 19 propolis örneğinin kullanıldığı bir çalışmada propolislerin etanolik ekstraktları hazırlanarak toplam fenolik madde miktarları analiz edilmiştir. Propolislerdeki toplam fenolik madde miktarlarının 72.05 µg GAE/mg ekstrakt ile 454.1 µg GAE/mg ekstrakt arasında değiştiği görülmüştür (106).

Brezilya yeşil propolisinin dental biyofilm üzerine aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, brezilya yeşil propolisin %80 etanol ile ekstraktı hazırlanarak toplam fenolik madde tayini gerçekleştirilmiş ve 88.64 µg GAE/mL olarak hesaplanmıştır (107).

Çin'de yapılan bir çalışmada Çin propolisi, *Baccharis* propolisi ve *Eucalyptus* propolisinin %95'lik etanol ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır.

Yapılan çalışmada propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları Çin propolisinde 192.80, *Baccharis* propolisinde 135.07, *Eucalyptus* propolisinde 217.70 mg GAE/g propolis olarak belirlenmiştir (108).

Hırvatistan'ın sekiz farklı bölgesinden elde edilen sekiz Hırvat propolisinin analiz edildiği bir çalışmada propolislerin etanol ekstraktları kullanılmıştır. Propolislerdeki toplam fenolik madde miktarının 1,589.3 ile 14,398.3 mg GAE/L etanol ekstrakt arasında değiştiği belirlenmiştir (109).

Polonya'nın çeşitli bölgelerinden elde edilen propolislerin fenolik kompozisyonu ve antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada örneklerdeki toplam fenolik madde miktarının 150.05 ile 197.14 mg GAE/g propolis arasında değiştiği gösterilmiştir (110).

Bolivya'da yapılan bir çalışmada 10 propolis örneğinin metanol ekstraktları hazırlanarak kimyasal profilleri belirlenmiş ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Sekiz propolis örneğinde toplam fenolik madde miktarının 9.48 ile 176.0 g GAE/kg propolis arasında değiştiği görülmüştür. Bununla birlikte iki propolis örneğinde fenolik madde miktarı tespit edilmemiştir (111).

Arajntin'in farklı bölgelerinden yedi propolis örneği alınmış ve bu örneklerin su ve %80'lik etanol ile ekstraktları hazırlanmıştır. Etanol ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı 27.3-42.4 g GAE/g propolis olarak tespit edilirken su ekstraktlarında bu oran 0.9-2.2 g GAE/ g propolis olarak bulunmuştur (112).

Tayland'ın Phayao şehrinden elde edilen propolisin %70'lik alkol kullanılarak iki farklı yöntem (maserasyon ve sonikasyon) ile hazırlanan ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 17.17 mg GAE/g propolis ve 18.27 mg GAE/g propolis olarak belirlenmiştir (113).

Türkiye'de yapılan ve propolislerin inhibisyon özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada Ankara, Kars, Erzurum, Zonguldak, Düzce ve Giresun propolislerinin etanolik ekstraktları kullanılmıştır. Bu çalışmada propolislerin toplam fenolik madde miktarlarının 114.207 ile 261.055 mg GAE/g propolis arasında olduğu tespit edilmiştir. Toplam fenolik bileşen miktarının en fazla Zonguldak propolisinde, en az Düzce propolisinde olduğu tespit edilmiştir (114).

Bu çalışmaya Doğu Karadeniz Bölgesinin üç farklı bölgesinden (Rize'nin Pazar ilçesinden, Ardahan ilinden ve Trabzon'un Uzungöl mevkiinden) elde edilen propolis örnekleri dahil edilmiştir. Propolis örneklerinin ekstraktları hem %70'lik alkol ile hem de distile su kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarları Uzungöl propolis etanol ekstraktında (UPEE) 166.908, Ardahan propolis etanol ekstraktında (APEE) 124.682, Pazar propolis etanol ekstraktında (PPEE) 44.188, Uzungöl propolis su ekstraktında (UPSE) 20.474, Ardahan propolis su ekstraktında (APSE) 6.078, Pazar propolis su ekstraktında (PPSE) 5.868 mg GAE/ g propolis olarak bulunmuştur.

Son yıllarda gelişen HPLC tekniği ile birlikte propolis içerisindeki fenolik bileşenlerin analiz edildiği çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Çin'de yapılan bir çalışmada Çin'in Zhejiang şehrinden ve Brezilya'nın Minas Gerais eyaletinden toplanan propolislerden %95'lik etanol kullanılarak ekstraktlar hazırlanmış ve HPLC-DAD/Q-TOF-MS ile fenolik bileşen analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizde 27 farklı bileşenin varlığı araştırılmıştır. Brezilya propolis ekstraktında p-kumarik asit, kuersetin, kaempferol, galangin ve artepilin C olmak üzere sadece beş bileşenin bulunduğu, bunlardan en fazla bulunan bileşenin 25.6 mg/g propolis ile artepilin C olduğu tespit edilmiştir. Çin propolis ekstraktında ise protokateşuik asit, vanilik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, trans-izoferulik asit, 3,4-dimetoksinamik asit, gallik asit, sinamik asit, kuersetin, pinobanksin, luteolin, hesperitin, kaempferol, galangin, pinokembrin, 3-O-asetilpinobanksin, krisin, CAPE ve apigenin olmak üzere 20 bileşenin varlığı gösterilmiştir. Klorojenik asit, şiringik asit, rutin, morin, mirisetin ve kurkumin her iki ekstraktta da bulunmazken, artepilin C Çin propolis ekstraktında bulunamamış fakat Brezilya propolis ekstraktında tespit edilmiştir. Çin propolis ekstraktında en fazla bulunan bileşenin 29.48 mg/g propolis ile CAPE olduğu, bunu 4.03 mg/ g propolis ile luteolinin takip ettiği görülmüştür (115).

Brezilya'daki bir çalışmada Brezilya kırmızı propolisinin etanol ekstraktının HPLC ile fenolik bileşen analizi LC-DAD-ESI-MS ile gerçekleştirilmiş, ekstraktta luteolin, rutin, kuersetin, daidzein, p-kumarik asit ve 2,4-dihidroksibenzoik asit varlığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmada ekstraktta bunların dışında fenolik bileşene rastlanmadığı belirtilmiştir. Fenolik bileşenlerden 17.2 µg/mL ile p-kumarik asitin en fazla olduğu, bunu 15.23 µg/mL ile luteolinin takip ettiği görülmüştür (100).

Brezilya’da iki farklı arı türünden elde edilen propolislere yapılan HPLC-DAD analizinde *M. quadrifasciata quadrifasciata*’nın ürettiği propoliste gallik asit, vanilin, p-kumarik asit ve kuersetin bulunurken, *T. angustula*’nın ürettiği propoliste sadece gallik asit varlığı gösterilmiştir (102).

Meksika’da yapılan bir çalışmada toplanan propolisten ile ekstrakt hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Ekstraktta en fazla görülen fenolik bileşiğin pinokembrin olduğu, bunu pinostrobin, prenile fenilproponoidler ve izalpininin takip ettiği görülmüştür (116).

Almanya, İrlanda ve Çek propolislerinin etanolik ekstraktlarının HPLC analizi sonucunda Almanya propolisinde kafeik asit ve pinokembrin, İrlanda propolisinde pinokembrin ve galangin bulunurken, Çek propolisinde kafeik asit, trans-p-kumarik asit, pinokembrin, sinamik asit ve galangin tespit edilmiştir (101).

Brezilya’da propolislerin antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada kırmızı, yeşil ve kahverengi propolislerin içerisindeki 28 fenolik bileşen UHPLC-QqQ-MS/MS ile analiz edilmiştir. Analiz edilen bileşenlerden α -siyano-4-hidroksisinamik asit hiçbir propoliste bulunamamıştır. Daidzein sadece yeşil propoliste, kafeik asit, CAPE, kateşin, krisin, sinamik asit, epikateşin, kaempferide, kuersetin-3-glukozid ve trans-izoferulik asit sadece kırmızı propoliste bulunamamıştır. Acacetin, apigenin, artepilin C, biochanin A, klorojenik asit, eriodictyol, gallik asit, isorhamnetin, kaempferol, luteolin, naringenin, p-kumarik asit, pinokembrin, protokateşinik asit, rutin, vanilin ve vanilik asit tüm propolislerde değişen miktarlarda tespit edilmiştir. Kırmızı propoliste en fazla luteolin, yeşil propoliste en fazla kaempferide, kahverengi propoliste ise en fazla artepilin C bulunduğu görülmüştür (103).

Hindistan’da yapılan bir çalışmada 19 propolis örneğinin etanolik ekstraktlarında gallik asit, naringin, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, kuersetin ve sinamik asit fenolik bileşenleri HPLC ile araştırılmıştır. Gallik asit 12/19 ekstraktta, naringin 3/19 ekstraktta, kafeik asit 9/19 ekstraktta, p-kumarik asit 16/19 ekstraktta, ferulik asit 3/19 ekstraktta, kuersetin 6/19 ekstraktta, sinamik asit 9/19 ekstraktta bulunmuştur. Birbirine yakın noktalardan alınan örneklerde bile fenolik bileşen içeriğinin ve miktarlarının oldukça değişken olduğu gözlemlenmiştir (106).

Şili'nin Maule Bölgesi'nden elde edilen propolisin HPLC-DAD analizinde propolisin aldehit benzoik asit, kafeik asit, p-vanilin, p-kumarik asit, cis-ferulik asit, trans-ferulik asit, veratrik asit, kafeik asit ester, apigenin, sinamik asit, kuersetin-7-metil ester, pinobanksin-5-metil eter ve kuersetin içerdiği gösterilmiştir. Propoliste en fazla kuersetinin bulunduğu görülmüştür (105).

Malezya'da yapılan bir çalışmada Malezya propolisinin %80'lik etanol ve etil asetat ekstraktları hazırlanarak HPLC ile flavonoid analizi gerçekleştirilmiştir. Kafeik asit, rutin ve sinamik asit iki ekstraktta da bulunmazken, iki ekstraktın farklı oranlarda kuersetin, luteolin, kaempferol, apigenin ve pinokembrin içerdiği belirtilmiştir. İki ekstraktta da en fazla kaempferol, en az luteolin bulunmuştur (117).

Yunanistan'ın sekiz farklı bölgesinden elde edilen propolislerin %75'lik etanol ile hazırlanan ekstraktların fenolik bileşen analizi HPLC-ESI-PDA/MS ile yapılmıştır. Propolis ekstraktlarında 42 fenolik bileşenin arandığı bu çalışmada pinokembrin ve krisin tüm ekstraktlarda bulunurken, galangin, gallik asit ve p-kumarik asit sadece bir ekstraktta, apigenin, pinobanksin ve CAPE sadece iki ekstraktta bulunamamıştır. Analiz edilen örneklerin dördünde pinokembrin, ikisinde krisin, birinde pinobanksin-3o-asetat, birinde(+)-kateşinin en fazla olduğu tespit edilmiştir (118).

Çin'de yapılan bir çalışmada Çin propolisi, *Baccharis* propolisi ve *Eucalyptus* propolisinde 27 fenolik bileşen HPLC analizi ile araştırılmış, bu bileşenlerden hiçbir *Baccharis* propolisinde bulunamamıştır. *Eucalyptus* propolisinde 27 fenolik bileşenden 12'si, Çin propolisinde ise 27 fenolik bileşenden beşi bulunamamıştır. *Eucalyptus* propolisinde en fazla bulunan fenolik bileşenin galangin olduğu, Çin propolisinde ise en fazla bulunan fenolik bileşenin 3-O-asetilpinobanksin olduğu görülmüştür (108).

Hırvatistan'da yapılan bir çalışmada sekiz Hırvat propolisinin HPLC-DAD analizinde vanilin, p-kumarik asit, ferulik asit, krisin, galangin ve CAPE fenolik bileşenleri aranmıştır. Propolislerden birinde bu bileşenlerden hiçbirine rastlanmamıştır. İki propoliste bileşenlerin hepsi, bir propoliste bileşenlerden beşi, iki propoliste bileşenlerden dördü, iki propoliste bileşenlerden üçü olduğu anlaşılmıştır. Propolislerden ikisinde en fazla galangin, ikisinde en fazla krisin, ikisinde en fazla p-kumarik asit, birinde en fazla ferulik asit olduğu görülmüştür (109).

Polonya'daki bir çalışmada fenolik bileşenler açısından incelenen propolislerde en fazla bulunan fenolik asitin 37.54 ile 116.95 mg/g arasında değişen miktarlarda p-kumarik asit olduğu belirlenmiştir. Örneklerde aynı zamanda ferulik asitin de fazla miktarda bulunduğu görülmüştür. Örneklerdeki flavonoidler incelendiğinde ise krisin ve galanginin baskın olduğu, iki örnekte ise naringinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (110).

Hatay'da yapılan bir çalışmada Hatay propolisinde 34 fenolik bileşen HPLC-DAD ile analiz edilmiş, Hatay propolisinde en fazla bulunan bileşenin galangin olduğu tespit edilmiştir (119).

Çalışmamızda propolisin farmakolojik özelliklerini belirleyen unsurlar olan fenolik bileşenler HPLC-UV ile analiz edilmiştir. Gallik asit, protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, kateşin, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, p-kumarik asit, ferulik asit, rutin, mirisetin, resveratrol, daidzein, luteolin, t-sinamik asit, hesperitin, krisin, pinokembrin ve CAPE olmak üzere toplam 19 bileşen varlığı araştırılmıştır. Şiringik asit sadece APEE'de, daidzein sadece UPEE'de tespit edilmiştir. PPEE ve APEE'de rutin ve luteolin bulunurken UPEE'de bulunmadığı görülmüştür. Luteolin ve ferulik asit en yüksek oranda PPEE'de tespit edilirken, kafeik asit, p-kumarik asit, rutin, t-sinamik asit, krisin, pinokembrin ve CAPE bileşenlerinin en fazla APEE'de bulunduğu tespit edilmiştir. Gallik asit, protokatekuik asit, p-OH benzoik asit, kateşin, epikateşin, miriseitn, resveratrol ve hesperitin ise hiçbir ekstraktta bulunmamıştır.

Hem dünyada hem de ülkemizde yapılan çalışmalarda propolislerdeki toplam fenolik madde miktarlarının yakın bölgelerden elde edilen propolislerde bile birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Aynı bölgeden farklı zamanlarda alınan propolis örneklerinde dahi bu değişim gözlenmiştir. Bunların dışında farklı arı türlerinin ürettiği propolislerin toplam fenolik madde miktarlarının da birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle propolislerde olması gereken toplam fenolik madde miktarı ile ilgili standart bir değer aralığı mevcut değildir. Bununla birlikte çalışmada kullanılan propolislerdeki toplam fenolik madde miktarları benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında, PPEE'nin çalışmada kullanılan diğer etanol ekstraktlarına nispeten düşük miktarda fenolik madde içermekle birlikte Hindistan, Şili, Tayland propolisleri gibi birçok propolisten daha fazla oranda fenolik madde içerdiği görülmüştür. APEE ve

UPEE'nin toplam fenolik madde miktarları ise Almanya, İrlanda, Arjantin propolislerinden fazla bulunurken, Çin, Hırvatistan ve Polonya propolislerinden az bulunmuştur. Ankara, Kars, Erzurum, Zonguldak, Düzce ve Giresun propolislerinin etanolik ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ile kıyaslandığında ise PPEE'nin bütün bu propolislerden oldukça az miktarda fenolik madde içerdiği, APEE'nin Giresun propolisi dışındaki tüm propolislerden düşük miktarda içeriğe sahip olduğu, UPEE'nin ise Zonguldak ve Kars propolisleri hariç hepsinden yüksek miktarda fenolik madde içerdiği görülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları kendi içinde kıyaslandığında, bütün propolislerin Doğu Karadeniz Bölgesinden olmasına rağmen toplam fenolik madde miktarlarının üç propolis ekstraktında da farklı olduğu görülmüştür. Propolis kompozisyonunun iklim, bitki örtüsü, toplandığı mevsim gibi parametrelere bağlı olarak değiştiği bilgisi göz önüne alındığında böyle bir farkın meydana gelmesinin olağan olduğu anlaşılmıştır. Etanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının su ekstraktlarından kat kat fazla olmasının, propolisin içindeki bileşenleri çözme konusunda suyun eksik kalmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu durumun literatürde yer alan veriler ile benzer olduğu görülmüştür. Propolis ekstraktı hazırlarken kullanılan farklı çözücülerin etkinlikleri karşılaştırıldığında anlaşılmıştır ki propolis içerisindeki bileşenleri ayırmak için kullanılan en iyi çözücü etanoldür.

Propolis içerisindeki fenolik bileşenlerin cinsi ve miktarları da tıpkı toplam fenolik madde miktarında olduğu gibi iklim, bitki örtüsü, propolisin toplandığı mevsim gibi parametrelere bağlı olarak değişmektedir. Yine aynı nedenlerden dolayı belli bir bölgeden elde edilen propoliste her zaman aynı fenolik bileşenlerin olması ve baskın fenolik bileşenin sabit olması söz konusu değildir. Propolisin içerdiği fenolik bileşenlerin farmakolojik özellikleri araştırılmaya devam etmekle birlikte bazı fenolik bileşenlerin biyolojik aktiviteleri tespit edilmiştir. Bu bakış açısıyla değerlendirildiğinde fazla miktarda CAPE içeren bir propolisin anti-kanser, krisin miktarı fazla olan bir propolisin ise antibakteriyel özellik göstermesi beklenebilir. Nitekim yapılan çalışmada toplam fenolik madde miktarı en fazla UPEE'de bulunmasına rağmen, krisin miktarı en fazla olan APEE'nin UPEE'den daha fazla anti-HSV-1 aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

Propolisin HSV-1 üzerine antiviral etkisinin değerlendirildiği çalışmalar araştırıldığında literatürde kısıtlı sayıda çalışmanın olduğu görülmüştür. Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada herpes labialis'i olan 189 hasta %0.5 propolis içeren krem ile, 190 hasta ise %0.5 asiklovir içeren krem ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Kremler günde beş kere bölgeye uygulanmıştır. Önceden tanımlanmış klinik duruma propolis uygulanan hastalar ortalama dört günde ulaşırken asiklovir uygulanan hastalar ortalama beş günde ulaşmıştır. Propolis uygulanan hastalarda alerjik reaksiyon, lokal irritasyon veya herhangi başka bir yan etki görülmemiştir. Propolis içeren kremin herpes labialis tedavisinde asiklovirden daha etkili olduğu, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu belirtilmiştir (120).

Brezilya'da yapılan bir çalışmada *Scaptotrigona postica*'dan elde edilen geopropolisin hidrometanolik ekstraktının HSV-1 üzerine etkisi RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Ekstraktın 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonları virüs üzerinde denenmiş, ekstraktın tüm konsantrasyonlarda virüs replikasyonu üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir (121).

Brezilya'da kahverengi Brezilya propolisinin hidroalkolik ekstraktının HSV-2 üzerine etkisi BALB/c fareler üzerinde araştırılmıştır. Propolis ekstraktının ekstrasvajinal lezyonları ve HSV-2 enfeksiyonunun vajinal dokularda meydana getirdiği histolojik hasarı azalttığı görülmüştür (122).

Japonya'da yapılan bir çalışmada farklı fenolik bileşen kompozisyonuna sahip üç Brezilya propolisinin etanol ekstraktının HSV-1 üzerine etkisine fareler üzerinde bakılmıştır. Ekstraktlar farelere 10 mg/kg oranında uygulanmıştır. Çalışmada ekstraktların herpetik deri lezyonlarının oluşumunu sınırlandırdığı görülmüştür. İki ekstraktın ise deri ve beyinde virüs titresini toksisiteye neden olmadan anlamlı derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bir ekstraktın in vivo etki göstermesine rağmen in vitro deneylerde anti-HSV-1 aktivitesi görülmemiştir (123).

Almanya'da yapılan bir çalışmada Çek propolisinin etanol ve su ekstraktlarının antiviral aktiviteleri plak azalma testi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada etanol ekstraktının su ekstraktına göre yaklaşık 10 kat daha etkili olduğu belirtilmiştir. Her iki ekstraktın da plak oluşumunu >%98 oranında azalttığı görülmüştür. Aynı çalışmada ticari olarak elde edilen kafeik asit, p-kumarik asit, benzoik asit, galangin, pinokembrin ve krisinin de

anti-HSV-1 aktiviteleri incelenmiş, galangin ve krisinin antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte daha fazla bileşenin bir arada bulunduğu maddelerde tek tek denenilen maddelerin etkisinden daha fazla antiviral etki görülmüştür. Propolis ekstraktlarının herpes enfeksiyonlarında topikal uygulanmasının uygun olabileceği söylenmiştir (124).

Ukrayna’da yapılan bir çalışmada Kanada propolisi, asiklovir ve plasebonun genital herpes (HSV-2) enfeksiyonu olan bireylerdeki etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Her madde için 30 kişilik gruplar kullanılmıştır. Bireyler hem klinik semptomlarına hem de herpetik lezyonların büyüklüğüne göre değerlendirilmiştir. Maddeler enfeksiyon olan bölgeye 10 gün boyunca günde dört kere uygulanmıştır. 10. günde propolis uygulanan 30 bireyin 24’ü, asiklovir uygulanan 30 bireyin 14’ü, plasebo uygulanan 30 bireyin 12’sinin iyileştiği görülmüştür. Propolis uygulanan bireylerde iyileşme hızının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kadınların %66’sında ilk muayenede mikrobiyal patojenlerin neden olduğu vajinal süperenfeksiyon bulunduğu, tedaviden sonra asiklovir ve plasebo gruplarında bu oranın değişmediği, fakat propolis grubunda süperenfeksiyonun %55 oranında azaldığı belirlenmiştir. Genital herpetik lezyonların tedavisinde ve lokal belirtilerin azaltılmasında propolis asiklovir ve plasebodan daha etkili olduğu gösterilmiştir (125).

Hatay’da yapılan bir çalışmada Hatay propolisinin etanol ekstraktının HSV-1 ve HSV-2 üzerine etkisi RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda Hatay propolisinin viral replikasyonu baskıladığı görülmüştür. Hatay propolisinin HSV-1’e etkisini 24 saatte, HSV-2’ye etkisini 48 saatte göstermeye başladığı belirtilmiştir (119).

Çalışmamızda Pazar, Ardahan ve Uzungöl propolislerinin etanol ve su ekstraktlarının HSV-1 üzerine etkileri MTT, RT-PCR ve plak azalma testleri ile değerlendirilmiştir.

MTT yönteminde virüs ile enfekte edilen hücrelerin üzerine ekstraktların VERO hücrelerine sitotoksik olmayan konsantrasyonları (etanol ekstraktlarının 6.25-100 µg/mL konsantrasyonları, su ekstraktlarının 12.5-800 µg/mL konsantrasyonları) eklenerek dört gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ekstraktları içeren kuyucuklardaki hücre canlılığı sadece virüs içeren hücre ile kıyaslanarak ekstraktların

etkisi belirlenmiştir. Bütün ekstraktların tüm konsantrasyonlarında virüs sayısı arttıkça hücrelerin canlılık oranının azaldığı görülmüştür. Sulu ekstraktlarda hücrelerin canlılık oranının sadece virüs içeren hücrelerdeki canlılık oranı ile benzer olduğu görülmüş, böylece sulu ekstraktların HSV-1 üzerinde antiviral etkisinin olmadığı belirlenmiştir. PPEE’ında 1 MOI virüs içeren kuyucuklarda hücre canlılığında kısmi bir artış olmakla birlikte bu artışın anlamlı olmadığı, 10 MOI ve 100 MOI virüs içeren kuyucuklarda ise hücre canlılığında artış olmadığı tespit edilmiştir. APEE ile UPEE’ında ise 1 MOI ve 10 MOI virüs içeren kuyucuklarda 50 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını belirgin şekilde arttırdığı (APEE; 1MOI: %44.9, 10 MOI: %28.42, UPEE; 1MOI: %52.5, 10 MOI: %35.32), bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir.

RT-PCR yönteminde virüs ile enfekte edilen hücrelerin üzerine ekstraktların VERO hücrelerine sitotoksik olmayan konsantrasyonları eklenerek üç gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ekstraktları içeren hücrelerdeki viral DNA miktarı sadece virüs içeren hücreler ile kıyaslanarak ekstraktların etkisi belirlenmiştir. Propolislerin su ekstraktları ile negatif kontrol arasında bir fark olmadığı, dolayısı ile sulu ekstraktların virüsün üremesi üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Etanolik ekstraktların virüs üzerine 6.25-50 µg/mL konsantrasyonlarında etki göstermedikleri, 100 µg/mL konsantrasyonda asiklovir ile benzer etki gösterdikleri belirlenmiştir. APEE’nın virüs üzerine en fazla etki gösteren etanolik ekstrakt olduğu anlaşılmıştır. Etanol ekstraktlarının 100 µg/mL’da gösterdikleri etki istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur.

Plak azalma testinde eşit miktarda virüs içeren hücreler üzerine etanol ekstraktlarının sitotoksik olmayan konsantrasyonları eklenmiştir. Üç gün inkübasyondan sonra canlı virüslerin oluşturduğu plak sayıları karşılaştırılarak ekstraktların etkisi değerlendirilmiştir. PPEE plak sayısında belirgin fark oluşturmazken, UPEE 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında, APEE ise 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında plak sayısında belirgin bir azalma oluşturduğu görülmüştür. İstatistiksel analizde APEE’nin 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlardaki etkileri ile UPEE’nin 100 µg/mL konsantrasyondaki etkisi istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur.

Çalışma sonunda propolislerin su ekstraktlarının anti-HSV-1 aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir. APEE'nin HSV-1 üzerine en etkili olduğu bunu UPEE'nin takip ettiği görülmüştür. PPEE'nin ise RT-PCR yönteminde etkisi görülmesine rağmen enfektif virüs partikülleri üzerine belirgin etkisi olmadığı anlaşılmıştır. Bu durumun ekstraktların içerdikleri fenolik bileşenlerdeki cins ve miktar farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Propolisin HSV-1 üzerine antiviral etkisinin RT-PCR yöntemi ile araştırıldığı iki çalışma incelenmiş, *Scaptotrigona postica*'dan elde edilen geopropolisin hidrometanolik ekstraktının 1 µg/mL'de anti-HSV-1 aktivite gösterdiği, Hatay propolisinin etanol ekstraktının ise 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda viral replikasyonu baskıladığı belirlenmiştir. Bu çalışmada ise RT-PCR yönteminde etanol ekstraktlarının yalnızca 100 µg/mL konsantrasyonda viral replikasyonu baskıladığı görülmüştür.

Çek propolisinin hem su hem de etanol ekstraktının anti-HSV-1 aktivitesi plak azalma testi ile değerlendirilmiş, her iki ekstraktın da HSV-1 plak oluşumunu >%98 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada PPEE'nin plak sayısında belirgin fark oluşturmadığı, UPEE'nin 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında, APEE'nin ise 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında plak sayısında belirgin bir azalma oluşturduğu belirlenmiştir. Plak sayısındaki azalmanın en fazla olduğu APEE'nin 100 µg/mL konsantrasyonunda ekstraktın plak oluşumunu ~%87 oranında azalttığı görülmüştür.

Bütün bu bilgiler ışığında *Scaptotrigona postica*'dan elde edilen geopropolisin hidrometanol ekstraktı, Çek propolisi etanol ekstraktı ve Hatay propolisi etanol ekstraktının anti-HSV-1 aktivitesinin bu çalışmada kullanılan ekstraktlara kıyasla daha fazla olduğu anlaşılmıştır.

Son zamanlarda propolisin HSV-1 veya diğer mikroorganizmaların tedavisinde kullanılabilmesi için çeşitli sistemlerin geliştirilmeye çalışıldığı görülmektedir. Bu amaçla kullanılabilmesi için öncelikle propolisin mikroorganizma üzerine etkisinin in vitro olarak gösterilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada Ardahan ve Uzungöl propolislerinin HSV-1 üzerine antiviral etkisi olduğu, Pazar propolisinin ise belirgin bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Buradan hareketle Ardahan ve Uzungöl propolislerinin

HSV-1 tedavisi için umut vadettiği, HSV-1 ile ilgili yapılacak topikal ilaç geliştirme çalışmalarında bu propolislerin değerlendirilebileceği anlaşılmıştır.

Çalışmada kullanılan propolisler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Doğu Karadeniz Bölgesi'nden elde edilen propolislerin HSV-1 üzerine etkisini gösteren bir çalışma da literatürde mevcut değildir. Bu bakımdan bu çalışma bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Ülkemizde propolislerin antiviral aktivitesine yönelik yapılan çalışmalar da oldukça kısıtlıdır. Yapılan bu çalışma ile sınırlı sayıda veri bulunan bu alana katkı sağlanmıştır.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Rize'nin Pazar ilçesinden, Ardahan ilinden ve Trabzon'un Uzungöl bölgesinden elde edilen propolislerin HSV-1 üzerine antiviral etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

1. Propolislerin etanol ekstraktlarının 100 µg/mL ve aşağısındaki konsantrasyonlarda VERO hücrelerine siltotoksik olmadığı belirlendi.
2. Propolislerin su ekstraktlarının 800 µg/mL ve aşağısındaki konsantrasyonlarda VERO hücrelerine siltotoksik olmadığı belirlendi.
3. Propolislerin HPLC-UV analizinde şiringik asit sadece Ardahan propolisi etanol ekstraktında, daidzein sadece Uzungöl propolisi etanol ekstraktında tespit edildi. Pazar ve Ardahan propolisi etanol ekstraktlarında rutin ve luteolin bulunurken Uzungöl propolisi etanol ekstraktında bulunmadığı görüldü. Luteolin ve ferulik asit en yüksek oranda Pazar propolisi etanol ekstraktında tespit edilirken, kafeik asit, p-kumarik asit, rutin, t-sinamik asit, krisin, pinokembrin ve CAPE bileşenlerinin en fazla Ardahan propolisi etanol ekstraktında bulunduğu tespit edildi.
4. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı araştırıldığında etanol ekstraktlarında fenolik madde miktarının Uzungöl propolisinde 166.908±0.46 mg GAE/g örnek, Ardahan propolisinde 124.682±1.36 mg GAE/g örnek, Pazar propolisinde ise 44.188±0.48 mg GAE/g örnek olduğu belirlendi. Su ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarı incelendiğinde Uzungöl propolisinde 20.474±1.46 mg GAE/g örnek, Ardahan propolisinde 6.078±0.53 mg GAE/g örnek, Pazar propolisinde 5.868±0.36 mg GAE/g örnek olduğu tespit edildi.
5. MTT testinde bütün ekstraktların tüm konsantrasyonlarında virüs sayısı arttıkça hücrelerin canlılık oranının azaldığı görüldü. Sulu ekstraktlarda hücrelerin canlılık oranının, sadece virüs içeren hücrelerdeki canlılık oranı ile benzer olduğu görüldü, böylece sulu ekstraktların HSV-1 üzerinde antiviral etkisinin olmadığı belirlendi. Etanol ekstraktlarında hücrelerin canlılık oranlarının kontrol hücrelerine oranla armış olduğu, en yüksek oranın Uzungöl propolis ekstraktının 50 µg/mL konsantrasyonunda 1 MOI oranında virüs içeren kuyucukta olduğu (% 52,5), onun ardından Ardahan propolis ekstraktının 50 µg/mL konsantrasyonunda 1 MOI oranında virüs içeren kuyucukların geldiği (%44,9) tespit edildi. Ardahan ve Uzungöl propolis etanol ekstraktlarının 50

$\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda 1 MOI ve 10 MOI oranında virüs içeren kuyucuklarda gösterdikleri etkiler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

6. RT-PCR yönteminde propolislerin su ekstraktları ile negatif kontrol arasında bir fark olmadığı, dolayısı ile sulu ekstraktların virüsün üremesi üzerine bir etkisinin olmadığı görüldü. Etanolik ekstraktların virüs üzerine 6.25-50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında etki göstermedikleri, 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda asiklovir ile benzer etki gösterdikleri belirlendi. Ardahan propolis etanol ekstraktının virüs üzerine en fazla etki gösteren etanolik ekstrakt olduğu anlaşıldı.

7. Plak azalma testinde Pazar propolis etanol ekstraktı plak sayısında belirgin fark oluşturmazken, Uzungöl propolis etanol ekstraktı 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında, Ardahan propolis etanol ekstraktı ise 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında plak sayısında belirgin bir azalma oluşturduğu görüldü. Ardahan propolisi etanol ekstraktının 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki etkileri ile Uzungöl propolisi etanol ekstraktının 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Bu çalışmada Ardahan ve Uzungöl propolislerinin HSV-1 üzerine antiviral etkisi olduğu, Pazar propolisinin ise belirgin bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Buradan hareketle Ardahan ve Uzungöl propolislerinin HSV-1 tedavisi için geliştirilecek olan ilaçlarda kullanılabileceği anlaşılmıştır. Bununla birlikte propolislerin içinde var olan fenolik bileşenler ayrılarak virüs üzerine tek tek denenebilir. Bu sayede HSV-1 üzerine en etkili olan bileşik belirlenerek antiviral olarak değerlendirilebilir.

9. KAYNAKLAR

1. Bankova V, Popova M, Trusheva B (2018). The phytochemistry of the honeybee. *Phytochemistry* 155: 1-11.
2. Bogdanov, Stefan. Propolis: biological properties and medical applications. 2016. Media:https://www.researchgate.net/profile/Stefan_Bogdanov/publication/304012147_Propolis_biological_properties_and_medical_applications/links/5762c2b908ae2a00c8bb040e/Propolis-biological-properties-and-medical-applications.pdf.
3. Davison AJ (2010). Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol* 143(1): 52-69.
4. World Health Organization. Herpes simplex virus. Available From: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. [Accessed 5 August 2018].
5. Klein RS (2016). Clinical manifestations and diagnosis of herpes simplex virus type 1 infection. Available From: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-herpes-simplex-virus-type-1-infection>. [Accessed 5 August 2018].
6. Klein RS (2017). Treatment of herpes simplex virus type 1 infection in immunocompetent patients. Available From: <https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-herpes-simplex-virus-type-1-infection-in-immunocompetent-patients>. [Accessed 5 August 2018].
7. Yıldırım A, Duran GG, Duran N, Jenedi K, Bolgul BS, Miraoğlu M, Muz M (2016). Antiviral activity of Hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1 and type 2. *Med Sci Monit* 22: 422-430.
8. Bankova V, Galabov AS, Antonova D, Vihelmova N, Di Perri B (2014). Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine* 21(11): 1432-1438.
9. Sartori G, Pesarico AP, Pinton S, Dobrachinski F, Roman SS, Pauletto F, Rodrigues LC Jr, Prigol M (2012). Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Cell Biochem Funct* 30(1): 1-10.

10. Shimizu T, Takeshita Y, Takamori Y, Kai H, Sawamura R, Yoshida H, Watanabe W, Tsutsumi A, Park YK, Yasukawa K, Matsuno K, Shiraki K, Kurokawa M (2011). Efficacy of brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 976196.
11. R. Krell (1996). Value-Added Products from Beekeeping, *FAO Agricultural Services Bulletin* no 124, chapter 5, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
12. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 964149.
13. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C (2015). Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 206439.
14. Zabaïou N, Fouache A, Trousson A, Baron S, Zellagui A, Lahouel M, Lobaccaro JA (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Cehms Phys Lipids* 207(Pt B): 214-222.
15. Barnett JR (2004). Langenheim, J. H. Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. *Ann Bot* 93(6): 784-785.
16. Ben-Yehoshua S, Borowitz C, Hanus LO (2012). Frankincense, myrrh, and balm of gilead: Ancient spices of Southern Arabia and Judea. *Horticultural reviews* 39(1): 1-76.
17. Bogdanov, Stefan. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. 2012. Media: <http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>
18. Falcao SI, Vilas-Boas M, Estevinho LM, Barros C, Domingues MRM, Cardoso SM (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Anal Bioanal Chem* 396(2): 887-897.

19. Pasupuleti VR, Sammugan L, Ramesh N, Gan SH (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 1259510.
20. Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal* 41(4): 1220-1234.
21. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19(12): 19610-19632.
22. Volpi N (2004). Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 25(12): 1872-1878.
23. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 7074209.
24. Sforcin JM (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother Res* 30(6): 894-905.
25. Santos VR (2012). Propolis: alternative medicine for the treatment of oral microbial diseases. Available From: <https://www.intechopen.com/books/alternative-medicine/antifungal-activity-of-propolis-oral-clinical-studies-in-humans>. DOI: 10.5772/54003. [Accessed 31 July 2018].
26. Mani F, Damasceno HCR, Novelli ELB, Martins EAM, Sforcin JM (2006). Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J Ethnopharmacol* 105(1-2): 95-98.
27. Rocha BA, Bueno PCP, Vaz MMOLL, Nascimento AP, Ferreira NU, Moreno GP, Rodrigues MR, Costa-Machado AR, Barizon EA, Campos JC, de Oliveira PF (2013). Evaluation of a propolis water extract using a reliable RP-HPLC methodology and in vitro and in vivo efficacy and safety characterisation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 670451.

28. Tavares DC, Barcelos GRM, Silva LF, Tonin CCC, Bastos JK (2006). Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol in Vitro* 20(7): 1154-1158.
29. Baykara M, Silici S, Özçelik M, Güler O, Erdoğan N, Bilgen M (2015). In vivo nephroprotective efficacy of propolis against contrast-induced nephropathy. *Diagn Interv Radiol* 21(4): 317-321.
30. Su KY, Hsieh CY, Chen YW, Chuang CT, Chen CT, Chen YLS (2014). Taiwanese green propolis and propolin G Protect the liver from the pathogenesis of fibrosis via eliminating TGF- β -Induced Smad2/3 phosphorylation. *J Agric Food Chem* 62(14): 3192-3201.
31. Rizk SM, Zaki HF, Mina MA (2014). Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 67: 176-186.
32. Orsolic N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I (2004). Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol* 94(2-3): 307-315.
33. Sforcin JM (2007). Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 113(1): 1-14.
34. Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Bachiega TF, Bufalo MC, Araujo JP, Sforcin JM (2010). Propolis immunomodulatory action in vivo on toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother Res* 24(8): 1141-1146.
35. Silva SS, Thome GS, Cataneo AHD, Miranda MM, Felipe I, Andrade CG, Watanabe MA, Piana GM, Sforcin JM, Pavanelli WR, Conchon-Costa I (2013). Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 673058.
36. Orsolic N, Sver L, Terzic S, Basic I (2004). Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. *Vet Res Commun* 29(7): 575-593.

37. Washio K, Kobayashi M, Saito N, Amagasa M, Kitamura H (2015). Propolis ethanol extract stimulates cytokine and chemokine production through NF- κ B activation in C2C12 myoblasts. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 349751.
38. Bufalo MC, Bordon-Graciani AP, Conti BJ, Golim MA, Sforcin JM (2014). The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *J Pharm Pharmacol* 66(10): 1497-1504.
39. Conti BJ, Bufalo MC, Golim MA, Bankova V, Sforcin M (2013). Cinnamic acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 109864.
40. Muli EM, Maingi JM (2007). Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 13(3): 655-663.
41. Rahman MM, Richardson A, Sofian-Azirun M (2010). Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Afr J Microbiol Res* 4(16): 1872-1878.
42. Massaro CF, Simpson JB, Powell D, Brooks P (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) propolis from subtropical eastern Australia. *Naturwissenschaften* 102(11-12): 68.
43. Oliveira ACP, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TIE (2006). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(5): 493-497.
44. Dota KFD, Consolaro MEL, Svidzinski TIE, Bruschi L (2011). Antifungal activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 201953.
45. Ghaly MF, Ezzat SM, Sarhan MM (1998). Use of propolis and ultragriseofulvin to inhibit aflatoxigenic fungi. *Folia Microbiol* 43(2): 156-160.

46. Boisard S, Le Ray AM, Landreau A, Kempf M, Cassisa V, Flurin C, Richomme P (2015). Antifungal and antibacterial metabolites from a French poplar type propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 319240.
47. Siheri W, Igoli JO, Gray AI, Nasciemento TG, Zhang T, Fearnley J, Clements CJ, Carter KC, Carruthers J, Edrada-Ebel R, Watson DG (2014). The isolation of antiprotozoal compounds from Libyan propolis. *Phytother Res* 28(12): 1756-1760.
48. Da Silva SS, Thome GS, Cataneo AHD, Miranda MM, Felipe I, Andrade CGTJ, Watanabe MA, Piana GM, Sforcin JM, Pavanelli WR, Conchon-Costa I (2013). Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 673058.
49. Da Silva SS, Mizokami SS, Fanti JR, Miranda MM, Kawakami NY, Teixeira FH, Araújo EJ, Panis C, Watanabe MA, Sforcin JM, Pavanelli WR, Verri WA Jr, Felipe I, Conchon-Costa I (2016). Propolis reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. *Parasitol Res* 115(4): 1557-1566.
50. Sartori G, Pesarico AP, Pinton S, Dobrachinski F, Roman SS, Pauletto F, Rodrigues LC Jr, Prigol M (2012). Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Cell Biochem* 30(1): 1-10.
51. Urushisaki T, Takemura T, Tazawa S, Fukuoka M, Hosokawa-Muto J, Araki Y, Kuwata K (2011). Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in brazilian green propolis water extract. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 254914.
52. Fan Y, Liu J, Wang D, Hu Y, Yang S, Wang J, Guo L, Zhao X, Wang H, Jiang Y (2011). Epimedium polysaccharide and propolis flavone can synergistically inhibit the cellular infectivity of NDV and improve the curative effect of ND in chicken. *Int J Biol Macromol* 48(3): 439-444.

53. Bankova V, Galabov A S, Antonova D, Vihelmova N, Di perri B (2014). Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine* 21(11): 1432-1438.
54. Soroy L, Bagus S, Yangkie IP, Djoko W (2014). The effect of a unique propolis compound (Propoelix™) on clinical outcomes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Infect Drug Resist* 7: 323-329.
55. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol* 63(11): 1378-1386.
56. Chan GC, Cheung KW, Sze DM (2013). The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol* 44(3): 262-273.
57. Frión-Herrera Y, Díaz-García A, Ruiz-Fuentes J, Rodríguez-Sánchez H, Sforcin JM (2015). Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *J Pharm Pharmacol* 67(10): 1448-1456.
58. Patel S (2016). Emerging adjuvant therapy for cancer: propolis and its constituents. *J Diet Suppl* 13(3): 245-268.
59. Khacha-ananda S, Tragoolpua K, Chantawannakul P, Tragoolpua Y (2013). Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pac J Cancer Prev* 14(11): 6991-6995.
60. Turan İ, Demir S, Mısır S, Kılınç K, Menteşe A, Aliyazıcıoğlu Y, Değer O (2015). cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines. *Trop J Pharm Res* 14(5): 777-782.
61. Kubina R, Kabala-Dzik A, Dziedzic A, Bielec B, Wojtyczka RD, Bułdak RJ, Wszyńska M, Stawiarska-Pięta B, Szaflarska-Stojko E (2015). The ethanol extract of Polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and Me45 malignant melanoma cells in vitro conditions. *Adv Clin Exp Med* 24(2): 203-212.

62. Amini-Sarteshnizi, N, Mobini-Dehkordi, M, Khosravi-Farsani, S, Teimori, H (2015). Anticancer activity of ethanolic extract of propolis on AGS cell line. *J Herb Med Pharmacol* 4(1): 29-34.
63. Bazo AP, Rodrigues MA, Sforcin JM, de Camargo JL, Ribeiro LR, Salvadori DM (2002). Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratog Carcinog Mutagen* 22(3): 183-194.
64. Bufalo MC, Ferreira I, Costa G, Francisco V, Liberal J, Cruz MT, Lopes MC, Batista MT, Sforcin JM (2013). Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. *J Ethnopharmacol* 149(1): 84-92.
65. Szliszka E, Mertas A, Czuba ZP, Krol W (2013). Inhibition of inflammatory response by artemisinin in activated RAW264.7 macrophages. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 735176.
66. Santos VR (2012). Propolis: alternative medicine for the treatment of oral microbial diseases. Available From: <https://www.intechopen.com/books/alternative-medicine/antifungal-activity-of-propolis-oral-clinical-studies-in-humans>. [Accessed 31 July 2018].
67. Andrew J. Davison. 2007. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. MRC Virology Unit, Institute of Virology, Glasgow, UK. Media: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47406/>.
68. Stanford University. Available from: <https://virus.stanford.edu/herpes/History.html>. [Accessed 14 July 2018].
69. Kukhanova MK, Korinova AN, Kochetkov SN (2014). Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc)* 79(13): 1635-1652.
70. Richard J. Whitley. Medical Microbiology. 4th edition. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8157/>. [Accessed 15 July 2018].
71. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (2007). Manual of Clinical Microbiology. Klinik Mikrobiyoloji. 9th ed. Çeviri Editörü: Başustaoglu A, Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 1523-1536.

72. Boehmer PE, Nimonkar AV (2003). Herpes Virus Replicaiton. IUBMB Life 55(1): 13-22.
73. Lehman IR, Boehmer PE (1999). Replication of herpes simplex virus DNA. J Biol Chem 274(40): 28059-28062.
74. Everts B, van der Poel HG (2005). Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. Cancer Gene Ther 12(2): 141-161.
75. Manservigi R, Argnani R, Marconi P (2010). HSV recombinant vectors for gene therapy. Open Virol J 4: 123-156.
76. Abaitua F, O'Hare P (2008). Identification of a highly conserved, functional nuclear localization signal within the N-Terminal region of herpes simplex virus type 1 VP1-2 tegument protein. J Virol 82(11): 5234-5244.
77. Copeland AM, Newcomb WW, Brown JC (2009). Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. J Virol 83(4): 1660-1668.
78. Sandbaumhüter M, Döhner K, Schipke J, Binz A, Pohlmann A, Sodeik B, Bauerfeind R (2013). Cytosolic herpes simplex virus capsids not only require binding inner tegument protein pUL36 but also pUL37 for active transport prior to secondary envelopment. Cell Microbiol 15(2): 248-269.
79. Whitley RJ, Roizman B (2001). Herpes simplex virus infections. Lancet 357(9267): 1513-1518.
80. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2010). Medical Microbiology. 6th ed. Çeviren: Başustaoğlu AC, Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Ankara, 517-540.
81. Klein RS (2017). Epidemiology of herpes simplex virus type 1 infection. Available From: <https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-herpes-simplex-virus-type-1-infection>. [Accessed 18 July 2018].
82. Remeijer L, Maertzdorf J, Doornenbal P, Verjans GM, Osterhaus AD (2001). Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation. Lancet 357(9254): 442.

83. Roberts C (2005). Genital herpes in young adults: changing sexual behaviours, epidemiology and management. *Herpes* 12(1): 10-14.
84. Roberts CM, Pfister JR, Spear SJ (2003). Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex Transm Dis* 30(10): 797-800.
85. World Health Organization (2015). Available From: <http://www.who.int/news-room/detail/28-10-2015-globally-an-estimated-two-thirds-of-the-population-under-50-are-infected-with-herpes-simplex-virus-type-1>. [Accessed 17 July 2018].
86. Simmons A (2002). Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* 186(1): 71-77.
87. Evans CM, Kudesia G, McKendrick M (2013). Management of herpesvirus infections. *Int J Antimicrob Agents* 42(2): 119-128.
88. Singh A, Preiksaitis J, Ferenczy A, Romanowski B (2005). The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 16(2): 92-98.
89. Gupta G, Athanikar SB, Pai VV, Naveen KN (2014). Giant cells in dermatology. *Indian J Dermatol* 59(5): 481-484.
90. Scoular A, Gillespie G, Carman WF (2002). Polymerase chain reaction for diagnosis of genital herpes in a genitourinary medicine clinic. *Sex Transm Infect* 78: 21-25.
91. Klein RS (2016). Clinical manifestations and diagnosis of herpes simplex virus type 1 infection. Available From: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-herpes-simplex-virus-type-1-infection>. [Accessed 5 August 2018].

92. Kinchington D, Schinazi RF. *Methods In Molecular Medicine™ Antiviral Methods and Protocols*. ©2000 Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. Media: [https://books.google.com.tr/books?id=kJeMc1g8kV0C&pg=PA231&lpg=PA231&dq=M+%3D+xk+%2B+d+%5B0.5+%E2%80%93+\(1/n\)+\(r\)%5D+spearman&source=bl&ots=yFzW0lnXnr&sig=4PFnBsAyJDxoLTZqjbtqX3n0mYg&hl=t r&sa=X&ved=2ahUKEwj4-4it3cAhVDAZoKHe-UA-kQ6AEwAHoECAAQAQ#v=onepage&q=M%20%3D%20xk%20%2B%20d%20%5B0.5%20%E2%80%93%20\(1%2Fn\)%20\(r\)%5D%20spearman&f=false](https://books.google.com.tr/books?id=kJeMc1g8kV0C&pg=PA231&lpg=PA231&dq=M+%3D+xk+%2B+d+%5B0.5+%E2%80%93+(1/n)+(r)%5D+spearman&source=bl&ots=yFzW0lnXnr&sig=4PFnBsAyJDxoLTZqjbtqX3n0mYg&hl=t r&sa=X&ved=2ahUKEwj4-4it3cAhVDAZoKHe-UA-kQ6AEwAHoECAAQAQ#v=onepage&q=M%20%3D%20xk%20%2B%20d%20%5B0.5%20%E2%80%93%20(1%2Fn)%20(r)%5D%20spearman&f=false).
93. Smither SJ, Lear-Rooney C, Biggins J, Pettitt J, Lever MS, Olinger GG Jr (2013). Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. *J Virol Methods* 193(2): 565-571.
94. Baer A, Kehn-Hall K (2014). Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *J Vis Exp* (93): e52065.
95. Cell Viability Testing with Trypan Blue Exclusion Method.pdf. Available From: <https://brd.nci.nih.gov/brd/sop/download-pdf/941>. [Accessed 27 August 2018].
96. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. *Cell Viability Assays*. 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. [Accessed 27 August 2018].
97. Loftis AD, Reeves WK. *Veterinary PCR Diagnostics. Chapter 1: Principles of Real-Time PCR*. 2012. Available From: https://www.researchgate.net/publication/235352847_Principles_of_real-time_PCR. DOI: 10.2174/97816080534831120101. [Accessed 27 August 2018].
98. Guzman-Gutierrez SL, Nieto-Camacho A, Castillo-Arellano JI, Huerta-Salazar E, Hernandez-Pasteur G, Silva-Miranda M, Argüello-Nájera O, Sepúlveda-Robles O, Inés Espitia C, Reyes-Chilpa R (2018). Mexican propolis: a source of antioxidants and anti-inflammatory compounds, and isolation of a novel chalcone and ϵ -caprolactone derivative. *Molecules* 23(2): 334.

99. Andrade JKS, Denadai M, de Oliveira CS, Nunes ML, Narain N (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Res Int* 101: 129-138.
100. Martins ML, Leite KLF, Pacheco-Filho EF, Pereira AFM, Romanos MTV, Maia LC, Fonseca-Gonçalves A, Padilha WWN, Cavalcanti YW (2018). Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. *Arch Oral Biol* 93: 56-65.
101. Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M (2018). Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines (Basel)* 5(1): E2.
102. Torres AR, Sandjo LP, Friedemann MT, Tomazzoli MM, Maraschin M, Mello CF, Santos ARS (2018). Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. *Braz J Med Biol Res* 51(6): e7118.
103. Andrade JKS, Denadai M, de Oliveira CS, Nunes ML, Narain N (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Res Int* 101: 129-138.
104. Kapare H, Lohidasan S, Sinnathambi A, Mahadik K (2017). Standardization, chemical profiling, in vitro cytotoxic effects, in vivo anti-carcinogenic potential and biosafety profile of Indian propolis. *J Ayurveda Integr Med* DOI: 10.1016/j.jaim.2017.06.003.
105. Mujica V, Orrego R, Pérez J, Romero P, Ovalle P, Zúñiga-Hernández J (2017). The role of propolis in oxidative stress and lipid metabolism: a randomized controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017:4272940.
106. Kasote DM, Pawar MV, Bhatia RS, Nandre VS, Gundu SS, Jagtap SD (2017). HPLC, NMR based chemical profiling and biological characterisation of Indian propolis. *Fitoterapia* 122: 52-60.

107. Cardoso JG, Iorio NL, Rodrigues LF, Couri ML, Farah A, Maia LC, Antonio AG (2016). Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. *Arch Oral Biol* 65: 77-81.
108. Zhang J, Shen X, Wang K, Cao X, Zhang C, Zheng H, Hu F (2016). Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis propolis* and *Eucalyptus propolis* in RAW64.7 cells. *Pharm Biol* 54(10): 2220-2235.
109. Jerković I, Marijanović Z, Kuš PM, Tuberoso CI (2016). Comprehensive study of Mediterranean (Croatian) propolis peculiarity: headspace, volatiles, anti-varroa-treatment residue, phenolics, and antioxidant properties. *Chem Biodivers* 13(2): 210-218.
110. Socha R, Gałkowska D, Bugaj M, Juszczak L (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Nat Prod Res* 29(5): 416-422.
111. Nina N, Quispe C, Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Giménez A, Schmeda-Hirschmann G (2014). Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. *J Sci Food Agric* 96(6): 2142-2153.
112. Danert FC, Zampini C, Ordonez R, Maldonado L, Bedascarrasbure E, Isla MI (2014). Nutritional and functional properties of aqueous and hydroalcoholic extracts from Argentinean propolis. *Nat Prod Commun* 9(2): 167-170.
113. Khacha-ananda S, Tragoolpua K, Chantawannakul P, Tragoolpua Y (2013). Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pac J Cancer Prev* 14(11): 6991-6995.
114. Baltaş N, Yıldız O, Kolaylı S (2016). Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. *J Enzyme Inhib Med Chem* 31(sup1): 52-55.

115. Wang K, Jin X, Li Q, Sawaya ACHF, Le Leu RK, Conlon MA, Wu L1, Hu F (2018). Propolis from Different Geographic Origins Decreases Intestinal Inflammation and *Bacteroides* spp. Populations in a Model of DSS-Induced Colitis. *Mol Nutr Food Res* 62(17): e1800080.
116. Guzmán-Gutiérrez SL, Nieto-Camacho A, Castillo-Arellano JI, Huerta-Salazar E, Hernández-Pasteur G, Silva-Miranda M, Argüello-Nájera O, Sepúlveda-Robles O, Espitia CI, Reyes-Chilpa R (2018). Mexican propolis: a source of antioxidants and anti-inflammatory compounds, and isolation of a novel chalcone and ϵ -caprolactone derivative. *Molecules* 23(2): E334.
117. Ong TH, Chitra E, Ramamurthy S, Siddalingam RP, Yuen KH, Ambu SP, Davamani F (2017). Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *PLoS One* 12(3): e0174888.
118. Kasiotis KM, Anastasiadou P, Papadopoulos A, Machera K (2017). Revisiting Greek propolis: chromatographic analysis and antioxidant activity study. *PLoS One* 12(1): e0170077.
119. Yildirim A, Duran GG, Duran N, Jenedi K, Bolgul BS, Miraloglu M, Muz M (2016). Antiviral activity of Hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1 and type 2. *Med Sci Monit* 22: 422-430.
120. Arenberger P, Arenbergerova M, Hladíková M, Holcova S, Ottillinger B (2017). Comparative study with a lip balm containing 0.5% propolis special extract GH 2002 versus 5% aciclovir cream in patients with herpes labialis in the papular/erythematous stage: a single-blind, randomized, two-arm study. *Curr Ther Res Clin Exp* 88: 1-7.
121. Coelho GR, Mendonça RZ, Vilar Kde S, Figueiredo CA, Badari JC, Taniwaki N, Namiyama G, de Oliveira MI, Curti SP, Evelyn Silva P, Negri G (2015). Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against antiherpes simplex virus (HSV-1). *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 296086.

122. Sartori G, Pesarico AP, Pinton S, Dobrachinski F, Roman SS, Pauletto F, Rodrigues LC Jr, Prigol M (2012). Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Cell Biochem Funct* 30(1): 1-10.
123. Shimizu T, Takeshita Y, Takamori Y, Kai H, Sawamura R, Yoshida H, Watanabe W, Tsutsumi A, Park YK, Yasukawa K, Matsuno K, Shiraki K, Kurokawa M (2011). Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 976196.
124. Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S, Zundel C, Nowack H, Sensch KH, Reichling J (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytother Res* 24(1): 20-28.
125. Vynograd N, Vynograd I, Sosnowski Z (2000). A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine* 7(1): 1-6.

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI

Sayı : 24237859- 560
Konu: Etik Kurul onay belgesi

09/10/2017

Sayın; Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD.

“Doğu Karadeniz Propolis Örneklerinin Herpes Simpleks Virüs Tip 1 Üzerine Antiviral Etkilerinin Değerlendirilmesi” başlıklı etik kurul 2017/166 protokol numaralı tez çalışması raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

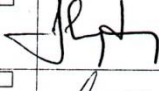
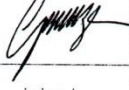
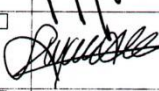
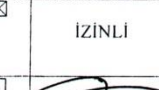
BASVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Doğu Karadeniz Propolis Örneklerinin Herpes Simpleks Virüs Tip 1 Üzerine Antiviral Etkilerinin Değerlendirilmesi”		
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2017 / 166		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji		
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, UNVANI/ADI/SOYADI	Arş.Gör.Merve CORA, Prof.Dr.Sevgi KOLAYLI, Doç.Dr.C.Kurtuluş BURUK, Prof.Dr.Ali Osman KILIÇ		
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 5	Tarih: 02/10/2017
	Prof.Dr.Neşe KAKLIKKAYA'nın sorumluluğunda yürütülmesi planlanan Arş.Gör.Merve CORA'ya ait "Doğu Karadeniz Propolis Örneklerinin Herpes Simpleks Virüs Tip 1 Üzerine Antiviral Etkilerinin Değerlendirilmesi" başlıklı 2017/166 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Gamze Ç'AN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLI
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Tıbbi Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cerr.	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Y.Doç.Dr.Demet SAĞLAM AYKUT Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLI
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı	: CORA, Merve
Uyruğu	: T.C
Doğum tarihi ve yeri	: 30.11.1985, Trabzon
Medeni hali	: Evli
E-posta	: mcora@ktu.edu.tr
Tlf	: +90 462 377 7786

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurum Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	KTÜ, SABE, Tıbbi Mikrobiyoloji AD	2018
Yüksek Lisans	KTÜ, SABE, Tıbbi Mikrobiyoloji AD	2012
Lisans	KTÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Trabzon Anadolu İmam Hatip Lisesi	2003

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİM

Görevi	Kurum	Süre
Araştırma Görevlisi	KTÜ, SABE, Tıbbi Mikrobiyoloji AD	2012-2018

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. **Cora M**, Kaklıkkaya N, Topbaş M, Çan G, Yavuzylmaz A, Tosun İ, Aydın F (2017). Determination of Seroprevalence of Borrelia burgdorferi IgG in Adult Population Living in Trabzon. Balkan Med J 34(1): 47-52.

2. Türe E, Kamaşak T, **Cora M**, Şahin S, Acar Arslan E, Kaklıkkaya N, Cansu A (2016). Comparison of the serum cytokine levels before and after adrenocorticotrophic hormone (ACTH) therapy in patients with infantile spasm. *Seizure* 41(2016): 112–115.

BİLDİRİLER

1. Uluçam Atay G, **Cora M**, Durukan İ, Sağlam Ertunga N, Kılıç AO. Screening of Antibiotic Resistance Genes in Gram Negative Bacteria Isolated From Caves, 10th Balkan Congress of Microbiology, 16-18 Kasım 2017, pp: 204, Sofya Bulgaristan.
2. Reis A, **Cora M**, Özgümüş OB, Kılıç AO. Conjugal Transfer of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Strains Involving Class 1 and Class 2 Integrons, 10th Balkan Congress of Microbiology, 16-18 Kasım 2017, pp: 187, Sofya Bulgaristan.
3. **Cora M**, Durukan İ, Uluçam G, Khorshidtalab M, Nas SS, Kılıç AO. Atık sulardan izole edilen bakterilerin antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Tartışmalı Poster, 16-20 Kasım 2016, pp: 209-210, Antalya Türkiye.
4. Türe E, Kamaşak T, **Cora M**, Şahin S, Acar Arslan E, Kaklıkkaya N, Cansu A. İnfantil spazmlı hastalarda adrenokortikotropik hormon tedavisi öncesi ve sonrası serum sitokin seviyelerinin karşılaştırılması, 18. Ulusal Çocuk Nörolojisi Kongresi, Poster, 20-24 Nisan 2016, Antalya Türkiye.
5. **Cora M**, Buruk CK, Kaklıkkaya N. KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi'nde CMV Enfeksiyonu Tanısında Kullanılan Antijenemi ve RT-PCR Testlerinin Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi, 1. Ulusal Viroloji Günleri ve Kursu, Poster, 25-28 Şubat 2016.
6. **Cora M**, Tüfekçi EF, Gençoğlu Özgür Ç, Öztel Ocak H, Bayramoğlu G, Kaklıkkaya N. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na Gönderilen Örneklerde Toxoplasma gondii, Rubella ve Sitomegalovirüs Antikor Pozitifliği, 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, pp: 394, 10-13 Kasım 2013, Antalya Türkiye.

7. **Cora M**, Kaklıkkaya N, Topbaş M, Çan G, Yavuzylmaz A, Tosun İ, Aydın F. Trabzon ili erişkin yaş gruplarında *Borrelia burgdorferi* sensu lato seroprevalansının belirlenmesi, 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Poster, pp: 362-363, 6 Kasım 2012, Aydın Türkiye.

PROJELER

1. Doğu Karadeniz Propolis Örneklerinin Herpes Simpleks Virüs Tip 1 Üzerine Antiviral Etkilerinin Değerlendirilmesi, BAP Doktora, TDK-2016-5602, Araştırmacı.
2. Mağaralardan İzole Edilmiş Gram Negatif Bakterilerde Antibiyotik Direnç Genlerinin Fonksiyonel ve Genetik Karakterizasyonu, BAP Hızlı Destek, THD-2017-6712, Araştırmacı.
3. Trabzon İli Erişkin Yaş Gruplarında Anti-Nükleer Antikor (ANA) Anti-Siklik Sitriluzine Peptid (Anti-CCP) ve *Borrelia burgdorferi* sensu lato Seroprevalansının Belirlenmesi, BAP Hızlı Destek, 2010.114.001.13, Araştırmacı.

ÖDÜLLER/TEŞVİKLER/BURSLAR

1. 10th. Balkan Congress of Microbiology, Young Scientist Grant, 16-18 Kasım 2017.
2. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Konaklama Bursu, 16-20 Kasım 2016.
3. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Konaklama Bursu, 3-7 Kasım 2012.
4. TÜBİTAK BİDEB 2210 Yurt içi Yüksek Lisans Bursu, 2009-2011.