



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN SULU
EKSTRAKTININ İNSAN LARİNGEAL
EPİDERMOİD KARSİNOMA (HEP-2) HÜCRE
SERİLERİNDE MİTOKONDRIYAL
MEMBRAN POTANSİYELİNE ETKİSİ**

Sevim ÇERÇİLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN SULU
EKSTRAKTININ İNSAN LARİNGEAL
EPİDERMOİD KARSİNOMA (HEP-2) HÜCRE
SERİLERİNDE MİTOKONDRIYAL MEMBRAN
POTANSİYELİNE ETKİSİ**

Sevim ÇERÇİLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

Yrd. Doç. Dr. İbrahim TURAN (2. Danışman)

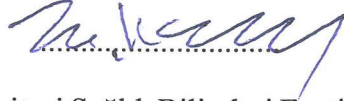
TRABZON-2016

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

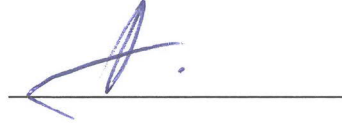
Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



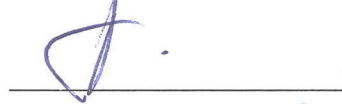
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Sevim ÇERÇİLER'in hazırladığı **“Türk Propolisinin Sulu Ekstraktının İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma (HEp-2) Hücre Serilerinde Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkisi”** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Orhan DEĞER



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Orhan DEĞER



Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU



Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Tarih:/.../201...

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

Tarih: 14.1.2016

Sevim ÇERÇİLER

TEŞEKKÜR

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

Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İbrahim TURAN'a,

K.T.Ü Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç Dr. Selim DEMİR'e,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN, Arş. Gör. Kübra AKBULUT olmak üzere tüm araştırma görevlileri ve lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma,

Hayatımın her alanında bana destek olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan başta annem olmak üzere aileme,

Çalışmalarında ve tez yazım aşamasında benden desteğini esirgemeyen nişanlım Dr. Kayahan EYÜBOĞLU'na en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Sevim ÇERÇİLER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

TABLOLAR DİZİNİ

ix

ŞEKİLLER DİZİNİ

x

KISALTMALAR DİZİNİ

xi

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

4

4.1. Propolis

4

4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

4

4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

5

4.1.2.1. Flavonoidler

7

4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri

9

4.2. Serbest Radikaller

10

4.3. Oksidatif Stres

13

4.3.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları ve Savunma Sistemleri

14

4.4 Kanser

16

4.4.1 İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma Hücre Serileri (HEp-2)

17

4.5. Apoptoz

17

4.5.1. Hücre İçi Apoptotik Yollar

18

4.5.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli

19

5. GEREÇ ve YÖNTEM

22

5.1. Gereç

22

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

22

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

23

5.2. Yöntem

24

5.2.1. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Madde ve Malzemelerin Hazırlanması

24

5.2.2. Hücre Kültürü	25
5.2.2.1. HEp-2 Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	25
5.2.2.2. HEp-2 Hücrelerinin Pasajlanması	26
5.2.2.3. HEp-2 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığının Tespiti	26
5.2.3. HEp-2 Hücre Serisi İçin Uygun DiOC ₆ Konsantrasyonunun Belirlenmesi	26
5.2.4. HEp-2 Hücre Serisi İçin DiOC ₆ Muamele Süresinin Belirlenmesi	26
5.2.5. Etanolun HEp-2 Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	27
5.2.6. HEp-2 Hücre Serisi İçin Propolisin Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkisinin Belirlenmesi	27
5.3. İstatistiksel Analizler	27
6. BULGULAR	28
6.1. Propolisin Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar	28
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	32
8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	36
8.1. Sonuçlar	36
8.2. Öneriler	36
9. KAYNAKLAR	37
10. ÖZGEÇMİŞ	47

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Propoliste bulunan başlıca bileşenler	6
Tablo 2.	Propolisin içerdiği etken maddeler ve bilinen etkileri	7
Tablo 3.	Hücredeki serbest radikal kaynakları	11
Tablo 4.	Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri	12
Tablo 5.	Hem lipofilik hem hidrofilik fazda olan bazı antioksidanlar	15
Tablo 6.	Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları	22
Tablo 7.	Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları ve ürün kodları	23
Tablo 8.	RPMI 1640 Medyum Hazırlığı	25
Tablo 9.	24 saatlik propolis inkübasyonu sonucu MMP hesaplamaları	28
Tablo 10.	48 saatlik propolis inkübasyonu sonucu MMP hesaplamaları	29
Tablo 11.	72 saatlik propolis inkübasyonu sonucu MMP hesaplamaları	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Kovandan toplanan propolis numuneleri	5
Şekil 2.	Flavonoidlerin genel yapısı	8
Şekil 3.	Flavonoidlerin yapısı	9
Şekil 4.	Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	10
Şekil 5.	İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları	19
Şekil 6.	Mitokondri membran potansiyeli analizi sonuçları 1	29
Şekil 7.	Mitokondri membran potansiyeli analizi sonuçları 2	30
Şekil 8.	Mitokondri membran potansiyeli analizi sonuçları 3	31

KISALTMAR DİZİNİ

CAT	Katalaz
DiOC₆	3,3'- Diheksiloksakarbosiyanin İyodür
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FBS	Fetal Bovin Serum
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutasyon S-transferaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
KH₂PO₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
Na₂HPO₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
MMP	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
NaCl	Sodyum Klorür
NaHCO₃	Sodyum Bikarbonat
NO·	Nitrik Oksit Radikali
O₂	Oksijen Molekülü
O₂·⁻	Süperoksit Radikali
OH·	Hidroksil radikali
ONOO·⁻	Peroksinitrit Anyonu
PBS	Fosfat tuz Tamponu
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROT	Reaktif Oksijen Türleri

ÖZET

Türk Propolisinin Sulu Ekstraktının İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma (HEp-2) Hücre Serilerinde Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkisi

Propolis, çeşitli bitkisel kaynaklardan bal arıları tarafından toplanan reçinemsi bir maddedir ve propolis arılar tarafından peteklerde bulunan çatlakları pürüzsüz hale getirip davetsiz misafirlere karşı kovanın girişini korumak için kullanılır. Yapılan çalışmalarda propolis ekstraktlarının değişik kanser hücrelerinde, mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalma meydana getirerek apoptotik hücre ölümünü indüklediği ortaya konmuştur. Bu çalışmada, Türk propolisinin antikanser özelliği dikkate alınarak, insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinde ne tür değişime sebep olduğunun araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada Türk propolisinin sulu (WEP 1-3 mg/mL) ve etanollü (EEP 0.075-3 mg/mL) ekstraktlarının, HEp-2 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi florimetrik yöntemle incelendi. WEP ve EEP' nin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak mitokondriyal membran potansiyellerinin HEp-2 hücre serilerinde kontrole (0 konsantrasyon) göre anlamlı azalttığı bulundu.

Anahtar Kelimeler: İnsan laringeal epidermoid karsinoma, Kanser, Mitokondriyal membran potansiyeli, Propolis, Reaktif oksijen türleri

SUMMARY

Effect of Water Extract of Turkish Propolis on Mitochondrial Membrane Potential in Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma Cell Lines (HEp-2)

Propolis is the generic name for the resinous substance collected by honeybees from the buds of various plant sources and it is used by bees to seal holes in their honeycombs, smooth out the internal walls, and protect the entrance of bee hive against intruders. The recent studies have shown that propolis extracts have induced apoptotic cell death by decreasing mitochondrial membrane potential in various cancer cells. The aim of this study is investigate what kind of changes the Turkish propolis cause on mitochondrial membrane potential of human laryngeal epidermoid cell lines (HEp-2), by considering its anticancer features. For this purpose, the effects the water extracts of Turkish propolis (WEP 1-3 mg/mL) and the ethanolic extracts of Turkish propolis (EEP 0.075-3 mg/mL) to Hep-2 cell lines' mitochondrial membrane potential were investigated by flourometric method. It was concluded that both WEP and EEP decreased mitochondrial membrane potentials on HEp-2 cell series according to control (0 concentration) depending concentration and time.

Key Words: Cancer, Human laryngeal epidermoid carcinoma, Mitochondrial membrane potential, Propolis, Reactive oxygen species

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Propolis, bal arılarının çeşitli bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden topladığı özütleri, bal mumu ve diğer bitkisel maddelerle karıştırarak oluşturduğu, yapışkan, reçinemsi, organik bir maddedir (1). Adını eski Yunanca'dan almakta olup, ön, giriş anlamına gelen “pro” ve topluluk, şehir anlamına gelen “polis” kelimelerinden oluşmaktadır (2). İnsanlar çok eski zamanlardan beri propolisi yaraların iyileştirilmesi, kanser için tedavi edici olarak kullanmışlardır. Propolisin antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar, antibiyotik, antioksidan, immünomodülatör etkileri yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (2-4).

Ham propolisin içeriği arıların propolis elde etmek için kullandıkları bitkinin kaynağına göre değişiklik göstermektedir. Propolis genel olarak %50 oranında reçine ve bitkisel balzam, %30 balmumu, %10 kadar esansiyel ve aromatik yağ, %5 oranında polen ve buna ek olarak %5 kadar da diğer organik maddelerden oluşmaktadır (5).

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif atom veya moleküllerdir (6-8). Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de toksik maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir (9). Oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır (10).

Mitokondri, primer fonksiyonu aerobik solunumu gerçekleştirmek ve hücre içi metabolik yollarda kullanılacak hücresel enerjiyi sentezlemek olan, ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan bir organeldir. Programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ve hücre içi sinyal iletiminde önemli rolü bulunmaktadır (11).

HEp-2 hücre serisi insan nazofaringeal mukozasının laringeal karsinoma hücrelerinden üretilir. Yavaş büyüyen tümör grubundandır (12). Larinksin en sık görülen malign tümörleri epidermoid karsinomlar olup, baş-boyun bölgesindeki epidermoid kanserlerin %26'sı larinkste yerleşmiştir (13). Tüm kanserlerin yaklaşık %2.7'sini ve kansere bağlı ölümlerin ise %2.1'ini oluşturmaktadır (14).

Literatürde Türk propolisinin sulu ekstraktlarının hazırlanarak HEp-2 hücre serilerinde mitokondriyal membran potansiyeline etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılacak olan bu çalışmada fonksiyonel bir gıda olarak antitümöral etkinliği de bilinen antioksidanlarca zengin Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktlarının HEp-2 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi incelenecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Propolis

"Arı tutkalı" olarak da bilinen propolis, arı kovanında dolgu olarak kullanmak için bal arıları tarafından farklı bitki türlerinden toplanarak üretilen bir reçineli malzemedir (15). Bal arıları propolisi, bal mumuna karıştırarak kovan girişinin küçültülmesinde petek yapımında, kovan duvarlarındaki çatlakların kapatılmasında kullanırlar. Buna bağlı olarak propolis bakteri, mantar ve virüslerle mücadelede etkilidir ve kovanda enfeksiyonlara karşı tüm arı popülasyonu için koruyucu olarak görev yapmaktadır (16). Aynı zamanda propolisi kullanarak kovan içerisine giren büyük olup taşınamayan canlıları da mumyalayarak bir enfeksiyon oluşturmamasını önlerler (17).

Propolis üretimi için arılar tarafından kullanılan materyal, bitkilerin yaprak bölgelerinden salgılanan maddeler olabildiği gibi, yapraklardaki lipofilik materyaller ile reçine, zamburak gibi maddeler de olabilmektedir. Arılar bu salgıya daha sonra çeşitli enzimler ile polenden türevlenen maddeler katmaktadırlar (16).

Propolisin içeriğini oluşturan bitkiler at kestanesi (*Aesculus hippocastanum*), kavak (*Populus spp.*), huş (*Betula alba*), kestane (*Castanea sativa*), kayın (*Fagus sylvatica*) akçaağaç (*Alnus glutinosa*) ve çeşitli koniferlerdir (18).

Propolisin antiseptik, ve ateş düşürücü gibi tedavi edici özellikleri nedeniyle İnkalar, Yunanlılar, Mısırlılar, Romalılar gibi eski uygarlıklar tarafından kullanıldığına dair kayıtlar vardır (19). Buna ek olarak, bu doğal bir ürün, aynı zamanda hastalıkların gelişmesini önlemek amacıyla insanların yiyecek ve içeceklerini hazırlanmasında da kullanılmıştır (20). Propolis antibakteriyel, lokal anestezi, antiviral, antiinflamatuvar, antifungal, antiprotazoal ve bağışıklığı uyarıcı gibi çok farklı biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahiptir (21). Hatta propolisin *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* gibi dental çürüklerle ilişkili olan bakterilere karşı büyük bir etkiye sahip olduğu görülmektedir (22).

4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin kokusu, rengi yapısı ve kompozisyonu büyük ölçüde kovanın etrafında bulunan botanik kaynaklara coğrafi konuma ve iklim koşullarına bağlı olarak (23).

Yüksek sıcaklıklarda, yumuşak, esnek ve çok yapışkan olup soğutulduğunda sert ve kırılğan hale gelir. Tipik propolis 70°C’ de sıvıdır ancak bazı örnekler için erime noktası 100°C kadar yüksek olabilir (24).

Propolisin çözünmesi için en yaygın olarak kullanılan çözücüler, etanol, metanol, DMSO, eter, propilen glikol ve sudur (25). Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis örnekleri Şekil 1’de gösterilmiştir (26).



Şekil 1. Kovandan toplanan propolis numuneleri (Turan’dan, 26)

4.1. 2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Propolisin rengi sarı yeşilimsiden koyu kırmızı veya kahverengiye değişir. Propolis kovanda arılar tarafından çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır, rengi ve fiziksel özellikleri kaynağına göre değişmektedir (27). Propolisin kimyasal bileşimi çeşitli ve karmaşık olup toplandığı floraya bağlıdır. Propolisin yaklaşık 300’e yakın bileşik içerdiği ve bu bileşiklerin başlıca flavonoidler, fenolik asitler, terpenoidler, steroidler ve amino asitler olduğu tespit edilmiştir (2).

Propolisin kokusu, rengi ve tıbbi karakteristikleri kaynağına ve sezonuna göre değişmektedir. Genellikle %10 esansiyel yağlar, %25-35 mum ve yağ asitleri, %45-50 reçine ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (5).

Propolisin ortalama %60.2’lik kısmını lipidler oluşturur. Bu miktarın %49.09’unu yağ asitleri, geri kalan bölümünü ise steroller, hidrokarbonlar ve uzun zincirli alkoller gibi sabunlaşmayan maddelerden oluşturur. Palmitik asit ve stearik asit propoliste bulunan doymuş yağ asitlerine örnektir. Doymamış yağ asitlerinden ise nervolik, eikosapentaenoik,

araşidonik, oleik, linoleik ve linolenik asitler propolisten değişen oranlarda izole edilmişlerdir (28, 29).

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler (Demir'den, 30)

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

B1, B2, B6, A, C, E, niasin, pantotenik asit gibi vitaminlerinde propolisin yapısında bulunabildiği gösterilmiştir. Propolis içerisinde triptofan, tirozin, treonin, alanin, fenilalanin, lösin, sistin, metiyonin, valin, serin, histidin, arginin, sistein, prolin, aspartik asit, glutamik ve lizin gibi amino asitlerden oluşmuş olan azot, %0.7 oranında bulunur (31).

Adenozin trifosfataz, suksinat dehidrogenaz, glukoz-6 fosfataz ve asit fosfataz gibi enzimler de yapısında yer almaktadır (32).

Farklı bölgelerden toplanıp elde edilen Türk propolisinin başlıca fenolik bileşenlerinin ise galangin, kuersetin ve kafeik asit olduğu da çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir. Propolisin içerdiği etken maddeler ve bilinen etkileri Tablo 2'de verilmiştir (33).

Tablo 2: Propolisin içerdği etken maddeler ve bilinen etkileri (Akbulut'dan, 33)

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

Apigenin: Antitümöral ve antiülser

Kuersetin: Antitümöral, antimikrobiyal ve spazmolitik

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

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

Artepillin C: Antitümöral, apoptozis indüklemeye, antimikrobiyal, antioksidan

Ferulik asit: Antibakteriyel, antiviral, antitümöral, antiülser

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

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

p-Kumarik asit: Antitümöral ve antiülser

4.1.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler aromatik aminoasitler fenilalanin, tirozin ve malonattan bitkilerde oluşturulmaktadır (34). Flavonoidler, genel olarak glikosil türevleri gibi bitkilerde meydana gelen ve yaprak, çiçek ve meyvelerde mavi, kırmızı ve turuncu tonları katkıda bulunur (35).

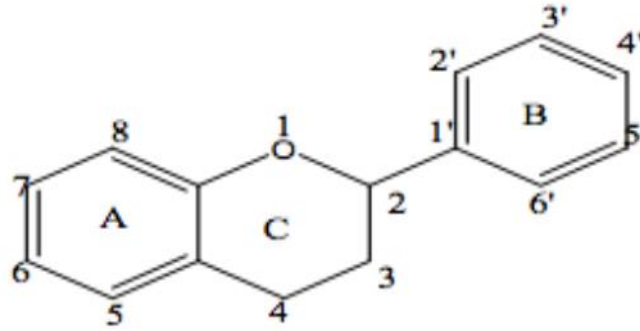
Flavonoidler yıllar önce araştırılma çalışmalarına başlanmış olmasına rağmen son zamanlarda önemli çalışmalar flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra antiinflamatuvar, antialerjik, antitrombotik, antiviral ve diğer özelliklerinin de bulunduğunu göstermektedir. 4000'in üzerinde var olduğu tahmin edilen flavonoidler çay, elma, soğan, baklagiller, domates ve kırmızı şarapta çok fazla bulunmaktadır (36).

Propoliste bulunan flavonoidler esas itibari ile antioksidan aktiviteden sorumludurlar. Bir flavon bileşiği olan pinosembrin, bakteriler, küf ve mayalar üzerine etki etmektedir. Bu flavonla birlikte galangin, 3-asetil pinobanksin, kafeik ve ferulik asitler propolisin biyolojik aktivitelerinin çoğundan sorumludur. Propolisteki diğer bir flavon olan kuersetin, antiviral

aktivite gösterir ve damarların kuvvetlendirilmesini sağlamaktadır. Propolisteki diğer flavonlar ve flavononlar antiinflamatuvar, topikal anestezik ve spazmolitik aktivitelere sahiptir (37).

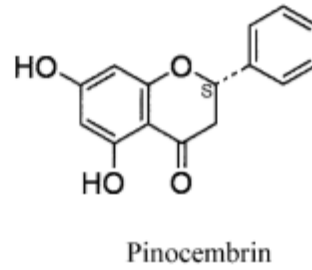
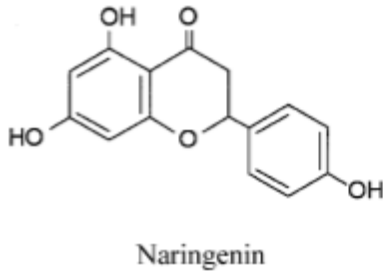
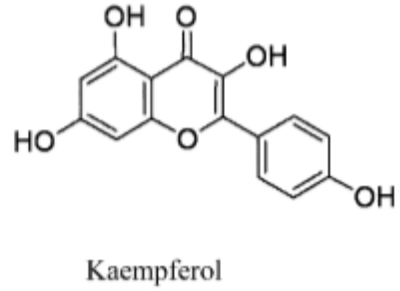
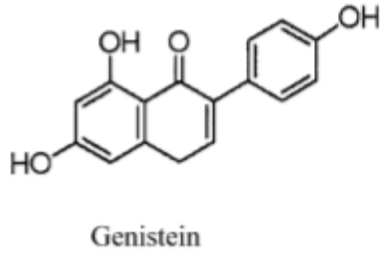
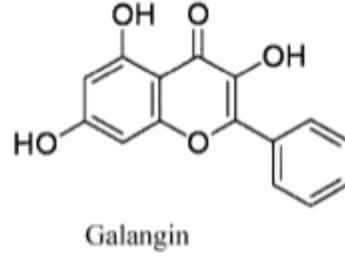
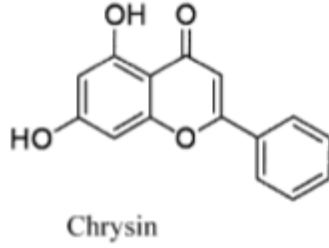
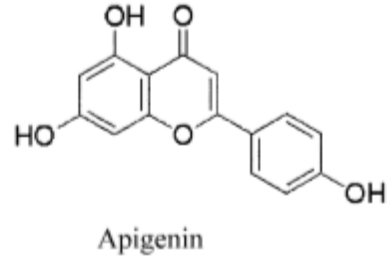
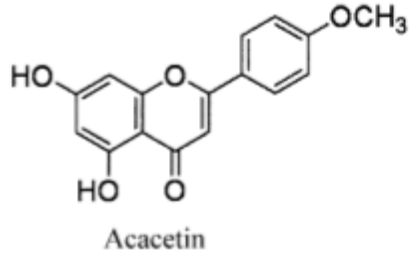
Yapısal farklılıklara dayanarak, flavonoidler altı alt gruplara bölünür; bunlar flavanonlar, flavonlar, flavonoller, flavan-3-oller, antosiyaninler ve isoflavonlardır (38).

Flavonoidlerin genel yapısı Şekil 2’de gösterilmiştir (39).



Şekil 2. Flavonoidlerin genel yapısı (Kumar’dan, 39)

Süperoksit radikali (O_2^-) ve hidroksil radikalini (OH^-) ve singlet oksijeni (O_2^1) temizler. Siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzimlerini inhibe eder. Hücresel regülasyonda önemli enzim fonksiyonlarına bağımlı kalsiyum modülasyonu ile bir rol oynayan küçük bir asidik protein olan kalmodülini inhibe eder (40). Flavonoidlerin örnekleri şekil 3’de gösterilmiştir (41).



Şekil 3. Flavonoidlerin yapısı (Kumar'dan, 41)

4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri

Flavonoidler, aromatik asitler ve esterlerinin propolisin biyolojik aktivitesinden sorumlu bileşikler olduğu düşünülmektedir. Bu aktivitenin fenolik bileşikler ile reçinedeki diğer bileşiklerin sinerjik etkisi ile oluştuğu belirtilmiştir (5).

Propolisin ayrıca, kokaine benzer bir anestezik etkisi vardır, biyolojik dokular üzerinde rejeneratif etkiler ve birçok kanser hücrelerine karşı anti-neoplastik aktivite göstermektedir. Propolis ayrıca hücre bölünmesini ve protein sentezini inhibe

edebilmektedir. Pinosembrin ayrıca antifungal özellikler de göstermektedir. Diğer aktif bileşikler kumarik ve kafeik asit esterleridir (16). Bazı bilim adamları yapılan çözeltilerde propolisin yara iyileştirici etkisinin, propolis içeriğine bağlı olduğunun üzerinde durmaktadır (42).

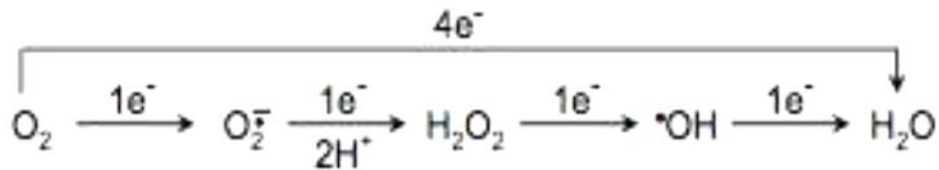
4.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, atomik veya moleküler yörüngelerde bir veya daha fazla ortaklaşmamış elektron bulunduran moleküller ya da moleküler fragmentler olarak tanımlanabilirler. Bu ortaklaşmamış elektron veya elektronlar genellikle serbest radikale önemli derecede reaktivite verir (43). Bu radikaller anyon, katyon veya nötral olabilirler. Serbest radikaller elektron transferi, enerji üretimi gibi diğer işlevlere de katılırlar fakat kontrolsüz davranışları hücrede hasara neden olmaktadır (44, 45).

Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik maddeye zarar verirler. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalık gibi birçok patolojiye sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (45).

Hücrede serbest radikal üretiminin ana kaynağı mitokondrilerdir. Alınan oksijenin yaklaşık %80-90 kadarı burada kullanılmaktadır (46).

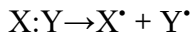
Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktifazot türleri (RNT) normal hücresel metabolizmanın ürünleridir (47). Şekil 4' de ROT'un oluşumu görülmektedir.



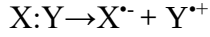
Şekil 4. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu

Serbest radikaller 3 yolla ortaya çıkar;

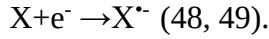
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu her bir parçada ortak elektronlardan biri kalması koşuluyla oluşurlar.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun eksilmesi ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Tablo 3’de hücredeki serbest radikal kaynakları verilmiştir (50).

Tablo 3. Hücredeki serbest radikal kaynakları (Kavas’dan 50)

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

Radikal kavramından bahsedildiğinde genelde oksijen merkezli radikaller akla gelir. Bu kavramın başlıca gerekçeleri şunlardır:

1. Diğer atom merkezli radikaller büyük bir hızla oksijenle tepkimeye girerler ve tepkimede paylaşılmamış elektron oksijen atomu üzerine kayar ve radikal özelliği oksijen atomu üzerinde devam eder.

2. Moleküler oksijen hücrelerde devamlı olarak kullanılmaktadır. Oksijeni kullanabilmek için elektron transferi ile spin kısıtlamasının aşılması gerekir. Bu nedenle de oksijen metabolizması sırasında reaktif radikal türlerinin oluşması kaçınılmazdır.

3. Oksijen elektrofilik bir atom olup, dış orbitaline elektron alarak biyomolekülleri oksitler. Bu sırada kendisinin radikal türleri oluşur. Metal iyonları oksijenin bu tür oksitleyici etkilerini hızlandırırlar (49).

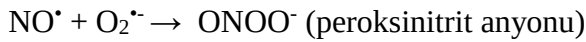
Serbest radikaller hücrelerde endojen veya ekzojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak meydana gelmektedirler. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri tablo 4’de verilmiştir (51).

Tablo 4. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (Özden’ den, 51)

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

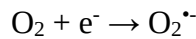
Nitrik oksit nörotransmisyon, savunma mekanizmaları, kan basıncının düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi ve immün regülasyon gibi çok çeşitli fizyolojik süreçlerde rolü olan çok fonksiyonlu bir radikaldir (52-54).

Oksidatif olarak aktif olan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) anyonunu önemli miktarda üretmek için Nitrik oksit ve süperoksit anyonu reaksiyona girerler (43).



Nitratlayıcı olup güçlü oksidan ajandır. DNA kırılması ve lipid peroksidasyonuna sebep olan bu anyon güçlü toksik özelliğe sahiptir (55).

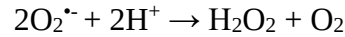
Hem çevresel etkenler ile hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali, $O_2^{\cdot-}$ dir. Süperoksit radikali oksijen molekülüne bir elektronun eklenmesi ile oluşur (48, 56, 57).



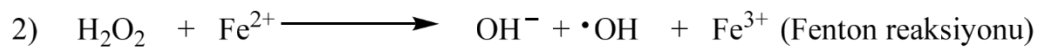
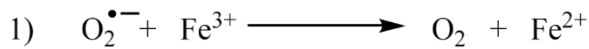
Süperoksit üretimi çoğunlukla bir hücrenin mitokondrisi içinde gerçekleşir. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri memeli hücresinde ATP üretiminin ana kaynağıdır ve bu nedenle yaşam için gereklidir. Süperoksit radikali genellikle çeşitli hastalıkların patofizyolojisinden sorumlu tutulur ve hücrenin mitokondrisinde gerçekleşen elektron taşıma zincirindeki elektron kaçağı ile birlikte oksijenden üretilmektedir (48). Serbest bir radikal olup kendisi direkt olarak fazla zarar vermez (58). Süperoksit radikali, H_2O_2 , $HO^\bullet$ veya 1O_2 gibi diğer ROT'nin oluşumunda önemli bir rol oynar (59).

Hidroksil ($OH^\bullet$) en reaktif oksidan radikalidir (10, 60). Süperoksit radikali Haber-Weiss reaksiyonu ile $OH^\bullet$ 'ne dönüşebilmektedir (43). Hidroksil radikalleri başta lipid, nükleik asitler (DNA ve RNA) ve protein olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler (61).

Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektron veya elektronlara sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. $O_2^\bullet$ üreten herhangi bir sistem aynı zamanda H_2O_2 açığa çıkarır (62). $O_2^\bullet$ 'ye bir elektron transferi (süperoksit dismutasyonu) ya da O_2 'ye iki elektronun eklenmesi (indirgenme) ile veya glikolat oksidaz ve D-amino asit oksidaz ile direkt olarak meydana gelir (63).



Fizyolojik şartlar altında diğer reaktif oksijen partikülleriyle karşılaştırıldığı zaman daha kararlı ve daha az reaktif olmasına rağmen spesifik kimyasal reaksiyonları gerçekleştirme özelliğine sahiptir (64). H_2O_2 bir radikal olmadığı halde, ROT içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü geçiş metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu sonucu; süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve daha çok hasar verici olan hidroksil radikaline dönüşür (65).



4.3. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılmaktadır (66). Vücuttaki

fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar (67).

Oksidatif stres oluşumuna birçok kaynak sebep olmakla beraber, bu kaynaklar iki madde ile özetlenebilir (44, 68).

- Beslenme bozukluklarına bağlı olarak gerçekleşen antioksidanların yetersizliği,
- Çeşitli patolojik ve kronik hastalıklar sonucu serbest radikallerin üretiminin artmasıdır.

Oksidatif stresin kardiyovasküler hastalık, kanser, nörolojik bozukluklar, diyabet, iskemi/reperfüzyon ve yaşlanmayı içeren çeşitli patolojik durumlarda rol oynadığı bilinmektedir (69).

4.3.1. Antioksidan etki mekanizmaları ve Savunma Sistemleri

Antioksidanların etki mekanizmaları;

1. Toplayıcı etki; Serbest oksijen radikallerini tutarak veya daha zayıf moleküllere dönüştürerek etki gösterirler.
2. Bastırıcı etki; Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen ekleyerek aktivitelerini azaltarak veya inaktif hale dönüştürerek etki gösterirler. Vitaminler ve flavanoidler bu özellikteki antioksidanlardır.
3. Zincir kırıcı etki; Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırıcı etki gösterirler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
4. Onarıcı etki; Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı onarıcı etkiye sahiptirler.
5. Hücresel kinaz kayıplarını önleme; Oksidasyon reaksiyonlarını durdururlar.
6. Enzimatik etki; SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırmak şeklindedir (58).

Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu engellemektedirler. Antioksidanlar, oksidatif zararın DNA'ya olan etkisini ve hücre bölünmesindeki anormal artışı azaltmak suretiyle kansere karşı koruyucu etki yaparlar (58). Organizmalar istenmeyen oksidanlarla farklı şekillerde baş etmeye çalışmaktadır (54). Antioksidan sistem hasar öncesi radikal oluşumunu önler, oksidatif hasarı onarır, hasara uğramış molekülleri temizler ve

mutasyonları önler. Hem lipofilik hem hidrofilik fazda pek çok antioksidan Tabla 4’de özetlenmiştir (70).

Tablo 5. Hem lipofilik hem hidrofilik fazda olan bazı antioksidanlar (Rizo’dan, 70)

Süperoksit Dismutaz(SOD)	Hidrofilik	$O_2^{\bullet\bullet}$ ’nin H_2O_2 ve O_2 ’e dismutasyonu
Katalaz(CAT)	Hidrofilik	H_2O_2 ’nin H_2O ve O_2 ’e dismutasyonu
Glutatyon peroksidaz (GPx)	Hidrofilik veya Lipofilik	R-OOH’nin R-OH indirgenmesi
Glutatyon redüktaz (GR)	Hidrofilik	Okside glutatyonun indirgenmesi
Glutatyon S Transferaz (GST)	Hidrofilik	R-OOH’nin GSH ile konjugasyonu
Metallotieninler	Hidrofilik	Geçiş metalleriyle nötralizasyon
Tiyoredoksinler	Hidrofilik	R-S-S-R’nin R-SH’a indirgenmesi
Ubikinon	Lipofilik	Serbest radikal temizleyicisi ve Lipid peroksidasyonunda korunma
Askorbik asit	Hidrofilik	Serbest radikal temizleyicisi ve Tokoferol kazanımı
Karotenler	Lipofilik	Serbest radikal temizleyicisi ve $O_2^{\bullet}$ baskılayıcı
Tokoferol	Lipofilik	Selenyum absorpsiyonunu artırır, Serbest radikal temizleyicisi ve Lipid peroksidasyonunda korunması
Selenyum	Amfifilik	Tiyoredoksin, GSH-Px yapıtaşı

4.4. Kanser

Kanser; hücre ölümü ve çoğalması 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. 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 (71).

Kanser, gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklardan sonra, gelişmekte olan ülkelerde ise kazalardan sonra tüm dünyadaki ölümlerin %12'sini oluşturan önemli bir sağlık problemidir (72). Kanser sıklığının bu kadar yüksek olması; popülasyonun yaş ortalaması, beslenme alışkanlığı, çevresel karsinojenlere maruz kalma süresi gibi 21 demografik durumlardan kaynaklanabilmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı; 2008 yılında 12.7 milyon olan kanser vakası sayısının 2030 yılında 21.4 milyona ulaşacağını öngörmektedir (73).

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 biyomolekülü olan DNA'da meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Normalde hücreler tamir yetenekleri ile DNA'larını tamir edebilmekteyken, 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 (74).

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.

Kanserin ortaya çıkışında moleküler anlamda iki temel mekanizmanın olduğu ileri sürülmektedir:

1. Proto-onkogenlerin fonksiyon kazanıp onkogen haline gelmesi.
2. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarının azalması (71).

4.4.1 İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma Hücre Serileri (HEp-2)

Larenks kanseri, baş boyun kanserlerinden sıklıkla görülmekle birlikte malign baş boyun tümörlerinin yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (75). Dünya nüfusunda yılda yaklaşık 190.000 kişide bu hastalık teşhis edilir, daha da önemlisi, sayı her geçen yıl artmaktadır (75, 76). Tüm kanserlerin yaklaşık %2.7'sini ve kansere bağlı ölümlerin ise %2.1'ini oluşturmaktadır (14).

HEp-2 hücre serisi insan nazofaringeal mukozasının laringeal karsinoma hücrelerinden üretilir. Yavaş büyüyen tümör grubundandır (77). Larenks kanseri, ses ve solunumda yaptığı değişikliklerden dolayı nispeten erken teşhis edilebilmektedir. Değişik ülkelerde zamana ve maruz kalınan risk faktörlerine göre hastalığın şekli değişebilmektedir. Larenks kanser gelişimine tütün, alkol, meslek icabı kalınan risk faktörleri (asbest, çimento tozu, katran, tekstil lifleri, sülfirik asit), diyet ve vitamin eksikliği, radyasyona maruz kalma, viral risk faktörleri, gastroözofageal (larengeofarengal) reflü gibi etkenler sebep olabilmektedir (78, 79).

4.5. Apoptoz

Fizyolojik şartlarda yüksek organizmaların, homeostazının düzenlenmesi ve istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde rol olan apoptoz, kontrollü ve programlı bir hücre ölüm sürecidir (80). Apoptoz; evrim boyunca korunmuş, oldukça kompleks, içsel bir ölüm programı olup embriyogenezde (parmak aralarındaki perdelere 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 (71).

Apoptoz, patolojik bir hücre ölümü olan nekrozdan farklıdır. Apoptozun nekrotik hücre ölümünden çeşitli morfolojik ve biyokimyasal farklılıkları vardır. Apoptozda sitoplazmanın parçalanma sürecinde oluşan kabarcıklar plazma zarı ile korunmuş durumdadırlar. Bu kabarcıklar makrofajlar tarafından fagosit edilirler, ancak herhangi bir yangısal cevap gerçekleşmez. Nekrozda ise hücre şişer, organellerin hacmi artar ve sonuçta patlayarak içeriği hücre dışına atılır. Makrofajlar nekrotik hücre kalıntılarını fagosit ederler ve yangısal cevap oluşmasını sağlayacak moleküller salgırlar (81).

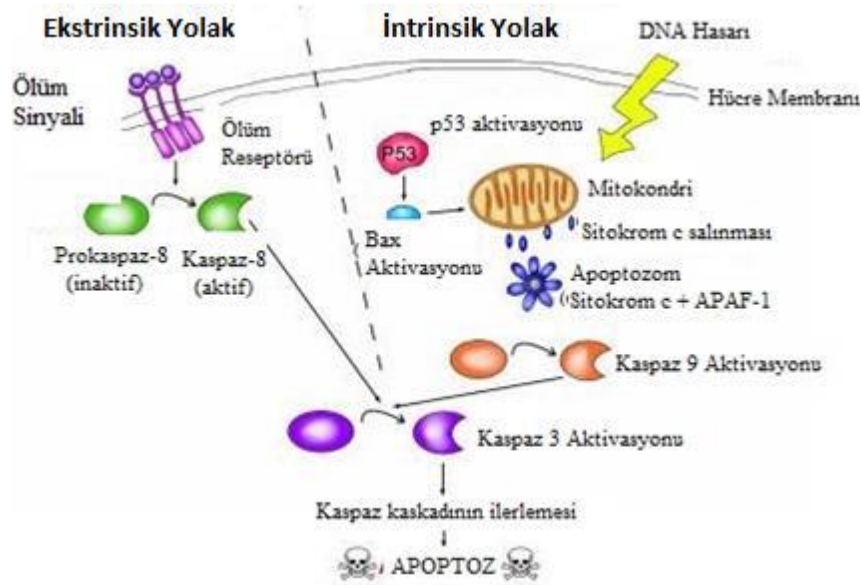
Kaspazları aktifleyerek apoptozu gerçekleştiren üç ana yolak olduğu öne sürölmektedir. Bunlar; intrinsik yolak (mitokondriyal), ekstrinsik yolak (ölüm reseptörlerine bağılı) ve tam olarak aydınlatılamamış ER stresi bağımlı yolaklardır (71).

4.5.1. Hücre İçi Apoptotik Yollar

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 (82).

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. p53'ün insanlarda ve hayvanlarda apoptozun en önemli regölatörü olduğu ileri sürölmekte ve bu transkripsiyon faktörü "genomun gardiyanı" (guardian of genome) olarak tarif edilmektedir. p53 eksikliğınin ya da mutasyonunun doğrudan kansere yatkınlığı ortaya çıkarması p53'ün tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilmesine neden olmuştur (83). Nökleer p53; Mdm2 (Murin double minute 2) geninin ekspresyonunu arttırmakta, Mdm2 ise sürekli p53'e bağlanarak onun ubiquitin ile işareetlenmesini ve proteazomlarda yıkılmasını sağlayan p53'ün negatif regölatörü 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 (84). İntersik ve ekstersik apoptoz yolları Şekil 5'de şematize edilmiştir.



Şekil 5. İntersik ve ekstersik apoptoz yolları (Fernald'dan, 85)

4.6. Mitokondriyal membran potansiyeli

Aerobik koşullar altında yaşamını destekleyen enerji kaynağı olmasının yanı sıra, mitokondri, apoptotik hücre ölümünü başlatan sinyallerin kaynağı olabilir. Mitokondri apoptoz kontrolünde kritik bir rol oynar (88).

Mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$); ATP üretmek ve solunum zinciri fizyolojik fonksiyonlarını korumak için kritik bir rol oynamaktadır. Mitokondriyal işlev bozukluğu ve oksidatif stres pek çok hastalığın patofizyolojisinde ilişkilendirilmiştir. Bu

nedenle, $\Delta\Psi_m$ belirlemek hücrenin fizyolojik durumu ve mitokondri fonksiyonu hakkında önemli ipuçları verebilir (87).

Mitokondri mitokondriyal iç zarı boyunca bir proton gradiyenti olacak şekilde bir zar potansiyeli elde etmek için okside tabakaları kullanmaktadır. Büyüme faktörleri veya hücre dışı glukoz kaynağında kayıp mitokondriyal membran potansiyelinde (MMP) bir azalmaya yol açar (88).

Hücrenin malign transformasyonu hücre membranında o kadar büyük değişikliklere yol açar ki, “kanser, bir membran hastalığıdır” denilebilir. Kanserde görülen membran değişikliklerini şöyle özetleyebiliriz:

1. Hücre yüzeyindeki karbohidrat kalıntılarında değişiklik sonucu membranda yeni karbohidratlar oluşmaya başlar
2. Membranda majör histokompatibilite antijeni (MHA = Doku uygunluğu antijeni) kaybı meydana gelir
3. Sialik asid konsantrasyonunun artmasına bağlı, membranın (-) yükü artar
4. Membrandan karbohidratların ve aminoasidlerin transportu artar
5. Alfa Feto Protein, Karsino Embriyojenik Antijen gibi onkofetal antijenler ortaya çıkar. Bunlara ilaveten membranda çeşitli hormon veya büyüme faktörlerinin reseptörlerinde de değişiklikler olabilmektedir (89. 90).

Mitokondriyal permeabilite proteinleri;

- 1- Sitokrom-C oksidatif fosforilasyon için elektron taşıyıcı. Muhtemelen MPT porlarından salınır.
- 2- Apoptoz indükleyici faktör: Bir flavoprotein olup MPT porlarından salınır.
- 3- Adenin nükleotit transporter: Mitokondriyal iç yapraktan serbestleşir ve MPT porlarının alt yapısında yer alan bir öge görevini yapar.
- 4- Endonükleaz G: MPT porlarından salınır, hücre nükleosuna transloke olur.
- 5- Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspase/Direct IAP binding protein with low pI): Bu protein MPT porlarından salınır; IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) inhibe eder böylece apoptozu hızlandırır.
- 6- VDAC (Voltage dependent anion channel): Mitokondriyal membranda bulunur ve MPT porunun alt yapısının oluşmasında rol alır.

- 7- Mitokondriyal ya da periferel benzodiazepin (MBR ya da PBR): Bu protein mitokondri dış membranda yer alarak MPT porunun yapısına girer.
- 8- Mitokondriyal permeabilite geçiş poru (MPT pore): PBR, ANT ve VDAC' den oluşur. PT porunun açılmasıyla AIF, endonükleaz G ve Smac/DIABLO sitoplasma içine salınarak apoptozu hızlandırır (90).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Saf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar ve saf malzemeler Tablo 6’de verilmiştir.

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

Kullanılan Cihazlar ve Saf Malzemeler	Üretici Firma
Florometre	Spectra Max, Paradigm, Molecular Devices
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO ₂ inkübatörü	Hera Cell 240, Heraeus
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5810
Mikropipetler	Eppendorf
Hassas terazi	Mettler Toledo AB204-S
pH metre	Hanna instrument HI 2211
Çalkalayıcı inkübatör	ShelLab/Sheldon S14-2
Derin dondurucu -80°C	Thermo
Steril falkon tüpler (15 mL, 50 mL)	Cellstar
Steril Pipet uçları (10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Grenier bio-one
cam malzemeler (beher, erlen, balon joje, cam şişe)	Isolab
Membran filtresi	Agilent Econofilter
Vorteks	Windaus, IKA Vortex Genius 3
Steril pastör pipet	
Steril enjektör	
UV lamba	
Etüv	
Eppendorf tüpler	
Parafilm	

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 7’de verilmiştir.

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

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma, ürün kodu ve saflığı
DiOC ₆ (3,3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür)	Sigma-Aldrich, MKBG8160V, ABD
Penisilin streptomisin	Biological Industries, 1245637, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Tripsin EDTA çözeltisi	Biological Industries, 1302762, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Fetal Bovin Serum	Biological Industries, 716779, Kibbutz BeitHaemek, İsrail
NaCl	Merck, K363600, Darmstadt, Almanya
KCl	Merck, TA771535, Darmstadt, Almanya
Na ₂ HPO ₄	Merck, F1021786125, Darmstadt, Almanya
KH ₂ PO ₄	Merck, A153371, Darmstadt, Almanya
CaCl ₂	Merck, K90242787, Darmstadt, Almanya
NaHCO ₃	Merck, K31437329, Darmstadt, Almanya
RPMI 1640	Biological Industries, 1311911, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, BCBG7474V, Fransa

5.2. Yöntem

5.2.1. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Maddeler ve Malzemelerin Hazırlanması

Propolisin Sulu Ekstraktlarının (WEP) Hazırlanması: Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan propolis örnekleri toz haline getirilip karıştırıldı ve Türk propolisi toz karışımı elde edildi. 100 g toz propolis 1000 mL saf su ile çözüldü. İyice vortekslendikten sonra sıcakta sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda çalkalayıcı inkübatörden çıkarılan ekstrakt, süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirildi. Bu şekilde hazırlanan 100 mg/mL'lik konsantrasyondaki stok propolis ekstraktından seyreltme yoluyla çeşitli konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı (0.5-3 mg/mL).

Propolisin Etanolik Ekstraktlarının (EEP) Hazırlanması: Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan propolis örnekleri toz haline getirilip karıştırıldı ve Türk propolisi toz karışımı elde edildi. 200 g toz propolis 1000 mL %70'lik etanol ile çözüldü. İyice vortekslendikten sonra sıcakta sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda çalkalayıcı inkübatörden çıkarılan ekstrakt, süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirildi. Bu şekilde hazırlanan 200 mg/mL'lik konsantrasyondaki stok propolis ekstraktından seyreltme yoluyla çeşitli konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı (0.075-0.3 mg/mL).

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

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

Tablo 8. RPMI 1640 Medyum Hazırlığı

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

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

DiOC₆ çözeltisinin hazırlanması: 1 mg DiOC₆(3,3'Dihexyloxacarbocyanine iodide) üzerine 174.7 µL DMSO eklenerek 10 mM'lık ana stok çözelti hazırlandı ışıktan uzak karanlık ortamda saklandı. 10 mM'lık ana stoktan 15 µL alınarak üzerine 985 µL DMSO eklenerek 150 µM'lık birinci ara stok hazırlandı. Daha sonra elde edilen bu ara stok çözeltiden 13.3 µL alınıp üzerine 986.7 µL DMSO eklenerek 2 µM ikinci ara stok hazırlandı ve son olarak 2 µM'lık ikinci ara stoktan 1 µL alınıp üzerine 199 µL DMSO ilave edilerek 10 nM DiOC₆ çözeltisi elde edildi.

5.2.2. Hücre Kültürü

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

5.2.2.1. HEp-2 Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

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

5.2.2.2 HEp-2 Hücrelerinin Pasajlanması

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

5.2.2.3 Hep-2 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığının Tespiti

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

5.2.3. HEp-2 Hücre Serisi İçin Uygun DiOC₆ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bu çalışmanın öncesinde Kübra Akbulut Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen deney sonucunda çalışmanın yapılacağı uygun hücre sayısının 1000 olduğu tespit etti (33). Uygun boya konsantrasyonu literatür araştırmaları sonucunda 10 nM olacağına karar verilmiştir (91).

5.2.4. HEp-2 Hücre Serisi İçin DiOC₆ Muamele Süresinin Belirlenmesi

Mitokondriyal membran potansiyeli için DiOC₆ ilavesiyle yapılan florometrik okumalarının 30 dakika olduğu literatürde yapılan çalışmalar incelenerek belirlendi (92).

5.2.5. Etanolün Hep-2 Hücre Serisi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Yapılan tüm deneme işlemlerinde pleytin belirli bir kısmına %70'lik etanol ilave edildi. Propolis ilave edilmeyen bu %70 etanol içeren kuyucukların spektrofotometrik okumaları sonucunda %70'lik etanolün etkinliği değerlendirildi.

5.2.6. Propolisin Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkisinin Belirlenmesi

Her bir kuyucukta uygun miktarda hücre olacak şekilde pleyte RPMI 1640 medyum ortamında hücreler ilave edildi. 12 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerin tabana yapıştığı görülerek ortama çeşitli konsantrasyonlarda (WEP için: 1, 2, 3 mg/mL, EEP için: 0.05, 0.075, 0.15 mg/mL, DiOC₆ için: 10 nM) propolis ekstraktları ilave edilerek inkübasyona bırakıldı. 24, 48, 72 saatlik muamele süreleri sonunda hücreler belirlenen konsantrasyonda DiOC₆ ile muamele edilip, spektrofotometri cihazında, 484 nm eksitasyon, 525 nm emisyon dalga boyunda okumalar gerçekleştirildi ve kaydedildi. Hücrelerdeki MMP de değişiklikler RF (Bağıl floresans birimi) olarak değerlendirildi.

5.3. İstatistiksel Analizler

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

6. BULGULAR

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

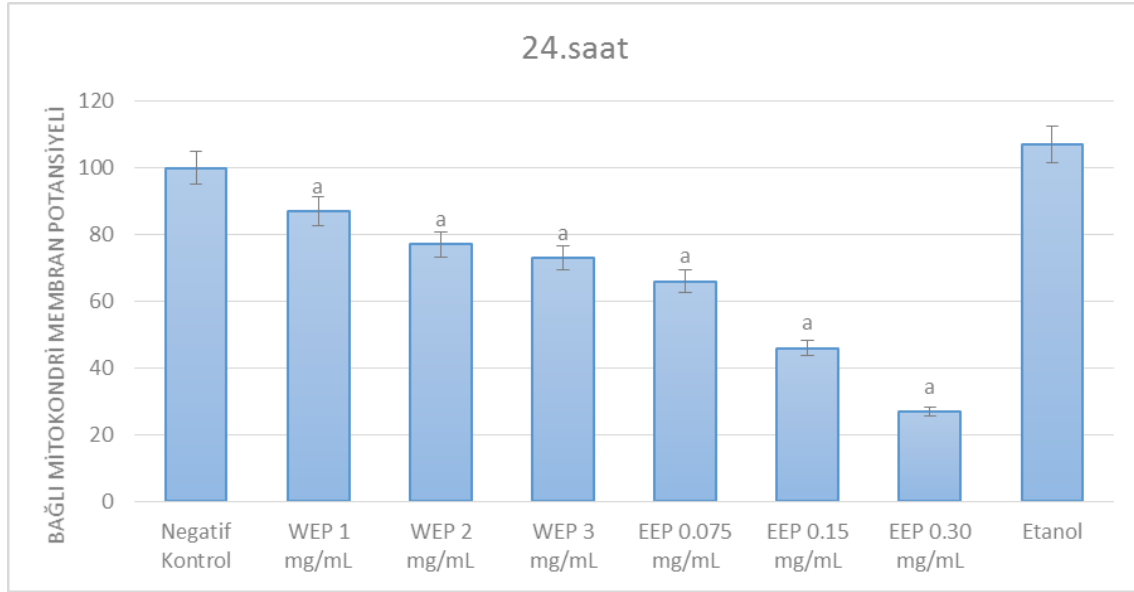
24, 48 ve 72 saatlik propolis inkübasyonunda MMP hesaplamaları aşağıda tablo 9, 10, 11’de verilmiştir. Değerler bağıl mitokondriyal membran potansiyeli cinsinden hesaplanmıştır.

Şekil 6, 7 ve 8’de muamele görmeyen negatif kontrol grubuna göre göreceli mitokondri membran potansiyeli değişimleri görülmektedir. Otuzuncu dakika sonuçlarına göre MMP etkileri açısından; 1, 2 ve 3 mg/mL konsantrasyonlarda WEP ve 0.075, 0.15 ve 0.30 mg/mL konsantrasyonda EEP ile kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü. (sırasıyla $p<0.001$ $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$ $p<0.001$, $p<0.001$).

Tablo 9. 24 saatlik propolis inkübasyonu sonucu MMP hesaplamaları (n=3) [^aNegatif kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü ($p<0.001$)]

Kontrol	WEP 1 mg/mL ($\bar{x} \pm SD$)	WEP 2 mg/mL ($\bar{x} \pm SD$)	WEP 3 mg/mL ($\bar{x} \pm SD$)	EEP 0.075 mg/mL ($\bar{x} \pm SD$)	EEP 0.15 mg/mL ($\bar{x} \pm SD$)	EEP 0.3 mg/mL ($\bar{x} \pm SD$)	Etanol ($\bar{x} \pm SD$)
100	87±0.5 ^a	77±0.4 ^a	73±1.9 ^a	66±0.9 ^a	46± 2.7 ^a	27± 1.3 ^a	107±6.2

(Değerler % cinsinden hesaplanmıştır)

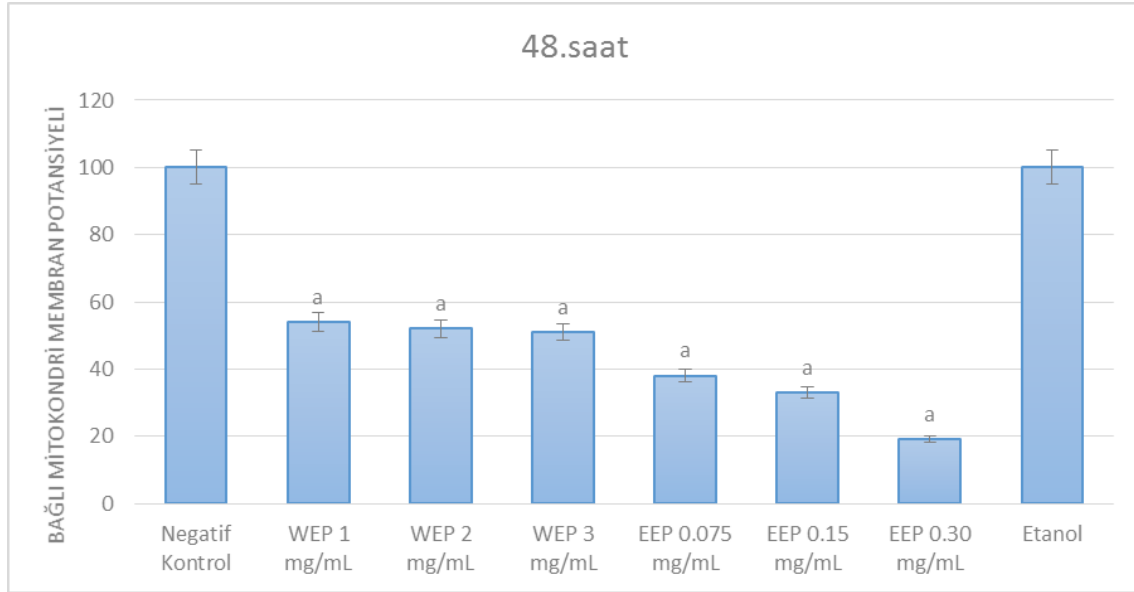


Şekil 6. Mitokondri membran potansiyeli 24 saat propolis inkübasyon analizi sonuçları (n=3) [^aNegatif kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü (p<0.05)]

Tablo 10. 48 saatlik propolis inkübasyonu sonucu MMP hesaplamaları hesaplamaları (n=3) [^aNegatif kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü (p<0.001)]

Kontrol	WEP	WEP	WEP	EEP	EEP	EEP	Etanol
	1 mg/mL	2 mg/mL	3 mg/mL	0.075	0.15	0.3	
	(x ± SD)	(x ± SD)	(x ± SD)	mg/mL	mg/mL	mg/mL	
				(x ± SD)	(x ± SD)	(x ± SD)	(x ± SD)
100	54±2.0 ^a	52±2.3 ^a	51±0.7 ^a	38±0.8 ^a	33±1.9 ^a	19±0.1 ^a	100±10

(Değerler % cinsinden hesaplanmıştır)

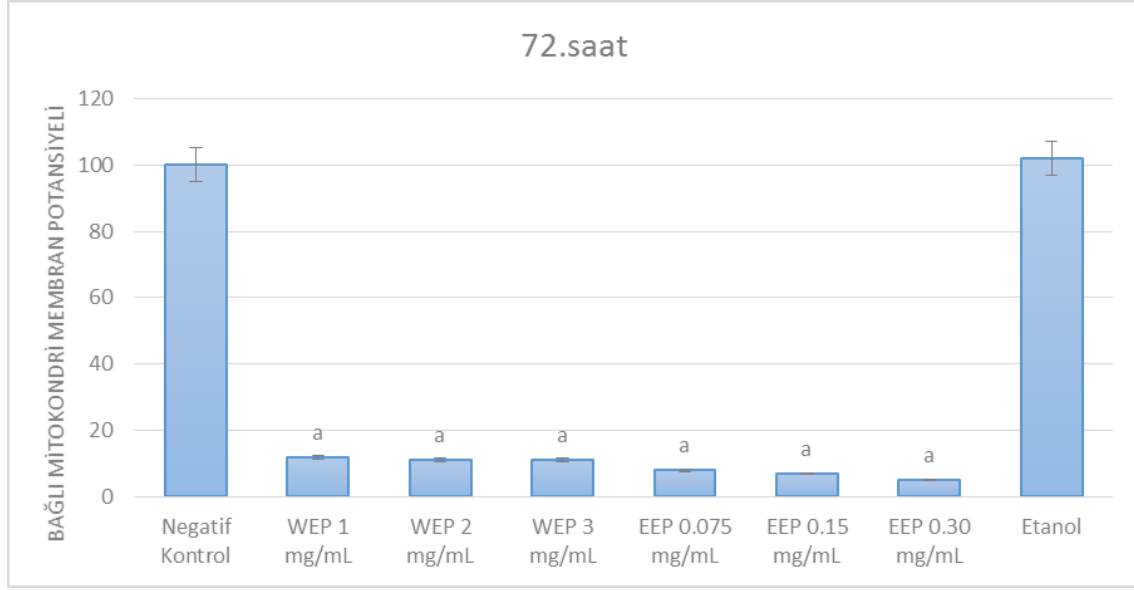


Şekil 7. Mitokondri membran potansiyeli 48 saat propolis inkübasyon analizi sonuçları (n=3) [^aNegatif kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü (p<0.05)]

Tablo 11. 72 saatlik propolis inkübasyonu sonucu MMP hesaplamaları (n=3) [^aNegatif kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü (p<0.001)]

Kontrol	WEP	WEP	WEP	EEP	EEP	EEP	Etanol
	1	2	3	0.075	0.15	0.3	
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	
	(x ± SD)	(x ± SD)	(x ± SD)	(x ± SD)	(x ± SD)	(x ± SD)	(x ± SD)
100	12±0.7 ^a	11±0.5 ^a	11±0.3 ^a	8±0.1 ^a	7±0.3 ^a	5±0.3 ^a	102±2.6

(Değerler % cinsinden hesaplanmıştır)



Şekil 8. Mitokondri membran potansiyeli 72 saat propolis inkübasyon analizi sonuçları (n=3) [^aNegatif kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü (p<0.05)]

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan sağlığında ve kanserin de dahil olduğu bazı kronik hastalıkların gelişiminde diyetel faktörler önemli bir rol oynar. Bazı yiyecekler mutajenler veya karsinojenler kadar anti-tümör bileşikler de içerir. Birçok araştırmanın hedefi, kanserin önlenmesi veya tedavisinde kullanılabilecek doğal ve doğal olmayan bileşikleri keşfetmektir (93).

Arı ürünleri başta bal olmak üzere, yüzyıllardır halk arasında birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (94). Propolis insanların dikkatini tıbbi açıdan binlerce yıl önce çekmiş ve bu doğal ürün eski çağlarda Avrupa ve Kuzey Afrika' da, Mısır, Yunan ve Romalılarca ya çeşitli hastalıkların tedavisinde ya da etkilerinin azaltılmasında yaygın olarak kullanılmıştır (16).

Propolis ilk kez antik çağlarda keşfedilerek doğal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır (95). Propolisin biyolojik aktivitesinden sorumlu bileşiklerin flavonoidler, aromatik asitler ve esterleri olduğu düşünülmektedir. Bu aktivitenin fenolik ve resindeki diğer bileşiklerin sinerjistik etkisi ile oluştuğu belirtilmiştir (4). Aslında, antiinflamatuvar, anti-viral, anestezik, antibakteriyel ve anti-tümöral gibi farklı etkileri propolise tedavi edici önemli özellikler kazandırmaktadır (96).

Tüm dünyada hızla artan antimikrobiyal direnç, hastalık ve ölümlerin sayısının artması ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle alternatif antimikrobiyal maddelerin bulunmasına ve doğal ürünlerle tedaviye yönelik çalışmalar artmaktadır. Zengin besleyici özelliğe sahip arı ürünü olan propolis çok çeşitli biyolojik aktivite göstermektedir (93).

Günümüzde 8000 e yakın flavonoid tanımlanmıştır fakat beslenme ilgili olarak bunlardan çok azı önem taşımaktadır (95, 96). 1990'lerden beri bu bileşiklere ilgi giderek artmaktadır. Flavonoidleri içeren doğal ürünler biyokimyasal ve farmakolojik olarak birçok etkiye sahiptir. Flavonoidlerin kanserden korumaya etkisi; serbest radikal temizleme, karsinojenleri detoksifiye eden enzimleri modifiye etme gibi mekanizmalara dayandırılmaktadır(97-99). Flavonoidlerin, antiinflamatuvar, antikanser, antihepatotoksik, antiviral ve antibakterial aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir (100).

Propolisin tümör hücrelerinde hücre büyümesinin engellenmesi ve apoptozis ile ilgili mekanizmaları son yıllarda çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Apoptozis tarafından programlanmış hücre ölümü kanser gelişimi için doğal bir bariyer görevi görmektedir.

Çünkü bu süreç mutasyona uğramış potansiyel zararlı hücreleri ortadan kaldırmaktadır. Bu durumu destekleyici çalışmalara sık rastlanmaktadır (33).

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Trabzon ilinden toplanan propolis örnekleri ile daha önce çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Çakıroğlu çalışmasında çeşitli çözücülerle (su, etanol, DMSO, gliserol ve aseton) hazırlanan Türk propolis ekstraktlarının çözünürlüğünü, toplam polifenol ve flavonoid içeriğini ve antioksidan özelliklerini ortaya koymuştur. Elde edilen bulgulara göre propolisin en iyi DMSO'da, daha sonra sırasıyla etanol, aseton ve gliserolde, en az suda çözüldüğü kanaatine varılmış ve yapılan HPLC analizleriyle de bu sonuçlar desteklenmiştir (101).

Yapılan bir diğer çalışmada Sulu Türk propolisinin ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücre serilerinde *in vitro* sitotoksik etkisi belilendi. Çalışmada hem WEP hem de EEP'nin HEp-2 hücrelerine sitotoksik etkisi bulunmuştur. Yani, hücre canlılığı azalmıştır (102). Akbulut çalışmasında Türk propolisinin sulu ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücre serilerinde hücre içi serbest kalsiyum ve hidrojen peroksit düzeylerine etkisini incelemiştir. Propolis hücre içi Ca^{2+} ve H_2O_2 miktarını artırmaktadır. Hem H_2O_2 hem de Ca^{2+} seviyelerinde görülen artış hücrenin zamanla apoptoz sürecine doğru ilerleyebileceğini göstermektedir (33). Yine bölümümüzde yapılan bir diğer yüksek lisans tez çalışmasında antioksidan sisteminde yer alan SOD ve CAT enzimlerinin aktiviteleri hesaplanmıştır. HEp-2 hücrelerine propolis verildikten sonra SOD ve CAT aktivitelerinde azalma görüldü. Bu azalmanın HEp-2 hücrelerinde propolisten kaynaklanabileceğini ve aynı zamanda hücrelerin büyümesine engel olabileceğini sonucuna varmıştır (103).

Bizde bu çalışmalardan yola çıkarak, propolisin antikanser özelliği dikkate alınarak, insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinde ne tür değişimlere sebep olduğunu incelemek amacıyla başladık.

Uygun hücre sayısına Akbulut'un yaptığı tez çalışmasını dikkate alarak 1000 olarak kullandık (33). Kullandığımız boya konsantrasyonuna ve boyanın muamele süresine literatür araştırması sonucunda karar verdik. Uygun DiOC₆ konsantrasyonuna literatür incelendiğinde elde edilen araştırmalar sonununca 10 nM olarak karar verdik (91). Yine literatür incelemeleri doğrultusunda boyanın muamele süresinin 30 dakika olacağına karar verilmiştir (92).

Çalışmamızda bağıl mitokondriyal membran potansiyelleri hesaplanmıştır. HEP-2 hücrelerine propolis verildikten sonra mitokondriyal membran potansiyellerinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma görüldü ($p<0.001$). Bu azalmalar Tablo 11, Tablo 12 ve Tablo 13'te verilmiştir. Bu azalmanın HEP-2 hücrelerinde propolisten kaynaklanabileceğini ve aynı zamanda hücrelerin büyümesine engel olabileceğini düşünebiliriz.

Daha önce ana bilim dalımızda gerçekleştirilen bir doktora tezinde etanollü propolis ekstraktının A549 hücrelerinde apoptoz ve ER stresi üzerine etkilerinin çalışmalarında 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 (71).

Yapılan bir diğer çalışmada; çeşitli kanser hücrelerinin apoptoz indüklenmesinde propolis, CAPE ve krisin gibi aktif bileşikler tarafından kullanılan doğal ürün konsantrasyonuna bağlı olduğunu ve propolis kaspaz kaskatını, pro-apoptotik proteinlerin (Bax, Bad, p53, p21) aktivasyonu yoluyla mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımı yoluyla apoptoz içsel yolu aktif ettiğini ileri sürmüşlerdir (104).

Motomura ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada propolisin insan lösemi (U937) hücrelerinde büyümeyi önlediği ve apoptoz indüklediğini ileri sürmüşlerdir. Propolis Kaspaz-3 aktivasyonu ve Bcl-2'nin baskılayarak U937 hücrelerinde apoptoza aracılık edebileceğini söylemişlerdir (105).

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 93 aktivitesini artırarak DNA fragmentasyonu oluşturduğunu, Bax artışına ve Bcl-2 azalmasına neden olarak apoptotik prosesleri harekete geçirdiğini, CHOP ekspresyonunu artırarak ER stresi üzerinden mitokondriyal apoptoz mekanizmasının aktiflendiğini bildirmişlerdir (106). 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 (107).

Lee ve arkadaşları yaptığı çalışmada epigallocatekin-3-galatın (EGCG) HEp-2 hücre serilerinde mitokondriyal membran potansiyelini azaltıp apoptozu indüklediğini ileri sürmüşlerdir (108). Paramasivan ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise *Nelumbo nucifera* (Lotus) bitkisinin tohumundan elde edilen bisbenzilzokinin alkoloid olan neferinin HEPG2 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini kontrol grubuna anlamlı derece de azalttığını ve mitokondriyal membran potansiyelinde olan bu azalmanın apoptozu indükleyeceğini ileri sürmüşlerdir (92).

Polifenollerin ve polifenolce zengin ekstraktların antikanser ve apoptoz uyarıcı özellik göstermeleri, onların antioksidan gücünden ziyade pro-oksidan özellikte olabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Örneğin polifenollerin pro-oksidan özelliği neticesinde hücre içinde artan ROS kanserli hücrelerde apoptotik DNA fragmentasyonuna neden olabilmektedir (109). 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 etanolü 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 bildirilmektedir (110).

Bu çalışma, Türk propolisinin HEp-2 hücre serisindeki sulu ekstraktının mitokondriyal membran potansiyelini anlamlı derecede azalttığı sonucuna varıldı. Buradan hareketle çalışmaların farklı kanser hücre serilerinde ve deneysel yaklaşımlarla devam ettirilmesinin, klinik çalışmaların önünü açabileceği düşünülebilir. Bu çalışmalardan da elde edilecek müspet verilerle propolisin alternatif, tamamlayıcı bir ürün olarak gıda ve ilaç endüstrisine adaptasyonunun sağlanabileceği, kansere karşı kullanılabileceği öngörülebilir.

8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

8.1. Sonuçlar

1. Propolisin sulu ekstraktları, kontrole göre 1, 2 ve 3 mg/mL konsantrasyonlarında HEp-2 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelini konsantrasyon ve zamana bağlı olarak azaltmıştır.
2. Propolisin etanolik ekstraktları, kontrole göre 0.075, 0.15, 0.30 mg/mL konsantrasyonlarında HEp-2 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelini konsantrasyon ve zamana bağlı olarak azaltmıştır.
3. 24, 48 ve 72 saatlik propolis inkübasyonları sonunca en büyük azalma 72 saatlik propolis muamele grubunda görülmüştür.
4. Bu bulgular ışığında, propolisin antikanser etkisini açıklamalara katkı sağlayıp, insan laringeal epidermoid karsinomlarına etkisine ilişkin mevcut sınırlı sayıdaki literatüre katkı sağlanmıştır.

8.2. Öneriler

1. Mitokondriyal membran potansiyeli tayini için başka kanser hücrelerinde de çalışılabilir.
2. Apoptozisi teyid etmek için çalışmalar yapılabilir (Flow sitometrik DNA analizi, Annexin V analizi, DNA fragmentasyonu v.b.).

9. KAYNAKLAR

1. Sartori DRS, Kawakami CL, Orsatti CL, Sforcin JM (2009). Propolis Effect On Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 15(1): 93–102.
2. Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31: 3–15.
3. Maruyama H, Sumitou, Y, Sakamoto T, Araki Y, Hara H (2009). Antihypertensive Effects of Flavonoids Isolated from Brazilian Green Propolis in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biol Pharm Bull* 32(7): 1244–1250.
4. Chaillou LL, Nazareno M (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT - Food Sci and Tech* 42: 1422–1427.
5. Burdock GA (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol* 36(4): 347–363.
6. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafarset K (2003). Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp Biochem Physiol C* 135: 331-336.
7. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.* 10: 141-147.
8. Dilsiz N (2009). Moleküler Biyoloji. *Palme yayıncılık* 146-151.
9. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107:526-45.
10. Ramos R, Martinez-Castelao A. (2008). Lipoperoxidation and hemodialysis. *Metabolism Clinical and Experimental* 57: 1369-1374.
11. Schapira HV (2006). Mitochondrial disease. *Lancet* 368(2): 70-82.
12. Buffalo MC, Candeias JMG, Sousa JPB, Bastos JK, Sforcin JM (2010). Natural Product *Res* 24: 1710-1718.
13. Cann CI, Fried MP, Rothman KJ (1985). Epidemiology of squamous cell cancer of the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am* 18(3): 367-88.

14. Rizo WF, Ferreira LE, Colnaghi V, Martins JS, Franchi LP, Takahashi CS, Beleboni RO, Marins M, Pereira PS, Fachin L (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of coronaridine from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC in a human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2). *Genet Mol Biol* 36(1): 105–110.
15. Wali AF, Avula B, Ali Z, Ikhlas AK, Mushtaq A, Rehman UM, Akbar S, Masoodi MH (2015). Antioxidant, hepatoprotective potential and chemical profiling of propolis ethanolic extract from kashmir himalaya region using UHPLC-DAD-QTOF-MS. *BioMed Res Inter* 393462: 1-10.
16. Castaldo S, Capasso F (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73: 1-6.
17. Basim E, Basim H, Özcan M,(2006). Antibacterial activities of Turkish polen and propolis extracts against plant bacterial pathogen. *J Food Eng* 77: 992-996.
18. Silici S, Kutluca S.(2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol* 99: 69-73.
19. Sforcin JM, Bankova V (2011).Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 133(2): 253–260.
20. Umthong S, Puthong S, Chanchao C (2009).Trigona laeviceps propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. *Am Chinese Medicine* 37(5): 855–865.
21. Azza MM, Abd-El-Rhman (2009). Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunol* 27 (3): 454–459.
22. Uzel A, Sorkun K, Onçağ O (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 160: 189-195.
23. Stock D, Finger D, Schmidt EM (2014). A comparison between characterization and biological properties of brazilian fresh and aged propolis. *Hindawi Publishing Corporation* 257617: 1-10.

24. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 964149: 1-11.
25. Kalyanaraman B (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 1: 244-257.
26. 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.
27. Şahinler N (2000). Arı ürünleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. *MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 5(1-2): 139-148.
28. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR (1987). The analysis of bud exsudate of *populus x euramericana* and of propolis. By Gas Chromatography -Mass Spectrometry. *Proc Royal Soc* 232: 249-272.
29. Dığrak M, Yılmaz Ö, Çelik S, Yıldız S (1995). Propolisdeki yağ asitleri ve antimikrobiyal etkisi üzerine in vitro araştırmalar. *Sci Eng J Fırat Univ* 20: 249-255.
30. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
31. Anonymous: <http://www.mmm.ba/royal-jelly/Propolis-composition.html>. (Eriřim Tarihi 29/12/2015).
32. Yousef MI, Kamel KI, Hassan MS, El-Morsy AM (2010). Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits. *Food Chem Toxicol* 48: 1846–1852.
33. Akbulut K (2014). Türk propolisinin sulu ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücre serilerinde hücreiçi serbest kalsiyum ve hidrojen peroksit düzeylerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

34. Harborne JB, Liss AR, Middleton E, Cody V (1986). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. *American Pharmacol Experimental Therapeutics* 60: 15-24.
35. Brouillard R, Cheminat A (1988). Flavonoids and plant color. *Prog Clin Biol Res.*280:93-106.
36. Kahraman A, Serteser M, Koken T (2002). Flavonoids. *Kocatepe Tıp Dergisi* 3: 1-8.
37. Ötleş S (1995). Bal ve Bal Teknolojisi. *Alaşehir MYO Yayınları* 2: 41-44.
38. D'Archivio M, Filesì C, Benedetto RD, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Super Sanita* 43(4):348-61.
39. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Phytopharmacol* 1: 2-4.
40. Formica JV, Regelson W (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33(12):1061-1080.
41. Kumar S, Pandey AK (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J* 162750: 1-16.
42. Ahn M, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem* 101(4): 1383–1392.
43. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
44. Yılmaz, Z. (2006). Öğrenme ve Hafızanın Şekillendiği Beyin Bölgelerinde Alkolün Oluşturduğu Hasarlarda Propolisin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
45. Koca N, Karadeniz F (2003). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi* 32–37.
46. Wud, Cederbaum AI (2003), Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 27(4): 277-84.

47. Pala FS, Gürkan H (2008). The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Adv Mol Biol* (1): 1-9.
48. Aruoma OI (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Am Oil Chem Soc* 75(2), 199- 212.
49. Kılınç K, Kılınç A (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp D* 33: 110-118.
50. Kavas C (2008). Kurşun aracılı doku hasarında flavonoidlerin rolü. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
51. Özden S (2006). Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
52. Kılınç K, Kılınç A (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp D* 33: 110-118.
53. Archer S (1993). Measurement of nitric-oxide in biological models. *FASEB J* 7:349–360.
54. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593–615.
55. Temel, HE (2008). Demanslı Hastalarda Asetilkolinesteraz Aktivitesi ve Oksidatif Stresin Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitörleri ile Değişimi. Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
56. Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54: 176–186.
57. Davies MJ, Donkor R, Dunster CA, Gee CA, Jonas S, Willson RL (1987). Desferal and superoxide free radicals. *Biochem J* 246, 725- 729.
58. Akkus D (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza yayınları*, Kuzucular ofset, Konya; 3-25.
59. Lee J, Koo N, Min DB (2004). Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals comprehensive. *Food Sci Food Safety* 3: 37-47

60. Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev* 52: 253-265.
61. Jakuzi V (2000). The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy* 101(10): 541–551.
62. Rosen MG, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE (1995). Free radicals and phagocytic cells. *Fed Am Soc Exp Biol J* 9(2): 200- 209.
63. Flora SJ (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol* 53: 1-2.
64. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1758: 994-1003.
65. Halliwell B, Clement MV, Long LH, (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letter* 486: 10-13.
66. Serafini M, Del Rio D (2004) Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 9(3): 145- 152.
67. Dündar Y, Aslan R (1999). Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü, *Hayvancılık Araştırma D* 9(1-2): 32-39.
68. Polat, A. (2004). Safra Kanal Ligasyonu Yapılmış Sıçanlarda Aspirinle Oluşturulan Mide Dokusu Hasarında Melatoninin Etkileri. Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
69. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D and Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 52:601-623.
70. Rizo WF, Ferreira LE, Colnaghi V, Martins JS, Franchi LP, Takahashi CS, Belebani RO, Marins M, Pereira PS, Fachin L (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of coronaridine from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC in a human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2). *Genet Mol Biol* 36(1): 105–110.
71. Demir S (2015). Türk propolisinin akciğer kanseri (A549) hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

72. Ali TS, Baig S (2006). Evaluation of a cancer awareness campaign: Experience with a selected population in Karachi. *Asian Pacific J Cancer Prev* 7: 391-395.
73. Premratanachai P, Chanchao C (2014). Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(5): 337-344.
74. Nema R, Khare S, Jain P, Pradhan A, Gupta A, Singh D (2013). Natural products potential and scope for modern cancer research. *Am J Plant Sci* 4: 1270-1277.
75. Uslu C, Taysi S, Akcay F, Sutbeyaz MY, Bakan N (2003). Serum free and bound sialic acid and alpha-1-acid glycoprotein in patients with laryngeal cancer. *Ann Clin Lab Sci* 33: 156-159.
76. Tamarit CJM, Carrasco LM, Estelles FE, Fernandez MS, Baviera GN, Dalmau GJ (2007). Supraglottic and glottic carcinomas. *Acta Otorhinolaringol Esp* 58: 449-453.
77. Bufalo MC, Candeias JM, Sousa JP, Bastos JK, Sforcin JM (2010). In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. *Nat Prod Res* 24: 1710-1718.
78. Sorg O (2004). Oxidative stres: a theoretical model or biological reality? *Comptes Rendus Biologies* 327: 649-662
79. Lima C, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79: 2056-2068.
80. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 32(5): 414-25.
81. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van de cees CJH, Cornelisse J, Van Dierendonck JH (1993). A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 41: 7-12.
82. Fulda S (2010). Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. *Planta Medica* 76: 1075-1079.
83. 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.

84. 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 Immunol Therapiae Experimentalis* 61: 43-58
85. Fernald K, Kurokawa M (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* 23(12): 620-633.
86. Gottlieb RA (2000). Mitochondria: execution central. *FEBS Lett* 482: 6–12
87. Joshi DC, Bakowska JC (2011). Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. *J Vis Exp* 51: 2074-2078.
88. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH and Thompson CB (2001). Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 21: 5899–5912.
89. Dic G, Marengo G, Albanese NN, Marabeti MR, Musso R, Cancemi P (2013). Pro-teomic profiling of Trastuzumab (Herceptin(R))-sensitive and -resistant SKBR-3 breast cancer cells. *Anticancer Res* 33(2):489-503.
90. Gultekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Dern Araş* 120-130.
91. Jin S, Zhang YQ, Kang XM, Wang JX, Zhao WH (2010). Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Annals Oncol* 21: 263–268.
92. Poornima P, Quency RS, Padma VV (2013). Neferine induces reactive oxygen species mediated intrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells. *Food Chem* 136: 659-667.
93. Orsolic N, Basic I (2005). Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *J Ethnopharmacol* 102: 37-45.
94. Albayrak S, Albayrak S (2008). Propolis: Natural Antimicrobial Matter *Ankara Ecz Fak D* 37 (3) 201–215.

95. Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamed M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry* 103: 729-733.
96. Moreira L, Dias GL, Pereira JA, Estevinho L (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem Toxicol* 46 3482–3485.
97. Erlund I (2004). Review of the flavonoids, quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutri Res* 24:851-874.
98. Wach A, Pyrzynska K, Biesaga M. (2007). Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chem* 100:699-704.
99. Moon YJ, Wang X, Morris ME. (2006). Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol in vitro* 20: 187-210.
100. Zhou J, Wang L, Wang J, Tang N. (2001a). Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal (II) complexes. *Transition Metal Chem* 26:57-63.
101. Çakıroğlu TN (2010). Çeşitli çözücülerde Türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
102. Kulaksız Değer B (2014). Sulu Türk propolisi ekstraktlarının insan Laringeal Epidermoid Karsinoma hücre serilerinde in vitro sitotoksik etkisi. Uzmanlık Tezi, KTÜ Tıp Fakültesi, Trabzon.
103. Ghanbari Taghiabad J (2014). Türk propolisinin sulu ekstraktının insan laringeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücre serilerinde süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeylerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
104. Sawicka D, Car H, Borawska MH, Niklinski J (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 50(1): 25-37.
105. 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 Toxicol and Pharmacol* 26(1): 61-67.

106. 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.
107. 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.
108. Lee JH, Jeong JY, Lee SW, Kim D, Oh SJ, Lim HS (2010). EGCG induces apoptosis in human laryngeal epidermoid carcinoma Hep2 cells via mitochondria with the release of apoptosis-inducing factor and endonuclease G. *Cancer Letters* 290:1 68-75.
109. 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
110. 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*, 11pages.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı: ÇERÇİLER Sevim

Uyruğu: TC

Doğum tarihi ve yeri: 16/02/1990 Trabzon

Medeni hali: Bekar

Telefon: 0462 377 78 89

E-Posta: sevim_cerciler@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü	2011
Lise	Yunus Emre Lisesi	2006

YABANCI DİL

İngilizce