



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN SULU
EKSTRAKTININ İNSAN LARİNGEAL
EPİDERMOİD KARSİNOMA (HEP-2) HÜCRE
SERİLERİNDE HÜCREİÇİ SERBEST
KALSİYUM VE HİDROJEN PEROKSİT
DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Kübra AKBULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON-2014

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Kübra AKBULUT'un hazırladığı “Türk Propolisinin Sulu Ekstraktının İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma (HEp-2) Hücre Serilerinde Hücreiçi Serbest Kalsiyum ve Hidrojen Peroksit Düzeylerine Etkisi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oybirliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Orhan DEĞER

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Orhan DEĞER

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Prof . Dr. Ahmet AYAR

Tarih:/.../201...

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

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

05/01/2014

Kübra AKBULUT

TEŞEKKÜR

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

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

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

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

Biyokimya Anabilim Dalındaki başta Arş. Gör. Selim DEMİR'e ve tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

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

Arş. Gör. Kübra AKBULUT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Propolis	5
4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	6
4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	6
4.1.2.1. Flavonoidler	8
4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri	10
4.2. Serbest Radikaller	11
4.2.1. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri	12
4.2.2. Serbest Radikal Türleri	13
4.2.2.1. Nitrik Oksit (NO [•])	13
4.2.2.2. Peroksinitrit Anyonu (ONOO ⁻)	13
4.2.2.3. Süperoksit Radikalleri (O ₂ ^{•-})	14
4.2.2.4. Hidroksil Radikalleri (OH [•])	14
4.2.2.5. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	14
4.2.2.5.1. Hücreiçi H ₂ O ₂ ve Önemi	15
4.3. Oksidatif Stres	15
4.3.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları	16
4.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	16
4.4. Hücreiçi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu	17
4.4.1. Hücreiçi Ca ²⁺ Sinyali ve Önemi	18

	vi
4.5. İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma Hücre Serileri (HEp-2)	18
5. GEREÇ VE YÖNTEM	20
5.1. Gereç	20
5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	20
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
5.2. Yöntem	21
5.2.1. Deneyin Planlanması	21
5.2.2. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Madde ve Malzemelerin Hazırlanması	22
5.2.3. Hücre Kültürü	24
5.2.3.1. HEp-2 Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	24
5.2.3.2. HEp-2 Hücrelerinin Pasajlanması	24
5.2.3.3. HEp-2 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığının Tespiti	25
5.2.4. HEp-2 Hücre Serisi İçin Uygun Hücre Sayısı, DCFH-DA ve H ₂ O ₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesi	25
5.2.5. HEp-2 Hücre Serisi İçin DCFH-DA Muamele Süresinin Belirlenmesi	26
5.2.6. HEp-2 Hücre Serisinin Propolis Ekstraktları İle Muamele Süresinin Belirlenmesi	26
5.2.7. HEp-2 Hücre Serisi İçin Fura-2AM Muamele Süresinin Belirlenmesi	26
5.2.8. HEp-2 Hücre Serisi İçin Fura-2AM Uygun Konsantrasyonunun Belirlenmesi	26
5.2.9. Etanol ve Suyun HEp-2 Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	26
5.2.10. Propolisin Hücreiçi H ₂ O ₂ Düzeyine Etkisinin Belirlenmesi	27
5.2.11. Propolisin Hücreiçi Serbest Ca ²⁺ Düzeyine Etkisinin Belirlenmesi	27
5.3. İstatistiksel Analizler	28
6. BULGULAR	28
6.1. HEp-2 Hücre Serisi İçin Uygun Hücre Sayısı, DCFH-DA ve H ₂ O ₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	28
6.2. HEp-2 Hücre Serisi İçin DCFH-DA Muamele Süresinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	31
6.3. HEp-2 Hücre Serisinin Propolis Ekstraktları İle Muamele Süresinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	31
6.4. HEp- 2 Hücre Serisi İçin Fura-2AM Muamele Süresinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	31

	vii
6.5. HEp- 2 Hücre Serisi İçin Fura-2AM Uygun Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	31
6.6. Etanol ve Suyun Hep-2 Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	32
6.7. Propolisin Hücreiçi H ₂ O ₂ Düzeyine Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	33
6.8. Propolisin Hücreiçi Serbest Ca ²⁺ Düzeyine Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	35
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	41
8.1. Sonuçlar	41
8.2. Öneriler	42
9. KAYNAKLAR	43
10. ÖZGEÇMİŞ	53

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler	7
Tablo 2. Propolisin içerdiği etken maddeler ve bilinen etkileri	8
Tablo 3. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri	12
Tablo 4. Hücredeki serbest radikal kaynakları	13
Tablo 5. Antioksidan sistem	17
Tablo 6. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları	20
Tablo 7. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları ve ürün kodları	21
Tablo 8. RPMI 1640 Medyum Hazırlığı	23
Tablo 9. EEP ve WEP hücreiçi H_2O_2 düzeylerinin spektrofotometrik okuma sonuçları	28
Tablo 10. EEP ve WEP için $[Ca^{2+}]$ indeksleri	29
Tablo 11. Kuyucuk başına 5000, 2500, 1000 ve 500 hücre ile yapılan hücreiçi H_2O_2 düzeylerinin spektrofotometrik okuma sonuçları	30
Tablo 12. EEP ve WEP için $[Ca^{2+}]$ indeksleri	32
Tablo 13. EEP ve WEP hücreiçi H_2O_2 düzeylerinin spektrofotometrik okuma sonuçları	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis	6
Şekil 2. Flavonoidlerin genel yapısı	9
Şekil 3. Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin kimyasal yapısı	10
Şekil 4. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	12
Şekil 5. WEP için hücre içi H_2O_2 düzeyleri	33
Şekil 6. EEP için hücre içi H_2O_2 düzeyleri	35
Şekil 7. WEP için hücre içi Ca^{2+} indeksleri	36
Şekil 8. EEP için hücre içi Ca^{2+} indeksleri	36

KISALTMAR DİZİNİ

CaCl₂	Kalsiyum klorür
CAT	Katalaz
DCFH- DA	2', 7'-diklorofluoresan diasetat
DMSO	Dimetil sülfoksit
FBS	Fetal bovin serum
Fura- 2AM	Fura- 2 asetoksimetil ester
GR	Glutasyon redüktaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S-transferaz
H₂O₂	Hidrojen peroksit
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
NO[•]	Nitrik oksit radikali
O₂	Oksijen molekülü
O₂⁻	Süperoksit radikali
OH[•]	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit anyonu
PBS	Fosfat tuz tamponu
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RTCA	Real time cell analyzer
SOD	Süperoksit dismutaz

1.ÖZET

TÜRK PROPOLİSİNİN SULU EKSTRAKTININ İNSAN LARİNGEAL EPİDERMOİD KARSİNOMA (HEP-2) HÜCRE SERİLERİNDE HÜCREİÇİ SERBEST KALSİYUM VE HİDROJEN PEROKSİT DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Propolis arıların çeşitli bitki ve ağaçlardan toplayarak ürettiği günümüzde sağlık, gıda ve birçok alanda kullanılan reçinemsi, doğal bir üründür. Propolisin en önemli biyolojik etkilerinden birinin antikanser özelliği olduğu bilinmektedir. Bu biyolojik özelliğin araştırıldığı çeşitli kanser türlerinde propolis ilavesinin kanser hücrelerine sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir. Propolisin bu özelliğinin hücreleri apoptozise yönlendirmesiyle gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir. Bu çalışmada propolisin sitotoksik etkisinin mekanizmasını açıklayabilmek için hücreiçi hidrojen peroksit (H_2O_2) ve serbest kalsiyum (Ca^{2+}) düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada HEP-2 hücreleri kullanılarak Türk propolisinin sulu (WEP) ve etanollü (EEP) ekstraktlarının 0.05-3 mg/mL konsantrasyonlarda, hücreiçi H_2O_2 ve serbest Ca^{2+} indeksine (360/380 nm'lerdeki floresans oranları) etkisi spektrofotometrik yöntemle [2', 7'-diklorofluoresan diasetat (DCFH-DA) ve Fura-2 asetoksimetil ester (Fura-2AM), sırasıyla] incelendi. WEP ve EEP hücreiçi H_2O_2 konsantrasyonlarını ve Ca^{2+} indekslerini kontrole (0 konsantrasyon) göre ilk 5 dakikalık florimetrik okumalarda arttırdığı sonucu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Floresans, hücreiçi kalsiyum, insan laringeal epidermoid karsinoma, propolis, reaktif oksijen türleri

2. SUMMARY

EFFECT OF WATER EXTRACT OF TURKISH PROPOLIS ON INTRACELLULAR CALCIUM AND HYDROGEN PEROXIDE LEVELS IN HUMAN LARYNGEAL EPIDERMOID CARCINOMA CELL LINES (HEP-2)

Propolis is produced by bees from various plants and trees and is a resinous, a natural product used for health, food and a variety of purpose. One of the most biological effects of propolis is known as its anticancer property. In various cancer types investigated for this biological effect, it has been shown that propolis treatment may be cytotoxic to cancer cells. It has been suggested that this effect occurs to lead by apoptosis for cells. A major aim of the present study is to investigate intracellular H_2O_2 and free Ca^{2+} levels to explain the cytotoxic mechanism of propolis in a cancer cell-line. For this purpose, effects of water extract of Turkish propolis (WEP) and ethanolic extract of Turkish propolis (EEP) at concentrations of 0.05-3 mg/mL on intracellular H_2O_2 level and free Ca^{2+} index (a fluorescence ratio of 360/380 nm) were investigated by spectrofluorometric methods, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2AM), respectively. It was concluded that both WEP and EEP increased intracellular H_2O_2 levels ve Ca^{2+} index according to control (0 concentration) at first 5 minutes of fluorimetric readings.

Key Words: Fluorescence, human laryngeal epidermoid carcinoma, intracellular calcium, reactive oxygen species, propolis

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Propolis bazı ağaç ve bitkilerin tomurcuk ve eksudalarından toplanan, düşmanlara karşı koruyucu bir bariyer olarak kabul edilen doğal reçineli bir bal arısı ürünüdür (1).

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

Serbest radikal tek bir paylaşılmamış elektronu olan atom veya moleküldür (4). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest radikal olmamasına rağmen, hidrojen peroksit (H_2O_2), serbest radikaller gibi yeni serbest radikallerin oluşumlarını, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını, DNA zincir kırılmalarını, mutajenik ve karsinojenik etkileri oluşturabilir (5, 6).

Yapılan çalışmalar H_2O_2 'in kanserin gelişmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Kanser hücrelerinde, H_2O_2 düzeylerinde artış gözlemlendiği deneysel veriler tarafından desteklenmektedir. Hidrojen peroksitin hücresel seviyelerindeki belirli düzeyde artışı; kanserde hücre çoğalması, apoptozis direnci, metastaz, anjiyogenez ve DNA değişiklikleri de dahil olmak üzere birkaç önemli değişikliklerle bağlantılı olduğu bilinmektedir. Ancak doğal bileşikler gibi birçok antioksidan içerikli ürün kanser hücrelerinde H_2O_2 'nin düzeyini çok daha fazla arttırmaktadır. Bu durum apoptozisin indüklenmesine, metastaz ve anjiogenezin inhibisyonuna yol açmaktadır (6).

Canlılarda gerçekleşen apoptozis, yaraların iyileşmesi ve karaciğer hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesi gibi pek çok önemli olayda kalsiyum iyonları (Ca^{2+}) belirleyici rol oynamaktadır (7). Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin çoğalmasının hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu ile ilişkisi gösterilmiştir (8). Ayrıca Ca^{2+} aracılıklı sinyal

yollarının kanserin başlamasında, tümör oluşumunda ve tümörün ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (9).

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

Literatürde propolis sulu ekstraktı hazırlanarak HEp-2 hücre serilerinde hücre içi H_2O_2 ve serbest Ca^{2+} düzeylerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılacak olan bu çalışmada fonksiyonel bir gıda olarak antitümöral etkinliği de bilinen antioksidanlarca zengin Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma hücre serilerindeki (HEp-2) hücre içi serbest Ca^{2+} ve H_2O_2 düzeylerine etkisi incelenecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Propolis

Propolis, tüm dünyada geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanılan, arıların bitkilerden toplayıp ürettiği, doğal, son derece kompleks, reçinemsî bir arı ürünüdür (13). Bu son derece doğal arı ürünü bal arıları tarafından çeşitli bitki florasının yaprak, tomurcuk ve eksudaları toplanılarak üretilmektedir (14).

Propolis, Yunancada pro– için ‘savunma’ ve –polis için ‘şehir’ kelimelerinin biraraya gelmesiyle oluşan ve ‘şehrin ya da kovanın savunması’ anlamında kullanılmış olup günümüzde de bu anlamını yitirmemiştir (15).

Propolis eski çağlardan günümüze kadar farklı amaçlar için kullanılmıştır. Mısırlılar, propolisin çürümeyi engelleyici özelliğini ölüleri mumyalamak için kullanırken; Yunan ve Romalı hekimler propolisi antiseptik ve yaranın kabuk bağlamasını kolaylaştırıcı madde olarak kullanmışlardır. Saf halde ya da doğal ürünlerle birlikte kozmetikte, gıdaların bir bileşeni olarak ve birçok alanda kullanılmaktadır. Aynı zamanda Asya, Avrupa ve Amerikan şehirlerinde sağlık içeceği olarak popüler olarak tüketilmektedir (15, 16).

Arılar, bitkilerden elde ettikleri reçineyi çiğneyip tükürük enzimleriyle karıştırarak kısmen sindirirler ve kısmen sindirilmiş materyali, balmumu ile karıştırarak kovanda kullanılmaktadırlar (17). Propolis kovanda, kovanın iç duvarları düzeltmek, kovandaki delikleri kapatmak, koloniyi hastalıklara karşı korumak, kovanı dışardan gelen davetsiz misafirlerden ve etkenlerden korumak için kullanılmaktadır (15, 18).

Propolisin en önemli botanik kaynağını ise kavak, huş, söğüt, karaağaç, çam ağaçları ve meşe gibi türlerin oluşturduğu bilinmektedir (1).

Propolis, biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik özellikleri sebebiyle son zamanlardaki çalışmaların ilgi çekici unsuru olmaya başlamıştır (19). Sitotoksik, antioksidan, antibakteriyel, antihepatotoksik, nöroprotektif, antimikrobiyal, antiviral aktiviteler gibi birçok farmakolojik ve biyolojik özellik sunmaktadır (20, 21).

4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis, elastik görünümlü, kaynağına ve depolama süresine göre hardal sarısı, kırmızı, kahverengi ve yeşil gibi değişken bir renk florasına sahip reçineli bir maddedir (22, 23). Karakteristik kokusu olup ciltteki yağlarla ve proteinlerle beraber güçlü etkileşim göstermesinden dolayı yapışkan bir özellik sunmaktadır (24).

Propolisin erime noktası 60-69°C arasında olup soğukta sert ve kırılgan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapısı vardır (25, 26). Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis örnekleri Şekil 1’de gösterilmiştir (27).



Şekil 1. Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis

Propolisin su ve hidrokarbon çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek oranda çözünürlük gösterdiği de bilinmektedir (28).

4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Propolisin kimyasal bileşiminin karmaşıklığı ve çeşitliliği hakkında bilgilere literatürde oldukça geniş yer verilmiştir (14).

Propolis, arılar tarafından ziyaret edilen her bir bölgenin florasının ekolojisiyle bağlantılı olup son derece karmaşık ve değişken kimyasal bileşime sahiptir (29). Bunun sebebi ise arıların iklim koşulları, arazi, su durumu ve çevresel faktörlere göre bölgeden

bölgeye değişim gösteren uygun bitkisel kaynaklardan reçine ve bitki eksudaları toplamadır (1).

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler (30)

Bileşenler	Ana Maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoidler, Terpenler Fenolik asitler ve esterler	% 45-55
Mum ve yağ asitleri	Arılardan veya bitkilerden mum, Bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	% 25-35
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	% 10
Polen	Eser elementler Serbest amino asitler	% 5
Diğer maddeler	Laktonlar Steroidler Şekerler Kinonlar	% 5

Ham propolisin bileşimi kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle % 50 reçine, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (2). Propoliste bulunan başlıca bileşenler Tablo 1’de verilmiştir.

Dünyada arı florası türüne, botanik ve coğrafik kökenine bağlı olarak kimyasal içeriği değişen birbirinden farklı propolis örneklerinden bugüne kadar 300’den fazla bileşik tespit edilmiştir (14, 19). İzole edilen bu bileşiklerin ana sınıfları başlıca flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik asit esterleridir (29).

Propolis magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), iyot (I), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn) ve demir (Fe) gibi elementlerle B1, B2, B6, C ve E vitaminleri ile çok sayıda yağ asidi içermektedir. Bunlara ek olarak suksinat dehidrogenaz, glukoz-6 fosfataz, adenosin trifosfataz ve asit fosfataz gibi enzimler de yapısında yer almaktadır (31).

Farklı bölgelerden toplanıp elde edilen Türk propolisinin başlıca fenolik bileşenlerinin ise galangin, kuersetin ve kafeik asit olduğu da çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir. (32) Propolisin içerdiği etken maddeler ve bilinen etkileri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Propolisin içerdiği etken maddeler ve bilinen etkileri (15, 29, 32-43)

Krisin: Antimikrobiyal, antifungal, antitümöral, antikanser, antialerjik, antiinflamatuvar, vazodilatör, antianksiyolitik, antioksidan, antiproliferatif

Apigenin: Antitümöral ve antiülser

Kuersetin: Antitümöral, antimikrobiyal ve spazmolitik

Galangin: Antifungal, antiproliferatif, antitümöral, antibakteriyel, antimikrobiyal, antimutajenik, antiklastojenik, antioksidatif, radikal süpürücü, metabolik enzim modüle

Pinosembrin: Antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar

Artepillin C: Antitümöral, apoptozis indüklemeye, antimikrobiyal, antioksidan

Ferulik asit: Antibakteriyel, antiviral, antitümöral, antiülser

Kafeik asit: Antiviral, antibakteriyel, antioksidan, tümör büyümesinin kontrol edilmesi, antitümöral

Kafeik asit fenetil ester: Antiinflamatuvar, antiproliferatif, antikanser, antitümöral, antimikrobiyal

p-Kumarik asit : Antitümöral ve antiülser

4.1.2.1. Flavonoidler

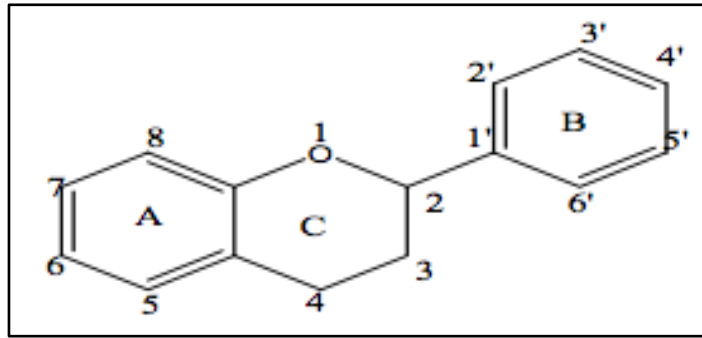
Flavonoidler bir asrı aşkın bir süredir düşük molekül ağırlıklı bitkisel pigmentler olarak bilinmektedir. Çeşitli bitkisel kaynaklı besin ve içeceklerde (meyveler, sebzeler, çay, kakao, şarap) dağılmış olan polifenolik bileşik grubundandır (44).

Doğada bitkilerden izole edilmiş birçoğu bitkinin meyve, yaprak ve çiçek gibi kısımlarında bulunan ve bunların renginden sorumlu olan 4000’den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur (45).

Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri oldukça geniş bir alan oluşturmaktadır. Serbest radikal yakalayıcısı olmaları, enzim aktivitelerini düzenlemeleri, hücre çoğalmasını inhibe etmeleri, antibiyotik, antiallerjen, antiviral, antitümör, antimutajen,

antiülser ve antiinflamatuvar ilaç gibi hareket etmeleri ile insan sağlığına birçok faydası olup araştırmacıların ilgisini çekmektedirler (44, 46, 47).

Flavonoidler antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Flavonoidlerin genel yapısı Şekil 2’de gösterilmiştir (47).



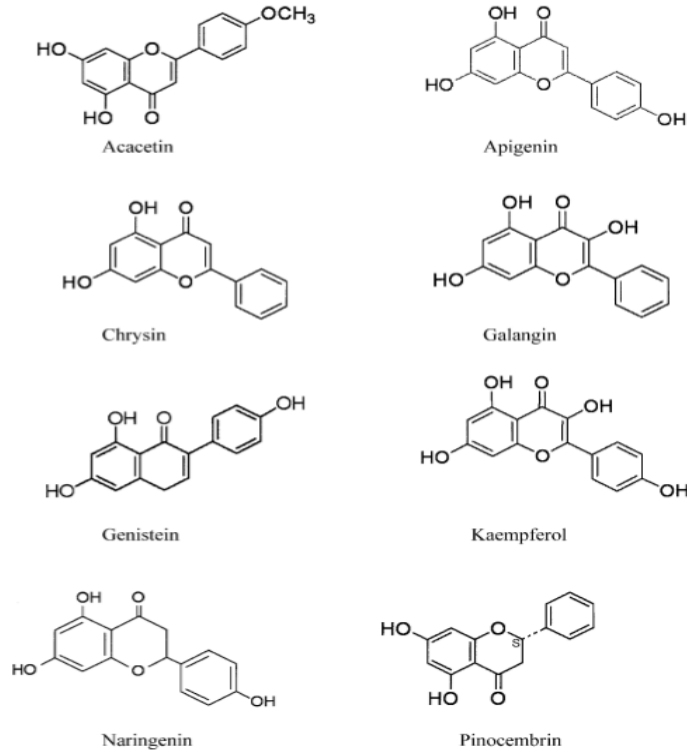
Şekil 2. Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidlerin metal şelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme ve reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma (inhibe etme) özellikleri de vardır (48).

Bunlara ek olarak trombosit agregasyonu, siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzim aktivasyonlarını inhibe etme özellikleri de bilinmektedir. Ayrıca hidrolazlar, cAMP fosfodiesteraz, lipaz, α -glukosidaz gibi enzimleri de inhibe ettikleri bilinmektedir (47).

Flavonoidler içerdikleri C halkasındaki değişimlere göre altı ana alt gruba ayrılabilirler. Bu gruplar: flavonlar, flavanoller, flavanonlar, kateşinler, antosiyanidinler ve izoflavonlardır (50). Diyetle alınan flavonoidler genellikle glikozillenmişlerdir (50).

Propolisten galangin, kaempferol, kirisin, kuersetin, pinosembrin, pinostrobin ve pinobanksin, apigenin, naringenin gibi birçok flavonoid izole edilmiştir (32, 51). Propolisin fenolik bileşikleri arasında başlıca; sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve esterleri, ferulik asit yer almaktadır (52). Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin kimyasal yapıları Şekil 3’te gösterilmiştir (53).



Şekil 3. Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin kimyasal yapısı

4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri

Coğrafi çeşitliliğe bağlı olarak değişken bir kimyasal içeriğe sahip olan propolis çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Propolisin sahip olduğu bu biyolojik aktiviteler çeşitli ülkelerde bilimsel araştırma gruplar tarafından kapsamlı bir şekilde çalışılmış olup konu ile ilgili çok sayıda bildiri yayınlanmıştır (54).

Propoliste bulunan bazı flavonoidler antiinflamatuvar (akasetin), antiülser (lutein ve apigenin), antialerjik (krisin ve kaempferol) ve antibakteriyel (pinosembrin ve galangin) gibi aktivitelere sahiptirler (29).

Japonya’da çeşitli coğrafik orijinli (Arjantin, Avusturya, Brezilya, Bulgaristan, Şili, Çin, Macaristan, Yeni Zelanda, Güney Afrika, Tayland, Ukrayna, Uruguay, Amerika ve Özbekistan) propolis örnekleriyle yapılan bir çalışmada propolisin antioksidan aktivitesi karşılaştırılmış ve total polifenolik ve flavonoid içeriğine bağlı olarak antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (55). Propolisin güçlü antioksidan

özelliğinin yanında antimikrobiyal özelliğinin de polifenol ve flavonoid içeriği ile ilişkili olduğu bilinmektedir (56).

Propolis ve içeriğinde yer alan flavonoidlerin mide, kolon, akciğer, ağız, prostat ve cilt gibi kimyasal kaynaklı kanser gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (3).

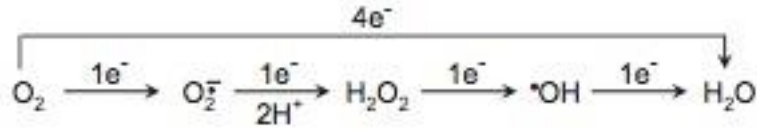
Propolisin tüm bu özellikleri dışında immünomodülatör, hepatoprotektif, antiviral (57), apopitotik, radyoprotektif, antiproliferatif (58), karaciğer, kalp ve beyni koruma (26) gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri de birçok araştırmacı tarafından farklı deneysel araştırmalarla rapor edilmiştir.

4.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, son yörüngelerinde tek ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atomlar veya moleküllerdir (59). Bunlar pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler (30). Bu atom ya da moleküller, eşlenmemiş elektronlar içerdiklerinden kararsız olup oldukça reaktiftirler. Kararlı hale gelebilmek için diğer moleküllerden ya elektron alırlar ya da diğer moleküllere elektron verirler (60). Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar (61). Bu etki ile birlikte pek çok hücrede kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğu söylenmektedir (62).

Organizmalardaki serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir. Ancak azot, karbon ve kükürt kaynaklı serbest radikaller de oluşabilmektedir (63).

Moleküler oksijen tüm aerobik organizmaların yaşamı için oldukça önemlidir. Normal hücrelerde gerçekleşen oksijenden ATP üretimi sürecinde oksijen suya indirgenmektedir (4). Elektron taşıma zincirinde meydana gelen elektron sızıntısıyla moleküler oksijenin tamamı suya dönüşmek yerine % 1-3'lük bir kısmı da süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) dönüşmektedir (59).



Şekil 4. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROS, RNS) elektron taşıma zinciri gibi hücre içi metabolik süreçler sırasında üretilir (64). Şekil 4'te reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu gösterilmiştir.

Reaktif oksijen türleri oldukça sık bir şekilde karşımıza çıkmakla birlikte, bu türler içerisinde sadece oksijen radikalleri olmayıp aynı zamanda radikal olmayan bazı oksijen türleri de yer almaktadır (65). Bu türler son zamanlarda transkripsiyon faktörü aktivasyonu, gen ekspresyonu, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi çeşitli hücresel olayların düzenlenmesinden sorumlu tutulmuşlardır (66). Tablo 3'te biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri verilmiştir (65).

Tablo 3. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (65)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $\cdot OH$	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksil, $RO_2^{\cdot}$	Ozon, O_3
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Singlet Oksijen, $O^{\cdot}$
Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$
Nitrik oksit, $NO^{\cdot}$	Hidroperoksit, $L(R)OOH$

4.2.1. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri

Serbest radikaller hücrelerde endojen veya ekzojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak meydana gelmektedirler (67). Tablo 4'te hücredeki serbest radikal kaynakları verilmiştir.

Tablo 4. Hücredeki serbest radikal kaynakları

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

4.2.2. Serbest Radikal Türleri

4.2.2.1. Nitrik Oksit (NO[•])

Nitrik oksit biyolojik dokularda spesifik nitrik oksit sentaz (NOSs) tarafından üretilir. Yaygın reaktif radikal olup kan basıncının düzenlenmesi, düz kas gevşemesi, sinir iletimi ve savunma mekanizması gibi vücuttaki birçok fizyolojik süreçlere katılan önemli bir oksidatif sinyal molekülü işlevi görmektedir. Düşük oksijen konsantrasyonunda nitrik oksit daha karardır ve sulu ortamda sadece birkaç saniyelik yarıömrü vardır. Su ve lipid ortamında çözünür olduğu için kolayca sitoplazma ve plazma membranları boyunca yayılır (59, 1).

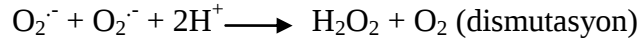
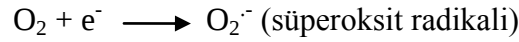
4.2.2.2. Peroksinitrit Anyonu (ONOO⁻)

Nitrik oksit ve süperoksit anyonu oksidatif olarak daha aktif olan peroksinitrit (ONOO⁻) anyonunu önemli miktarda üretmek için reaksiyona girerler. İki radikalın birleşimiyle ortaya çıkan bu güçlü oksidan ajan DNA kırılması ve lipid peroksidasyonuna neden olan toksik özelliğe sahiptir (59).



4.2.2.3. Süperoksit Radikalleri ($O_2^{\cdot-}$)

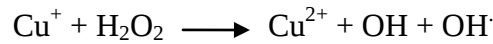
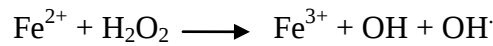
Çeşitli hastalıklarında patofizyolojisinden sorumlu tutulan süperoksit radikali genellikle hücrenin mitokondrisinde gerçekleşen elektron taşıma zincirindeki elektron kaçağı ile birlikte oksijenden üretilmektedir. Bu radikal diğer radikallere kıyasla çok daha az reaktif ve seçiciliği daha fazladır. Biyolojik sistemlerde ömrü birkaç saniyedir (4, 59).



Süperoksit radikali kendi başına reaktif olmamakla birlikte dismutasyon adı verilen reaksiyonu sonucu H_2O_2 oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu H_2O_2 , metal iyonları varlığında oldukça reaktif olan hidroksil radikali oluşturmak için ayrıışmaktadır (68, 69).

4.2.2.4. Hidroksil Radikalleri ($OH^{\cdot}$)

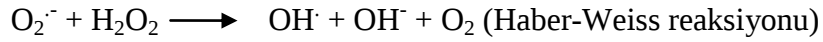
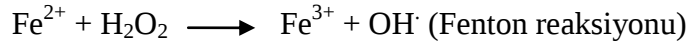
Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) yaklaşık yarı ömrü 10^{-9} s olan oldukça güçlü bir oksidandır. Bilinen en toksik radikal olmakla birlikte lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi hemen hemen bütün makromolekülleri okside edebilmektedir (69). Redoks metal iyonları $OH^{\cdot}$ 'ni oluşturmak için H_2O_2 ile birlikte reaksiyona girerler (4). Ayrıca süperoksit radikali Haber-Weiss reaksiyonu ile $OH^{\cdot}$ 'ne dönüşebilmektedir (59).



4.2.2.5. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit reaktif oksijen türlerinin radikal olmayan gurubunda yer alıp enzimler dahil olmak üzere çeşitli yollarla daha reaktif olan reaktif oksijen türlerine dönüşebilmektedir. Süperoksit radikallerinin dismutasyonu (iki süperoksit radikalının iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluşturması) sonucu oluşan reaktif bir moleküldür (70). Fizyolojik koşullar altında diğer reaktif oksijen türleriyle karşılaştırılınca daha kararlı ve daha az reaktif olmasına rağmen spesifik kimyasal reaksiyonları gerçekleştirme özelliğine sahiptir (5).

Bu reaktif oksijen türü hücre membranlarından kolayca geçme kapasitesinde olup hücreiçine ve hücredişına kolayca nüfuz edebilmektedir (70). Hidrojen peroksit redoks metal iyonları (demir ve bakır gibi) varlığında Fenton reaksiyonu ve $O_2^{\cdot-}$ radikalinin varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucu oldukça reaktif serbest oksijen radikali olan $OH^{\cdot}$ 'ni oluşturmaktadır (60, 69).



4.2.2.5.1. Hücreiçi H_2O_2 ve Önemi

Hidrojen peroksit biyolojik sistemlerdeki yüksek konsantrasyonda lipid, protein ve nükleik asitlere potansiyel hasar verme ve Ca^{2+} gibi sinyal özelliği gösterebilen bir reaktif oksijen türü olarak bilinmektedir (5).

Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, hücre gelişimi, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, anjiyogenez, bağışıklık fonksiyonları, motilite ve apoptozis gibi olayları da içeren birçok hücresel olayların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (71).

Çeşitli kanser hücrelerindeki H_2O_2 düzeyi normal hücrelere oranla daha farklı düzeylerde olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde MnSOD'un aşırı ekspresyonunun da bazı kanser hücrelerinde hücreiçi H_2O_2 düzeylerinde değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir. Hidrojen peroksit, konsantrasyon bağımlı olarak, kanserli hücrelerde iki zıt etki olan hücrelerin büyümesi ve apoptozu uyardığı çalışmalarla gösterilmiştir (72).

Yüksek oranda H_2O_2 üretimi çok etkili antioksidan sistemlerle dengededir. Dehidratasyon, düşük ve yüksek sıcaklıklar, aşırı radyasyona maruz kalma bu dengeyi rahatsız eder. Öyle ki artan H_2O_2 , enzim aktivasyonu, gen ekspresyonu, programlanmış hücre ölümü ve hücresel hasarı içeren sinyal tepkilerini başlatmaktadır (73).

4.3. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde. Bu denge bozulmadığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Vücudumuzda oluşan serbest radikallerin antioksidan savunma

sistemi ile arasında meydana gelen dengesizliğe oksidatif stres denilmektedir. Bu dengenin bozulması doku hasarına sebep olmaktadır. Oksidatif stres DNA, protein, lipid ve karbohidrat yapılarında modifikasyonlara sebep olabilmektedir (4, 60, 61).

Oksidatif strese azalmış antioksidan düzeyleri ve antioksidan enzimler sebep olabilmektedir. Ayrıca toksinlere maruz kalarak artan serbest radikal üretimi de oksidatif strese sebep olabilmektedir (4).

Oksidatif stres, ateroskleroz, pulmoner fibrozis, kanser, nörodejeratif hastalıklar ve yaşlanma gibi çok sayıda insan hastalığı ile ilişkili bulunmuştur (74).

4.3.1. Antioksidan etki mekanizmaları

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

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

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

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

D. Zincir kırıcı (Chain breaking) etki: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen bu etki hemoglobin ve E vitamini tarafından yapılır (75).

4.3.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikal hasarına karşı vücuttaki organ ve hücreleri korumak için son derece kompleks antioksidan sistemler mevcuttur. Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkileri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarla denge içerisinde (76).

Reaktif oksijen türlerinin üretimi, çeşitli hücrelerde ölüm ve hayatta kalmaya sebep olan olayların aktivasyonu için artış göstermektedir (66).

Ansioksidanlar başlıca serbest radikal süpürücüsü olmakla birlikte insan vücudunda bulunması oksidatif strese bağlı hasarların büyük çoğunluğunu azaltmaktadırlar. Ayrıca lipid peroksidasyonunu, proteinlerin çapraz bağlanmasını ve DNA mutasyonunu engellemektedirler (75).

Normal koşullarda antioksidanların aktiviteleri ve hücre içi düzeyleri arasında bir denge söz konusudur. Bu denge organizmaların sağlıklı yaşam sürdürebilmesi için gereklidir (59).

Tablo 5'te yer alan enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların oksidatif strese karşı koruma özellikleri birçok makalede yer almaktadır (59, 30)

Tablo 5. Antioksidan sistem

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

4.4. Hücre içi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu

Kalsiyum pek çok hücre sel süreçleri kontrol etmekten sorumlu yaygın bir şekilde bulunan hücre içi bir sinyaldir (77). Sitolitik serbest Ca^{2+} konsantrasyonundaki artış ise bu kalsiyum sinyalinin oluşumuna sebep olmaktadır (78).

Dinlenim durumunda hücre dışı kalsiyum iyon yoğunluğu, hücre içine oranla 10 000 kat daha yüksektir (hücre dışı 10^{-3} M, hücre içi 10^{-7} M) (79).

Hücreler, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarını kalsiyum kanalları, kalsiyum pompaları ve kalsiyum değiştiricileri gibi çeşitli kalsiyum düzenleme mekanizmaları ile kontrol etmektedirler (80).

Kalsiyumun hücreiçinde artışı ya hücre dışından plazma membranındaki kalsiyum seçici kanallar (voltage bağımlı kalsiyum kanalları, reseptör bağımlı kanallar, depo bağımlı kanallar) ile birlikte hücre içine girerek olur ya da hücre içi kalsiyum depolarından inositol 1,4,5-trifosfat ve ryanodin reseptörleri aracılığıyla kalsiyum salınımı ile birlikte olur (78).

Hücre içi kalsiyum miktarındaki azalış ise plazma membran pompaları (Ca^{2+} -ATPaz) ya da değiş tokuşçuları (Na^+ - Ca^{2+} “değiş tokuşu”) tarafından dışarı atılarak ya da başlıca mitokondri ve endoplazmik retikulumda ağırlıkla temsil edilen kalsiyum depolarına kalsiyum taşıyıcı sistemler aracılığı ile kalsiyumu alarak sağlanmaktadır (81).

4.4.1. Hücre içi Ca^{2+} Sinyali ve Önemi

Hücrelerin işlevleri için bazı iyonların değişimleri önemli rol oynamaktadır. Tetikleyici bu iyonların başında ise kalsiyum yer almaktadır (79). Kalsiyum yer kabuğunda bulunan en bol bulunan beşinci element olmakla birlikte insan vücudunda da en bol bulunan katyondur (82).

Kalsiyumun iyonik formu (Ca^{2+}) evrensel olarak hücre içi ikincil haberci olarak; kas kasılması, hücre gelişimi, endositozis, ekzositozis mitotik aktivite, immün cevap, (83), sinir iletimi, enzim ve hormon salgılanması (82), enerji iletimi, apoptozis, hafıza ve öğrenmede kemotaksis gibi birçok biyolojik sürecin ayarlanmasında görevlidir (9).

Kalsiyum aracılıklı sinyal yollarının kanserin başlatılması, tümör oluşumu, tümör ilerlemesi, metastaz ve anjiyogeneizde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Hücre ölümü aktivasyonu ve yürütülmesinde yüksek seviyede hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonları olduğu gösterilmiştir (9). Bazı kanserler hipokalsemi ile ilişkili olduğu ve tümörlerin alışılmadık derecede yüksek kalsiyum düzeylerine sahip oldukları kabul edilmektedir (84).

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

Larenks kanseri, baş boyun kanserlerinden sıklıkla görülmekle birlikte malign baş boyun tümörlerinin yaklaşık % 25’ini oluşturmaktadır (10). Son yıllarda bu kanserin görülme sıklığı artmaktadır (85). Tüm kanserlerin yaklaşık % 2.7’sini ve kansere bağlı

ölümlerinse % 2.1'ini oluşturmaktadır (10). Skuamöz hücreli karsinom tüm malign tümörlerin % 85-90'ını temsil etmektedir (86).

HEp-2 hücre serisi insan nazofaringeal mukozasının laringeal karsinoma hücrelerinden üretilir. Yavaş büyüyen tümör grubundandır (12).

Larenks kanseri, ses ve solunumda yaptığı değişikliklerden dolayı nispeten erken teşhis edilebilmektedir. Değişik ülkelerde zamana ve maruz kalınan risk faktörlerine göre hastalığın şekli değişebilmektedir. Larenks kanser gelişimine tütün, alkol, meslek icabı kalınan risk faktörleri (asbest, çimento tozu, katran, tekstil lifleri, sülfirik asit), diyet ve vitamin eksikliği, radyasyona maruz kalma, viral risk faktörleri, gastroözofageal (larengeofarengeal) reflü gibi etkenler sebep olabilmektedir (87, 88)

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

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

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

Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	Üretici Firma
Spektrofluorimetre	Spectra Max,Paradigm, Molecular Devices
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
Real Time Cell Analiz sistemi	Roche Diagnostics GmbH
İnvert mikroskop	Nikon eclipse TS100
CO ₂ inkübatörü	Hera Cell 240, Heraeus
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5810
Mikropipetler (20, 100, 200, 1000 µL)	Eppendorf
Hassas terazi	Mettler Toledo AB204-S
pH metre	Hanna instrument HI 2211
Çalkalayıcı inkübatör	Eppendorf Centrifuge 5810
Derin dondurucu -80°C	Nuaire
Steril falkon tüpler (15 mL,50 mL)	Cellstar
Steril Pipet uçları (10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Grenier bio-one
Cam malzemeler (beher, erlen, balon joje, cam şişe)	Isolab
Membran filtresi	
Vorteks	Agilent Econofilter
Steril pastör pipet	Windaus, IKA Vortex Genius 3
Steril enjektör	
UV lamba	
Etüv	
Eppendorf tüpler	
Parafilm	

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 7’de verilmiştir.

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

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma, ürün kodu ve saflığı
Penisilin streptomisin (20 mL)	Biological Industries, 1245637, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
2', 7'-diklorofluoresan diasetat	Sigma-Aldrich, BCBK6827V, Almanya
Sodyum piruvat solüsyonu (100 mL)	Biological Industries, 1250700, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Tripsin EDTA Solüsyonu (100 mL)	Biological Industries, 1302762, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Fetal Bovin Serum (500 mL)	Biological Industries, 716779, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Fura-2 asetoksimetil ester	İnvitrogen, 827102, Eugen, Oregon, Amerika
NaCl	Merck, K363600, Darmstadt, Almanya
KCl	Merck, TA771535, Darmstadt, Almanya
Na ₂ HPO ₄	Merck, F1021786125, Darmstadt, Almanya
KH ₂ PO ₄	Merck, A153371, Darmstadt, Almanya
CaCl ₂	Merck, K90242787, Darmstadt, Almanya
NaHCO ₃	Merck, K31437329, Darmstadt, Almanya
H ₂ O ₂	Sigma, BCB7137V, İsviçre
RPMI 1640	Biological Industries, 1311911, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Dimetil sülfoksit	Sigma-Aldrich, BCBG7474V, Fransa

5.2. Yöntem

5.2.1. Deneyin Planlanması

Tüm çalışmalar Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 10010 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. HEp-2 hücrelerinde ideal hücre sayısının ve hücrelerin proliferasyonunu durduran uygun propolis konsantrasyonunun belirlenmesi işlemi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Real Time Cell Analyzer (RTCA) cihazı ile gerçekleştirildi. Propolis uygulanmadan önce hücreleri logaritmik artış fazında yakalamak için hücreler 24 saat inkübe edildi ve

en sonunda büyüme eğrileri analizi yapıldı. Optimal hücre sayısı her kuyu için 5000 olarak belirlendi.

Proliferasyonu durduran uygun propolis konsantrasyonunun tespiti için 1.25-50 mg/mL arası konsantrasyonlarda propolis sulu ekstraktları ile 0.01-2.4 mg/mL arası konsantrasyonlarda propolis etanolik ekstraktları hücrelere verilerek 48 saat süreyle proliferasyon takibi yapıldı. Hücre proliferasyonuna etki eden uygun propolis konsantrasyonları hem etanol ekstraktları için hem de su ekstraktları için tespit edildi. Daha sonra hücrelere belirlenen konsantrasyonlardaki propolis muamelesiyle hücredeki hücre içi H_2O_2 ve serbest Ca^{2+} düzeylerine spektrofotometrik yöntemlerle bakıldı.

5.2.2. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Madde ve Malzemelerin Hazırlanması

Propolis Sulu Ekstraktlarının (WEP) Hazırlanması: Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan propolis örnekleri toz haline getirilip karıştırıldı ve Türk propolisi toz karışımı elde edildi. 100 g toz propolis 1000 mL saf su ile çözüldü. İyice vortekslendikten sonra sıcakta sürekli çalkalanarak en az 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda çalkalayıcı inkübatörden çıkarılan ekstrakt, süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0,22 μ m'lik steril filtrelerden geçirilerek hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirildi. Bu şekilde hazırlanan 100 mg/mL'lik konsantrasyondaki stok propolis ekstraktından seyreltme yoluyla çeşitli konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı (0.5-3 mg/mL).

Propolis Etanolik Ekstraktlarının (EEP) Hazırlanması: Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan propolis örnekleri toz haline getirilip karıştırıldı ve Türk propolisi toz karışımı elde edildi. 200 g toz propolis % 70'lik 1000 mL etanol ile çözüldü. İyice vortekslendikten sonra sıcakta sürekli çalkalanarak en az 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda çalkalayıcı inkübatörden çıkarılan ekstrakt, süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0,22 μ m'lik steril filtrelerden geçirilerek hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirildi. Bu şekilde hazırlanan 200 mg/mL'lik konsantrasyondaki stok propolis ekstraktından seyreltme yoluyla çeşitli konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı (0.05-0.2 mg/mL).

H_2O_2 Hazırlanması: 17.6 M'lık stok H_2O_2 çözeltisinden seyreltme yoluyla istenilen konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı (0.25-10 mM).

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

RPMI 1640 Medyum Hazırlanması: Fetal Bovin Serum, -70°C'den 37°C'ye alınarak çözülmesi sağlandı. Penisilin/streptomisin ve Sodyum pirüvat -70°C'den oda sıcaklığına alınarak çözülmesi sağlandı. 100 mL RPMI 1640 medyumunun hazırlanması için Tablo 8'deki miktarlardaki solüsyonlar hücre kültürü kabini içinde steril şartlara dikkat edilerek karıştırıldı ve RPMI 1640 ile 100 mL'ye tamamlanarak 0,22 µm'lik steril filtre ile filtre edildi ve +4°C'de saklandı.

Tablo 8. RPMI 1640 Medyum Hazırlığı

Madde	Hacim	Final konsantrasyon
FBS (fetal sıgır serumu)	10 mL	% 10
Penisilin/Streptomisin, 100x	1 mL	% 1 (1x)
Sodyum Pürivat, 100 mM	1 mL	% 1 (1 mM)
RPMI 1640	88 mL	

Hücreiçi Ca²⁺ Tayininde Kullanılan Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 4 mM NaHCO₃, 0.2 mM Na₂HPO₄ tartılarak 800 mL kadar saf su ile çözünmesi sağlandı. pH metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra çözeltinin pH'sı ölçülerek saf su ile son hacim 1 litreye tamamlandı. Son pH 7.2 olarak kaydedildi. 0.22 µm'lik steril filtre ile filtre edildi ve +4°C'de saklandı.

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

DCFH-DA Hazırlanması: 1.94 mg DCFH-DA (hücreiçi H₂O₂ ölçümünde kullanılan prob) karanlık ortamda tartıldı ve 1000 µL DMSO ile çözülerek 4000 µM'lık stok çözelti hazırlandı.

Fura-2AM Hazırlanması: Karanlıkta 50 µg Fura-2AM (hücre içi Ca^{2+} ölçümünde kullanılan boya) 50 µL DMSO ile çözülerek 1000 µM'lık stok çözelti hazırlandı. İstenilen konsantrasyondaki çözeltiler seyreltme yoluyla elde edildi (800-200 µM).

5.2.3. Hücre Kültürü

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

5.2.3.1. HEp-2 Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Çalışmada O.M.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan temin edilen HEp-2 hücreleri kullanıldı. HEp-2 hücreleri fetal sıgır serumu ile takviye edilmiş penisilin/streptomisinli RPMI 1640 besiyerinde, % 5'lik CO_2 ortamında, 37°C'de, 25 cm^2 'lik flakslarda, inkübatörde çoğaltıldı.

5.2.3.2. HEp-2 Hücrelerinin Pasajlanması

Hücreler flaskın yüzeyini % 70-80 kadar kaplayınca pasajlama yapıldı. Pasajlama için öncelikle flasktaki besiyeri uzaklaştırıldı. ~2-3 mL steril PBS alınarak flaska aktarıldı. Hücreler yıkanarak PBS uzaklaştırıldı. ~1 mL Tripsin-EDTA solüsyonu flaska ilave edildi ve 3-5 dakika süreyle CO_2 inkübatöründe bekletildi. Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra Tripsin-EDTA'nın üzerine ~3-4 mL RPMI 1640 medyum ilave edildi ve karıştırıldı. RPMI 1640 medyum ile hücreler 15 mL'lik falkon tüpte toplandı ve 130 g'de, oda sıcaklığında, 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 25 cm^2 'lik flakslara uygun sayıda hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi de 5 mL'ye tamamlandı.

5.2.3.3. Hep-2 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığının Tespiti

Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 10 µL'si 10 µL tripan blue ile karıştırılarak karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışım pipet ile tekrar karıştırılarak 10 µL alınarak neubauer hematositometre lamına aktarıldı. Işık mikroskobu altında 10x objektif kullanarak canlı ve ölü hücreler sayıldı. Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanlar sarı-yeşil renkte, ölü olanlar mavi renkte görüldü. Mikroskopla bakıldığında hematositometrede 16 küçük karenin dört köşede bulunduğu görülür. Çapraz köşelerde bulunan hücreler sayılır ve mililitredeki canlı ve ölü hücre sayısı; sayılan hücre sayısı x seyreltme oranı x 10^4 bağıntısı kullanılarak hesaplandı.

5.2.4. HEp-2 Hücre Serisi İçin Uygun Hücre Sayısı, DCFH-DA ve H₂O₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bu çalışmanın öncesinde Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen deney sonucunda çalışmanın yapılacağı uygun hücre sayısının 5000 olduğu tespit edildi. Her bir kuyucukta 5000 hücre, 48 saat propolis inkübasyonu, 20 µM DCFH-DA ve 4 µM Fura-2AM şartlarında yapılan denemelerdeki spektrofotometrik ölçüm sonuçlarını istenilen aralıkta olmadığı için farklı sayıda hücre, inkübasyon süresi ve boya konsantrasyonları kullanılarak yeni deneme yapıldı.

Bu yeni deneme için iki ayrı pleyt düzenlemesi yapıldı. Birinci pleytte hücre sayısının 5000 ile 2500 olduğu kuyucuklar yer alırken ikinci pleytte 1000 ile 500 hücre sayılarının olduğu kuyucuklar yer aldı. Her iki pleytin belirli kısımlarına son konsantrasyon 10 µM ve 20 µM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda DCFH-DA ve çeşitli konsantrasyonlarda (0.25-10 mM arasında) H₂O₂ ilave edilerek uygulama yapıldı.

Bu spektrofotometrik okumanın sonuçlarına göre uygun hücre sayısı, DCFH-DA ve H₂O₂ konsantrasyonu belirlendi. Ayrıca H₂O₂'nin HEp-2 hücreleri üzerinde etkinliğinin değerlendirilmesinin yapılacağı uygun konsantrasyon belirlendi.

5.2.5. HEp-2 Hücre Serisi İçin DCFH-DA Muamele Süresinin Belirlenmesi

Hücreiçi H_2O_2 düzeylerinin DCFH-DA ilavesiyle yapılan spektrofiorimetrik okumalarının (10, 20, 40, 60, 120, 180 ve 240. dakika) sonucunda DCFH-DA'nın hücrelerle uygun muamele süresi belirlendi.

5.2.6. HEp-2 Hücre Serisinin Propolis Ekstraktları ile Muamele Süresinin Belirlenmesi

Yapılan denemelerde hücrelerin ilave edildikten 12 saat sonra pleytlere oturduğu belirlenip üzerine istenilen konsantrasyonlarda propolis ekstraktları ilave edildi. 4 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında spektrofiorimetrik okumalar gerçekleştirildi. Bu okumanın değerlendirilmesine göre propolis ile hücrelerin muamele süresi belirlendi.

Bu işlem sadece H_2O_2 düzeylerine bakılarak gerçekleştirildi. Belirlenen uygun muamele süresi Ca^{2+} düzeyine bakılan deneyde de kullanıldı.

5.2.7. HEp-2 Hücre Serisi İçin Fura-2AM Muamele Süresinin Belirlenmesi

Hücredeki H_2O_2 düzeylerindeki değişimlerin ölçümünde kullanılan DCFH-DA'nın muamele süresi (10, 20, 40, 60, 120, 180 ve 240. dakika) göz önüne alınarak ve aynı zamanda Fura-2AM (45. dakika) ile deneme yapılarak uygun olan Fura-2AM'nin muamele süresi belirlendi.

5.2.8. HEp-2 Hücre Serisi İçin Fura-2AM Uygun Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücreiçi serbest Ca^{2+} düzeylerinin belirlenmesi sırasında iki ayrı pleyte aynı sayıda hücre ilave edilerek ve eşit sürede propolis muamelesi sonrasında okuma işlemi gerçekleştirildi. Yapılan tek farklılık pleytlere 0.5 ve 1 μM olacak şekilde iki ayrı konsantrasyonda Fura-2AM uygulanmasıydı. Spektrofiorimetrik okuma sonuçlarına göre uygun Fura-2AM konsantrasyonu belirlendi.

5.2.9. Etanol ve Suyun Hep-2 Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Yapılan tüm deneme işlemlerinde pleytin belirli bir kısmına % 70'lik etanol ve saf su ayrı ayrı ilave edildi. Propolis ilave edilmeyen bu % 70 etanol ve saf su içeren kuyucukların spektrofiorimetrik okumaları sonucunda % 70'lik etanolün ve saf suyun etkinliği değerlendirildi.

5.2.10. Propolisin Hücreiçi H₂O₂ Düzeyine Etkisinin Belirlenmesi

Her bir kuyucukta uygun miktarda hücre olacak şekilde pleyte RPMI 1640 medyum ortamında hücreler ilave edildi. 12 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerin tabana yapıştığı görülerek ortama çeşitli konsantrasyonlarda (WEP için: 0.5, 1, 2 mg/mL, EEP için: 0.05, 0.075, 0.1 mg/mL, H₂O₂ için: 0.25, 0.5, 1 mM) propolis ekstraktları ilave edilerek inkübasyona bırakıldı. Muamele süresi sonunda hücreler belirlenen konsantrasyonda DCFH-DA ile muamele edilip, spektrofotometri cihazında, 485 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalga boyunda okumalar gerçekleştirildi ve kaydedildi. Hücrelerdeki H₂O₂ aktivitesindeki değişiklikler RFU (Bağlı floresans birimi) ile değerlendirildi.

5.2.11. Propolisin Hücreiçi Serbest Ca²⁺ Düzeyine Etkisinin Belirlenmesi

Her bir kuyucukta uygun miktarda hücre olacak şekilde pleytlere RPMI 1640 ortamında hücreler ilave edildi. 12 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerin tabana yapıştığı görülerek ortama çeşitli konsantrasyonlarda (WEP için: 0.5, 1, 2, 3 mg/mL, EEP için: 0.05, 0.075, 0.1, 0.2 mg/mL) propolis ekstraktları ilave edilerek inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler pH'sı 7.2 olan fosfat tamponu içerisinde belirlenen konsantrasyonda Fura-2AM ile muamele edilip, spektrofotometri cihazında, floresans emisyonu 500 nm, eksitasyonu 360 ve 380 nm dalga boyunda, okumalar gerçekleştirildi ve kaydedildi. 360 ve 380 nm dalga boyundaki eksitasyon yoğunluklarının oranı (360/380) [Ca²⁺] indeksi olarak kullanıldı.

Yapılan tüm denemelerdeki spektrofotometrik okumalar en az 3 kez gerçekleştirildi.

5.3. İstatistiksel Analizler

Elde edilen değerler, aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm S.D$) olarak ifade edildi. Veriler SPSS 11.3 (Statistical Package for the Social Sciences) bilgisayar paket programına aktarılarak, istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi için One Way ANOVA ve post-hoc Tukey analizleri kullanıldı. Hidrojen peroksit ve Ca²⁺ düzeyleri verilerinin propolis ilave edilen hücreler ile propolis ilave edilmeyen grubun karşılaştırılması yapıldı ve $p < 0.05$ olanlar anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. HEp-2 Hücre Serisi İçin Uygun Hücre Sayısı, DCFH-DA ve H₂O₂ Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Hücre içi H₂O₂ düzeylerindeki değişimleri görmek için her kuyucukta 5000 hücre olan yeni bir pleyt düzenlendi. 48 saatlik propolis inkübasyonu ve 20 µM DCFH-DA muamelesinden sonra 4 saat boyunca belirli aralıklarla spektrofotometrik okuma gerçekleştirildi. Elde edilen bazı okumaların alt ve üst sınırları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. EEP ve WEP hücre içi H₂O₂ düzeylerinin spektrofotometrik okuma sonuçları (RFU=Bağıl floresans birimi)

Okuma Süresi (dakika)		Kontrol	Etanol	EEP 0.05 mg/mL	EEP 0.075 mg/mL	EEP 0.1 mg/mL
20.	Üst Sınır	725200448	479628288	588085824	491111904	227248048
	Alt Sınır	72315320	165827168	184117024	138098304	77873152
40.	Üst Sınır	1478250496	1466801664	1255459968	1170994944	677081344
	Alt Sınır	176163344	377733856	350443072	282046496	210054304
		Su	WEP 1 mg/mL	WEP 2 mg/mL	WEP 3 mg/mL	H ₂ O ₂ 2 mM
20.	Üst Sınır	643540800	539402496	381102560	444417536	499768224
	Alt Sınır	177872496	253265968	96227872	40631596	176704880
40.	Üst Sınır	1513089664	1468183424	1013014208	1025364928	1546677888
	Alt Sınır	269794080	435723424	160449584	66849172	255227920

Tablo 9’da yer alan spektrofotometrik değerlerin oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. Hücre içi serbest Ca²⁺ düzeylerinin 4 µM Fura-2AM’nin 45 dakika muamelesiyle gerçekleştirilen spektrofotometrik okumadan hesaplanan [Ca²⁺] indeksleri Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. EEP ve WEP için $[Ca^{2+}]$ indeksleri

Okuma Süresi (dakika)		Kontrol	Etanol	EEP 0.05 mg/mL	EEP 0.075 mg/mL	EEP 0.1 mg/mL
45.	Üst Sınır	0,85	1,02	1,226	1,18	1,48
	Alt Sınır	0,56	0,66	0,49	0,7	0,68
		Su	WEP 1 mg/mL	WEP 2 mg/mL	WEP 3 mg/mL	H ₂ O ₂ 2 mM
45.	Üst Sınır	1,26	0,8	1,31	1,32	1,31
	Alt Sınır	1,15	0,3	0,63	1,29	1,29

Bu okumalarda elde edilen $[Ca^{2+}]$ indekslerinin lineer ve tutarlı olmadığı anlaşıldı.

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda çeşitli konsantrasyonlarda H₂O₂'nin kullanıldığı, kuyucuk başına 5000, 2500, 1000 ve 500 hücre kullanılarak yeni bir denemenin yapılması uygun görüldü. İki farklı DCFH-DA konsantrasyonu (10-20 μ M) kullanılarak yapılan denemenin spektrofotometrik okumalarının sonuçları Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Kuyucuk başına 5000, 2500, 1000 ve 500 hücre ile yapılan hücre içi H_2O_2 düzeylerinin spektrofotometrik okuma sonuçları (RFU)

DCFH-DA konsantrasyonu	Hücre Sayısı	Kontrol (x ± SD)	1 mM H_2O_2 (x ± SD)	2.5 mM H_2O_2 (x ± SD)	5 mM H_2O_2 (x ± SD)	10 mM H_2O_2 (x ± SD)
10 μ M	5000	112326008 ±13721718	18052144 ±1141476	20691195 ±2891358	112395680 ±350498	151131408 ±11952955
	2500	13338217 ±3042990	12506890 ±718147	15284680 ±3210132	12809480 ±1619817	61525990 ±70764
20 μ M	5000	83804284 ±12624079	31645259 ±3934801	15647653 ±208643	35067119 ±5482245	43821230 ±5084773
	2500	9946967 ±811040	6064443 ±589468	17996604 ±7565242	6251878 ±1203574	50427286 ±1595756
10 μ M	1000	2421448 ±223595	8049722 ±1254896	12166243 ±674668	6383348 ±748088	2026578 ±137162
	500	11013982 ±6231692	7546450 ±1079212	11460911 ±1911446	5789471 ±257651	6165786 ±944375
20 μ M	1000	8794551 ±554897	14693208 ±1822016	8803761 ±2361819	6538944 ±270010	9546105 ±1324455
	500	9662443 ±3234659	13021253 ±227126	23437126 ±11756198	6929810 ±467374	5399883 ±863307

Uygun hücre sayısının 1000 hücre olduğu, hem bu okuma değerlerinin istenilen aralıkta olması hem de çeşitli konsantrasyonlarda H_2O_2 'nin değerlerinin kontrol gruplarının değerleriyle olan ilişkisine göre belirlendi. Bu değerler doğrultusunda son konsantrasyon 10 μ M olacak şekilde DCFH-DA kullanılması HEp-2 hücrelerindeki hücre içi H_2O_2 düzeylerindeki değişimleri gözlemlemek için uygun bulundu.

Tablo 11'de sonuçları yer alan deneyde çeşitli konsantrasyonda (1, 2.5, 5 ve 10 mM) H_2O_2 kullanıldı. Aynı tabloya göre kullanılan hücre sayısının 1000, DCFH-DA konsantrasyonunun ise 10 μ M olduğu durumda hücrelere farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 ilavesinin H_2O_2 düzeylerinde kontrol grubuna göre artışa sebep olduğu görülmüştür. Ancak ilave edilen H_2O_2 konsantrasyonları ile hücrelerde belirlenen H_2O_2 düzeyleri arasında korelasyon gözlenmemiştir. Bu sebeple bundan sonraki H_2O_2 düzeylerinin ölçülmesi sırasında ortama kontrol amaçlı daha düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 konulmasına karar verilmiştir.

6.2. HEp-2 Hücre Serisi İçin DCFH-DA Muamele Süresinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Tablo 11’de gördüğümüz denemelerin sonuçlarının kontrol grubuna göre mukayese edildiğinde beklenen farklılıklar görülmemiştir. Bu durum sonucunda hücrelere DCFH-DA ilave edilmesinden sonraki sürenin, HEp-2 hücrelerinin oldukça aktif çoğalmalarından dolayı aşırı floresans background gösterdiklerinden, kısa tutulması gerektiği belirlenmiştir. Bundan sonra gerçekleşen tüm okumalarda DCFH-DA ilavesini takiben ilk okuma 5. dakikada gerçekleştirilmiştir.

6.3. HEp-2 Hücre Serisinin Propolis Ekstraktları İle Muamele Süresinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Tablo 9 ve 10’da yer alan veriler propolisin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilmiş verilerdir. Bu veriler beklenen değerlerin oldukça üstündedir ve spektrofotometrik okumanın sınırlarını aşmıştır. Bu durum göz önüne alınarak propolisin hücreler ile muamele süresi kısaltılarak 4 saatlik inkübasyonlara karar verilmiştir.

6.4. HEp-2 Hücre Serisi İçin Fura-2AM Muamele Süresinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Fura-2AM ilavesinden sonra 45. dakikada spektrofotometrik okuma sonuçları Tablo 10’da yer almaktadır. Denemedeki $[Ca^{2+}]$ indeksleri oldukça yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar hem spektrofotometrik okuma sınırları içerisinde olmayıp hem de hücrede çok yüksek seviyelerde Ca^{2+} düzeylerini göstermektedir. Beklediğimiz değerler çerçevesinde veriler elde etmek için Fura-2AM’nin hücrelere ilave edilmesinden sonra 5. dakikada ilk okumanın gerçekleştirilmesi ve ardından belirli periyotlarda okumaların yapılması gerektiği düşünülmüştür ve buna göre işlemler yapılmıştır.

6.5. HEp-2 Hücre Serisi İçin Fura-2AM Uygun Konsantrasyonunun Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Uygun hücre sayısı, propolis muamele süresi ve okumaya başlama süresi belirlendikten sonra yeni pleyt düzeni oluşturuldu. Bu pleyt düzenine göre iki pleyt

dizayn edilerek son konsantrasyon 0.5 ve 1 μM Fura-2AM olacak şekilde ayarlandı ve okumalar yapıldı.

Tablo 12. EEP ve WEP için $[\text{Ca}^{2+}]$ indeksleri

FURA-2AM konsantrasyonu	Okuma Süresi (dakika)	Kontrol (x $\pm$ SD)	Etanol (x $\pm$ SD)	EEP 0.05 mg/mL (x $\pm$ SD)	EEP 0.075 mg/mL (x $\pm$ SD)	EEP 0.1 mg/mL (x $\pm$ SD)	EEP 0.2 mg/mL (x $\pm$ SD)
0.5 μM	5.	0.41 ± 0.06	0.58 ± 0.005	0.82 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.93 ± 0.05	0.85 ± 0.03
	10.	0.84 ± 0.03	0.94 ± 0.003	0.74 ± 0.06	0.77 ± 0.05	0.90 ± 0.04	0.87 ± 0.08
1 μM	5.	0.76 ± 0.01	0.77 ± 0.05	0.78 ± 0.05	0.92 ± 0.10	1.00 ± 0.06	1.20 ± 0.05
	10.	0.78 ± 0.07	0.90 ± 0.07	0.74 ± 0.03	0.77 ± 0.05	0.87 ± 0.05	0.75 ± 0.03
		Kontrol (x $\pm$ SD)	Su (x $\pm$ SD)	WEP 0.5 mg/mL (x $\pm$ SD)	WEP 1 mg/mL (x $\pm$ SD)	WEP 2 mg/mL (x $\pm$ SD)	WEP 3 mg/mL (x $\pm$ SD)
0.5 μM	5.	0.41 ± 0.06	0.59 ± 0.008	0.87 ± 0.007	0.84 ± 0.003	0.9 ± 0.02	0.86 ± 0.02
	10.	0.84 ± 0.03	0.85 ± 0.01	0.80 ± 0.03	0.67 ± 0.03	1.08 ± 0.13	0.79 ± 0.01
1 μM	5.	0.76 ± 0.01	0.72 ± 0.02	0.75 ± 0.07	0.59 ± 0.03	0.99 ± 0.05	0.96 ± 0.07
	10.	0.78 ± 0.07	0.65 ± 0.006	0.77 ± 0.07	0.74 ± 0.03	0.69 ± 0.03	0.89 ± 0.04

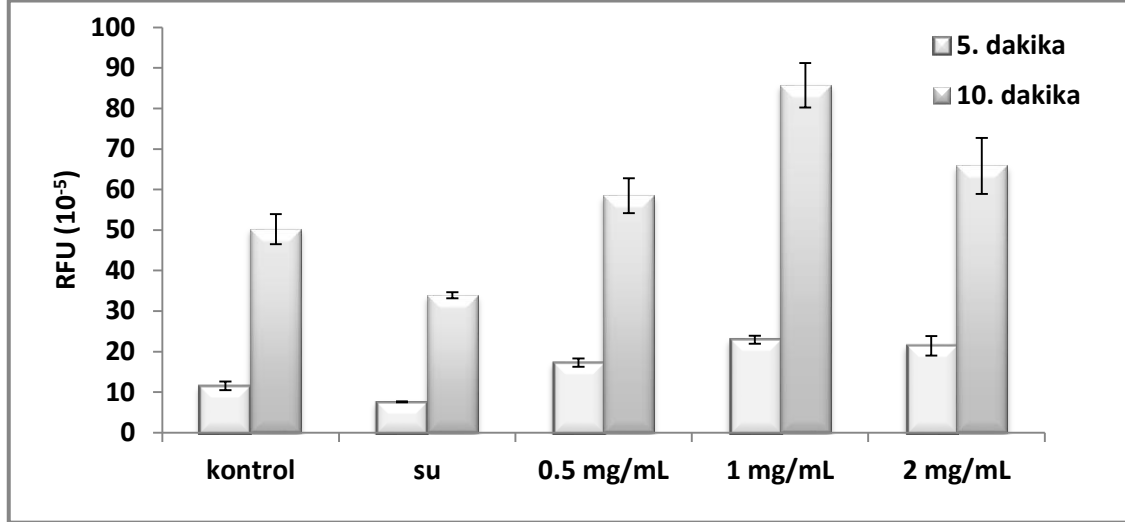
Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek uygun Fura-2AM konsantrasyonunun 0.5 μM olduğuna karar verildi (0.5 μM Fura-2AM için $p < 0.05$).

6.6. Etanol ve Suyun Hep-2 Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Yapılan tüm denemelerde pleytin bir kısmına propolis ekstraktı hazırlamak için kullanılan etanol ve sudan dolayı oluşabilecek hücre içi H_2O_2 ve serbest Ca^{2+} düzeylerindeki değişimleri belirlemek amacıyla %70'lik etanol ve saf su ilave edildi. Propolisin hücre içi serbest Ca^{2+} ve H_2O_2 düzeylerine etkisinin belirlenmesi deneylerindeki spektrofotometrik okumaların istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda etanolün ve suyun HEP-2 hücrelerinde kontrole göre anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p > 0.05$).

6.7. Propolisin Hücreiçi H₂O₂ Düzeyine Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Beşinci dakika sonuçlarına göre H₂O₂ düzeyleri açısından; 0.5, 1 ve 2 mg/mL konsantrasyonlarda WEP ile kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (sırasıyla p<0.05, p<0.001, p<0.05).



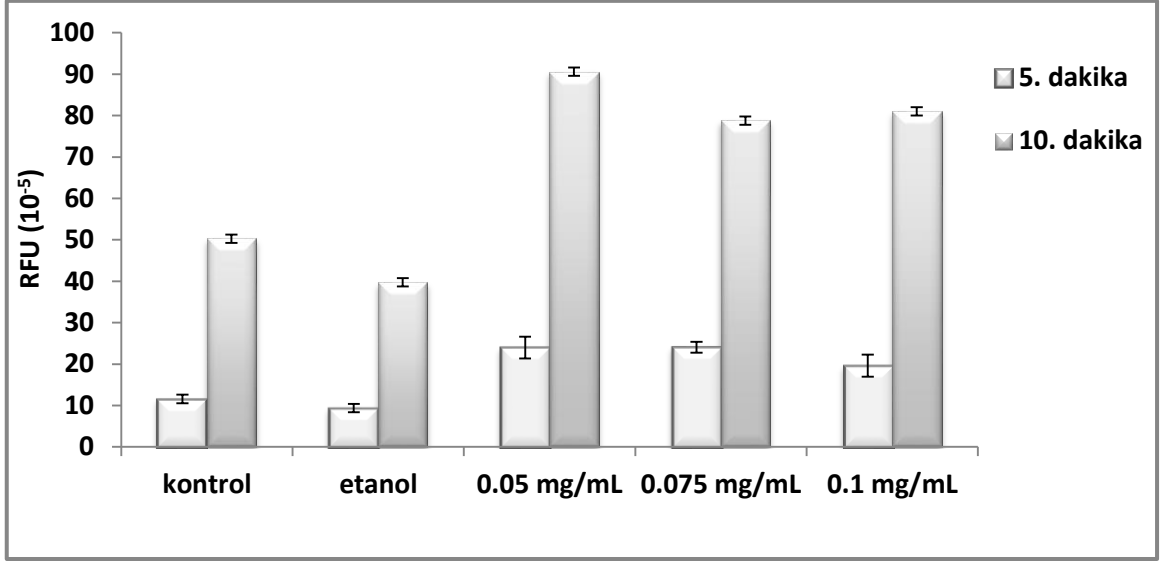
Şekil 5. WEP için hücreiçi H₂O₂ düzeyleri

Onuncu dakika sonuçlarına göre H₂O₂ düzeyleri açısından; 1 mg/mL konsantrasyonda WEP ile kontrol arasında anlamlı fark görüldü (p<0.05).

Tablo 13. EEP ve WEP hücreiçi H₂O₂ düzeylerinin spektrofotometrik okuma sonuçları (RFU)

Okuma Süresi (dakika)	Kontrol (x ± SD)	Etanol (x ± SD)	EEP 0.05 mg/mL (x ± SD)	EEP 0.075 mg/mL (x ± SD)	EEP 0.1 mg/mL (x ± SD)
5.	1157033 ±107234	936050 ±101491	2395291 ±262625	2406061 ±129319	1961339 ±264372
10.	5024538 ±372192	3972181 ±301622	9058084 ±1064920	7879394 ±505583	8103256 ±903536
	Kontrol (x ± SD)	Su (x ± SD)	WEP 0.5 mg/mL (x ± SD)	WEP 1 mg/mL (x ± SD)	WEP 2 mg/mL (x ± SD)
5.	1157033 ±107234	764425 ±11882	1728528 ±102804	2294291 ±101059	2145530 ±242440
10.	5024538 ±372192	3388839 ±75409	5848225 ±430150	8572782 ±551886	6585883 ±691745
	Kontrol (x ± SD)	0.25 mM H ₂ O ₂ (x ± SD)	0.5 mM H ₂ O ₂ (x ± SD)	1 mM H ₂ O ₂ (x ± SD)	
5.	1157033 ±107234	2879730 ±344080	3979973 ±425657	2935838 ±168555	
10.	5024538 ±372192	8369416 ±758232	10797149 ±3236351	7796057 ±244069	

Tablo 11'deki sonuçlara göre H₂O₂ konsantrasyonları 0.25, 0.5 ve 1 mM seçilerek deney tekrarlanmıştır. Yapılan istatistiksel işlemler sonucunda 5. ve 10. dakikalarda 0.5 mM H₂O₂'nin kontrol olarak kullanılmasına karar verildi (p<0.05).



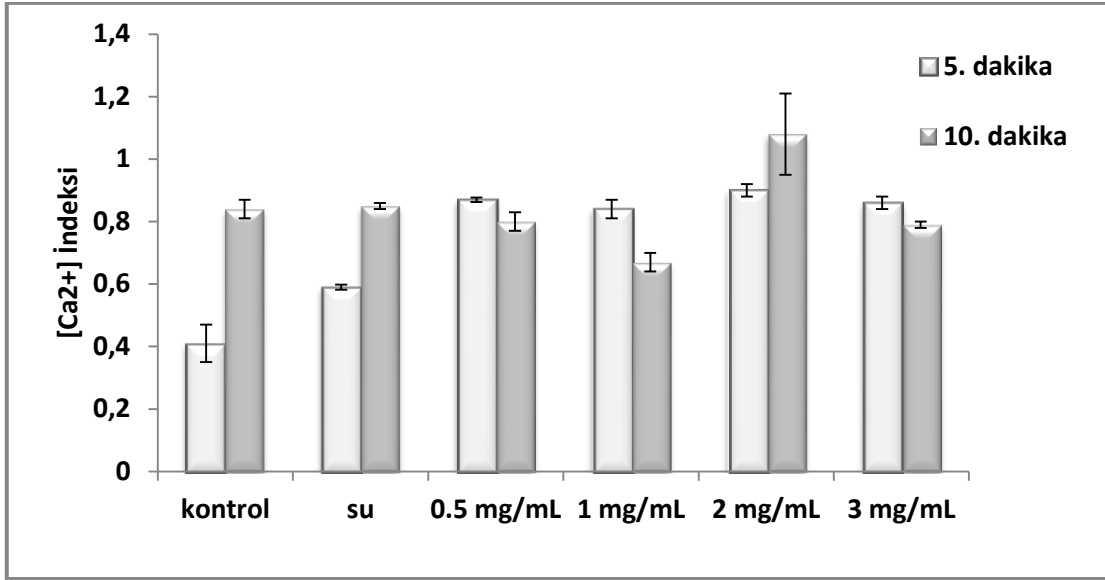
Şekil 6. EEP için hücre içi H₂O₂ düzeyleri

Beşinci dakika sonuçlarına göre H₂O₂ düzeyleri açısından; 0.05 ve 0.075 mg/mL konsantrasyonda EEP ile kontrol arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$).

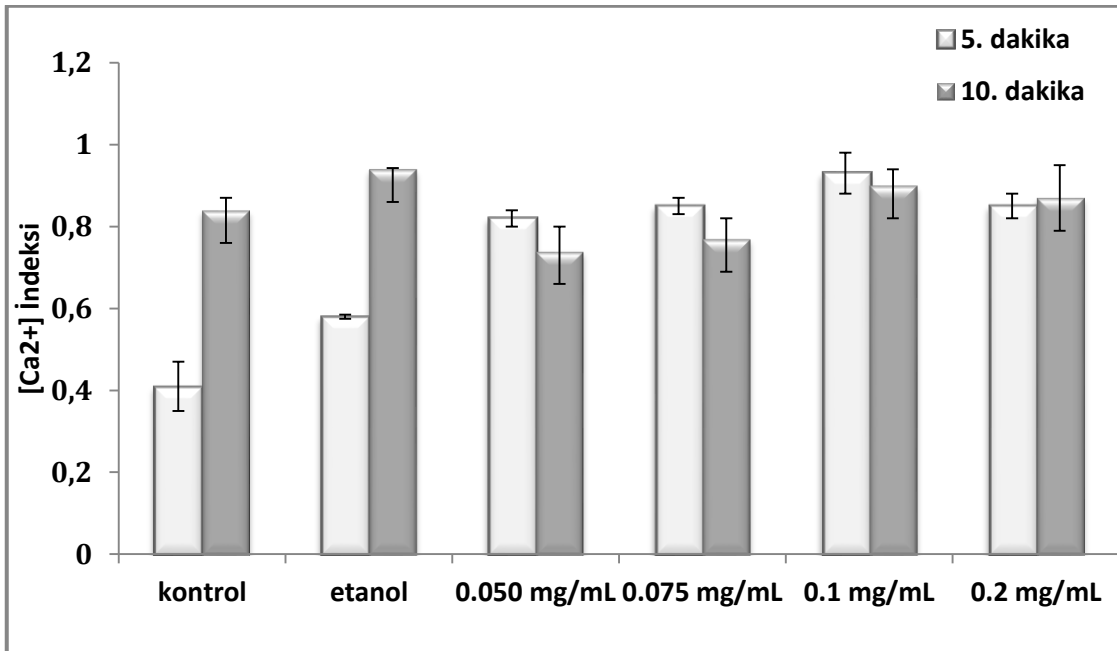
Onuncu dakika sonuçlarına göre H₂O₂ düzeyleri açısından; 0.05 ve 0.1 mg/mL konsantrasyonda EEP ile kontrol arasında anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$).

6.8. Propolisin Hücre içi Serbest Ca²⁺ Düzeyine Etkisinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Beşinci dakikada WEP'in tüm konsantrasyonlarında (0.5, 1, 2 ve 3 mg/mL) kontrol grubuna göre [Ca²⁺] indekslerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p < 0.05$, Şekil 7).



Şekil 7. WEP için hücreiçi Ca²⁺ indeksleri



Şekil 8. EEP için hücreiçi Ca²⁺ indeksler

Beşinci dakikada EEP'in tüm konsantrasyonlarında (0.05, 0.075, 0.1 ve 0.2 mg/mL) kontrol grubuna göre [Ca²⁺] indekslerinde istatistik olarak anlamlı fark gözlemlendi (p<0.05, Şekil 8).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanserin önlenmesinde veya tedavi edilmesinde kullanabilir doğal ve sentetik bileşiklerin keşfedilmesi son zamanlarda yapılan araştırmaların hedefi olmaya başlamıştır (3, 89) Kanser kemoterapisinde birçok uygulamada bulunan zengin bileşenler doğal ürünler tarafından sağlanmaktadır (35).

Birçok bitkinin antitümör ve bağışıklığı uyarıcı etkisi gibi birçok biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Arı ürünleri hem besleyici gıda hem de apiterapide tıbbi ürünler olarak hizmet etmektedir (3).

Bir arı ürünü olan propolis ve propolisin aktif bileşenleri hem *in vivo* hem de *in vitro* tümör modellerinde antikarsinojen ve antitümör etkisi çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (90, 3). Propolis bileşenlerinden olan kafeik asit fenil ester, artepilin C, naringenin, galangin, genistein ve pluketoin A antitümör ajanlarından en umut vericileridir (3). Propolis ve bileşenlerinin antitümör etkisiyle ilgili son yıllarda çok sayıda yayın olması yeni antitümör ajanların geliştirilmesinde oldukça yararlı olmaktadır. Türk propolisinin antikarsinojenik etkisi gösterilmiştir (35, 91).

Propolisin terapötik aktivitesinin başlıca flavonoidlere bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Propolisin içeriğinde bulunan flavonoidlerin kanser hücrelerinin apoptozisini, farklılaşmasını, çoğalmasını etkilediği ve kanser kemoprevansiyonunda önemli rol oynayabileceği bilinmektedir (3).

Propolisin tümör hücrelerindeki hücre büyümesinin engellenmesi ve apoptozis ile ilgili mekanizmaları son yıllarda çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (15). Apoptozis tarafından programlanmış hücre ölümü kanser gelişimi için doğal bir bariyer görevi görmektedir. Çünkü bu süreç mutasyona uğramış potansiyel zararlı hücreleri ortadan kaldırmaktadır. Bu durumu destekleyici çalışmalara sık rastlanmaktadır (92).

Son zamanlarda geliştirilen doğal propolisin suda çözünür formlarının hem oral olarak hem de parenteral olarak uygulanabilir ve geliştirilmiş tıbbi etkinliğe sahip olduğu düşünülmektedir (93).

Deneysel aşamalarda hücrelere ilave edilen çeşitli konsantrasyonlardaki H_2O_2 hücrelerde H_2O_2 oluşumunun aktif olduğunu gözlemleyebilmek için kullanılmıştır.

Hücrelerin 12 saatlik proliferasyonundan sonra 15. dakikada (1, 2.5, 5, 10 mM) konsantrasyonlarda H_2O_2 ile muamele edilmesi sonucunda kontrol grubuna göre H_2O_2 düzeylerinde bir artış görülmektedir. Ancak kullanılan artan konsantrasyondaki H_2O_2 sonuçları arasında bir korelasyon olmadığı da belirlenmiştir. Bu yüzden zamanı azaltarak fluoresansın daha iyi izlenebileceği sonucuna varılmış ve bu amaçla 5 ile 10 dakika seçilmiştir.

Her kuyucukta 1000 hücre olacak şekilde tasarlanan deneyde kullanılan % 70'lik etanolün ve saf suyun H_2O_2 düzeylerinde artışa sebep olmadığı görülmüştür (Tablo 13). Bu da hücrelerdeki H_2O_2 düzeylerindeki değişimlerin su veya kullanılan etanolden kaynaklı olmayıp propolis kaynaklı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda propolisin reaktif oksijen türlerinden biri olan H_2O_2 'nin HEP-2 hücrelerinde gözle görülebilen bir artışa sebep olduğu gözlenmektedir. Bilindiği gibi de reaktif oksijen türlerinin birçok yolla apoptozisi indüklediği birçok çalışmada bildirilmektedir (94). Buradan yola çıkılarak HEP-2 hücrelerinde gözlenen H_2O_2 düzeylerindeki artış hücreleri apoptozise doğru götürebileceği sonucuna varılabilmektedir.

DCFH-DA hücre membranlarından kolayca geçip hücre içinde esterase tarafından hidroliz edilerek floresan olmayan DCFH'a dönüşmekte ve oluşan DCFH reaktif oksijen türleri varlığında oldukça yüksek floresan özellikte olan DCF'ye dönüşebilmektedir. Deneylerimizde düzeylerine baktığımız H_2O_2 hem ROS öncülü olarak yer almaktadır hem de ROS oluşumuna sebep olabilmektedir. Tüm bu sebepler yüzünden hücre içi H_2O_2 düzeylerine spektrofotometrik olarak bakılmasında DCFH-DA kullanılması uygun görülmüştür. Yapılan literatür araştırmasında da birçok çalışmada ROS tayini için DCFH-DA floresan probunun kullanıldığı görülmektedir (95, 96).

Yapılan çalışmalarda propolisin malign hücrelerin sayısını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (97). Brezilya yeşil propolisinin *in vitro* olarak farklı tümör hücrelerine karşı belirgin aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Brezilya yeşil propolisinin (2.5 ve 5 mg/kg) ayrıca mikroorganizmaları öldürmek için H_2O_2 üretimi düzeyinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (15).

Akatov ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada Vitamin B_{12b} ve C kombinasyonunun HEP-2 hücrelerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında 2×10^5 hücre/mL ve 20 μ M konsantrasyonda DCFH-DA kullanarak 4 saat boyunca kinetik ölçüm yaparak H₂O₂ aktivitesindeki değişiklikleri deney ve kontrol sinyallerinin birbirlerine oranlarıyla değerlendirmişlerdir. Hücrelere 2 μ M H₂O₂'nin ilavesinin ilk dakikasında hücrelerdeki H₂O₂ aktivitesinde hızlı bir artış olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmada oksidatif stresin gelişmesiyle hücredeki H₂O₂ artışına bağlı olarak belirli bir süre sonra hücrelerin ölümünün gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda kuyucuk başına 5000 hücre ve ölçümler için 20 μ M DCFH-DA kullanılması rağmen oldukça yüksek fluorimetrik sonuçlar gözlenmiştir. Bu durum göz önünde bulundurularak yapılan denemeler sonucunda hem kullanılacak hücre sayısının kuyucuk başına 1000 olması hem de 10 μ M DCFH-DA kullanılmasının bundan sonraki spektrofotometrik HEP-2 çalışmaları için uygun olduğu görüşüne varılmıştır. Sonuçların yüksek olmasının HEP-2 hücrelerinin proliferasyonunun oldukça hızlı bir şekilde olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (98).

Propolisin EEP ve WEP'nin tüm konsantrasyonlarında propolis inkübasyonu sonucunda H₂O₂ düzeylerinde spektrofotometrik okuma sonuçlarına göre artış görülmüştür.

Yaptığımız çalışmada çeşitli konsantrasyonlarda propolisin 4 saat süresince hücrelerle muamelesi sonucu 0.5 μ M Fura-2AM kullanıldığında 5. dakikada tüm konsantrasyonlardaki WEP ve EEP'nin [Ca²⁺] indekslerinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir.

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

Bufalo ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada ise propolisin etanolik ekstraktlarının 5 ve 10 μ g/ 100 μ L'sinin hücre canlılığına etkisi olmazken 25, 50 ve 100 μ g/100 μ L konsantrasyonlarının HEP-2 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığını ortaya

koymuşlardır. Bu konsantrasyonların aynı zamanda hücre morfolojisinde değişimlere sebep olduklarını belirtmişlerdir (12).

Kamiya ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre Brezilya kırmızı propolisinin MCF-7 (insan göğüs kanseri) kanser hücrelerinde apoptozisi ilerletme etkisi gösterdiği belirtilmiştir (99).

Frozza ve arkadaşlarının kırmızı propolisin HEP-2 ve Hela hücreleri üzerinde sitotoksik etkisine bakmışlardır. Propolisin 10-150 µg/mL konsantrasyon aralığında hidroalkolik ekstraktları kullanılmış ve yüksek konsantrasyonlarda normal hücrelere oranla tümör hücrelerinde inhibitör etkisinin daha anlamlı olduğunu göstermişlerdir (13). Projenin diğer kısmında yaptığımız ön çalışmada ise EEP ekstraktlarının IC₅₀ değeri yaklaşık 70 µg/mL bulunmuştur.

Frozza ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kırmızı propolisin etanolik ekstraktlarının doza bağımlı olarak HEP-2 hücrelerinde apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir (100).

Yapılan bu çalışmada 1000 hücre kullanılmasına rağmen HEP-2 hücrelerinde ilk 5 dakikada ve ilerleyen sürelerde hem H₂O₂ hem de Ca²⁺ seviyelerinde görülen artış hücrenin zamanla apoptozis sürecine doğru ilerleyebileceğini göstermektedir.

8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

8.1. Sonuçlar

1. HEp-2 hücre kültürü ile ilgili çalışmalarda her bir kuyucuk başına (toplam hacim 200 μ L) 1000 hücre kullanılması floresans background açısından daha uygun bulunmuştur.
2. Bu tür çalışmalarda modelin çalışıp çalışmadığını gösteren H_2O_2 konsantrasyonunun 0.5 mM civarında olması uygundur.
3. H_2O_2 tayini için kullanılan DCFH-DA konsantrasyonunun optimum 10 μ M, kalsiyum tayini için kullanılan Fura-2AM konsantrasyonunun optimum 0.5 μ M olduğu anlaşıldı.
4. HEp-2 hücreleri çoğaltıldıktan sonra propolis ekstraktlarıyla muamele süresinin uygun spektrofotometrik floresansı takip etmek için 4 saat olabileceği sonucuna varıldı.
5. Ekstraktlarla muamele sonrası ilave edilen DCFH-DA ve Fura-2AM floresanslarını spektrofotometrik takip etmede en uygun zaman aralığının 5-10 dakika olduğu anlaşılmıştır.
6. Propolisin sulu ekstraktları, kontrole göre 5. dakikada 0.5, 1, 2 mg/mL konsantrasyonlarında 10. dakikada ise 1 mg/mL konsantrasyonunda hücre içi H_2O_2 düzeylerini fluorimetrik okumalarda anlamlı olarak arttırdı.
7. Propolisin etanolik ekstraktları, kontrole göre 0.05-0.075 mg/mL konsantrasyonlarında 5. dakikada, 0.05-0.1 mg/mL konsantrasyonlarında 10. dakikada hücre içi H_2O_2 düzeylerini fluorimetrik okumalarda anlamlı olarak arttırdı.
8. Propolisin sulu ekstraktları, kontrole göre hücre içi Ca^{2+} indekslerini 0.5, 1, 2, 3 mg/mL konsantrasyonlarında 5. dakikadaki fluorimetrik okumalarda anlamlı olarak arttırdı..
9. Propolisin etanolik ekstraktları, kontrole göre hücre içi Ca^{2+} indekslerini 0.05, 0.075, 0.1, 0.2 mg/mL konsantrasyonlarında 5. dakikadaki fluorimetrik okumalarda anlamlı olarak arttırdı..
10. Hem WEP hem de EEP'nin farklı konsantrasyonlarda hücre içi H_2O_2 ve Ca^{2+} düzeylerini arttırmak suretiyle apoptozise yol açabileceği sonucuna varıldı.

8.2. Öneriler

1. HEp-2 hücre kültürü çalışmalarında bu hücrelerin oldukça hızlı çoğaldıkları, floresans backgroundlarının yüksek olduğu dikkate alınmalıdır.
2. Hidrojen peroksit yanında WEP ve EEP'nin etkilerini ROS düzeyinde görmek için H_2O_2 yanında diğer serbest radikaller ($OH^\cdot$ gibi) çalışılabilir.
3. Hücre içi Ca^{2+} düzeyleri spektrofotometrik okuma yanında floresan mikroskop tabanlı yöntemle de irdelenebilir.
4. Hücre içi Ca^{2+} düzeyleri bağlı kalsiyum ve serbest kalsiyum fraksiyonları şeklinde çalışılabilir.
5. Apoptozisi teyid etmek için çalışmalar yapılabilir (Flow sitometrik DNA analizi).
6. Hidrojen peroksit ve kalsiyum yanında hücresel enzimler (SOD ve katalaz gibi) çalışılabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Cheng H, Qin ZH, Guo XF, Hu XS, Wu JH (2013). Geographical origin identification of propolis using GC–MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Res Int* 51: 813–822.
2. Sforcin JM (2007). Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 113: 1-14.
3. Orsolic N (2010). A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *JAAS* 1: 1 – 20.
4. Kalyanaraman B (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 1: 244-257.
5. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1758: 994-1003.
6. Lopez-Lazaro M (2007). Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett* 252: 1-8.
7. Özgür E (2008). Memeli kültür hücrelerinde hücre içi kalsiyum sinyalinde görev alan elemanların entegre bir sistem olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
8. Schwarz EC, Qu B, Hoth M (2013). Calcium, cancer and killing: the role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1603-1611.
9. Parkash J, Asotra K (2010). Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sci* 87: 587-595.
10. Rizo WF, Ferreira LE, Colnaghi V, Martins JS, Franchi LP, Takahashi CS, Beleboni RO, Marins M, Pereira PS, Fachin L (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of coronaridine from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC in a human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2). *Genet Mol Biol* [Epub ahead of print]

11. Bufalo MC, Candeias JM, Sforcin JM (2009). In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 6: 483-487.
12. Bufalo MC, Candeias JM, Sousa JP, Bastos JK, Sforcin JM (2010). In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEp-2 cells. *Nat Prod Res* 24: 1710-1718.
13. Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JA, Roesch-Ely M (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol* 52: 137-142.
14. Gulcin I, Bursal E, Sehitoglu MH, Bilsel M, Goren AC (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol* 48: 2227-2238.
15. Sforcin JM, Bankova V (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 133: 253-260.
16. Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P (2010). Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine* 17: 132-138.
17. Burdock GA (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 36: 347-363.
18. Sulaiman GM, Al Sammarrae KW, Ad'hiah AH, Zucchetti M, Frapolli R, Bello E, Erba E, D'Incalci M, Bagnati R (2011). Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food Chem Toxicol* 49: 2415-2421.
19. Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, Antunes MD (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem Toxicol* 48: 3418-3423.

20. Barbaric M, Miskovic K, Bojic M, Loncar MB, Smolic-Bubalo A, Debeljak Z, Medic-Saric M (2011). Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J Ethnopharmacol* 135: 772-778.
21. Popova M, Trusheva B, Antonova D, Cutajar S, Mifsud D, Farrugia C, Tsvetkova I, Najdenski H, Bankova V (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem* 126: 1431–1435.
22. Pierini GD, Granero AM, Nezio MS, Centurion ME, Zon MA, Fernandez H (2013). Development of an electroanalytical method for the determination of lead in Argentina raw propolis based on bismuth electrodes. *Microchem J* 106: 102-106.
23. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 80: 67-73.
24. Thirugnanasampandan R, Raveendran SB, Jayakumar R (2012). Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. *Asian Pac J Trop Biomed* 2: 651-654.
25. Woo KS, Park JS (1997). Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects. In *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Mizrahi, A. and Lensky, Y. (Eds) New York Plenum Press. pp 125-128.
26. Khalil ML (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 7: 22-31.
27. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Propolis>. (Erişim Tarihi 05/01/2014)
28. Çolak M (2009). Arı poleni ve propolisin metastatik insan prostat kanseri hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
29. Turkez H, Yousef MI, Geyikoglu F (2010). Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food Chem Toxicol* 48: 2741-2746.

30. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
31. Yousef MI, Kamel KI, Hassan MS, El-Morsy AM (2010). Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits. *Food Chem Toxicol* 48: 1846–1852.
32. Doganyigit Z, Kup FO, Silici S, Deniz K, Yakan B, Atayoglu T (2013). Protective effects of propolis on female rats' histopathological, biochemical and genotoxic changes during LPS induced endotoxemia. *Phytomedicine* 20: 632-639.
33. Yang SZ, Peng LT, Su XJ, Chen F, Gheng YJ, Fan G, Pan SY (2011). Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Chem* 127: 210-215.
34. Valente MJ, Baltazar AF, Henrique R, Estevinho L, Carvalho M (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food Chem Toxicol* 49: 86-92.
35. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol* 63: 1378-1386.
36. Carvalho AA, Finger D, Machado CS, Schmidt EM, da Costa PM, Alves AP, Morais TM, de Queiroz MG, Quinaia SP, da Rosa MR, dos Santos JM, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Sawaya AC, Eberlin MN, Torres YR (2011). In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chem* 126: 1239-1245.
37. Koru O, Toksoy F, Acikel CH, Tunca YM, Baysallar M, Uskudar Guclu A, Akca E, Ozkok Tuylu A, Sorkun K, Tanyuksel M, Salih B (2007). In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* 13: 140-145.

38. Silva JC, Rodrigues S, Feas X, Estevinho LM (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem Toxicol* 50: 1790-1795.
39. Li F, Awale S, Tezuka Y, Kadota S (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorgan Med Chem* 16: 5434–5440.
40. Slavov A, Trifonov A, Peychev L, Dimitrova S, Peycheva S, Gotcheva V, Angelov A (2013). Biologically active compounds with antitumor activity in propolis extracts from different geographic regions. *Biotechnol Biotech Eq* 27(4): 4010-4013.
41. Ahn M, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Fang Z, Nakayama T (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem* 101: 1383–1392.
42. Cui K, Lu W, Zhu L, Shen X, Huang J (2013). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis, inhibits *Helicobacter pylori* peptide deformylase activity. *Biochem Bioph Res Co* 435: 289–294.
43. Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Galvez-Ruiz JC, Salas-Reyes M, Jiménez-Estrada M, Velazquez-Contreras E, Hernandez J, Velazquez C (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem* 131: 645–651.
44. Coşkun T (2005). Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 48: 69-84.
45. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoor DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425.
46. Merken HM, Beecher GR (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Chromatogr A* 897: 177-184.

47. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *IPS* 1: 25-4.
48. Çelik SE (2011). Farklı tür, karışım ve çözücü ortamlarına uygulanabilen modifiye cuprac antioksidan kapasite ölçümleri. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
49. Ross JA, Kasum CM (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22: 19-34.
50. Merken HM, Beecher GR (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem* 48: 577-599.
51. Barlak Y (2009). Türk propolisi ekstraktlarının prostat kanser hücre serilerinin proteomisine etkisi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
52. Kolankaya D, Selmanoğlu G, Sorkun K, Salih B (2002). Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food chem* 78: 213-217.
53. Volpi N, Bergonzini G (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42: 354-361.
54. Laskar RA, Sk I, Roy N, Begum NA (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem* 122: 233-237.
55. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* 84: 329-339.
56. Choi YM, Noh DO, Cho SY, Suh HJ, Kim KM, Kim JM (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT- Food Sci Tech* 39: 756-761.
57. Gong S, Luo L, Gong W, Gao Y, Xie M (2012). Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. *Food Chem* 134: 583-588.

58. Montoro A, Soriano JM, Barquinero JF, Almonacid M, Montoro A, Verdu G, Sahuquillo V, Villaescusa JJ, Sebastia N (2012). Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. *Food Chem Toxicol* 50: 216-221.
59. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
60. Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49: 3-8.
61. Altan N, Dinçel AS, Koca C (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stress. *Türk J Biochem* 31 (2): 51-56.
62. Koca N, Karadeniz F (2003). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16: 32-37.
63. Eroğlu Doğan E (2008). Bazı flavonoidlerin drosophila melanogaster’de antigenotoksik aktivitesi ve antioksidan etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
64. Sosa V, Moline T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 12: 376-390.
65. Korkmaz A (2009). Sıçan böbreğinde deneysel iskemi reperfüzyon hasarına karşı flavonoid uygulamasının etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
66. Han YW, Kim SZ, Kim SH, Park WH (2007). The changes of intracellular H₂O₂ are an important factor maintaining mitochondria membrane potential of antimycin A-treated As4.1 juxtaglomerular cells. *Biochem Pharmacol* 73: 863-872.
67. Kavas C (2008). Kurşun aracılı doku hasarında flavonoidlerin rolü. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
68. Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46: 200-206.

69. Fantel AG (1996). Reactive oxygen species in developmental toxicity: review and hypothesis. *Teratology* 53: 196-217.
70. Kariya S, Sawada K, Kobayashi T, Karashima T, Shuin T, Nishioka A, Ogawa Y (2009). Combination treatment of hydrogen peroxide and X-rays induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75: 449-454.
71. Grisham MB (2013). Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls. *Com Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 165: 429-438.
72. Sen S, Kawahara B, Chaudhuri G (2012). Maintenance of higher H₂O₂ levels, and its mechanism of action to induce growth in breast cancer cells: Important roles of bioactive catalase and PP2A. *Free Radical Bio Med* 53: 1541–1551.
73. Neill S, Desikan R, Hancock J (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 388-395.
74. Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-1028.
75. Meral R, Doğan IS, Kanberoğlu G (2012). Fonksiyonel Gıda Bileşeni Olarak Antioksidanlar. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2: 45-50.
76. Choudhari SK, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A, Tekade S (2013). Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncol* [Epub ahead of print]
77. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21.
78. Lipskaia L, Lompre AM (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* 96: 55-68.
79. Emre M, Özcal I, Şan M (2004). Endoteldeki iyon kanalları ve işlevleri. *Erciyes Tıp Dergisi* 26 (4): 186-193.
80. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev* 79: 1089-1125.

81. Florea AM, Busselberg D (2009). Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *Neurotoxicology* 30: 803-810.
82. Belkacemi L, Bedard I, Simoneau L, Lafond J (2005). Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review. *Cell Calcium* 37: 1-8.
83. Zylinska L, Soszynski M (2000). Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in excitable and nonexcitable cells. *Acta Biochim Pol* 47: 529-539.
84. Taylor JM, Simpson RU (1992). Inhibition of cancer cell growth by calcium channel antagonists in the athymic mouse. *Cancer Res* 52: 2413-2418.
85. Liu R, Tang W, Kang Y, Si M (2009). Studies on best dose of X-ray for Hep-2 cells by using FTIR, UV-vis absorption spectroscopy and flow cytometry. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 73: 601-607.
86. Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Jacobson AS, Werner JA, Suarez C, Leemans CR, Bradley PJ, Rinaldo A (2007). Evolution of the management of laryngeal cancer. *Oral Oncol* 43: 431-439.
87. Ünal R, Mehel DM, Ünal M (2000). Larenks kanserlerinde etyoloji ve patogenezi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi* 17 (2): 61-68.
88. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, Lefebvre JL (2003). Cancer of the larynx. *Crit Rev Oncol Hematol* 47: 65-80.
89. Orsolich N, Basic I (2005). Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *J Ethnopharmacol* 102: 37-45.
90. Sulaiman GM, Ad'hiah AH, Al-Sammarrae KW, Bagnati R, Frapolli R, Bello E, Ubaldi S, Romano M, Panini N, Scanziani E, Pezzolato M, Erba E and D'Incalci M (2012). Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 50: 1632-1641.
91. Erdogan S, Ates B, Durmaz G, Yilmaz I, Seckin T (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food Chem Toxicol* 49: 1592-1597.

92. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of Cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
93. Orsolic N, Basic I (2003). Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol* 84: 265-273.
94. Poornima P, Quency RS, Padma VV (2013). Neferine induces reactive oxygen species mediated intrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells. *Food Chem* 136: 659-667.
95. Wang H, Joseph JA (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Bio Med* 27: 612-616.
96. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F (2003). Evaluation of the probes 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65: 1575-1582.
97. Gunduz C, Biray C, Kosova B, Yilmaz B, Eroglu Z, Sahin F, Omay SB, Cogulu O (2005). Evaluation of Manisa propolis effect on leukemia cell line by telomerase activity. *Leukemia Res* 29: 1343–1346.
98. Akatov VS, Solov'eva ME, Leshchenko VV (2003). Oxidative stress in HEP-2 Human Laryngeal Carcinoma Induced by combination of vitamin B12b and C. *B Exp Biol Med* 136: 318-321.
99. Kamiya T, Nishihara H, Hara H, Adachi T (2012). Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Endoplasmic Reticulum Stress. *J Agric Food Chem* 60: 11065–11070.
100. Frozza CO, Ribeiro T, Gambato G, Menti C, Moura S, Pinto PM, Staats CC, Padilha FF, Begnini KR, de Leon PM, Borsuk S, Savegnago L, Dellagostin O, Collares T, Seixas FK, Henriques JA, Roesch-Ely M (2013). Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. *Food Chem Toxicol* 63: 194-205.

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı: AKBULUT Kübra

Uyruğu: TC

Doğum tarihi ve yeri: 09/09/1986 Trabzon

Medeni hali: Bekar

Telefon: 0462 3777889

E-Posta: kubra-akbulut@windowsslive.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet
Yılı		
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	K.T.Ü. Fatih Eğitim Fakültesi	
	OFMA Kimya Öğretmenliği	2010
Lise	Trabzon Lisesi	2005

YABANCI DİL

İngilizce