



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SULU TÜRK PROPOLİS EKSTRAKTININ  
t-BHP İLE UYARILMIŞ OKSİDATİF HASARA  
KARŞI KORUYUCU ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

Ertuğrul YİĞİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON – 2017





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SULU TÜRK PROPOLİSİ EKSTRAKTININ  
t-BHP İLE UYARILMIŞ OKSİDATİF HASARA  
KARŞI KORUYUCU ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

Ertuğrul YİĞİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON – 2017

## **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.

08/06/2017

Ertuğrul YİĞİT



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresinde bilimsel, akademik ve insani yönden daima örnek aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman yardımcı olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER'e,

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca her anlamda yetişmemde çok büyük katkı ve emekleri olan değerli hocalarım; Prof Dr. E.Edip KEHA başta olmak üzere Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

Bilimsel ve akademik her anlamda imkanlarını, bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç Dr. Selim DEMİR'e ve K.T.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Arş. Gör. Kübra AKBULUT ÇAKIROĞLU, Dr. Mehmet Akif BİLDİRİCİ, Dr. Tuğba Nigar ÇAKIROĞLU, Katip KORKMAZ, Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN, Akın BODUR, İmran İNCE, Mehmet ERDEM başta olmak üzere tüm araştırma görevlileri ve lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma,

Bu tez çalışmasını gerçekleştirmemde; her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen başta Annem ve Babam olmak üzere bütün aileme teşekkür ederim.

Ertuğrul YİĞİT

## İÇİNDEKİLER

|                                                   | Sayfa |
|---------------------------------------------------|-------|
| <b>KABUL ve ONAY</b>                              |       |
| <b>BEYAN</b>                                      |       |
| <b>TEŞEKKÜR</b>                                   |       |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b>                            | viii  |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                            | ix    |
| <b>KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ</b>  | x     |
| <b>1.ÖZET</b>                                     | 1     |
| <b>2. SUMMARY</b>                                 | 2     |
| <b>3. GİRİŞ ve AMAÇ</b>                           | 3     |
| <b>4. GENEL BİLGİLER</b>                          | 5     |
| 4.1. Propolis                                     | 5     |
| 4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri            | 5     |
| 4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği | 6     |
| 4.1.2.1. Flavonoidler                             | 9     |
| 4.1.2.2. Arı Mumu ve Yağ Asitleri                 | 10    |
| 4.1.2.3. Esansiyel Yağlar                         | 10    |
| 4.1.2.4. Mineral Elementler                       | 10    |
| 4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri           | 10    |
| 4.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem     | 11    |
| 4.2.1. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları   | 13    |
| 4.2.2. Serbest Radikallerin Oluşum Nedenleri      | 14    |
| 4.2.2.1. Endojen Kaynaklar                        | 14    |
| 4.2.2.2. Eksojen Kaynaklar                        | 14    |
| 4.2.3. Serbest Radikal Türleri                    | 15    |
| 4.2.3.1. Süperoksit Radikali                      | 15    |
| 4.2.3.2. Hidrojen Peroksit                        | 15    |
| 4.2.3.3. Hidroksil Radikali                       | 16    |
| 4.2.3.4. Tersiyer Bütil Hidroperoksit             | 16    |
| 4.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri              | 17    |
| 4.3. Antioksidan Savunma Sistemi                  | 19    |

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.1. Antioksidan Enzimler                                                   | 21 |
| 4.3.1.1 Süperoksit Dismutaz                                                   | 21 |
| 4.3.1.2. Katalaz                                                              | 21 |
| 4.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz                                                 | 22 |
| 4.3.2. Antioksidan etki mekanizmaları                                         | 22 |
| 4.4. Oksidatif Stres                                                          | 23 |
| <b>5. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                     | 26 |
| 5.1. Gereç                                                                    | 26 |
| 5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler                                | 26 |
| 5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler                             | 27 |
| 5.2. Yöntem                                                                   | 28 |
| 5.2.1. Sulu Propolis Ekstraktının Hazırlanması                                | 28 |
| 5.2.2. Eritrosit Hücre İzolasyonu                                             | 28 |
| 5.2.3. Tersiyer Butil Hidroperoksit Hazırlanması                              | 28 |
| 5.2.4. Kuersetin Hazırlanması                                                 | 29 |
| 5.2.5. Deneyde Kullanılacak t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi              | 29 |
| 5.2.6. Deneyde Kullanılacak sulu Türk Propolis Konsantrasyonunun Belirlenmesi | 29 |
| 5.2.7. Deneyde Kullanılacak Kuersetin Konsantrasyonunun Belirlenmesi          | 29 |
| 5.2.8. Deney Grupları                                                         | 30 |
| 5.2.9. Eritrosit Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini                        | 30 |
| 5.2.10. Eritrosit Katalaz Aktivitesi Tayini                                   | 33 |
| 5.2.11. Eritrosit Malondialdehit Seviyesinin Belirlenmesi                     | 34 |
| 5.2.12. Eritrosit Toplam Oksidan Kapasite Seviyesinin Belirlenmesi            | 35 |
| 5.2.13. Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasite Seviyesinin Belirlenmesi        | 35 |
| 5.3. İstatiksel Yöntem                                                        | 36 |
| <b>6. BULGULAR</b>                                                            | 37 |
| 6.1. Eritrosit Toplam Oksidan Kapasite Seviyeleri                             | 37 |
| 6.2. Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasite Seviyeleri                         | 38 |
| 6.3. Eritrosit Malondialdehit Seviyeleri                                      | 39 |
| 6.4. Eritrosit Süperoksit Dismutaz Aktivitesi                                 | 40 |
| 6.5. Eritrosit Katalaz Aktivitesi                                             | 41 |
| <b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>                                                   | 43 |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <b>8. KAYNAKLAR</b>         | 50 |
| <b>9. EKLER</b>             | 59 |
| <b>10. ETİK KURUL ONAYI</b> | 63 |
| <b>11.ÖZGEÇMİŞ</b>          | 64 |



## TABLOLAR DİZİNİ

| Tablo                                                                           | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Tablo 1.</b> Propoliste bulunan başlıca bileşenler                           | 7     |
| <b>Tablo 2.</b> Propolisin içerdiği etken maddeler ve bilinen etkileri          | 8     |
| <b>Tablo 3.</b> Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler      | 9     |
| <b>Tablo 4.</b> Oksijen kaynaklı serbest radikaller                             | 12    |
| <b>Tablo 5.</b> Azot kaynaklı serbest radikaller                                | 12    |
| <b>Tablo 6.</b> Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri         | 18    |
| <b>Tablo 7.</b> Endojen ve eksojen antioksidanların sınıflandırılması           | 20    |
| <b>Tablo 8.</b> Çalışmada kullanılan kullanılan cihazlar, alet ve malzemeler    | 25    |
| <b>Tablo 9.</b> Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler            | 26    |
| <b>Tablo 10.</b> Deney Grupları                                                 | 30    |
| <b>Tablo 11.</b> SOD aktivitesi ölçümü                                          | 31    |
| <b>Tablo 12.</b> CAT aktivitesi ölçümü                                          | 33    |
| <b>Tablo 13.</b> Eritrosit MDA ölçümü                                           | 34    |
| <b>Tablo 14.</b> Eritrosit TOK Seviyeleri                                       | 37    |
| <b>Tablo 15.</b> Eritrosit TAK Seviyeleri                                       | 38    |
| <b>Tablo 16.</b> Eritrosit MDA Seviyeleri                                       | 39    |
| <b>Tablo 17.</b> Eritrosit SOD Aktiviteleri                                     | 40    |
| <b>Tablo 18.</b> Eritrosit CAT Aktiviteleri                                     | 41    |
| <b>Tablo 19.</b> Ölçülen Oksidatif Stres Biyobelirteçlerinin Korelasyon Tablosu | 42    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil                                                                                      | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1. Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis                              | 6     |
| Şekil 2. Propoliste bulunan tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları | 9     |
| Şekil 3. Serbest radikallerin oluşum şeması                                                | 11    |
| Şekil 4. t-BHP'nin açık kimyasal formülü                                                   | 17    |
| Şekil 5. Hücrede serbest oksijen radikal aracılı hasar                                     | 18    |
| Şekil 6. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği                                   | 32    |
| Şekil 7. Log (Standart SOD aktivitesi) ve % inhibisyon grafiği                             | 32    |
| Şekil 8. Eritrosit MDA standart grafiği                                                    | 35    |
| Şekil 9. Eritrosit TOK seviyeleri                                                          | 37    |
| Şekil 10. Eritrosit TAK seviyeleri                                                         | 38    |
| Şekil 11. Eritrosit MDA seviyeleri                                                         | 39    |
| Şekil 12. Eritrosit SOD Aktiviteleri                                                       | 40    |
| Şekil 13. Eritrosit CAT Aktiviteleri                                                       | 41    |

## KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

|              |                               |
|--------------|-------------------------------|
| <b>BER</b>   | Baz Eksisyon Tamiri           |
| <b>CAT</b>   | Katalaz                       |
| <b>DMSO</b>  | Dimetil Sülfoksit             |
| <b>DNA</b>   | Deoksiribonükleik Asit        |
| <b>EDTA</b>  | Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| <b>GPx</b>   | Glutasyon Peroksidaz          |
| <b>GR</b>    | Glutasyon Redüktaz            |
| <b>GSH</b>   | Glutasyon                     |
| <b>Hb</b>    | Hemoglobin                    |
| <b>Hct</b>   | Hematokrit                    |
| <b>MDA</b>   | Malondialdehit                |
| <b>NBT</b>   | Nitroblue Tetrazolium         |
| <b>PBS</b>   | Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi |
| <b>RNA</b>   | Ribonükleik Asit              |
| <b>RNS</b>   | Reaktif Azot Türleri          |
| <b>ROS</b>   | Reaktif Oksijen Türleri       |
| <b>SOD</b>   | Süperoksit Dismutaz           |
| <b>TAK</b>   | Toplam Antioksidan Kapasite   |
| <b>TBA</b>   | Tiyobarbitürik Asit           |
| <b>t-BHP</b> | Tersiyer Bütil Hidroperoksit  |
| <b>TCA</b>   | Trikloroasetik Asit           |
| <b>TOK</b>   | Toplam Oksidan Kapasite       |
| <b>XO</b>    | Ksantin Oksidaz               |

### Simgeler

|          |       |
|----------|-------|
| $\alpha$ | Alfa  |
| $\mu$    | Mikro |

**Formüller****CuCl<sub>2</sub>**

Bakır (II) Klorür

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Hidrojen Peroksit

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**

Potasyum Dihidrojen Fosfat

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**

Sodyum Karbonat

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**

Disodyum Hidrojen Fosfat

**NaHCO<sub>3</sub>**

Sodyum Bikarbonat

**NaOH**

Sodyum Hidroksit





## 1. ÖZET

### **Sulu Türk Propolisi Ekstraktının t-BHP ile Uyarılmış Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkisinin İncelenmesi**

Propolis, çeşitli ağaç ve bitki türlerinden arılar tarafından toplanan, ihtiva ettiği zengin fenolik ve flavonoid içeriğinden dolayı antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antitümör etkiye sahip doğal reçinemsi bir arı ürünüdür. Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu ve antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikaller lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzimler üzerine etki ederek hücre hasarına neden olur. Eritrositler, elde edilmesinin kolay olmasının yanı sıra ihtiva ettiği hemoglobin ve bu hemoglobinin oksidasyonundan dolayı oksidatif stres şartlarına en çok maruz kalan hücrelerdir. Bundan dolayı deneysel oksidatif hasar çalışmaları için mükemmel bir modeldir. Tersiyer bütül hidroperoksit (t-BHP) insan eritrosit hücrelerinde oksidatif hasar meydana getiren organik bir peroksittir. Bu çalışmada sulu Türk propolisinin t-BHP ile indüklenmiş oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Sağlıklı bireylerden etik kurul onayı ile alınan kanlardan eritrosit hücreleri izole edilmiştir. Elde edilen eritrosit paketi kontrol, sulu Türk propolisi, pozitif kontrol (kuersetin) ve negatif kontrol (t-BHP) grubu olarak dörde ayrılmıştır. Deney modeli olarak eritrosit paketlerine öncelikle ekstrakt muamelesi ve ardından t-BHP muamelesi ile birlikte negatif kontrolde oluşacak olan hasara karşı sulu Türk propolisinin koruyucu etkileri lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA), toplam oksidan kapasite (TOK), toplam antioksidan kapasite (TAK), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerine göre değerlendirilmiştir. Sulu Türk propolisi grubunda MDA, CAT, SOD, TOK ölçümleri, negatif kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Sulu Türk propolisi grubunda TAK ölçümleri, negatif kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu çalışma ile sulu Türk propolisinin eritrositlerde t-BHP ile indüklenmiş olan oksidatif hasara karşı koruyucu etkinliği ortaya konulmuştur. Azalan SOD ve CAT enzim aktivitesinin nedeninin sulu Türk propolisi ekstraktının ortamdaki serbest radikalleri antioksidan aktivite göstererek temizlemesinin sonucu olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Antioksidan, Eritrosit, Oksidatif Stres, Propolis, t-BHP

## 2. SUMMARY

### **Investigation of Protective Effect of Water Extract of Turkish Propolis Against Oxidative Damage Induced by t-BHP**

Propolis is collected various trees and plant by bees, due to rich containing flavonoids and phenolic it has antibacterial, antiviral, antitumor effect is a natural resinous with bee products. Oxidative stress results in the deterioration of the balance between free radical formation and the antioxidant system. Oxidative stress results in free radicals that acting on lipids, proteins, DNA, carbohydrates and enzymes, causing cell damage. Erythrocytes are a very important model for experimental oxidative damage studies because they both easy to reach and the most exposed to oxidative stress conditions due to the oxidation of hemoglobin that it contains. Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) is an organic peroxide that causes oxidative damage in human erythrocyte cells. The aim of this study is to evaluate the protective effect of water extract of Turkish propolis against t-BHP induced oxidative damage on the erythrocyte cells. The erythrocyte cells were isolated from the blood obtained by the ethical committee approval from health individuals. The erythrocyte package obtained was divided into four groups as control, water extract of Turkish propolis, positive control (quercetin) and negative control (t-BHP) group. Red blood cells package as experimental model was treated firstly with propolis extract. Then t-BHP was added to the cells packages. Protective effects of water extract of Turkish propolis were investigated by malondialdehyde (MDA, final product of lipid peroxidation), total oxidant capacity (TOC), total antioxidant capacity (TAC) and antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). In the water extract of Turkish propolis group, MDA, CAT, SOD, TOC measurements were found to be significantly lower than those in the negative control group ( $p < 0.05$ ); whereas TAC measurements were found to be significantly higher than those in the negative control group ( $p < 0.05$ ). The protective effect of water extract of Turkish propolis against oxidative damage induced by t-BHP on erythrocytes was revealed. Decreased SOD and CAT activities may be explained by water extract of Turkish propolis extract have antioxidant compounds that they removes free radicals from the cells.

**Key Words:** Antioxidants, Erythrocyte, Oxidative Stress, Propolis, t-BHP

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda hastalıkların tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesi insanları ilaç olarak bilinen doğal ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Doğal ürünler, yeni farmakolojik keşifler için gelecek vaadeden kaynaklardır. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arı ürünleridir. Arı ürünleri birçok hastalıkta, hastalığın ilerlemesinin önüne geçmek, ağrıların azaltılması ve hastalığın tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına apiterapi denilmektedir. Apiterapi bal, polen, arı sütü, propolis, arı zehri ve bal mumu gibi arı ürünlerinin tıbbi amaçlar için kullanılmasıdır ve arıcılık kadar eskidir (1).

Propolis, tüm dünyada geleneksel tıpta yüzlerce yıldır kullanılan, arıların ağaç ve bitkilerden toplayıp ürettiği, doğal, son derece kompleks içeriğe sahip reçinemsî bir arı ürünüdür (2).

Propolisin bileşimi oldukça karmaşık olmakla birlikte toplandığı coğrafik bölgenin koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Propolisin içeriğinde şu ana kadar en az 300 farklı bileşik tanımlanmıştır. Genel olarak propolisin bileşiminde %50 reçine, %30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 çeşitli diğer bileşikler mevcuttur. Propoliste bulunan ana kimyasal sınıflar ise flavonoidler, fenolik ve çeşitli aromatik bileşiklerdir. Propolisin bileşimindeki bu antioksidan etkinliğe sahip muhteviyat immün sistemi etkilemekte ve böylece antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral ve antitümöral etkiler göstermektedir Propolisin son zamanlarda hastalıkların tedavisinde ve hastalıkları önlemek amacıyla gıda ve içeceklerde kullanımı artmıştır. Dolayısıyla propolis fonksiyonel gıda, dizayn edilmiş gıda olarak da adlandırılmaktadır. (3, 4).

Biyolojik sistemlerde bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller serbest radikaller olarak adlandırılırlar. Serbest radikallerin aktif oksijen türevlerine de oksidanlar denir. Serbest radikallerin hedef moleküllerden elektron alma yetenekleri nedeniyle, bu hedef molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarlarına yol açtığı bilinmektedir. Bu oksidanlar canlı organizmalarda sitoplazmik, mitokondriyel ve ekstrasellüler formları olan süperoksit

dismutaz, glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz gibi antioksidan enzim sistemleri ile seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C) ve  $\alpha$ -tokoferol gibi antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılırlar (5, 6).

Organik bir hidroperoksit olan t-BHP, oksidatif hücre hasarı mekanizmalarını kapsayan çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir bileşiktir. Organik hidroperoksitler alkil radikallerine bir oksijen eklenmesi ve/veya peroksil radikallerinden bir hidrojen atomunun çıkarılması sonucu oluşurlar. T-BHP sonradan diğer alkoksil ya da peroksil radikallerine ayrışabilmekte ve bu durumun lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını hızlandırabileceği belirtilmektedir (7, 8).

İnsan vücudundaki hücrelerin yaklaşık %3'unu, dolaşımdaki eritrositler oluşturur. Dolaşımdaki bu eritrositler akciğerlerdeki oksidatif olaylar ve böbreklerdeki hiperozmotik şartlardan dolayı sürekli olarak oksidatif stres şartlarına maruz kalırlar. Eritrositlerin ihtiva ettiği hemoglobin yapısındaki oksijen, demir ve pek çok fizyopatolojik faktör eritrositlerdeki ROS miktarını artırır. Bunun yanı sıra eritrosit hücre eldesi kolay olduğundan *in vitro* çalışmalar için mükemmel bir modeldir (9, 10).

Yapılan literatür araştırmalarında insan eritrosit hücrelerinde, serbest radikal indüklü oksidatif hasarlar ve bu hasarlara karşı sulu Türk propolisi ekstraktlarının etkinliğini değerlendirmek için *in vitro* herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Buradan hareketle hazırlanan sulu Türk propolisi ekstraktının biyomolekülleri oksidatif hasara karşı koruma kapasitesi bu çalışma kapsamında değerlendirilecek ve bu çalışma daha sonraki *in vivo* denemelerin de ön çalışması niteliğinde olacaktır. Müspet sonuçların elde edilip, yayınlanmasının bu ürüne olan talebi arttıracığı, bunun da yöremiz ve ülkemizin bu üründen elde ettiği katma değere olumlu bir şekilde yansıyabileceği düşünülmektedir.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Propolis

Arı ürünleri birçok hastalıkta, hastalığın ilerlemesinin önüne geçmek, ağrıların azaltılması ve hastalığın tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu arı ürünlerinden biri olan propolis; bal arıları tarafından ağaçların yaprak ve kabuklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan, özel reçine ve mumsu maddelerin, arının tükürük enzimleriyle birtakım kimyasal reaksiyon sonucunda değişikliğe uğratılmasıyla elde edilen ve içeriği toplandığı coğrafik bölgeye bağlı olarak değişiklik gösterebilen bir üründür. Diğer adı *bee glue* olan propolis kelime olarak pro- ve -polis köklerinden oluşur ve kovanın (şehrin) savunması anlamını taşır. Propolis; kovan iç yüzeyinin kaplanması, yarık ve çatlakların kapatılması, peteklerin kenarlarının sertleştirilip onarılması, yaz sonunda çerçevelerin bağlanması, kovan giriş deliğinin küçültülmesi, ana arı yumurtlamadan önce petek gözlerinin cilalanmasını sağlamak gibi birçok amaçla arılar tarafından kullanılır (11-13).

Propolis sahip olduğu içerikten dolayı sitotoksik, antioksidan, antibakteriyel, antihepatotoksik, nöroprotektif, antimikrobiyal, antiviral gibi birçok farmakolojik ve biyolojik özelliğe sahiptir. Bundan dolayı son zamanlardaki çalışmaların ilgi çekici bir konusu olmuştur. Zaten insanoğlu propolisi çok eski çağlardan beri farklı amaçlar için kullanmıştır. Örneğin; günümüze kadar gelen eski Yunan Yazıtları propolisin iltihaplanan yaralar ve diş çürükleri için tedavi amacıyla kullanıldığını göstermiştir. Günümüzde ise kozmetikte, gıdaların bir bileşeni olarak ve diğer birçok alanda kullanılmaktadır. Aynı zamanda Asya, Avrupa ve Amerikan şehirlerinde sağlık içeceği olarak tüketilmektedir. İnsanlık için bu reçinemsi yapının keşfedilen yararları henüz çok az aydınlatılabilmektedir (14-16).

#### 4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin rengi kaynağına ve depolama süresine bağlı olarak hardal sarısı, kırmızı, kahverengi ve yeşil gibi değişken olabilmektedir (12). Kendine özgü kokusu olup ciltteki yağlarla ve proteinlerle beraber güçlü etkileşim göstermesinden dolayı yapışkan bir özelliğe sahiptir (17).

Propolis, su ve hidrokarbon çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek oranda çözünürlük göstermesinin yanı sıra erime noktası 60-69 °C arasında olup, soğukta sert

ve kırılgan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapısı vardır (18). Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis örnekleri Şekil 1’de gösterilmiştir (19).



**Şekil 1.** Kovandan toplanarak topak haline getirilmiş propolis (Turan’dan, 19)

#### **4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği**

İşlem görmemiş propolisin içeriği kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle %50 reçine, %30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (20). Propolisteki temel kimyasal sınıflar; flavonoidler, fenolik ve çeşitli aromatik bileşiklerdir. Propoliste bulunan başlıca bileşenler Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Propoliste bulunan başlıca bileşenler (Demir'den, 21)

| <b>Bileşenler</b>   | <b>Ana Maddeler</b>                                      | <b>Miktar</b> |
|---------------------|----------------------------------------------------------|---------------|
| Reçine              | Flavonoidler<br>Terpenler<br>Fenolik asitler ve esterler | %45-55        |
| Mum ve yağ asitleri | Doymamış Yağ asitleri                                    | %25-35        |
| Esansiyel yağlar    | Uçucu bileşenler                                         | %10           |
| Polen               | Eser elementler<br>Serbest aminoasitler                  | %5            |
| Diğer maddeler      | Laktonlar<br>Steroidler<br>Şekerler<br>Kinonlar          | %5            |

Bu bileşenlerin yanı sıra arıların çok değişik flora ziyaretleri ile birlikte bileşenlerin bölgeden bölgeye değişiklik göstermesinin bir sonucu olarak birçok vitamin, mineral ve eser elementler gibi toplam 300'den fazla içerik belirlenmiştir. Bu etken maddelerden bazıları Tablo 2'de verilmiştir (22).

**Tablo 2.** Propolisin içerdığı etken maddeler ve bilinen etkileri (Yang’dan, 22)

---

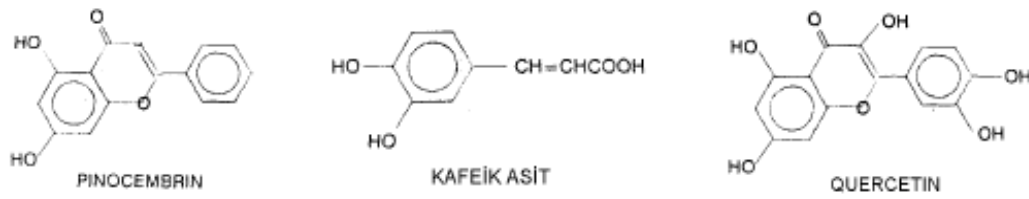
|                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Krizin:</b> Tümör hücre toksisitesi, <i>anti-helicobacter pylori</i>                                                                                                             |
| <b>Apigenin:</b> Gastrik ülserin iyileştirilmesi                                                                                                                                    |
| <b>Akasetin:</b> Ateş düşürücü                                                                                                                                                      |
| <b>Kuersetin:</b> Antiviral, kılcal damarların güçlendirilmesi, antitümöral aktivite, spazmolitik, antihistaminik, ülser iyileştirici                                               |
| <b>Kaempferid:</b> Spazmolitik, <i>anti-mycobacterium phlei</i> , mikroorganizmaların asit direncine karşı etkili                                                                   |
| <b>Kaemperol-7,4-dimetil eter:</b> Antifungal                                                                                                                                       |
| <b>Baicalin:</b> Antigenotoksik                                                                                                                                                     |
| <b>Galangin:</b> Bakteriyostatik aktivite, antibakteriyel ve antifungal, <i>anti-helicobacter pylori</i>                                                                            |
| <b>Pinosembrin:</b> Bakteriyostatik aktivite, antifungal, antimikrobiyal, lokal anestezik                                                                                           |
| <b>Pinobanksin:</b> Antibakteriyel ve antifungal                                                                                                                                    |
| <b>Pinobanksin-3-asetat:</b> Antibakteriyel ve antifungal                                                                                                                           |
| <b>Pinostrobin:</b> Lokal anestezik                                                                                                                                                 |
| <b>3,4 -dihidroksiflavonidler:</b> Kılcal damarların güçlendirilmesi                                                                                                                |
| <b>Flavan-3-ol:</b> Kılcal damarların güçlendirilmesi                                                                                                                               |
| <b>Pektolinarinenin:</b> Spazmolitik                                                                                                                                                |
| <b>Luteolin:</b> Antiviral, gastrik ülserin iyileştirilmesi                                                                                                                         |
| <b>Luteolin 3,4-dimetil eter:</b> Spazmolitik ve hipokoleretik                                                                                                                      |
| <b>Artepillin C:</b> Antitümöral, antilökemik etki                                                                                                                                  |
| <b>Eriodiktol:</b> Kalp yetmezliğini iyileştirici etki, akut kalp yetmezliğini önleyici etki                                                                                        |
| <b>Pinosilvin (3,5-dihidroksistilben):</b> <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Bacillus cereus</i> ’u inhibe edici, <i>mycobacterium phlei</i> ve <i>M. semegmatis</i> ’e karşı etkinlik |
| <b>Ferulik asit:</b> Antibakteriyel etki, aglutinant etki, kollojenik etki                                                                                                          |
| <b>Isoferulik asit:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> ’ a karşı etkinlik                                                                                                             |
| <b>Benzoik asit:</b> Bakteriostatik ve bakterisid etki, balzamik ve antiseptik aktivite                                                                                             |
| <b>Sinnamik asit:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> ’ a karşı etkinlik                                                                                                               |

---



#### 4.1.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler meyve ve sebzelerin yanı sıra çay, şarap, meyve suyu gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir (23). Bugüne kadar propolisten 38'den fazla flavonoid izole edilmiştir. Bunlara galangin, kaempferol, kuersetin, pinosembrin, pinostobin ve pinobanksin örnek olarak verilebilir. Propolisteki tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı Şekil 2'de gösterilmiştir. Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşiklerde Tablo 3'de verilmiştir (25).



**Şekil 2.** Propoliste bulunan tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları (Çolak'tan, 25)

Propolisin fenolik bileşikleri arasında başlıca; sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve esterleri, ferulik asit yer almaktadır (24).

**Tablo 3.** Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler (Çolak'tan, 25)

| Flavonlar   | Flavonoller | Flavononlar    | Dihidro Flavoneller     | Sinamik Asit Türevleri | Diğerleri           |
|-------------|-------------|----------------|-------------------------|------------------------|---------------------|
| Apigenin    | Kaempferol  | Pinosembrin    | Pinobanksin             | Ferulik asit           | 11-Famesol          |
| Akasetin    | Kaempferid  | Sakuranetin    | Pinobanksin-3-asetat    | Kafeik asit            | $\beta$ -Karyofilen |
| Baicalin    | Galangin    | İsosakuranetin | Pinobanksin-7-metileter | $p$ -Kumarik asit      | Terpinkol           |
| Krisin      | İsohamnetin |                |                         |                        | Benzoik asit        |
| Luteolin    | Ramnetin    |                |                         |                        | Siringaldehit       |
| Tektokrisin | Mirisetin   |                |                         |                        | Protokatekvik asit  |

Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri oldukça geniş bir alanı kapsar. Serbest radikal yakalayıcısı olmaları, enzim aktivitelerini düzenlemeleri, hücre çoğalmasını inhibe etmeleri, antibiyotik, antiallerjen, antiviral, antitümör, antimitojen, antiülser ve

antiinflamatuvar ilaç gibi hareket etmeleri ile insan sağığına birçok faydası var olduğı bilinmektedir (26). Ayrıca epidemiyolojik çalışmalar; günlük diyetle ilaveten çeşitli kaynaklardan (yeşil çay, kırmızı üzüm, propolis gibi) alınan polifenollerin, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruyucu olabileceğini ortaya koymuştur (27).

#### **4.1.2.2. Arı Mumu ve Yağ Asitleri**

Arı mumu ve yağ asitleri propolisin yaklaşık %30'unu oluşturur. Arı mumu başlıca monoesterler, diesterler, uzun zincirli hidrokarbonlar, hidroksiesterler, poliesterler, uzun zincirli yağ asitleri, triesterler ve asit esterlerinden oluşur (28).

#### **4.1.2.3. Esansiyel Yağlar**

Uçucu bileşenler propolisin yaklaşık %10'unu oluşturur. Propoliste bulunan uçucu yağlar, terpenler ve arı mumu propolisin etkisini ve kimyasal özelliklerini anlamlı bir şekilde etkilememektedir (28).

#### **4.1.2.4. Mineral Elementler**

Propolis mineral elementleri üzerine yapılan çalışmalarda, Makedonya örneklerinde; Ca, Mg, K, Na, Fe ve Zn; Küba örneklerinde ise Fe, Mn, Zn, Cu elementleri belirlenmiştir (29).

#### **4.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri**

Propolis coğrafi koşullara bağılı olarak değişken bir kimyasal içerik gösterdiği için çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Propolisin sahip olduğı bu biyolojik aktiviteler çeşitli ülkelerde bilimsel araştırma grupları tarafından kapsamlı bir şekilde çalışılmaya devam etmektedir (30).

Çeşitli coğrafi orjinlerden toplanan (Arjantin, Avusturya, Brezilya, Bulgaristan, Şili, Çin, Macaristan, Yeni Zelanda, Güney Afrika, Tayland, Ukrayna, Uruguay, Amerika ve Özbekistan) propolis örnekleriyle yapılan bir çalışmada propolisin antioksidan aktivitesi karşılaştırılmış ve toplam polifenolik ve flavonoid içeriğine bağılı olarak antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (11).

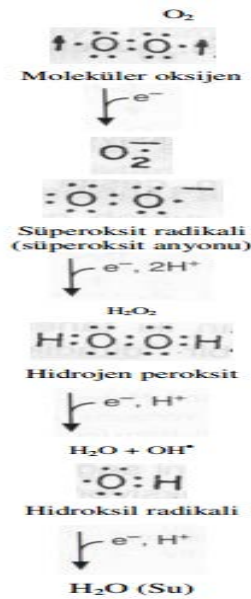
Ayrıca propolisin bu güçlü antioksidan özelliğinin yanı sıra antimikrobiyal özelliğinin de polifenol ve flavonoid içeriğı ile ilişkili olduğı bilinmektedir (31).

## 4.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem

Serbest radikaller bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Normal metabolizma olayları sırasında da üretilmektedirler. Radikallerin canlıya zarar verme potansiyeli olmasına rağmen bazı metabolik olayların devamlılığı için bunların oluşumu kaçınılmazdır. Bu moleküller fizyolojik olarak mitokondriyal elektron transport sistemi reaksiyonları, ksantin oksidaz, lipooksijenaz gibi enzimlerin reaksiyonları, antimikrobiyal aktivite sırasında oluşan solunum patlaması, oto-oksidasyon reaksiyonları gibi birçok endojen kaynak tarafından üretilmektedirler. Ayrıca bu moleküller çevresel ajanlar, farmasötikler, endüstriyel kimyasallar, sigara gibi bir dizi eksojen kaynak tarafından da üretilmektedir (32).

Oksijen fazla etkin olmayan ancak *in vivo* şartlarda çok etkin türevlere metabolize olabilen bir bileşiktir. Oksijen canlı sistemde iki şekilde indirgenmektedir. Bunların ilki oksijenin 4 elektron alarak suya indirgenmesidir (%95 oranında). İkincisiyse oksijenin basamak basamak tek değerli indirgenmeye uğramasıdır (%5 oranında). Serbest radikaller de bu olay sonucunda ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin oluşum şeması Şekil 3'te belirtilmiştir (33).

Bu şekilde biyolojik sistemlerde ortaya çıkan en önemli serbest oksijen grupları süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) ve singlet oksijendir ( $^1O_2$ ).



Şekil 3. Serbest radikallerin oluşum şeması (Tokaç'dan, 33)

Son derece reaktif olan bu moleküller elektron açığını kapatmak için lipidler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler gibi birçok biyomoleküle saldırabilmektedir. Oksijen serbest radikalleri ya da daha genel ismiyle reaktif oksijen türleri (ROS) ve benzer şekilde reaktif azot türleri (RNS) denen bu moleküller normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. ROS ve RNS türleri Tablo 4 ve Tablo 5’te belirtilmiştir.

Düşük ve orta düzeydeki konsantrasyonlar yararlı etkilere sahipken yüksek miktarları büyük oranda hücre hasarına sebep olabilmektedir. Oksidan moleküller şeklinde de adlandırılan ROS ve/veya RNS doğrudan ya da dolaylı olarak biyomoleküllere hasar verebilmektedir. Bu nedenle reaktif türlerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” olarak adlandırılmaktadır. Bu savunma sisteminde görev alan moleküllere de “antioksidan moleküller” denilmektedir (34).

**Tablo 4.** Oksijen kaynaklı serbest radikaller (Valko’dan, 5)

| Radikaller     |                 | Nonradikaller     |          |
|----------------|-----------------|-------------------|----------|
| Süperoksit     | $O_2^{\cdot -}$ | Hidrojen peroksit | $H_2O_2$ |
| Hidroksil      | $OH^{\cdot}$    | Hipokloröz asit   | $HOCl$   |
| Peroksil       | $ROO^{\cdot}$   | Hipobromöz asit   | $HOBr$   |
| Alkoksil       | $RO^{\cdot}$    | Singlet oksijen   | $^1O_2$  |
| Hidroperoksil  | $HO_2$          | Ozon              | $O_3$    |
| Lipid peroksil | $LOO^{\cdot}$   |                   |          |

Antioksidan moleküller etkilerini dört farklı yolla ortaya koyabilmektedir. Oksidan molekülleri daha zayıf başka bir moleküle çevirerek, kendilerine bağlayarak veya moleküllere bir hidrojen aktararak onların aktivitelerini azaltarak, hatta yok ederek etkisiz hale getirebilmektedirler. Bir diğer yol ise oksidatif olarak hasar görmüş molekülleri onarmaktır (35).

**Tablo 5.** Azot kaynaklı serbest radikaller (Valko’dan, 5)

| Radikaller   |                | Nonradikaller    |          |
|--------------|----------------|------------------|----------|
| Nitrik oksit | $NO^{\cdot}$   | Nitrik asit      | $HNO_2$  |
| Azot dioksit | $NO_2^{\cdot}$ | Nitrosil katyonu | $NO^+$   |
|              |                | Nitrosil anyonu  | $NO^-$   |
|              |                | Diazot tetroksid | $N_2O_4$ |
|              |                | Diazot trioksit  | $N_2O_3$ |

Antioksidanlar hücrede farklı kompartmanlarda veya hücre dışında yerleşerek savunma mekanizmasında rol oynamaktadır. Antioksidanlar enzimatik olarak etki gösterebilecekleri gibi non-enzimatik olarak da etki edebilmektedirler. Enzimatik olarak etki eden antioksidanları, hücrenin çeşitli organellerinde etki gösteren süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enzimler oluşturur. Çeşitli metal iyonlarını bağlama, serbest radikalleri yakalama, hapsetme ve süpürme gibi etkilere sahip glutatyon, bilirubin, ferritin, seruloplazmin ve ürik asit gibi yapılar non-enzimatik antioksidanlara örnek olarak verilebilir. Bu antioksidanlar sayesinde organizma serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşturacağı zarardan ya daha az etkilenir ya da hiç etkilenmez (36, 37).

#### 4.2.1. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları

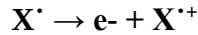
Serbest radikaller, diğer moleküllerle çeşitli yollarla reaksiyona girerler.

1. İki serbest radikal karşılaştıklarında, her ikisinin de ortaklanmamış elektronları bir kovalent bağ oluşturacak şekilde birleşirler ve radikal özelliklerini kaybederler (38).

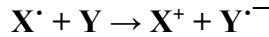


2. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir bileşikle reaksiyona girdiğinde yeni bir radikal oluşur:

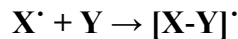
► Radikal, ortaklanmamış elektronunu eşlemek üzere radikal olmayan başka bir bileşikten elektron alabilir (okside edici radikal).



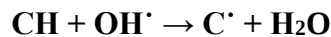
► Radikal, ortaklanmamış elektronunu radikal olmayan bir bileşiğe verebilir (redükte edici radikal).



► Radikal, radikal olmayan bir bileşiğe katılabilir.



► Radikal, C-H bağından bir hidrojen atomu koparabilir.



Bu reaksiyonların sonunda, radikal olmayan bileşik radikal hale gelir. Bu nedenle serbest radikallerin radikal olmayan bileşiklerle reaksiyonları birbirini izleyen zincir reaksiyonları şeklinde olur (39).

#### **4.2.2. Serbest Radikallerin Oluşum Nedenleri**

Organizmadaki serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilebilir. Serbest radikaller hücrede ve çevrede sürekli olarak üretilir (40).

##### **4.2.2.1. Endojen Kaynaklar**

- Mitokondride aerobik solunum sırasında elektron transport sistemi tarafından katalize edilen oksijenler serbest radikalleri yan ürün olarak üretirler.
- Yangı durumunda sitokinler serbest bırakılır ve bunun sonucunda nötrofiller ve makrofajlar serbest radikalleri üretmeye başlar.
- Serbest radikaller lipid peroksidasyonu, ksantin oksidaz ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan oluşabilir.
- Düz kas hücreleri, plateletler ve araşidonik asit metabolizması tarafından serbest radikaller üretilir.
- Otooksidasyon reaksiyonları sırasında ksantin oksidaz (XO) ile nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz gibi enzimlerle endoplazmik retikulumda sitokrom p450 sisteminde meydana gelen elektron kaçaklarından oluşabilir.
- Zihinsel stres veya vücut yorgunluğundan kaynaklanan stres toksik yan ürün olarak serbest radikal üretebilir. Ayrıca kortizol ve katekolamin gibi hormonlar vücutta stres reaksiyonlarına yol açarlar. Aynı zamanda bu hormonların kendileri de serbest radikallere dönüşebilirler.
- İmmun sistem hücreleri patojenlere yanıt olarak ROS üretebilir.

##### **4.2.2.2. Eksojen Kaynaklar**

- UV ışınlar, X-ışınları, gamma ışınları, mikrodalga ışınları,
- Pişirme sırasında organik maddelerin yakılması,
- Orman yangınları, volkanik faaliyetler,
- Asbest, benzen, karbonmonoksit, formaldehit, ozon ve toluen gibi hava kirleticiler,

- Temizlik ürünleri, tutkal, boya, tiner, parfümler ve böcek ilaçları gibi kimyasallar,
- Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirletici maddeler,
- Alkol ve sigara kullanımı, sigara dumanı, egzoz dumanı, eksojen olarak serbest radikal üretimine katkıda bulunabilir (41).

#### 4.2.3. Serbest Radikal Türleri

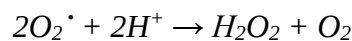
Oksijen canlı için vazgeçilmez bir element olup hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile organik moleküllerin temel yapı taşlarını oluşturur. Bununla birlikte hücrelerde gerçekleşen metabolik reaksiyonlar için gerekli olan oksijenin %90'ı mitokondride oksidatif fosforilasyon sırasında kullanılır. Bu oksijenin %1-3'ü mitokondrilerde ROS'a dönüşür (42, 43).

##### 4.2.3.1. Süperoksit Radikali

Oksijen molekülüne bir elektron eklenmesiyle  $O_2^-$  oluşur (44). Serbest radikal olmasına rağmen yüksek derecede reaktif değildir. Süperoksitin üretimi çoğunlukla elektron transfer sistemiyle ATP üretimi sırasında hücre mitokondrisinde gerçekleşir (45). Normalde oksijenin suya dönüştürülmesi gerekirken, toplam elektronların %5'i  $O_2^-$  süperoksit radikali oluşturur (46).

##### 4.2.3.2. Hidrojen Peroksit

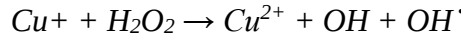
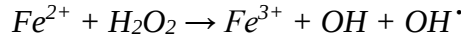
Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmamasına rağmen yine de çok önemlidir. Çünkü biyolojik membranlara nüfuz edebilir. Hidrojen peroksit, nötrofillerin fagozomlarında bulunan bir enzim olan miyeloperoksidaz tarafından hipokloröz asite (HOCl) dönüştürülür. Bu sırada geçiş metallerinin oksidasyonu yoluyla da  $OH^-$  oluşmasına neden olarak ROS moleküllerinin üretilmesinde bir aracı olarak rol oynar. Hidrojen peroksidin bir diğer önemli fonksiyonu da hücre içi sinyal molekülü rolünü yerine getirmektir. Hidrojen peroksit,  $O_2^-$ 'ye bir elektron ilavesiyle ya da  $O_2$ 'ye iki elektron eklenmesiyle de doğrudan meydana gelir (41).



Üretilen hidrojen peroksit, katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler olarak adlandırılan antioksidan enzim sistemleri tarafından ortadan kaldırılır (46).

#### 4.2.3.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldır.  $H_2O_2$ '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 gözlenmiştir ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.



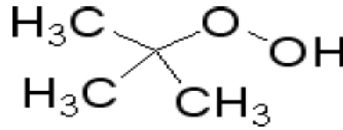
Hidroksil radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptir.  $OH^\bullet$  radikallerinin, DNA'da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve oluşan bu ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra  $OH^\bullet$  radikalleri aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiğinden, DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak, radikal oluşumuna neden olurlar. Örneğin; timine katılarak timin radikalini oluşturabilir ve timin radikali de oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil radikaline dönüşebilir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen  $OH^\bullet$  radikali, DNA'nın baz ve şeker yapılarında da ciddi hasarlar oluşturarak DNA üzerinde zincir kırıkları meydana getirirler. Hasarın çok kapsamlı olması durumunda, oluşan hasar hücresel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelebilir (39).

#### 4.2.3.4. Tersiyer Bütil Hidroperoksit

Organik bir hidroperoksit olan t-BHP, oksidatif hücre hasarı mekanizmalarını kapsayan çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir bileşik olup, açık formülü Şekil 4'te verilmiştir. Organik hidroperoksitler alkil radikallerine bir oksijen eklenmesi ve/veya peroksil radikallerinden bir hidrojen atomunun çıkarılması sonucu oluştukları ortaya konulmuştur. t-BHP sonradan diğer alkoksil ya da peroksil radikallerine ayrışabilir ve bu durum lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını hızlandırabilir. Bu ayrışma reaksiyonları metal iyonları ve onların kompleksleri vasıtasıyla gerçekleşir. t-BHP



kaynaklı toksisitenin nedenleri için önerilen etki mekanizmaları şöyledir; intraselüler kalsiyum dengesindeki değişiklikler ve bunu takiben glutatyon ve protein tiyol düzeyindeki azalma, DNA tek zincir kırıklarının oluşumu, lipid peroksidasyonunun başlaması ya da tersiyer bütoksil radikallerinin oluşması, t-BHP kaynaklı genotoksisite; bir geçiş metali aracılıklı reaksiyon ile  $H_2O_2$  gibi değişik tipteki ROS'ların üretimiyle sonuçlanan bir süreçtir (7).



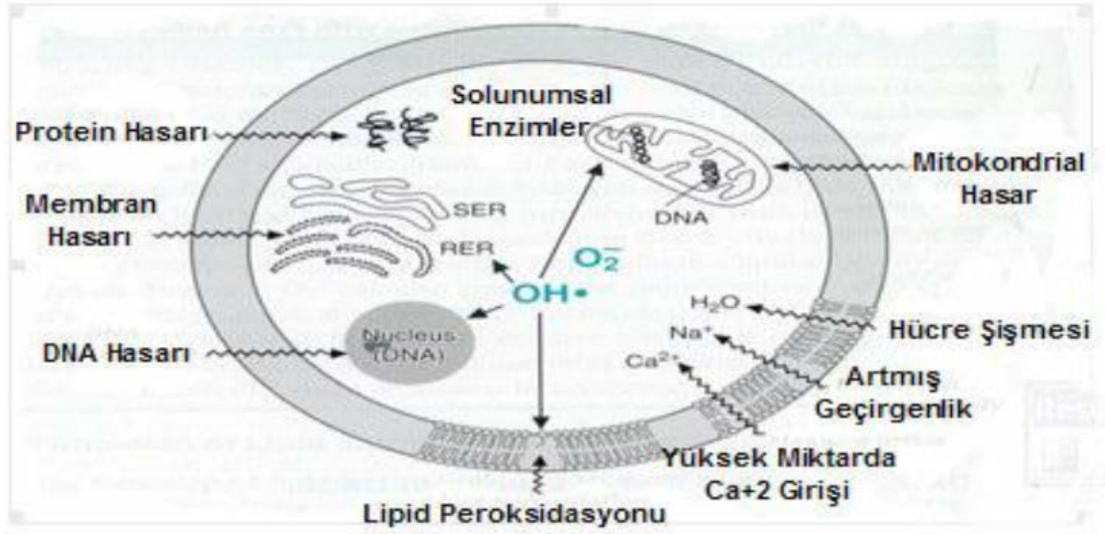
**Şekil 4.** t-BHP'nin açık kimyasal formülü (Luo'dan, 4)

#### 4.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Düşük yoğunlukta olduklarında ROS'un yararlı etkilerinden söz etmek mümkündür. Birçok hücrel yanıtı karşı normal fizyolojik bir fonksiyon olarak birçok hücrede  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  ürettiği çalışmalarla ortaya konulmuştur. Reaktif oksijen türlerinin bazı yararlı faaliyetleri arasında fagositoz aracılığıyla enfeksiyonlara karşı savunma, sitotoksik lenfositler ve makrofajlar tarafından kanser hücrelerini öldürme, sitokrom p450 tarafından ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, mitokondride ATP üretimi, hücre büyümesi ve düşük konsantrasyonda mitojenik yanıtlara neden olma sayılabilir. Ayrıca düşük yoğunluklarda bulunduklarında ROS'un nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, intrasellüler depolardan  $Ca^{2+}$ 'nın salınımı, tirozin amino asidinin fosfatlanma aktivasyonu, non-reseptör tirozin kinaz aktivasyonu, bazı sitokinler ve büyüme faktörü sinyallerinin aktivasyonu gibi hücrel sinyaller üzerine önemli rolleri olduğundan bahsedilebilir. Bunların dışında ROS; prostaglandin ve tiroksin gibi moleküllerin biyosentezine katılıp bu işlemlerin gelişimini uyarır. Reaktif oksijen türleri hücrede çözünerek guanilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesinde ve gen transkripsiyonu gibi yaşamsal faaliyetlerde kullanılır (41).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu; inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı ( $pO_2$ ), ozon ( $O_3$ ), azot dioksit ( $NO_2$ ), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artmasıyla birlikte serbest radikallerin; hücrelerin

lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine olan zararlı etkileri Tablo 6 ve Şekil 5'te özetlenmiştir (33).



**Şekil 5.** Hücrede serbest oksijen radikalı aracılı hasar (Tokaç'dan, 33)

$O_2^{\bullet}$  radikali ve  $OH^{\bullet}$  radikali; sitoplazma, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlattığı belirtilmiştir. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur (47, 48).

**Tablo 6.** Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri (Tokaç'dan, 33)

|                        |                                                                                                           |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Lipidler</b>        | Kolestrol ve yağ asitlerinde oksidasyon<br>Lipidlerde çapraz bağlanmalar                                  |
| <b>Karbohidratlar</b>  | Polisakkaritlerin depolimerizasyonu                                                                       |
| <b>Nükleik asitler</b> | Tek ve çift zincir kırıkları, protein çapraz bağları,<br>Baz içermeyen bölgeler, kimyasal modifikasyonlar |
| <b>Proteinler</b>      | Peptid zincirinde kopmalar, denatürasyonlar                                                               |

Bununla birlikte serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının, birçok patolojik olayda ve hastalıkta rol oynadığı düşünülmektedir. İskemi/reperfüzyon

hasarı, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, akut renal yetmezlik, diyabet, böbrek yetmezliği, kanser, anfizem/bronşit, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar gibi hastalıklarda ROS aracılıklı hücre hasarının söz konusu olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (48).

#### **4.3. Antioksidan Savunma Sistemi**

İnsan vücudunda serbest radikaller tarafından oluşturulabilecek oksidatif stresi ortadan kaldırmak için en önemli silah antioksidanlardır. Antioksidanlar serbest radikalleri temizleyebilen ve hücre hasarını engelleyebilen maddelerdir. İnsanda bulunan antioksidanlar ya vücut tarafından doğal olarak üretilirler ya da dışarıdan ilave olarak alınırlar. Hem endojen hem de eksojen antioksidanlar serbest radikal süpürücü olarak hareket ederler. Bundan dolayı savunma sisteminin etkisini artırarak hastalık riskini de azaltırlar. Endojen ve eksojen antioksidanların sınıflandırılması Tablo 7’de gösterilmiştir (38).

**Tablo 7.** Endojen ve eksojen antioksidanların sınıflandırılması (Sen'den, 38)

| <b>ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR</b>      |                                                                                       |                          |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>Enzimatik Antioksidanlar</b>    | <b>Non-enzimatik Antioksidanlar</b>                                                   |                          |
| Süperoksit dismutaz (SOD)          | Glutasyon                                                                             | Koenzim Q10              |
| Katalaz (CAT)                      | Melatonin                                                                             | Selenyum                 |
| Glutasyon peroksidaz (GPx)         | Ürik asit                                                                             | ( $\alpha$ )-Lipoik asit |
| Glutasyon redüktaz (GR)            | Bilirubin                                                                             | Transferrin              |
|                                    | Albumin                                                                               | Seruloplazmin            |
| <b>EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR</b>      |                                                                                       |                          |
| <b>Vitamin Antiokasidanlar</b>     | <b>İlaç Olarak Kullanılan Antioksidanlar</b>                                          |                          |
| ( $\alpha$ )-Tokoferol (Vitamin E) | Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)    |                          |
| ( $\beta$ )-Karoten (Vitamin A)    | NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri) |                          |
| Askorbik asit (Vitamin C)          | Rekombinant süperoksit dismutaz                                                       |                          |
| Folik asit (Vitamin B9)            | Troloks-C (vitamin E analogu)                                                         |                          |
|                                    | Endojen antioksidan aktiviteyi arttıranlar                                            |                          |
|                                    | (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)                                   |                          |
|                                    | Nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları                                            |                          |
|                                    | Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)                                   |                          |
|                                    | Nötrofil adezyon inhibitörleri                                                        |                          |
|                                    | Sitokinler (TNF ve IL-1)                                                              |                          |
|                                    | Barbitüratlar                                                                         |                          |
|                                    | Demir şelatörleri                                                                     |                          |

### 4.3.1. Antioksidan Enzimler

#### 4.3.1.1 Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1), süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir.



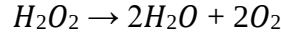
Bu reaksiyondandan da anlaşılacağı üzere SOD gerçekte detoksifiye edici bir enzim değildir. Çünkü reaksiyon sonucunda oluşan  $H_2O_2$  toksik bir moleküldür. Fakat bu reaksiyon süperoksit radikalının detoksifikasyonuna giden yolun ilk basamağını oluşturmaktadır. İkinci basamak katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından  $H_2O_2$ 'in suya dönüşmesini sağlamaktadır. Bu şekilde detoksifikasyon gerçekleştirilmektedir (49).

İnsanda iki tip SOD bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerlerdir (Mn SOD). Temel fonksiyonu oksijenin metabolize edildiği hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerinden korumaktır. Bu şekilde süperoksit radikalının başlatabileceği lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir. Oksijen kullanımının fazla olduğu dokularda SOD aktiviteside yüksektir ve oksijenin kısmi basıncının artışı ile SOD aktivitesi artmaktadır. Fizyolojik şartlarda hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde hücre içi süperoksit düzeyi düşürülmektedir. SOD'un hücre içi aktivitesi çok yüksekken hücre dışı aktivitesi çok düşüktür (50). SOD fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde etkisiz hale getirilmesinde de rol oynadığından granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de yüksek oranda SOD bulunmaktadır. SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi sayesinde hücrelerde süperoksit birikimi engellenmektedir (51).

#### 4.3.1.2. Katalaz

Katalaz (EC 1.11.1.6) dört tane hem grubu bulunduran bir hemoproteindir. Her alt birim enzimin kararlılığında önemli rol oynadığı düşünülen bir molekül olan NADPH içermektedir. Katalaz oksijenli solunum yapan sitokrom sistemi içeren tüm hücrelerde bulunmaktadır. Katalaz, peroksizomlar başta olmak üzere endoplazmik retikulum ve

sitozolde bulunmaktadır. Aktivitesi karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır (52).

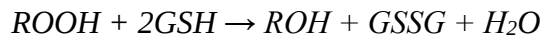
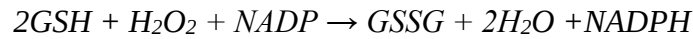


Katalaz hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük molekülleri indirgeyebilmektedir. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmemektedir (53).

#### 4.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (EC 1.11.1.9), dört selenyum içeren tetramerik yapıya sahip sitozolik bir enzimdir. En çok karaciğer ve eritrositte bulunmaktadır. Tıpkı katalaz gibi hücrede  $H_2O_2$ 'nin temizlenmesinden sorumlu enzimdir. GPx hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesini katalizler. Bu şekilde hücreler oksidatif hasara karşı korunmaktadır (54).

Glutasyon peroksidaz enzimi hidroperoksitlerin indirgenmesi reaksiyonu esnasında redükte glutasyonu (GSH) elektron vericisi olarak kullanır ve sonuçta oluşan okside glutasyon (GSSG) NADPH bağımlı glutasyon redüktaz enzimi tarafından yenilenir.



Glutasyon ( $\gamma$ -glutamilsisteinilglisin); serbest sülfidril grubuna sahip tripeptittir. Eritrositlerde ise GPx hemoglobinin methemoglobine oksidasyonunu azaltarak eritrositin ömrünü uzatır (55).

#### 4.3.2. Antioksidan Etki Mekanizmaları

**Toplayıcı (scavenging) etki:** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler ve fenolik bileşikler bu tipte etki gösterirler.

**Bastırıcı (quencher) etki:** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak, aktivitelerini azaltan ve inaktif şekle dönüştüren mekanizmadır. A vitamini ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

**Onarıcı (repair) etki:** Antioksidan özelliğe sahip polifenolik bileşiklerin, BER mekanizmasında görevli olan 8-oksoguanin DNA glikosilaz 1, apürinik/apirimidinik endonükleaz ve DNA polimeraz beta gibi DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini ve ekspresyonlarını indüklediği ortaya konmuştur.

**Zincir kırıcı (Chain breaking) etki:** Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak, zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller zincir kırıcı özellik gösterirler (56).

#### 4.4. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum “oksidatif denge” olarak tanımlanmaktadır. Çünkü fizyolojik fonksiyonları yerine getirebilmesi ile hasar oluşturma arasındaki denge ROS ve RNS’lerin oluşum ve ortamdan uzaklaştırılma hızına göre değerlendirilmektedir. Örneğin, bir hücrede saniye yaklaşık 50 hidroksil radikali oluşturmakta ve gün boyunca bu sayı 4 milyona ulaşmaktadır. Oluşan bu moleküller ya antioksidanlar tarafından uzaklaştırılmaktadır ya da çevredeki biyomoleküllere saldırılmaktadır (57). Bu radikallerin oluşum hızındaki artış ya da ortadan kaldırılma hızındaki düşüş bu dengenin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu şekilde oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulmasıyla oluşan duruma “oksidatif stres” denilmektedir. Artan oksidanlar dokularda harabiyete, proteinler, nükleik asitler, yapısal karbohidratlar ve lipidler gibi birçok biyomolekülün hasarına sebep olabilmektedir (58, 59).

Serbest radikallerin DNA ile reaksiyonu sonucunda baz ve şeker modifikasyonları, baz delesyonları ve zincir kırılmaları gerçekleşebilmektedir. DNA’yı etkileyerek hücrede mutasyona, hücresel disfonksiyona ve ölüme yol açabilmektedirler (60). Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar DNA ve proteinlere bağlanıp çapraz bağlar oluşturabilir (61). Proteinler, serbest radikal hasarına duyarlı moleküllerdir. Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişir. Serbest radikallerin etkisi ile protein molekülleri üzerindeki sülfhidril ve amino gruplarında daha fazla hasar meydana gelmektedir. Bununla beraber triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, lizin ve sistein gibi aminoasit içeren proteinler daha duyarlıdır.

Serbest radikallerin proteinlerle etkileşmesi sonucu oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır:

- 1) Aminoasitlerin modifikasyonu,
- 2) Proteinlerin fragmentasyonu,
- 3) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalardır.

Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler. Serbest radikallerin etkisiyle IgG ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinler üç boyutlu yapılarını kaybederler. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (62, 63).

Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelebilir. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobin  $H_2O_2$  ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşturur (64).

Serbest radikallerin etkilerine karşı en duyarlı olan ve en çok maruz kalan moleküller lipidlerdir. Biyomoleküller arasında doymamış yağ asitleri yapılarındaki  $C=C$  çift bağlar nedeniyle radikal hasarına en hassas olanlarıdır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı “lipid peroksidasyonu” olarak tanımlanmaktadır.

Lipid peroksidasyonu hem bitkilerde hem de hayvanlarda gerçekleşebilen kompleks bir işlemdir. Bir hidrojen çıkışıyla veya bir oksijen radikalinin eklenmesi ile başlatılan ve çoklu doymamış yağ asitlerinin hasarıyla sonuçlanan geri dönüşümsüz bir zincir reaksiyonudur.

Lipid peroksidasyonu genel olarak serbest radikaller ya da radikalik yapıda olmayan maddeler gibi oksidan moleküllerin özellikle çoklu doymamış yağ asitleri gibi karbon-karbon çift bağı içeren lipidlere saldırması ile başlatılan lipid peroksil radikalleri ve hidroperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanan bir reaksiyon dizisi olarak tanımlanır. ROS, lipid peroksidasyonunu indükleyerek fonksiyonel ve yapısal hücre hasarına neden olabilmektedir. Bu nedenle serbest radikal kaynaklı hasarın ana kaynağı lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu hücre membranlarının bütünlüğünü tehlikeye



sokar ve hücre membranının akışkanlığını artırır. Membrana bağlı reseptör ve enzimlerin inaktive olmasına neden olur (65).



## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Gereç

#### 5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

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

**Tablo 8.** Çalışmada kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

| Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme |                                                              | Marka                   |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Çalkalayıcı                       |                                                              | Nüve, SL 350            |
| Dondurucu                         | Arçelik, Altus (-20 °C), ThermoElectron Corporation (-80 °C) |                         |
| Etüv                              |                                                              | Gallenkamp              |
| Hassas terazi                     |                                                              | Mettler Toledo, AB204-S |
| İnkübatör                         | Shel Lab Shaking Incubator, Heraeus                          |                         |
| Karıştırıcı                       |                                                              | Ika Vortex Genius 3     |
| Manyetik karıştırıcı              |                                                              | Ikamag RH               |
| Mikropleyt okuyucu                | Versa Max Microplate Reader                                  |                         |
| Otomatik pipet 0.5-10 µL          |                                                              | Eppendorf               |
| Otomatik pipet 100-1000 µL        |                                                              | Socorex                 |
| Otomatik pipet 10-100 µL          |                                                              | Socorex                 |
| Otomatik pipet 1-5 mL             |                                                              | Eppendorf               |
| Otomatik pipet 20-200 µL          |                                                              | Eppendorf               |
| pH metre                          | Hanna Instruments HI 2211                                    |                         |
| Santrifüj                         |                                                              | Eppendorf 5810          |
| Soğutmalı santrifüj               | Beckman Coulter Allegra 64R                                  |                         |

### 5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler Tablo 9’da verilmiştir.

**Tablo 9.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

| <b>Kullanılan Kimyasal Madde/Çözelti</b>                | <b>Marka</b> |
|---------------------------------------------------------|--------------|
| Amonyum Sülfat                                          | Merck        |
| Bakır (II) Klorür ( $\text{CuCl}_2$ )                   | Sigma        |
| Bovine Serum Albumin (BSA)                              | Sigma        |
| Disodyum Hidrojen Fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  | Merck        |
| DMSO                                                    | Sigma        |
| Etanol                                                  | Sigma        |
| Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)                   | Merck        |
| Gliserol                                                | Sigma        |
| Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )            | Sigma        |
| Kloroform                                               | Merck        |
| Ksantin                                                 | Sigma        |
| Ksantin Oksidaz                                         | Sigma        |
| Kuersetin                                               | Sigma        |
| Potasyum Dihidrojen Fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) | Merck        |
| Sodyum Bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )                  | Merck        |
| Sodyum Dihidrojen Fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )  | Merck        |
| Sodyum Hidroksit ( $\text{NaOH}$ )                      | Sigma        |
| Sodyum Karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )            | Merck        |
| Sodyum Klorür ( $\text{NaCl}$ )                         | Merck        |
| Sodyum Meta-Arsenit                                     | Merck        |
| Tersiyer-Bütil Hidroperoksit (t-BHP)                    | Sigma        |
| Tiyobarbitürik Asit (TBA)                               | Sigma        |
| Trikloro Asetik Asit (TCA)                              | Sigma        |

## 5.2. Yöntem

### 5.2.1. Sulu Propolis Ekstraktının Hazırlanması

Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan propolis örnekleri toz haline getirilip karıştırıldı. 50 g toz propolis 100 mL saf su ile çözüldü. İyice vortekslendikten sonra 60 °C sıcakta sürekli çalkalanarak en az 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda çalkalayıcı inkübatörden çıkarılan ekstrakt, süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek deneyde kullanıma hazır hale getirildi. Bu şekilde hazırlanan 50 mg/mL'lik konsantrasyondaki stok propolis ekstraktından seyreltme yoluyla çeşitli konsantrasyonlarda çalışma çözeltileri hazırlandı.

### 5.2.2. Eritrosit Hücre İzolasyonu

Etik kurul onayı alındıktan sonra, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda çalışan 15 gönüllüden (sigara, alkol, ilaç kullanmayan, kronik rahatsızlığı olmayan, ağır egzersiz yapmayan) onam formu eşliğinde üçer adet EDTA'lı tüpe (eritrosit eldesi için) kan örneği alındı. Alınan kanlar 1690xg 'de 10 dakika santrifüj edilip plazmaları ayrıldı. Plazmaları ayrılan EDTA'lı tüpteki kanlara hacimlerinin üç katına kadar izotonik tuz çözeltisi ilave edilip ve tüp birkaç defa hafifçe ters-düz edildikten sonra santrifüj edildi. Ara yüzeyde beyaz bir tabaka şeklinde duran lökositler ve üst kısım uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi üst kısım berraklaşana kadar devam ettirilerek eritrosit paketleri hazırlanarak havuz oluşturuldu. Eritrosit paketlerinin KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda hematokrit (Hct) ve hemoglobin değerleri ölçüldü. ematokrit oranı deneylerde %10 olacak şekilde %0.9'luk NaCl ile seyreltildi. Hazırlanan eritrosit paketleri aligotlanıp +4 °C'de saklandı.

#### ***Kullanılan Çözeltiler***

**%0.9'luk NaCl:** 9 g NaCl tartılıp bir miktar saf su ile çözülüp hacmi 1 L'ye tamamlandı.

### 5.2.3. Tersiyer Butil Hidroperoksit (t-BHP) Hazırlanması

1987.8 µL PBS steril 15 mL'lik falkon tüpe alındı. Üzerine stok t-BHP şişesinden (7.989 M) 12.5 µL konuldu. İyice vortekslenerek tamamen çözülmesi sağlandı. Böylece 50000 µM konsantrasyonda ara stok oluşturuldu.

### ***Kullanılan Çözeltiler***

**Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS):** 1.76 mL 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi ve 6.08 mL 0.5 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  çözeltisi %0.9'luk NaCl çözeltisinde karıştırılıp pH 7.4'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 1 L'ye tamamlandı.

#### **5.2.4. Kuersetin Hazırlanması**

1 mg kuersetin tartıldı ve 1 mL DMSO ilavesiyle iyice vortekslenip çözülerek 1000  $\mu\text{g/mL}$ 'lik çalışma stoğu hazırlandı. Daha sonra bu stoktan çeşitli konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlandı.

#### **5.2.5. Deneyde Kullanılacak t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Deneyde kullanılacak olan t-BHP dozunun bulunması için farklı dozlarda t-BHP eritrosit paketleri üzerine çeşitli konsantrasyonlarda t-BHP eklenip, 1 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra eritrosit paketlerinde MDA ölçümü gerçekleştirilerek kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ( $p < 0.05$ ) hasar oluşturan 750  $\mu\text{M}$  t-BHP konsantrasyonu seçildi (Sonuçlar EK 1'de verilmiştir).

#### **5.2.6. Deneyde Kullanılacak Sulu Türk Propolis Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

50  $\text{mg/mL}$ 'lik sulu Türk propolisi ekstraktından çeşitli konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlandı. Eritrosit paketlerinin üzerine çeşitli konsantrasyonlarda (5-400  $\mu\text{g/mL}$ ) sulu Türk propolisi eklenip, 2 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 750  $\mu\text{M}$  t-BHP eklenerek 1 saat daha  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilip, MDA ölçümü gerçekleştirildi. MDA sonuçlarına göre hem t-BHP'nin oluşturduğu hasarı kontrol grubuyla aynı seviyede sonuç aldığımız hem de negatif kontrole göre anlamlı derecede düşük ( $p < 0.05$ ) konsantrasyon olan 200  $\mu\text{g/mL}$  seçildi (Sonuçlar EK 2'de verilmiştir).

#### **5.2.7. Deneyde Kullanılacak Kuersetin Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

1  $\text{mg/mL}$ 'lik kuersetin ekstraktından çeşitli konsantrasyonlarda ara stoklar hazırlandı. Eritrosit paketlerinin üzerine çeşitli konsantrasyonlarda (1-10  $\mu\text{g/mL}$ ) kuersetin eklenip, 2 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 750  $\mu\text{M}$  t-BHP eklenerek 1 saat daha  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilip, MDA ölçümü gerçekleştirildi. MDA sonuçlarına göre hem t-BHP'nin oluşturduğu hasarı kontrol grubuyla aynı seviyede sonuç aldığımız hem de negatif kontrole göre anlamlı derecede düşük ( $p < 0.05$ ) konsantrasyon olan 2  $\mu\text{g/mL}$  seçildi (Sonuçlar EK 3'de verilmiştir).

### 5.2.8. Deney Grupları

Deney grupları Tablo 10'daki gibi oluşturuldu. Pipetlemeler  $\mu\text{L}$  olarak yapıldı.

**Tablo 10.** Deney grupları

|                                                              | Kontrol Grubu | Sulu Türk propolisi Grubu | Pozitif Kontrol (Kuersetin) Grubu | Negatif Kontrol (t-BHP) Grubu |
|--------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| <b>Eritrosit Hemolizati (Hct: %10)</b>                       | 2000          | 1928.8                    | 1967.6                            | 1969.6                        |
| <b>Sulu Türk Propolisi (200 <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | -             | 40.8                      | -                                 | -                             |
| <b>Kuersetin (2 <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>             | -             | -                         | 2                                 | -                             |
| 37°C' de 2 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı.            |               |                           |                                   |                               |
| <b>t-BHP (750 <math>\mu\text{M}</math>)</b>                  | -             | 30.4                      | 30.4                              | 30.4                          |
| 37°C' de 1 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı.            |               |                           |                                   |                               |

### 5.2.9. Eritrosit Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

Süperoksit dismutaz aktivitesi, Sun ve Oberley (66) metoduna göre yapıldı. Bu metot, ksantin-ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek oluşturduğu mavi-mor rengin 560 nm'de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Eritrositlerdeki SOD'un ortamdaki süperoksit radikallerini uzaklaştırması sonucu optik dansitede meydana gelen azalmadan yararlanılarak SOD tarafından katalizlenen reaksiyonun % inhibisyonu hesaplandı.

#### *Kullanılan Çözeltiler*

**Etanol:Kloroform Karışımı (5:3):** 50 mL etanol 30 mL kloroformla karıştırıldı.

**0.3 mmol/L Ksantin Çözeltisi:** 3.65 mg ksantin 80 mL deiyonize suda çözüldü.

**0.6 mmol/L EDTA Çözeltisi:** 8.93 mg EDTA 40 mL deiyonize suda çözüldü.

**150 µL NBT Çözeltisi:** 4.9 mg NBT 40 mL deiyonize suda çözöldü. NBT günlük taze hazırlandı.

**400 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Çözeltisi:** 1.01 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 24 mL deiyonize suda çözöldü.

**0.5 g/L BSA:** 24 mL deiyonize suda 12 mg BSA çözöldü.

**167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi:** 3.3 U/mL'lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL'ye amonyum sülfatla tamamlandı. Ksantin oksidaz günlük hazırlandı.

**0.8 mmol/L CuCl<sub>2</sub> Çözeltisi:** 5.37 mg CuCl<sub>2</sub> 50 mL deiyonize suda çözöldü. Günlük taze hazırlandı.

**2 mol/L Amonyum Sülfat:** 2.64 g amonyum sülfat 10 mL deiyonize suda çözöldü.

**SOD Standartları:** 20, 16, 0.5, 0.313, 0.125 U/mL'lik SOD standartları ve kör hazırlandı.

**Reaksiyon karışımı:** 80 mL 0.3 mM ksantin çözeltisi, 40 mL 0.6 mM EDTA çözeltisi, 40 mL 150 µM NBT çözeltisi, 24 mL 400 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi, 12 mL 1g/L BSA karıştırıldı. Reaksiyon karışımı hazırlanırken hacimler hesaplanıp bütün maddeler aynı kapta karıştırıldı. Yukarıda ifade edilen konsantrasyon ifadeleri son konsantrasyonlar olarak verildi.

#### ***Deneyin yapılışı***

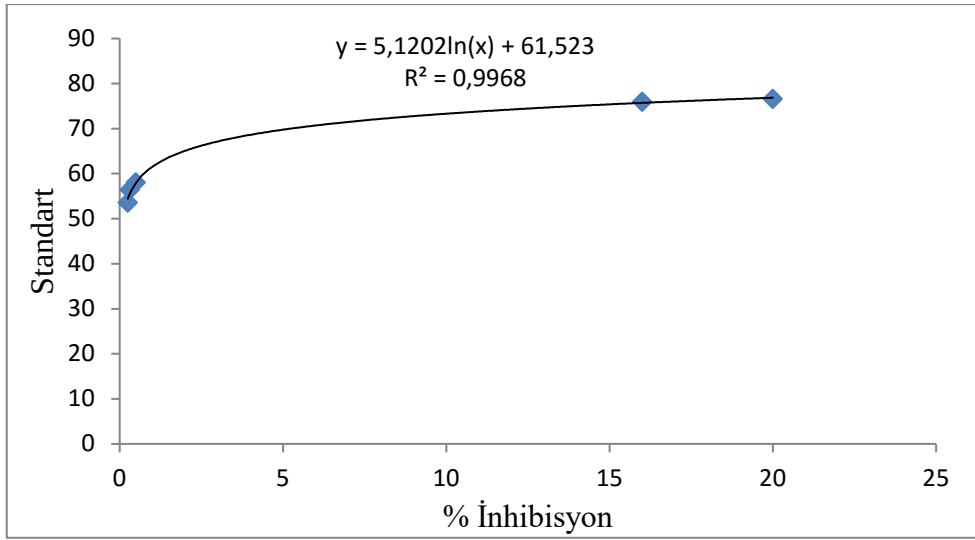
100 µL eritrosit paketi 900 µL soğuk saf su ile karıştırılıp hemoliz edildi. Elde edilen hemolizata 800 µL etanol:kloroform (5:3) karışımı eklenip vortekslendi. 18000g'de 4°C'de bir saat santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant SOD ve CAT aktivitesinin yanı sıra TAK ve TOK ölçümünde kullanıldı.

**Tablo 11.** SOD aktivitesi ölçümü

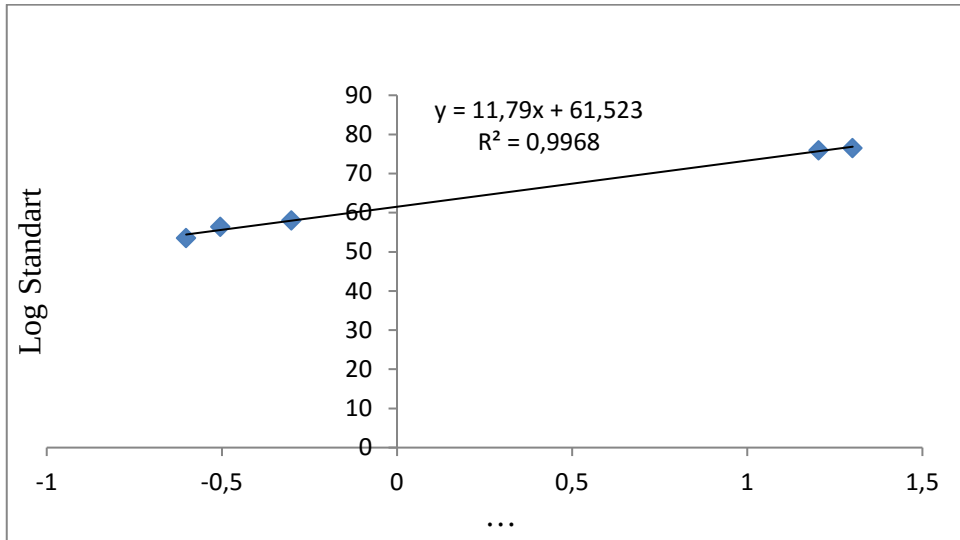
| <b>Çözelti</b>                                          | <b>Hacim (mL)</b> |
|---------------------------------------------------------|-------------------|
| Reaksiyon karışımı                                      | 1.225             |
| Süpernatant                                             | 0.25              |
| Ksantin oksidaz                                         | 0.025             |
| 25 °C' da 20 dakika inkübasyona (karanlıkta) bırakıldı. |                   |
| Bakır Klorür                                            | 0.5               |
| 560 nm'de absorbans ölçöldü.                            |                   |

Tablo 10’da ifade edildiği gibi pipetlemeler ve işlemler yapıldı ve 560 nm’de absorpsanlar ölçüldü. Hesaplamalar % inhibisyon olarak hesaplandı. Şekil 6’daki standart grafiği SOD aktivitesinin logaritması alınarak Şekil 7’deki lineer standart grafiğine dönüştürüldü. Bu grafikten yararlanılarak % inhibisyonlar SOD aktivitesine dönüştürüldü. Sonuçlar hemoglobin miktarına bölünerek U/g Hb olarak hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A \text{ kör} - A \text{ numune})}{A \text{ kör}} \times 100$$



Şekil 6. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği



Şekil 7. Log(Standart SOD aktivitesi) ve % inhibisyon grafiği



### 5.2.10. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivitesi, temel prensibi amonyum molibdatın hidrojen peroksitle oluşturduğu sarı renkli kompleksin 405 nm’de absorbansının ölçülmesi esasına dayanan Goth (67) metoduna göre yapıldı.

#### *Kullanılan Çözeltiler*

**60 mM Sodyum Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7.0):** 5.37 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 3.65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  yaklaşık 750 mL saf suda çözülür, pH 7.0’a ayarlanır ve hacmi 1 L’ye tamamlandı.

**32.4 mM Amonyum Molibdat Çözeltisi:** 1.89 g amonyum molibdat 50 mL saf suda çözülür.

**65 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  Çözeltisi:** 327  $\mu\text{L}$  % 30’luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 mL fosfat tamponunda çözülür.  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi taze hazırlandı.

**Tablo 12.** CAT aktivitesi ölçümü ve yapılan işlemler

| Çözeltiler                      | Numune            | Kör 1             | Kör 2             |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Numune                          | 20 $\mu\text{L}$  |                   |                   |
| Tampon                          |                   | 20 $\mu\text{L}$  | 120 $\mu\text{L}$ |
| t-BHP ’li tampon                | 100 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ |                   |
| 37°C’ de 1 dakika bekletildi.   |                   |                   |                   |
| Amonyum molibdat çözeltisi      | 100 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ |
| 405 nm’de absorbansları okundu. |                   |                   |                   |

Tablo 11’de ifade edilen işlemler yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki denklemde yerine konularak katalaz aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar hemoglobinin miktarlarına bölünerek U/g Hb olarak ifade edildi.

$$\text{Katalaz aktivitesi } \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{(A_{\text{kör2}} - A_{\text{numune}}) \times 271}{(A_{\text{kör2}} - A_{\text{kör1}})}$$

### 5.2.11. Eritrosit MDA Seviyesinin Belirlenmesi

Eritrosit MDA seviyesi Stocks ve Dormandy (68) metoduna göre gerçekleştirildi. Bu metod MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA)'in ısıtılması sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi esasına dayanır.

#### *Kullanılan Çözeltiler*

**Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS):** 1.76 mL 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi ve 6.08 mL 0.5 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  çözeltisi %0.9'luk NaCl çözeltisinde karıştırılıp pH 7.4'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 1 L'ye tamamlandı.

**0.4 M Sodyum Azid:** 2.6 g  $\text{NaN}_3$  100 mL PBS'de çözülür.

**TBA Çözeltisi:** 0.1 g TBA 500  $\mu\text{L}$  1N NaOH çözeltisinde çözülür bir miktar saf su ilave edilir ısıtılır iyice çözüldükten sonra hacmi 10 mL'ye tamamlanır.

**% 28'lik Trikloro Asetik Asit Çözeltisi:** 14 mg TCA 50 mL saf suda çözülür.

**Sodyum Arsenit Çözeltisi:** 0.52 g sodyum meta-arsenit 20 mL % 28'lik TCA'da çözülür.

**Standartlar Çözeltileri:** 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 nmol/mL konsantrasyonlarda MDA standartları ve kör hazırlandı.

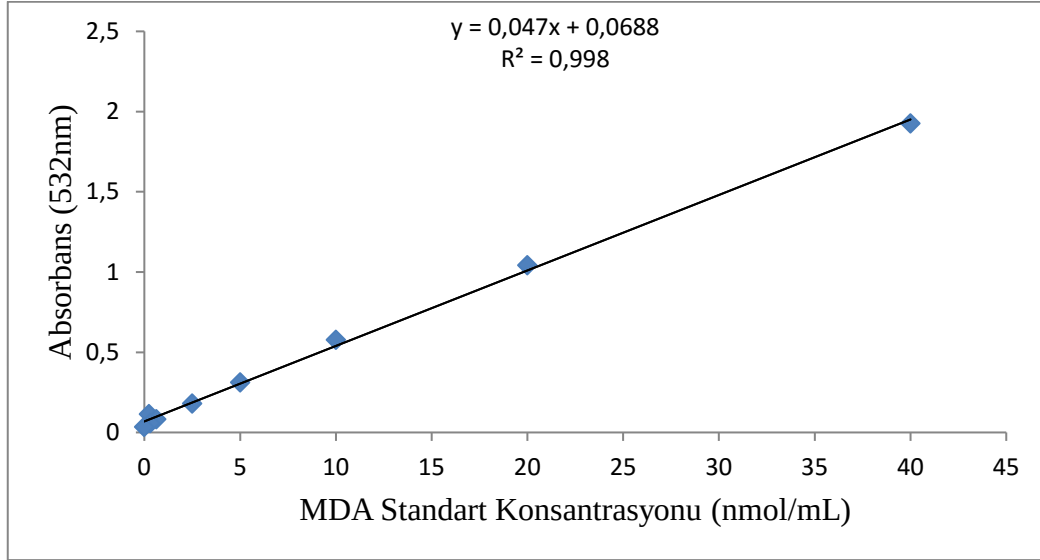
**Tablo 13.** Eritrosit MDA ölçümü ve yapılan işlemler

| Çözelti                                                     | Hacim ( $\mu\text{L}$ ) |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Eritrosit paketi                                            | 300                     |
| Azitli PBS çözeltisi                                        | 2700                    |
| 37 °C'de 10 dakika karıştırılır.                            |                         |
| PBS çözeltisi                                               | 3000                    |
| Süspansiyon                                                 | 900                     |
| TCA – Arsenit                                               | 600                     |
| 1690 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. |                         |
| Süpernatant ve Standartlar                                  | 300                     |
| TCA                                                         | 100                     |
| TBA                                                         | 100                     |

15 dakika kaynar su banyosunda bekletildi.

Soğutulduktan sonra mikropipetle aktarıldı ve 532 nm'de absorbanları okundu.

Tablo 12’de ifade edildiği gibi işlemler gerçekleştirildi. Şekil 9’daki MDA standart grafiğinden yararlanarak örneklerdeki MDA konsantrasyonu hesaplandı. Belirlenen MDA düzeyleri hemoglobin değerlerine bölünerek ifade edildi.



Şekil 8. MDA Standart absorbens grafiği

#### 5.2.12. Eritrosit TOK Seviyesinin Belirlenmesi

Örneklerin toplam oksidan kapasitesi (TOK), Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Ölçümde, testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equivalent/ L olarak ifade edildi (69).

#### 5.2.13. Eritrosit TAK Seviyesinin Belirlenmesi

Örneklerin total antioksidan kapasitesi (TAK), Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS\* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan trolox kullanılır. Sonuçlar mmol trolox equivalent/L olarak ifade edildi (70).

### 5.3. İstatiksel Yöntem

Veriler SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences) bilgisayar paket programına aktararak, istatistiksel olarak değerlendirildi. Normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan ikiden fazla bağımsız grupların değerlendirmesinde One Way ANOVA ve post-hoc Tukey testleri, normal dağılıma uymayan ikiden fazla parametrenin değerlendirilmesinde ise Kruskal-Wallis testi uygulandı ve ikili Mann Whitney-U testine göre değerlendirildi. Elde edilen değerler, aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma ( $\bar{x} \pm S.D$ ) olarak ifade edildi. Parametreler arasındaki ilişki ortaya konmasında Pearson ve Spearman korelasyon testi uygulandı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 6. BULGULAR

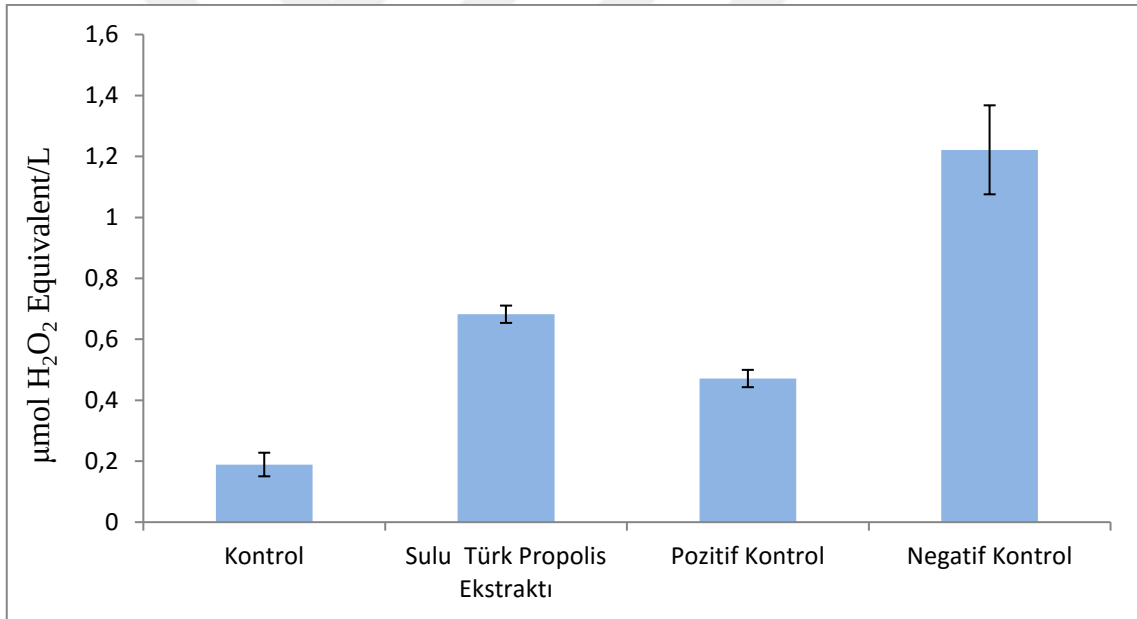
### 6.1. Eritrosit Toplam Oksidan Kapasite (TOK) Seviyesi

Grupların toplam antioksidan kapasite (TOK) düzeyi, Tablo 13 ve Şekil 9’da gösterilmiştir.

**Tablo 14.** Eritrosit TOK Seviyeleri

| Grup (n=3)                   | Eritrosit TOK ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L) | ANOVA, p |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------|
| Kontrol                      | $0.18 \pm 0.038^a$                                          | 0.0001   |
| Sulu Türk Propolis Ekstraktı | $0.68 \pm 0.028^b$                                          |          |
| Pozitif Kontrol              | $0.47 \pm 0.028^c$                                          |          |
| Negatif Kontrol              | $1.22 \pm 0.146^d$                                          |          |

a-b,a-c,a-d,b-c,b-d,c-d, Post-hoc Tukey testine göre anlamlı fark vardır ( $p<0.05$ ).



**Şekil 9.** Eritrosit TOK seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; sulu Türk propolis ekstrakt grubunda negatif kontrol grubuna göre toplam oksidan kapasite anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

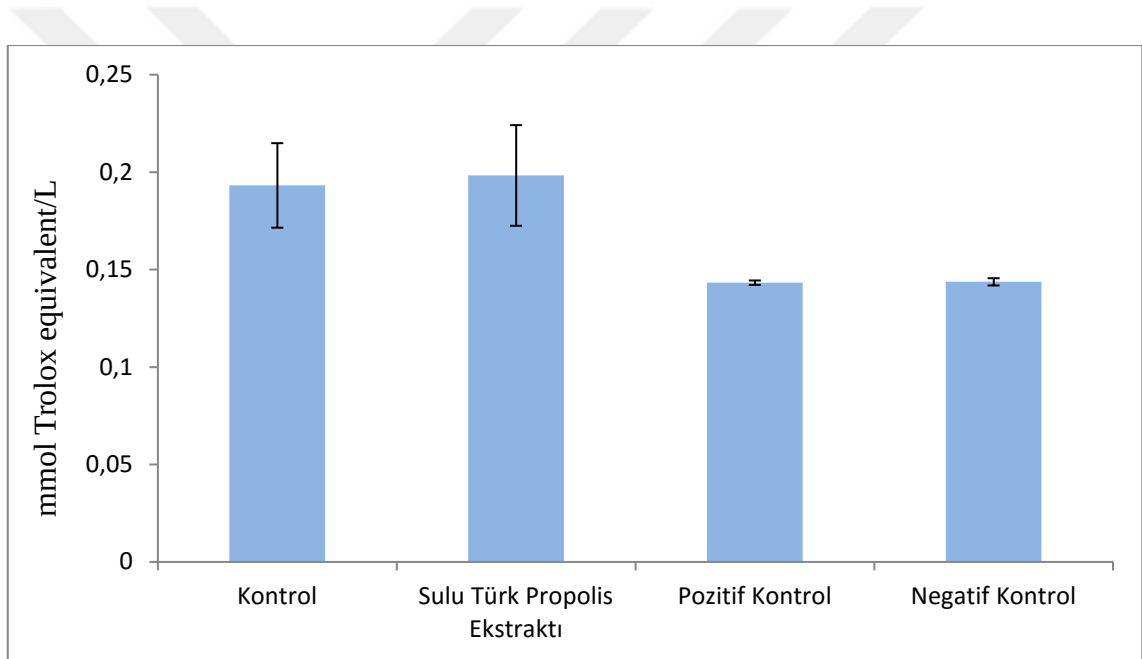
## 6.2. Eritrosit Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Seviyeleri

Grupların toplam antioksidan kapasite (TAK) düzeyi, Tablo 14 ve Şekil 10’da gösterilmiştir.

**Tablo 15.** Eritrosit TAK Seviyeleri

| Grup (n=3)                   | Eritrosit TAK (mmol trolox equivalent/L) | ANOVA, p |
|------------------------------|------------------------------------------|----------|
| Kontrol                      | $0.19 \pm 0.012^a$                       | 0.001    |
| Sulu Türk Propolis Ekstraktı | $0.21 \pm 0.025^b$                       |          |
| Pozitif Kontrol              | $0.14 \pm 0.001^c$                       |          |
| Negatif Kontrol              | $0.14 \pm 0.001^d$                       |          |

a-c,a-d,b-c,b-d,c-d, Post-hoc Tukey testine göre anlamlı fark vardır ( $p<0.05$ )



**Şekil 10.** Eritrosit TAK seviyeleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; sulu Türk propolis ekstrakt grubunda negatif kontrol grubuna göre toplam antioksidan kapasite anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

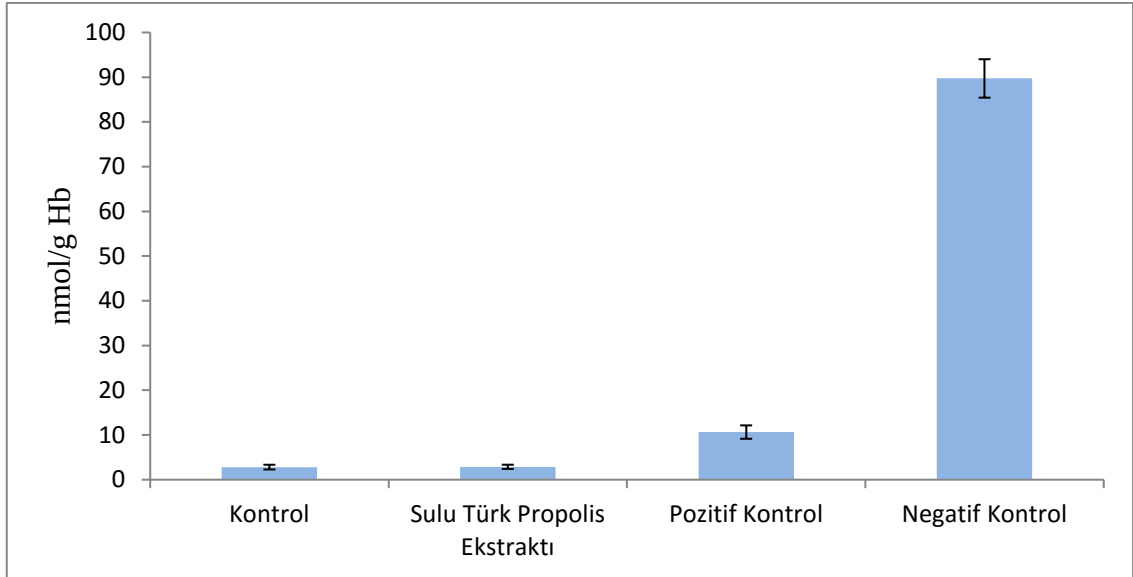
### 6.3. Eritrosit MDA Seviyeleri

Grupların MDA seviyeleri, Tablo 15 ve Şekil 11’de gösterilmiştir.

**Tablo 16.** Eritrosit MDA sonuçları

| Grup (n=3)                    | Eritrosit MDA (nmol/g Hb) | Kruskal-Wallis,p |
|-------------------------------|---------------------------|------------------|
| Kontrol                       | 2.81 ± 0,52 <sup>a</sup>  | 0.001            |
| Sulu Türk Propolisi Ekstraktı | 2.87 ± 0,47 <sup>b</sup>  |                  |
| Pozitif Kontrol               | 10.6 ± 1,49 <sup>c</sup>  |                  |
| Negatif Kontrol               | 89.7 ± 4,29 <sup>d</sup>  |                  |

a-c,a-d,b-c,b-d,c-d, Mann-Whitney testine göre anlamlı fark vardır (p<0.05).



**Şekil 11.** Eritrosit MDA sonuçları

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit paketlerinde sulu Türk propolis ekstrakt grubunun MDA seviyesi, negatif kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu. MDA seviyesinin anlamlı derecede düşük olması oksidatif hasarı önlemek için verilen 200 µg/mL sulu Türk propolis ekstraktının antioksidan etki göstererek, reaktif oksijen radikallerini ortadan kaldırması sonucunda lipid peroksidasyonunu önleyici yönde etki ettiğini göstermektedir.

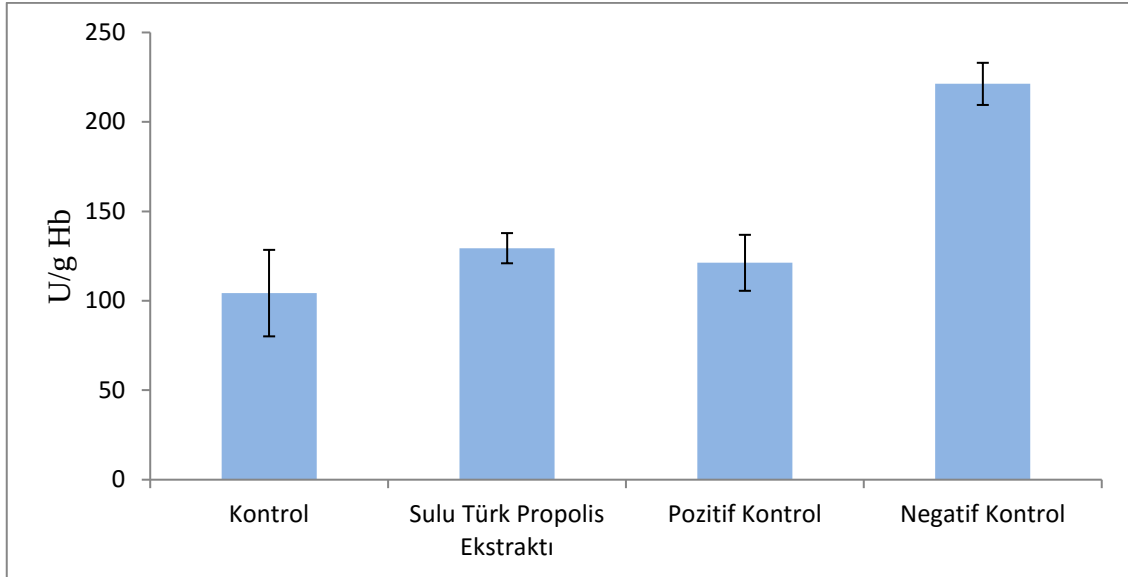
#### 6.4. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Grupların SOD aktivitesi, Tablo 16 ve Şekil 12’de gösterilmiştir.

**Tablo 17.** Eritrosit SOD Aktivitesi

| Grup(n=3)                    | Eritrosit SOD Aktivitesi (U/g Hb) | Kruskal-Wallis,p |
|------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| Kontrol                      | 104.2 ± 24.17 <sup>a</sup>        | 0.05             |
| Sulu Türk Propolis Ekstraktı | 129.4 ± 8.43 <sup>b</sup>         |                  |
| Pozitif Kontrol              | 121.2 ± 15.64 <sup>c</sup>        |                  |
| Negatif Kontrol              | 221.2 ± 11.77 <sup>d</sup>        |                  |

a-c,a-d,b-c,b-d,c-d, Mann-Whitney testine göre anlamlı fark vardır (p<0.05).



**Şekil 12.** Eritrosit SOD Aktiviteleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit lizatında, sulu Türk propolis ekstrakt grubunun negatif kontrole göre SOD enzim aktivitesi anlamlı derece düşük bulunması, oksidatif hasarı önlemek için verilen 200 µg/mL sulu Türk propolis ekstraktının antioksidan etki göstererek ortamdaki serbest oksijen radikallerini uzaklaştırarak ya da metabolize ederek, SOD enzimin aktivitesinin bu radikallerden etkilenmesini engelleyerek tüketimini azalttığı ve endojen antioksidan sistemi güçlendirdiğini göstermektedir.



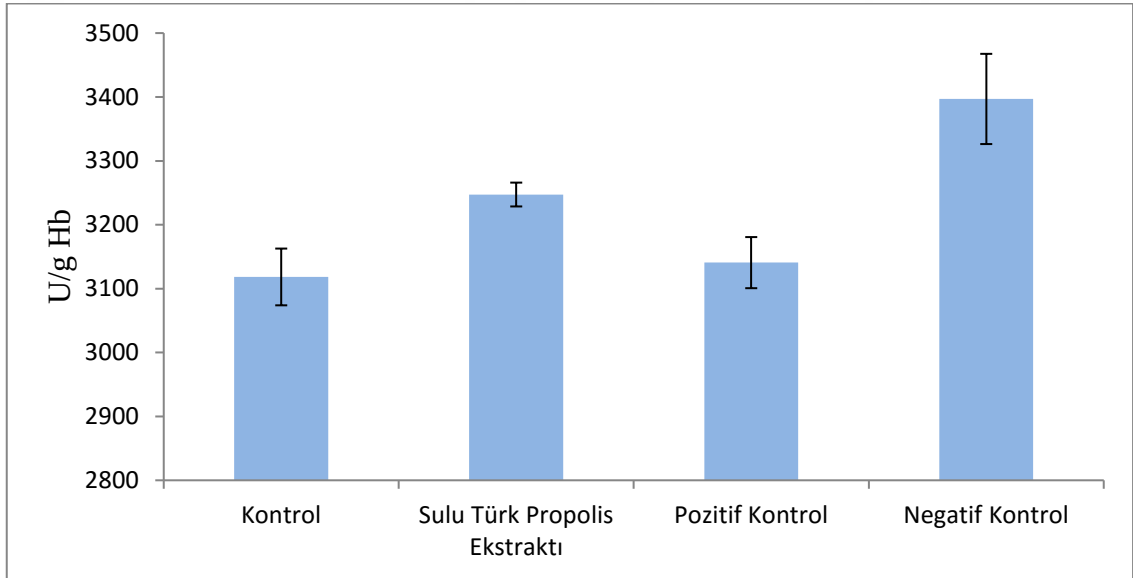
### 6.5. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktivitesi

Grupların CAT aktivitesi, Tablo 17 ve Şekil 13’da gösterilmiştir.

**Tablo 18.** Eritrosit CAT Enzim Aktivitesi

| Grup(n=3)                     | Eritrosit CAT Aktivitesi (U/g Hb) | ANOVA,p |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------|
| Kontrol                       | 3118 ± 44.41 <sup>a</sup>         | 0.0001  |
| Sulu Türk Propolisi Ekstraktı | 3247 ± 18.65 <sup>b</sup>         |         |
| Pozitif Kontrol               | 3140 ± 40.00 <sup>c</sup>         |         |
| Negatif Kontrol               | 3396 ± 70.60 <sup>d</sup>         |         |

a-d,b-d,c-d, Post-hoc Tukey testine göre anlamlı fark vardır (p<0.05).



**Şekil 13.** Eritrosit CAT Aktiviteleri

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit lizatında, sulu Türk propolis ekstrakt grubunun negatif kontrole göre CAT enzim aktivitesi anlamlı derece düşük bulunması, oksidatif hasarı önlemek için verilen 200 µg/mL sulu Türk propolis ekstraktının antioksidan etki göstererek ortamdaki serbest oksijen radikallerini uzaklaştırarak ya da metabolize ederek, CAT enzimin aktivitesinin bu radikallerden etkilenmesini engelleyerek tüketimini azalttığı ve endojen antioksidan sistemi güçlendirdiğini göstermektedir.

Çalışmamız sonucunda oksidatif stres biyobelirteçleri arasında yapmış olduğumuz korelasyon testine göre; MDA'nın CAT, SOD ve TOK ile arasında pozitif korelasyon var iken TAK ile arasında negatif korelasyon vardır. SOD'un MDA, CAT ve TOK arasında pozitif korelasyon vardır. CAT'ın MDA ve SOD ile arasında pozitif korelasyon vardır. TAK'ın MDA ile arasında negatif korelasyon vardır. TOK'un MDA ve SOD ile arasında pozitif korelasyon vardır (Tablo 19).

**Tablo 19.** Ölçülen Oksidatif Stres Biyobelirteçlerinin Korelasyon Tablosu

|     | MDA                 | SOD                 | CAT                 | TAK                 | TOK                 |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| MDA |                     | r= 0.938<br>p<0.01  | r= 0.822<br>p<0.01  | r= -0.599<br>p<0.05 | r= 0.878<br>p<0.01  |
| SOD | r= 0.938<br>p<0.01  |                     | r= 0.833<br>p<0.01  | r= -0.567<br>p>0.05 | r= 0.259<br>p>0.05  |
| CAT | r= 0.308<br>p<0.01  | r= 0.720<br>p<0.01  |                     | r= -0.151<br>p>0.05 | r= 0.522<br>p>0.05  |
| TAK | r= -0.782<br>p<0.05 | r= -0.537<br>p>0.05 | r= -0.151<br>p>0.05 |                     | r= -0.418<br>p>0.05 |
| TOK | r= 0.783<br>p<0.01  | r= 0.357<br>p>0.05  | r= 0.259<br>p>0.05  | r= -0.418<br>p>0.05 |                     |

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır. Serbest radikal olarak adlandırılan bu reaktif oksijen türleri canlı sistemdeki DNA, protein, lipid ve karbohidrat gibi moleküller ile reaksiyona girerek onların yapısını bozarlar ve dolayısıyla hücre hasarına neden olurlar. Organik bir peroksit olan t-BHP akut oksidatif hasar çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü t-BHP'nin, alkoksil ve peroksil radikallerine dönüşerek daha reaktif bir radikal olan hidroksil oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir (71, 72).

Eksojen kaynaklı radikaller membranda hasara ve bu hasara bağlı olarak membranın hiperpolarize olmasına neden olur. Ayrıca t-BHP'nin membrana bağlı enzimleri seçici olarak inhibe ettiği, methemoglobin oluşumu artırdığı ve bazı membran proteinlerinin yüksek molekül ağırlıklı polimerlere kümeleşmesine neden olduğu belirtilmektedir (76).

t-BHP, hemoglobin ile etkileşime geçtiğinde t-bütoksil radikali oluşur ve bu radikal membran lipidleri ile tepkimeye girerek lipid peroksidasyonunu başlatır. Bu zincir reaksiyonların malondialdehit, aldehitler ve ketonlar gibi çeşitli reaksiyonların son ürünler oluşuncaya kadar devam ettiği belirtilmiştir (77, 78).

Yapılan literatür taraması sonucunda *in vitro* şartlarda model hücre olarak eritrositler seçilirken, oksidatif hasar oluşturmak için de eksojen bir oksidan olan t-BHP seçildi.

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların çeşitli yan etkilerinin ortaya çıkması insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketilmesine yöneltmiştir. Arı ürünleri de en çok tercih edilen doğal ürünlerden biridir. Aslında insanoğlu eski çağlardan beri arı ürünlerini çeşitli amaçlar için kullanmıştır fakat bu reçinemsî arı ürününün faydaları henüz çok az aydınlatılabilmektedir (79).

Propolisin polifenol bileşik bakımından zengin bir ürün olması ve bu bileşiklerinde antioksidan, antimutajenik, tümörisidal, antikarsinojenik ve antiinflamatuvar özellikler taşıdığı bilinmektedir. Propolisin biyolojik aktivitesinden sorumlu bileşenler; polifenolik bileşikler ve esas olarak flavonoidlerdir. Bundan dolayı propolisin oksidatif hasarı önleyebileceği düşünülmektedir (1, 15).

Aliyazıcıoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise propolisin DMSO'lu ekstraktlarının konsantrasyona bağlı olarak K-562 kanser hücrelerinde solunumsal patlamayı inhibe ettiği flow-sitometrik analizlerle ortaya konulmuş ve propolis ekstraktlarının bu etkiyi antioksidan özellikleri ile gerçekleştirdiği savunulmuştur (81).

Yine Aliyazıcıoğlu ve arkadaşlarının bir başka çalışmasında, fibroblast hücre serileri kullanılarak çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan propolisin etanolik ekstraktlarının, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile indüklenmiş DNA hasarı üzerine etkisi comet analizi ile incelenmiştir. Hücrelerin, propolisin 50  $\mu g/mL$ 'lik konsantrasyondaki etanolik ekstraktıyla; genotoksik ajandan önce, genotoksik ajanla aynı anda ve genotoksik ajandan sonra muamelesi sonucunda,  $H_2O_2$  ile indüklenmiş DNA hasarında, genotoksik etki yaratmadan, anlamlı azalma olduğu ve bunun da propolisin içinde bulunan fenolik bileşenlerinin antioksidan aktivitesinden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır (82).

Çolak ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada; doğal propolisin DMSO ile hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki ekstraktları HL-60 hücre serisi ile inkübe edildikten sonra flow-sitometri ile hücre siklusu analizleri ve spektrofotometrik kaspaz3 aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda 0.25-0.50  $mg/mL$ 'lik konsantrasyondaki propolisin differansiasyon oranını ve kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı ve böylece apoptozu indükleyip antitümöral aktiviteye sahip olduğu kanaatine varılmıştır (80).

Turan'ın çalışmasında, Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanıp etanolik ekstraktı hazırlanmış propolis örneklerinin DNA tamir enzimlerinden olan hOGG-1 ve Neil-1 DNA glikozilazların ekspresyonları üzerinde etkisi gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan real-time PCR yöntemi kullanılarak ifade edilmiştir. hOGG-1 ve Neil-1'in mRNA ekspresyon analiz sonuçlarına göre deney grubunda her ikisinin mRNA ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. DNA hasarının tespiti için ise komet analizi kullanılmıştır. Komet sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde etanollü propolis ekstraktlarının antigenotoksik özelliğinin, DNA tamir enzimlerinin ekspresyonlarında artıştan ziyade farklı mekanizmalar ile hasar oluşumunun propolis tarafından engellenmesi özelliğinden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır (19).

Yalçın ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, Türk propolisinin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış etanollü ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde gama radyasyon ile uyarılmış DNA hasarını engellediği ve radyoprotektif etkinliğe sahip olduğu ortaya konulmuştur (83).

Mısır'ın yaptığı çalışmada Trabzon yöresinden elde edilen propolisin etanol, metanol, DMSO'lu ekstraktlarının demir şelatlama aktivitesi ve serbest radikalleri yakalama kapasitesi incelenmiştir. Bu ekstraktların 25 mg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda %90'ın üzerinde metal şelatlama etkisi olduğu bulunmuştur. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) metoduyla radikal süpürücü aktivitesi tayin edilerek etanollü, metanollü ve DMSO'lu ekstraktlarda radikal süpürücü aktivitesi olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda *in vitro* ROS ölçümü yapılarak propolisin pozitif kontrole göre oluşan ROS miktarını azalttığı, bunun da radikal süpürücü etki ve etkin olarak metal şelatlama üzerinden gerçekleşmiş olabileceği sonucuna varılmıştır (84).

Akbulut ve arkadaşlarının yaptığı, propolisin sitotoksik etkisinin mekanizmasını açıklayabilmek için hücre içi hidrojen peroksit ve  $Ca^{2+}$  düzeylerinin araştırılmasının amaçlandığı çalışmada HEp-2 (insan laringeal epidermoid karsinoma) hücreleri kullanılarak Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktlarının, hücre içi ve serbest  $Ca^{2+}$  indeksine etkisi spektrofotometrik yöntemle incelenmiştir. Sulu ve etanolik ekstraktların hücre içi  $H_2O_2$  konsantrasyonlarını ve  $Ca^{2+}$  indekslerini kontrole göre florimetrik okumalarda arttırdığı ve hücreleri bu şekilde apoptoza götürebileceği sonucuna varılmış (85). Çalışmanın devamı niteliğindeki bir başka çalışmada antioksidan sistemde önemli enzimler olan süperoksit dismutaz ve katalazın aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle ölçülmüş ve sulu propolis ekstraktının HEp-2 hücrelerinde SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerini azalttığı sonucu bulunmuştur (86).

Demir ve arkadaşlarının yaptığı A549 hücre serisindeki sitotoksik etkinin ve olası etki mekanizmalarının ortaya konulmasının amaçlandığı kapsamlı çalışmada etanollü propolis ekstraktının antioksidan kapasitesi toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeme gücü testleriyle, sitotoksik etkinliği ise MTT metoduyla belirlenmiştir. Devamında ise 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

3/7 aktivitesi yönünden incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda ekstraktın A549 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisinin normal fibroblast hücrelerine göre seçici olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ekstraktın A549 hücrelerini hücre döngüsünün G<sub>1</sub> 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 belirlenmiştir (87).

Barlak tarafından yapılan çalışmada, PMN lökositlerin forbol miristat asetat (PMA) indüklenmesiyle solunumsal patlamanın uyarıldığı durumda artan konsantrasyonda DMSO'lu propolis ekstraktlarının hem solunumsal patlamayı hem de PMN elastaz salgılanmasını azalttığı bulunmuştur (88).

Barlak ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada Türk propolisi ekstraktlarının prostat kanser hücre serilerinin proteomikğine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise propolisin antioksidan potansiyelinin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarının total fenolik bileşimleriyle korelasyon gösterdiği ve aynı ekstraktların MTT testi sonucu hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Bunun sonucu olarak propolisin PC-3 prostat kanser hücre serilerinde protein ekspresyon profilini değiştirerek, antiproliferatif aktiviteye sahip olabileceği sonucuna varılmış (89).

Propolis; reçinemsî yapısından dolayı ham halde kullanılamamakta, çeşitli çözücülerle ekstrakt haline getirilmektedir. Bu işlem esnasında inert bileşenlerin uzaklaştırılmasının ve polifenolik içeriğin korunması gerektiği dikkat edilmesi gereken hususlar olduğu vurgulanmaktadır (90).

Propolis ekstraksiyon işlemlerinde farklı yöntemler ve çözücüler kullanılmaktadır. Bu kullanılan ekstraksiyon yöntemine ve çözücüye göre de propolis ekstraktları farklı aktiviteler sergileyebilmektedirler (91).

Moreno ve arkadaşları Arjantin propolisinde antioksidan aktivite ile flavonoid içeriğinin belirgin biçimde ilişkili olduğunu göstermişlerdir (92).

Buradan hareketle literatürle uygun şekilde olmasına dikkat edilerek bu çalışmada kullanılacak propolis numuneleri önce donduruldu, sonrasında toz haline getirildi ve toz haldeki propolis numuneleri distile su ilavesi ile konsantrasyonu 50 mg/mL'lik sulu Türk propolis ekstraktı hazırlandı.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit paketlerinde sulu Türk propolis ekstrakt grubunun MDA seviyesi, negatif kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu. MDA seviyesinin anlamlı derecede düşük olması oksidatif hasarı önlemek için verilen 200 µg/mL sulu Türk propolis ekstraktının antioksidan etki göstererek, reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesi sonucu, lipid peroksidasyonunu önleyici yönde etki ettiğini göstermektedir. Yapılan diğer çalışmalar bizim bulgularımızla uygunluk göstermektedir.

İsla ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada ise propolisin flavonoid içeriğiyle MDA yüzdesi arasında negatif bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Ayrıca flavonoid içeriğin haricinde diğer propolis bileşenlerinin antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (93).

Hoşnuter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada propolisin temel bileşenlerinden biri olan Kafeik asit fenil esteri (CAPE)'nin, lipid peroksidasyonunu baskılayarak MDA düzeyini düşürdüğü, reaktif oksijen türlerini azaltıcı etki gösterdiği belirtilmiştir (94).

Yine yapılmış olan çalışmalarda propolisin içindeki polifenol bileşiklerin oksidatif stres şartları maruz bırakılan eritrositlerde antihemolitik etki ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu özelliği ortaya konulmuştur (95, 96).

Kanbur ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada ise propolisin, rat eritrositlerinde propetamfos ile indüklenmiş oksidatif hasara karşı koruyuculuğu incelenmiş ve plazma MDA seviyesini düşürdüğü belirtilmiştir (97).

Serbest radikallerin aşırı reaktif yapıda moleküller olmasından dolayı hücresel bileşenlerdeki karbohidrat, protein ve lipidlerin oksidasyonuyla sonuçlanacak zararın önlenmesi antioksidanların görevidir (98).

SOD, CAT ve GPx gibi redoks döngüsünde yer alan enzimler endojen antioksidanlardır ve bu enzimler hücre içindeki primer koruma sistemini oluştururlar (99).

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre; eritrosit lizatında, sulu Türk propolis ekstrakt grubunun negatif kontrole göre SOD ve CAT enzim aktivitesi anlamlı derecede düşük bulunması, oksidatif hasarı önlemek için verilen 200 µg/mL sulu Türk propolis ekstraktının antioksidan etki göstererek ortamdaki serbest oksijen radikallerini

uzaklaştırarak ya da metabolize ederek, SOD ve CAT enzim aktivitesinin bu radikallerden etkilenmesini engelleyerek tüketimini azalttığı ve endojen antioksidan sistemi güçlendirmiş olabileceği ortaya konuldu. Literatürde bulgularımızı destekleyen sonuçlar mevcuttur.

Abdallah ve arkadaşlarının insan HepG2 hücrelerinde çeşitli fenolik bileşiklerin t-BHP ile uyarılmış oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin incelenmiş olduğu çalışmada, t-BHP'nin hücrelerde SOD enzim aktivitesini anlamlı derecede artırdığı ortaya konulmuştur (100).

Bais ve arkadaşlarının insan eritrosit ve lökosit hücrelerinde *Amorphophallus campanulatus* bitki ekstraktlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile uyarılmış oksidatif hasara koruyucu etkinliklerini inceledikleri çalışma sonucunda, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in eritrosit ve lökositlerde SOD enzim aktivitesini önemli derecede artırdığı ortaya konulmuştur (101).

Slamenova ve arkadaşlarının insan HepG2 hücrelerinde gerçekleştirmiş olduğu t-BHP'ye bağlı SOD enzim aktivitesinin normal hücre serilerine göre anlamlı derecede artırdığı ortaya konulmuştur (102).

Slamenova ve arkadaşlarının insan HepG2 ve fare v79 hücrelerinde çeşitli serbest radikaller (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, t-BHP ve MMS) kullanarak yapmış oldukları bir başka çalışma sonucunda t-BHP'nin HepG2 hücrelerinde CAT aktivitesini, V79 hücrelerinde ise SOD enzim aktivitesini anlamlı derecede artırdığı ortaya konulmuştur. Yine aynı çalışmada farklı hücre tiplerinde t-BHP'nin metabolize edilme yöntemi farklı unsurlar tarafından gerçekleştiği tartışılmış hatta çeşitli konsantrasyonlardaki t-BHP'nin enzim aktivitesi üzerine farklı etkiler yaptığı ortaya konulmuştur (103).

Hoşnuter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada propolisin temel bileşenlerinden biri olan CAPE'in, ksantin oksidaz ve nitrik oksit sentaz aktivitelerini baskı altında tutarak engellediği ve süperoksit dismutaz aktivitesinin tüketiminin önlenmesi ile antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir (94).



Sonuç olarak bu çalışmada ilk defa sulu Türk propolis ekstraktının *in vitro* şartlarda, insan eritrosit hücrelerinde t-BHP ile indüklenmiş oksidatif hasara karşı koruyucu etkinliği ortaya konuldu. Elde edilen bulgular çeşitli *in vitro* ve *in vivo* alışmaların öncüsü niteliğindedir. Bu çalışmalardan da elde edilecek müspet verilerle propolisin alternatif, tamamlayıcı doğal bir ürün olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.



## 8. KAYNAKLAR

1. Sforcin JM, Bankova V (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 133: 253-260.
2. Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JA, Roesch M (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol* 52: 137-142.
3. Solange MC, Sabik H, Antoine C, Fortin J, Graveline N, Visentainer JV, Britten M (2015). Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *Food Sci Tech* 60: 609-614.
4. Luo C, Zou X, Li Y, Sun C, Jiang Y, Wu Z (2011). Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection. *Food Chem* 127: 314-320.
5. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.
6. 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.
7. Lima CF, Fernandes FM, Pereira WC (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sci* 79: 2056-2068.
8. Smart RC, Hodgson E (2008). *Molecular and biochemical toxicology*. Wiley fourth edition, 342-343.
9. Kumar A (2011). Biomedical studies on lipid peroxidation and erythrocyte fragility during the process of aging. *Asian Pac J Trop Biomed* 1: 6-7.
10. Cimen M (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 390: 1-11
11. Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem* 52: 7286-7292.

12. Wang K, Hu L, Jin XL (2015). Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- $\kappa$ B. *Journal of Functional Foods* 19: 464–478.
13. Marcucci MC, Ferreres F, Custodio AR, Ferreira MM, Bankova VS, Garcia VC, Bretz WA (2000). Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Z Naturforsch C* 55: 76-81.
14. Zumla A, Lulat A (1989). Honey a remedy rediscovered. *J R Soc Med* 82: 384-385.
15. Ferguson LR (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res* 475: 89-111.
16. Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, Antunes MD (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem Toxicol* 48: 3418-3423.
17. Thirugnanasampandan R, Raveendran SB, Jayakumar R (2012). Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. *Asian Pac J Trop Biomed* 2: 651-654.
18. Khalil ML (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 7: 22-31.
19. Turan İ (2011). Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerine etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incilenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
20. Burdock GA (1988). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis *Food and Chemical Toxicol* 36: 347-363.
21. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile uyarılmış DNA hasarı üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
22. 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.
23. Lairon D, Amiot MJ (1999). Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Current Opinion in Lipidology* 10: 23-28.

24. akıroğlu TN (2017). Türk propolisinin sulu ve etanollü ekstraktının HPLC ve GC-MS ile karakterizasyonu, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
25. olak M (2009). Arı poleni ve propolisin metastatik insan prostat kanseri hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
26. Silva JP, Gomes AC, Coutinho OP (2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. Eur J Trop Biomed 601: 50-60.
27. LeMarchand L (2002). Cancer preventive effects of flavonoids a review. Biomed Pharmacother 56: 296-301.
28. Campos MG, Cunh A, Markham KR (1997). Bee products chemical composition and application. New York Plenum Press, pp. 93-100.6725.
29. Duran GG (2007). *In vitro* koşullarda propolisin antibakteriyel, antifungal ve leyiş-manyasidal etkilerinin araştırılması, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Hatay.
30. Laskar RA, Sk I, Roy N, Begum NA (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. Food Chem 122: 233–237.
31. Choi YM, Noh DO, Cho SY, Suh HJ, Kim KM, Kim JM (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. Food Sci Tech 39: 756-761.
32. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA (2010) Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. Toxicol Pathol 38: 96-109.
33. Tokaç D (2007). Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri, Haccettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
34. Sies H (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. Klin Wochenschr 69: 965-968.
35. Yılmaz S, Ozan S, Benzer F, Canatan H (2003). Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. Cell Biochem Funct 21: 325-330.
36. Harris ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes. J Nutr 122: 625-626.

37. Barber DA, Harris SR (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm* 34: 26-35.
38. Bjorklund G, Chirumbolo S (2017). Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition* 33: 311-321.
39. Brent J, Rumack B (1993). Role of free radicals in toxic hepatic injury I. Free radical Biochemistry. *J Toxicol Clin* 31: 139-171.
40. Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Int J Pharm Sci Res* 1185-192.
41. Karabulut H, Gülay MS (2016). Serbest radikaller. *MAKÜ Sag Bil Enst Derg* 4: 50-59.
42. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sc* 4: 89-96.
43. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279: 49064-49073.
44. Miller DM, Buettner GR, Aust SD (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 8: 95-108.
45. Cadenas E, Sies H (1998). The lag phase. *Free Radic Res* 28: 601-609.
46. Chae HZ, Kang SW, Rhee SG (1999). Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 300: 219-226.
47. Dinçer Y, Akçay T (2000). DNA Hasarı. *Turk J Biochem* 25: 73-79.
48. Halliwell B (1987). Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB J* 1: 358-364.
49. Marklund SL (1984). Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J* 220: 269-272.
50. Grayck EN, Suliman HB, Piantadosi CA (2005). Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Bio* 37: 2466-2471.
51. McCord JM, Edeas MA (2005). SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother* 59: 139-142.
52. Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Birinci baskı. Mimoza Yayınları. 17.

53. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Bri Med Bull* 49: 481-493.
54. Halliwell B (1996). Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 24: 1023-1027.
55. Yalçın AS (1998). Antioksidanlar. *Klinik Gelişim II*. 11: 342-346
56. Çolak M (2003). Miyeloid kanser hücre serilerinde propolis ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
57. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics *Mass Spectrom Rev*. 24: 55- 99.
58. Azzi A (2007). Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? *Biochem Biophys Res Commun* 362: 230-232.
59. Catala A (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Physic Lipids* 157: 1-11.
60. Halliwell B, Aruoma OI (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281: 9-19.
61. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4: 118-126.
62. Gülbahar Ö (2007). Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. *Turk J Geriatrics* 10: 43-48.
63. Baykal Y, Kocabalkan F (2000). Serbest radikaller ve hücre hasarı. *Sendrom* 9:31-36.
64. Flora SJ (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 53: 1-2.
65. Catala A (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem and Phys of Lipids* 157: 1-11.
66. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinic Chem* 34: 497-500.

67. Goth L (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chimica Acta* 196: 143-151.
68. Stocks J, Dormandy TL (1971). The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 20: 95-111.
69. Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38: 1103-1111.
70. Erel O (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 37: 277-285.
71. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K (1988). Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44: 230-232.
72. Sarkar MK, Sil PC (2010). Prevention of tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative impairment and cell death by a novel antioxidant protein molecule isolated from the herb, *Phyllanthus niruri*. *Toxicol In Vitro* 24: 1711-1719.
73. Zavodnik LB, Zavodnik IB, Niekurzak A, Szosland K, Bryszewska M (1998). Activation of red blood cell glutathione peroxidase and morphological transformation of erythrocytes under the action of tert-butyl hydroperoxide. *Biochem Mol Biol Int* 44: 577-588.
74. Mansouri A, Lurie AA (1993). Concise review: methemoglobinemia. *Am J Hematol* 42: 7-12.
75. Grelloni F, Gabbianelli R, Santroni AM, Falcioni G (1993). Inactivation of glutathione-peroxidase following entrapment of purified alpha-hemoglobin or beta-hemoglobin chains in human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 217: 187-192.
76. Moore RB, Brummitt ML, Mankad VN (1989). Hydroperoxides selectively inhibit human-erythrocyte membrane enzymes. *Arch of Biochem Biophys* 273: 527-534.
77. Patterson LK (1981). *Oxygen and oxyradicals in chemistry and biology*. Academic Press, New York; 89-94.
78. Esterbauer H (1982). *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*. Academic Press, New York; 439-441.
79. Ghisalberti EL (1979). Propolis - Review. *Bee World* 60: 59-84.

80. Çolak M, Değer O, Cengiz SÖ, Uçar F, Ovalı, E (2004). Miyeloid kanser hücre serilerinde propolis ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri, 18. Ulusal Biyokimya Kongresi, 15-19 Mayıs, Trabzon.
81. Aliyazicioglu Y, Deger O, Ovali E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y, Karahan SC (2005). Effects of Turkish polen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *Int Immunopharm* 5: 1652-1657.
82. Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Cakiroglu TN, Akalin I, Deger O, Bedir A (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biol Hung* 62: 388-396.
83. Yalcin CO, Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Bahat Z, Misir S, Deger O (2016). Evaluation of the radioprotective effect of Turkish propolis on foreskin fibroblast cells. *J Cancer Res Ther* 12: 990-994.
84. Mısır S (2013). Türk propolisinin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının radikal yakalama ve demir şelatlama aktivitesinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
85. Akbulut K, Deger KB, Deger O, Imamoglu M, Demir S, Cakiroglu TN, Ayar A (2014). Effect of water extract of Turkish propolis on intracellular calcium and hydrogen peroxide levels in human laryngeal epidermoid carcinoma cell lines (HEp-2). IFCC Worldlab, 22-26 June, İstanbul
86. Akbulut K, Ghanbaritaghiaabadi J, Deger O, Demir S, Sentürk A, Cakiroglu TN (2015). Türk propolisinin sulu ekstraktının insan laryngeal epidermoid karsinoma (HEp-2) hücre serilerinde süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeylerine etkisi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Kasım, Antalya.
87. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Ozer YS, Akbulut K, Kilinc K, Deger O (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutr Cancer* 68: 165-172.
88. Barlak Y (2003). Türk propolisi ekstraktlarının solunumsal patlama sonrası PMN lökositlerden PMN elastaz salınımına etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
89. Barlak, Y, Deger O, Çolak M, Karataylı SC, Bozdayı AM, Yücesan F (2011). Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteo Sci* 9: 74.



90. Gomez-Caracava AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal* 41: 1220-1234.
91. Sforcin JM (2007). Propolis and the immune system: A review. *J Ethnopharmacol* 113: 1-14.
92. Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharm* 71: 109-114.
93. Isla MI, Moreno MIN, Sampietro AR, Vattuone MA (2001). Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 76: 165-170.
94. Hosnuter M, Gurel A, Babuccu O, Armutcu F, Kargi E, Isikdemir A (2004). The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns* 30: 121-125.
95. Asgary S, Naderi G, Askari N (2005). Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp Clin Cardiol* 10: 88-90.
96. Baltazar AF, Henrique R, Estevinho L, Carvalho M (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food Chem Toxicol* 49: 86-92.
97. Kanbur M, Eraslan G, Silici S (2009). Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 909-915.
98. Schmidt HH, Stocker R, Vollbracht C, Paulsen G, Riley D, Daiber A, Cuadrado A (2015). Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal* 23: 1130-1143.
99. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828.
100. Abdallah H, Farag M, Osman S, Kim DH, Kang K, Pan CH, Abdel-Sattar E (2016). Isolation of major phenolics from *Launaea spinosa* and their protective effect on HepG2 cells damaged with t-BHP. *Pharm Biol* 54: 536-541.
101. Bais SS, Mali YP (2013). Protective effect of *Amorphophallus campanulatus* tuber extracts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. *Int J Green Pharm* 7: 111-116.

- 102.** Slamenova D, Kozics K, Hunakova L, Melusova M, Navarova J, Horvathova E (2013). Comparison of biological processes induced in HepG2 cells by tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ): The influence of carvacrol. *Mutat Res* 757: 15-22.
- 103.** Slamenova D, Kozics K, Melusova M, Horvathova E (2015). Influence of different chemical agents ( $H_2O_2$ , t-BHP and MMS) on the activity of antioxidant enzymes in human HepG2 and hamster V79 cells; relationship to cytotoxicity and genotoxicity. *Neoplasma* 62: 722-732.



## 9. EKLER

**EK 1** Deneyde kullanılacak t-BHP konsantrasyonunun belirlenmesi.

|                    | Kontrol | 250 µM<br>t-BHP | 500 µM<br>t-BHP | 750 µM<br>t-BHP | 1000 µM<br>t-BHP | 2000 µM<br>t-BHP |
|--------------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| MDA<br>(nmol/g Hb) | 4 ± 0.9 | 14 ± 1.6        | 201 ± 2.1       | 272 ± 3.6       | 304 ± 16.7       | 101 ± 6.9        |

**EK 2** Deneyde kullanılacak sulu Türk propolisi konsantrasyonunun belirlenmesi.

|                    | Kontrol | 50 µg/mL<br>Propolis | 100 µg/mL<br>Propolis | 200 µg/mL<br>Propolis | 400 µg/mL<br>Propolis | Negatif<br>Kontrol* |
|--------------------|---------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| MDA<br>(nmol/g Hb) | 4 ± 0.9 | 80 ± 0.5             | 37± 1.6               | 3 ± 0.4               | 4 ± 1.6               | 272 ± 3.6           |

\*Negatif Kontrol: 750 µM t-BHP

**EK 3** Deneyde kullanılacak kuersetin konsantrasyonunun belirlenmesi.

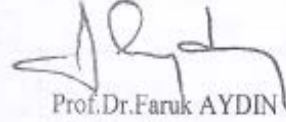
|                    | Kontrol | 1 µg/mL<br>Kuersetin | 2 µg/mL<br>Kuersetin | 5 µg/mL<br>Kuersetin | 10 µg/mL<br>Kuersetin | Negatif<br>Kontrol* |
|--------------------|---------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| MDA<br>(nmol/g Hb) | 4 ± 0.9 | 43 ± 7.6             | 4.9 ± 0.84           | 10.8 ± 3.2           | 8.1 ± 4.9             | 272 ± 3.6           |

\*Negatif Kontrol: 750 µM t-BHP

#### EK 4 Gönüllü Onam Formu.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                       |                                                                                    |                 |                 |              |              |          |          |            |          |  |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|----------|----------|------------|----------|--|-----------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ<br/>GÖNÜLLÜ OLUR FORMU</b> |  |                 |                 |              |              |          |          |            |          |  |           |
| <p>Ben ..... Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesinde yürütülmekte olan “Çeşitli arı ürün ve bitki ekstraktlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve/veya t-BHP ile uyarılmış oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin incelenmesi” adlı araştırmaya denek olarak katılmayı gönüllülükle kabul ediyorum.</p> <p>Bana, Arş. Gör. Kübra AKBULUT tarafından doğal antioksidan maddelerin vücuttaki antioksidan sisteme olan katkısı ve önemi anlatıldı. Bu çalışmada geleneksel tedavi amaçlı olarak kullanılan doğal ürünlerin (propolis, polen, arı sütü ve çeşitli bitkilerin) oksidan hasara karşı koruyuculuğunun araştırılacağı ve beklenen sonuçların alınması halinde bu doğal ürünlerin kullanımının oksidatif hasarla ilişkili hastalıkların tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanılabilirliğinin önünün açılacağı vurgulandı.</p> <p>Yapılacak olan bu çalışma için bir defaya mahsus bir gecelik açlık sonrasında kan vereceğim, farklı olarak herhangi bir işlem uygulanmayacağı ve daha sonra bu kanlarda, konu ile ilgili biyokimyasal analizler yapılacağı anlatıldı.</p> <p>Kan alma işlemi esnasında gözlenebilecek istenmeyen etkiler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma gibi olası bir soruna karşı gerekli tedbirlerin alınacağı, doktoruma haber vererek araştırmadan çekilme hakkım olduğumu ve kendimle ilgili bir olumsuzluk hissettiğimde Arş. Gör. Kübra AKBULUT’ a (05399877262) nolu telefondan 24 saat ulaşabileceğimi biliyorum.</p> <p>Araştırmamın 15 kişiyi kapsayan bir çalışma olduğunu biliyorum.</p> <p>Araştırma sonuçlarının, eğitim ya da bilimsel amaçlarla kullanılması sırasında benim mahremiyetime saygı gösterileceğine inanıyorum. Gönüllü olarak katılmaya karar verdiğim araştırmamın ekonomik sorumluluğunun bana ait olmadığını biliyorum.</p> <p>Bu açıklamaları anladım ve gönüllülükle bu onamı verdim. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.</p> |                                                       |                                                                                    |                 |                 |              |              |          |          |            |          |  |           |
| <table style="width: 100%;"><tr><td style="width: 50%;">Tanık / Vekil :</td><td style="width: 50%;">Hasta/Denegin :</td></tr><tr><td>Adı Soyadı :</td><td>Adı Soyadı :</td></tr><tr><td>İmzası :</td><td>İmzası :</td></tr><tr><td>Telefonu :</td><td>Adresi :</td></tr><tr><td></td><td>Telefon :</td></tr></table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                       |                                                                                    | Tanık / Vekil : | Hasta/Denegin : | Adı Soyadı : | Adı Soyadı : | İmzası : | İmzası : | Telefonu : | Adresi : |  | Telefon : |
| Tanık / Vekil :                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Hasta/Denegin :                                       |                                                                                    |                 |                 |              |              |          |          |            |          |  |           |
| Adı Soyadı :                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Adı Soyadı :                                          |                                                                                    |                 |                 |              |              |          |          |            |          |  |           |
| İmzası :                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | İmzası :                                              |                                                                                    |                 |                 |              |              |          |          |            |          |  |           |
| Telefonu :                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Adresi :                                              |                                                                                    |                 |                 |              |              |          |          |            |          |  |           |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Telefon :                                             |                                                                                    |                 |                 |              |              |          |          |            |          |  |           |
| Aydınlatan Hekim Adı Soyadı ve İmzası:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                       |                                                                                    |                 |                 |              |              |          |          |            |          |  |           |

## 10. ETİK KURUL ONAY FORMU

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                            | <p>T.C.<br/>KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ<br/>KTÜ TIP FAKÜLTESİ<br/>BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL<br/>BAŞKANLIĞI</p> |
| <p>Sayı : 24237859-673<br/>Konu: Etik kurul onay belgesi</p>                                                                                                                                                                                                                                                | <p>01/12/2016</p>                                                                                                                  |
| <p>Sayın; Prof.Dr.Orhan DEĞER<br/>Tıbbi Biyokimya ABD.</p>                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                    |
| <p>“Çeşitli Arı Ürün ve Bitki Ekstraktlarının <math>H_2O_2</math> ve/veya t-BHP ile Uyarılmış Oksidatif Hasara Karşı Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı etik kurul 2016/163 no.lu çalışması raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.</p> |                                                                                                                                    |
| <p>Bilginizi ve gereğini rica ederim.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                    |
| <p><br/>Prof.Dr.Faruk AYDIN<br/>Etik kurul Başkanı</p>                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                    |

## 11. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** Ertuğrul YİĞİT  
**Doğum Tarihi** 05.06.1988  
**E-posta** 310704@ogr.ktu.edu.tr  
**Adres** KTÜ SABE, Tıbbi Biyokimya AD, Trabzon

| Derece        | Bölüm/Program   | Üniversite | Yıl       |
|---------------|-----------------|------------|-----------|
| Lisans        | Biyoloji        | KTÜ        | 2008-2013 |
| Yüksek Lisans | Tıbbi Biyokimya | KTÜ        | 2014-2017 |

**Yabancı Dil:** İngilizce