



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN AKCİĞER KANSERİ
(A549) HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Selim DEMİR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON - 2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN AKCİĞER KANSERİ
(A549) HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Selim DEMİR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

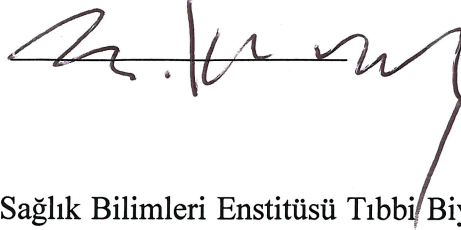
TRABZON – 2015

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



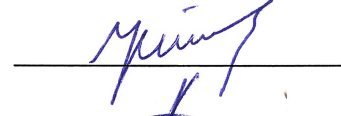
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Selim DEMİR'in hazırladığı "Türk Propolisinin Akciğer Kanseri (A549) Hücre Serisi Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU



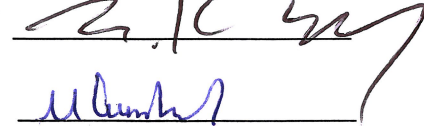
Prof. Dr. Orhan DEĞER



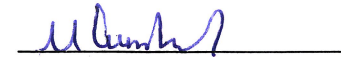
Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM



Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN



Doç. Dr. Medine CUMHUR CÜRE



Tarih: 28/04/2015

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

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi 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.

28/04/2015

Selim DEMİR

İTHAF

*Kanser ile m¼cadele eden kahramanlara, bilim emekçilerine
ve kanserden hayatını kaybedenlere...*

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca hep yanımda olan, bana destek veren, güvendiğim, danıştığım, hayatım boyunca emeklerini asla unutamayacağım insanlar oldu. Bu bağlamda;

Bilimsel bakış açısı, akademik duruşu ve karakteri yönünden daima örnek olarak aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışman hocam sayın Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na,

Lisansüstü öğrenimim boyunca bilimsel ve manevi yönden yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarım; Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Eşref Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Prof. Dr. Ahmet ALVER ve Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN ve zamansızca aramızdan ayrılan, saygıyla andığımız değerli hocamız Prof. Dr. Ekin ÖNDER'e,

Tezimin planlanması, deneysel aşamalar ve teorik kısımlar dahil hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, çok değerli dostum Gümüşhane Üniversitesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. İbrahim TURAN'a,

Bilimsel ve akademik geçmişimin oluşmasında, imkan, bilgi ve deneyimlerini özveriyle benimle paylaşan Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

KTÜ Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ ve Gümüşhane Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kağan KILINÇ'a,

Çalışmanın çeşitli kademelerinde emekleri bulunan Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN, Arş. Gör. Sema MISIR, Arş. Gör. Kübra AKBULUT, Arş. Gör. Diler US ALTAY ve Uzm. Dr. Selçuk YAMAN başta olmak üzere bana her aşamada destek ve yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm değerli arkadaşlarıma ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, yaptığım tüm tercihlerde yanımda duran sonsuz özveri ve emekleri için aileme, desteği ve sabrı için müstakbel eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Selim DEMİR

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin 2008.114.001.5 ve 2007.114.001.3 nolu projeleri tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Propolis	5
4.1.1. Propolisin Tarihçesi	6
4.1.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri	8
4.1.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	8
4.1.3.1. Flavonoidler	10
4.1.3.2. Arı Mumı, Yağ Asitleri ve Esansiyel Yağlar	12
4.1.3.3. Mineral Elementler ve Diğer Maddeler	12
4.1.4. Propolisin Biyolojik Özellikleri	13
4.1.5. Propolisin Antikanser Özellikleri	13
4.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres	14
4.2.1. Serbest Radikaller	14
4.2.2. Serbest Radikal Türleri	16
4.2.2.1. Süperoksit Radikali	16
4.2.2.2. Hidroksil Radikali	16
4.2.2.3. Hidrojen Peroksit	17
4.2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	17
4.2.4. Antioksidan Savunma Sistemi	18

4.2.5.	Oksidatif Stres ve Hastalıklardaki Rolü	19
4.3.	Kanser	20
4.3.1.	Akciğer Kanseri	22
4.3.2.	Kanser ve Reaktif Oksijen Türleri	23
4.3.3.	Kanser, Reaktif Oksijen Türleri ve Polifenoller	25
4.4.	Hücre Döngüsü	26
4.4.1.	Hücre Döngüsünün Kontrolü ve Kanser	29
4.4.2.	Hücre Döngüsü ve Reaktif Oksijen Türleri	30
4.5.	Hücre Ölümü	30
4.5.1.	Hücre Ölümü Araştırmalarının Tarihçesi	30
4.5.2.	Hücre Ölümü Türleri	31
4.5.3.	Apoptoz	32
4.5.3.1.	Apoptoz Yolakları	36
4.6.	Endoplazmik Retikulum Stresi	38
4.6.1.	Endoplazmik Retikulum Stresi, CHOP Proteini ve Apoptoz	39
4.6.2.	Endoplazmik Retikulum Stresi ve Kanser	40
4.7.	Sitotoksikite Testleri	41
4.8.	Flow Sitometri	42
4.8.1.	Flow Sitometri ile DNA Analizi	43
4.9.	Apoptoz Tayininde Kullanılan Yöntemler	44
4.10.	Real-Time PCR	45
5.	GEREÇ ve YÖNTEM	47
5.1.	Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	47
5.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
5.3.	Etanollü Propolis Ekstraktının Hazırlanması	50
5.4.	Etanollü Propolis Ekstraktının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi	50
5.4.1.	Toplam Polifenolik İçeriğin Belirlenmesi	50
5.4.2.	Toplam Flavonoid İçeriğin Belirlenmesi	52
5.4.3.	Demir İndirgeyici Gücünün Belirlenmesi	53
5.5.	Hücre Kültürü	56
5.5.1.	Akciğer Kanseri ve Fibroblast Hücre Serilerinin Eldesi ve Kültürü	56

5.5.2.	Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması	57
5.6.	Sitotoksosite Deneyleri	58
5.7.	Etanollü Propolis Ekstraktının Hücre Döngüsü ve Apoptoz Üzerine Etkisinin Flow Sitometrik Olarak Belirlenmesi	60
5.7.1.	Hücre Döngüsü Analizi	61
5.7.2.	Anneksin V Analizi	62
5.7.3.	Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi	65
5.8.	Kaspaz Aktivitesinin Ölçülmesi	67
5.9.	Hücre İçi ROS Miktarının Ölçülmesi	68
5.10.	Gen Ekspresyon Çalışmaları	70
5.10.1.	RNA İzolasyonu	70
5.10.2.	RNA Örneklerinden cDNA Elde Edilmesi	71
5.10.3.	Real Time PCR Protokolü	72
5.11.	İstatistiksel Yöntemler	74
6.	BULGULAR	75
6.1.	Etanollü Propolis Ekstraktının Antioksidan Özellikleri	75
6.2.	Sitotoksosite Analizi Sonuçları	75
6.2.1.	A549 Hücre Serisindeki Sitotoksosite Çalışmalarının Sonuçları	75
6.2.1.1.	Etanollü Propolis Ekstraktının Sitotoksik Etkisi	75
6.2.1.2.	Sisplatinin Sitotoksik Etkisi	76
6.2.1.3.	Kuersetinin Sitotoksik Etkisi	76
6.2.2.	Fibroblast Hücre Serisindeki Sitotoksosite Çalışmalarının Sonuçları	77
6.2.2.1.	Etanollü Propolis Ekstraktının Sitotoksik Etkisi	77
6.2.2.2.	Sisplatinin Sitotoksik Etkisi	77
6.2.2.3.	Kuersetinin Sitotoksik Etkisi	78
6.2.3.	IC ₅₀ Değerleri ve Seçicilik İndeksleri	78
6.3.	Flow Sitometrik Analiz Sonuçları	78
6.3.1.	Hücre Döngüsü Analizi Sonuçları	78
6.3.2.	Anneksin V Analizi Sonuçları	82
6.3.3.	Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi Sonuçları	83
6.4.	Kaspaz Aktivitesi Ölçüm Sonuçları	84
6.5.	Hücre İçi ROS Ölçüm Sonuçları	85

6.6.	CHOP Ekspresyon Analizi Sonuçları	86
7.	TARTIŞMA ve SONUÇ	88
8.	KAYNAKLAR	96
9.	ÖZGEÇMİŞ	113

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler ve miktarları	10
Tablo 2. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri	15
Tablo 3. Antioksidan savunma sistemi elemanları	19
Tablo 4. Hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan siklin-CDK kompleksleri ve etki ettikleri evreler	28
Tablo 5. CDK inhibitör ailelerinin üyeleri ve işlevleri	29
Tablo 6. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri arasındaki temel farklar	33
Tablo 7. Apoptoz ile ilişkili hastalıklar	35
Tablo 8. Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri	47
Tablo 9. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri ve satın alındıkları firmalar	48
Tablo 10. Etanollü propolis ekstraktının toplam polifenolik içeriğinin belirlenmesi	51
Tablo 11. Etanollü propolis ekstraktının toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi	53
Tablo 12. Etanollü propolis ekstraktının demir indirgeyici gücünün belirlenmesi	55
Tablo 13. RNA örneklerinden cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri	72
Tablo 14. Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenleri	73
Tablo 15. RT-PCR protokolü	74
Tablo 16. Etanollü propolis ekstraktının antioksidan özellikleri	75
Tablo 17. Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisindeki sitotoksik etkisi	75
Tablo 18. Sisplatinin A549 hücre serisindeki sitotoksik etkisi	76
Tablo 19. Kuersetinin A549 hücre serisindeki sitotoksik etkisi	76
Tablo 20. Etanollü propolis ekstraktının fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkisi	77
Tablo 21. Sisplatinin fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkisi	77
Tablo 22. Kuersetinin fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkisi	78
Tablo 23. IC ₅₀ değerleri ve seçicilik indeksleri	78
Tablo 24. Hücre döngüsü analizi sonuçları	81

Tablo 25. Anneksin V analizi sonuçları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Propolis içeriğinde bulunabilen bazı polifenolik bileşiklerin kimyasal yapıları	12
Şekil 2. Karsinogenez aşamaları	22
Şekil 3. Hücre döngüsü evreleri ve evreler arası geçişi gerçekleştiren siklin-CDK kompleksleri	27
Şekil 4. Hücre ölümü türlerinin sınıflandırılması	32
Şekil 5. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolaklarının biyokimyasal özeti	37
Şekil 6. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolakları	38
Şekil 7. Endoplazmik retikulum stresi kaynaklı apoptoz yolakları	41
Şekil 8. Toplam polifenol içerik tayini için kullanılan gallik asit standart grafiği	51
Şekil 9. Toplam flavonoid içerik tayini için kullanılan kuersetin standart grafiği	53
Şekil 10. Demir indirgeyici güç tayininde kullanılan troloks standart grafiği	55
Şekil 11. Lüminometrik kaspaz 3/7 kitinin çalışma prensibi	67
Şekil 12. DCFH-DA' nın ışığa veren DCF'ye dönüşümü	69
Şekil 13. Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisindeki IC ₅₀ değerini belirlemede kullanılan logaritmik konsantrasyon-yüzde canlılık grafiği	76
Şekil 14. Etanollü propolis ekstraktının fibroblast hücre serisindeki IC ₅₀ değerini belirlemede kullanılan logaritmik konsantrasyon-yüzde canlılık grafiği	77
Şekil 15. Mitokondri membran potansiyeli analizi sonuçları	84
Şekil 16. Kaspaz 3/7 aktivitesi ölçüm sonuçları	85
Şekil 17. Hücre içi ROS ölçümü sonuçları	86
Şekil 18. CHOP mRNA ekspresyon analizi sonuçları	87

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Çalışmada kullanılan propolis numuneleri	9
Resim 2. Annexin V analizinde hücrelerin yaptığı floresans ışımlar sonucu elde edilen bölgeler	63
Resim 3. Negatif kontrol grubunu oluşturan hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu	79
Resim 4. Etanollü propolis ekstratının IC_{50} konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu	79
Resim 5. Etanollü propolis ekstratının IC_{90} konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu	80
Resim 6. Etanollü propolis ekstratının IC_{90} konsantrasyonuna eşdeğer saf etanol ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu	80
Resim 7. Anneksin V analizi sonucu elde edilen grafikler	83
Resim 8. CHOP mRNA ekspresyon analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri	87

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATF-6	Activating transcription factor 6
A549	İnsan adenokarsinomik alveolar bazal epitel hücre serisi
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer protein
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
BIP	Binding immunoglobulin protein
Bid	BH3 interacting-domain death agonist protein
CAK	CDK-activating kinase
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
CAT	Katalaz
Cdc 25	Cell division cycle 25 protein
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CD 95	Cluster of differentiation 95
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CHOP	C/EBP homolog protein
CIP	Cyclin-dependent kinase interacting protein
CKIs	Inhibitors of cyclin-dependent kinase
CM-H₂DCFDA	5, 6-klorometil-2',7'-diklorodihidrofloroskein diasetat asetil ester
Diablo	Direct IAP-Binding protein with low PI
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	Enzim bağı immunosorbent assay
EMEM	Eagle's minimal essential medium
ER	Endoplazmik retikulum
ERAD	Endoplazmik retikulum ilişkili protein degradasyonu

ERO1α	Endoplazmik retikulum oksidaz 1 alfa
FADD	Fas-associated protein with death domain
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Floroskein izotiyosiyanat
FOXO	Forkhead box protein
GADD153	Growth arrest and DNA damage inducible protein 153
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
GRP94	94 kDa glucose-regulated protein
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
IP3R	Inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
JAK/STAT	Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription
JC-1	5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür
Kras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog protein
LDH	Laktat dehidrogenaz
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
Mdm2	Murin double minute 2 protein
ML-IAP	Melanoma inhibitor of apoptosis
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimetil hidrazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
Myc	Myelocytomatosis onkogen
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
Nrf-2	Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 protein
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
OD	Optik dansite
PBS	Phosphate buffered saline

PC	Fosfotidilkolin
PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PI	Propidyum iyodür
PIDD1	p53-induced death domain protein 1
PI3K/Akt	Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B
pRb	Retinoblastoma protein
PS	Fosfotidilserin
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
p53	Tumor protein 53
Ras	Rat sarcoma
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Trikloroasetik asit
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
TR	Tiyoredoksin redüktaz
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UPR	Unfolding protein response
Wnt	Wingless-type glycoprotein
Simgeler	
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
μ	Mikro

Formüller

AlCl_3	Alüminyum (III) klorür
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Alüminyum nitrat nonahidrat
CaCl_2	Kalsiyum (II) klorür
CO_2	Karbon dioksit
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Etanol
FeCl_3	Demir (III) klorür
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$\text{H}_3\text{P}[\text{W}_3\text{O}_{10}]_4$	Fosfotungstik asit
KCH_3COO	Potasyum asetat
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	Potasyum hekzasiyanoferrat (III)
NaCl	Sodyum klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
NaOH	Sodyum hidroksit
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Disodyum hidrojen fosfat dihidrat
NO_2	Azot dioksit
$\text{OH}^\bullet$	Hidroksil radikali
$\text{O}_2^\bullet$	Süperoksit radikali
O_3	Ozon

1. ÖZET

Türk Propolisinin Akciğer Kanseri (A549) Hücre Serisi Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

Kanser, hücre döngüsü kontrolünün ortadan kalkması ve/veya azalmış apoptoz nedeniyle ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Propolis; arılar tarafından kovanların çatlak ve boşluklarını doldurmak için üretilen, arı kovanlarında doğal olarak bulunabilen, toplandığı bölgenin bitki çeşitliliğine, mevsimine, toplayan arı ırkına göre içerik farklılıkları gösterebilen mumsu, reçinemsî yapıda bir maddedir. Literatürde değişik bölge propolislerinin sitotoksik ve antiproliferatif etkilerine yoğunlaşan çok sayıda çalışma mevcut olup, bu çalışmalarda propolisin sitotoksik etkinliği, içeriğinde bulunan polifenolik bileşiklere atfedilmektedir. Türk propolisinin kanser hücre serilerindeki sitotoksitesini konu alan çalışmalar ise sınırlıdır. Bu çalışmada, Türk propolisinin dünyada en yüksek mortaliteye sahip kanser türü olan A549 hücre serisindeki sitotoksik etkisinin ve olası etki mekanizmalarının ortaya konulması amaçlandı.

Etanollü propolis ekstraktının antioksidan kapasitesi toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeme gücü testleriyle, sitotoksik etkinliği ise MTT metoduyla belirlendi. Daha sonra etanollü Türk propolisi ekstraktının A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin mekanizması; apoptoz, mitokondri membran potansiyeli, hücre döngüsü, hücre içi reaktif oksijen türleri, endoplazmik retikulum stresi ve kaspaz aktivitesi yönünden incelendi.

Etanollü propolis ekstraktının toplam polifenolik ve flavonoid içerikleri ile demir indirgeme gücü değerleri gram propolis başına sırasıyla; 124 ± 1.5 mg gallik asit, 42 ± 0.8 mg kuersetin ve 311 ± 2.5 mg troloks eşdeğeri olarak bulundu. Ekstraktın A549 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisinin normal fibroblast hücrelerine göre seçici olduğu gözlemlendi. Ekstraktın A549 hücrelerini hücre döngüsünün G_1 evresinde durdurduğu; hücre içi reaktif oksijen türlerinin miktarını arttırmasına bağlı olarak mitokondri membran potansiyelini azalttığı, endoplazmik retikulum stresini ve kaspaz aktivitesini arttırarak proapoptotik özellik gösterdiği belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Akciğer Kanseri, Apoptoz, Endoplazmik Retikulum Stresi, Hücre Döngüsü, Propolis, Sitotoksikite

2. SUMMARY

Investigation of Cytotoxic Effect of Turkish Propolis on Lung Cancer (A549)

Cell Line

Cancer is a pathologic condition where the normal mechanisms of cell cycle regulation are dysfunctional either due to excessive cell proliferation, insufficient apoptosis or both. Propolis, is a natural wax-like resinous substance found in bee hives where it is used by honeybees as cement and to seal cracks or open spaces and its composition is variable depending on varieties of the plants, geographical area from which the resin is collected and the races of the bees. There have been many studies about cytotoxic and antiproliferative effects of propolis from different countries in the literature and its cytotoxic effects have been attributed its content of polyphenols. Even now, there are limited studies about cytotoxic effects of Turkish propolis on cancer cell lines. By this study it has been aimed to show cytotoxic effects and possible mechanism of this action of Turkish propolis on A549 cell line which has the highest mortality rate worldwide. Antioxidant capacity of ethanolic propolis extract was determined by total polyphenolic content, total flavonoid content and ferric ion reducing power assays and cytotoxic activity of ethanolic propolis extract was shown by MTT method. Then, mechanisms of cytotoxic action of Turkish propolis on A549 cells were investigated with regard to apoptosis, mitochondria membrane potential, cell cycle, intracellular reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress and caspase activity. Total polyphenolic contents, total flavonoid contents and ferric ion reducing power values of ethanolic propolis extract were found as 124 ± 1.5 mg gallic acid, 42 ± 0.8 mg quercetin, and 311 ± 2.5 mg trolox equivalents per gram propolis, respectively. We observed that propolis extract exhibited selective toxicity against A549 cells compared to normal fibroblast cells. We determined that ethanolic extract of propolis had arrested the cell cycle at G₁ phase of A549 cells, induced endoplasmic reticulum stress, caspase activity and apoptosis and decreased mitochondrial membrane potential by increasing the levels of intracellular reactive oxygen species.

Key words: Apoptosis, Cell Cycle, Cytotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, Lung Neoplasms, Propolis

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, hücre döngüsü kontrolünün ortadan kalkması ve/veya azalmış apoptoz nedeniyle ortaya çıkan patolojik bir durumdur (1). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre bulaşıcı olmayan hastalık kaynaklı ölümlerin % 63'ü kanser ile ilişkilidir (2). Kanserli hücrelerin bazı karakteristik özellikleri vardır. Bu özelliklerin başında, kontrollü hücre ölümü olan apoptozdan kaçma eğilimleri ve hücre döngülerini kontrol edememeleri gelmektedir (3). Akciğer kanseri dünyada en yüksek mortaliteye sahip kanser türüdür ve erken evrelerde saptanamaması hastalığın hızlı seyrine, bu da hastaların yaşam süresinin kısılmasına sebep olmaktadır (2).

Günümüzde cerrahi girişim, kemoterapi, radyoterapi, hormon replasmanı ve immunoterapi kanserle mücadelede başvuru alan temel tedavi yöntemleridir. Kemoterapi, kanserle mücadelede sıklıkla başvuru alan bir metod olup etkisizlik, ciddi toksisite ve çoklu ilaç direnci gibi dezavantajlar başarı yüzdesini düşürmektedir (4). Bunlara ilaveten bazı kanser hücrelerinin farmakolojik ajanlarla bile apoptoza yönlendirilememesi, onkoloji ve farmakoloji alanının hala çözemediği bir problemdir. Bundan dolayı antikanser ilaçlara karşı olan direnci yenebilmek için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. İşte bu noktada doğal ürünler kanserli hücrelerde apoptoz sinyal yollarını düzenleyebildikleri için önem kazanmaktadır (5).

Propolis ya da "bee glue" (arı zambakı) kovanların çatlak ve boşluklarını doldurmak için arılar tarafından üretilen ve arı kovanlarında doğal olarak bulunan, mumsu, reçinemsî yapıda bir maddedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda propolisin sabit bir bileşime sahip olmadığı, toplandığı bölgenin ve ülkenin bitki çeşitliliğine, hasat zamanına, toplayan arı ırkına göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiş ve propolis içeriğinde bulunan en az 180 bileşik karakterize edilmiştir. Bu bileşiklerden özellikle flavonoid ve fenolik asitlerin propolisin; antimikrobiyal, antioksidan, anti-inflamatuvar, antitümöral, antiülser, antiproliferatif ve immunomodülatör etkinliğinden sorumlu oldukları düşünülmektedir (6). Bunların sonucunda da başta gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisi olmak üzere pek çok ticari çevrede propolise olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (7).

Son yıllarda literatürde propolisin antitümöral ve immunomodülatör etkilerine yoğunlaşan çok sayıda çalışmanın mevcut olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda *in vitro* ve *in vivo* deneylerle propolisin bu etkilerinin mekanizmaları araştırılmakta, sonuçlar

kullanılan propolisin kimyasal kompozisyonu ve botanik orjini verileri ile yorumlanmakta ve hatta çalışmalar derleme makalelerinin konusu haline gelmektedir (8, 9). Böyle olduğu halde Türk propolisinin kanser hücre serilerindeki sitotoksik etkinliğini konu alan çalışmaların sınırlı olduğu (10-13) ve henüz akciğer kanseri hücre serilerinde herhangi bir *in vitro* alışma yapılmadığı görülmektedir.

Bu tez çalışmasında; Türk propolisinin dünyada en yüksek mortaliteye sahip kanser türü olan akciğer kanseri (A549) hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin incelenip, ekstraktın hücre döngüsü, apoptoz, hücre içi reaktif oksijen türleri ve endoplazmik retikulum stresi ile ilişkisinin incelenmesi amaçlandı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Propolis

Arıların dünya üzerindeki varlıklarının milyonlarca yıl önceye dayandığı tahmin edilmekte ve bu süre boyunca tüm canlıların arılardan faydalandıkları düşünülmektedir. Bu evrimsel başarının, arıların komplike sosyal organizasyonundan kaynaklandığı ileri sürülmekte ve bu başarının arı ürünlerine de yansıdığı bildirilmektedir. Bal arıları yüksek kaliteli gıda maddelerinin yanı sıra propolis gibi yapı malzemesi ve eşi görülmemiş savunma bileşikler de üretirler (7). Arılar, propolisi reçinensi yapısından dolayı kovanın çatlak ve deliklerini kapatmada, kovanın tamirinde ve kovanın incelmış duvarlarını güçlendirmede kullanmaktadırlar. Bununla birlikte propolis, kovadaki arı popülasyonunun hastalıklardan korunması için çok önemli bir biyolojik rol oynamaktadır. Arılar; kapalı ve sınırlı bir ortamda yaşadığı ve bir arının hastalığı hızla tüm popülasyona yayılabilme tehlikesi taşıdığından propolisin antiseptik özelliği oldukça önem kazanmaktadır. Arılar kovana giren davetsiz misafirlerini öldürdükten sonra propolis ile mumyalayıp, cesedin çürüyüp mikroorganizma üretmesini engellemektedirler. Ayrıca kovanın içten sıvanmasında kullanılan propolis, kovayı kontrolsüz hava akımından ve dış nemden de korumaktadır. Bu sayede kovanın su kaybı önlenmekte ve kovan içinin sabit nemde kalması sağlanmaktadır (6, 7). Propolisin enfeksiyonlara karşı bu mükemmel koruyucu özelliği halk arasında asırlardır bilinmekteyken modern bilim propolis ile ancak 1960'lardan sonra doğal ürünlere olan genel eğilim sonucu tanışabilmiştir (7).

Propolisin arılar tarafından bitkilerden toplanarak oluşturulduğu gerçeği ilk kez Philipp ve Vansell ile Bisson isimli araştırmacıların çalışmalarıyla literatüre girmiştir. Propolisin bal arıları tarafından ağaçların filizlerinden ve diğer botanik kaynaklardan toplandığı kabul edilmektedir. Kavak, söğüt, huş, karaağaç, kızılğaç, kayın, atkestanesi ve diğer kozalaklı ağaçlar propolisin botanik orjinini oluşturmaktadır. Bal arıları, çiçeklerin ve yaprakların koruyucu reçine tabakalarını çeneleriyle toplamakta ve elde ettikleri parçaları arka ayaklarıyla kovana taşımaktadırlar. Bir arı kolonisi yılda 150-200 g propolis toplayabilmekle birlikte bazı arı ırklarında miktar bu rakamlardan daha da az olabilmektedir. Propolis üreten arı ırklarının başında Avrupa bal arısı (*Apis mellifera*) ve onun alt gruplarını oluşturan İtalyan bal arısı (*Apis mellifera ligustica*), Avrupa kara arısı (*Apis mellifera mellifera*) ve Karniyol bal arısı (*Apis mellifera carnica*) gibi türler

gelmektedir. Şaşırtıcı bir şekilde tropik bal arısı (*Apis cerana*, *Apis florea*, *Apis dorsata*) ve Afrika bal arısı (*African Apis mellifera*) türlerinin propolis yapmadıkları belirlenmiştir (6).

Son elli yıldır propolisin; antibakteriyel, antifungal, antiviral, sitotoksik, antioksidan, anti-inflamatuvar, immunomodülatör, antikanser ve daha pek çok faydalı biyolojik özelliğini ortaya koyan bilimsel çalışmalar yapılmıştır. Bunların sonucunda da propolise olan ilgi özellikle gıda ve kozmetik endüstrisi başta olmak üzere ticari çevrelerde artmaktadır (7). Propolisin kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerine kayda değer pek çok veri bulunmasına rağmen ilaç endüstrisindeki tedavi edici uygulamaları ve kullanımları sınırlıdır. Bunun ana sebeplerinden birisi propolis içeriğinin toplandığı ekosistem ve iklimden etkileniyor olmasıdır (14).

4.1.1. Propolisin Tarihçesi

Arıların ve arı ürünlerinin tarihsel sürecinin milattan önce 13000 yıl önce başladığına inanılmaktadır. Bu tarihi bilgi yapılan kazılarda ortaya çıkan arı fosillerine ve kovan benzeri yapıların varlığına dayandırılmaktadır. Milattan önce 3100 yıllarında yapıldığı hesaplanan hiyerogliflerde, Antik Mısır'ın arı figürleriyle temsil edildiği görülmektedir. Antik çağlarda firavunların arılarla alakadar oldukları ve hatta bir firavunun "*Arı Kral*" olarak anıldığı keşfedilmiştir. Bazı tapınakların, kralların istekleri doğrultusunda sadece bal ve baldan ilaç yapmak üzere arılara tahsis edilmiş olduğu bildirilmektedir. Elde edilen kanıtlar propolisin sadece Mısırlılar tarafından değil, Persler ve Romalılar tarafından da kullanıldığına işaret etmektedir. Antik Mısır'da vazo ve bakır süs eşyaları üzerinde propolis yapan arı figürleri betimlenmiş ve propolisin hastalıkların tedavisinde kullanıldığı motifleri işlenmiştir. Silva Veiga'ya göre bu dönemlerde arı ürünlerinin faydalı özellikleri rahipler tarafından bilinmekte ve bu nedenle ölümlerin bozulmasını önlemek için mumyalamada kullanılmaktaydılar.

Antik Yunan döneminde de arıcılığın çok gelişmiş ve popüler olduğuna dair kanıtlara rastlanmaktadır. Aristaos, Apollo ve Cyrene gibi efsanelerde arıcılık kavramlarına yer verildiği görülmektedir. Propolis (suburb, bee glue) kelime olarak Helenistik Antik Yunan kökenlidir ve bir fiil olan "*promalasso*" (sürterek ya da ovuşturarak yumuşatma) kelimesinden türetilmiştir (6). Propolis sözcüğü eski Yunan'da, *pro-* için "ön, giriş" ve *-polis* için "şehir" kelimeleri bir araya getirilerek bal arılarının kovani savunması ile ilgili olarak "şehrin ya da kovanın savunması" anlamında kullanılmıştır (15).

Antik Yahudiler propolis kelimesine karşılık İbranice "*Tzori*" kelimesini kullanmışlar ve onu bir ilaç olarak değerlendirmişlerdir. Eski Ahit'de "*Tzori*" ve onun terapötik etkilerine vurgu yapılmaktadır. İncil'de geçen "*Balm of Gilead*" (pelesenk yağı) tabirinin de propolisi tarif ettiği ileri sürülmektedir. Bu adı geçen pelesenk yağının Saba melikesi Belkıs'ın Kral Süleyman'a bir hediyesi olduğu rivayet edilmektedir. Yunanlılar propolisi parfüm yapımında da kullanmışlar, 15'den fazla Yunan/Romalı yazar propolisin bal ve arı mumundan sonra üçüncü arı ürünü olduğunu belirtip hazırlanışı ve kullanışı hakkında bilgiler vermiştir. Hipokrat yaraların ve ülserin tedavisinde propolis kullandığını aktarırken, milattan sonra 50'li yıllarda yaşamış olan Pedanios Dioscorides isimli bitki bilimci "*De materia Medica*" adlı eserinde propolisin medikal amaçlı kullanım şekillerini tarif etmiştir. Milattan sonra 1. yüzyılda yaşamış Cornelius Celsus "*De Medicina Celsus*" adlı eserinde propolisin kanlı irin, açık yara ve apse tedavisinde kullanılabileceğini yazmıştır. Kuran'da da Nahl suresinde (68 ve 69. ayetler) arı adının geçtiği ve arı ürünlerinin insanlara faydalı olduğu yönünde ayetler bulunmaktadır. Bu ayetlerde "Rabbin bal arısına vahyetti: Dağlarda, ağaçlarda ve onların kurdukları çardaklarda kendine evler edin" ve "Sonra meyvelerin tümünden ye, böylece Rabbinin sana kolaylaştırdığı yollarda yürü-uçuver. Onların karınlarından türlü renklerde şerbetler çıkar, onda insanlar için bir şifa vardır. Şüphesiz düşünen bir topluluk için gerçekten bunda bir hikmet vardır" ifadeleri yer almaktadır. Araplar da propolisi bu yüzyıllarda bilmekte, hatta İbn-i Sina iki tür arı mumundan birinin açık, diğerinin koyu renkli olduğunu ve koklandığında hapsirmeye sebep olabileceklerini yazmakta, bahsettiği koyu renkli maddenin propolis olduğuna inanılmaktadır. Pers el yazmalarında ise propolis; egzema, kas ağrısı ve romatizma tedavisinde kullanılan bir ilaç olarak geçmektedir.

Orta Çağ'da propolisin ağız ve boğaz enfeksiyonları ile diş rahatsızlıklarının tedavisinde kullanıldığına dair kanıtlar mevcuttur. Yine bu yıllarda propolise "Rus penisilini" denildiği görülmektedir. Rönesans'tan sonra yayınlanan John Gerard'a ait "*The History of Plants*" adlı eserde propolisten yapılan merhem in inflamasyon temelli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini vurgulanmaktadır. Propolis, 17. yüzyıl İngiltere farmakopelerine yara iyileştirici özelliği ile girmiştir. Propolisin kimyasal kompozisyonu ile ilgili ilk çalışmalar 20. yüzyılda başlamış, kimyanın ilerlemesi ile birlikte bu alanda da hız kazanılmış, bilim insanları bir yandan propolisin içeriğindeki

maddeleri ortaya çıkarılırken bir yandan da biyolojik etkinliklerini ortaya koymaya başlamışlardır (6).

4.1.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis; yapışkan ve reçineli bir madde olup, rengi toplandığı bitki örtüsüne ve depolama süresine bağlı olarak, sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar değişebilmektedir (16). Çalışmada kullanılan propolis örnekleri Resim 1’de gösterilmiştir. Propolis karakteristik olarak 60-70 °C’de sıvı haldeyken bazı türlerinin sıvılaşması için 100 °C’nin üzerine çıkmak gerekmektedir. Yüksek sıcaklıklarda yumuşak, bükülebilir ve oldukça yapışkan bir kıvamda iken, soğutulduğunda ya da kısmen dondurulduğunda oldukça sert ve kırılgan bir yapı kazanmaktadır (6). Propolis reçinemsi yapısından dolayı nadiren ham haliyle kullanılabilen, bundan dolayı çoğunlukla çeşitli çözücüler kullanılarak farklı ekstraksiyon işlemleriyle ekstrakt haline getirilmektedir (17). Kullanılan ekstraksiyon yöntemine ve çözücüye göre de propolis ekstraktları farklı aktiviteler sergileyebilmektedir (18). Propolis su ve hidrokarbon çözücülerde düşük, alkol türevlerinde ise yüksek oranda çözünürlük gösterdiği belirlenmiştir (19). Propolis ekstraktı hazırlamada en sık kullanılan çözücü etanol olup, zaman zaman metanol ve sulu propolis ekstraktları da tercih edilmektedir (18).

4.1.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda propolisin; sabit bir bileşime sahip olmadığı, toplandığı bölgenin bitki çeşitliliğine, mevsime, toplayan arı ırkına göre farklılıklar gösterebildiği belirlenmiştir (6). Ham propolisin bileşimi kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle % 50 reçine ve balsam [fenoller, fenolik asitler, flavanonlar (kuersetin, galangin, pinosembrin), dihidroflavanonlar, flavonlar, kalkonlar, flavanoller, fenolik gliseridler, sinnamik asit, kumarik asit, prenillenmiş bileşikler ve artepilin C] % 25-30 mum, % 10 uçucu yağ, % 5 polen, % 5 organik ve mineral bileşiklerden oluşmaktadır (15, 20-22).



Resim 1. Çalışmada kullanılan propolis numuneleri (Turan'dan, 20).

Propolis içeriğinde bulunabilen temel bileşik sınıfları; flavonoidler ile çeşitli fenolik ve aromatik bileşiklerdir. Bu sınıflar dışında birçok B-kompleks vitamini, önemli mineralleri ve eser elementleri de içermektedir (20). Propolis içeriğinde bulunabilen başlıca bileşikler Tablo 1'de verilmiştir. Flavonoidler bitkilerde glikozidleri şeklinde bulunurlarken, propolis içeriğindeki flavonoidler ise aglikonları şeklinde bulunmaktadır. Bu durumun arıların propolis toplarlarken salgıladıkları β -glikozidazların bitkisel flavonoidlerdeki şeker birimlerini kesmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (23).

Avrupa, Asya, Kuzey ve Güney Amerika ile Afrika'dan toplanan propolis örneklerinin kimyasal içeriklerinin birbirinden farklı olduğu bildirilmektedir (20, 24). Avrupa ve Çin propolis örneklerinin çoğunlukla flavonoid ve fenolik asit türevlerini içerdikleri, tropikal bölge propolis örneklerinin ise genellikle flavonoid bakımından fakir olduğu bilinmektedir (14). Ilıman kuşak bölgelerine ait propolis örneklerinin flavonoidler ve sinamik asit türevleri gibi fenolik bileşiklerce zengin olduğu bildirilmekle birlikte bu örneklerde diterpenlerin ve prenillenmiş bileşiklerin eser miktarlarda bulundukları, tropikal Güney Amerika propolisinde ise bu bileşiklerin esas içeriği oluşturmakla beraber yapıda lignanların ve flavonoidlerin de bulunabileceği vurgulanmaktadır (25). Ilıman kuşak ülkelerinden elde edilen propolis numunelerinde bugüne kadar fenolik asitler, fenolik asit esterleri ve flavonoidler gibi ana sınıflara dahil 300 kadar bileşik belirlenmiştir (26).

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler ve miktarları (Demir'den, 27).

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

4.1.3.1. Flavonoidler

Flavonoid terimi Latince sarı anlamına gelen "*flavus*" kelimesinden türemiştir (28). Flavonoidler; polifenolik bileşikler grubunun bir üyesi olan, meyvelerde, sebzelerde, çay ve meyve suyu gibi içeceklerde doğal olarak bulunan, 15 karbon atomundan meydana gelen, üçlü halkalı yapıya çeşitli fonksiyonel grupların takılı olmasıyla oluşan bileşiklerdir (23, 29). Yapıya takılı hidroksil gruplarının konumunun ve sayılarının flavonoidlerin farmakolojik aktivitelerini etkilediği yönünde genel bir kanı vardır (23). Flavonoidler antioksidan özelliklerini yapılarındaki karbonil ve hidroksil grupları, çift bağları ve 3',4'-dihidroksi katekol konfigürasyonları ile kazanmaktadırlar (30, 31). Ayrıca genellikle 3. karbon atomuna bağlı hidroksil grubu üzerinden gerçekleşen glikozilasyonun flavonoidlerin antioksidan etkinliğini azalttığı bildirilmektedir (23, 32). Flavonoidler

yapısal özelliklerine göre; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, kateşinler, kalkonlar, antosiyanidinler ve lökoantosiyanidinler gibi alt gruplara ayrılmaktadırlar (23).

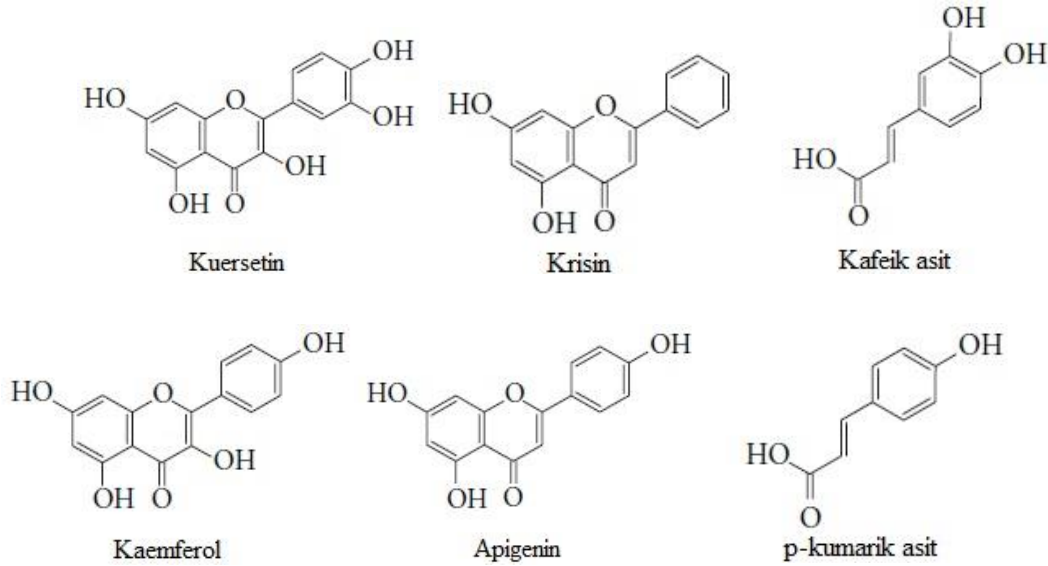
Polifenolik bileşikler diyetle organizmaya giren, değiştirilmeden emilebilen, hidroksilasyon, metilasyon, sülfatasyon ve glukuronasyon gibi reaksiyonlarla metabolize edilebilen eksojen antioksidan moleküllerdir. Alkolde çözünmelerinin emilimlerini arttırdığı bildirilmektedir. Sindirilen polifenollerin çoğunluğu ince bağırsak bakterileri tarafından da parçalanabilmektedir (23). Bitkilerdeki fizyolojik rollerinin yanı sıra insan diyetinin de önemli bir parçası olmasına rağmen flavonoidler besin olarak değerlendirilmemektedir (28).

Bugüne kadar propolisten 38'den fazla flavonoid izole edilmiş olup; galangin, kaemferol, kuersetin, pinosembrin, pinostrobin ve pinobanksin bunlara örnek olarak verilebilir. Propolisin fenolik bileşikler arasında başlıca; sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, ferulik asit, kafeik asit ve esterleri yer almaktadır (33). Propolis içeriğinde bulunabilen bazı polifenolik bileşiklerin açık molekül yapıları Şekil 1'de verilmiştir.

Fenolik asitlerin biyolojik antioksidan özellikleri; serbest radikalleri (süperoksit anyonu, hidroksil iyonu gibi) yakalayabilme, ağır metal (demir, bakır gibi) iyonlarını şelatlayabilme ve oksidazları inhibe ederek enzim aktivitelerini değiştirebilme hipotezleri ile açıklanmaktadır (23). Flavonoidlerin serbest radikal toplama kapasitelerinden dolayı gösterdikleri antioksidan özellikleri, onlar hakkında daha pek çok alanda çalışma yapma ihtiyacını beraberinde getirmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında; hücre proliferasyonu üzerinde etkili oldukları, anjiyogenezi ve hücreler arası sinyal mekanizmasını inhibe, DNA tamir enzimlerini ise aktive edebildikleri ortaya konulmuştur (34, 35). Ayrıca flavonoidlerin alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu, bundan dolayı da günlük diyetle ilaveten çeşitli kaynaklardan (yeşil çay, kırmızı üzüm, propolis gibi) alınan polifenollerin, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruyucu olabileceği vurgulanmaktadır (31, 36, 37).

Bununla beraber tüm polifenollerin tamamen sağlıklı olduğunu düşünmenin de yanlış olabileceği vurgulanmaktadır. Bazı polifenol türlerinin konsantrasyona ve maruz kalma

süresine bağlı olarak mutajenik ve pro-oksidan özellik gösterebileceği, dolayısıyla topoizomeras enzim aktiviteleri, prostanoid biyosentezi ve sinyal transdüksiyonu gibi esansiyel biyokimyasal yolları olumsuz etkileyebileceği de ileri sürülmektedir (36).



Şekil 1. Propolis içeriğinde bulunabilen bazı polifenolik bileşiklerin kimyasal yapıları (Szliszka'dan, 34).

4.1.3.2. Arı Mumu, Yağ Asitleri ve Esansiyel Yağlar

Propoliste bulunan arı mumu ve yağ asitleri propolis içeriğinin yaklaşık % 30'unu, uçucu bileşenler ise yaklaşık % 10'unu oluşturmaktadır (27). Arı mumu bileşimi başlıca; mono esterler, poliesterler, uzun zincirli hidrokarbonlar, hidroksi esterler, uzun zincirli yağ asitleri ve asit esterlerinden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar, propoliste bulunan uçucu yağlar, terpenler ve arı mumu gibi bileşenlerin propolisin biyolojik etkisini ve kimyasal özelliklerini anlamlı bir şekilde etkilemediğini ortaya koymuştur (20).

4.1.3.3. Mineral Elementler ve Diğer Maddeler

Propolis içeriğinde bulunan mineral elementleri belirlemek amacıyla atomik absorpsiyon spektroskopisi ile yapılan çalışmalarda, Makedonya'dan toplanan propolis numunelerinde; Ca, Mg, K, Na, Fe ve Zn; Küba'dan toplanan propolis numunelerinde ise Fe, Mn, Zn, Cu elementleri belirlenmiştir (27). Ayrıca propolis içeriğinde B, C ve E vitaminlerinin yanı sıra arıların tükürük salgılarından kaynaklanan α -amilaz, β -amilaz, α -laktamaz, β -laktamaz, maltaz, esteraz, süksinik dehidrogenaz, glukoz-6-fosfataz, adenozin

trifosfataz, asit fosfotidaz ve transhidrogenaz gibi enzimlerin bulunabildiği de bildirilmektedir (22, 23).

4.1.4. Propolisin Biyolojik Özellikleri

Propolisin biyolojik özelliklerinin içeriğinde bulunan polifenollerden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (27). Propolisin farmakolojik özelliklerinin ortaya çıkışında bazı bileşikler bağımsız katkı sunarken, genellikle içerikte bulunan tüm bileşenlerin sinerjik etkisinden bahsedilmekte ve yaklaşık olarak 70 mg/gün konsantrasyonun erişkin insanlar için güvenilir tüketim miktarı olduğu bildirilmektedir (14, 18). Propolisin; antifungal, antiviral, lokal anestezik, nöroprotektif, antibakteriyel, tümörisidal, antimitojenik, radyoprotektif, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, immüностimülatör, sitostatik, yara iyileştirici, apoptotik, antioksidatif, anti-inflamatuvar, antimetastatik, antigenotoksik ve antiproliferatif özellikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (19, 27, 38-49).

Değişik ülkelerden elde edilen propolis numunelerinin farklı kimyasal yapıya sahip olmaları, farklı biyolojik aktiviteler sergilemelerine neden olabilmektedir. Ancak bu durumun her farmakolojik özellik için aynı olmadığı da vurgulanmaktadır. İlginç bir şekilde karasal ve ekvatorial bölgeleri de içine alan farklı bölgelerden toplanan ve farklı kimyasal yapıya sahip olan propolis örneklerinin, benzer biyolojik aktiviteler gösterdiği de bulunmuştur. Propolis; arılar tarafından kovanda enfeksiyonlardan korunma amacıyla kullanılmaktadır ve bu nedenle değişik propolis türlerinin hem antibakteriyel hem de antifungal özellik göstermesi doğaldır. Bu sebeple gözlenen aktivitenin sadece belirli bir bileşik grubuna atfedilmesi doğru bulunmamaktadır. Nitekim propolisin antibakteriyel aktivitesinden sorumlu bileşik grupları; kavak tipi propoliste flavonlar, flavononlar, fenolik asitler ve onların esterleri iken, *Baccharis* tipi (Brezilya) propoliste prenillenmiş *p*-kumarik asitler, diterpenler, kırmızı Küba propolisinde ise prenillenmiş benzofenonlardır. Bu nedenle propolisin antibakteriyel özelliği tüm dünyada propolisin üzerinde en çok çalışılan biyolojik özelliği olmuştur (49).

4.1.5. Propolisin Antikanser Özellikleri

Propolis ile yapılan gerek *in vitro* gerekse *in vivo* çalışmalarda, propolisin antikanser terapide hedeflenen etkilere sahip olabileceği ileri sürülmektedir (9). Propolisin; *in vitro* koşullarda kanserli hücrelerin çoğalmasını durdurabilen ve/veya bu hücrelerde apoptozu arttırabilen kafeik asit, kafeik asit fenetil ester (CAPE), artepilin C, kuersetin, naringenin,

galangin, kaempferol ve genistein gibi bileşikler i ihtiva ettiği bildirilmektedir. Ayrıca propolisin deneysel modellerde; akciğer, ağız, deri, özofagus, mide, kolon, prostat ve meme kanserlerinin gelişimini inhibe edebildiği de ortaya konulmuştur (23). Propolisin *in vivo* antitümöral etkisi immünomodölatör etkinliğine dayandırılmaktadır. Bu etki mekanizması; makrofaj aktivasyonu aracılığı ile makrofajlardan salınan faktörlerin üretiminin arttığı, bu faktörlerin de doğrudan kanser hücrelerine etki ederek ya da diğer immün hücrelerini aktive ederek spesifik olmayan tümör cevabının oluştuğu şeklinde açıklanmaktadır (8).

Propolisin ve ondan izole edilen bileşiklerin antitümöral etkilerinin ortaya konulması, propolisi yeni nesil antikanser ilaç geliştirme noktasında potansiyel bir hedef haline getirmiştir. Uygun konsantrasyon aralıklarında propolisin ratlarda ve insanlarda yan etki göstermemesi de bu ilgiyi arttırmaktadır. Propolisten her geçen yıl yeni bileşikler izole edilmekte ve bu bileşiklerin de antikanser etkinlikleri bireysel olarak değerlendirilmektedir. Bazı araştırmacılar bu şekilde izole maddelerin antikanser etkinliği ile ilgilenirken, bazıları ise bütün ekstrakt kullanıp sinerjik etkiyi görmeyi tercih etmektedirler (8).

4.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres

4.2.1. Serbest Radikaller

Atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya meyillidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma ya da moleküle büyük bir aktiflik kazandırır. Bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren, bağımsız olarak varlığını sürdürebilen molekül, atom veya atom gruplarına "serbest radikal" adı verilir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle ($R^{\bullet}$, $R^{\cdot}$) gösterilir (51). Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri eşleşmemiş elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmemekte, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak yüksüz olabilirler. Serbest radikal tanımına göre, moleküler oksijen biradikal olarak değerlendirilmektedir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde, diğer serbest radikallerle hızlıca reaksiyona

girebilmektedir. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşmaktadır. Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} , Cu^+ gibi) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle, oksidasyon reaksiyonları meydana gelmektedir. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir (20).

Serbest radikaller; radyasyona, sigara dumanına ya da hidrokarbonlara maruz kalma, sigara, alkol, uyuşturucu kullanımı, cerrahi stres, iskemi, travma gibi dış faktörlerin etkisiyle oluşabildiği gibi aktive olmuş fagositler (solunumsal patlama), mitokondriyal elektron transportu, enzim aktiviteleri (özellikle oksidazlar) ya da araşidonik asit metabolizması gibi iç faktörlerin etkisiyle de oluşabilmektedir (27).

İki serbest radikal karşılaştıklarında, her ikisinin de eşleşmemiş elektronları bir kovalent bağ oluşturacak şekilde birleşebilir ve radikal özelliklerini kaybedebilir. Radikal, eşleşmemiş elektronunu eşlemek üzere radikal olmayan başka bir bileşikten elektron alabilir, elektron verebilir ya da radikal olmayan bir bileşiğe katılabilir. Ancak bu reaksiyonların sonunda, radikal olmayan bileşik radikal hale gelebilmektedir. Bu nedenle serbest radikallerin radikal olmayan bileşiklerle reaksiyonları birbirini izleyen zincir reaksiyonları şeklinde olmaktadır (27, 53). Bu özellikleri ile reaktif oksijen türleri, Tablo 2’de verildiği gibi iki ana başlık altında incelenmektedir.

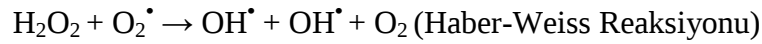
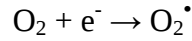
Tablo 2. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (Demir’den, 27).

Radikal Olanlar	Radikal Olmayanlar
Süperoksit ($\text{O}_2^\bullet$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($\text{OH}^\bullet$)	Hipokloröz asit (HOCl)
Peroksil ($\text{RO}_2^\bullet$)	Ozon (O_3)
Alkoksil ($\text{RO}^\bullet$)	Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)
Nitrik oksit ($\text{NO}^\bullet$)	Peroksinitrit ($\text{ONOO}^\bullet$)
Hidroperoksil ($\text{HO}_2^\bullet$)	Hidroperoksit L(R)OOH

4.2.2. Serbest Radikal Türleri

4.2.2.1. Süperoksit Radikali

Süperoksit, hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan bir serbest radikaldır. $O_2^{\bullet}$ radikali hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedir. $O_2^{\bullet}$ oluşumu; elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Uzun bir yarı ömre sahip olup, lipofilik özellik göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı da oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir. Zayıf bir oksidan olan $O_2^{\bullet}$ radikalının kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak $O_2^{\bullet}$ radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları (Haber-Weiss gibi) başlatabilmektedir. Bu reaksiyonda $O_2^{\bullet}$ ve H_2O_2 ; Fe^{2+} varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikallerini oluşturmaktadır.



Üretilen bu $OH^{\bullet}$ radikalleri oldukça reaktif olup, DNA gibi biyomoleküllerle reaksiyona girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir (20, 27).

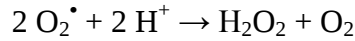
4.2.2.2. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikal olarak kabul edilmektedir. H_2O_2 'nin Fe^{2+} veya Cu^{2+} ile reaksiyona girmesiyle $OH^{\bullet}$ oluşmaktadır. H_2O_2 toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde, bu oluşan $OH^{\bullet}$ radikalının olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlemlendiği için "Fenton reaksiyonu" olarak adlandırılmaktadır. $OH^{\bullet}$ radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. $OH^{\bullet}$ radikallerinin, DNA'da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturabildiği ve oluşan bu ürünlerin bazılarının mutajenik olabildikleri vurgulanmaktadır. Yine $OH^{\bullet}$ radikalleri aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden, DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak, radikal oluşumuna neden olabilmektedirler. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen $OH^{\bullet}$ radikali, DNA'nın baz ve şeker yapılarında da ciddi hasarlar oluşturarak DNA üzerinde zincir kırıkları meydana getirebilmektedir. Hasarın çok kapsamlı olması

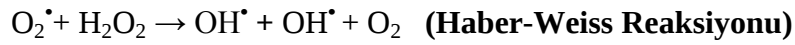
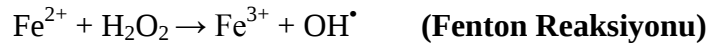
durumunda, oluşan hasar hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilememekte ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelebilmektedir (20, 27).

4.2.2.3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından bir radikal olarak kabul edilmemektedir. $O_2^{\bullet}$ radikalinin, hidrojenle verdiği reaksiyona "Dismutasyon Reaksiyonu" adı verilmekte ve dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanmaktadır. Reaksiyon şu şekilde ifade edilmektedir:



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen bileşikleri kapsamına girmektedir. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu, $O_2^{\bullet}$ radikalinin varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali türü olarak kabul edilen $OH^{\bullet}$ radikalini oluşturabilmektedir (20, 27).



4.2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin miktarı; inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, yüksek parsiyel oksijen basıncı, O_3 , azot dioksit, kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi uyarıların etkisiyle artmaktadır. Serbest radikallerin; hücrelerdeki lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm biyomoleküllere zararlı etkilerinin olabileceği vurgulanmaktadır. $O_2^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ radikalleri; sitoplazma, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilmekte, bunun sonucu olarak da membran geçirgenliği artmaktadır. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olabilmekte, bu durum da protein konformasyonlarını, protein-protein etkileşimlerini veya enzim aktivitelerini değiştirebilmektedir. Serbest radikaller karbohidrat depolimerizasyonuna ve DNA üzerinde zincir kırıklarına da sebep olabilmektedirler (54, 55).

Reaktif oksijen türleri; hücre sinyalizasyonunda sekonder haberci olarak kabul edilmekte ve normal hücrelerin çeşitli biyolojik prosesleri için gerektiği bilinmektedir. Nanomolar seviyelerdeki ROS hücre için mitojen karakterde olup hücrenin hayatta

kalması, farklılaşması, çoğalması ve anjiyogenez gibi biyolojik süreçlerin kontrolü açısından önemlidir. Fizyolojik koşullar altında ROS sürekli olarak oluşmakta ve ilgili ROS temizleyici mekanizmalar tarafından ortadan kaldırılarak hücre içinde ROS dengesi sağlanmakta ve bu denge hücrelerin metabolik ve immün strese adaptasyon sağlayabilmesi, farklılaşabilmesi ve çoğalabilme sinyalizasyonu için son derece önem arz etmektedir. Bu dengenin hücre dışı veya hücre içi sebeplerle bozulmasından dolayı meydana gelebilecek ROS artışı "oksidatif stres" adı verilen hücreye zarar veren mekanizmaları ve anormal hücre sinyalizasyonunu aktiflerken; ROS azalması ise hücre sinyalizasyonunun bozulmasına dolayısıyla hücresel homeostazisin sekteye uğramasına neden olabilmektedir. Bundan dolayı yüksek seviyelerdeki ROS hücre için toksik olmakta, hücre çoğalmasını durdurucu ya da hücre ölümünü aktifleyici yolları tetiklemektedir (56).

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre harabiyetinin, iskemi/reperfüzyon hasarı, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, akut renal yetmezlik, diyabet, böbrek yetmezliği, anfiyem/bronşit, kanser, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar gibi birçok patolojik olayda ve hastalıkta rolü olduğu düşünülmektedir (27, 55).

4.2.4. Antioksidan Savunma Sistemi

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta "antioksidan savunma sistemi" adı verilen savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Antioksidan sistem elemanları Tablo 3’de özetlenmiştir. Bütün hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı mücadele etmektedir. Savunma sistemleri; serbest radikal toplayıcılar ve bazı enzimlerden oluşmakta olup, savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır. Antioksidanlar reaktif oksijen ürünlerini inaktive eden ve bu nedenle oksidatif hasarı önleyen ya da geciktiren bileşiklerdir (57). Gıdalar ile alınan antioksidanların başında E vitamini, C vitamini, fenolik bileşikler ve karotenoidler gelmektedir (55).

Tablo 3. Antioksidan savunma sistemi elemanları (Demir'den, 27).

Enzimatik	Enzimatik Olmayan	
Glutasyon S-transferaz (GST)	Askorbik asit (Vit C)	α -Tokoferol (Vit E)
Glutasyon peroksidaz (GPx)	Glutasyon (GSH)	Seruloplazmin
Süpreoksit dismutaz (SOD)	Transferrin	Polifenoller
Tiyoredoksin redüktaz (TR)	Laktoferrin	Melatonin
Glutasyon redüktaz (GR)	Bilirubin	Albümin
Katalaz (CAT)	β -karoten	Ürik asit

Antioksidanların oksidatif strese karşı koruyuculukları, ROS'lara karşı reaktivitelerine bağlıdır. *In vitro* çalışmalar flavonoidler, fenolik asitler ve karotenoidler gibi doğal bileşiklerin çok etkili ROS süpürücüleri olduklarını ortaya koymakla birlikte bu bileşiklerin kendilerinin de reaktif sekonder radikaller olabileceğini vurgulamaktadır. Bu sekonder radikaller hücre içine ulaşp lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hedeflerde sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açabilecek değişiklikler yapabilirler. Gıdalarda bulunan antioksidan özellikteki bileşiklerin antikarsinojen özellik taşıyabildiği de bildirilmektedir. Bu bileşiklerin işlevleri; serbest radikalleri ortadan kaldırmak, antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesini arttırmak ya da redoks homeostazındaki biyokimyasal olayları etkilemektir (58).

4.2.5. Oksidatif Stres ve Hastalıklardaki Rolü

Serbest radikal oluşumu ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulduğu durumda ortaya çıkan patolojik durum "oksidatif stres" olarak adlandırılmaktadır (59). Serbest tiyol ve protein disülfidlerinin oksidasyonu, ATP havuzundaki azalma, serbest sitozolik kalsiyumun yükselmesi, sitoskelet elemanlarının bütünlüğünün kaybolması, plazma membranı geçirgenliğinin artması, plazma membranında artmış peroksidasyon, sitozolik bileşenlerin hücre dışına çıkması ve artmış DNA hasarı oksidatif stresin başlıca bulguları arasında gösterilmektedir (60). Oksidatif stresin biyolojik etkilerinin; oluşan ROS'ların içeriğine, maruz kalma süresine ve konsantrasyonuna aynı zamanda maruziyet esnasında hücre döngüsünün durumuna bağlı olduğu kabul edilmektedir (27).

Oksidatif stres; ateroskleroz, diyabet, kanser, kronik inflamasyon hastalıkları, santral sinir sistemi bozuklukları gibi fizyopatolojik olaylarda, hücre yaşlanmasında ve dolayısıyla hücresel yıkım, hücre hasarı ve hücre ölümünde rol oynayabilen bir mekanizma olarak son yıllarda büyük önem kazanmıştır (61).

Özellikle son yıllarda antioksidanların oksidan stresi azaltabilme kabiliyetlerinden dolayı oksidatif stresle ilişkili Alzheimer, kanser, diyabet, ateroskleroz gibi kronik hastalıklara karşı koruyucu olabileceği sıklıkla vurgulanmaktadır. Fakat bu bileşiklerin özellikle düşük konsantrasyonları koruyucuyken yüksek konsantrasyonlarda kendileri okside olup pro-oksidan karakter kazanabilmektedirler (62). Düşük konsantrasyonlarda kimyasalların zararlı etkilerini önleyici, yüksek konsantrasyonlarda ise mutajenik etki gösterebilen bileşikler "Janus bileşiği" olarak isimlendirilmektedirler. Janus; eski Yunan mitolojisinde çift başlı bir tanrının adıdır ve iki yönlü etki gösterebilen bileşikler bu isimle anılmaktadırlar. Janus cevabın ortaya çıkmasını, hücrenin çeşidi ile hücrelerin bu ajana maruz kaldığı konsantrasyon ve maruz kalma süresi belirlemektedir. Bileşiklerin Janus aktivite göstermesinde enzimlerin aktivitelerini değiştiren pek çok moleküler mekanizmanın görev alabildiği ileri sürülmektedir. Pek çok antioksidan bileşik Janus bileşikler grubunda değerlendirilmekte ve konsantrasyonlarına göre pro-oksidan ya da radikal toplayıcı olarak görev yaparak mutajenik veya antimutajenik etki sergileyebilmektedir (38, 63, 64).

4.3. Kanser

Kanser; hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin aşırı hücre proliferasyonu ya da azalmış apoptoz nedeniyle bozulması sonucu ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Kanser oluşum sürecinde baskılanmış ya da azalmış apoptozun önemli rol oynadığı bildirilmektedir (1). Kanser; hücre sinyal yollarında meydana gelen çoklu değişimler sonucu ortaya çıkan genetiksel öyküyü de barındırabilen heterojen bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır (65). Kanser, gelişen ve gelişmekte olan ülkeler için en önemli sağlık sorunlarından bir tanesidir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre bulaşıcı olmayan hastalık kaynaklı ölümlerinin % 63'ü kanser ile ilişkilidir ve ölüme en çok sebebiyet veren kanser türlerinin akciğer, mide, kolon, karaciğer ve meme kanserleri olduğu bildirilmektedir (2, 66). Kanser sıklığının bu kadar yüksek olması; popülasyonun yaş ortalaması, beslenme alışkanlığı, çevresel karsinojenlere maruz kalma süresi gibi

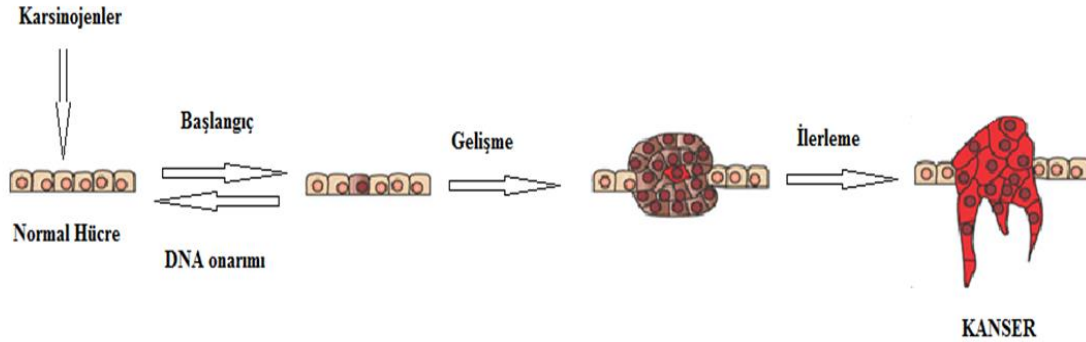
demografik durumlardan kaynaklanabilmektedir. Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı; 2008 yılında 12.7 milyon olan kanser vakası sayısının 2030 yılında 21.4 milyona ulaşacağını öngörmektedir (2).

Kanser araştırmalarına her yıl milyarlarca dolar harcanmasına rağmen hala kanserin tam olarak nasıl geliştiği sorusu yanıt bulamamıştır. En çok kabul gören hipoteze göre kanser; hücrenin akıbetine karar veren ve kalıtım biyomolekölü olan DNA’da meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Normalde hücreler tamir yetenekleri ile DNA’larını tamir edebilmektedirken, tamir kapasitelerinin üzerinde bir DNA hasarının oluşmasının hücrenin kanserleşme sürecini başlattığına inanılmaktadır. Sigara, sağlıksız diyet, virüsler, yetersiz fiziksel aktivite, kimyasal ve çevresel karsinojenlere maruziyet gibi etmenler başlıca kanser oluşturma sebepleri arasında sayılmaktadır (67).

Yetişkin bir insan yaklaşık 10^{15} hücreden meydana gelmektedir ve bu hücrelerin bölünüp farklılaşmasıyla ölümleri arasında bir denge vardır. Bu dengenin çoğalma yönünde bozulması hücrelerin kanserleşmesine neden olmaktadır. Birçok kanser türünde hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarıyla oluşturdıkları küme, tümör halini almaktadır. Yanındaki ya da uzaktaki dokulara yayılım yapmayan tümörler benign karakterdedir. İstisnalar haricinde benign tümörler ciddi rahatsızlıklara ya da ölüme sebebiyet vermezlerken, kanserli karakterde olan malign tümörler yakınındaki ya da uzaktaki doku ve organları istila edip onlara da zarar verme eğilimindedir. Kanserli hücrelerin tümör oluşturdıkları odaktan çeşitli etkilerle vücudun bir başka yerine taşınıp yerleşmesi "metastaz" olarak adlandırılmaktadır. Kanserinin ortaya çıkışında moleküler anlamda iki temel mekanizmanın olduğu ileri sürülmektedir: 1. Proto-onkogenlerin fonksiyon kazanıp onkogen haline gelmesi. 2. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarının azalması (67).

Karsinogenez (kanseri oluşum süreci), temelde normal bir hücrenin çok ayaklı süreçlerin sonunda transforme olması ve malign fenotip kazanmasını tarif etmektedir. Karsinogenez aşamaları Şekil 2’de gösterilmiştir. Başlangıç aşamasında; genellikle çeşitli etmenler sonucu ya onkogen aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı gen inaktivasyonuna neden olacak bir mutasyonun meydana geldiği ileri sürülmektedir. Gelişme aşaması; pek çok faktörün devreye girdiği ve hücrenin çoğalma avantajına sahip olmaya başladığı bir dönem olarak tarif edilmektedir. İlerleme aşamasında ise; hücre sahip olduğu kontrolsüz

bölünebilme karakteri sayesinde malign karakterdeki hücre sayısını arttırıp artık tümör oluşumuna neden olabilmektedir (1).



Şekil 2. Karsinogenez aşamaları (Oliveira'dan, 68).

Kanserli hücrelerin tanımlanan karakteristik özellikleri vardır. Bu özelliklerin başında kontrollü hücre ölümü olan apoptozdan kaçma eğilimleri gelmektedir (3). Bunun dışında büyüme sinyalleri konusunda kendi kendine yetebilmesi, hücresel enerji düzeyini değiştirebilmesi, damarlanmayı arttırabilmesi, immün yanıtı kaçabilmesi, doku invazyonu ve metastaz kabiliyetini arttırabilmesi kanserli hücrelerin diğer karakteristik özellikleridir (69).

Günümüzde cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, hormon replasmanı ve immunoterapi kanserle mücadelede başvurulacak esas metodlar olmakla birlikte bazen tamamlayıcı ve alternatif tedavi amacıyla doğal ürünlerin kansere karşı kullanımı da görülmektedir. Kemoterapi, kanserle mücadelede sıklıkla başvurulacak metod olup etkisizlik, ciddi toksisite ve çoklu ilaç direnci gibi dezavantajlar başarı yüzdesini düşürmektedir (4).

4.3.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri dünyada en yüksek mortaliteye sahip kanser türüdür ve erken evrelerde saptanamaması hastalığın hızlı seyrine bu da hastanın yaşam süresinin azalmasına sebep olmaktadır (2). Çünkü akciğer kanseri başlayıp diğer organlara yayılım yapmadıkça önemli bir semptom göstermemektedir. Dolayısıyla akciğer kanseri hastalarının sağ kalımını arttırmak tamamen erken teşhise bağlıdır. Akciğer kanseri oluşumunda sigara, hava kirliliği, radyasyon ve ağır metaller maruziyet önemli rol oynamaktadır. Bunlardan sigara en önemli risk faktörü olup, akciğer kanseri görülme sıklığı erkek popülasyonda bayanlara göre daha fazladır. Sigara kullanmayan insanlarda

akciğer kanseri görülmesi genetik yatkınlığa, zararlı gazlara maruziyet ve hava kirliliği gibi etmenlere bağlanmaktadır (2, 70).

Akciğer kanseri; küçük hücreli olan (SCLC) ve olmayan (NSCLC) olmak üzere iki sınıfta değerlendirilmektedir. NSCLC, vakaların % 80'ini oluşturmakta ve skuamöz hücreli karsinoma, adenokarsinoma, büyük hücreli karsinoma gibi alt gruplara ayrılmaktadır (2).

Akciğer kanseri tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale gibi yöntemlere başvurulmaktadır. SCLC kemoterapisinde genellikle sisplatin, etoposide ve celecoxib tek başına antrasiklinler, doksorubisin, epirubisin, topotekan, irinotekan, paklitaksel ve gempitabin ya tek başlarına ya da birbirleriyle kombine şekilde kullanılmaktadır (71). NSCLC kemoterapisinde ise sisplatin ve karboplatin ya tek başlarına ya da genellikle gempitabin, paklitaksel, doketaksi, etoposid veya vinorelbin ile kombine kullanılmaktadır (72). Bununla birlikte bu standart kemoterapi ciddi toksisiteden dolayı sınırlı sağ kalım süresi yaratmaktadır. Bu yüzden özellikle son yıllarda akciğer kanseri terapisi için daha düşük toksisite gösteren, antitümör özellikli doğal ürünlerin ve fitokimyasallarının kullanılabilirliği sorgulanmaktadır. Geleneksel tedavide beyaz dut, kayısı, öksürük otu, balon çiçeği gibi meyve ve bitkilerin akciğer kanseri tedavisinde hasta sağ kalım süresini uzatması, kemoterapinin yan etkilerini gidermesi, hasta yaşam kalitesini artırması gibi nedenlerle kullanıldığı bildirilmektedir (73).

4.3.2. Kanser ve Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türlerinin kanser üzerindeki rolünün iki yönlü olduğu ileri sürülmektedir. Normal hücrelerde görülen ROS artışı, onkogenik karakter sergileyip kanserin başlamasına, ilerlemesine ve yayılmasına neden olan sinyal yollarını aktiflerken, kanserleşmiş hücrelerde görülebilen aşırı ROS artışı ise bu hücrelerde ölüm yollarını, yaşlanmayı ve hücre döngüsünün durdurulmasını tetikleyebilmektedir (74-76).

Reaktif oksijen türleri; büyüme faktörleri, G protein kenetli reseptörleri, Wnt (Wingless-type glycoprotein) ve Notch ile onların alt hedefleri olan JAK/STAT (Janus kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription), MAPK (Mitogen-activated protein kinases), NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), PI3K/Akt (Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B) gibi sinyal yollarını modüle edebilmekte ve bu olaylar "redoks sinyalizasyonu" olarak isimlendirilmektedir (77). Kanser hücrelerinde; normal hücrelere göre redoks sinyalizasyonunun kaybolması

nedeniyle daha fazla miktarda ROS bulunmaktadır (76). İnsan prostat, meme, kolon ve malign mezotelioma gibi kanser türlerinde endojen ROS miktarının arttığı ve bu hücrelerde oksidatif strese karşı direnç oluşabildiği ileri sürülmektedir. Bu durumun; membrana bağlı NADPH oksidazın ekspresyonunun artışının, mitokondri disfonksiyonuna bağlı olarak enerji metabolizmasının değişmesinin, SOD aktivitesinin, siklooksijenaz, lipoksijenaz ve timidin fosforilaz disfonksiyonu ile GSH miktarının azalmasının bir sonucu olabileceği üzerinde durulmaktadır (78, 79).

Ayrıca Ras (Rat sarcoma), Myc (Myelocytomatosis onkogen) ve Akt gibi onkogenlerin de ROS üretimini arttırabildikleri ileri sürülmektedir (80). Ras aktivasyonuna bağlı olarak çoğu kanser türünde PI3K/Akt/mTOR (Mammalian target of rapamycin) hücre sağ kalım yolağı işlev kazanmakta, artan mitokondriyal aktivite sonucu ROS üretimi artmakta ve Akt tarafından yönlendirilen fosforilasyon ile Foxo (Forkhead box protein) inhibe olmakta, böylelikle karsinogenez süreci hızlanmaktadır. Kanser hücrelerinde artmış ROS'un hücre ölümüne sebep olmasını engellemek amacıyla çeşitli antioksidan genlerin aktivasyonunun gerçekleşebildiği de bildirilmektedir. Antioksidan enzim ekspresyonunun ana düzenleyicisi Nrf-2 (Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2); Kras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), Myc ve PI3K gibi kanser hücrelerinin sağ kalımını ve proliferasyonunu arttıran onkogenlerin aktivasyonu ile aktif hale gelebilmektedir (76). Redoks dengesinin kaybolması, kanser hücre metabolizmasının bir sonucu olarak artan oksidatif stres ve bu strese karşı koyabilmek adına anormal antioksidan enzim seviyeleri pek çok kanser türünde belirlenmiştir (81).

Kanser hücrelerindeki artmış ROS üretimi hücre metabolizmayı etkileyecek olan sinyal mekanizmalarının değişmesine de neden olabilmektedir. Tümör baskılayıcı genlerden olan p53; artmış oksidatif strese cevaben antioksidan genlerin aktivasyonunu sağlayarak redoks dengesini kurmaya, dolayısıyla biyomoleküllerin zarar görmesini engellemeye çalışmaktadır. İnsan kanserlerinin % 50'sinden fazlasında p53 mutasyonları veya p53 kayıpları görülmekte ve bu durum artmış ROS miktarı ve agresif tümör büyümesi ile ilişkilendirilmektedir. Hücre içi miktarına bağlı olarak ROS; kanser hücrelerinin hayatta kalımına ve ölümüne sebep olabildiği için "iki ucu keskin kılıç" olarak nitelendirilmektedir. Bu özelliğinden dolayı kanser terapilerinde ROS'a dayalı stratejiler tartışılmaya başlanmıştır (76). ROS arttırıcı ya da antioksidan inhibitörlerin kanser hücrelerini seçici bir şekilde öldürebildiği, tümör oluşumunu ve ilerlemesini

baskılayabildiği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (74, 76). SOD, CAT gibi antioksidan enzimler kanser hücrelerini oksidan strese karşı koruyabildiklerinden, yüksek düzeyde ROS üretimi ve birikimi de hücre ölümüne sebep olabileceğinden son yıllarda CAT ve SOD inhibitörleri kullanarak kanser hücrelerini ROS aracılıklı apoptoza sürüklenme stratejisi önem kazanmıştır (82, 83).

Son yıllarda bazı antikanser ilaçların da ana mekanizmaları olmamalarına rağmen kanser hücrelerinde ROS miktarını arttırdıkları ortaya konulmuştur. Örneğin; antikanser ilaçlardan 5-fluorourasil, DNA replikasyonunu inhibe ederek hücre bölünmesini durdurmakta, okzaliptatin DNA'da zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar yaparak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonu durdurmaktadır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar her iki kemoterapötik ilacın da kanser hücrelerinde hücre içi ROS miktarını arttırabildiklerini ortaya koymuştur. Paklitaksel; mitotik inhibisyon göstererek antikanser etkinlik sergileyen bir ilaç olup kanser hücrelerinde NADPH oksidaz aktivitesini arttırmak suretiyle ROS miktarını da arttırabildiği gösterilmiştir (84). Benzer özelliklerinden dolayı sisplatin, arsenik trioksit, antrasiklinler ve bleomisin gibi kemoterapötik ajanlar hücre içi ROS miktarını da arttırdıklarından kemoterapide daha fazla tercih edilmeye başlanmıştır (77).

4.3.3. Kanser, Reaktif Oksijen Türleri ve Polifenoller

Kanserli hücrelerdeki bazal redoks seviyesi normal hücrelerden farklıdır. Yüksek seviyelerdeki serbest metal iyonu ve endojen ROS üretimi bu hücreleri pro-oksidan sitotoksositeye daha meyilli hale getirmektedir. Kanser hücrelerinde transferrin reseptörünün artmış ekspresyonu nedeniyle fazla miktarda ağır metal bulunabilmektedir. Bu fazla miktardaki ağır metal varlığında antioksidanların kendileri okside olup pro-oksidan karakter sergileyebilmektedir (85).

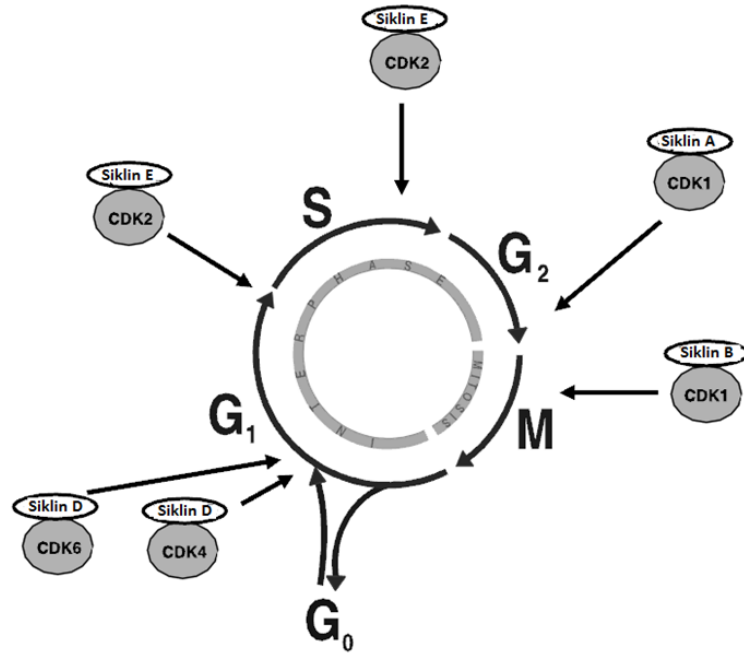
Polifenoller; ROS temizleyici ve ağır metal bağlayıcı aktivitelerinden dolayı antioksidan olarak bilinmelerine rağmen yüksek konsantrasyona, fizyolojik duruma ve zamana bağlı olarak pro-oksidan karakter sergileyebilmektedirler. Bir o-difenol yapısından hidrojen kopmasıyla fenoksil radikali oluşmakta ve bu radikal pro-oksidan karakter sergileyebilmektedir (83). Böylelikle flavonoidin indirgenmiş hali antioksidan özellik sergilerken okside formu olan fenoksil türevleri pro-oksidan karakterde olmaktadır. Kanser hücrelerinde yüksek miktarda bakır bulunduğu, polifenollerin de bu yüksek bakır

içeriğinden dolayı kanser hücrelerinde daha çok ROS oluşturarak DNA, lipid ve protein hasarını arttırarak kanserli hücrelerin ölümüne sebep olabileceği ileri sürülmektedir. Bu özelliği pek çok polifenolün sergileyebildiği bildirilmektedir (86). Flavonoidlerin geçiş metalleri varlığında sergiledikleri pro-oksidan davranış sonucu oluşan fenoksil radikali gibi ROS'lar kanser hücrelerinde mitokondri membran potansiyelini bozarak mitokondriyal toksisiteye neden olabilmektedirler. Mitokondri membran permeabilitesinin bozulması ile birlikte sitokrom c gibi apoptotik sinyal başlatıcılarının sitozole salınımının kolaylaşması, hücrelerde apoptoz kaskadının başlamasını sağlayabilmektedir (87, 88). Kuersetin, epigallokateşin gallat, kurkumin, teaflavin, baicalin, wogonin gibi polifenolik bileşiklerin kanser hücrelerinde ROS miktarını arttırarak mitokondriyal apoptozu başlatabildikleri bildirilmektedir (89).

4.4. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Döngüye giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlamaktadır (90). Hücre döngüsü; G₁, DNA'nın sentezlendiği S, G₂ ve mitoz (M) olmak üzere birbirini takip eden 4 evreden oluşmaktadır. Hücre döngüsünün bu ardışık evreler arasındaki sıralı ilerleyişi bir takım hücre içi moleküler mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Hücre döngüsünün doğru bir şekilde ilerlemesi ve bu ilerleyişin kusursuz kontrolü organizmalar için hayati öneme sahiptir. Bu kontrol de temelde siklin (cyclin) ve CDK (Cyclin-dependent kinase) adı verilen proteinlerin etkileşimlerine bağlı olarak sürdürülmektedir. Siklin ve CDK'ların farklı kombinasyonları, döngünün bir evresinden diğerine geçişi sağlamaktadır. Bu proteinlerin aktiviteleri ya da miktarları büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından düzenlenmektedir. Bu uyarıcılar hücre sinyal mekanizmasını inhibe ya da aktive ederek hücre döngüsünün ilerlemesini, hücre döngüsünün durdurulmasını, farklılaşmayı ya da apoptozu gerçekleştirmektedirler. Bir evreden diğer bir evreye geçiş sürecinin tamamlanmasına doğru ilgili siklin molekülü ubiquitin ile işaretlenmekte ve yıkıma uğratılmaktadır. Bütün bunlar göz önüne alındığında hücre döngüsünün geri dönüşünün olmadığı anlaşılmaktadır (91). Şekil 3'de hücre döngüsü evreleri ve evreler arası geçişi gerçekleştiren siklin-CDK kompleksleri gösterilmiştir.

Bugüne kadar memeli hücrelerinde 9 siklin ve 7 CDK tanımlanmıştır. Her ne kadar siklin ve CDK'ların hücre döngüsündeki esas rolleri belirlenmiş olsa da mekanizma hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Son bilgilere göre hücre döngüsünün ilerleyişi için tüm CDK'lar görev almamaktadır. Laboratuvar çalışmalarında CDK3 yoksunu farelerin büyüebildiğinin gösterilmesi CDK3'ün farelerde hücre döngüsünün devamı için elzem olmadığını göstermektedir. Buradan hareketle siklin ve CDK'ların başka hangi biyokimyasal mekanizmalarda görev aldığının belirlenmesi adına yapılan araştırmalar, bu proteinlerin transkripsiyon, nöronal fonksiyon ve iyon transportu gibi olaylarla da iç içe olabileceğini bildirmektedir (92).



Şekil 3. Hücre döngüsü evreleri ve evreler arası geçişi gerçekleştiren siklin-CDK kompleksleri (Vermeulen'den, 90).

CDK'lar serin/treonin kinaz ailesinin üyesi olan enzimlerdir. Genellikle hücre tipine göre; siklin D, CDK4 veya CDK6 ile, siklin E CDK2 ile, siklin A ve B ise CDK1 ile etkileşmektedir. CDK'lara siklin bağlanması onları aktiflemekte ve birçok adımda geri dönüşümlü fosforilasyon reaksiyonları meydana gelmektedir (93). Tablo 4'de hücre döngüsünün ilerleyişini sağlayan siklin-CDK kompleksleri ve etki ettikleri evreler verilmiştir. Örneğin; CDK1'in aktif hale gelebilmesi için CAK (CDK-activating kinase) tarafından 161. treonin rezidüsünün fosforillenmesi, 14. ve 15. treonin rezidülerinin Cdc25 (Cell division cycle 25) tarafından defosforillenmesi gerekmektedir. İnaktif hale

gelebilmesi için 14. ve 15. treonin rezidülerinin Wee1 kinaz tarafından fosforillenmesi gerekmektedir (92).

Tablo 4. Hücre döngüsünün ilerlemesini sağlayan siklin-CDK kompleksleri ve etki ettikleri evreler (Vermeulen'den, 90).

CDK Tipi	Siklin Tipi	Etki ettiği evre
CDK4	Siklin D1, D2, D3	G ₁ evresi
CDK6	Siklin D1, D2, D3	G ₁ evresi
CDK2	Siklin E	G ₁ /S geçişi
CDK2	Siklin A	S evresi
CDK1 (cdc2)	Siklin A	G ₂ /M geçişi
CDK1 (cdc2)	Siklin B	Mitoz
CDK7	Siklin H	CAK

CDK'ların aktiviteleri; CDK-siklin kompleksine doğrudan bağlanabilen CDK inhibitörleri (CKIs) adı verilen proteinlerce de düzenlenebilmektedir. CKI ailesi CDK inhibitör (INK4) ailesi ve CDK ile etkileşebilen protein (CIP) ailesi olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. INK4 ailesi; siklin D'nin CDK 4 veya 6'ya bağlanmasını engelleyen p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} ve p19^{INK4D} olmak üzere dört üyeye sahiptir. CIP ailesi ise tüm siklin ve CDK'ları hedef alıp kompleks inhibisyon gösterebilen p21^{Cip1}, p27^{Kip} ve p57^{Kip2} gibi üyeleri kapsamaktadır. CKI protein miktarının kontrolü ubiquitin aracılıklı degradasyon ile kontrol edilmektedir. Ubikitin ile işaretlenmiş protein, 26S proteazom tarafından tanınmakta ve yıkılmaktadır (92). Tablo 5'de CDK inhibitör ailelerinin üyeleri ve işlevleri özetlenmiştir.

Tablo 5. CDK inhibitör ailelerinin üyeleri ve işlevleri (Vermeulen'den, 90).

CKI Ailesi	İşlev	Üyeleri
INK4 Ailesi	G ₁ geçişinin kontrolü CDK4 ve CDK6 inaktivasyonu	p15 ^{INK4b}
		p16 ^{INK4a}
		p18 ^{INK4c}
		p19 ^{INK4d}
Cip/Kip Ailesi	G ₂ / M Geçişinin kontrolü siklin-CDK kompleksleri ve siklin B-CDK1 inaktivasyonu	p21 ^{Waf1} , p21 ^{Cip1}
		p27 ^{Cip2}
		p57 ^{Kip2}

4.4.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü ve Kanser

Hücre döngüsünün kusursuz bir biçimde ilerleyişinde her bir evreden diğerine geçişin "kontrol noktaları" (checkpoints control) adı verilen sensör mekanizmalar tarafından sürekli izlendiği bilinmektedir. Böylelikle bir evre tamamlanmadan diğerine geçişe izin verilmemektedir. Buradaki amaç; olası genetik hasarın tamir edildiğinden emin olunması, kontrolsüz hücre bölünmesinin engellenmesi ve iki yavru hücrenin ata hücreden eksiksiz bir şekilde genetiksel mirası temin etmesinin sağlanmasıdır. Bu kontrol noktalarında genetik materyalde bir problem sezilirse döngü durdurulur ve tamir edilmesi için zaman kazanılır. Hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse hücre apoptoza ya da bölünmeden yaşlanma periyoduna yönlendirilir.

Hücre döngüsü kontrol noktalarının çalışmaması kanser gibi hastalıkların gelişmesine neden olmaktadır. Pek çok kanser türünde CDK ve siklinlerin artmış ekspresyonu ile CKI ve pRb (Retinoblastoma protein)'nin azalmış ekspresyonunun olduğu bildirilmektedir. Bu değişimlerin; kromozom değişiklikleri (onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu) ya da epigenetik inaktivasyon (tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinin metilasyonu) sonucu oluştuğuna inanılmaktadır. Çoğu kanser türünde G₁'den S evresine geçişteki kontrol noktasının defektinden söz edilmekte ve buradan hareketle CDK 4, 6 ve 2'nin tümörlerin % 80-90'ında kontrol edilemediğinden bahsedilmektedir. Tümörlerin çoğunda bu durumun ortaya konması araştırmacıları kanser tedavisinde doğrudan bu proteinlerin aktiviteleri üzerine yoğunlaştırmıştır. Örneğin; preklinik verilere göre CDK aktivitesinin azaltılmasının kanserin önlenmesinde faydalı olabileceği bildirilmektedir (94).

4.4.2. Hücre Döngüsü ve Reaktif Oksijen Türleri

Özellikle son yıllarda oksidatif stres ve hücre döngüsü arasındaki ilişki oldukça ilgi çekici bir araştırma sahası haline gelmiştir. Düşük seviyelerdeki ROS miktarının hücre döngüsünün normal seyrini değiştirmede, fakat yüksek miktardaki ROS'un kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olabileceği belirtilmektedir. Yüksek seviyelerdeki ROS'un büyüme faktörleri olmadan bile büyüme faktörleri reseptörlerini aktive ederek hücre proliferasyonu üzerinde etkili olabildiği gösterilmektedir. Yine özellikle son yıllarda antikanser hedef terapi yaklaşımlarında reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olup hücre proliferasyonu, sağ kalımı, migrasyonu ve farklılaşmasından sorumlu olduğu düşünülen ve pek çok kanser türünde ekspresyonu artan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) inhibisyonu üzerinde çalışılmaktadır. ROS miktarı artışıyla beraber çeşitli hücrelerde EGFR yolağının da aktiflendiği ortaya konulmuştur. Bir başka yaklaşım kanser hücrelerinde artmış ROS'dan dolayı aşırı eksprese olan ve hücre döngüsünün sürdürülmesi yönünde fonksiyon gösteren Cdc 25'in baskılanmasıdır (92).

4.5. Hücre Ölümü

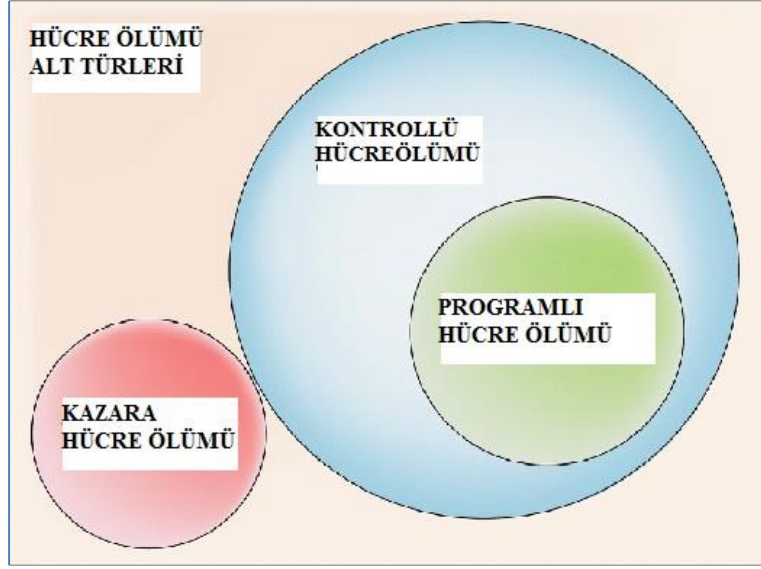
4.5.1. Hücre Ölümü Araştırmalarının Tarihçesi

19. yüzyılın ilk yarısından sonra hücre çoğalmasının mekanizmaları ortaya konulurken, hücre çoğalmasının sürekliliği karşısında programlı ve sürekli bir hücre ölümünün de olmasının gerektiğine dair sorular hücre ölümü araştırmalarını başlatmıştır. 1842 yılında Carl Vogt doğal hücre ölümüyle ilgili ilk hipotezi kurmuş, 1858'de Rudolph Virchow hücrelerde nekrozdan farklı bir ölüm çeşidi olduğunu göstermiş ve olayı "nekrobiosis" olarak isimlendirmiştir. Walther Flemming 1885 yılında doğal hücre ölümünü "kromatoliziz" olarak adlandırmış ve hücredeki morfolojik değişikliklere dikkat çekmeye çalışmıştır. 1960'larda özellikle hücrelerin gelişme aşamasında görülen doğal ölümlerin rastgele ve kazara olmadığı, kontrollü basamakların ürünü olduğu savunulmuştur. "Apoptoz" kelimesi literatüre ilk kez Kerr tarafından 1972 yılında kazandırılmıştır. 1980'lerden sonra gelişme dönemindeki apoptoz ve onun eksikliğinde ortaya çıkabilen hastalıklar üzerine yoğunlaşmıştır. Bir antiapoptotik protein olan Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)'nin keşfinden sonra apoptoz sinyalizasyonu ve mekanizması üzerine olan ilgi daha da artmıştır. Organ gelişimi ve kontrollü hücre ölümünün regülasyonu alanlarındaki çalışmalarından dolayı 2002 yılında Sydney Brenner, H. Robert Horvitz ve

John E. Sulston adlı bilim insanları tıp ve fizyoloji alanında Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir (66).

4.5.2. Hücre Ölümü Türleri

2000’li yılların başlarında hücre ölümü ile ilgili çalışmalar oldukça popüler hale gelmeye başlamış olmakla birlikte, farklı mekanizmalara sahip çeşitli hücre ölüm tiplerinin keşfi ile hücre ölümü sınıflaması ve tanımlamasında karışıklıklar yaşanmaya başlanmıştır. Hücre ölümü araştırmalarında ortak bir dil kullanmak amacıyla 2005 yılında "Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi" (NCCD-Nomenclature Committee on Cell Death) kurulmuştur. NCCD tarafından, daha önceleri özellikle morfolojik özellikler esas alınarak yapılan hücre ölümü sınıflandırması yerine, bugüne kadar yapılan çalışmalar ışığında ölçülebilir biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklere dayanan yeni bir hücre ölümü sınıflamasının yapılması önerilmiştir (95). NCCD’nin 2015 yılında yayınladığı son öneri derlemesinde; üç çeşit hücre ölümü sınıflama kriteri belirlenmiştir: 1) Morfolojik özelliklere göre (apoptotik, nekrotik, otofajik hücre ölümleri gibi), 2) Enzimolojik özelliklere göre (kaspaz, katepsin, kalpain, transglutaminaz gibi enzimlerin aktivitelerine bağımlı ya da bağımsız hücre ölümleri gibi), 3) Fonksiyonel duruma göre (fizyolojik, patolojik, kazara, kontrollü, programlı hücre ölümleri). Hücrelerin fonksiyonel durumlarına göre karşılaştığı ölüm tipleri Şekil 4’de gösterilmiştir. Kazara ölüm türünün en klasik örneği nekroz olup; hücrenin akut, şiddetli uyarana maruz kalması sonucu cevap mekanizmalarını harekete geçirmeye fırsat bulamadığı membran hasarına bağlı olarak, hücreye su girişinin artmasıyla hücrenin patlaması ve dolayısıyla inflamasyon ile karakterizedir. NCCD’nin önerisine göre bugüne kadarki çalışmalar ile belirlenen programlı hücre ölüm tipleri ise fonksiyonel olarak şöyle sınıflandırılmaktadır: 1) Apoptoz, 2) Otofaji, 3) Nekroptoz, 4) Mitototik Çöküş, 5) Kornifikasyon, 6) Partanatoz, 7) Netoz, 8) Anoikis, 9) Entozis, 10) Piroptoz. Ancak belirtilen ölüm tiplerinin mekanizmalarından bazıları (anoikis, entozis, piroptoz, partanatoz gibi) apoptoz ile yakın ilişkili bulunurken bazıları (netoz ve kornifikasyon gibi) farklı mekanizmalar üzerinden yürümektedir (96).



Şekil 4. Hücre ölümü türlerinin sınıflandırılması (Galluzzi'den, 96).

Tüm bu gelişmeler ışığında günümüzde erişkin bir insanda normal doku homeostazisinin sağlanabilmesi için "apoptoz" adı verilen ve saniyede yaklaşık bir milyon hücrenin üretilip kontrollü şekilde öldürüldüğü bir döngünün olduğu kanaatine varılmaktadır (97).

4.5.3. Apoptoz

Apoptoz kelimesi Yunanca kökenlidir ve "sonbaharda yaprak düşmesi" anlamına gelmektedir (66). Apoptoz; evrim boyunca korunmuş, oldukça kompleks, içsel bir ölüm programı olup embriyogenezde (parmak aralarındaki perdelerin kalkması gibi), gelişme evresinde ve yetişkinlikte doku homeostazisinin sağlanmasında olduğu kadar hasarlanmış ya da anormal hale gelmiş hücrelerin eliminasyonunda da oldukça önemli bir yere sahiptir. Dolayısıyla, fizyolojik apoptoz düzeyindeki çok küçük bir azalma bile erken dönemde tümörleşmeye gidebilen bir yolun önünü açabilmektedir. Kanserli hücrelerin tipik özelliklerinden olan apoptozdan kaçabilme yetenekleri, tümörün oluşumuna ve ilerlemesine ayrıca yardımcı olmaktadır (69, 98).

Uyarıcı türüne ve uyarıcının etki süresine bağlı olarak hücreler apoptotik ya da nekrotik ölüme gidebilmektedirler. Düşük düzeylerdeki ısı, radyasyon, hipoksi ya da kimyasallara maruz kalma gibi uyarıcılar hücrelerde apoptoz yolaklarını aktiflerken aynı etkenlerin yüksek seviyeleri hücreleri nekroza sürüklemektedir (99). Apoptoz fizyolojik bir ölüm türü iken nekroz patolojik bir ölüm türü olarak kabul edilmektedir. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri arasındaki temel farklar Tablo 6'da özetlenmiştir. Nekrotik ölümden

mitokondri fonksiyonu değişirken nukleus değişimleri minimum seviyededir. Nekrotik ölüm sürecinde organellerin çözünmesi, hücre membranının seçici geçirgenliğini kaybetmesi ve hücre içeriğinin ortama salınması gibi olaylar meydana gelmektedir. Lizozomların parçalanmasıyla serbestleşen hidrolazlar çevredeki hücrelere zarar verebilmekte bu da kuvvetli bir inflamasyon oluşturmaktadır (66).

Tablo 6. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri arasındaki temel farklar (Solakoğlu’ndan, 100).

	Apoptoz	Nekroz
Tetikleyen Mekanizmalar	Hücre dışından (TNF α , Ani toksik etki sonucu zar büyüme faktör eksikliği, geçirgenliğinin çok büyük ölçüde antikanserojen ilaçlar, oksidatif bozulması stres, DNA hasarı)	
	Hücre içinden (mitokondri, ER)	
Biyokimyasal Değişimler	Hücre içinde proteolitik enzimlerin aktivasyonu, hücre içi proteinlerin ve DNA’nın yıkımı (kaspaz ve DNAaz aktivasyonu)	Hücrede çok hızlı bir enerji yetmezliği ya da toksik etki sonucu zar geçirgenliğin hızla artmasıyla osmotik dengenin bozulması, hücrenin patlaması
Morfolojik Özellikler	Küçülme, çekirdekte kromatin yoğunlaşması, tomurcuklanmayla apoptotik cisimlerin oluşması, komşu hücreler tarafından fagosit edilme	Şişme, hücre geçirgenliğinin hızla artması ve blebleşme, hücre içeriğinin dış ortama dağılması
Sonuçları	Apoptoza uğrayan hücrenin inflamasyon oluşturmada ortamdan temizlenmesi	Hücre içi maddelerin dağılmasıyla oluşan inflamasyon

Programlı hücre ölüm türü olan apoptoz iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada çeşitli biyokimyasal mediyatörler hücreye hasarını tamir edebilmesi fırsatını vermektedirler. Eğer hücreler hasarı onarmada başarısız olurlarsa "infaz evresi" adı verilen ikinci aşamaya geçilmektedir ve bu aşamada hücreyi kontrollü bir şekilde ölüme götürecek yapısal değişiklikler (nükleer, membransal ve organel) meydana gelmektedir. Nükleer değişimler kromatin ve nükleus membranında görülmektedir. Kromatin yapısı yoğunlaşmakta ve kromatinler nükleer membrana doğru yönelmektedir. Nükleer membran bütünlüğü korunsun bile nükleer por komplekslerinin oluşumu ve nükleer proteinlerin miktarı yeniden düzenlenmektedir. Hücre membranı deforme olmakta ve dışa doğru çıkıntı yapmaktadır. ER ve mitokondri yapısal özelliklerini zamanla kaybetmekte ve mitokondriyal membran potansiyeli azalmaktadır. ER'de sisternalar genişlemekte ve birleşmektedirler. Hücre membranındaki fosfolipid düzeni değişmekte, hücrenin sitoplazmik kalıntılarının çevreye zarar vermemesi için membran kalıntıları ile sarılmaktadır (66). Fosfatidilserinin dış yaprağa çıkması apoptoza giden bir hücreden oluşan apoptotik cisimlerin makrofajlar tarafından temizlenmesi için "beni ye" sinyalinin oluşması anlamına gelmektedir (101). Apoptoz gerçekleştikten sonra hücreden arta kalan apoptotik cisimleri komşu hücreler ya da immün hücreleri tarafından fagositoz yoluyla alınmakta, böylelikle inflamasyon oluşmamaktadır. Apoptoz; oldukça sıkı bir şekilde düzenlenen ve pek çok faktörün devreye girdiği bir süreçtir. Hücreler hayatta kalmaları ya da ölmelerine karar verecek içsel sinyalizasyon ağlarına sahiptirler. Bu sinyalizasyondaki bir kusur normal hücreleri de apoptoza yönlendirebilmektedir (66). Apoptozun artması veya azalmasıyla karakterize hastalıkların özeti Tablo 7'de verilmiştir.

Apoptotik hücrelerin DNA'larında, 180 baz çiftinde bir görülen internükleozomal kromatin kesilmesinin sonucu olarak klasik merdiven görüntüsü oluşmaktadır. Bu görüntü apoptozun varlığı için karakteristiktir. Hücreler apoptoza giderken aktif bölgelerinde sistein içeren ve hedef proteinleri komşu aspartik asit rezidülerinden kesen "kaspaz" adı verilen enzim ailesi kaskad şeklinde aktive olmaktadır (98). Zimojen formda sentezlenen kaspazlar apoptoz aşamasının erken döneminde aktive olmaktadır. Apoptoz süresince hücrenin sitoskelet elemanları ve DNA tamir enzimleri kaspazların ana substratlarını oluşturmaktadır. Bugüne kadar kaspaz ailesinin 14 üyesi tanımlanmıştır. 2, 8, 9, 10 başlatıcı kaspazlar; 3, 6, 7 efektör kaspazlar ve 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14 ise inflamasyon kaspazları olarak sınıflandırılmaktadırlar (1).

Tablo 7. Apoptoz ile ilişkili hastalıklar (Tomatır’dan, 102).

Apoptozun artmasıyla ilgili hastalıklar	Apoptozun azalmasıyla ilgili hastalıklar
1. Nörodejenaratif bozukluklar	1. Kanser
Alzheimer hastalığı	Blastoma
Amyotrofik lateral skleroz	Karsinoma
Creutzfeld-Jakob hastalığı	Lösemi
Huntington hastalığı	Lenfoma
Parkinson hastalığı	Sarkoma
2. Hematolojik bozukluklar	2. Premalign hastalıklar
Aplastik anemi	Ataksi Telenjektazi
Fanconi anemisi	Kseroderma Pigmentosum
Hodgkin hastalığı	Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri
3. Otoimmün bozukluklar	3. Otoimmün bozukluklar
Fulminant hepatit	Otoimmün lenfoproliferatif sendrom
Hashimoto tiroiditi	Sistemik lupus eritematozus
Multiple skleroz	4. Ateroskleroz
Romatoid artrit	5. Metabolik bozukluklar
Skleroderma	Niemann-Pick hastalığı
Sjögren sendromu	Osteoporoz
4. İskemik yaralanma	Wilson hastalığı
Böbrek enfarktüsü	6. Viral enfeksiyonlar
Miyokardiyal enfarktüs	Adenovirüs
İnme	Bakulovirüs
5. Toksinlere bağlı hastalıklar	Epstein-Barr virüsü
Alkole bağlı hepatit	Herpes virüsü
Pulmonar fibrozis	Poks virüsü
Sepsis	
6. Bakteriyal ve viral enfeksiyonlar	
AIDS	
Ebola virüsü	
Helikobakter pilori	
Salmonella typhimurium	

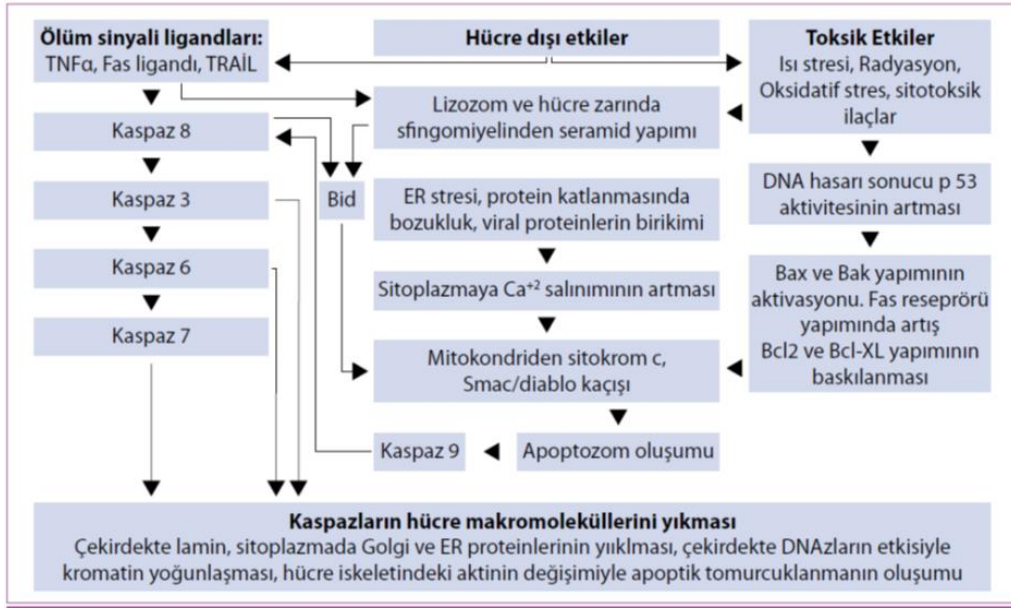
4.5.3.1 Apoptoz Yolakları

Kaspazları aktifleyerek apoptozu gerçekleştiren üç ana yolak olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar; intrinsik yolak (mitokondriyal), ekstrinsik yolak (ölüm reseptörlerine bağlı) ve tam olarak aydınlatılamamış ER stresi bağımlı yolaklardır (66).

Reseptör bağımlı dış apoptoz yolağında; TNF (Tumor necrosis factor), CD95 (Cluster of differentiation 95) ya da TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) gibi hücre ölüm reseptörlerinin, doğal ligandları ya da agonist özellik gösteren diğer uyarıcılarla aktifleşmesiyle oluşan reseptör dimerizasyonunu takiben FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) ve kaspaz-8 aktiflenmektedir. Kaspaz 8 doğrudan efektör kaspaz olan kaspaz 3'ü aktiflemekte ve alternatif olarak Bid (BH3 interacting-domain death agonist) proteinini tBid (Truncated Bid) haline çevirmektedir. Bid; Bcl-2 ailesinden bir protein olup, tBid formu mitokondriye geçerek membran geçirgenliğini azaltan mekanizmaları düzenleyebilmektedir. Bundan dolayı Bid proteinin mitokondri ile reseptöre bağlı dış apoptoz yolağı arasında bağlantı kurduğu düşünülmektedir.

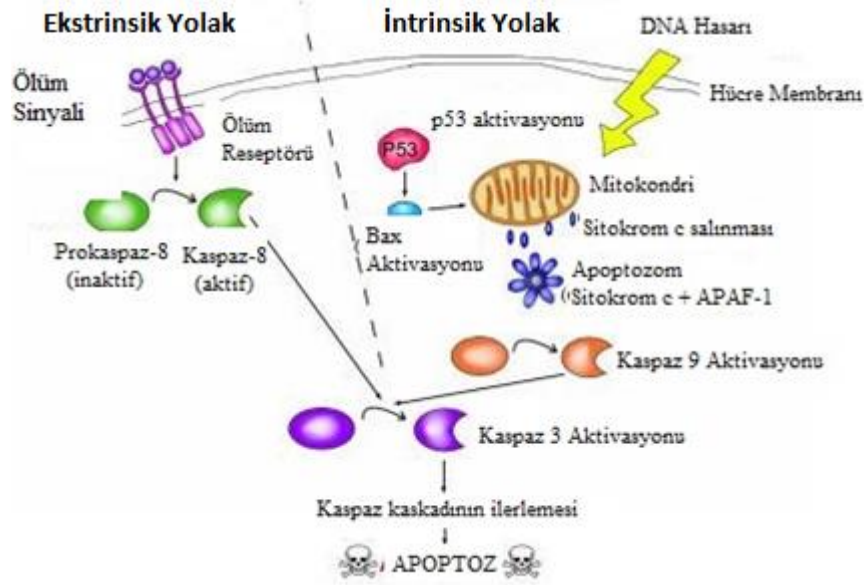
Mitokondri aracılıklı intrinsik yolağın aktiflendikten sonra geri dönüşünün olmadığı gösterilmiştir. Mitokondri membranlar arası bölge proteinlerinden sitokrom c, Smac (Second mitochondria-derived activator of caspases), Diablo (Direct IAP-Binding protein with Low PI) gibi proteinlerin sitozole çıkışı efektör kaspazların aktiflenmesi ile sonuçlanmaktadır. Özellikle sitozole çıkan sitokrom c'nin, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) ve kaspaz 9 ile oluşturduğu apoptozom kompleksi kaspaz 3'ü aktiflemektedir. Smac ve Diablo proteinleri ise apoptoz inhibitör proteinlerine (IAP) bağlanarak onları etkisiz hale getirmekte, bu durum kaspaz 9, 7 ve 3 aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. IAP proteinleri endojen kaspaz inhibitörleri olup XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivin and ML-IAP (melanoma inhibitor of apoptosis) gibi üyeleri içermektedir (5). İç ve dış apoptoz yolaklarının biyokimyasal özeti Şekil 5'de verilmiştir.

Tumor protein 53 (p53) farklılaşma ile ilişkili protein olarak 1979 yılında keşfedilmiştir. İlerleyen yıllarda yapılan araştırmalar p53'ün hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri, hücre farklılaşması, hücre yaşlanması, genom kararlılığı, apoptoz, otofaji gibi yolaklarda da görevli olduğunu ortaya koymuş ve p53 en önemli tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilmiştir (101).



Şekil 5. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yollarının biyokimyasal özeti (Solakoğlu'ndan, 100).

p53'ün insanlarda ve hayvanlarda apoptozun en önemli regülatörü olduğu ileri sürülmekte ve bu transkripsiyon faktörü "genomun gardiyanı" (guardian of genome) olarak tarif edilmektedir. p53 eksikliğinin ya da mutasyonunun doğrudan kansere yatkınlığı ortaya çıkarması p53'ün tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilmesine neden olmuştur (98). Nükleer p53; Mdm2 (Murin double minute 2) geninin ekspresyonunu arttırmakta, Mdm2 ise sürekli p53'e bağlanarak onun ubiquitin ile işaretlenmesini ve proteazomlarda yıkılmasını sağlayan p53'ün negatif regülatörü olarak iş görmektedir. DNA hasarı gibi hücresel sinyal yollarının aktiflendiği durumlar p53 ile Mdm2 etkileşimini bozmakta, sitoplazma ve nukleustaki serbest p53 miktarı artmaktadır. Ayrıca p53'ün; antiapoptotik Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large)'yi DNA bağlama domaini ile bağlayarak inaktive ettiği, proapoptotik Bax (Bcl-2-associated X protein) proteini ile etkileşerek onu aktive ettiği böylece mitokondri bağımlı apoptoz yolağının aktiflenmesinde de görev aldığı ortaya konulmuştur. Üstelik yine onkogen artışı, DNA hasarı ya da diğer stres durumlarında aktif hale geçen p53'ün Bax, Noxa (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), Bid, Apaf-1 ve PIDD1 (p53-induced death domain protein 1) gibi proapoptotik proteinlerin ekspresyonlarını da arttırarak hücrelerin apoptoza yönlendirilmesini sağladığı ortaya konulmuştur (101). İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları Şekil 6'da şematize edilmiştir.



Şekil 6. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları (Fernald'dan, 103).

4.6. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER); özellikle hücre içi Ca^{2+} düzeyinin dengede tutulması başta olmak üzere sentez, katlanma, translasyon sonrası modifikasyon, salgılanma gibi fonksiyonel protein oluşumunun temel kademelerinde olduğu kadar kas kasılması-gevşemesi, lipid sentezi, hücre döngüsü ve apoptoz gibi olaylarla da ilişkili olduğu belirlenmiş, tübüler ağıyla oldukça dinamik fonksiyonları yerine getiren hayati bir hücre organelidir. Bu kadar çok metabolik işlevle alakası olan ER lümeni bu nedenle çok sayıda fonksiyonel proteine ev sahipliği yapmaktadır (104, 105). ER protein konsantrasyonu oldukça yüksek bir organel olup (~ 2 mM) yeni sentezlenen proteinlerin olgun hale getirilmesi ER aktivitesine bağlıdır (106).

Endoplazmik retikulum lümeninde optimum protein katlanmasının gerçekleşmesi için ATP ve Ca^{2+} gibi bileşenlere ayrıca disülfid bağlarının oluşumu için yükseltgen bir ortama ihtiyaç vardır. Hücresel enerji şartlarının, redoks durumunun ya da kalsiyum seviyesinin fizyolojik koşulların dışına çıkmasıyla ER'nin protein katlayabilme kapasitesi azalmaktadır. Bu durumda proteinlerin yanlış katlanması ve transport edilememesine bağlı olarak ER lümeninde protein birikmesi "ER Stresi" adı verilen tabloyu ortaya çıkarmaktadır (107).

ER stresinin indüklenmesi, hücrede "katlanamayan protein cevabı" (unfolding protein response-UPR) adı verilen adaptasyon mekanizmalarını harekete geçirmektedir.

Ökaryotik hücrelerde ER stresini ortadan kaldırmaya yönelik üç farklı cevap mekanizmasının olduğu ileri sürülmektedir; a) Doğru katlanamayan proteinlerin birikimini azaltmak için translasyonun sınırlandırılması, b) ER’de bulunan ve protein katlanmasına yardımcı olan BiP/GRP78 (Binding immunoglobulin protein/78 kDa glucose-regulated protein) ve GRP94 (94 kDa glucose-regulated protein) gibi şaperon proteinlerin transkripsiyonel aktivasyonu, c) ER’de biriken yanlış katlanmış proteinlerin ERAD (Endoplazmik retikulum ilişkili protein degradasyonu) ile ortadan kaldırılmasının hızlanması (108). UPR ile protein katlandırma hızı artırılarak lümende biriken katlanamayan protein miktarı dolayısıyla ER stresi azaltılmaya çalışılmaktadır. Bununla birlikte uzamış veya geri döndürülemeyen ER hasarı durumunda hücreler apoptoza yönlendirilmektedir. Bundan dolayı, ER stresi durumunda hücrenin hayatta kalmaya devam etme veya apoptoza gitme seçeneklerine yönelmesinde oldukça ince bir çizginin olduğu düşünülmektedir (105).

4.6.1. Endoplazmik Retikulum Stresi, CHOP Proteini ve Apoptoz

C/EBP homolog protein (CHOP) diğer adıyla GADD 153 (Growth arrest and DNA damage inducible protein 153) proteini, C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) transkripsiyon ailesinin üyesi olup, 29 kDa ağırlığında ve 169 amino asit rezidüsüne sahip bir proteindir (109). ER stresi ile artan apoptozda görevli olduğu belirlenen CHOP proteini ile ilk bilgiler 1996 yılına aittir. Fizyolojik koşullarda oldukça düşük seviyelerdeki CHOP ekspresyonu, artan ER stresi ile birlikte hızla artmaktadır. Aşırı CHOP ekspresyonunun hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz gibi sinyal yollarını aktifleyebildiği, CHOP eksikliğinin hücreleri bu yollardan mahrum bıraktığı belirlenmiştir (108).

Hücrede ER stresini algılayan en azından üç farklı sensör proteinin varlığından bahsedilmektedir; ATF-6 (Activating transcription factor 6), PERK (Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase) ve IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1). Hücre dinlenim halindeyken bu üç ER stres reseptörü de GRP78 ve diğer ER şaperonları ile etkileşim halinde olup, inaktif haldedirler. Stres süresinin veya şiddetinin artmasına bağlı olarak katlanamayan proteinler biriktikçe GRP78’in bu proteinlerden ayrılması UPR cevabına neden olmaktadır. UPR cevabına rağmen stres azaltılamazsa ya da protein agregasyonu kalıcı hale gelmişse proapoptotik yollar aktif hale geçmektedir. Hücre dinlenme halindeyken Bax ve Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) gibi proapoptotik proteinler

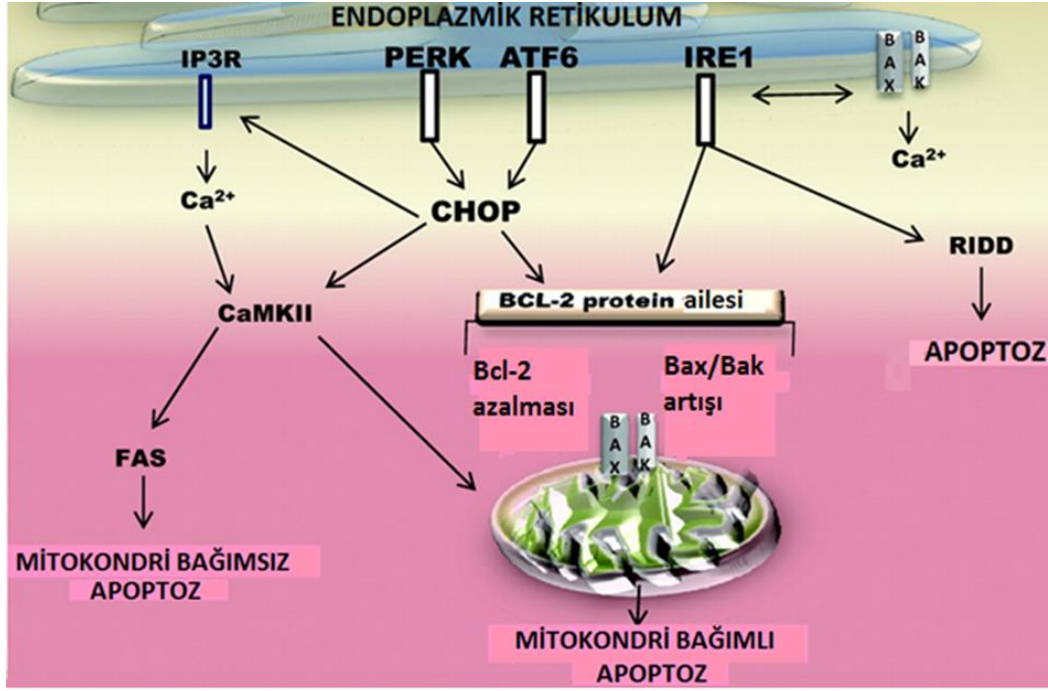
Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinler tarafından mitokondride olduğu gibi ER’de de inaktif halde tutulmaktadırlar. Bim proteini ise sitoskelet elemanlarından dynein ile etkileşim halinde ve inaktif konumdadır (66). Algılanan ER stresi sonucu PERK aktiflenerek öncelikle hücrenin sağ kalımını sağlayacak sinyal yollarını aktiflemeye çalışır. Uzamış ve geri döndürülemeyen ER stresi durumunda ise PERK ve ATF-4, programlı hücre ölümüne neden olacak proapoptotik proteinlerin (Bim, Puma, Noxa, Bax gibi) aktiflenmesini sağlayan CHOP ekspresyonunu arttırmaya çalışmaktadırlar (105). Sadece gen ifadesi olarak değil aynı zamanda p38 MAPK tarafından 78 ve 81. serin rezidülerinin fosforilasyonu gibi translasyon sonrası modifikasyonlar da CHOP aktivitesinin artmasına neden olabildiği bildirilmektedir (107).

CHOP proteininin özellikle antiapoptotik Bcl-2 proteinini azaltarak, Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinleri arttırarak mitokondri bağımlı apoptoza yatkınlık yarattığı bildirilmektedir. Ayrıca artmış CHOP ekspresyonunun ERO1 α (ER oksidase 1 α) aktivitesini indükleyerek ER içi ROS miktarını arttırıp, glutatyon düzeyini düşürdüğü de ortaya konmuştur. Bunlara ilaveten CHOP artışına paralel olarak artan ERO1 α aktivitesinin IP3R (Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) aktivasyonuna neden olabildiği, bunun sonucu ER’den sitozole Ca²⁺ salınımının artabildiği, böylece Ca²⁺ ile aktiflenen kalpain ve katepsin gibi proteazların fonksiyonel hale gelmesiyle apoptozdan başka nekroptoz gibi diğer kontrollü hücre ölüm yollarının da aktiflenebildiği ileri sürülmektedir. Bu ölüm yolağı mitokondriden bağımsız ER stresi bağımlı yolak olarak tarif edilmektedir (105). ER stresi kaynaklı apoptoz yolları Şekil 7’de gösterilmiştir.

4.6.2. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Kanser

Tümör hücreleri; düşük oksijen saturasyonu, zayıf damarlanma ağı, besin maddelerinin azlığı ve asidik pH gibi ER stresini arttırıcı etkenlerin olduğu bir mikro çevre içerisinde. Bu sebeple tümör hücrelerinde ER stresine cevaben hücre sağ kalımını sağlayacak mekanizmalar kronik bir şekilde sürekli aktiftir (109). Normal hücrelerin aksine; çoğu kanserli hücrede bozulan sinyalizasyona bağlı olarak sağ kalım yollarını aktiveleyen ve bu özelliği ile CHOP proteinin tersi işlev gören GRP78’in aşırı ifadesinin olduğu bildirilmektedir. Hatta, artmış GRP78 miktarının kanser hücrelerini paklitaksel, doksorubisin ve temozolomid gibi antikanser ilaçların sitotoksitelerine karşı koruduğu *in vitro* çalışmalarla gösterilmektedir. Bundan dolayı kanser hücrelerinde CHOP artışını

ve/veya GRP78 azalmasını sağlayabilmek ER stresi-kanser çalışmaları hedef mekanizma haline gelmektedir (110).



Şekil 7. Endoplazmik retikulum stresi kaynaklı apoptoz yolları (Scull'dan, 111).

4.7. Sitotoksosite Testleri

Hücre canlılığının, proliferasyon hızının ve sitotoksitenin belirlenebilmesi için pek çok yöntem geliştirilmiş olup, günümüz gereksinimlerine uygun şekilde bu yöntemler 96 kuyucuklu hücre kültür pleytlerine adapte edilmişlerdir. Böylelikle çok sayıda örneğin hızlıca analizi mümkün hale getirilmiştir. Sitotoksosite testleri genellikle kolorimetrik ya da lüminometrik ölçüm temelli yöntemlerdir (112). Hücre sayımında kullanılan klasik yöntem, mikroskop altında sayım için hazırlanmış bir lam (hematositometre) ile ölü-canlı hücre ayrımını sağlayacak olan bir boyanın (tripan blue) kombine kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Günümüzde ise elektronik sayıcı ünitelere sahip, özellikle kümeleşmeyen hücreler için tasarlanmış otomatik cihazlar kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra organel canlılığını esas alan yöntemler de geliştirilmiştir.

Mikroskop yardımıyla yapılan sitotoksosite analizlerinde tripan blue yöntemi kullanılabilir. Burada hematositometre lamı olarak Neubauer lamı yaygın bir kullanıma sahiptir. Hücre solüsyonu tripan blue boyasıyla karıştırılınca canlı hücreler küçük ve

yuvarlak halde kalırken, ölü hücreler Na^+/K^+ ATPaz'ın işlevsizliği nedeniyle hücre içinde biriken K^+ dan dolayı şişkin, büyümüş ve koyu mavi olarak görülürler.

MTT yöntemi ilk kez Mosmann tarafından 1983 yılında tanımlanmış olup hücre canlılığı, proliferasyonu ve aktivasyonu hakkında fikir verebilen hassas, kantitatif ve güvenilir bir kolorimetrik metottur. Yöntemin esası, yaşayan hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin kapasitelerine göre sarı renkli suda çözünebilen 3-(4,5-dimetil hidrazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür boyasını suda çözünmeyen koyu mavi formazan kristallerine dönüştürebilmesine dayanmaktadır. Üretilen formazan kristallerinin miktarı, çalışılan hücre serisinin canlılığı ile doğrudan orantılı olmaktadır.

Nötral red (3-amino-7-dimetil-2-metilfenazin hidroklorür) yöntemi; *in vitro* hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla tasarlanmış, yıllar içerisinde modifiye edilerek *in vitro* sitotoksosite çalışmalarında da kullanılabilir hale getirilmiştir. Nötral red suda çözünebilen, zayıf bazik karakterde, supravital bir boyadır ve canlı hücrelerin lizozomlarında birikebilmektedir. Boyanın hücrelere girişi pasif transport ile gerçekleşmektedir. Hasarlı ya da ölü hücreler lizozoma giren nötral red boyasını sitoplazmik vakuollerde daha fazla tutamamakta ve plazma membranı da boyanın hücre içerisinde kalmasını sağlayacak bir bariyer görevi görememektedir.

LDH yönteminin esası pirüvatın laktata indirgenmesini sağlayan laktat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.27) enziminin aktivitesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu indirgenme NADH'nin NAD^+ 'ya oksidasyonu eşliğinde 340 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmektedir (113).

Son yıllarda hücrenin metabolik olarak aktif olabilmesinin ön koşulunun ATP olduğundan yola çıkılarak biyoluminesans temelli ATP yöntemi de sitotoksosite çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Metod, lüsiferaz enzim aktivitesine bağlı olup enzim; ATP ve lüsiferinden ışık oluşturmaktadır. Reaksiyon sonucu elde edilen ışımaya ATP miktarıyla dolayısıyla canlı hücre sayısı ile orantılı olmaktadır (112).

4.8. Flow Sitometri

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Flow sitometri; tek tek hücrelerin veya diğer biyolojik örneklerin bir alıcı cihaz tarafından bir sıvı içerisinde, tek sıra halinde alınarak bu hücrelerin veya partiküllerin fiziksel veya kimyasal özelliklerinin ölçüldüğü bir yöntemdir

(114, 115). Flow sitometri cihazı başlıca; akış (sıvı) sistemi, ışık kaynağı (lazer ışını), filtreler ve sinyal dedektörleri, bilgisayar ve yazılım programları ile ayırma mekanizması (cell sorting) bileşenlerinden oluşmaktadır. Flow sitometri tekniğinde hücreler, sıvının içerisinde bir ışık demetinin önünden tek tek geçirilmektedirler. Bu sırada hücreler hakkında elde edilen veriler grafik haline getirilmekte, istatistiksel analiz uygulanmakta ve yorumlanmaktadır (115).

Hücreler lazer ışını önünden geçerlerken muhtemelen iki olay meydana gelmektedir. İlk olay ışığın yayılmasıdır. Işık kaynağına paralel olarak yayılan ışınlar hücrenin çapı, lazer ışınına 90 derece açı ile yayılan ışınlar hücrenin granülaritesi ve iç yapısı hakkında fikir vermektedir. İkinci olay örnek önceden florokromlarla boyandığında oluşmaktadır. Florokromlar lazer ışığından enerji absorbe ederler ve onu daha düşük bir enerji fakat daha uzun bir dalga boyunda yeniden dışarı verirler. Dışarı verilen ışının miktarı hücrelerde tutulan florokrom miktarıyla orantılıdır (114).

Flow sitometri yöntemi özellikle son yıllarda biyokimya, immunoloji, hematoloji, onkoloji, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, parazitoloji, enfeksiyon, yardımcı üreme teknikleri, patoloji, radyasyon onkolojisi, enfeksiyon hastalıkları, bitki biyolojisi ve deniz biyolojisi alanlarında klinik ve araştırma laboratuvarlarında sıklıkla tercih edilmektedir (115).

4.8.1. Flow Sitometri ile DNA Analizi

Flow sitometrik DNA analizi hızlı ve güvenilir olduğu için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Hücre bölünmesine gitmeden önce proliferen olan hücreler değişik evrelerden geçmektedirler. G₁ evresinde hücreler RNA ve protein sentezlerini gerçekleştirmektedirler. S evresinde DNA sentezi yapılmakta ve bu evrenin sonunda hücresel DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. G₂ evresi, S evresinden sonra gelen hücre bölünmesinden önceki RNA ve protein sentezinin gerçekleştiği evredir. M evresi en kısa evre olup bu evredeki DNA miktarı G₂ evresi ile aynıdır. Hücrelerin DNA içeriğinin flow sitometrik analizinde çoğunlukla floresans boyalar kullanılmakta ve bu boya hücrelerin DNA'sına bağlanmaktadır. DNA'ya bağlanan boyanın miktarı her bir hücredeki toplam DNA miktarı ile orantılıdır. Propidyum iyodür, etidyum bromür ve akridin oranj en sık kullanılan DNA boyalarıdır (114).

4.9. Apoptoz Tayininde Kullanılan Yöntemler

Apoptoz, sadece hücre sayısı ve doku büyüklüğünü kontrol altında tutan bir mekanizma olmayıp; hasarlı, enfekte veya aşırı strese maruz kalmış hücrelerin organizmadan eliminasyonu için de oldukça önemli bir süreçtir (116). Günümüzde apoptozun nitel ve nicel olarak incelenmesinde:

- Morfolojik görüntüleme (Işık, floresan, faz kontrast veya elektron mikroskopisi)
- İmmünohistokimyasal (Anneksin V-FITC, TUNEL, M30 antijen veya kaspaz 3 deteksiyonu)
- Biyokimyasal (DNA-protein bazlı elektroforez veya akım sitometrisi bazlı metotlar)
- İmmünolojik (ELISA) ve moleküler biyoloji (Array-bazlı teknikler)

gibi tekniklerin ön plana çıktığı görülmektedir. Kullanılacak yöntemlerin seçiminde örnek türü ve deney kurgusunun önem taşıdığı vurgulanmaktadır (117). Mikroskobik tekniklere apoptozun varlığının gösterilmesi amacıyla başvurulmasına rağmen, apoptotik cisimcikler makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından ortadan kaldırıldığı için apoptozun sayısal olarak ifade edilmesinde bu yöntemler yetersiz kalmaktadırlar (66). DNA ladder yöntemi apoptozu belirlemede sıklıkla kullanılmasına rağmen sensitivitesinin düşük olduğu kabul edilmektedir. Çünkü DNA fragmentasyonu ancak geç apoptotik dönemde oluştuğu ve görüntülediği için erken apoptoz evresi hakkında fikir sahibi olunamamaktadır (116). Anneksin V; fosfolipid bağlayıcı anneksin protein ailesinin bir üyesi olup negatif yüklü fosfolipidlerden fosfatidilserine (PS) yüksek ilgiyle, fosfatidilkoline (PC) ise çok daha az ilgiyle bağlanmaktadır. Sağlıklı hücrelerde PS hücre membranının iç yaprağında bulunurken, proapoptotik uyarıcıların etkisiyle PS hızlıca hücre membranı dış yaprağına taşınmakta ve bu durumun bakterilerden memelilere kadar oldukça iyi korunmuş evrimsel bir mekanizma olduğu ileri sürülmektedir. Apoptoz sürecinde PS'nin bu yeniden düzenlenme mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte olayın polikaspaz inhibitörü olan Z-VAD-FMK varlığında olmaması sürecin kaspazlarla bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir. Analizlerde FITC işaretli anneksin V ve canlılığın tespiti için propidyum iyodür (PI) kombine boyaları kullanılmaktadır. Apoptotik hücreler anneksin V ile boyanıp PI ile boyanmazlarken apoptoz süreci uzadıkça bu hücrelerde de PI alınımı gözlelenebilmektedir (97). Apoptozun en önemli aktörlerinden kaspazların aktivitelerinin ortaya konulması da başka bir yaklaşımdır (66).

Apoptozun belirlenmesinde pek çok spektroskopik yöntem kullanılmakta ve bunlar genellikle floresans ölçümüne dayanmaktadır. Florometrik probalar apoptozun erken indikatörleri olarak membran potansiyelini belirlemede uzun yıllardır kullanılmaktadırlar. Membran potansiyelindeki azalma sonucu, mitokondri geçici geçirgenlik porunun açılması ve bunu takiben sitokrom c'nin sitozole çıkışı intrinsik apoptoz yolağının işlediğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. JC-1, rhodamine 123 ve mitotracker red gibi floresans boyalar mitokondri membran potansiyelindeki değişimleri flow sitometrik olarak belirlemede sıklıkla kullanılmaktadırlar (116).

4.10. Real-Time PCR

Real-time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu), DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Bilim ve tıp alanındaki çalışmalarda, nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniğin real-time PCR olduğu ortaya konulmuştur. Bu teknik 80'li yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PCR'ın ileri bir versiyonudur. Klasik PCR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini, çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte, işlem sonrasında da ürün miktarını net olarak belirlemek oldukça güç hale gelmektedir. Çünkü klasik PCR başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız bir ürün miktarını ortaya çıkarmaktadır. Higuchi ve arkadaşları 1992 yılında real-time PCR'ı geliştirmişlerdir. Real-time PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünün miktarını real-time PCR sırasında gözlemek mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi real-time PCR'yi özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkan reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü floresans işaretli probalar ile sağlanmaktadır (118, 119).

Son zamanlarda bilimsel araştırmalar için kullanılan gen ekspresyon çalışmalarında kantitatif real-time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilmekte ve gen ekspresyon seviyeleri hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Real-time PCR ile elde edilen veriler mutlak kantitasyon (absolute quantification) veya göreceli kantitasyon (relative quantification) analiz teknikleri ile değerlendirilmektedir. mRNA ekspresyon

alışmalarında ise sıklıkla göreceli kantitasyon kullanılmaktadır. Bu teknikte aynı örneğe ait iki farklı hedef genin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılır ve sonuç bu hedeflerin oranı olarak ifade edilir. Karşılaştırma amacıyla kullanılan ikinci gen ekspresyonu "referans gen" olarak isimlendirilir ve tüm deney şartlarında değişmez miktarda eksprese olduğu kabul edilir. Bu referans gen internal kontrol olarak da bilinir ve örnekten örneğe olan farklılıkların değişiminin normalizasyonu için kullanılır. İlgilenilen genin deney gruplarının ekspresyon seviyeleri muamelesiz grup (negatif kontrol) ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak rölatif olarak ifade edilir. Böylelikle rölatif kantitasyon kullanıcılara, bir hedef genin en az iki farklı durumdaki ekspresyon profilini kolayca karşılaştırmalarına olanak sağlar. Rölatif kantifikasyon gen ekspresyonunun belirlenmesinde en iyi teknik olarak kabul edilmektedir (120).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Marka / Model
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
Ters faz mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO ₂ inkübatörü	Thermo Forma 381
Santrifüj	Eppendorf 5804
Derin donduruculu buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	Altus
Derin dondurucu (-80 °C)	Thermo Electron Corporation
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Etüv (37 °C)	Heraeus
Çalkalayıcılı inkübatör	ShellLab/Sheldon S14-2
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV
Manyetik karıştırıcı	Termal
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Vorteks	IKA Genius 3
Mikropleyt okuyucu	SpectraMax Paradigm Multi-Mode
Flow sitometri	BD FACSCalibur
Mikro hacimli spektrofotometre	Thermo Nanodrop 2000
Real-Time PCR cihazı	Roche LightCycler 480 II
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Pipet pompası	JetPip Pipette Aid
Çalkalayıcılı ısı bloğu	Eppendorf Thermo Mixer Comfort
Mikrosantrifüj	Thermo IEC Micromax
PCR cihazı	Applied Biosystems GeneAmp9700
Laboratuvar değirmeni	Retsch ZM 200
Azot tankı	StateBourne Biorack 750

Tablo 8. Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri (Devamı)

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Marka / Model
Membran filtreleri (0.2 µm)	Sartorius Stedim Minisart
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	Corning ve Greiner
15 ve 50 mL hacimli steril falkon tüpler	Greiner ve LP Italiana SPA
Steril 96 kuyucuklu hücre kültür pleytleri	Corning ve Nunclon
Neubauer lamı ve lameli	Marienfeld
Çeşitli cam malzemeler	Isolab
5, 10 ve 25 mL hacimli steril serolojik pipetler	Greiner ve Corning
3 mL hacimli steril pastör pipetleri	LP Italiana SPA
Çeşitli hacimlerde (0.1-1000 µL) steril pipet uçları	Axygen
0.5 ve 1.5 mL hacimli kapaklı tüpler	Greiner

5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları, ürün kodları ve varsa özel saflık dereceleri Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri ve üretici firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma, Kodu ve Saflığı
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	Sigma, 34870
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Lancaster, 13098
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma, F9252
Gallik asit	Sigma, G7384
Alüminyum nitrat nonahidrat (Al(NO ₃) ₃ .9H ₂ O)	Fluka, 06274
Potasyum asetat (KCH ₃ COO)	Merck, K32043020
Kuersetin dihidrat	Fluka, 83370
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	Merck, K1305445
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Merck, K16290176
Potasyum hekzasiyanoferrat (III) (K ₃ Fe(CN) ₆)	Lancaster, 13746-66-2

Tablo 9. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri ve satın alındıkları firmalar (Devamı)

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma, Kodu ve Saflığı
Demir (III) klorür (FeCl ₃)	Sigma, F7134
Trikloro asetik asit (TCA)	ABCR, AB119247
Troloks	Fluka, 56510
Ham's F12 besiyeri	Lonza, BE12-615F
Eagle's minimal essential medium (EMEM) besiyeri	Lonza, BE12-611F
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom, S 0115
10000 Units/mL penisilin/10000 µg/mL streptomisin	Gibco, 15140-122
Phosphate buffered saline (PBS) tablet	Medicago, 09-2051-100
Trypsin/EDTA çözeltisi	BI, 03-053-1A
Trypan blue çözeltisi	Sigma, T8154
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, D2650 (steril)
Sisplatin	Sigma, P4394
DMSO	Amresco, 0231
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma, 516813
CM-H ₂ DCFDA probu	Invitrogen, C6827
Hücre siklusu (DNA content) analiz kiti	BD, 340242
FITC-Anneksin V apoptoz kiti	BD Pharmingen, 556547
Mitokondriyal membran potansiyeli analiz (JC-1) kiti	BD Mitoscreen, 551302
Kaspaz 3/7 lüminometrik aktivite kiti	Promega, G8090
RNA izolasyon kiti	Roche, 11828665001
cDNA sentez kiti	Roche, 04379012001
RT-PCR reaksiyon ortamı kiti	Roche, 04707494001
Real time ready GAPDH Assay, UPL probe	Roche, 143641
Real time ready CHOP Assay, UPL probe	Roche, 100355
[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT Boyası)	Sigma, M2128

5.3. Etanollü Propolis Ekstraktının Hazırlanması

Fanus Gıda tarafından, Trabzon ilinin çeşitli yörelerinden toplanarak tenin edilen ve buzdolabında -20 °C’de dondurulmuş olan doğal propolis ürünü rendelendi. Rendelenen propolis, laboratuvar değirmeninde toz haline getirildi ve çalışma sonuna kadar toz haliyle -20 °C’de saklandı. 0.5 g toz propolis tartılarak steril falkon tüpe alındı ve son hacim saf etanol ile 20 mL’ye tamamlandı. Karışım iyice vortekslendikten sonra 60 °C’de 150 rpm’de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra karışım 3000 g’de 10 dakika santrifüjlendi, süpernatantlar süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0.2 µm’lik steril filtrelerden geçirildi. Bu şekilde hazırlanan etanollü propolis ekstraktı, daha sonra kullanılmak üzere alikotlanıp -20 °C’de, karanlıkta saklandı (20, 27).

5.4. Etanollü Propolis Ekstraktının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan etanollü propolis ekstraktının antioksidan özellikleri; toplam polifenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeme gücü testleri kullanılarak belirlendi.

5.4.1. Toplam Polifenolik İçeriğin Belirlenmesi

Etanollü propolis ekstraktının toplam polifenol içeriği, modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Metod; fosfotungstik asidin ($H_3P[W_3O_{10}]_4$) bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Ölçülen absorbansın miktarı, fenolik grupların sayısı ile orantılıdır ve toplam polifenol içeriğinin ifade edilebilirliği için standart olarak gallik asit kullanılmaktadır (121, 122).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

% 20’lik Na_2CO_3 Çözeltisi: 10 g Na_2CO_3 tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 50 mL’ye tamamlandı.

1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi: 1 mL 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi, 9 mL saf su eklenerek 1:10 oranında seyreltildi. Tayin öncesi hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

Standartlar: 10 mg gallik asit 1 mL saf su ile çözülerek 10 000 µg/mL’lik gallik asit standardı elde edildi. Bundan 1000 µg/mL’lik standart hazırlanarak saf su ile çözülmüş 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ve 1.5625 µg/mL’lik gallik asit standartları seri dilüsyon ile oluşturuldu.

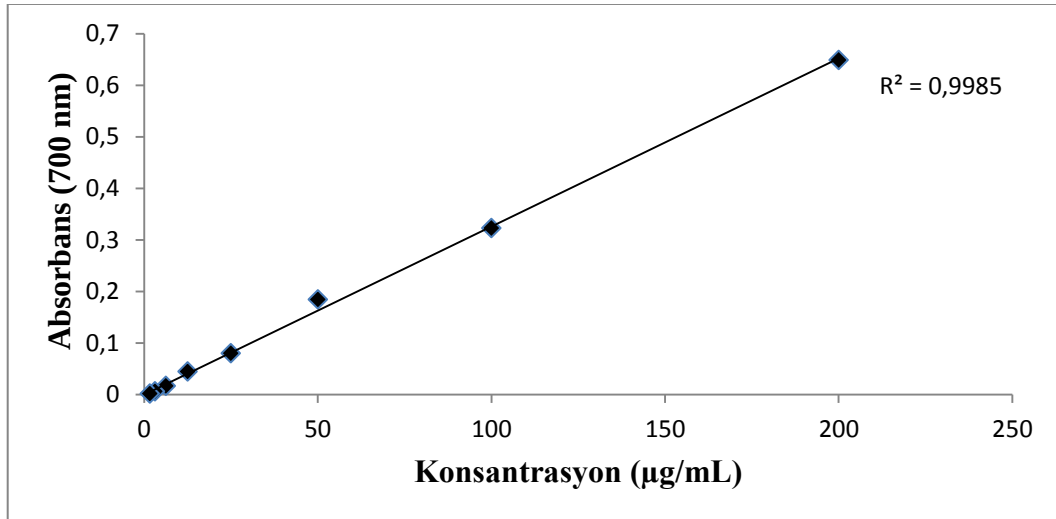
Deneyin Yapılışı

Propolis ekstraktı 1:50 oranında etanol ile seyreltildi. Tablo 10'daki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikroyuvarıpta yapıldı. Sonuçlar galik asit standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı (Şekil 8). Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı ($n=3$).

Tablo 10. Etanollü propolis ekstraktının toplam polifenolik içeriğinin belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Etanol	12.5 μL	-	-
Ekstrakt	-	12.5 μL	-
Standart	-	-	12.5 μL
1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi	62.5 μL	62.5 μL	62.5 μL
% 20'lik Na_2CO_3	125 μL	125 μL	125 μL

Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
700 nm'de mikroyuvarıpt okuyucuda absorbanans ölçüldü.



Şekil 8. Toplam polifenol içerik tayini için kullanılan galik asit standart grafiği

5.4.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Ekstraktın toplam flavonoid içeriği, alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlendi. Metodun prensibi, $AlCl_3$ 'ün flavon ve flavonollerin C-4 keto grubu, C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asitte kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır. Buna ek olarak $AlCl_3$, flavonoidlerin A- veya B- halkalarının orto-dihidroksil grupları ile de kompleks oluşturabilmektedir. Ölçülen absorbansın miktarı, flavonoid miktarıyla orantılıdır ve toplam flavonoid içeriğinin ifade edilebilirliği için standart olarak kuersetin kullanılmaktadır (122, 123).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

% 80'lik Etanol Çözeltisi: 80 mL'lik saf etanolün hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk $Al(NO_3)_3$ Çözeltisi: 2.5 g $Al(NO_3)_3$ tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

1 M KCH_3COO Çözeltisi: 2.454 g KCH_3COO tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

Standartlar: 10 mg kuersetin 800 μ L saf etanol ile çözülerek hacmi saf su ile 1000 μ L'ye tamamlandı ve böylelikle 10 000 μ g/mL' lik kuersetin standardı elde edildi. Bu ana stoktan 1:10 dilüsyon ile 1000 μ g/mL'lik standart hazırlanarak % 80'lik etanol ile çözülmüş 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ve 1.5625 μ g/mL'lik kuersetin standartları seri dilüsyon ile oluşturuldu.

Deneyin Yapılışı

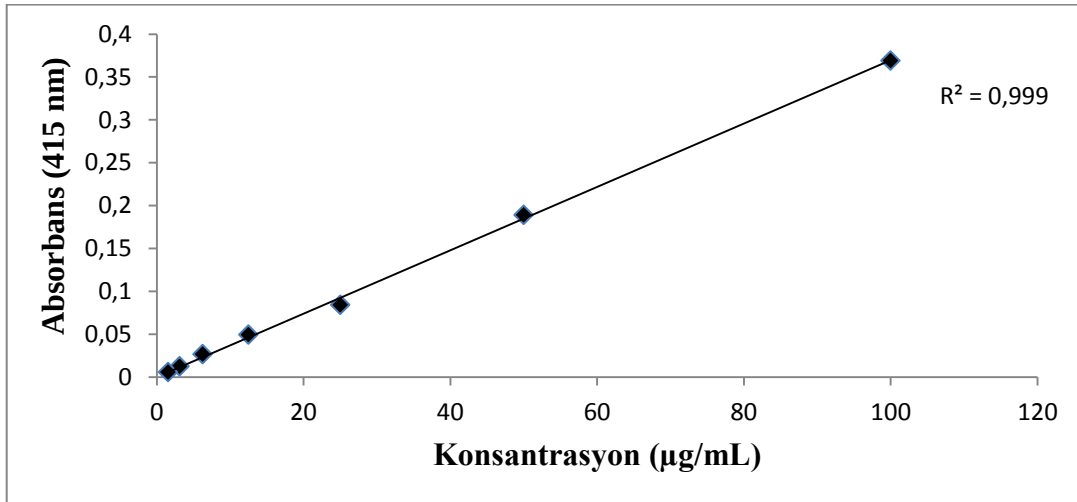
Propolis ekstraktı 1:20 oranında etanol ile seyreltilti. Tablo 11'deki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikropleytte yapıldı. Sonuçlar kuersetin standart grafiğinden yararlanılarak μ g/mL olarak hesaplandı (Şekil 9). Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).

Tablo 11. Etanollü propolis ekstraktının toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Etanol	20 µL	-	-
Ekstrakt	-	20 µL	-
Standart	-	-	20 µL
% 80'lik etanol	172 µL	172 µL	172 µL
% 10'luk Al(NO ₃) ₃	4 µL	4 µL	4 µL
1 M KCH ₃ COO	4 µL	4 µL	4 µL

Oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dakika inkübe edildi.

415 nm'de mikroyok okuyucuda absorbanst ölçüldü.

**Şekil 9.** Toplam flavonoid içerik tayini için kullanılan kuersetin standart grafiğı

5.4.3. Demir İndirgeyici Gücünün Belirlenmesi

Antioksidanlar gibi indirgen maddelerin varlığı, Fe⁺³-ferrisiyanür kompleksinin Fe⁺²'ye indirgenmesine neden olmaktadır. Bu metodda, test edilen örneğın indirgenme gücüne bağılı olarak test çözeltisinin rengi sarıdan yeşile dönmektedir. Oluşan yeşil renk 700 nm'de maksimum absorbanst vermekte ve artan absorbanst artan indirgenme kuvvetini

göstermektedir. Demir indirgeyici gücün ifade edilebilirliği için standart olarak troloks kullanılmaktadır (122, 124).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

0.2 M Fosfat Tamponu (pH:6.6): 2.137 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1.121 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak karıştırıldı. Saf su eklenerek 90 mL'ye kadar çözüldü. Daha sonra pH'sı 6.6'ya ayarlanarak hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ Çözeltisi: 1 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk TCA Çözeltisi: 5 g TCA tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

% 0.1'lik FeCl_3 Çözeltisi: 0.1 g FeCl_3 tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

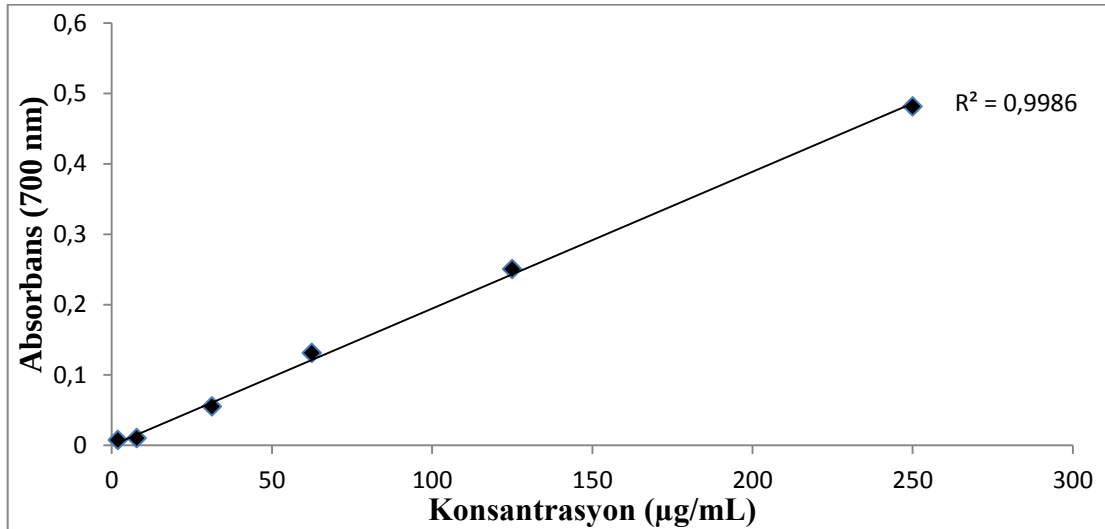
Standartlar: 1 mg troloks 1 mL saf etanol ile çözülerek 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik troloks standardı elde edildi. 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik standarttan saf etanol ile çözülmüş 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906 ve 1.953 $\mu\text{g/mL}$ 'lik troloks standartları seri dilüsyonla oluşturuldu.

Deneyin Yapılışı

Propolis ekstraktı 1:100 oranında etanol ile seyreltildi. Metod modifiye edilerek spektrofotometrik küvetler yerine Tablo 12'deki pipetlemelerin ilk altı aşaması 1.5 mL hacimli kapaklı tüplerde, sonraki aşamalar ise 96 kuyucuklu mikroyetide yapıldı. Sonuçlar troloks standart grafiğinden yararlanılarak $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı (Şekil 10). Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).

Tablo 12. Etanollü propolis ekstraktının demir indirgeyici gücünün belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Etanol	40 µL	-	-
Ekstrakt	-	40 µL	-
Standart	-	-	40 µL
0.2 M Fosfat Tamponu (pH:6.6)	100 µL	100 µL	100 µL
% 1'lik K ₃ Fe(CN) ₆	100 µL	100 µL	100 µL
50 °C' de 20 dakika inkübe edildi ve soğutuldu.			
% 10'luk TCA	100 µL	100 µL	100 µL
3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki fazlardan 100'er µL alınarak 96 kuyucuklu mikroye aktarıldı.			
Saf su	100 µL	100 µL	100 µL
% 0.1'lik FeCl ₃	20 µL	20 µL	20 µL
Oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika inkübe edildi. 700 nm'de mikroye okuyucuda absorban ölçüldü.			

**Şekil 10.** Demir indirgeyici güç tayininde kullanılan troloks standart grafiği

5.5. Hücre Kültürü

Bütün hücre kültürü çalışmaları KTÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında bulunan hücre kültürü kabininde, steril ortamda gerçekleştirildi. Her çalışma öncesi kabin ve kullanılacak malzemeler, her çalışma sonrasında ise kabin % 70'lik etanol ile silindi. Çalışmalar sonunda kabin ve hücre kültürü odası UV ışık ile tekrar kullanıma hazırlık amacıyla steril edildi.

5.5.1. Akciğer Kanseri ve Fibroblast Hücre Serilerinin Eldesi ve Kültürü

Çalışmada; ATCC (American Type Culture Collection) firmasından temin edilen A549 (ATCC, CCL-185) ve sünnet derisi kökenli fibroblast (ATCC, CRL-2522) hücreleri kullanıldı.

A549 hücre serisi için besiyeri çözeltisi: 442.5 mL Ham's F12 Medyum üzerine 50 mL FBS ve 7.5 mL penisilin-streptomisin eklendi. 50 mL'lik falkon tüplere bölünerek +4 °C'de saklandı.

Fibroblast hücreleri için besiyeri çözeltisi: 442.5 mL EMEM Medyum üzerine 50 mL FBS ve 7.5 mL penisilin-streptomisin eklendi. 50 mL'lik falkon tüplere bölünerek +4 °C'de saklandı.

0.01 M PBS (pH 7.4): 10 adet PBS tableti içerisinde yaklaşık 900 mL saf su bulunan beherde çözüldü ve çözeltinin pH'sı, pH metrede 7.4'e ayarlandı. pH'sı ayarlanan çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlanarak otoklavlandı ve hücre kültürü çalışmalarında kullanıldı.

Üretici firmadan temin edilen ve kuru buz içerisinde tarafımıza ulaştırılan hücrelerin bulunduğu kriyovialler aşağıda tarif edildiği şekilde işleme tabi tutuldu:

- Donmuş halde kriyovial içinde bulunan hücreler kuru buzdan çıkarıldıktan sonra 37 °C su banyosunda 5 dakika bekletilerek tamamen çözölmeleri sağlandı.
- Fibroblast hücreleri (1 mL) 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve son hacim L-Glutaminli, % 10 FBS ve % 1 penisilin + streptomisin içeren EMEM besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı.
- A549 hücreleri (1 mL) 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve son hacim L-Glutaminli, % 10 FBS ve % 1 penisilin + streptomisin içeren Ham's F12 besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı.
- Hücre süspansiyonları 130 g'de 6 dakika santrifüj edildi.

- Santrifüj sonunda süpernatant kısımları uzaklaştırıldı, tüplere 1'er mL taze besiyeri ilavesi yapıldı ve hafif pipetaj ile hücre çökelekleri çözüldü.
- Çözülen hücrelerin üzerine fibroblast için 15 mL EMEM, A549 için ise 15 mL Ham's F12, besiyeri eklendi ve hücreler % 5 CO₂ ortamında, 37 °C' de, T-75'lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı.

5.5.2. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması

Çoğalan hücreler flask yüzeyinin % 70-80'lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı.

- Pasajlama için öncelikle flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Flasklar 8'er mL PBS ile yıkandıktan sonra her bir flaska 3 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 3 dakika inkübatörde bekletildi.
- İnkübasyon sonrası 9 mL % 10 FBS içeren EMEM ya da Ham's F12 ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 130 g'de 6 dakika santrifüjlendi.
- Santrifüj sonunda süpernatant kısımları 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı.
- Tripsinizasyon sonrası 1 mL besiyeri içinde çözülmüş hücre süspansiyonundan 10 µL'si 0.5 mL hacimli kapaklı tüpe alınarak 10 µL tripan blue ile karıştırıldı, karışım 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Karışım pipetajlanarak 10 µL alındı ve Neubauer hematositometre lamına aktarıldı.
- İnvert mikroskop ile incelenen hematositometre lamı üzerinde 16'ya bölünmüş dört ayrı kare olduğu görülmektedir. Çapraz iki kare içerisinde bulunan canlı hücreler sayıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı; "sayılan hücre sayısı x seyreltme oranı x 10⁴" formülü kullanılarak hesaplandı (125).
- Tripan blue ile boyama metodunda; ölü hücreler işlev görmeyen Na⁺/K⁺ ATPaz pompaları nedeniyle boyayı absorblamakta ve dışarı atamamakta, dolayısıyla canlı hücreler sarı-yeşil renkte gözükürlerken, ölü hücreler mavi renkte gözükmetedirler (48).
- Sayımı yapılan hücreler, içerisinde 15 mL besiyeri bulunan 75 cm²'lik flasklara 2000-10000 hücre/cm² olacak şekilde tekrar ekildi ve böylelikle kültürlenme sürecine devam edildi.

- Her hücre serisinin her sağlıklı pasajından ilerleyen süreçlerde olası kontaminasyonlara karşı önlem olması açısından yedeklemeler yapıldı. Bunun için sayımı yapılan her hücre serisinden 10^6 hücre süspansiyonu alındı, kriyoviallere aktarıldı, son hacim besiyeri ile 950 μL 'ye tamamlandı ve üzerine son hacmin % 5'i olacak şekilde 50 μL steril DMSO ilave edildi. Kriyovialler önce $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat, sonra $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün bekletildi ve sonrasında uzun süre saklanmak üzere sıvı azot tankına kaldırılarak, sıvı azot buharında saklandı.

5.6. Sitotoksikite Deneyleri

Hazırlanan etanollü propolis ekstraktının, kullanılan propolis numunesinin içeriğinde bulunduğu daha önceden gösterilen bir flavonoid olan kuersetinin (122) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılan ticari bir antikanser ilaç olan sisplatinin (71) A549 ve fibroblast hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde MTT yöntemi (126) modifiye edilerek kullanıldı. Bir doğal bileşiğin kemopreventif ya da kemoterapötik açıdan etkili ve kabul edilebilir olduğunu gösteren bazı kriterler belirlenmiştir. Bu kriterlerin en önemlisi kullanılan doğal ürünün kanserli hücrelerde gösterdiği sitotoksik etkiyi, normal ve sağlıklı hücrelerde göstermemesidir (86). Buradan hareketle etanollü propolis ekstraktının A549 kanser hücre serileri üzerindeki muhtemel sitotoksik etkisinin seçici olduğunun belirlenebilmesi adına sitotoksikite çalışmaları A549 hücre serisine paralel olarak sağlıklı insan fibroblast hücreleri üzerinde de gerçekleştirildi.

Sitotoksikite çalışmalarında kullanılan MTT yönteminde; canlı hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenmesi özelliğinden yararlanılmaktadır. Canlı hücreler mitokondriyal enzimleriyle MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak sarı renkli MTT boyasını mor renkli formazan ürününe dönüştürmektedirler. Hücre içerisinde tutulan formazan kristallerinin DMSO ile çözündürülmesiyle oluşan renk yoğunluğu 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmekte ve renk yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile orantılı olmaktadır (20, 126).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) Çözeltisi (5 mg/mL): 1 g MTT boyası 6 mL DMSO ile çözüldükten sonra hacmi steril PBS ile 200 mL'ye tamamlandı ve tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi. Tamamen çözüldükten sonra 0.22 μm 'lik filtreden geçirilerek 1'er mL (5 mg/mL) halinde alikotlanarak deneylerde kullanılmak üzere $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

Sisplatin Çözeltisi: 1 mg sisplatin tartıldı ve 1 mL DMSO ilavesiyle iyice vortekslenip çözülerek 1000 µg/mL'lik çalışma stoğu hazırlandı. Sisplatin çözeltisi deney günü hazırlandı ve taze halde kullanıldı.

Kuersetin Çözeltisi: 1 mg kuersetin tartıldı ve 1 mL DMSO ilavesiyle iyice vortekslenip çözülerek 1000 µg/mL'lik çalışma stoğu hazırlandı. Kuersetin çözeltisi deney günü hazırlandı ve taze halde kullanıldı.

MTT testi için aşağıdaki işlemler sırası ile yapıldı.

- Tripsinizasyon ile flasklardan kaldırılan A549 ve fibroblast hücreleri sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu steril hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 5000 hücre düşecek şekilde 200 µL besiyeri içinde ekildi (127, 128).
- Başlangıçtan 24 saat sonra; pleytler inkübatörden alındı, içerikleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 200'er µL taze besiyeri eklendi.
- A549 hücre serisi için taze besiyerleri üzerine son konsantrasyonları etanollü propolis ekstraktı için 10, 25, 50, 100, 250 µg/mL, kuersetin için 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 µg/mL ve sisplatin için 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.25, 2.5, 5 µg/mL olacak şekilde uygun hacimlerde ilaveler yapıp hücrelerin bu maddeler ile 37 °C'de 72 saat inkübasyonu sağlandı.
- Fibroblast serisi için taze besiyerleri üzerine son konsantrasyonları etanollü propolis ekstraktı için 25, 50, 100, 250 µg/mL, kuersetin için 4, 12, 24, 36 µg/mL ve sisplatin için 1, 2.5, 5, 10 µg/mL olacak şekilde uygun hacimlerde ilaveler yapıp hücrelerin bu maddeler ile 37 °C'de 72 saat inkübasyonu sağlandı. Her bir hücre serisi için kullanılan maddelerin tüm konsantrasyonları 3 kuyucuk olacak şekilde planlandı (n=3).
- Süre sonunda pleyt içerikleri uzaklaştırıldı ve bütün kuyucuklara 190'ar µL taze besiyeri eklendi. Her bir kuyucuğa son konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak 10'ar µL MTT boyası eklendi ve pleytler 3 saat daha 37 °C'de inkübe edildi.
- Inkübasyon sonunda pleyt içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200'er µL DMSO eklendi ve pleytler formazan kristallerin çözünmesi için 90 dakika çalkalayıcıda bekletildi.
- Süre sonunda kuyucuklardaki kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği invert mikroskop altında kontrol edildi.

- Her bir kuyucukta oluşan mor tonundaki rengin absorbansı mikropleyt okuyucuda 570 nm dalga boyunda okundu. Her örneğin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin, herhangi bir muamele görmeyen kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak her bir maddenin her bir konsantrasyonu için % hücre canlılığı hesaplandı.

- Elde edilen % hücre canlılığı değerlerinin logaritmik konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen grafikten her bir hücre serisinde propolis ekstraktı, kuersetin ve sisplatin için IC₅₀ (yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu) değerleri hesaplandı.

IC₅₀; FDA tarafından negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında % 50 absorbans azalması oluşturan ilaç ya da kimyasal konsantrasyonu olarak tarif edilmektedir (129).

- Etanollü propolis ekstraktının, kuersetinin ve sisplatinin çalışılan iki hücre serisindeki IC₅₀ değerleri bulunduğundan sonra bu değerler;

$$\text{Seçicilik İndeksi} = \text{Normal Hücre IC}_{50} / \text{Kanser Hücresi IC}_{50}$$

formülünde (130) gösterildiği gibi birbirine oranlanarak seçicilik indeksleri hesaplandı.

5.7. Etanollü Propolis Ekstraktının Hücre Döngüsü ve Apoptoz Üzerine Etkisinin Flow Sitometrik Olarak Belirlenmesi

Flow sitometri; apoptozun belirlenmesinde, hatta ekspresyonu değiştiği bilinen hücre yüzey proteinlerinin miktarlarının floresans işaretli antikorlar kullanılarak ortaya konulabildiği, oldukça yaygın kullanım ağına sahip bir yöntemdir. Özellikle onkoloji kliniği açısından uygulanabilirliğinin kolay olması, kantitatif sonuç verebilmesi ve kısa zamanda tamamlanabilmesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (117).

Çalışmanın bu aşamasında sitotoksosite çalışmalarında A549 hücre serisinde seçici toksisite gösterdiği belirlenen etanollü propolis ekstraktının bu etkisinin hangi ana yollar üzerinden gerçekleştiğini ortaya koyabilmek adına flow sitometrik aneksin-V (apoptoz), DNA içerik (hücre döngüsü) ve mitokondriyal membran potansiyeli (intrinsik apoptoz) analizleri ticari kitler kullanılarak KTÜ Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan flow sitometri cihazı kullanılarak yapıldı.

5.7.1. Hücre Döngüsü Analizi

Reaktiflerin Hazırlanması

Üretici firmadan temin edilen ve -20 °C’de saklanan tüm kit bileşenleri kullanılmadan önce oda sıcaklığında bekletilerek erimeleri sağlandı. Tüm reaktifler üretici firma tarafından kullanıma hazır şekilde tasarlanmıştı.

Kitin Çalışma Prensibi

Hücreler gerekli muamelelerden sonra DNA bazları arasına interkalasyon yapabilen ve floresans özellik taşıyan propidyum iyodür (PI) ile boyanırlar. Hücreler; hücre döngüsünün G₁ evresinde bir kopya DNA ihtiva ederlerken, G₂/M evresinde iki kopya DNA içerirler. Bu nedenle G₂/M evresindeki bir hücrenin verdiği floresans ışımaya G₁ evresindeki bir hücrenin verdiği floresans ışımaya iki katı olmaktadır. S evresinde ise DNA sentezi devam ettiğinden dolayı hücrelerin verdiği floresans şiddeti G₁ ile G₂/M evrelerinde verdiklerinin arasında bir değer olmaktadır (114).

Hücre döngüsü analizi için aşağıdaki adımlar takip edildi:

- T-25 flasklara, 750 000 hücre/flask olacak şekilde A549 hücreleri ekildi, son hacim zenginleştirilmiş Ham’s F12 medyum ile 4’er mL’ye tamamlandı ve hücrelerin flasklara yapışması için 24 saat beklendi.
- 24 saat sonunda flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4’er mL taze zenginleştirilmiş Ham’s F12 medyum ilave edildi. İlgili deney gruplarına ait flasklara son konsantrasyonu IC₅₀ için 31.7 µg/mL, IC₉₀ için 57.1 µg/mL olacak şekilde etanollü propolis ekstraktından ve aynı hacimde etanolden (çözücü etkisini görebilmek için) ilave edilip flasklar 72 saat inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda flask içerikleri uzaklaştırıldı ve flasklar 5’er mL PBS ile yıkandı. Flasklara 1’er mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 5 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası 4’er mL zenginleştirilmiş Ham’s F12 medyum ile hücreler falkon tüpler içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonları 300 g’de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1’er mL yıkama tamponu (DMSO içinde çözülmüş sükroz-sodyum sitrat) ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi. Karışım 300 g’de 5 dakika santrifüjlendi ve bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı.

- Üçüncü yıkamanın ardından pelletler 1'er mL yıkama tamponu ile çözüldü. Hücre süspansiyonlarından 10'ar μL alınarak 10'ar μL tripan blue ile karıştırılıp neubauer lamında hücre sayımları yapıldı.
- Her tüpteki hücre sayısı 10^6 olacak şekilde ayarlandı.
- Hücre sayıları eşitlenen tüpler 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Tüm süpernatantlar dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Her tüpe 250'şer μL A solüsyonundan (spermin tetrahidroklorür içinde tripsin içeren deterjan tamponu) ilave edilerek tüpler hafifçe alt üst edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda her tüpe 200'er μL B solüsyonundan (ribonükleaz A and tripsin inhibitörü içeren spermin tamponu) ilave edilerek tüpler hafifçe alt üst edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda tüpler buz üzerine alındı. Her tüpe 200'er μL C solüsyonundan (propidyum iyodür içeren spermin tamponu) ilave edilerek tüpler hafifçe alt üst edildi ve 10 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda tüpler ağızları kapalı şekilde köpük kutuya konularak Hematoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına ulaştırıldı. Hücrelerin hücre döngüsü analizleri burada bulunan flow sitometri cihazında gerçekleştirildi, her tüp için 30 000 hücre saydırıldı ve her deneme 3 kez tekrarlandı (n=3).

5.7.2. Anneksin V Analizi

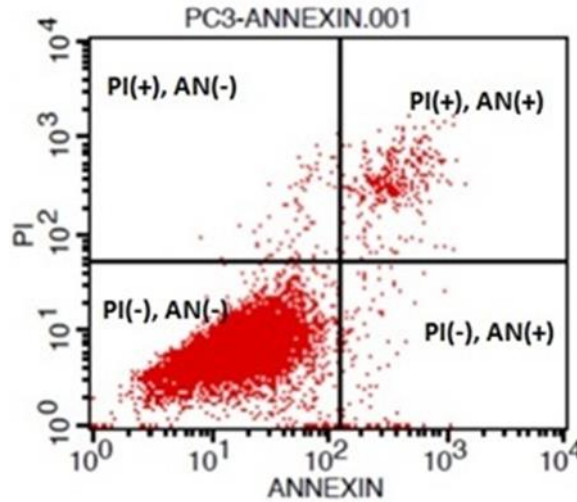
Reaktiflerin Hazırlanması

4 °C'de saklanan tüm kit bileşenleri kullanılmadan önce oda sıcaklığında bekletilerek erimeleri sağlandı. 10X Anneksin V bağlama tamponu [0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl_2] distile su ile 1:9 oranında seyreltilerek 1X Anneksin V çalışma taponu hazırlandı. Diğer reaktifler üretici firma tarafından kullanıma hazır şekilde tasarlanmıştı.

Kitin çalışma prensibi

Apoptoz; embriyonik gelişim aşamasında başlayan ve doku dengesinin devamına olanak sağlayan fizyolojik bir süreçtir. Apoptozun; membran asimetrisinin bozulması,

nukleusun kondenzasyonu, DNA'nın nükleozom içinde kesilmesi gibi karakteristik morfolojik değişiklikleri vardır. Normalde hücre membranının iç yaprağında bulunan fosfatidilserin (PS) apoptoz mekanizmasının işlediği süreçte dış yaprağa çıkmaktadır. Anneksin V, 35-36 kDa ağırlığında Ca^{2+} bağımlı fosfolipid bağlayabilen bir protein olup PS'ye yüksek afinitelidir. Anneksin V bu özelliğinden dolayı FITC (floreskein izotiyosiyanat) gibi florokromlarla konjuge edilip hücrelere verildiğinde yapılan ışımadan hücrelerin ne kadarının apoptoza gittiği belirlenebilmektedir. Anneksin V membran bütünlüğü bozulmuş fakat apoptoza uğramamış hücrelere de girip ışımaya yapabilmektedir. Bunu önleyip sadece kontrollü apoptoza uğrayan hücreleri saptamak için ikinci bir boya (PI gibi) kullanılmaktadır. Kontrollü apoptoza giden hücreler normalde membran bütünlüğü korunan hücrelere giremeyen PI ile değil sadece anneksin V-FITC ile boyanacak ve ona uygun floresans ışımaya yapacaklardır (114). Elde edilen anneksin V analizi sonucunda Resim 2'de de olduğu gibi 4 ayrı bölge görülecektir:



Resim 2. Annexin V analizinde hücrelerin yaptığı floresans ışımlar sonucu elde edilen bölgeler

1. **Bölge PI(-), Anneksin(-):** Canlı hücreleri,
2. **Bölge PI(+), Anneksin (-):** Membran bütünlüğü kontrolsüz şekilde ortadan kalkmış nekrotik hücreleri,
3. **Bölge PI(+), Anneksin (+):** Geç apoptoz evresindeki ya da henüz ölmüş hücreleri,
4. **Bölge PI(-), Anneksin (+):** Erken apoptoz evresindeki hücreleri göstermektedir.

Anneksin V analizi için aşağıdaki adımlar takip edildi:

- T-25 flasklara 750 000 hücre/flask olacak şekilde A549 hücreleri ekildi, son hacim zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ile 4'er mL'ye tamamlandı ve hücrelerin flasklara yapışması 24 saat beklendi.
- 24 saat sonunda flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4'er mL taze zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ilave edildi. İlgili deney gruplarına ait flasklara son konsantrasyonu IC₅₀ için 31.7 µg/mL, IC₉₀ için 57.1 µg/mL olacak şekilde etanollü propolis ekstraktından ve aynı hacimde etanolden (çözücü etkisini görebilmek için) ilave edilip 72 saat inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda flask içerikleri uzaklaştırıldı. Flasklar 5'er mL PBS ile yıkandı.
- Flasklara 1'er mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 5 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası 4'er mL zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ile hücreler falkon tüpler içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonları 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1'er mL soğuk PBS ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi ve tüpler içindeki hücre süspansiyonları 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1'er mL soğuk PBS ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi ve tüpler içindeki hücre süspansiyonları 300 g'de 5 dakika tekrar santrifüjlendi.
- Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1'er mL 1X Anneksin V çalışma taponu ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi. Hücre süspansiyonlarından 10'ar µL alınarak 10'ar µL tripan blue ile karıştırılıp neubauer lamında hücre sayımları yapıldı.
- Her tüpteki hücre sayısı 100 µL de 10⁵ olacak şekilde ayarlandı.
- 100'er µL hücre süspansiyonları üzerine 5'er µL FITC ve 5'er µL PI ilave edilerek elde edilen karışımlar yavaşça vortekslendi, oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda her bir tüpe 400'er µL 1X Anneksin bağlama tamponu ilave edildi. Tüpler ağızları kapalı şekilde köpük kutuya konularak Hematoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına ulaştırıldı. Hücrelerin Anneksin V analizleri burada bulunan flow sitometri

cihazında gerçekleştirildi, her tüp için 10 000 hücre saydırıldı ve her deneme 3 kez tekrarlandı (n=3).

5.7.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi

Reaktiflerin Hazırlanması

4 °C’de saklanan tüm kit bileşenleri kullanılmadan önce oda sıcaklığında bekletilerek erimeleri sağlandı. 10X çalışma tamponu 37 °C su banyosunda ısıtılarak içindeki tuz kristallerinin çözünmesi sağlandı. Sonrasında distile su ile 1:9 oranında seyreltilerek 1X çalışma taponu hazırlandı ve kullanılıncaya kadar 1X çalışma tamponu 37 °C su banyosunda bekletildi. Liyofilize haldeki JC-1 boyası içeren tüpe 125 µL DMSO ilave edildi. Hafif pipetaj ile boyanın çözünmesi sağlandı. Hazırlanan 125 µL ana stok JC-1 boyası 12 375 µL 1X çalışma tamponu içerisine ilave edilerek JC-1 çalışma solüsyonu hazırlandı.

Kitin Prensibi

JC-1 (5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür) mitokondri membran potansiyelini ölçmede kullanılan floresans özellikte bir boyadır. Sağlıklı hücrelerde JC-1 boyası hücre membranını geçip net negatif yükü -60 mV olan sitoplazmaya vardığında yeşil floresans vermektedir. JC-1, katyonik özelliklerinden dolayı net negatif yükü -180 mV olan mitokondriye geçme eğilimindedir. Mitokondriye geçen JC-1 boya tanecikleri yüksek konsantrasyona ulaşınca bir araya gelip agregatlaşmaya uğrarlar ve boya agregatlaşmış haliyle kırmızı floresans ışıma yapmaktadır. Eğer hücreler apoptoza gitmişse mitokondri membran potansiyelindeki azalmadan dolayı JC-1 boya tanecikleri mitokondriye daha az girebilmekte, çoğunluğu sitoplazmada kalıp yeşil floresans ışıma yapmaya devam etmektedirler. Mitokondrideki membran potansiyelinin azalması zamanla sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya çıkışına, kaspaz 9 ve kaspaz 3 enzimlerinin aktiflenmesine neden olacak bir süreci başlatabilmektedir (131).

Mitokondri membran potansiyeli analizi için aşağıdaki adımlar takip edildi:

- T-25 flasklara 750 000 hücre/flask olacak şekilde A549 hücreleri ekildi, son hacim zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ile 4'er mL'ye tamamlandı ve hücrelerin flasklara yapışması 24 saat beklendi.

- 24 saat sonunda flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4'er mL taze zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ilave edildi. İlgili deney gruplarına ait flasklara son konsantrasyonu IC₅₀ için 31.7 µg/mL, IC₉₀ için 57.1 µg/mL olacak şekilde etanolü propolis ekstraktından ve aynı hacimde etanolden (çözücü etkisini görebilmek için) ilave edilip 72 saat inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda flask içerikleri uzaklaştırıldı ve flasklar 5'er mL PBS ile yıkandı.
- Flasklara 1'er mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 5 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası 4'er mL zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ile hücreler falkon tüpler içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonları 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1'er mL 1X çalışma taponu ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi.
- Hücre süspansiyonlarından 10'ar µL alınarak 10'ar µL tripan blue ile karıştırılıp Neubauer lamında hücre sayımları yapıldı.
- Her tüpteki hücre sayısı 250 000 olacak şekilde ayarlandı.
- Hücre süspansiyonlarının üzerine 500'er µL JC-1 çalışma çözeltisi ilave edildi, hafif pipetaj ile karıştırıldı. Hücre süspansiyonlarını içeren tüpler karanlıkta 37 °C'de etüvde bekletildi.
- Süre sonunda tüpler 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet 2 mL 1X çalışma taponu ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi. Tüpler 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak pellet 1 mL 1X çalışma taponu ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi. Tüpler 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak pellet 0,5 mL 1X çalışma taponu ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi. Tüpler ağızları kapalı şekilde köpük kutuya konularak Hematoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına ulaştırıldı. Hücrelerin mitokondri membran potansiyeli analizleri burada bulunan flow sitometri cihazında gerçekleştirildi, her tüp için 10 000 hücre saydırıldı ve her deneme 3 kez tekrarlandı (n=3). Öncelikle her deney grubuna ait iki farklı ışığa (yeşil ve kırmızı) alanlarına ait değerler birbirlerine oranlanarak her bir örnekteki mitokondri membran potansiyeli değerleri hesaplandı. Sonrasında ise her deney grubu

negatif kontrol grubuna oranlanarak göreceli mitokondri membran potansiyeli değişimleri elde edildi.

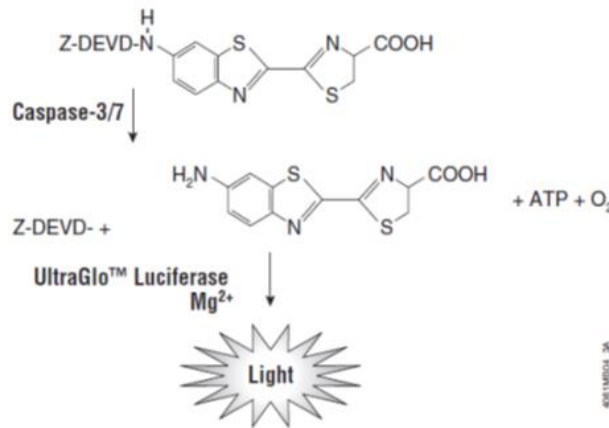
5.8. Kaspaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Reaktiflerin Hazırlanması

-20 °C’de saklanan liyofilize efektör kaspaz substratı ve substratı çözmede kullanılacak olan tampon kullanılmadan önce oda sıcaklığında bekletilerek reaktiflerin erimeleri sağlandı. 2.5 mL tampon, liyofilize kaspaz substratı vialine ilave edildi ve homojen şekilde çözünmesini sağlamak için hafif ters düz edilerek karıştırıldı. Deneyde kullanılacak kaspaz substratı böylece hazırlanmış oldu.

Kitin çalışma prensibi

Kitin ölçüm prensibi temelde; kaspaz substratı olan tetrapeptid sekansa sahip DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) bölgesini de içeren lüminojenik özellikteki substrata, lüsiferaz aktivitesine ve hücre lizisine dayanmaktadır. Hücreler Kaspaz 3/7 Glo reaktifi ile 1:1 oranında karıştırıldığında hücreler lizize uğramakta, kaspazların substratı kesmesi sonucu açığa çıkan aminolüsiferin serbest kalmakta ve lüsiferaz tarafından gerçekleştirilen reaksiyon sonucu parlayan tipte lüminesans sinyal meydana gelmektedir. Şekil 11’de görüldüğü şekilde gerçekleşen reaksiyon sonucu ölçülen lüminesans şiddeti doğrudan toplam efektör kaspaz (3 ve 7) aktivitesi ile orantılı olmaktadır (132).



Şekil 11. Lüminometrik kaspaz 3/7 kitinin çalışma prensibi (Farfan’dan, 132).

Efektör kaspazlardan olan kaspaz 3 ve 7'nin toplam aktivitesinin belirlenmesi için aşağıdaki adımlar takip edildi:

- Beyaz duvarlı 96 kuyucuklu steril hücre kültür pleytine kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde A549 hücreleri ekildi, son hacim zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ile 200 μ L'ye tamamlandı ve hücrelerin pleyte yapışması beklendi.
- 24 saat sonra pleyt içeriği tamamen uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200'er μ L taze zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ilave edildi. İlgili deney gruplarına son konsantrasyonu 35, 75 ve 150 μ g/mL olacak şekilde etanollü propolis ekstraktından ilave edilip 18 saat inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonunda pleyt içeriği uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100'er μ L Ham's F12 medyum ve 100'er μ L taze hazırlanmış Kaspaz 3/7 reaktifi ilave edildi.
- Pleyt çalkalayıcıda 30 saniye 400 rpm'de karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda pleyt okuyucu lüminometrede lüminesans ölçümü gerçekleştirildi ve her deneme her grup için üç kere tekrarlandı (n=3).
- Etanollü propolis ekstraktıyla muamele edilen deney gruplarına ait veriler hiçbir muameleye uğratılmayan negatif kontrol grubu verilerine oranlandı ve sonuçlar negatif kontrol grubuna göre göreceli kaspaz aktivitesi olarak verildi.

5.9. Hücre İçi ROS Miktarının Ölçülmesi

Reaktiflerin Hazırlanması

50 μ g CM-H₂DCFDA probu içeren vial 1000 μ L saf etanol ilave edilerek 87 μ M'lık CM-H₂DCFDA çalışma çözeltisi hazırlandı.

Yöntemin Prensibi

Çeşitli radikaller tarafından oksitlenen CM-H₂DCFDA hücrede oluşan ROS üretimini ölçmek için kullanılmaktadır. CM-H₂DCFDA; H₂DCFDA'nın klorometil türevi olup hücre içi ROS ölçümünde kullanışlı bir indikatördür. CM-H₂DCFDA pasif difüzyonla hücre içine girer, esteraazlar tarafından deasetillenir ve tiyol reaktif klorometil grupları intraselüler glutatyon ve diğer tiyol içeren bileşiklerle etkileşir. Böylece 2',7'- DCFH-DA, floresans özelliği olmayan diklorofluoreskin (2',7'-DCFH) ürünü haline dönüşür. DCFH

ortamdaki reaktif türler tarafından, güçlü floresans ışıma veren DCF (diklorofluoreskein)'ye dönüşen bir probdur ve aktifleşmesi Şekil 12'de gösterilmektedir (133, 134).

Şekil 12. DCFH-DA'nın ışıma veren DCF'ye dönüşümü (Mısır'dan, 134).

Hücre içi ROS seviyelerinin belirlenmesi deneyinde kullanılacak uygun boya konsantrasyonu, hücre sayısı ve muamele süreleri bölümümüzde daha önce yapılan bir yüksek lisans çalışması (135) göz önüne alınarak tasarlandı ve aşağıdaki adımlar takip edildi:

- Siyah duvarlı 96 kuyucuklu steril hücre kültür pleytine kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde A549 hücreleri ekildi, son hacim zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ile 200 µL'ye tamamlandı ve hücrelerin pleyte yapışması bekledi.
- 24 saat sonra pleyt içeriği uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200'er µL taze zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ilave edildi. İlgili deney gruplarına son konsantrasyonu 50, 75, 100, 250 ve 500 µg/mL olacak şekilde etanollü propolis ekstraktından ilave edilip 4 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon bitimine 30 dakika kala ilgili deney grubuna son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde H₂O₂ (pozitif kontrol) ilave edildi.
- Süre sonunda pleyt içeriği uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 100'er µL PBS ilave edildi. Pleytin her bir kuyucuğuna son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde 13'er µL CM-H₂DCFDA çalışma çözeltisi eklendi ve çalkalayıcı etüvde 150 rpm'de karıştırılarak 5 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

- İnkübasyon sonunda florometrede eksitasyon için 492 nm ve emisyon için 527 nm dalga boylarında floresans ölçümler gerçekleştirildi.
- Elde edilen floresans ışıma değerleri, hiçbir muameleye uğratılmayan negatif kontrol grubunun verdiği floresans ışıma 100 kabul edilerek oranlandı ve böylece her gruba ait bağıl floresans yoğunlukları hesaplandı.

5.10. Gen Ekspresyon Çalışmaları

CHOP gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için aşağıdaki adımlar takip edildi:

- T-25 flasklara 200 000 hücre/flask olacak şekilde A549 hücreleri ekildi, son hacim zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ile 4'er mL'ye tamamlandı ve hücrelerin flasklara yapışması 24 saat beklendi.
- 24 saat sonunda flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4'er mL taze zenginleştirilmiş Ham's F12 medyum ilave edildi. İlgili deney gruplarına ait flasklara son konsantrasyonu IC₅₀ için 31.7 µg/mL, IC₉₀ için 57.1 µg/mL olacak şekilde etanollü propolis ekstraktından ilave edilip 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirildi.
- Süre sonunda hücreler flasklardan tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı. 130 g'de 6 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısımlar dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp pellet kısımları 200'er µL PBS çözüldü ve RNA izolasyon işlemleri başlatıldı.

5.10.1. RNA İzolasyonu

Etanollü propolis ekstratıyla muamele edilen hücrelerden RNA izolasyonu kullanılan ticari kitin yönlendirmeleri doğrultusunda aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- 200'er µL PBS ile çözülen hücre pelletleri üzerine 400'er µL liziz çözeltisi ilave edildi ve karışım 15 saniye vortekslendi.
- Toplama tüplerine filtreler yerleştirildi ve 600'er µL hacimdeki karışımlar filtrelere transfer edilerek 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.
- Toplama tüplerindeki sıvı kısımlar uzaklaştırılarak filtreler tekrar tüplere yerleştirildi. Her bir filtre üzerine 90'ar µL DNase inkübasyon tamponu ve 10'ar µL DNase 1 ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
- Filtrelere 500'er µL yıkama tamponu 1 çözeltisinden ilave edildi ve tüpler 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.

- Toplama tüplerindeki sıvılar uzaklaştırılarak filtreler tekrar tüplere yerleştirildi. Filtrelere 500'er μL yıkama tamponu 2 çözeltisinden ilave edildi ve tüpler 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.
- Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırılarak filtreler tekrar tüplere yerleştirildi. Filtrelere 200'er μL yıkama tamponu 2 çözeltisinden ilave edildi ve tüpler 13 000 g'de 120 saniye santrifüjlendi.
- Filtreler dikkatli bir şekilde toplama tüplerinden çıkarılarak yeni steril tüplere aktarıldı. Her bir filtre üzerine 50'şer μL elüsyon tamponu ilave edildi ve tüpler 8000 g'de 60 saniye santrifüjlendi.
- Filtrelerden tüplere geçen RNA örneklerinin miktarları ve saflık dereceleri spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra cDNA dönüşümü yapılarına kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

5.10.2. RNA Örneklerinden cDNA Elde Edilmesi

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA eldesi ticari kitin yönlendirmeleri doğrultusunda aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan RNA örnekleri oda sıcaklığında erimeleri için bekletildi. Eriyen RNA örneklerinin homojenliğini sağlamak için bu örnekler ısı bloğu üzerinde $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika ısıtıldı.
- RNA konsantrasyonları ölçülerek kaydedildi. Elde edilen en düşük RNA konsantrasyonu baz alınarak diğer RNA örnekleri bu konsantrasyona gelecek şekilde elüsyon tamponuyla seyreltildiler.
- 1.5 mL hacimli steril tüp içerisinde gerekli reaksiyon ortamı Tablo 13'de verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.
- Hazırlanan karışım cDNA elde edilecek her bir örnek için önceden hazırlanmış 250 μL hacimli tüplere her birinde 10'ar μL olacak şekilde dağıtıldı. Dağıtılan karışımlar üzerine de her bir deney grubu için 10'ar μL eşitlenmiş konsantrasyondaki RNA örneklerinden ilave edildi.

Tablo 13. RNA örneklerinden cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri

Reaktifler	Her bir örnek için gerekli hacim (µL)
Anchored-oligo dT primer	1
Random hexamer primer	2
Transkriptör reaksiyon tamponu	4
RNase inhibitörü	0,5
dNTP karışımı	2
Reverse Transkriptaz	0,5

- PCR cihazı; 10 dakika 25 °C

60 dakika 50 °C

5 dakika 85 °C olacak şekilde ayarlandı ve cDNA sentezi işlemi başlatıldı.

- Süre sonunda sentezlenen cDNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü, gruplar arası farkları ortadan kaldırmak adına cDNA konsantrasyonları eşitlendi ve RT-PCR aşamasına geçildi.

5.10.3. Real Time PCR Protokolü

Gen ekspresyon çalışmaları; ekspresyonu ölçülmek istenen hedef gen (Roche Real time ready *CHOP-1* Assay ID: 100355, İleri Primer sekansı: 5'-CAGAGCTGGAACCTGAGGAG-3', Geri Primer Sekansı: 5'-CTGCAGTTGGATCAGTCTGG-3') ve referans gen (Roche Real time ready *GAPDH* Assay ID:143641, İleri Primer sekansı: 5'-CCCCGGTTTCTATAAATTGAGC-3', Geri Primer Sekansı: 5'-CACCTTCCCCATGGTGTCT-3') için spesifik olarak üretilen UPL (Universal Probe Library) probolar kullanılarak üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda Roche Light Cycler 480 II marka cihaz kullanılarak gerçekleştirildi. RT-PCR analizi için aşağıdaki adımlar takip edildi:

- 1.5 mL hacimli tüp içerisinde hedef gen ve referans gen için ayrı ayrı olmak üzere gerekli reaksiyon ortamı Tablo 14'de verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 14. Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenleri

Reaktif	Her bir örnek için gerekli hacim (µL)
LightCycler 480 Probes master	10
Real time ready assay (<i>CHOP</i> ya da <i>GAPDH</i>)	1
PCR saflığında su	4

- Hazırlanan karışım her bir örnek için üç kuyucuk olacak şekilde RT-PCR için özel olarak üretilmiş beyaz 96 kuyucuklu pleyte her bir kuyucukta 15'er µL olacak şekilde dağıtıldı. Dağıtılan karışımlar üzerine de her bir deney grubu için 5'er µL cDNA örneği ilave edildi.
- Cihaz ayarları Tablo 15'de verilen şablona göre düzenlendi ve RT-PCR analizi gerçekleştirildi.
- Sonuçların analizi Roche Light Cycler 480-II cihazında bulunan Advance Relative Quantification programı ile yapıldı. Göreceli kantitasyon modunda; ilgilenilen hedef genin deney gruplarının ekspresyon seviyeleri muamelesiz grup (negatif kontrol) ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak rölatif olarak ifade edildi.

Tablo 15. RT-PCR protokolü**Tespit formatı:** Tek Renkli Hidroliz Prob/ UPL Probe**Pleyt türü:** 96 kuyucuklu**Reaksiyon hacmi:** 20 µL

Program	Döngü	Analiz Modu
Ön inkübasyon	1	-
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon
Soğutma	1	-

Hedef Sıcaklık °C	Elde etme modu	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/s)
Ön inkübasyon			
95	-	10 dakika	4.4
Amplifikasyon			
95	-	10 saniye	4.4
60	-	30 saniye	2.2
72	Tek	1 saniye	4.4
Soğutma			
40	-	30 saniye	2.2

5.11. İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması ve $\pm$ standart sapma (mean $\pm$ SD) alınarak hesaplandı. Deney sonuçları, SPSS (Statistics Program for Social and Science) 13.0.1 istatistik programına yüklenerek normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov Testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uygun oldukları görüldükten sonra ANOVA testi, gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi için ise post-hoc Tukey analizleri kullanıldı. $P<0.05$; istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Etanollü Propolis Ekstraktının Antioksidan Özellikleri

Etanollü propolis ekstraktının antioksidan gücü; toplam polifenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeme gücü testleri kullanılarak belirlendi ve sonuçlar Tablo 16’da verildi.

Tablo 16. Etanollü propolis ekstraktının antioksidan özellikleri (n=3)

Çalışılan Parametre	Etanollü Propolis Ekstraktı
Toplam Polifenolik İçerik (mg gallik asit/g propolis)	124.6±1.5
Toplam Flavonoid İçerik (mg kuersetin/g propolis)	42.1±0.8
Demir İndirgeme Gücü (mg troloks/g propolis)	311±2.5

6.2. Sitotoksisite Analizi Sonuçları

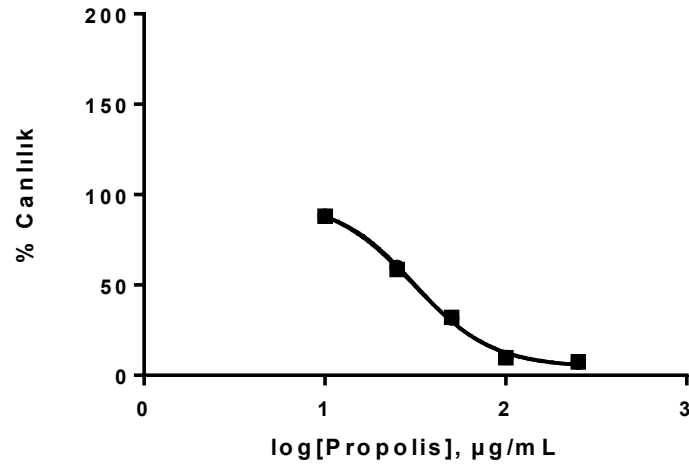
6.2.1. A549 Hücre Serisindeki Sitotoksisite Çalışmalarının Sonuçları

6.2.1.1. Etanollü Propolis Ekstraktının Sitotoksik Etkisi

Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisindeki sitotoksik etkinliği MTT testi ile değerlendirildi, veriler negatif kontrol grubuna oranlanarak elde edilen % hücre canlılıkları Tablo 17’de, bu değerlerden elde edilen ve IC₅₀ hesaplanmasında kullanılan grafik Şekil 13’de verildi.

Tablo 17. Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Etanollü Ekstrakt (µg/mL)	10	25	50	100	250
% Canlılık	88.1±1.1	58.5±1.1	32.2±0.4	9.7±0.2	7.5±0.3



Şekil 13. Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisindeki IC₅₀ değerini belirlemede kullanılan logaritmik konsantrasyon-yüzde canlılık grafiği

6.2.1.2. Sisplatinin Sitotoksik Etkisi

Sisplatinin, A549 hücre serisindeki sitotoksik etkinliği MTT testi ile değerlendirildi, veriler negatif kontrol grubuna oranlanarak elde edilen % hücre canlılıkları Tablo 18’de verildi.

Tablo 18. Sisplatinin A549 hücre serisindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Sisplatin (µg/mL)	0.1	0.25	0.5	1	1.25	2.5	5
% Canlılık	85.5±0.5	68.9±1.3	54.9±2.1	40±1	26.1±0.9	16.3±0.4	7.4±0.3

6.2.1.3. Kuersetinin Sitotoksik Etkisi

Kuersetinin, A549 hücre serisindeki sitotoksik etkinliği MTT testi ile değerlendirildi, veriler negatif kontrol grubuna oranlanarak elde edilen % hücre canlılıkları Tablo 19’da verildi.

Tablo 19. Kuersetinin A549 hücre serisindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Kuersetin (µg/mL)	1,2	2,4	4,8	9,6
% Canlılık	79.9±3.5	37.7±0.2	25.3±0.9	13.7±0.4

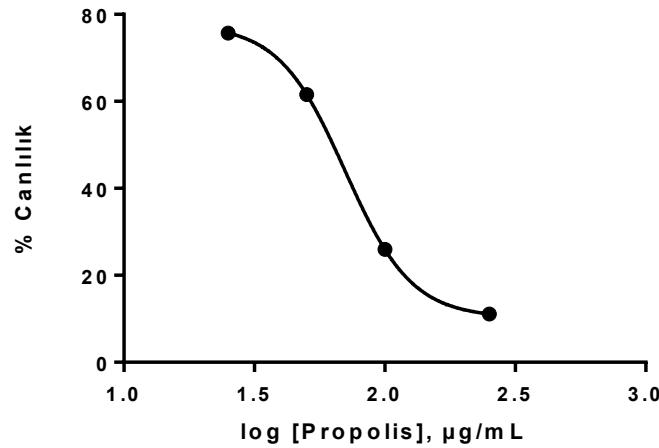
6.2.2. Fibroblast Hücre Serisindeki Sitotoksikite Çalışmalarının Sonuçları

6.2.2.1. Etanollü Propolis Ekstraktının Sitotoksik Etkisi

Etanollü propolis ekstraktının fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile değerlendirildi, veriler negatif kontrol grubuna oranlanarak elde edilen % hücre canlılıkları Tablo 20’de, bu değerlerden elde edilen ve IC₅₀ hesaplanmasında kullanılan grafik Şekil 14’de verildi.

Tablo 20. Etanollü propolis ekstraktının fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Etanollü Ekstrakt (µg/mL)	25	50	100	250
% Canlılık	77.8±1.9	61.8±0.5	27±1	11.7±0.8



Şekil 14. Etanollü propolis ekstraktının fibroblast hücre serisindeki IC₅₀ değerini belirlemede kullanılan logaritmik konsantrasyon-yüzde canlılık grafiği

6.2.2.2. Sisplatinin Sitotoksik Etkisi

Sisplatinin, fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile değerlendirildi, veriler negatif kontrol grubuna oranlanarak elde edilen % hücre canlılıkları Tablo 21’de verildi.

Tablo 21. Sisplatinin fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Sisplatin (µg/mL)	1	2.5	5	10
% Canlılık	98±0.9	78.1±0.6	38±2.6	22.6±1

6.2.2.3. Kuersetinin Sitotoksik Etkisi

Kuersetinin, fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile değerlendirildi, veriler negatif kontrol grubuna oranlanarak elde edilen % hücre canlılıkları Tablo 22’de verildi.

Tablo 22. Kuersetinin fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Kuersetin ($\mu\text{g/mL}$)	4	12	24	36
% Canlılık	75 $\pm$ 0.9	58.9 $\pm$ 3.2	38.7 $\pm$ 1.8	10.7 $\pm$ 0.3

6.2.3. IC₅₀ Değerleri ve Seçicilik İndeksleri

Etanollü propolis ekstraktı, sisplatin ve kuersetinin A549 ve fibroblast hücreleri için hesaplanan IC₅₀ değerleri ve her iki hücre serisindeki IC₅₀ değerlerinin oranlanmasıyla elde edilen seçicilik indeksleri Tablo 23’de verildi. Etanollü propolis ekstraktının sitotoksik etkisinin seçici olduğu görüldü ve daha ileri analizlerle etanollü propolis ekstraktının IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri kullanılarak bu etkinin temel mekanizmalarının ortaya konulmasına çalışıldı.

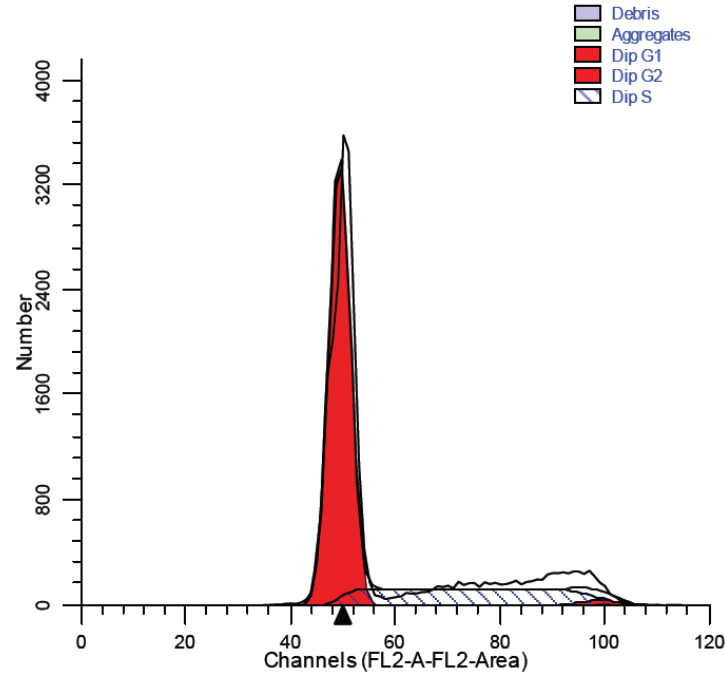
Tablo 23. IC₅₀ değerleri ve seçicilik indeksleri (IC₅₀ değerleri $\mu\text{g/mL}$ birimiyle verildi, n=3)

Test Materyali	A549 Hücre Serisi	Fibroblast Hücreleri	Seçicilik İndeksi
Propolis Ekstraktı	31.7 $\pm$ 0.26	76.9 $\pm$ 2.9	2.4
Kuersetin	1.8 $\pm$ 0.13	12.3 $\pm$ 0.3	6.8
Sisplatin	0.7 $\pm$ 0.01	5.2 $\pm$ 0.12	7.4

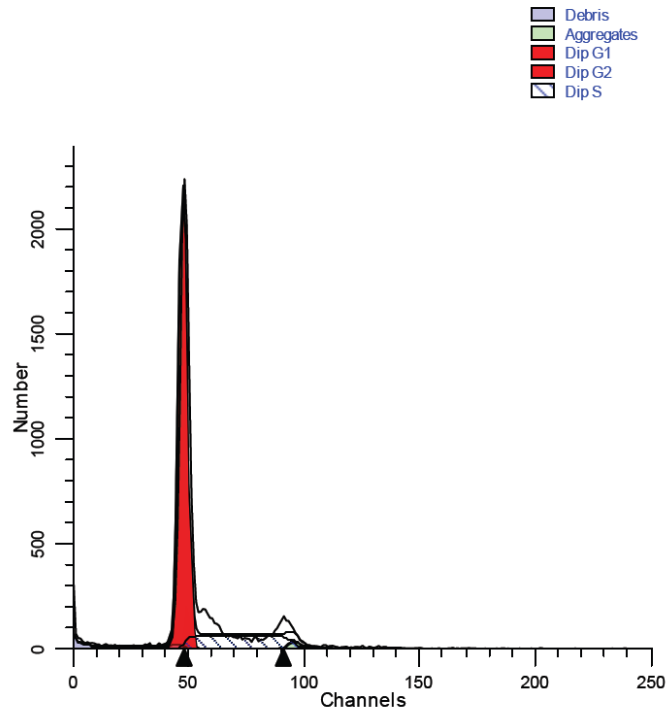
6.3. Flow Sitometrik Analiz Sonuçları

6.3.1. Hücre Döngüsü Analizi Sonuçları

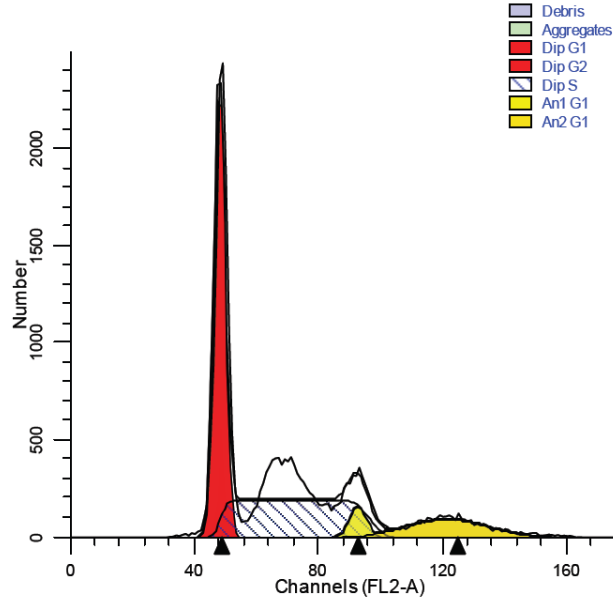
Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisinin hücre döngüsü üzerindeki etkisi DNA içerik kiti kullanılarak akım sitometrisi sistemiyle analiz edildi. Negatif kontrol grubu, etanollü propolis ekstraktıyla IC₅₀ ve IC₉₀ konsantrasyonlarda ve IC₉₀’a karşılık gelen yüzdede saf etanol ile 72 saat muamele edilen A549 hücrelerine ait akım sitometrisi analizi sonuçları sırasıyla Resim 3, 4, 5 ve 6’da verildi. Tablo 24’de ise tüm gruplara ait hücre döngüsü analiz sonuçları görülmektedir.



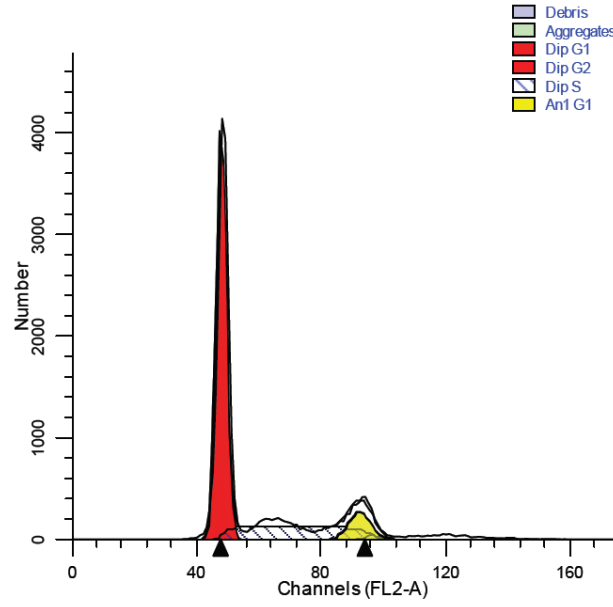
Resim 3. Negatif kontrol grubunu oluşturan hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu



Resim 4. Etanollü propolis ekstratının IC₅₀ konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu



Resim 5. Etanollü propolis ekstratının IC₉₀ konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu



Resim 6. Etanollü propolis ekstratının IC₉₀ konsantrasyonuna eşdeğer saf etanol ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu

Tablo 24. Hücre döngüsü analizi sonuçları (n=3) [^aNegatif kontrol grubuna göre anlamlı artış görüldü (p<0.05), ^bNegatif kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü (p<0.05)]

	G₁ Evresi	G₂ Evresi	S evresi
Negatif Kontrol	68.2±4.47	7.8±0.37	23.9±2.8
Propolis IC₅₀	74.6±1.8	1.1±0.7 ^b	24.7±2.3
p	(0.221)	(0.001)	(0.970)
Propolis IC₉₀	78.4±5.3 ^a	8±0.01	16.7±0.4 ^b
p	(0.038)	(0.990)	(0.007)
Etanol	68.3±0.48	6.6±1.98	25.1±2.5
p	(1.000)	(0.381)	(0.917)

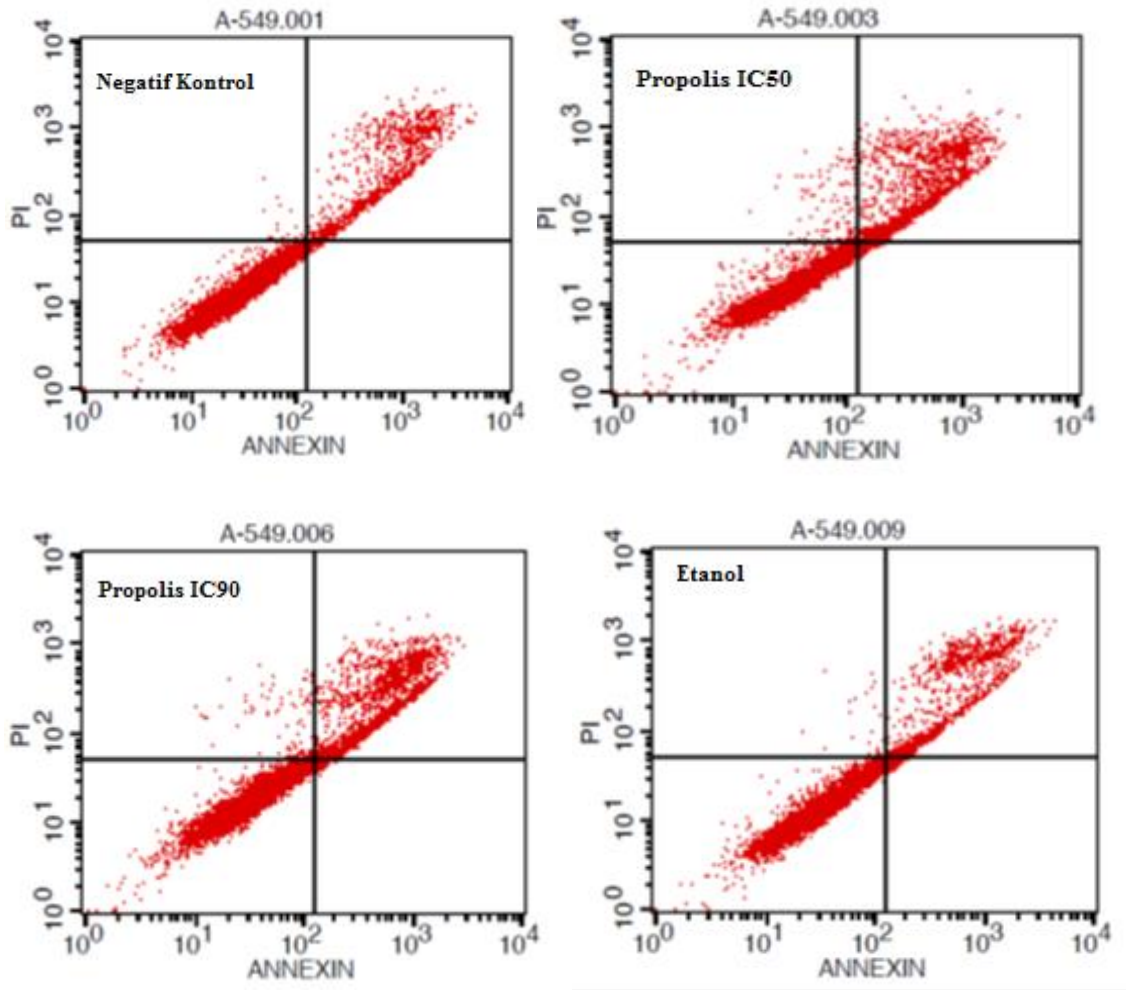
Elde edilen hücre döngüsü analiz sonuçlarına göre; etanollü propolis ekstraktının IC₅₀ konsantrasyonunun A549 hücrelerinin döngüsünü G₁ evresinde durdurduğu fakat bulunan değerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, buna cevaben G₂ evresindeki hücre topluluğunu anlamlı şekilde azalttığı görüldü. Etanollü propolis ekstraktının IC₉₀ konsantrasyonunun A549 hücrelerinin döngüsünü G₁ evresinde durdurduğu ve buna bağlı olarak sentez evresine giren hücre miktarını anlamlı şekilde azalttığı görüldü. Buradan hareketle etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisinde antiproliferatif etkinlik sergilediği sonucuna varıldı. Propolis ekstraktı hazırlamada kullanılan etanolün kullanılan konsantrasyonda hücre döngüsü üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlendi.

6.3.2. Anneksin V Analizi Sonuçları

Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisindeki apoptotik etkinliği Anneksin V kiti kullanılarak akım sitometrisi sistemiyle analizlendi. Negatif kontrol grubu, etanollü propolis ekstraktıyla IC₅₀ ve IC₉₀ konsantrasyonlarda ve IC₉₀'a karşılık gelen yüzdede saf etanol ile 72 saat muamele edilen A549 hücrelerine ait akım sitometrisi analizi sonuçları sırasıyla Resim 7'de verildi. Tablo 25'de ise tüm gruplara ait Anneksin V analiz sonuçları görülmektedir.

Tablo 25. Anneksin V analizi sonuçları (n=3) [^aNegatif kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü (p<0.05), ^bNegatif kontrol grubuna göre anlamlı artış görüldü (p<0.05)]

	Sağlam Hücre	Nekrotik Hücre	Nekrotik veya Geç Apoptotik Hücreler	Erken Apoptotik Hücreler
Negatif Kontrol	84.9±3.38	0.47±0.31	12.16±2.73	2.48±0.36
Propolis IC₅₀	71.2±1.5 ^a	1±0.35	22.43±0.72 ^b	5.38±1.08 ^b
p	(0.001)	(0.275)	(0.001)	(0.015)
Propolis IC₉₀	76±1.26 ^a	1.54±0.2 ^b	20.6±0.98 ^b	1.8±0.4
p	(0.006)	(0.019)	(0.002)	(0.725)
Etanol	85.6±0.23	0.38±0.08	11.13±0.38	2.89±0.53
p	(0.976)	(0.986)	(0.863)	(0.934)



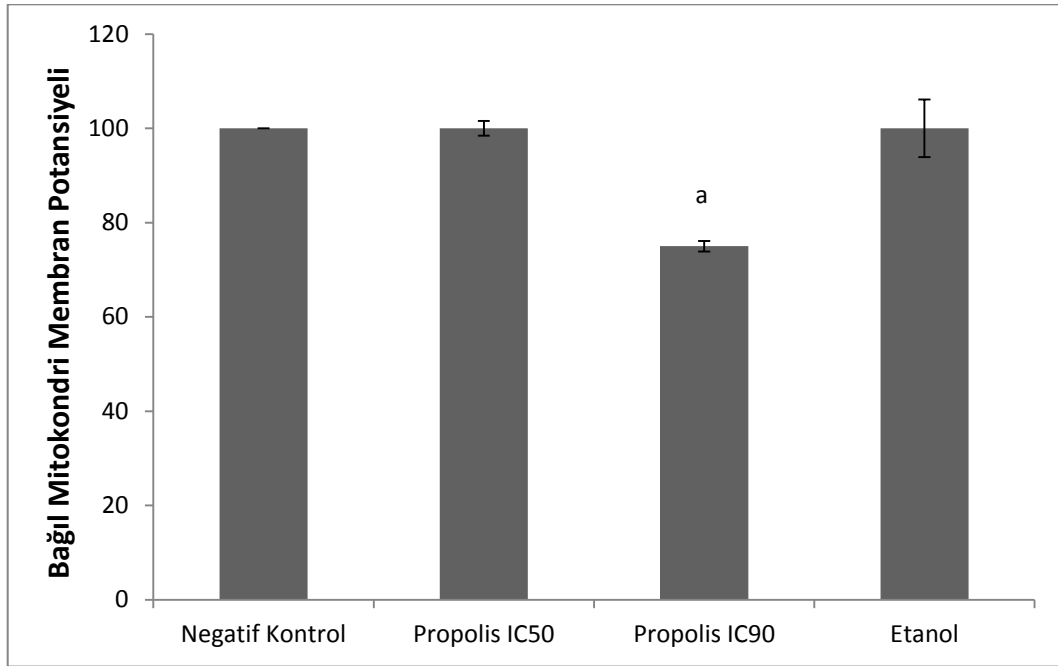
Resim 7. Anneksin V analizi sonucu elde edilen grafikler

Anneksin V analiz sonuçlarına göre; etanollü propolis ekstraktlarının IC₅₀ konsantrasyonda sağlam A549 kanser hücresi miktarını anlamlı olarak azaltıp, nekrotik veya geç apoptotik ile erken apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı görüldü. Etanollü propolis ekstraktının IC₉₀ konsantrasyonunu ise sağlam A549 kanser hücresi miktarını anlamlı olarak azaltıp, nekrotik hücreler ile nekrotik veya geç apoptotik hücrelerin miktarını arttırdığı görüldü. Propolis ekstraktı hazırlamada kullanılan etanolün hücre ölümü üzerine her hangi bir etkisine rastlanmadı.

6.3.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi Sonuçları

Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisinde mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisi JC-1 kiti kullanılarak akım sitometrisi sistemiyle analizlendi. Şekil 15’de

muamele görmeyen negatif kontrol grubuna göre göreceli mitokondri membran potansiyeli değişimleri görülmektedir.

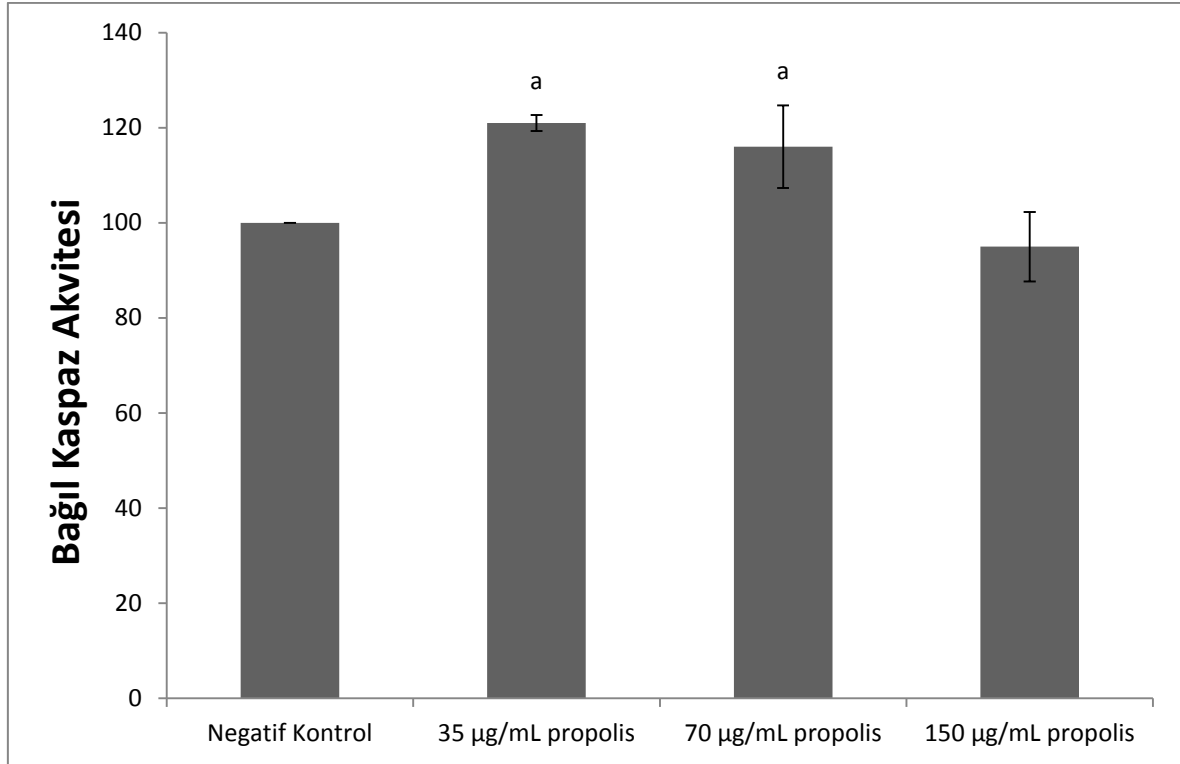


Şekil 15. Mitokondri membran potansiyeli analizi sonuçları (n=3) [^aNegatif kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü (p<0.05)]

Etanollü propolis ekstraktının IC₅₀ konsantrasyonu ve saf etanol ile 72 saat muamele edilen hücrelerin mitokondri membran potansiyelinde anlamlı değişiklik görülmezken, propolisin IC₉₀ konsantrasyonunun A549 hücrelerinde mitokondri membran potansiyelini anlamlı derecede azalttığı görülmüş (p=0.005) dolayısıyla bu hücre grubunda mitokondri bağımlı kontrollü hücre ölüm yollarının aktiflenmiş olabileceği düşünülmüştür.

6.4. Kaspaz Aktivitesi Ölçüm Sonuçları

Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisinde toplam kaspaz aktivitesi üzerindeki etkisi lüminometrik kit kullanılarak lüminometre sistemiyle analizlendi. Şekil 16'da muamele görmeyen negatif kontrol grubuna göre göreceli kaspaz aktivitesi değişimleri görülmektedir.

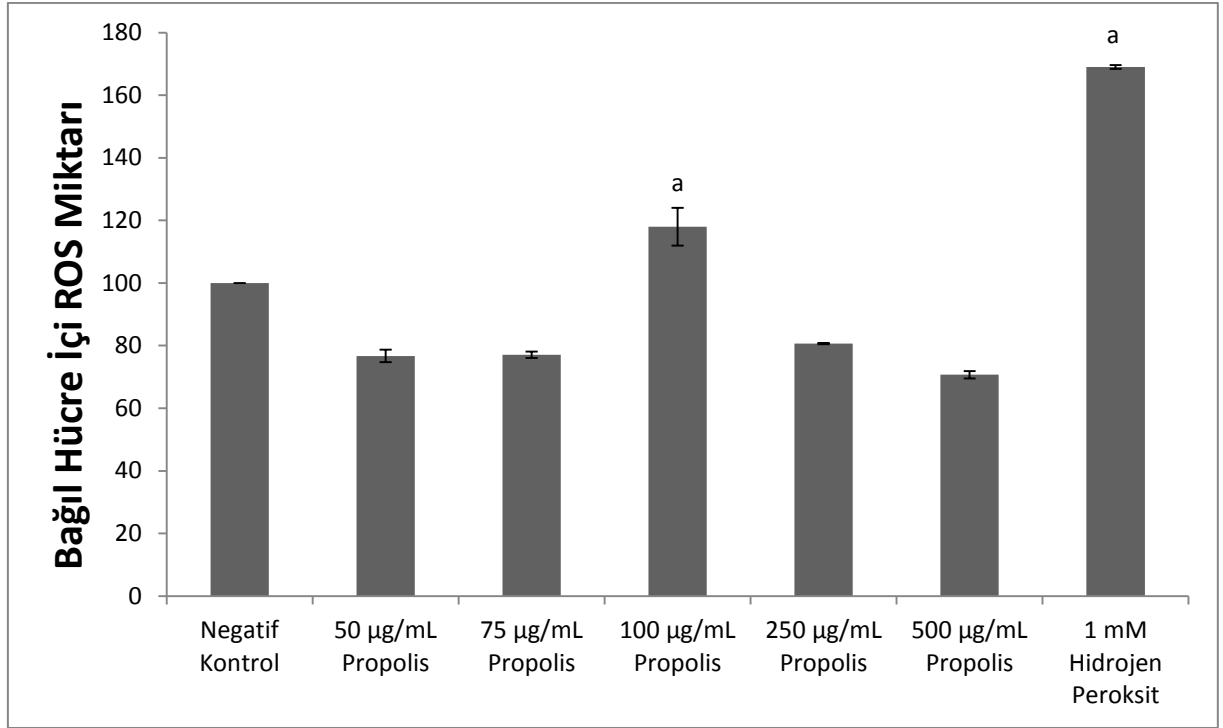


Şekil 16. Kaspaz aktivitesi ölçüm sonuçları (n=3) [^aNegatif kontrole göre anlamlı artış görüldü (p<0.05)]

35 ve 75 µg/mL konsantrasyonlardaki etanollü propolis ekstraktıyla 18 saat muamele edilen A549 hücrelerinde kaspaz aktivitesinin anlamlı olarak arttığı (p değerleri sırasıyla 0.009 ve 0.037), 150 µg/mL konsantrasyondaki etanollü propolis ekstraktının ise kaspaz aktivitesinde anlamlı değişiklik (p=0.706) oluşturmadığı görüldü.

6.5. Hücre İçi ROS Ölçüm Sonuçları

Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisinde hücre içi ROS miktarına olan etkisi florometrik prob kullanılarak florometre sistemiyle analizlendi. Şekil 17’de muamele görmeyen negatif kontrol grubuna göre göreceli hücre içi ROS değişimleri görülmektedir.

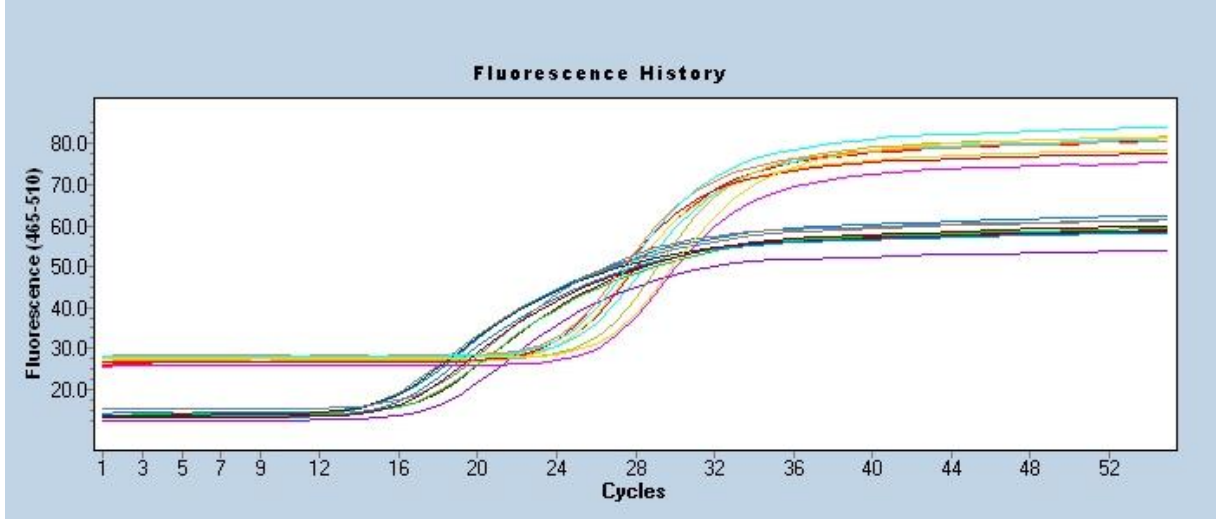


Şekil 17. Hücre içi ROS ölçümü sonuçları (n=3) [^aNegatif kontrole göre anlamlı artış görüldü (p<0.05)]

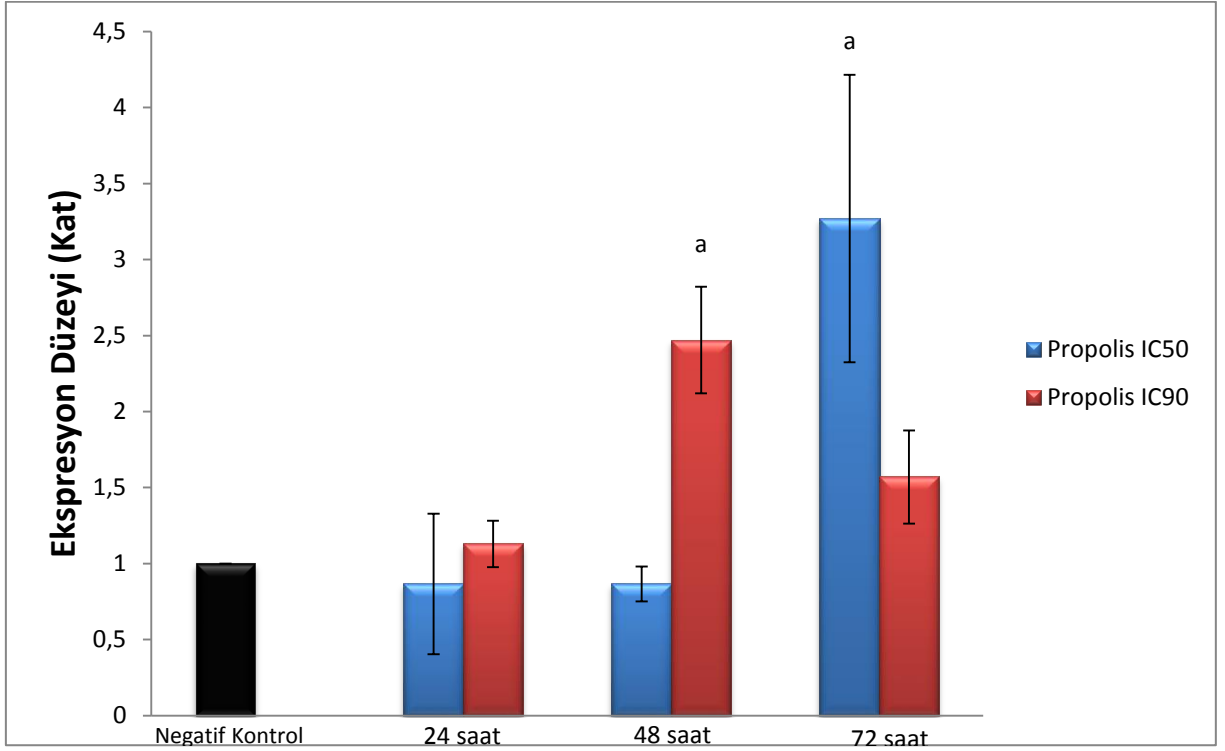
Çalışmada pozitif kontrol grubu olarak kullanılan 1 mM H₂O₂ ve etanollü propolisin sadece 100 µg/mL konsantrasyonunda hücre içi ROS miktarında anlamlı artış (p=0.0001) görüldü.

6.6. CHOP Ekspresyon Analizi Sonuçları

Real-time PCR ile gen ekspresyonu çalışmasına ait amplifikasyon eğrileri Resim 8’de verildi. Etanollü propolis ekstraktının A549 hücre serisinde ER stresi belirteçlerinden olan CHOP proteininin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi, konsantrasyona ve muamele süresine bağlı olarak muamele görmeyen negatif kontrole göre kat olarak Şekil 18’de sütun grafiği olarak verildi. CHOP ekspresyonu propolisin IC₅₀ konsantrasyonunda negatif kontrole göre 72. saatte anlamı olarak artarken (p=0.003), IC₉₀ konsantrasyonda 48. saatte anlamlı artış (p<0.0001) görüldü. Elde edilen sonuçlar kendi aralarında değerlendirildiğinde IC₅₀ konsantrasyonda 72. saat değeri, 24 ve 48. saate göre anlamlı yüksekken (p=0.002) diğer saatler arasında anlamlı fark görülmedi (p=1). IC₉₀ konsantrasyonda ise 48. saat değeri, 24 ve 72. saate göre anlamlı yüksekken (p=0.001 ve p=0.009) diğer saatler arasında anlamlı fark görülmedi (p=1).



Resim 8. CHOP mRNA ekspresyon analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri



Şekil 18. CHOP mRNA ekspresyon analizi sonuçları (n=3) [^aNegatif kontrole göre anlamlı artış görüldü (p<0.05)]

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser; hücre sinyal yollarında meydana gelen çoklu değişimler sonucu ortaya çıkan genetiksel öyküyü de barındırabilen heterojen bir hastalıktır (65). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre ölümlerin % 63'ü kanser ile ilişkilidir. Akciğer kanseri dünyada en yüksek mortaliteye sahip kanser türüdür ve erken evrelerde saptanamaması hastalığın hızlı seyrine, bu da hastanın yaşam süresinin azalmasına sebep olmaktadır (2). Günümüzde cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, hormon replasmanı ve immunoterapi kanserle mücadele de başvuru alan esas metodlar olmakla birlikte bazen tamamlayıcı ve alternatif tedavi amaçlı doğal ürünlerin kansere karşı kullanımı da görülmektedir. Kemoterapi kanserle mücadelede sıklıkla başvuru alan metod olup etkisizlik, ciddi toksisite ve çoklu ilaç direnci gibi dezavantajlar başarı yüzdesini düşürmektedir (4). Bundan dolayı antikanser ilaçlara karşı olan direnci yenebilmek için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (5). İşte bu noktada doğal ürünlere yeni ilaç keşifleri için potansiyel hammadde gözüyle bakılmakta ve doğal ürünlerde bulunan polifenoller bu anlamda yapıları ve aktiviteleri ile ön plana çıkmaktadır. Doğal ürünlerin gerek bütün haldeki ekstraktlarının, gerekse doğal ürünlerden izole edilen bileşiklerin antikanser etkilerinin araştırılması oldukça popüler çalışma alanlarından birisi haline gelmiştir (98).

Özellikle son yıllarda doğal arı ürünlerinin gerek *in vivo* ve gerekse *in vitro* antikanser etkinliklerinin ortaya konması, bu özelliğin de tümör hücre büyümesini ve metastazı engelleyerek ya da apoptozu artırarak ortaya çıktığının belirlenmesi bilim camiasında heyecan yaratmıştır (136). Güncel literatürde propolisin antitümöral ve immunomodülatör etkilerine yoğunlaşan çok sayıda çalışmanın mevcut olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda *in vivo* ve *in vitro* deneylerle propolisin bu etkilerinin mekanizmaları araştırılmakta, sonuçlar kullanılan propolisin kimyasal kompozisyonu, botanik orjini verileri ile yorumlanmakta ve çalışmalar derleme makalelerinin konusu haline gelmektedirler (8, 9). Böyle olduğu halde Türk propolisinin kanser hücre serilerinde sitotoksik etkinliğini konu alan çalışmalar sınırlı olduğu görülmektedir (10-13).

Doğal ürünlerin insanlar için kullanılabilirliğini belirlemede yapılacak ön çalışmalarda öncelikle *in vitro* metodların kullanılması önerilmektedir. Klinik denemeler ancak *in vitro* çalışmalardan pozitif sonuçların alınması durumunda tavsiye edilmektedir. Üstelik gerek *in vitro* gerekse *in vivo* çalışmalarda alınan pozitif sonuçların klinik

Çalışmalarda her zaman ngrldğ şekilde elde edilemeyeceğ de vurgulanmaktadır (137). Bu nedenle bu çalışmada Türk propolisinin etanollü ekstraktının dünya genelinde en yüksek insidansa sahip kanser türü olan akciğerkanserinin küçük hücreli olmayan tipinden elde edilmiş A549 serilerindeki sitotoksik etkisinin öncelikli olarak *in vitro* koşullarda belirlenmesi planlandı.

Propolis; reinemi yapıısından dolayı ham halde kullanılamamakta, çeşitli çözücülerle ekstrakt haline getirilmektedir. Bu işlem esnasında inert bileşenlerin uzaklaştırılmasının ve polifenolik ieriğinkorunmasının dikkat edilmesi gereken hususlar olduğu vurgulanmaktadır. Çeşitli derişimlerdeki (% 70-100) etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarının mumsu bileşik iermediğ ve polifenolce zengin olduğu vurgulanmaktadır. Ekstraksiyon öncesinde propolis numunesinin dondurulması, sonrasında küçük parçacıklara ayrılması ve hatta toz haline getirilmesi önerilmektedir. Propolis numunesine 1:10 veya 1:20 (w/v) oranında çözücü eklenmesi, oda sıcaklığında ya da inkübatörde belirli sıcaklıklarda inkübe edilerek maserasyon yöntemiyle ekstrakt elde edilmesi tavsiye edilmektedir (49, 138). Propolis ekstraksiyon işlemlerinde farklı yöntemler ve çözücüler kullanılmakta ve kullanılan ekstraksiyon yöntemine ve çözücüye göre de propolis ekstraktları farklı aktiviteler sergileyebilmektedirler. Propolis ekstraktı hazırlamada en sık kullanılan çözücü etanol olup, zaman zaman metanol ve sulu propolis ekstraktları da tercih edilmektedir. Etanollü propolis ekstraktının fenolik asitler ve flavonoidler açısından zengin olduğu immunomodülatör, kimyasalların zararlı etkilerini önleyici ve antitümör etkilerinin bulunduğu ortaya konmuştur (18). Buradan hareketle literatürle uygun şekilde olmasına dikkat edilerek bu çalışmada kullanılacak propolis numuneleri önce donduruldu, sonrasında toz haline getirildi ve toz haldeki propolis numuneleri 1:20 (w/v) oranında saf etanol ile karıştırılarak inkübatörde 60 C’de inkübe edilerek maserasyon yöntemi ile ekstrakt haline getirildi.

Propolisin günlük hayat içerisindeki kullanımının artması, hazırlanan propolis ekstraktının temel içeriğinin hızlı ve ucuz metodlarla saptanmasını gerekliliğinkide doğurmuştur. Bu amaçla toplam fenolik ve flavonoid ieriğinkbelirlenmesi, demir indirgeyici güç tayini en sık başvurulan rutin kontrol testleri haline gelmiştir (138, 139). Bundan dolayı hazırlanan etanollü propolis ekstraktının temel ieriğ ve antioksidan karakteri toplam polifenol ve toplam flavonoid içerik ile demir indirgeme gücü testleri kullanılarak belirlendi.

Sunulan çalışmada Türk propolisinin etanollü ekstraktının toplam polifenolik içeriği 124.6 mg gallik asit/g propolis olarak bulunurken; literatürde Dünya'nın farklı yerlerinden toplanan propolis numunelerinin etanollü ekstraktlarındaki toplam polifenolik içeriklerin; 31-299 mg gallik asit/g propolis değerleri arasında değiştiği (140), kırmızı Brezilya propolisi için 152 mg gallik asit /g propolis (141), Çin propolisi için 175 mg gallik asit/g propolis (142), Türk propolisi için 122 mg gallik asit /g propolis (122) değerlerinin verildiği görülmüştür. Sunulan çalışmada Türk propolisinin etanollü ekstraktının toplam flavonoid içeriği 42.1 mg kuersetin/g propolis olarak bulunurken; Dünya'nın farklı yerlerinden toplanan propolis numunelerinin etanollü ekstraktlarındaki toplam flavonoid içerik değerlerinin; 2.5-176 mg kuersetin/g propolis arasında değiştiği (140), Çin propolisi için 45 mg kuersetin/g propolis (142) ve Türk propolisi için ise 48 mg kuersetin/g propolis (122) değerleri bildirilmiştir. Sunulan çalışmada Türk propolisinin etanollü ekstraktının demir indirgeme gücü 311 mg troloks/g propolis olarak bulunurken; İran'ın farklı yerlerinden toplanan propolis numunelerinin etanollü ekstraktlarının demir indirgeme gücü değerlerinin 32-1650 mg troloks/g propolis arasında değiştiği (143), Türk propolisinin etanollü ekstraktının demir indirgeme gücü değerlerinin ise 237 mg troloks/g propolis (122) olarak bildirildiği görülmüştür. Çalışmada elde edilen toplam polifenol içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeme gücü değerlerinin literatür verileriyle uyumlu olduğu görüldü. Aradaki küçük farklılıklar, propolisin toplandığı bölgenin iklimsel, bitkisel farklılıklarından, toplandığı mevsimden, ekstraksiyon metodundan ya da propolis toplayan arı ırkından (6) kaynaklanıyor olabilir.

Günümüzde hücre canlılığının, proliferasyon hızının ve sitotoksitenin belirlenmesi için sıklıkla tripan blue, MTT, nötral red, LDH, ATP gibi yöntemler kullanılmaktadır (112). Bu nedenle çalışmada etanollü propolis ekstraktının sitotoksik etkinliğini belirlemek için hassas, kantitatif ve güvenilir bir kolorimetrik metot olan ve benzer çalışmalarda da (10-13) kullanılan MTT yöntemi tercih edildi. Bir doğal bileşiğin kemopreventif ya da kemoterapötik açıdan etkili ve kabul edilebilir olduğunu gösteren bazı kriterler belirlenmiş olup bu kriterlerin en önemlisi kullanılan doğal ürünün kanserli hücrelerde gösterdiği sitotoksik etkiyi normal ve sağlıklı hücrelerde göstermemesidir (86). Bu nedenle sitotoksikite çalışmaları, A549 kanser serileri ile paralel olarak normal fibroblast hücrelerinde de sürdürüldü ve etanollü propolis ekstraktının A549 hücrelerinde normal hücrelere göre 2.4 kat daha seçici şekilde sitotoksik etki gösterdiği belirlendi.

Literatür incelendiğinde değişik coğrafik bölgelerden toplanan propolis numunelerinden elde edilen ekstraktların çeşitli kanser hücre serilerinde *in vitro* sitotoksik etki gösterebildiğinin bildirildiği görülmektedir. Portekiz propolisinin metanollü ekstraktının renal kanseri (144), Yunan propolisinin bütanollü ekstraktının kolon kanseri (145), Tayland propolisinin metanollü ekstraktlarının karaciğer, mide ve kolon kanseri (125), kırmızı Brezilya propolisinin etanollü ekstraktının larinks ve over kanseri (141), Sırp propolisinin etanollü ekstraktlarının kolon kanseri (146), Türk propolisinin sulu ve DMSO'lu ekstraktlarının prostat kanseri (13), sulu ve etanollü ekstraktlarının larinks kanser (135) hücre serilerinde sitotoksik etki gösterdikleri bildirilmektedir.

Propolis ekstraktlarının A549 hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin incelendiği çalışmalarda ise; Koudhi ve arkadaşları Tunus propolisinin etanollü ekstraktlarının sitotoksik etkinliğini de kapsayan çalışmalarında ekstraktın kolon (HT-29) ve larinks (Hep-2) hücrelerinde normal fibroblast hücrelerine göre ($IC_{50}=55 \mu g/mL$) seçici bir şekilde sitotoksik etki gösterdiğini fakat aynı seçiciliğin A549 hücre serisinde ($IC_{50}=200 \mu g/mL$) görülemediğini bildirmişlerdir (147). Herrera ve arkadaşları ise Küba'nın farklı yerlerinden toplanan propolis numunelerinin DMSO'lu ekstraktlarının A549 hücre serisinin çoğalmasını seçici bir şekilde inhibe ettiğini ve fibroblast hücrelerine göre seçicilik indeksinin 0.8-3.2 arasında değiştiğini, apoptotik bulgulara rastlanmayıp nekrotik görüntüler elde edildiğini belirtmişlerdir (130). Bu açıdan bakıldığında Türk propolisinin etanollü ekstraktının da diğer bölge propolislerinden elde edilen ekstraktlar gibi A549 hücre serisinde sergilediği sitotoksik etkinin seçici olduğu belirlendi.

Çalışmada Türk propolisinin etanollü ekstraktlarının A549 hücre serisi üzerindeki seçici sitotoksik etkinliğinin mekanizmasını belirleyebilmek benzer çalışmalarda kullanılması önerilen yöntemler ile (66, 97, 116, 148) ekstraktın hücre döngüsüne ve apoptoza olan etkileri araştırıldı. Sitotoksik etki mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda sitotoksikite deneylerinden elde edilen değerlerden hesaplanan IC_{50} değerlerinin ya da IC_{50} değerine yakın konsantrasyonların kullanılması tercih edilen bir yaklaşımdır. Artan konsantrasyonunun etkisini görebilmek adına IC_{50} konsantrasyonu yanında IC_{50} 'nin yaklaşık iki katı konsantrasyonu ifade eden IC_{90} konsantrasyonu da beraberce kullanılabilir (149, 150). Bu nedenle flow sitometrik analizlerde ve gen ekspresyonu çalışmalarında A549 hücre serisi için etanollü propolis ekstraktının IC_{50} ve IC_{90} konsantrasyonları tercih edildi.

Hücre döngüsünün kusursuz bir biçimde ilerleyişinde her bir evreden bir diğerine geçişin "kontrol noktaları" adı verilen sensör mekanizmalar tarafından sürekli izlendiği bilinmektedir. Hücre döngüsü kontrol noktalarının işlevsizliği kanser gibi aşırı hücre çoğalmasıyla karakterize hastalıkların gelişmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle kanser hücrelerini hücre döngüsünün belirli evrelerinde durdurabilmek antikanser terapide hedef yaklaşımlardan birisidir (94). Buradan yola çıkarak gerçekleştirilen hücre döngüsü analizinde, propolis ekstraktının özellikle IC₉₀ konsantrasyonunun A549 hücrelerini hücre döngüsünün G₁ evresinde durdurduğu ve sentez evresine giren hücre sayısını azalttığı görüldü. Propolis ve ondan izole edilen bileşiklerden özellikle krisin, kuersetin ve CAPE'nin farklı kanser hücre serilerinde (glioma, kolon, meme, prostat, histiyositik lenfoma gibi) gösterdikleri antiproliferatif etkinin hücre döngüsünü G₁ ya da G₂/M evrelerinde durdurabilmelerinden, mekanizmanın ise siklinler ve CDK'ların ekspresyonlarının azaltılması ya da p21 ve p27 gibi hücre döngüsü inhibitörlerinin artırılması aracılığı ile işlediği belirtilmektedir (8, 9, 151). Yapılan literatür taramalarında propolisin A549 hücre serilerinin hücre döngüsü üzerindeki etkisini ortaya koyan bir çalışma bulunamamış olmakla birlikte, Türk propolisinin etanollü ekstraktının A549 hücrelerini hücre döngüsünün G₁ evresinde durdurabilmesinin muhtemel sebepleri; CDK2/siklin E kompleksinin inhibe edilmesi ya da p21 ve p27 ekspresyonunun artırılması olabilir ve etkinin bu yönüyle de araştırılmasının gerektiği kanaatindeyiz.

Etanollü propolis ekstraktının A549 hücrelerinde apoptoz ve ER stresi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda; ekstraktın IC₅₀ konsantrasyonunun sadece anneksin V pozitif dolayısıyla erken apoptotik hücre sayısını arttırdığı, sağlıklı hücre sayısını azalttığı, mitokondri membran potansiyelini değiştirmede, CHOP protein ekspresyonu artışından dolayı ER stresini ve kaspaz aktivitesini arttırdığı belirlendi.

Ekstraktın IC₉₀ konsantrasyonunun ise anneksin V analizinde nekrotik ya da geç apoptotik sınıfına giren hücre sayısını arttırdığı, sağlıklı hücre sayısını azalttığı, mitokondri membran potansiyelini azaltıp, CHOP protein ekspresyonu artışından dolayı ER stresini ve kaspaz aktivitesini arttırdığı belirlendi.

Literatürde propolis ve propolisten izole edilen maddelerin apoptoz üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde; Kamiya ve arkadaşları kırmızı Brezilya propolisinin etanollü ekstraktlarının meme (MCF-7) kanseri hücre serilerinde kaspaz

aktivitesini arttırarak DNA fragmentasyonu oluşturduğunu, Bax artışına ve Bcl-2 azalmasına neden olarak apoptotik prosesleri harekete geçirdiğini, CHOP ekspresyonunu arttırarak ER stresi üzerinden mitokondriyal apoptoz mekanizmasının aktiflendiğini bildirmişlerdir (152). Akao ve arkadaşları Brezilya propolisinin etanollü ekstraktının ve ondan izole edilen baccharin, drupanin ve artepilin C bileşiklerinin apoptozu arttırmak suretiyle kolon (SW-480) ve lösemi (HL-60) hücre serilerinde apoptotik etki gösterdiklerini vurgulamışlardır (153). Yine propolisin ana bileşenlerinden olan kuersetinin meme (MCF-7) kanseri hücre serilerinde; hem dış apoptoz yolağını aktifleyerek, hem ER stresini dolayısıyla artmış ER stresi belirteçlerinden CHOP ekspresyonunu 24 ve 48. saatlerde arttırarak mitokondri bağımlı apoptozu indükleyerek, hem de hücre döngüsünü S fazında tutuklayarak sitotoksik etki gösterebildiğini bildirilmektedir (154).

Elde edilen sonuçlar ve literatür bilgileri ışığında ekstraktın IC₉₀ konsantrasyonunda görülen proapoptotik etkinin; iç apoptoz yolağının ve ER stresinin indüklenmesi sonucu artan kaspaz aktivitesi üzerinden gerçekleşmiş olduğu, ekstraktın IC₅₀ konsantrasyonunda görülen proapoptotik etkinin ise indüklenmiş ER stresi üzerinden mitokondriden bağımsız, artmış kaspaz aktivitesi ile ortaya çıkmış olabileceği kanaatine varıldı.

Propolis ekstraktının sitotoksik etkisinin hücre döngüsü ve apoptoz yolları üzerinden nasıl gerçekleştiği konusunda fikir vermesi açısından propolis ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelerde hücre içi ROS miktarı bu amaçla sıkça kullanılan floresan bir prob olan CM-H₂DCFDA kullanılarak ölçüldü (133, 134). Hücre içi ROS seviyelerinin belirlenmesi deneyinde kullanılacak uygun boya konsantrasyonu, hücre sayısı ve muamele süreleri bölümümüzde daha önce yapılan bir yüksek lisans çalışması (135) göz önüne alınarak, ölçümde kullanılan florometre sisteminin tayin üst sınırını geçmeden sonuç alabilmek üzere tasarlandı. Bu nedenle çalışmanın bütünüyle korelasyon göstermesi gereken 72 saatlik muamele sürelerinde elde edilen büyük floresans ışımlar doğru ölçülemediği için hücre içi ROS ölçümü 4 saatlik muamele sürelerinde gerçekleştirildi. Propolisin zengin polifenolik içeriğine bağlı olarak Janus etki gösterdiğinin görüldüğü çalışmada propolisin etanollü ekstraktının 100 µg/mL konsantrasyonda hücre içi ROS miktarını anlamlı olarak arttırdığı görüldü (P<0.05). 50 ve 75 µg/mL konsantrasyonlarda görülen hücre içi ROS miktarındaki azalmanın ekstraktın antioksidan özelliği ile serbest radikalleri süpürme aktivitesinden, 100 µg/mL konsantrasyonun üzerindeki hücre içi ROS miktarındaki azalmasının ise ekstraktın hücre canlılığını aşırı azaltmasından kaynaklanıyor

olabileceği kanaatine varıldı. Bu çalışma ile hazırlanan etanollü propolis ekstraktının uygun konsantrasyon ve muamele sürelerinde hücre içi ROS miktarını arttırabildiği sonucuna varıldı.

Polifenollerin ve polifenolce zengin ekstraktların antikanser ve apoptoz uyarıcı özellik göstermeleri, onların antioksidan gücünden ziyade pro-oksidan özellikte olabilmelerinden kaynaklanmaktadır (155). Metabolik hızı normal hücrelere göre son derece yüksek olan kanser hücrelerinde, transferrin reseptörünün artmış ekspresyonu nedeniyle fazla miktarda ağır metal bulunabilmektedir. Bu fazla miktardaki ağır metal varlığında antioksidanların kendileri okside olup pro-oksidan karakter sergileyebilmektedir (85). Örneğin polifenollerin pro-oksidan özelliği neticesinde hücre içinde artan ROS kanserli hücrelerde apoptotik DNA fragmentasyonuna neden olabilmektedir (155). Literatürde propolis ekstraktlarının ve propolisten izole edilen bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda hücre içi ROS miktarını arttırarak sitotoksik etki mekanizmalarını harekete geçirebildiğine dair çalışmalar mevcuttur. Çin propolisinin etanollü ekstraktının meme kanseri (MCF-7 ve MDA-MB-231) hücre serilerindeki sitotoksik etkinliğinin; ekstraktın yüksek konsantrasyonlarda Janus özellik sergileyerek hücre içi ROS miktarını arttırarak, mitokondri membran potansiyelini azaltarak ve apoptozu indükleyerek gerçekleştirdiği (156), Şili propolisinin etanollü ekstraktının ağız (KB), kolon (Caco-2) ve prostat (DU-145) hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin, ekstraktın bu hücre serilerinde ROS artışına bağlı olarak DNA hasarı oluşturarak gösterdiği (157) bildirilmektedir. Lee ve arkadaşları ise propolis içeriğinde bulunan CAPE'nin C6 glioma hücre serisindeki sitotoksik etkinliğinin CAPE'nin; mitokondriyal apoptoz yolağı üzerinden kaspazları aktifleyerek, Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinleri arttırarak, Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinleri ve hücre içi glutatyonu azaltmak suretiyle hücre içi ROS miktarını arttırarak kanser hücrelerini öldürebildiğini savunmuşlardır (149). Diyetle meyve ve sebzelerden alınabilen, propolisin de bileşenlerinden biri olan kuersetin çok güçlü antioksidan karakterde bir flavonoiddir. DNA hasarını engelleyebildiği için kemopreventif özellikte olduğu bildirilmektedir. Bunun yanı sıra kuersetinin doza, maruz kalma süresi ve hücre tipine göre pro-oksidan karakter sergileyebildiği ve kanser hücrelerinde DNA hasarı yapabildiği de gösterilmiştir. Ayrıca PI3K ve Akt sinyal yollarını inhibe edebildiği, Bcl-2 gibi antiapoptotik protein miktarını azaltabildiği, survivin gibi kaspazlara doğrudan bağlanarak onları inhibe eden proteinleri inaktive etmek suretiyle kaspaz aktivasyonu

sağlayabildiği ve antioksidan enzim ekspresyonunu azaltarak ROS artışına sebep olabildiği de vurgulanmaktadır (1).

Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan propolis numunelerinde daha çok kuersetin, benzoik asit, kafeik asit, ferulik asit, krisin, mirisetin, kumarik asit gibi bileşikler saptanırken; vanilik asit, klorogenik asit, epikateşin, rutin, şiringik asit ve o-kumarik asit gibi bileşiklerin az miktarlarda bulunduğu bildirilmektedir (139, 158-160). Uzel ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise Trabzon yöresinden toplanan propolis numunelerinin başta pinocembrin olmak üzere isalpinin, pinostropin, naringenin, krisin, 3,4,7-trimetoksi flavanon, pinobanksin, kuersetin, galangin, apigenin, benzoik asit ve kafeik asit gibi bileşiklerce zengin olduğunu gösterilmiştir (161). Çeşitli doğal ürünlerden hazırlanan ekstraktların sitotoksik özelliklerinin incelendiği çalışmalarda, öncelikle ekstraktın bütün haldeki etkisinin incelendiği ve sonuçların sinerjik etkiye atfedildiği görülmektedir. İlerleyen çalışmalarda ise etkinin görüldüğü fraksiyondan çeşitli izolasyonlar yapılarak içerikteki bileşenlerin bireysel etkileri değerlendirilmektedir (162). Bu çalışma, Türk propolisinin etanollü ekstraktının A549 hücre serisindeki sitotoksik etkisinin; hücre döngüsünün durdurularak, apoptozun, ER stresinin ve hücre içi ROS miktarının arttırılarak ortaya çıktığını belirleyen ilk çalışma olup, propolisin belirlenen seçici sitotoksik etkisine içeriğinde bulunan tüm bileşenlerin katkı verebilmiş olabileceği sonucuna varılmıştır. Buradan hareketle, kullanılan propolis numunelerinin içeriğinin aydınlatılıp, çalışmaların farklı kanser hücre serilerinde ve deneysel yaklaşımlarla devam ettirilmesinin, klinik çalışmaların önünü açabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmalardan da elde edilecek müspet verilerle propolisin alternatif, tamamlayıcı bir ürün olarak gıda ve ilaç endüstrisine adaptasyonunun sağlanabileceği, kansere karşı kullanılabileceği öngörülmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T (2012). Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry* 3(2): 156-173.
2. Monteiro LS, Bastos KX, Barbosa-Filho JM, Athayde-Filho PF, Diniz MFFM, Sobral MV (2014). Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article ID 604152*, 15 pages.
3. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
4. Tan W, Lu J, Huang M, Li Y, Chen M, Wu G, Gong J, Zhong Z, Xu Z, Dang Y, Guo J, Chen X, Wang Y (2011). Anticancer natural products isolated from Chinese medicinal herbs. *Chinese Medicine* 6: 27, 15 pages.
5. Fulda S (2010). Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. *Planta Medica* 76: 1075-1079.
6. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article ID 964149*, 11 pages.
7. Bankova V, Popova M, Trusheva B (2014). Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. *Chemistry Central Journal* 8: 1-28.
8. Watanabe MAE, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63: 1378-1386.
9. Sawicka D, Car H, Borawska MH, Niklinski J (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 50(1): 25-37.
10. 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 Research* 29(11): 1343-1346.

11. Vatansever SH, Sorkun K, Gurhan SID, Ozdal Kurt F, Turkoz E, Gencay O, Salih B (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochemica* 112(6): 546-556.
12. Ozdal Kurt F, Vatansever SH, Sorkun K, Gurhan SID, Turkoz E, Gencay O, Salih B (2010). Inhibitory effects of propolis on human osteogenic sarcoma cell proliferation mediated by caspase pathway. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 16(3): 397-404.
13. Barlak Y, Değer O, Colak M, Karataylı SC, Bozdayı AM, Yücesan F (2011). Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Science* 9: 74.
14. Daleprane JB, Abdalla DS (2013). Emerging roles of propolis: Antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article ID 175135*, 8 pages.
15. Burdock GA (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36: 347-363.
16. 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. *Journal of Ethnopharmacology* 80: 67-73.
17. Abubakar MB, Abdullah WZ, Sulaiman SA, Ang BS (2014). Polyphenols as key players for the antileukaemic effects of propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article ID 371730*, 11 pages.
18. Sforcin JM (2007). Propolis and the immune system: A review. *Journal of Ethnopharmacology* 113: 1-14.
19. 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.
20. Turan İ (2011). Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerinde etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

21. Barbaric M, Miskovic K, Bojic M, Loncar MB, Bubalo AS, Debeljak Z, Medic-Saric M (2011). Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology* 135(3): 772-778.
22. Rajoo M, Parolia A, Pau A, Amalraj FD (2014). The role of propolis in inflammation and orofacial pain: A review. *Annual Research & Review in Biology* 4(4): 651-664.
23. Kurek-Gorecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19: 78-101.
24. Banskota AH, Tezuka Y, Andiyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas AAG, Kadota S (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, Netherlands and Chile. *Journal of Ethnopharmacology* 72: 239-246.
25. Borges KS, Brassesco MS, Scrideli CA, Soares AEE, Tone LG (2011). Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genetics and Molecular Biology* 34(2): 310-314.
26. Yang H, Dong Y, Du H, Shi H, Peng Y, Li X (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules* 16: 3444-3455.
27. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksosite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
28. Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82: 513-523.
29. Lairon D, Amiot MJ (1999). Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Current Opinion in Lipidology* 10: 23-28.
30. Metodiewa D, Kochman A, Karolczak S (1997). Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. *Biochemistry and Molecular Biology International* 41: 1067-1075.

31. Heo MY, Sohn SJ, Au WW (2001). Antigenotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research* 448: 135-150.
32. Demir, F (2015). Asit ilave edilmiş farklı çözücülerde hazırlanan *Laurocerasus officinalis roemer* (karayemiş) ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
33. Kolankaya D, Selmanoğlu G, Sorkun K, Sali, B (2002). Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry* 78: 213-217.
34. Szliszka E, Krol W (2013). Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article ID 731940*, 10 pages.
35. Gao K, Henning SM, Niu Y, Youssefian AA, Seram NP, Xu A, Heber D (2006). The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17: 89-95.
36. Ferguson LR (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 475: 89-111.
37. Marchand L (2002). Cancer preventive effects of flavonoids: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56: 296-301.
38. Pereira AD, Andrade SF, Oliveira Swerts MS, Maistro EL (2008). First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2580-2584.
39. Yalçın CÖ (2012). Türk propolis ekstraktlarının iyonizan (γ -Gama) radyasyonla uyarılmış insan fibroblast hücre serileri üzerine olası radyoprotektif etkisinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
40. Benguedouar L, Boussenane HN, Wided K, Alyane M, Rouibah H, Lahouel M (2008). Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 46: 112-119.

41. Bhadauria M (2012). Propolis prevents hepatorenal injury induced by chronic exposure to carbon tetrachloride. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Article ID 235358, 12 pages.
42. Fischer G, Leite FP, Conceicao FR, Dummer LA, Vargas GD, Hübner Sde O, Dellagostin OA, Paulino N, Paulino AS, Vidor T (2007). Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* 25: 1250-1256.
43. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I (2006). Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 3(2): 249-254.
44. Lima de Moura SP, Negri G, Salatino A, Cunha Lima LD, Dourado LPA, Mendes JB, Andrade SP, Ferreira MAND, Cara DC (2011). Aqueous extract of Brazilian green propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Article ID 748283, 8 pages.
45. Çolak M (2003). Miyeloid kanser hücre serilerinde propolis ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
46. Aliyazicioglu Y, Deger O, Ovali E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y, Karahan SC (2005). Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *International Immunopharmacology* 5: 1652-1657.
47. Barlak Y, Deger O, Ucar M, Cakiroglu TN (2015). Effects of Turkish propolis extract on secretion of polymorphonuclear elastase following respiratory burst. *Turkish Journal of Biology* 39: 1-8.
48. Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Cakiroglu TN, Akalin I, Deger O, Bedir A (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H₂O₂-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica* 62(4): 388-396.
49. Khachaananda S, Tragoolpua K, Chantawannakul P, Tragoolpua Y (2013). Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14: 6991-6995.

50. Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC (2000). Propolis; recent advantages in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31: 3-15.
51. Cross CE, Halliwell B, Borish ET (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine* 107(6): 526-545.
52. Halliwell B (2012). Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews* 70(5): 257-265.
53. Brent J, Rumack B (1993). Role of free radicals in toxic hepatic injury I. Free radical Biochemistry. *Clinical Toxicology* 31: 139-171.
54. Dinçer Y, Akçay T (2000). DNA damage. *Turkish Journal of Biochemistry* 25(2): 73-79.
55. Halliwell B (1987). Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB Journal* 1: 358-364.
56. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine* 49(11): 1603-1616.
57. Halliwell B (1999). Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept. *Nutrition Reviews* 57: 104-113.
58. Breinholt VM, Molck AM, Svendsen GW, Daneshvar B, Vinggaard AM, Poulsen M, Dragsted LO (2003). Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3-methylimidazole (4,5-f)-quinoline (IQ) on preneoplastic lesions and on oxidative damage, hormonal status, and detoxification capacity in the rat. *Food and Chemical Toxicology* 41: 1315-1323.
59. Ramos AA, Azqueta A, Pereira-Wilson C, Collins AR (2010). Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 7465-7471.
60. Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sciences* 79: 2056-2068.

61. Sorg O (2004). Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies* 327: 649-662.
62. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki I (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta* 436: 332-347.
63. Von Borstel RC, Higgins JA (1998). Janus carcinogens and mutagens. *Mutation Research* 402: 321-329.
64. Munari CC, Resende FA, Alves JM, Sousa JPB, Bastos JK, Tavares DC (2008). Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in chinese hamster ovary cells. *Planta Medica* 74: 1363-1367.
65. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ (2009). Principles of cancer therapy: Oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136(5): 823-837.
66. Sankari SL, Masthan KMK, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M (2012). Apoptosis in cancer: An update. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13(10): 4873-4878.
67. Nema R, Khare S, Jain P, Pradhan A, Gupta A, Singh D (2013). Natural products potential and scope for modern cancer research. *American Journal of Plant Sciences* 4: 1270-1277.
68. Oliveira PA, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De La Cruz LFP, Lope C (2007). Chemical carcinogenesis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 79(4): 593-616.
69. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
70. Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong K (2000). Molecular and genetic aspects of lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161(4): 1355-1367.
71. Puglisi M, Dolly S, Faria A, Myerson JS, Popat S, O'Brien MER (2010). Treatment options for small cell lung cancer - do we have more choice? *British Journal of Cancer* 102: 629-638.

72. Clegg A, Scott DA, Hewitson P, Sidhu M, Waugh N (2002). Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: A systematic review. *Thorax* 57: 20-28.
73. Jeong SJ, Koh W, Kim B, Kim SH (2011). Are there new therapeutic options for treating lung cancer based on herbal medicines and their metabolites? *Journal of Ethnopharmacology* 138: 652-661.
74. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, Chiao PJ, Achanta G, Arlinghaus RB, Liu J, Huang P (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 10: 241-252.
75. Glasauer A, Sena LA, Diebold LP, Mazar AP, Chandel NS (2014). Targeting SOD1 reduces experimental non-small-cell lung cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 124: 117-128.
76. Glasauer A, Chandel NS (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* 92: 90-101.
77. Kardeh S, Ashkani-Esfahani S, Alizadeh AM (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *European Journal of Pharmacology* 735: 150-168.
78. Han Y, Chen JZ (2013). Oxidative stress induces mitochondrial DNA damage and cytotoxicity through independent mechanisms in human cancer cells. *BioMed Research International* Article ID 825065, 8 pages.
79. Costa A, Scholer-Dahirel A, Mechta-Grigoriou F (2014). The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Seminars in Cancer Biology* 25: 23-32.
80. Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society Transactions* 31: 1441-1444.
81. Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 11: 85-95.

82. Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B, Batteux F (2005). Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 59(4): 169-174.
83. Saeidnia S, Abdollahi M (2013). Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. *Toxicology and Applied Pharmacology* 271: 49-63.
84. Sosa V, Moline T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews* 12: 376-390.
85. Lee WL, Huang JY, Shyur LF (2013). Phytoagents for cancer management: Regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Article ID 925804, 22 pages.
86. Galati G, O'Brien PJ (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine* 37: 287-303.
87. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* 18: 44-51.
88. Crompton M (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal* 341: 233-249.
89. Sandoval-Acuna C, Ferreira J, Speisky H (2014). Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 559: 75-90.
90. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003). The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 36: 131-149.
91. Boonstra J, Post JA (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13.
92. Verbon EH, Post JA, Boonstra J (2012). The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 511: 1-6.

93. Satyanarayana A, Kaldis P (2009). Mammalian cell-cycle regulation: Several CDKs, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28: 2925-2939.
94. Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 138: 255-271.
95. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G (2005). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on cell death. *Cell Death and Differentiation* 12: 1463-1467.
96. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH, Bazan NG, Bertrand MJ, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Breiden DE, Brenner C, Campanella M, Candi E, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, Di Daniele N, Dixit VM, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Fimia GM, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Joseph B, Jost PJ, Kaufmann T, Kepp O, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, Lopez-Otin C, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Meier P, Melino S, Mizushima N, Moll U, Munoz-Pinedo C, Nunez G, Oberst A, Panaretakis T, Penninger JM, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Ravichandran KS, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Shi Y, Simon HU, Stockwell BR, Szabadkai G, Tait SW, Tang HL, Tavernarakis N, Tsujimoto Y, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Villunger A, Wagner EF, Walczak H, White E, Wood WG, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation* 22: 58-73.
97. Henry CM, Hollville E, Martin SJ (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* 61: 90-97.

98. Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK (2001). Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current Science* 80(11): 1387-1396.
99. Elmore S (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35: 495-516.
100. Solakoğlu, Z (2008). Apoptoz: Varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim* 21: 20-25.
101. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, Los MJ (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 61: 43-58.
102. Tomatır AG (2003). Apoptoz: Programlı hücre ölümü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 23: 499-508.
103. Fernald K, Kurokawa M (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology* 23(12): 620-633.
104. Groenendyk J, Michalak M (2005). Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochimica Polonica* 52(2): 381-395.
105. Urrea H, Dufey E, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Hetz C (2013). When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833: 3507-3517.
106. Martinon F (2012). Targeting endoplasmic reticulum signaling pathways in cancer. *Acta Oncologica* 51: 822-830.
107. Gorman AM, Healy SJM, Jager R, Samali A (2012). Stress management at the ER: Regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics* 134: 306-316.
108. Kadowaki H, Nishitoh H, Ichijo H (2004). Survival and apoptosis signals in ER stress: The role of protein kinases. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 28: 93-100.
109. Li Y, Guo Y, Tang J, Jiang J, Chen Z (2014). New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 46: 629-640.

110. Schonthal AH (2012). Endoplasmic reticulum stress: Its role in disease and novel prospects for therapy. Scientifica Article ID 857516, 26 pages.
111. Scull CM, Tabas I (2011). Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31: 2792-2797.
112. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* 288: 369-376.
113. Doyle E, Griffiths JB (1999). *Cell and tissue culture: Laboratory procedures in biotechnology*. John Wiley & Sons, Guildford, UK, 55-76.
114. Demirel D (1995). Flow sitometrik DNA analizinin temel prensipleri. *Türk Patoloji Dergisi* 11(2): 64-65.
115. Taneli F (2007). Methodology of flow cytometry and its role in clinical laboratory. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 5(2): 75-82.
116. Martinez MM, Reif RD, Pappas D (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods* 2: 996-1004.
117. Ulukaya E, Acilan C, Ari F, İkitimur E, Yilmaz Y (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turkish Journal of Biochemistry* 36(3): 261-269.
118. Kubista M, Andrade JM, Bangtsson M, Forootan A (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2-3): 95-125.
119. Wilhelm J, Pingoud A (2003). Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 4(11): 1120-1128.
120. Telmann G, Geulen O (2006). Light cycler 480 real-time PCR system: Innovative solutions for relative quantification. *Biochemica* 4: 16-18.
121. Slinkard K, Singleton VL (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49-55.
122. Çakıroğlu TN (2010). Çeşitli çözücülerde Türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

123. Lin JY, Tang CY (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry* 101: 140-147.
124. Singh R, Singh S, Kumar S, Arora S (2007). Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chemistry* 103: 505-511.
125. Teerasripreecha D, Phuwapraisirisan P, Puthong S, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Chanchao C (2012). *In vitro* antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 27.
126. Mosmann, T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
127. Skinner R, Trujillo A, Ma X, Beierle E (2009). Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells. *Journal of Pediatric Surgery* 44: 212-216.
128. Hsu HF, Huang KH, Lu KJ, Chiou SJ, Yen JH, Chang CC, Houngh JY (2011). *Typhonium blumei* extract inhibits proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Ethnopharmacology* 135: 492-500.
129. Abdi K, Hadadzadeh H, Weil M, Salimi M (2012). Mononuclear copper(II) complex with terpyridine and an extended phenanthroline base, $[Cu(tpy)(dppz)]^{2+}$: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity. *Polyhedron* 31: 638-648.
130. Frion-Herrera Y, Diaz-Garcia A, Rodriguez-Sanchez H, Ruiz-Fuentes J, Monzote-Fidalgo L, Morier-Diaz L, Setzer WN (2013). Cytotoxic effect of Cuban propolis extracts against tumor cells lines. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 1(1): 112-117.
131. Petit PX, Lecoer H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 130(1): 157-167.

132. Farfan A, Yeager T, Moravec R, Niles A (2004). Multiplexing homogeneous cell-based assays. *Cell Notes* 10: 15-18.
133. Kang KA, Lee KH, Zhang R, Piao M, Chae S, Kim KN, Jeon YJ, Park DB, You HJ, Kim JS, Hyun JW (2006). Caffeic acid protects hydrogen peroxide induced cell damage in WI-38 human lung fibroblast cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29(9): 1820-1824.
134. Mısıır, S (2013). Türk propolisinin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının radikal yakalama ve demir şelatlama aktivitesinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
135. Akbulut K (2014). Türk propolisinin sulu ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücre serilerinde hücre içi serbest kalsiyum ve hidrojen peroksit düzeylerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
136. Premratanachai P, Chanchao C (2014). Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(5): 337-344.
137. Sforcin JM, Bankova V (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 133: 253-260.
138. Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1220-1234.
139. Aliyazicioglu R, Sahin H, Erturk O, Ulusoy E, Kolayli S (2013). Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties* 16: 277-287.
140. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84: 329-339.

141. Da Silva Frozza CO, Celi Garcia CS, Gambato G, Oliveira de Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JAP, Roesch-Ely M (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology* 52: 137-142.
142. Yang H, Dong Y, Du H, Shi H, Peng Y, Li X (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules* 16: 3444-3455.
143. Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamed M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry* 103: 729-733.
144. 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 and Chemical Toxicology* 49: 86-92.
145. Pratsinis H, Kletsas D, Melliou E, Chinou I (2010). Antiproliferative activity of Greek propolis. *Journal of Medicinal Food* 13(2): 286-290.
146. Zizic JB, Vukovic NL, Jadranin MB, Andelkovic BD, Tesevic VV, Kacaniova MM, Sukdolak SB, Markovic SD (2013). Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 3001-3009.
147. Kouidhi B, Zmantar T, Bakhrouf A (2010). Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe* 16: 566-571.
148. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews* 109: 3012-3043.
149. Lee YJ, Kuo HC, Chu CY, Wang CJ, Lin WC, Tseng TH (2003). Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical Pharmacology* 66: 2281-2289.

150. Diaz-Carballo D, Malak S, Bardenheuer W, Freistuehler M, Reusch HP (2009). The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16: 9635-9643.
151. Motomura M, Kwon KM, Suh SJ, Lee YC, Kim YK, Lee IS, Kim MS, Kwon DY, Suzuki I, Kim CH (2008). Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26(1): 61-67.
152. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 11065-11070.
153. Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, Araki Y, Mishima S, Nozawa Y (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26(7): 1057-1059.
154. Chou CC, Yang JS, Lu HF, Ip SW, Lo C, Wu CC, Lin JP, Tang NY, Chung JG, Chou MJ, Teng YH, Chen DR (2010). Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Archives of Pharmacal Research* 33(8): 1181-1191.
155. Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A (2000). Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant derived polyphenolic compounds. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 50: 167-171.
156. Xuan H, Li Z, Yan H, Sang Q, Wang K, He Q, Wang Y, Hu F (2014). Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article ID 280120*, 11 pages.
157. Russo A, Cardile V, Sanchez F, Troncoso N, Vanella A, Garbarino JA (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences* 76: 545-558.

158. 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 and Chemical Toxicology* 49: 1592-1597.
159. Duran N, Muz M, Culha G, Duran G, Ozer B (2011). GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitology Research* 108: 95-105.
160. Temiz A, Sener A, Ozkok Tuylu A, Sorkun K, Salih B (2011). Antibacterial activity of bee propolis samples from different geographical regions of Turkey against two foodborne pathogens, *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Turkish Journal of Biology* 35: 503-511.
161. Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Salih B (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research* 160: 189-195.
162. Bufalo MC, Candeias JMG, Sforcin JM (2007). *In vitro* cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 6(4): 483-487.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı Selim DEMİR
Doğum Tarihi 08.10.1983
Telefon 0 462 377 78 89
Medeni Hali Bekar
E-posta selim-demir@hotmail.com
Adres KTÜ SABE, Tıbbi Biyokimya AD,
Trabzon

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi	2002-2007
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2007-2010
Doktora	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2010- 2015

Görev, Unvan	Görev Yeri	Yıl
Arş. Gör.	KTÜ, SABE, Tıbbi Biyokimya AbD	2010-2015

Yabancı Dil: İngilizce

Uzmanlık Alanı: Hücre kültürü, Doğal Ürünler, Oksidatif Stres, Genotoksisite, Kanser

YAYINLAR

1. Aliyazıcıoğlu Y, **Demir S**, Turan İ, Çakıroğlu TN, Akalın İ, Değer O, Bedir A (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H₂O₂ induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica* 62(4): 388-396.
2. Menteşe A, Güven S, Sümer A, Turan İ, **Demir S**, Karahan SC, Alver A (2013). Serum anti-carbonic anhydrase I and II antibodies and polycystic ovary syndrome. *Turkish Journal of Biochemistry* 38(1): 43-48.
3. Hanci H, Odaci E, Kaya H, Aliyazıcıoğlu Y, Turan İ, **Demir S**, Çolakoğlu S (2013). The effect of prenatal exposure to 900-megahertz electromagnetic field on the 21-old-day rat testicle. *Reproductive Toxicology* 42: 203-209.
4. Mentese Ü, Dogan OV, Turan İ, Usta S, Dogan E, Oztas Mentese S, **Demir S**, Özer T, Aykan AÇ, Alver A (2014). Oxidant- antioxidant balance during on-pump coronary artery bypass grafting. *The Scientific World Journal*, Article ID 263058, 5 pages.
5. Menteşe Ü, Doğan OV, Doğan S, Turan İ, Usta S, Demirbaş M, Aykan AÇ, Kılıç A, **Demir S**, Karahan SC (2015). Relation of ischemia modified albumin to myocardial infarction in on-pump coronary artery bypass grafting. *Turk Gogus Kalp Dama* 23(2): 245-250.
6. Das H, Turan İ, **Demir S** (2015). Genetic characterization of the Akkaraman, Morkaraman and Karayaka sheep through microsatellite variation. *Indian Journal of Animal Research*, 49(2): 173-179.
7. Turan I, **Demir S**, Misir S, Kilinc K, Mentese A, Aliyazicioglu Y, Deger O (2015). Cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, Yayınlanmak üzere kabul edildi.
8. Turan İ, Değer O, Aliyazıcıoğlu Y, **Demir S**, Kılınç K, Sümer A (2015). Effects of Turkish propolis on expression of hOGG-1 and NEIL-1. *Turkish Journal of Medical Sciences*, Yayınlanmak üzere kabul edildi.
9. Yalcin CO, Aliyazicioglu Y, **Demir S**, Turan I, Bahat Z, Misir S, Deger O (2015). Evaluation of radioprotective effect of Turkish propolis on foreskin fibroblast cells, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, Yayınlanmak üzere kabul edildi.