



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN FARKLI
ÇÖZÜCÜLERDEKİ EKSTRAKTLARININ
RADİKAL YAKALAMA VE DEMİR
ŞELATLAMA AKTİVİTESİNİN
İNCELENMESİ**

Sema MISIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2013



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN FARKLI
ÇÖZÜCÜLERDEKİ EKSTRAKTLARININ
RADİKAL YAKALAMA VE DEMİR
ŞELATLAMA AKTİVİTESİNİN
İNCELENMESİ**

SEMA MISIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2013

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Sema Mısır'ın hazırladığı **“Türk Propolisinin Farklı Çözücülerdeki Ekstraktlarının Radikal Yakalama ve Demir Şelatlama Aktivitesinin İncelenmesi”** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oybirliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU _____

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU _____

Prof. Dr. Orhan DEĞER _____

Yrd . Doç. Dr Ahmet MENTEŞE _____

Tarih:....../.../2013

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

.....
Prof. Dr. Ahmet KALKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

BEYAN

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

10.12.2012

Sema MISIR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı başta tez danışman hocam Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU olmak üzere bilgilerinden faydalandığım ana bilim dalımızın saygıdeğer hocaları Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Doç. Dr. Ahmet ALVER, Doç. Dr. Birgül KURAL, Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN, Yrd. Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE' ye, spektrofotometrik ölçümler esnasında yardımını esirgemeyen Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ 'a çalışmanın tüm aşamalarında benimle olan Gümüşhane Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İbrahim TURAN ve Arş. Gör. Selim DEMİR başta olmak üzere, İmran İNCE, Arş. Gör. Serap ÖZER, Arş. Gör. Ayşegül UZUN, Arş. Gör. Diler US ALTAY, Arş. Gör. Selçuk YAMAN, İnci DURUKAN, Dilek KOCABAŞ'a, Sağlık Bilimleri Enstitüsü' ne, Biyokimya Anabilim Dalı' ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma ve beni bugünlere getiren değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sema MISIR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
BEYAN	
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER, KISALTMALAR ve ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÖZET	1
SUMMARY	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ	4
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Propolis	7
4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	9
4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	10
4.1.2.1. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler	11
4.1.2.2. Fenolik Bileşikler(Polifenoller)	13
4.1.2.3. Arı Mumu ve Yağ Asitleri	13
4.1.2.4. Esansiyel Yağlar	13
4.1.2.5. Mineral Elementler	14
4.1.3. Propolisin ve İçeriğinde Bulunan Bileşenlerin Biyolojik Aktiviteleri	14
4.1.3.1. Propolisin Antioksidan Aktivitesi	16
4.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres	18
4.2.1. Serbest Radikaller	18
4.2.1.1. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri	18
4.2.1.2. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları	20
4.2.1.3. Serbest Radikal Türleri	21
4.2.1.3.1. Süperoksit Radikalleri	21
4.2.1.3.2. Hidroksil Radikalleri	22
4.2.1.3.3. Hidrojen Peroksit	23

4.2.1.3.4. Hipoklorik Asit	24
4.2.1.3.5. Peroksil Radikali	24
4.2.1.3.6. Nitrik Oksit	24
4.2.1.3.7. Tersiyer Bütil Hidroperoksit	25
4.2.1.4. Serbest Oksijen Radikalinin Etkileri	26
4.2.2. Oksidatif Stres	27
4.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	28
4.3.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları	29
5. GEREÇ ve YÖNTEM	31
5.1. Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme ve Kimyasallar	31
5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Malzemeler	31
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
5.2. Kullanılan Yöntem	32
5.2.1. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Madde ve Malzemelerin Hazırlanması	34
5.2.2. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	35
5.2.3. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini	36
5.2.4. Hücre Kültürü	36
5.2.4.1. Primer Fibroblast Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığın Tespiti	36
5.2.4.2. Primer Fibroblast Hücrelerinin Çözülmesi, Çoğaltılması	37
5.2.4.3. Primer Fibroblast Hücrelerinin Pasajlanması	37
5.2.4.4. Primer Fibroblast Hücrelerinin Sayılması	38
5.2.5. CM-H ₂ DCFDA ile Hücre İçi Oksidatif Stresin Spektrofluometrik Analizi	38
5.2.6. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	40
6. BULGULAR	41
6.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktive Tayin Sonuçları	41
6.2. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayin Sonuçları	42
6.3. CM-H ₂ DCFDA ile Hücre İçi Oksidatif Stresin Spektrofluometrik Analizi	
Sonuçları	43
7. TARTIŞMA	45
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	50
8.1. Sonuçlar	50
8.2. Öneriler	50

9. KAYNAKLAR**52****10. ÖZGEÇMİŞ****60**

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler	10
Tablo 2. Propolis içeriğinde bulunan flavonoid türleri	11
Tablo 3. Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler	12
Tablo 4. Propolisin yapısında bulunan bazı bileşiklerin biyolojik aktiviteleri	14
Tablo 5. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri	21
Tablo 6. Antioksidan sistem	28
Tablo 7. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	31
Tablo 8. Kullanılan kimyasal maddeler	32
Tablo 9. DPPH tayini için deney esnasında yapılan pipetlemeler	35
Tablo 10. Metal şelatlama aktivitesi tayini için deney esnasında yapılan pipetlemeler	36
Tablo.11. ROS ölçüm sonuçları	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
Şekil 1. Arı peteklerinin kenarlarındaki propolis kalıntıları	8
Şekil 2. Çalışmada kullanılan propolis örnekleri	9
Şekil 3. Flavonoidlerin genel yapısı	11
Şekil 4. Eser metallerin flavonoidlerde bağlandığı yerler	17
Şekil 5. Serbest radikal oluşum nedenleri	20
Şekil 6. t-BHP' nin açık kimyasal formülü	26
Şekil 7. Hücre ve dokularda ROS'un etkisi	26
Şekil 8. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi	34
Şekil 9. DCFH-DA'nın ışıma veren DCF (diklorofluoreskein)'e dönüşümü	39
Şekil 10. DPPH serbest radikali giderme aktivitesine ait konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri	41
Şekil 11. Metal şelatlama şelatlama aktivitesini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon grafiği	42
Şekil 12. ROS üretiminin bağıl yoğunluk yüzdesi	44

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon S- transferaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	Fetal bovin serum
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
DMSO	Dimetil sülfoksit
CM-H₂DCFDA	5, 6 klorometil- 2',7'diklorohidrofluoreskindiasetat, asetil ester

Formüller

O₂^{·-}	Süperoksit radikali
OH[·]	Hidroksil radikali
t-BHP	Tersiyer Bütil Hidroperoksit
H₂O₂	Hidrojen peroksit
NO	Nitrik oksit
8-OH-Gua	8-hidroksi guanin

ÖZET

TÜRK PROPOLİSİNİN FARKLI ÇÖZÜCÜLERDEKİ EKSRAKTLARININ RADİKAL YAKALAMA VE DEMİR ŞELATLAMA AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Propolis, polifenolik bileşikler ve flavonoidler açısından zengin, toplandığı bölgenin coğrafyasına ve iklimine göre içeriği değişebilen, antitümoral, antioksidatif, antimutajenik, antibakteriyal ve diğer faydalı aktiviteleri olan önemli bir arı ürünüdür. Flavonoidler; meyvelerde, sebzelerde, çay, şarap, meyve suyu gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler ikincil bitki metabolitleridir ve insanlar tarafından sentezlenemedikleri için, insan diyetinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Flavonoidlerce zengin olan propolis biyolojik aktivitesini ağır metal iyonlarını, biyolojik polimerleri bağlayarak, elektron transportunu katalizleyerek ve serbest radikalleri yok ederek gösterir. Serbest radikaller biyomoleküller üzerinde oksidatif hasara neden olurlar.

Bu çalışmada yöremizden elde edilen propolisin farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının demir şelatlama aktivitesi, serbest radikalleri yakalama kapasitesi incelendi. Yaptığımız bu çalışmada propolisin etanol, metanol, DMSO 'lu ekstraktlarının 25 mg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda % 90'ın üzerinde metal şelatlama etkisi olduğu bulundu. DPPH tayiniyle propolisin radikal süpürücü aktivitesi çalışıldı. Etanol ve metanollü ekstraktlarda 125µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda %90 üzerinde süpürücü etki gözlemlendi. Propolisin DMSO ile hazırlanmış ekstraktlarının radikal süpürücü aktivitesi 125µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda %73 olarak bulundu. Daha önce yapılan çalışmalarda propolisin antioksidan özelliği ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasıyla propolisin ortaya konmuş olan antioksidan özelliğinin muhtemel mekanizmalarından olan metal şelatlama ya da serbest radikalleri yakalama kapasitesinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı in vitro ROS ölçümü yapılarak ortaya koyuldu. 300µM t-BHP ile hasarlanmış fibroblast hücrelerinde 4 saatlik iyileşme süresi sonunda 200µg/mL propolisin pozitif kontrole göre oluşan ROS miktarını azalttığı,

bununda radikal süpürücü etki ve etkin olarak metal şelatlama üzerinden gerçekleşmiş olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Metal Şelatlama, Serbest Radikal, CM-H₂DCFDA, Fibroblast

SUMMARY

INVESTIGATION OF RADICAL SCAVENGING AND FERROUS IONS CHELATING ACTIVITY OF TURKISH PROPOLIS EXTRACTS

Propolis is an important bee product, rich of polyphenolic compounds and flavonoids, it has antibacterial, antitumoral, anti-inflammatory, antioxidative, antimutagenic properties and changeable composition according to climate and geography of harvest region, and is used as a natural drug with other useful activities. Flavonoids are polyphenolic compounds where they naturally take place in drinks such as fruits, vegetables, tea, wine, juice. These compounds are secondary plant metabolites, and they compose an important part of human diet as they can not be synthesized by human. Its biological activity shows via combining heavy metal ions and polymers, catalyzing electron transport and scavenging free radicals. Free radicals cause oxidative damage on biomolecules.

In this study iron chelating activity and free radical scavenging capacity of extracts of our regional propolis in different solvents were investigated. Propolis extracts in ethanol, methanol and DMSO with 25 mg/mL and above concentrations were found to have metal chelating effect over 90 %. Radical scavenging activity was determined with DPPH method. Extracts in ethanol and methanol with 125 µg/mL and above concentrations demonstrated scavenging effect over 90 %. Extracts in DMSO with same concentrations were found to have scavenging activity as 73 %. Antioxidant effects of propolis were reported in previous studies. In this study known antioxidant effect of propolis was investigated via in vitro ROS measurement if it was due to possible mechanisms including metal chelating and radical scavenging capacity or not. After a recruitment time for 4 hours in fibroblasts damaged with 300 µM t-BHP 200 µg/ml propolis reduced ROS amounts compared with the positive control by radical scavenging effect and more effective by metal chelating activity.

Key Words: Propolis, Metal chelating, Free radical, CM-H₂DCFDA, Fibroblast cell

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de bir arı ürünü olan propolistir (1). İnsanoğlu propolisi çok eski çağlardan beri farklı amaçlar için kullanmıştır. Uzun yıllar boyunca da propolisten tıpta çeşitli amaçlar için yararlanılmıştır (3). Arı ürünleri birçok hastalıkta, hastalığın ilerlemesinin önüne geçmek, ağrıların azaltılması ve hastalığın tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır (2, 3).

Propolis; bal arılarının ağaç kabuklarından, bitkilerin filiz, dal ve tomurcuklarından toplayarak polen sepetçiklerinde biriktirdiği reçinemsi maddeleri ve bitki öz sularını, baş kısımlarında bulunan salgı bezlerinden salgılanan birtakım enzimlerle biyokimyasal değişikliğe uğratarak balmumu ile karıştırarak kovan içerisinde oluşturdukları reçinemsi yapışkan, keskin ve güzel kokulu organik üründür (8).

Propolisin içeriği toplandığı bitkilerin tür ve çeşitlerine göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak, ham propolisin % 50' sini reçine ve bitkisel balsam, % 30' unu balmumu, %10' unu esansiyel ve aromatik yağlar, % 5' ini polen ve % 5' ini diğer organik maddeler oluşturmaktadır (5).

Propolisteki ana kimyasal sınıflar; flavonoidleri, fenolik bileşikleri ve çeşitli aromatik yapıları içermektedir. Bununla birlikte propolis birçok B- kompleks vitamini, önemli mineralleri ve eser elementleri de bünyesinde barındırmaktadır (7).

Flavonoidler biyolojik aktivitelerini ağır metal iyonlarını, biyolojik polimerleri bağlayarak, elektron transportunu katalizleyerek ve serbest radikalleri yok ederek gösterir (5). Flavonoidler; alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahiptir (9). Flavonoidler antioksidan özelliklerini yapılarındaki karbonil ve

hidroksil gruplar, çift bağlar ve 3',4'-dihidroksi katekol konfigürasyonları ile kazanırlar (10, 9). Yapılan çalışmalarla propolisin; antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar, radyoprotektif ve diğer faydalı biyolojik etkileri ile kimyasal yapısına ait değerli bilgiler ortaya koyulmuştur (11).

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olarak tanımlanırlar. Serbest radikallerin metabolizmaya ait bir ürün olduğu sonradan anlaşılmıştır. Bugün radikallerin pek çok hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı iyi bilinmektedir (12). Serbest radikallerin oluşma nedenleri endojen ve ekzojen kaynaklı olabilmektedir (7).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler; oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerin iyonları ve hidroksil radikalidir (13). Bu serbest radikaller, hücrede çeşitli reaksiyonlar aracılığı ile yeni serbest radikallerin oluşumlarını, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını, DNA zincir kırılmalarını, mutajenik ve karsinojenik etkileri oluşturabilirler (14). Serbest radikaller vücutta antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesini aştıkları zaman, karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerin tüm sınıfları ve tüm hücre komponentleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar (15). Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta antioksidan savunma sistemi adı verilen birçok savunma mekanizmaları vardır. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi enzimatik olarak (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST), mitokondrial sitokrom oksidaz) ve non-enzimatik (glutatyon, α - tokoferol (Vit E), askorbik asit (Vit C), flavonoidler, melatonin, seruloplazmin, β -karoten, bilirubin, laktoferrin, albümin, transferrin, bilirubin) olmak üzere görev yapan moleküllerden oluşur (1).

Antioksidanlar, hem doğrudan, hem de dolaylı olarak serbest radikal reaksiyonlarının istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (16).

Antioksidanlar, membran lipidlerine, proteinlere, DNA' ya saldıran ve kardiyovasküler, diyabet, kanser, Alzheimer gibi birçok hastalıkta önemli rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından oluşturulan hasara karşı vücudu koruyarak insan sağlığında pozitif etki göstermektedirler (17). Flavonoidlerce zengin olan propolisin serbest radikal toplama kapasitesinden dolayı gösterdiği antioksidan özellik, onun hakkında daha pek çok alanda çalışma yapma ihtiyacını da beraberinde getirmiştir (18).

Daha önce bölümümüzde yapılan çalışmalarla propolisin antioksidan özelliği ve antioksidan özelliğinden kaynaklanan faydalı etkileri ortaya konulmuştur. Bu çalışmada yöremizden elde edilen propolisin farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının demir şelatlama aktivitesi, serbest radikalleri yakalama kapasitesi incelenecektir. Bu tez çalışmasıyla propolisin ortaya konulmuş olan antioksidan özelliğinin metal şelatlama ya da serbest radikalleri yakalama kapasitesinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı in vitro ROS ölçümü yapılarak değerlendirilecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Propolis

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Bu doğal ürünler arasında giderek önem kazanan ve en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arı ürünleridir. Arı ürünleri birçok hastalıkta, ağrıların azaltılması ve hastalığın tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına *Apiterapi* denilmektedir (1). Apiterapi; bal, propolis, arı sütü, polen ve arı zehiri kullanımını kapsar (4).

İnsanoğlu propolisi çok eski çağlardan beri farklı amaçlar için kullanmıştır. Uzun yıllar boyunca propolisten tıpta çeşitli amaçlar için yararlanılmıştır ve bu doğal ürün eski çağlarda Avrupa ve Kuzey Afrika'da, Mısır, Yunan ve Romalılarca yaygın olarak kullanılmıştır. Günümüze kadar gelen Yunan yazıtları propolisin iltihaplanan yaralar ve diş çürükleri için tedavi amacıyla kullanıldığını tanımlarken, Romalılar döneminde yara üzerine konulan lapa benzeri karışımın içerisine katılarak kullanıldığı aktarılmaktadır. Avrupa'daki on ikinci yüzyıl kayıtları, propolisin ağız ve yara enfeksiyonlarının tedavisi ve diş sağlığı için kullanımından bahsetmektedir. Arılar propolisi milyonlarca, insanlar ise binlerce yıldır kullanmaktadır. İnsanlık için bu reçinemsî yapının keşfedilen yararları henüz çok fazla aydınlatılabilmiş değildir (6, 3).

Propolis bal arıları tarafından çeşitli bitkilerden, ağaç reçinelerinden toplanan koyu renkli, kompleks kimyasal kompozisyona sahip bir materyaldir (5). Diğer adı bee glue olan propolis; pro- ve -polis köklerinden oluşarak kovanın (şehrin) savunması anlamını taşır (5, 19).

Arılar, bitkilerden elde ettikleri reçineyi çiğneyip tükürük enzimleriyle karıştırarak kısmen sindirirler. Toplama esnasında polenle de harmanlanan reçine daha sonra balmumu ile karıştırılır (5). Meydana gelen madde, arılar tarafından kovanın

içindeki delikleri kapatmada, kovanın soğuğa ve dışarıdan gelen istilacılara karşı korunmasında ve leşlerini mumyalamada kullanılır (20). Ayrıca bakteri, mantar ve virüslerle mücadele de etkili olan propolis, kovanda tüm arı popülasyonu için çeşitli enfeksiyonlara karşı koruyucu olarak görev yapmaktadır (21).

Sağlık için alınması gereken 30'a yakın besin kaynağını bünyesinde bulundurması bakımından mükemmel bir doğal ilaç olma özelliği ile önem kazanmıştır (6).

Propolisin kaynağını oluşturan bitkiler; kavak (*Populus spp*), kayın (*Fagus sylvatica*), huş (*Betula alba*), kestane (*Castanea sativa*), at kestanesi (*Alnus glutinosa*) gibi bitkiler olabilmektedir (22). Peteklerin kenarlarındaki propolis kalıntıları şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Arı peteklerinin kenarlarındaki propolis kalıntıları (Yalçın'dan, 23)

Propolis: antibakteriyel, antikaryojenik, antiinflamatuvar, antimutajenik, antioksidan gibi özelliklere sahip olduğu için son yıllarda ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde de oldukça ilgi görmektedir (5, 24). Cildi nemlendirme, yenileme, kırışıklıkları giderme ve antibakteriyel özelliklerinden dolayı kremlerde, çeşitli losyonlarda kullanılarak kozmetik endüstrisinde yer alır (25). Ayrıca propolis dişeti, dudak ve ağız iltihaplarını iyileştirebilmek için diş macunları ile ağız yıkama

solüsyonlarında da kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde de önemli bir yere sahip olan propolis, kimyasal koruyucu olarak konservecilikte yer almaktadır. Özellikle son yıllarda; propolis içeren tablet, toz ve sakız ürünleri marketlerde tüketicinin hizmetine sunulmuştur (5).



Şekil 2. Çalışmada kullanılan propolis örnekleri (Demir'den, 1)

4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis soğukta katı ve kırılgan, sıcakta ise yumuşak ve çok yapışkan olup, 15-25 °C arasında ise mum gibi elastik bir yapıdadır (8). Genel olarak 60- 69 °C arasında bir erime noktasına sahiptir (1). Propolisin rengi reçinenin kaynağına bağlı olarak sarı-yeşilden, kırmızı ve koyu kahverengiye kadar değişebilmektedir. Propolisin rengi, kokusu, kimyasal kompozisyonu toplandığı bölgenin bitki örtüsüne ve mevsime göre değişebilmektedir (26, 2). Çalışmada kullanılan propolis örnekleri şekil 2' de gösterilmiştir.

Propolis; su ve hidrokarbon çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek oranda çözünürlük gösterir (27).

4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Propolisin kompozisyonu son derece karmaşık bir yapı göstermekte ve bu özelliği toplandığı bölgenin bitki örtüsüne ve mevsimine göre değişebilmektedir (2, 28). Ham propolisin bileşimi, genellikle % 50 reçine, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (5, 29). Propolisteki temel kimyasal sınıflar; flavonoidler, fenolik ve çeşitli aromatik bileşiklerdir. Bu sınıflar dışında birçok B- kompleks vitamini, önemli mineraller ve eser elementleri de içerir (24). Ilıman bölgelere ait propolis örnekleri flavonoidler ve sinnamik asit türevleri gibi fenolik bileşiklerce zengindir (30). Propolisin biyolojik aktivitesi, çoğunlukla flavonoidlerin varlığına atfedilmektedir (24).

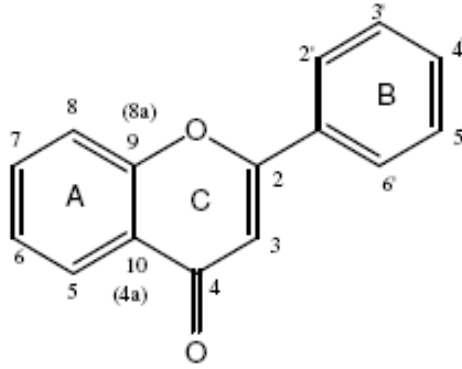
Ilıman kuşak ülkelerinden elde edilen propolis örneklerinden bugüne kadar fenolik asitler, fenolik asit esterleri ve flavonoidler gibi ana sınıflara dahil 300 kadar bileşik belirlenmiştir (1, 31). Tablo 1’ de propoliste bulunan başlıca bileşenler, bulunma oranlarıyla birlikte verilmiştir.

Tablo 1. Propoliste bulunan başlıca bileşenler (21)

Bileşenler	Ana Maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoitler	45–55
	Terpenler	
	Kumarinler	
	Fenolik asitler ve esterleri	
Mum ve yağ asitleri	Arılardan veya bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	25–35
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	10
Polen	Proteinler	5
	Serbest aminoasitler	
	Vitaminler (A, B, C, E, PP,vs)	
Diğer maddeler	Eser elementler (Cu, Mn, Fe vs)	5
	Ketonlar	
	Laktonlar	
	Kinonlar	
	Steroidler	

4.1.2.1. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler

Flavonoidler, bitkisel orijinli, düşük molekül ağırlıklı, genellikle flavon çekirdeğine sahip olan bileşiklerdir (8). Biyosentetik olarak fenilalaninden türetilen flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan pigmentlerdir. Flavonoidler oksijen içeren heterosiklik altı üyeli halkayı çevreleyen, iki aromatik halkaya sahiptir (32). Flavonoidlerin genel yapısı Şekil 3’ de gösterilmiştir.



Şekil 3. Flavonoidlerin genel yapısı (32)

Propolis örneklerinden izole edilen bileşiklerin en büyük grubunu, bitkilerde yaygın olarak bulunan flavonoid pigmentleri oluşturmaktadır (33, 27). Flavonoidler; meyvelerde, sebzelerde, çay, şarap, meyve suyu gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir (34). Bu bileşikler, sekonder bitki metabolitleri olduğu için, insanlar tarafından sentezlenemezler ve insan diyetinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadırlar (33, 27). Tablo 2’de propolisin içeriğinde bulunan flavonoid türleri verilmiştir.

Tablo 2 . Propolis içeriğinde bulunan flavonoid türleri (32)

Flavonid Çeşidi	Bileşik
Flavonoller	Kuersetin, Kaempferol, Galangin, Fisetin
Flavononlar	Pinosebrin, Naringin, Hesperidin
Flavonlar	Apigenin, Akasetin, Krisin, Luteolin

Propolisten izole edilen flavonoidler, propolisin biyolojik aktivitesinin önemli bir kısmından sorumludur (35). Bugüne kadar propolisten 38' den fazla flavonoid izole edilmiştir (32). Flavonoidler sahip oldukları halka yapıları ve hidroksil gruplarının antioksidan özelliği ve radikal yakalama aktivitesi nedeniyle son yıllarda dikkat çekmeye başlamışlardır. Bu durum, flavonoidlerin hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayıları ile ilişkilidir (36).

Flavonoidler hidrojen verici, radikal süpürücü antioksidanlardır. Demir iyonları ile kompleks oluşturan flavonoidler, hidroksil radikali oluşturan Fenton reaksiyonunu baskılar. Flavonoidler alerjilere, inflamasyona, hipertansiyona, eklem iltihaplarına, mutasyonlara ve karsinojenlere, kanser ve AIDS' e karşı aktivite gösterirler. Polifenoller cGMP ve cAMP fosfodiesteraz, ksantin oksidaz ve elastazı inhibe ederler (37,32).

Flavonoidler alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahiptir (3). Bu özellikleri gösteren propoliste bulunan bazı flavonoid ve fenolik bileşikler tablo 3' te verilmiştir.

Tablo 3. Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler (3)

Flavonlar	Apigenin, Akasetin, Baisetin, Krisin, Luteolin, Tektokrisin
Flavonoller	Kaempferol, Kaempferid, Galangin, Isohamnetin, Ramnetin Mirisetin, Fisetin, Rutin
Flavononlar	Pinosembrin, Sakuranetin, İsosakuranetin
Dihidro-Flavoneller	Pinobaksin, Pinobaksin -3-asetat, Pinobanksin-7-metil eter
Sinamik asit türevleri	Ferrulik asit, Kafeik asit, p-Kumarik asit
Diğerleri	11-Farnesenol (seskiterpen), β -karyofilen, Terpinkol(terpenoid) Benzoik asit, Syringaldehit (diterpenikasit) Protocate huikasit(benzoik asit türevi), Vanillin (benzaldehit türevi)

4.1.2.2. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)

Polifenol terimi kimyasal olarak, sahip olduğu aromatik halkada çeşitli fonksiyonel gruplara (esterler, metil esterler, glikozitler vb.) ilave olarak hidroksil grubu taşıyan madde olarak tanımlanır (38, 21). Fenolik bileşikler; içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaların birbirine bağlanmasıyla oluşan yapısal moleküllere bağlı olarak değişik gruplar şeklinde sınıflandırmak mümkündür (39).

Fenolik bileşiklerin en önemlileri; sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve ferulik asitlerdir (8). Bitkilerde yaygın olarak bulunurlar ve birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir (40).

Fenolik bileşikler, pek çok bitkide renk, koku ve tattan sorumlu olarak önemli duyuşsal özellikler içermenin yanı sıra, oksidatif stres ile ilişkilendirilmiş çeşitli hastalıkların önlenmesinde de anahtar rol oynarlar. Bu bileşenlerin antioksidan aktivitesi özellikle radikal temizleme etkisine dayanmaktadır (41).

4.1.2.3. Arı Mum ve Yağ Asitleri

Propoliste bulunan arı mumu ve yağ asitleri propolisin yaklaşık % 30' unu oluşturur (42). Arı mumu başlıca mono esterler, diesterler, uzun zincirli hidrokarbonlar, hidroksiesterler, poliestesterler, uzun zincirli yağ asitleri, triesterler ve asit esterlerinden oluşur (3).

4.1.2.4. Esansiyel Yağlar

Propolisteki uçucu bileşenler propolisin yaklaşık % 10' unu oluşturur (42). Ancak Schmidt ve arkadaşlarına göre propoliste bulunan uçucu yağlar, terpenler ve arı mumu propolisin etkisini ve kimyasal özelliklerini anlamlı bir şekilde etkilememektedir (3).

4.1.2.5. Mineral Elementler

Propolis mineral elementleri üzerine yakın zamanda yapılan çalışmalarda Makedonya örneklerinde; Ca, Mg, K,Na, Fe ve Zn (3), Küba örneklerinde ise Fe, Mn, Zn, Cu (43) belirlenmiştir. Her iki çalışmada atomik absorpsiyon spektrokopisi kullanılmıştır.

4.1.3. Propolisin ve İçeriğinde Bulunan Bileşenlerin Biyolojik Aktiviteleri

Propolisin tıbbi özellikleri, eski çağlardan beri bilinmektedir. Yıllar boyunca propolis, insanlar tarafından değişik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (26). Propolisin yapısında bulunan bazı bileşiklerin biyolojik aktiviteleri Tablo 4’ te gösterilmiştir.

Tablo 4. Propolisin yapısında bulunan bazı bileşiklerin biyolojik aktiviteleri (32)

Bileşik	Biyolojik Aktiviteler
Galangin	Antiinflammatuar, antioksidan, antiviral, antibakteriyel
CAPE	Antiinflammatuar, antitümöral, antiviral,
Kuersetin	Antiinflammatuar, antitümöral, antiviral, antibakteriyel, antikanser, yara iyileştirici
Luteolin	Antitümöral, antiviral
Naringin	Antiülser
Pinosembrin	Antibakteriyel, antifungal
Hesperitin	Antiülser
Rutin	Antiviral
Kaempferol	Antiviral, antiülser
Dikafeoilkuinik asit türevleri	Güçlü antioksidan
Propol	Güçlü antioksidan

Propolisin antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikaryojenik, antiülser, immünomodülatör, antiinflammatuar, antioksidan, anestezik, antitümöral, antikanser, radyoprotektif, nöroprotektif, antiproliferatif ve tümör indüklü anjiogeneze karşı koruyucu gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan değişik araştırmalarla gösterilmiştir (45, 46, 11, 44, 47).

Polifenoller pek çok biyolojik aktiviteye sahip sekonder bitkisel metabolitlerdir. Antioksidan aktivitelerinin yanı sıra diğer enzim ve antioksidanlarla sinerjik etkileşimleri tanımlanmıştır. Polifenollerin değişik hücre tiplerinde oksidatif DNA hasarını engellediğine dair pek çok çalışma mevcuttur (47).

Farklı yapısal özelliklere sahip olan flavonoidler biyolojik aktivitelerinde önemli çeşitlilikler gösterir (32). Flavonoidlerin hayvan sistemlerindeki biyokimyasal etkileri; biyolojik polimerlere bağlanması, ağır metal iyonlarına bağlanması, elektron taşınmasının hızlandırılması ve serbest radikalleri yakalaması şeklinde belirtilmektedir (5).

Flavonoidler antioksidan etkilerini reaktif oksijen, azot ve klor türlerini direkt yakalayarak ve antioksidan enzim sistemlerini aktifleştirerek gösterirler. Yapılan son çalışmalar flavonoidlerin DNA (DSB, SSB, şeker ve baz rezidülerinin oksidasyonu, kromozomal aberasyon ve mutasyon gibi) ve hücredeki diğer bileşenleri oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermiştir (48).

Propolisin antibakteriyel etki gösteren aktif bileşenleri pinocembrin, galangin, kafeik asit, benzil ester, sakuraretin ve pterostilben'dir. Antibakteriyel etki bakteriyel RNA polimeraz inhibisyonuna bağlanmaktadır (49). Anti-viral etkiden sorumlu bileşenler kafeik asit, lutseolin ve kuersetin' dir.

Propolisin deride yara iyileşmesi, yanıklar, iltihabi yaralar, cilt inflamasyonları ve diğer deri hastalıklarında tedavi edici etkisinin de bulunduğu belirtilmiş ve yara iyileşmesinden sorumlu olan en önemli içeriğinin flavonoidler ve fenolik asit bileşikleri olduğu belirtilmiştir (8).

Bununla beraber tüm flavonoidlerin tamamen sağlıklı olduğunu düşünmek yanlış olur. Bazı polifenol türlerinin konsantrasyona bağlı olarak mutajenik ve pro-oksidan özellik gösterebileceği, dolayısıyla topoizomeraz enzim aktiviteleri, prostanoid biyosentezi ve sinyal transdüksiyonu gibi esansiyel biyokimyasal yolları olumsuz etkileyebileceği de ileri sürülmektedir (50).

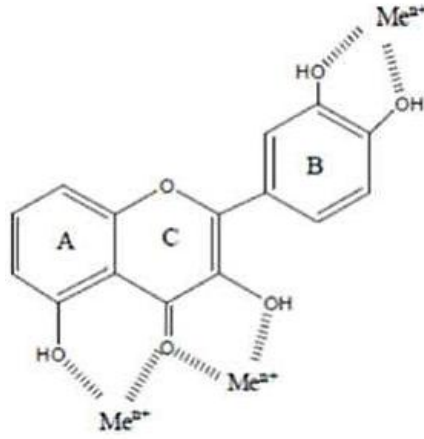
4.1.3.1. Propolisin Antioksidan Aktivitesi

Propolisin son yıllarda üzerinde durulan ve tartışılan özelliklerinden biri de antioksidan etkisidir. Organizmada metabolik olaylar aşamasında kaçınılmaz bir şekilde ortaya çıkan serbest radikaller, hücresel yaşlanma ve buna bağlı olarak, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, artrit, parkinson, alzheimer gibi hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Organizma da ise serbest radikaller başlıca antioksidan enzimler olan SOD, CAT, GPx, GR ile temizlenir, eğer oksidan madde düzeyi antioksidan enzim kapasitesini aşarsa antioksidan vitaminler (özellikle C ve E) ikincil savunma hattı olarak devreye girmektedirler (51).

Propolisin en önemli antioksidan mekanizması serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarlarını tamir edici özellikte olmasından ve lipid peroksidasyonuna neden olan polimer zincir reaksiyonlarını kırıcı özelliği ile ROS' ları dokulardan uzaklaştırıcı etki göstermesinden kaynaklanmaktadır (52).

Flavonoidler, fenolik asitler ve tanninler gibi fenolik bileşikler gıdaların antioksidan potansiyeline katkı sağlayan başlıca bileşikler olarak düşünülmektedir. Polifenollerin antioksidan aktivitesi büyük ölçüde serbest radikalleri etkisizleştirici rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca antioksidanlar sinerjistik yolla birbirini etkilerler ve herhangi birinin diğerini oksidatif hasara karşı koruyabildiği ayrı ayrı etkilere sahiptirler (53).

Flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin radikal temizleme ve metal şelatlama olmak üzere iki önemli etkiye dayandığı düşünülmektedir (32). Hidrojenlerin ayrılmasıyla oluşan flavonoid radikalleri, ortamdaki eser metallerle şelat halka oluşturarak kararlı duruma geçerler (54). Bu durum Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Eser metallerin flavonoidlerde bağlandığı yerler (21)

Flavonoidler antioksidan özelliklerini yapılarındaki hidroksil gruplar, O-metillenmiş gruplar, 2. ve 3. karbon arasındaki çift bağ (doymamış yapı) ve 4. karbondaki karbonil grubu (4-okso grubu), karbohidrat birimleri ve 3',4'-katekol konfigürasyonları ile kazanırlar (55).

Propolisin etken maddelerinden biri olan CAPE'nin insan nötrofillerinde ve ksantin oksidaz (XO) sisteminde reaktif oksijen üretimini bloke ederek antioksidan etki oluşturduğu gösterilmiştir. Major flavonoidlerden güçlü bir antioksidan madde olan kuersetin, doku yenilenmesinin hızlandırılması ve yaşlı bireylerde bazı enzimlerin aktive edilmesi gibi antioksidan özellik gösterir (56, 8). Yapılan denemelerde özellikle lipid peroksidasyonunu başlatan ajan olarak bilinen $\text{OH}^\cdot$ radikalının propolis etkisi ile engellendiği, bu antioksidan etkinin E ve C vitaminlerinin antioksidan etkilerinden daha güçlü olduğunu saptanmıştır (8).

Propolisin aktif bileşenlerinden olan CAPE'nin, ısı uygulaması ile yanık oluşturulan ratlarda plazma lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit düzeylerine etkileri araştırılmış ve CAPE eklenen grupta SOD aktivitesi artmış; ksantin oksidaz aktivitesi ise inhibe edilmiştir. Malondialdehit (MDA) ve NO in plazmadaki düzeylerinin ise düşüş gösterdiği belirlenmiştir (57).

4.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres

4.2.1. Serbest Radikaller

Atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma ya da moleküle büyük bir aktiflik kazandırır (3). Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan ve genellikle reaktif olan kimyasal maddelerdir. Bir atom veya molekül bir orbital üzerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyorsa radikal olarak tanımlanır (58, 59). Reaktif oksijen türleri ise kimyasal olarak reaktif, bir veya daha fazla oksijen atomu içeren moleküller olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen türleri serbest radikalleri ve biyolojik molekülleri okside edebilen radikal olmayan reaktif bileşikleridir. Bu nedenle reaktif oksijen türleri aynı zamanda oksidanlar veya prooksidanlar olarak da ifade edilmektedir (60).

Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler.

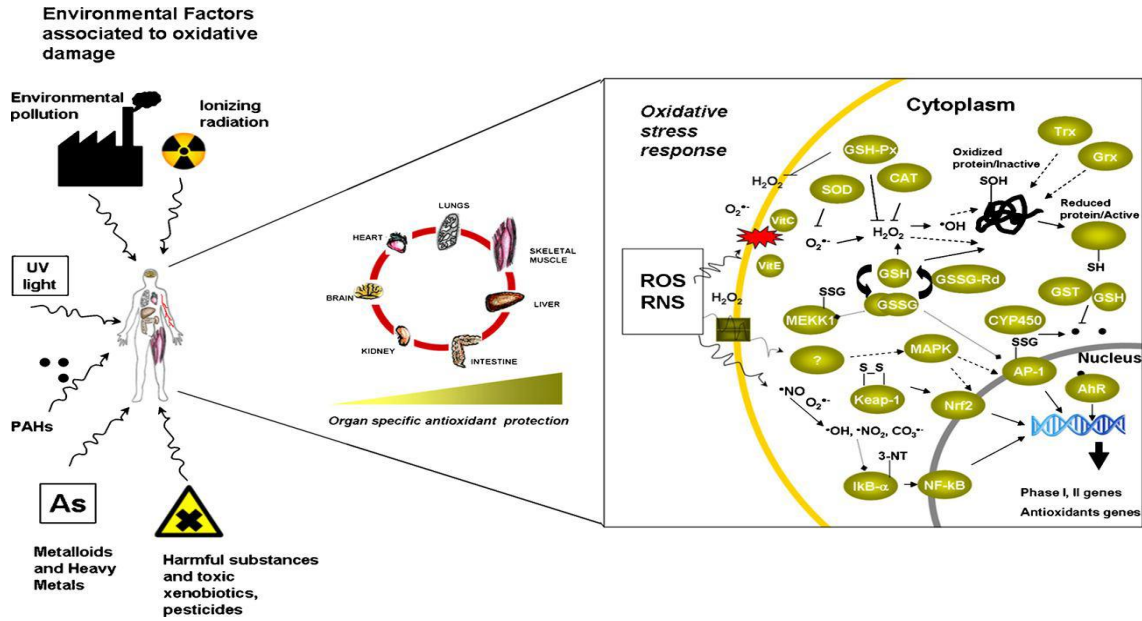
Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^{+} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle, oksidasyon reaksiyonları meydana gelir (61).

4.2.1.1. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında meydana gelebildiği gibi, organizmada bazı yabancı maddelerin (ksenobiyotikler) metabolize edilmesi sırasında ve organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz bırakılmasıyla da meydana gelebilir. Bu nedenle serbest radikal

oluşturan mekanizmalar endojen ve ekzojen olarak ikiye ayrılmaktadır (62). Serbest radikal oluşum nedenleri Şekil 5’ de gösterilmektedir. Bunlar :

- Aktive olmuş fagositler (respiratory burst),
- Radyasyon,
- Alkol,
- Uyuşturucu,
- Çevresel faktörler (sigara dumanı, aromatik hidrokarbonlar),
- Cerrahi stres,
- Mitokondriyal elektron (e-) transportu: Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağıdır. Elektron transportu sırasında, elektron sızması olur. Sızan e-’ ların O_2 ’ i indirgemesi ile ROS meydana gelir.
- Ksantin oksidaz: Enerji azlığı ve artmış intraselüler kalsiyum varlığında kalsiyuma bağımlı proteaz aktive olarak, ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. ksantin oksidaz, ksantinin ürik aside dönüşümü sırasında O_2^- oluşumuna neden olur.
- Hemoglobin yıkımı: Hem yıkımında görevli bir enzim olan, hem oksidaz enzimi ROS oluşumuna neden olur.
- Endoplazmik retikulum e- transport sistemleri,
- Peroksizomlarda bulunan oksidazlar: Bol miktarda hidrojen peroksit üretirler.
- Araşidonik asit metabolizması: Lipooksigenaz ve siklooksigenaz, reaksiyonun kataliz sırasında ROS oluştururlar.
- İskemi,
- Travma gibi (1, 6).



Şekil 5. Serbest radikal oluşum nedenleri (Takım'dan, 59)

4.2.1.2. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları

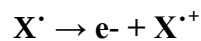
Serbest radikaller, diğer moleküllerle çeşitli şekillerde reaksiyona girerler.

1. İki serbest radikal karşılaştıklarında, her ikisinin de ortaklanmamış elektronları bir kovalent bağ oluşturacak şekilde birleşirler ve radikal özelliklerini kaybederler (63).

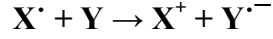


2. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir bileşikle reaksiyona girdiğinde yeni bir radikal oluşur:

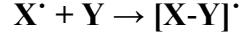
- Radikal, ortaklanmamış elektronunu eşlemek üzere radikal olmayan başka bir bileşikten elektron alabilir (okside edici radikal).



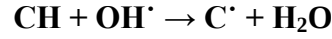
- Radikal, ortaklanmamış elektronunu radikal olmayan bir bileşiğe verebilir (redükte edici radikal).



- Radikal, radikal olmayan bir bileşiğe katılabilir.



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



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

Bu özellikleri ile reaktif oksijen türleri; Ttablo 5' te verildiği gibi radikaller ve nonradikaller olarak iki ana başlık altında incelenmektedir (64).

Tablo 5. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (64)

Radikaller	Non -radikaller
Süperoksit radikali, (O ₂ ^{•-})	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Hidroksil radikal (OH [•])	Hipokloröz asidi, HOCl
Peroksil, RO ₂ [•]	Ozon, O ₃
Alkoksil, RO [•]	Singlet oksijen, O [•]
Hidroperoksil, HO ₂ [•]	Peroksinitrit, ONOO [•]
Nitrik oksit, NO [•]	Hidroperoksit, L(R)OOH

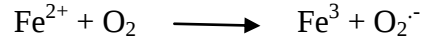
4.2.1.3. Serbest Radikal Türleri

4.2.1.3.1. Süperoksit Radikalleri (O₂^{•-})

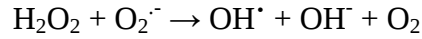
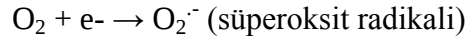
Süperoksit radikali (O₂^{•-}), hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan bir ajandır. O₂^{•-} radikalleri hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedirler. O₂^{•-} oluşumu; elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Uzun bir yarı

ömre sahip olup, lipofilik özellik gösterir. Bu özelliğinden dolayı da oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir (3).

Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.



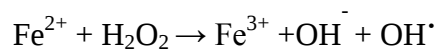
Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir (65).



En çok mitokondri, endoplazmik retikulum ve kloroplast gibi hücresel organellerde, elektron transport zincirinin çeşitli komponentlerinden O_2 'e elektron sızması ile oluşur (62).

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

Hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldır (3). Hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.



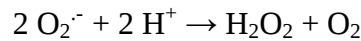
Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS[•]), karbon merkezli organik radikaller (R[•]), organik peroksitler (RCOO[•]) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur (63, 65).

Hidroksil radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. OH[•] 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, hücre ölümleri meydana gelebilir (63, 66).

4.2.1.3.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi oluşturur.

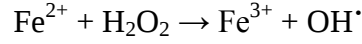
H₂O₂, süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonu sonucu ortaya çıkar. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H₂O₂ ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir (15, 62).



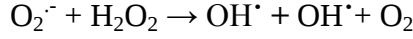
H₂O₂ bir serbest radikal değildir, fakat biyolojik membranlara kolaylıkla girebilmesinden dolayı oldukça önemlidir (15).

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen bileşiklerini kapsama girer. Çünkü Fe²⁺ veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton

reaksiyonu, $O_2^{\cdot-}$ radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan $OH^{\cdot}$ radikali oluşturur (64).



Fenton Reaksiyonu

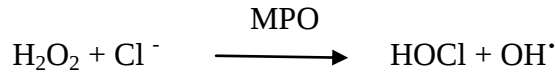


Haber – Weiss Reaksiyonu

Peroksizomlar çok önemli hücre içi H_2O_2 kaynağıdır. Bu organeldeki D-amino asid oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asid oksidaz ve yağ asidi açıl- CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden, bol miktarda H_2O_2 üretimine sebep olurlar (64).

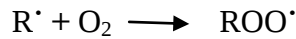
4.2.1.3.4. Hipoklorik Asit (HOCl)

Nötrofiller, stoplazmada bulunan myeloperoksidaz (MPO) enziminin katalizlediği reaksiyonla güçlü oksidatif bir yapı olan hipokloridi oluşturur (67).



4.2.1.3.5. Peroksil Radikali ($ROO^{\cdot}$)

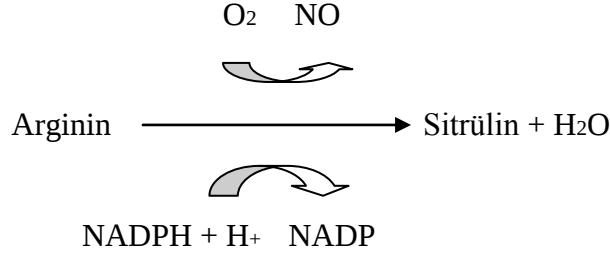
$R^{\cdot}$ radikalleri hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek $ROO^{\cdot}$ ’yi oluştururlar $ROO^{\cdot}$, lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerdir.(68).



4.2.1.3.6. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$)

Memeli hücrelerinde NO başlıca $NOS^{\cdot}$ un (NO -Sentaz) aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS , oksijeni kullanarak L-arjinin amino asitinden sitrülün ve $NO^{\cdot}$ yu oluşturur. Bu olay, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat ($NADPH$), flavin

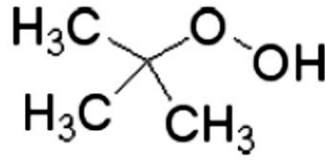
mononükleotit (FMN), flavin adenin dinükleotit (FAD), tetrahidrobiopterin (BH₄) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar (69).



Eşleşmemiş elektronu nedeniyle bir serbest radikal türü olarak bazı memeli hücre tiplerince üretilen NO; platelet agregasyonunda, lökosit adezyonunda, hücre aracılı immün sitotoksitesinde, sinaptik geçirgenlikte sinyal molekülü olarak önem taşımaktadır (69).

4.2.1.3.7. Tersiyer Bütil Hidroperoksit (t-BHP)

Organik bir hidroperoksit olan t-BHP, oksidatif hücre hasarı mekanizmalarını kapsayan çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir bileşiktir ve açık formülü Şekil 6' da verilmiştir. 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 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 genotoksitesite; bir geçiş metali aracılıklı reaksiyon ile H₂O₂ gibi değişik tipteki ROS' ların üretimiyle sonuçlanan bir süreçtir (3,70).

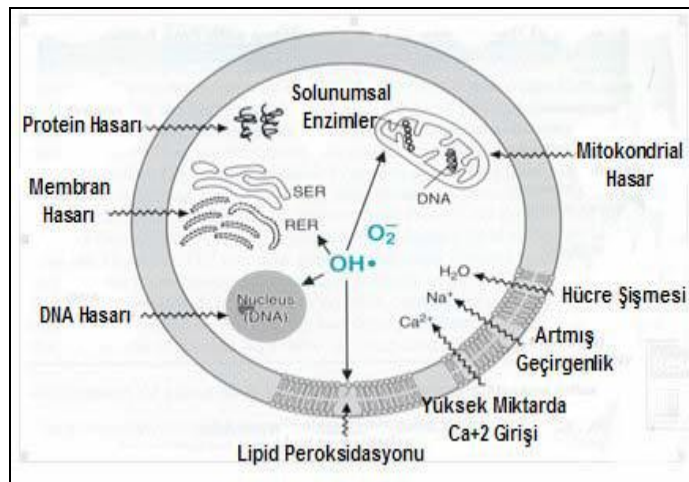


Şekil 6. t-BHP' nin açık kimyasal formülü (3)

4.2.1.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

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 artar. Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır (71). Hücre ve dokularda ROS'un etkisi Şekil 7' de gösterilmiştir. Bu zararlar şöyle sıralanabilir:

- DNA' nın tahrip olması,
- Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
- Lipit peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
- Membran proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- Proteinlerin tahrip olması ve protein “turnover” nin artması
- Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir (72).



Şekil 7. Hücre ve dokularda ROS'un etkisi(Tokaç'dan, 66)

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının, birçok patolojik olayda ve hastalıkta rolü olduğu düşünölmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarı, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, akut renal yetmezlik, diyabet, böbrek yetmezliğı, anfizem/bronşit, kanser, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar gibi durumlarda ROS aracılıklı hücre hasarı söz konusudur (73, 74).

4.2.2. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına sebep olur (75). Oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulmasıyla hasarlara yol açarak insanda pek çok hastalığın oluşmasını sağlayan durum olarak tanımlanır (76, 75).

Serbest tiyol oksidasyonu ve protein disüfitlerinin ortaya çıkması, ATP havuzundaki azalma, serbest sitozolik kalsiyumun yükselmesi, sitoskelet elemanlarının bütünlüğünün kaybolması, plazma membranı geçirgenliğinin artması, plazma membranında artmış peroksidasyon, sitozolik bileşenlerin hücre dışına çıkması ve artmış DNA hasarı oksidatif stresin bulguları arasında gösterilebilir (70).

Endojen ROS' ların esas kaynağı öncelikle mitokondrilerdeki oksidatif metabolizmanın ürünleridir. Reaktif oksijen türleri her zaman hücresel metabolizmanın bir ürünü olmayabilir; sitokinlere, büyüme faktörlerine ve spesifik sinyal yollarındaki ikincil habercilere cevap olarak özel plazma membran oksidazları tarafından da üretilebilir (77).

Oksidatif stres, ateroskleroz, diyabet, kanser, kronik inflamasyon hastalıkları, santral sinir sistemi bozuklukları gibi fizyopatolojik olaylarda, hücre yaşlanmasında ve dolayısıyla hücresel yıkım, hücre hasarı ve hücre ölümünde rol oynayan önemli bir mekanizma olarak son yıllarda büyük önem kazanmıştır (75).

4.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin serbest radikaller tarafından oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidan ve bu olaya antioksidan savunma denir. Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır (78). Tablo 6’da enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemde görevli moleküller verilmiştir.

İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar SOD, CAT ve GPx enzimleridir. Süperoksit dismutazın yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx’de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. Hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır. Bu nedenle hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan esas olarak E ve C vitamini, transferrin, haptogloblin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β -karoten, ürik asit, glukoz, sistein sorumludur (79, 78).

Tablo 6. Antioksidan sistem (1)

Enzimatik	Non- Enzimatik
Süperoksit dismutaz(SOD)	Glutasyon Bilirubin
Katalaz(CAT)	α -tokoferol (Vit E) Ürik asit
Glutasyon peroksidaz(GSH-Px)	askorbik asit (Vit C) Melatonin β -karoten
Glutasyon S-transferaz(GST)	Haptogloblin,
Mitokondriyal stokrom oksidaz	Transferrin Seruloplazmin Albumin Flavonoidler

Antioksidanlar, oksidatif şu prensipler doğrultusunda koruma sağlarlar:

- Enzim aktivitesi üzerinden veya doğrudan kimyasal reaksiyonlar yoluyla,
- Oksijenden türeyen moleküllerin oluşumunu en az düzeye indirerek,
- Radikallerle doğrudan kimyasal yolla temasa geçerek,
- Reaktif metabolitlerin temizlenmesini veya bu radikallerin daha az aktif ve toksik olmayan ürünlere dönüşümünü sağlayarak,
- Zayıf reaktif türlerin daha zararlı türlere dönüşümü için gereksinim duyulan metal iyonlarını bağlayarak,

- Hedef molekülde oluşan hasarı onarma yoluyla,
- Hasarın çok büyük olduğu durumda, hasara uğramış molekülü uzaklaştırarak (80).

Antioksidanların oksidatif strese karşı koruyuculukları, reaktif oksijen bileşiklerine karşı reaktivitelerine bağlıdır. *In vitro* çalışmalarda flavonoidler, basit fenolik asitler ve karotenoidler gibi doğal bileşiklerin çok etkili serbest reaktif oksijen süpürücüleri olduğu ancak bunların kendilerinin de reaktif sekonder radikaller olabileceğine ilişkin bulgular elde edilmiştir. Bu sekonder radikaller hücre içine ulaşp burada lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hedeflerde sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açabilecek değişiklikler yapabilir.

Gıdalarda bulunan antikarsinojen özellikteki bileşiklerin antioksidan özellik taşıdığı bilinmektedir. Bu bileşiklerin işlevleri; serbest radikallerin süpürülmesi, antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesini artırma ya da redoks homeostazındaki biyokimyasal olayları etkilemektir. Birçok rahatsızlığa karşı koruyucu olduğu varsayılan antioksidanlar ile ilgili çalışmalar *in vitro* koşullarda yapılmış olup, *in vivo* çalışmalardan elde edilen bilgiler sınırlıdır. Antioksidan etkinin kansere karşı koruyucu rolü henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır (81).

4.3.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları

A. 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.

B. Bastırıcı (quenching) 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.

C. Onarıcı (repair) etki: Antioksidan özelliğe sahip polifenolik bileşiklerin, BER mekanizmasında görevli olan 8-oxoguanin DNA glikozilaz 1,apurinik/aprimidinik

endonükleaz ve DNA polimeraz beta gibi DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini ve ekspresyonlarını indüklediği ortaya konulmuştur.

D. 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 (73, 17, 1, 32).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme ve Kimyasallar

5.1.1. Cihazlar ve Malzemeler

Tezde kullanılan cihaz, alet ve malzemeler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Derin dondurucu, -20 °C	Altus
Derin dondurucu, -80°C	Thermo Electron Corporation
Etüv	Heraeus
Çalkalayıcı	Eppendorf Thermo Mixer Comfort
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Manyetik karıştırıcı	Termal
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Pipet pompası	JetPip Pipette Aid
Mikropleyt okuyucu	Molecular Devices Versa
Spektrofluorimetre	Spectra Max M2
Membran filtreleri	Agilent Econofilter 0,22µm
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO ₂ inkübatör	Thermo Forma 381
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	Greiner Cellstar
Santrifüj	Eppendorf 5810
15 mL’ lik ve 50 mL’ lik steril falkon tüpler	TPP, Greiner
Neubauer hematositometre lamı	Marienfeld
10 mL’ lik steril disposable pipetler	Grenierbio-one, 607 180
0,5 ve 1,5 mL’ lik eppendorf tüpler	Greiner
Çalkalayıcı inkübatör	ShelLab/Sheldon S14-2
pH metre	Hanna Instruments, HI 9321
Vorteks (Karıştırıcı)	IKA Genius 3
Cam malzemeler(beher, erlen, balon joje, cam şişe)	Isolab
Yatay ve dikey tip boyama şaleleri	Isolab
Buzdolabı, +4 °C	Altus
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV

5.1.2. Kimyasal Maddeler

Tezde kullanılan kimyasal maddeler Tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 8. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma, ürün kodu ve saflığı
Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)	Sigma
Etilen Diamin Tetra Asetik asit (EDTA)	Sigma
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck
Fetal Bovine Serum	Biochrom S0113
Tripsin/ EDTA çözeltisi	Gibco 25300
Tripan Blue	Sigma, T8154
DMEM	Lonza
PBS Tablet	Medicago
CM-H ₂ DCFDA	Invitrogen C6827
Ferrozin	Sigma 82950
Demir(2)klorid tetrahidrat	Sigma 380024
Askorbik asit	Lancaster 5385
Deferoksamin mesilat (DFO)	Sigma D9533
DPPH	Sigma D9132
Etanol	Sigma %99,8
Metanol	Merck % 99,9
pH-metre kalibrasyon çözelti (4.01, 7.00, 9.18)	Merck

5.2.1. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Madde ve Malzemelerin Hazırlanması

Propolisin Farklı Çözücülerle Ekstraktlarının Hazırlanması (25 mg/mL):

Trabzon ve çevresinden toplanarak temin edilen, buzdolabında -20 °C’ de dondurulmuş olan doğal propolis ürünü rendelendi. Rendelenen propolis, öğütücüde toz haline getirildi ve -20 °C’ de donduruldu.

0,5 g toz propolis 10 mL saf etanol, metanol, DMSO ile çözüldü. Saf etanol, metanol, DMSO ile 20 mL’ ye tamamlandı. İyice vortekslendikten sonra 60 °C’ de 150 rpm’ de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000

rpm' de 10 dk santrifüjlendi. Partikülleri tam çökmeyen propolis ekstraktları 10000 g' de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0,22 µm' lik filtrelerden geçirildi. Daha sonra kullanılmak üzere alikotlanıp -20°C' de, karanlıkta saklandı.

0,1 mM DPPH Çözeltisi: 3,94 mg DPPH tartıldı, etanol ile çözünüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Askorbik asit Çözeltisi: 4.40 mg askorbik asit 5 mL saf su ile çözülerek 5000µM'lik askorbik asit standardı elde edildi. 5000µM olarak hazırlanan çözeltiden 25 kat dilüsyon ile 200µM'lık askorbik asit standartı elde edildi.

0,2 mM FeCl₂.4H₂O Çözeltisi: 9,94mg FeCl₂.4H₂O tartıldı, saf su ile çözünerek hacmi 25 mL' ye tamamlandı. 2 mM olarak hazırlanan çözeltiden 10 kat dilüsyon ile 0,2 mM çözelti elde edildi.

5 mM Ferrozin Çözeltisi: 62 mg Ferrozin tartılıp, saf su ile çözünerek hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

DFO (Deferoksamin mesilat) Çözeltisi: 98,5 mg olarak DFO tartılıp 0,5mL saf su ile 30mM 'lik DFO standardı elde edildi.

DMEM Hazırlanması: 442,5 mL DMEM (glukoz içeren) üzerine 50 mL FBS ve 7,5 mL penisilin-streptomisin eklendi. 50 mL' lik falkon tüplere bölünerek +4 °C' de saklandı.

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 oluşturulmuş oldu.

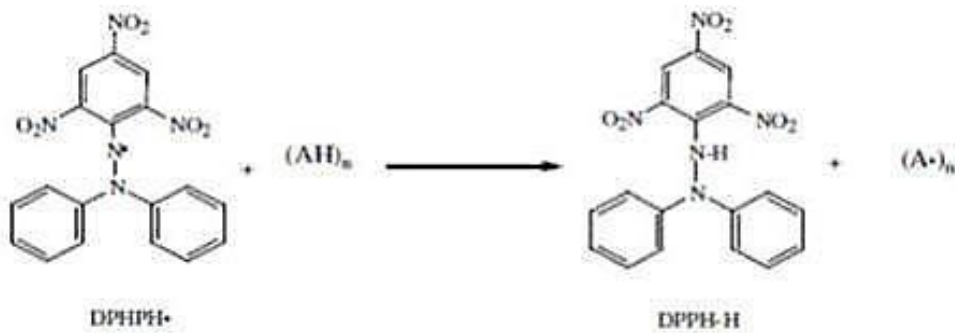
PBS (Phosphate Buffer Solution), pH 7.4, 1 L: Temiz bir behere 900 mL kadar saf su ve 10 tane PBS tablet konularak manyetik karıştırıcıda manyetik bar yardımıyla

      . pH-metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra       n pH' ı 7. 4' e ayarlandı.        balon jojeye aktarılarak, saf su ile son hacim 1 L' ye tamamlandı ve +4  C' de saklandı.

CM-H₂DCFDA       s : 50 g CM-H₂DCFDA içeren bir t  p alınıp, 1000  L saf etanol ile       nerek 87 M' lık CM-H₂DCFDA       s  elde edildi.

5.2.2. DPPH Radikal S       Aktivite Tayini

Propolis ekstraktlarının DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi, Yu ve arkadaşları tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanıldı (82). DPPH radikali, ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup, 517 nm dalga boyunda maksimum absorbans değeri vermektedir. Antioksidan madde veya maddelerle muamele edildiğinde, DPPH 'den kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbans değerlerinin d   mesine neden olmaktadır. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesine ait reaksiyon  ekil 8' de g  sterilmektedir. Çalışmada satın alınan bu radikalın 0,1mM'lık etanolik       s  kullanıldı. Propolis ekstraktları değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. E it hacimde (750  L) DPPH ve numune       leri karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dk bekletildi. Süre sonunda DPPH'ın maksimum absorbans değerini verdiği 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Negatif kontrol olarak DPPH       s  ve numunenin                 kullanıldı. DPPH radikal s       aktivite tayini için deney esnasında yapılan pipetlemeler Tablo 9'da g  sterilmektedir.



Şekil 8. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi

Sonuçları karşılaştırmak amacıyla doğal antioksidan olarak ise askorbik asit kullanıldı. Numune ve standartların radikal süpürücü aktivitesi negatif kontrole oranla % olarak verilmektedir ve Eşitlik 1'e göre hesaplanmaktadır.

$$\%RSP = \frac{\text{kontrol absorbansı} - \text{numune absorbansı}}{\text{kontrol absorbansı}} \times 100 \quad (1)$$

Tablo 9. DPPH tayini için deney esnasında yapılan pipetlemeler

	Kontrol	Numune	Standart
Etanol / Metanol / DMSO	750 µL	-	-
DPPH çözeltisi	750 µL	750 µL	750 µL
Ekstrakt(değişik konsantrasyonlarda)	-	750 µL	-
Standart(değişik konsantrasyonlarda)	-	-	750 µL
Oda sıcaklığında, karanlıkta 50 dakika inkübe edildi.			
517 nm' de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçüldü.			

5.2.3. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini

Propolisin demir iyonu (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesi Dinis ve arkadaşları tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanıldı (83). Propolisin farklı çözücülerde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki ekstraktları, FeCl_2 ve ferrozin çözeltileri belirlenen miktarda kullanılarak 562 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Sonuçları karşılaştırmak amacıyla çalışmalarda sentetik antioksidan EDTA, in vitro hücre çalışmalarında ise deferoksamin (DFO) kullanıldı. Numune ve standartların demir bağlama oranları negatif kontrole oranla % olarak verilmektedir ve Eşitlik.2'e göre hesaplanmaktadır. Metal şelatlama aktivite tayini için deney esnasında yapılan pipetlemeler Tablo 10'da gösterilmektedir.

$$\%\text{Inhibisyon} = \frac{\text{kontrol absorbansı} - \text{numune absorbansı}}{\text{kontrol absorbansı}} \times 100 \quad (2)$$

Tablo 10. Metal şelatlama aktivitesi tayini için deney esnasında yapılan pipetlemeler

	Kör	Numune	Standart
Etanol/ Metanol/ DMSO	50µL	-	-
Ekstrakt(değişik konsantrasyonlarda)	-	50µL	-
Standart(değişik konsantrasyonlarda)	-	-	50µL
Distile su	1,7mL	1,7mL	1,7mL
0,2 mM FeCl ₂ .4H ₂ O çözeltisi	50µL	50µL	50µL
5 mM Ferrozin çözeltisi	-	0,2mL	0,2mL
Karışımlar vortekslendi ve 10 dakika sonra 562 nm 'de absorbans ölçüldü.			

İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm'deki absorbansı ferrozin hariç geriye kalan çözeltiden oluşan köre karşı kaydedildi. Negatif kontrol olarak da numune yerine saf çözücüsü kullanıldı.

5.2.4. Hücre Kültürü

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

5.2.4.1. Primer Fibroblast Hücrelerinin Sayılması ve Canlılığın Tespiti

Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 10 µL' si 10 µL tripan blue ile karıştırılarak Neubauer hematositometre camına aktarıldı. Işık mikroskobu altında canlı hücreler sayıldı. Ölü hücrelerde işlev görmeyen Na⁺-K⁺ ATPaz pompası nedeniyle boya membran tarafından absorblanmakta ve dışarı atılamamakta, dolayısıyla hücreler mavi renkte görülmektedir Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanlar sarı-yeşil renkte, ölü olanlar mavi renkte görüldü (1).

5.2.4.2. Primer Fibroblast Hücrelerinin Çözülmesi, Çoğaltılması

Bu çalışmada, bölümümüzde yapılmış olan başka bir çalışmada dondurularak saklanmış olan primer fibroblast hücreleri kullanıldı. Fibroblast hücreleri L-Glutaminli, % 10 FBS, % 1 penisilin + streptomisin içeren DMEM besiyerinde, % 5 CO₂ ortamında, 37 °C’ de, T-25 ve T-75’ lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı. Donmuş hücreler aşağıdaki şekilde çözüldü.

1. Kriyovial içinde bulunan 1 mL fibroblast hücreleri azot tankından çıkarıldıktan sonra 37 °C’ de su banyosunda tamamen çözüldü.
2. Fibroblast hücreleri (1 mL) 15 mL’ lik falkon tüpe aktarıldı ve hacmi L-Glutaminli, % 10 FBS, % 1 penisilin + streptomisin ve yüksek oranda (4,5 g/dL) glukoz içeren DMEM besiyeri ile 10 mL’ ye tamamlandı.
3. Hücre süspansiyonu 400 g’ de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve hücre çökeleği tüpün ucuna parmak ucuyla vurularak, hücreler 1 mL besiyeri içinde çözüldü.
5. Çözülen hücrelerin üzerine istenilen miktarda taze DMEM besiyeri eklendi ve % 5 CO₂ ortamında, 37 °C’ de, T- 75’ lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı.

5.2.4.3. Primer Fibroblast Hücrelerinin Pasajlanması

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

1. Pasajlama için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. 8 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra 75 cm²’ lik flasklara, 3 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 3 dakika inkübatörde bekletildi.
3. İnkübasyon sonrası 9 mL % 10 FBS içeren DMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g’ de 5 dakika santrifüjlendi.
4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra T-

75 flasklara uygun sayıda hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi de 15 mL' ye tamamlandı.

5.2.4.4. Primer Fibroblast Hücrelerinin Sayılması

1. Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 10 µL' si 10 µL tripan blue ile karıştırılarak karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

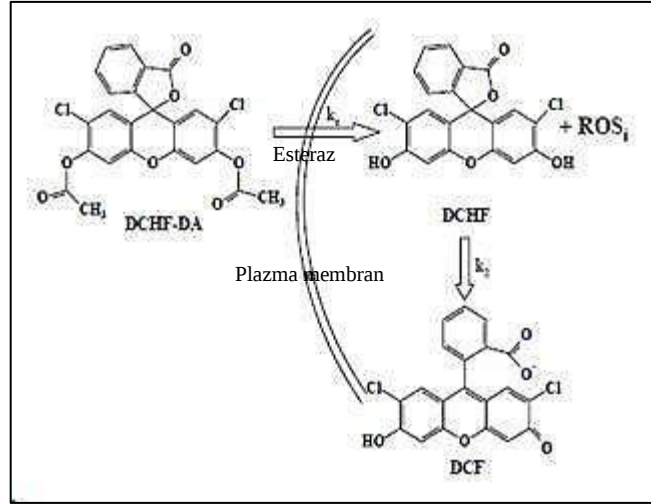
2. Karışım pipet ile tekrar karıştırılarak 10 µL alınarak neubauer hematositometre lamına aktarıldı.

3. Işık mikroskobu altında 10x objektif kullanarak canlı ve ölü hücreler sayıldı. Ölü hücrelerde işlev görmeyen Na^+/K^+ ATPaz pompası nedeniyle boya membran tarafından absorblanmakta ve dışarı atılamamakta, dolayısıyla hücreler mavi renkte görülmektedir. Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanlar sarı-yeşil renkte, ölü olanlar mavi renkte görüldü.

4. Mikroskopla bakıldığında hematositometrede 16 küçük karenin dört köşede bulunduğu görülür. Çapraz köşelerde bulunan hücreler sayılır ve mililitredeki canlı ve ölü hücre sayısı; sayılan hücre sayısı x seyreltme oranı x 10^4 bağıntısı kullanılarak hesaplandı.

5.2.5. CM-H₂DCFDA ile Hücre İçi Oksidatif Stresin Spektrofluorometrik Analizi

Çeşitli radikaller tarafından oksitlenen CM-H₂DCFDA hücrede oluşan ROS üretimini ölçmek için kullanıldı (84). CM-H₂DCFDA; H₂DCFDA'nın klorometil türevi olup hücre içi ROS ölçümünde kullanışlı bir indikatördür. CM-H₂DCFDA pasif difüzyonla hücre içine girer, esterazlar tarafından deasetillenir ve tiyol reaktif klorometil grupları intraselüler glutatyon ve diğer tiyol içeren bileşiklerle etkileşir. Böylece 2',7'-DCFH-DA, fluoresans özelliği olmayan diklorofluoreskin (2',7'-DCFH) ürünü haline dönüşür. DCFH ortamdaki reaktif türler tarafından, güçlü fluoresans ışıma veren DCF (diklorofluoreskein)'e dönüşen bir probdur ve Şekil 9'da gösterilmektedir.



Şekil 9. DCFH-DA'nın ışıma veren DCF (diklorofluoreskein)'e dönüşümü

Yöntemin Uygulanması

1. Hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 200 μ L besiyeri içinde 5000 hücre ekildi.
2. Başlangıçtan 24 saat sonra pleyt inkübatörden alındı, içeriği uzaklaştırıldı ve propolis (200 μ g/mL), DFO(15 mM), askorbik asit (200 μ M) olacak şekil pleyte eklendi. 1 saat 37 °C' de inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra pleyt içeriği uzaklaştırıldı ve ortama 200 μ L yeni DMEM eklendi. 300 t-BHP μ M ilave edildi ve 1 saat 37 °C' de inkübasyona bırakıldı.
4. Pleyt inkübatörden alındı, içeriği uzaklaştırıldı ve ortama 200 μ L yeni DMEM eklendi
5. 4 saat 37 °C' de inkübe edildi.
6. Pleyte son konsantrasyonu 10 μ M olacak şekilde CM-H₂DCFDA boyası eklendi.
7. 10 dk 37 °C' de inkübe edildi.
8. Eksitasyon(492), Emisyon(527) da okuma yapılır.

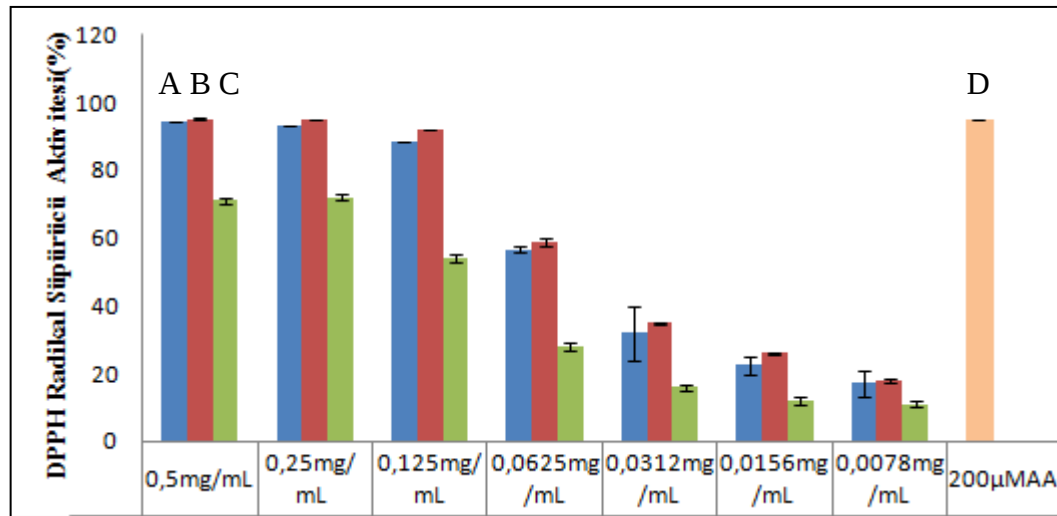
5.2.6. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen değerler, aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm S.D.$) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konulabilmesi için One Way ANOVA ve post-hoc Tukey analizleri kullanıldı. Metal şelatlama, DPPH tayini ile ilgili verilerinin metanol, etanol, DMSO propolis ekstraktları arasında karşılaştırılma yapıldı. CM-H₂DCFDA ile hücre içi oksidatif stresin spektrofotometrik analizi ile ilgili verilerinin negatif kontrol grubu ile t-BHP, propolis, DFO ve askorbik asit muamelesine maruz bırakılan hücreler grubunda karşılaştırılma yapıldı ve $p < 0,05$ olanlar anlamlı kabul edildi. Tüm tayinler 3 kez çalışıldı.

6. BULGULAR

6.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktive Tayin Sonuçları

DPPH radikali doğal antioksidanların serbest radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılır. Propolisin farklı çözücülere ait ekstraktlarının serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali üzerinden tayin edildi. DPPH çözeltisi mordur ve antioksidan bir bileşikle etkileştiğinde yapısı değişerek sarı renkli yeni bir bileşik haline gelir. Bu renk değişikliğinin derecesi, antioksidanın konsantrasyonu ile orantılıdır. Çalışmadaki propolis ekstraktların DPPH serbest radikali giderme aktivitelerine ait konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri Şekil 10 'da gösterilmektedir. Standart olarak askorbik asit kullanıldı.

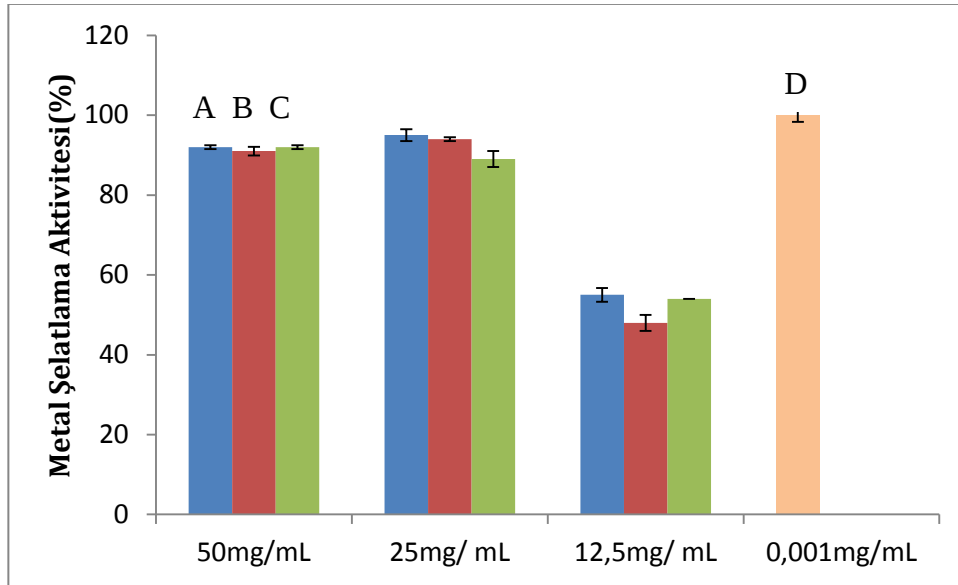


Şekil 10. DPPH serbest radikali giderme aktivitesine ait konsantrasyon-% inhibisyon grafikleri A:Etanolik ekstrakt, B:Metanolik ekstrakt, C: DMSO'lu ekstrakt, D: Askorbik asit

Propolisin etanol, metanol ve DMSO'lu ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi (%) sonuçları etanolü (94±0,1, 93,3±0,09, 88,5±0,2, 56±0,6, 32±8, 22,6±2,7, 17,2±3,9), metanolü (95±0,3, 94,7±0,2, 91,7±0,2, 58±1,3, 35,5±0,3, 26,1±0,5, 18,5±0,8), DMSO 'lu (72± 1,4, 72,7±1,1, 54±0,4, 28,7±5,4, 16,5 ±1,3, 12,9±0,4, 11±0,1) ve standart olarak kullanılan askorbik asit 96±0,07 olarak bulundu.

6.2. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayin Sonuçları

Metal şelatlama aktivitesi; propolisin çözeltideki Fe^{2+} iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirildi. Ferozin, ferröz iyonları (Fe^{2+}) gibi 2^+ değerlikli metal iyonları ile kantitatif miktarda bile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal kompleksi ise 562 nm’de maksimum absorbansta sergilemektedir. Metal şelatlayıcı ajanların varlığında ferrozin-metal kompleksi oluşmaz. Dolayısıyla şelatlama aktivitesinde 562 nm’de absorbansta meydana gelen azalma metal şelasyonunun göstergesidir. Metal şelatlama aktivitesinde azalan absorbansta ferrozin bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığını gösterir. Standart olarak iyi bir metal şelatlayıcı olan EDTA seçildi. Propolisin farklı çözücülere ait ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon grafiği Şekil 11 ‘de gösterilmektedir.



Şekil 11. Metal şelatlama şelatlama aktivitesini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon grafiği A:Etanolik ekstrakt, B:Metanolik ekstrakt, C: DMSO’lu ekstrakt, D: EDTA

Propolisin etanol, metanol ve DMSO’lu ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesi (%) sonuçları etanollü ($92 \pm 0,5$, $91 \pm 1,5$, $55 \pm 1,7$), metanollü ($95 \pm 1,1$, $94,3 \pm 0,5$, 48 ± 2), DMSO ‘lu ($92,6 \pm 0,5$, $89,0 \pm 2$, 54 ± 0) ve standart olarak kullanılan EDTA $98 \pm 1,7$ olarak

bulundu. Her 3 farklı çözücünde de metal şelatlama aktivitesi açısından benzerlik gözlenmiştir.

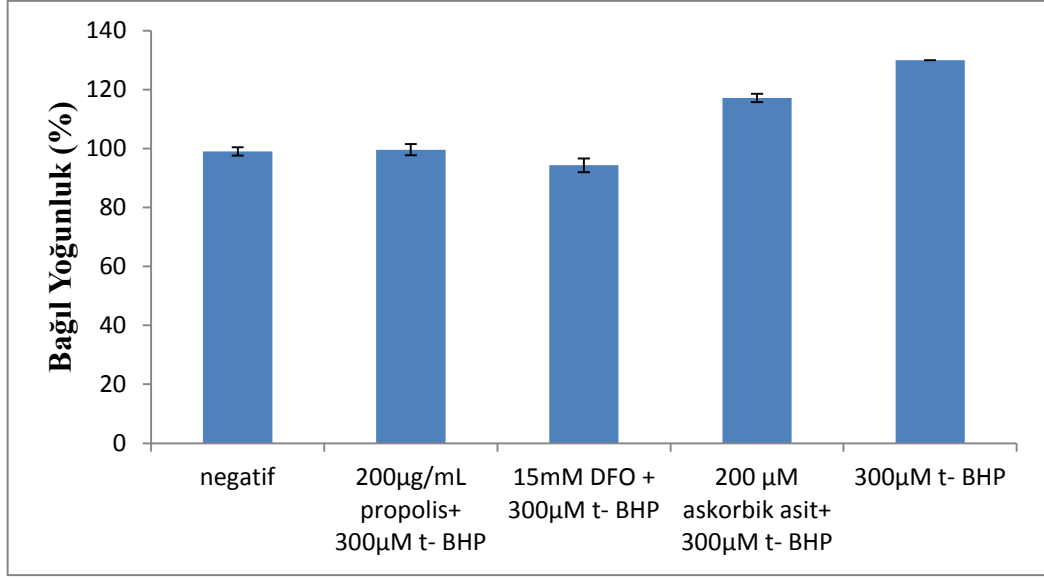
6.3. CM-H₂DCFDA Hücre İçi Oksidatif Stresin Spektrofluorometrik Analiz Sonuçları

Çeşitli radikaller tarafından oksitlenen CM-H₂DCFDA hücrede oluşan ROS üretimini ölçmek için kullanıldı. Hücre içi oksidatif stresin spektrofluorometrik analizi ile ilgili verilerinin negatif kontrol grubu ile pozitif kontrol grubu(300µM t-BHP), 200µg/mL propolis, 15mM DFO ve 200µM askorbik asit muamelesine maruz bırakılan hücreler grubunda karşılaştırılma yapıldı. Elde edilen veriler Tablo 11’de gösterilmektedir.

Tablo 11. ROS ölçüm sonuçları

	negatif kontrol	200µg/mL propolis+ 300µM t-BHP	15mM DFO+300µM t-BHP	200µM askorbik asit + 300µM t-BHP	300µM t-BHP
n	3	3	3	3	3
Bağıl yoğunluk (%)	(99±1,4)	(99,6±2,35)	(94,3±0)	(117,1±6)	(130±1,6)
p	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

300µM t-BHP ile hasarlanmış fibroblast hücrelerinde 4 saatlik iyileşme süresi sonunda 200µg/mL propolis, 15mM DFO ve 200µM askorbik asidin pozitif kontrole göre oluşan ROS miktarını azalttığı gözlemlendi. ROS üretiminin bağıl yoğunluk yüzdesi grafiği Şekil 12’ de gösterilmektedir.



Şekil 12. ROS üretiminin bağıl yoğunluk yüzdesi

7. TARTIŞMA

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. 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 (1,2).

Bir arı ürünü olan propolis; bal arıları tarafından ağaçların kabuklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli polenler, yağlar, özel reçine ve mumsu maddelerden oluşur. Propolis, kompleks kimyasal bileşiminden dolayı halk tıbbında uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (31). Propolisin, önemli farmakolojik özelliklerinden dolayı inflamasyon, diyabet, kanser ve kalp hastalıklarından korunmada ve genom kararlılığının sürdürülmesinde önemli rolü olabileceği düşünülmektedir (3).

Doğal ürünler, yeni ilaç keşfi için umut verici bir kaynaktır. Son yıllarda, propolisin kompozisyonu ve biyolojik özelliklerini ele alan birçok çalışma, araştırmacıların bu arı ürününe ilgisini arttırmıştır (2).

Bizde çalışmamızda propolis içeriğinde bulunan flavonoidlerden sadece birisini izole edip çalışmak yerine, total propolis ekstraktı kullanıp hem doğal ve yöresel bir ürünümüz olan propolisin, daha önce yapılan çalışmalarla ortaya koyulan antioksidan özelliğinin muhtemel mekanizmalarından olan metal şelatlama ya da serbest radikalleri yakalama kapasitesinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı in vitro ROS ölçümü yaparak değerlendirilmesini amaçladık.

Farklı çözücüler, farklı bileşenleri çözüp ekstrakte edeceği için propolis ekstraksiyon metodları, propolisin aktivitesini etkileyebilmektedir. Biyolojik

ölçümlerde propolis ekstraktı hazırlamada yaygın olarak kullanılan çözücüler; etanol, metanol ve sudur (21).

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Trabzon ilinden toplanan propolis örnekleri ile daha önce çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Çakıroğlu, çalışmada çeşitli çözücülerle (su, etanol, DMSO, gliserol ve aseton) hazırlanan Türk propolis ekstraktlarının; çözünürlüğünü, toplam polifenol, flavonoid içeriğini ve antioksidan özelliklerini ortaya koymuştur. Elde edilen bulgulara göre propolisin en iyi DMSO'da, daha sonra sırasıyla etanol, aseton ve gliserolde, en az suda çözündüğü kanaatine varılmış ve yapılan HPLC analizleriyle de bu sonuçları desteklemiştir (31).

Yaptığımız bu çalışmada kullanılan çözücülerin belirlenmesinde literatür desteği ve daha önce bölümümüzde yapılan çalışmalar (1, 3, 31) referans alınarak etanol, metanol ve DMSO olarak belirlendi.

Miguel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada propolisin üç tip ekstraktının (hidroalkolik, metanolik ve sulu) içeriğini aydınlatmaya çalışmışlardır. Propolisin sulu ekstraktının, fenolik bileşikleri ekstrakte etmek için metanol ve su-etanol ekstraktlarından daha az etkili olduğu gösterilmiştir. Hidroalkolik ekstraktlarda; dihidroflavonollar, flavononlar ve toplam fenollerin daha yüksek miktarlarda olduğu ileri sürülmüş olup metanolik ekstraktlarda ise sadece flavonlar ve flavonolların daha fazla olduğu belirtilmiştir (85).

DPPH radikali biyolojik bir radikal olmamasına rağmen, antioksidanların serbest radikal giderme aktivitelerinin tayini için kabul görmüş bir indikatördür (86). Çalışmamızda; farklı çözücülerle hazırlanmış propolisin serbest radikal giderici etkisi stabil bir radikal olan DPPH üzerinden test edilmiştir. Ekstraksiyon için kullanılan çözücülerin radikal giderme aktivitesinde etkili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda etanol ve metanollü propolis ekstraktlarının 125µg/mL gibi düşük konsantrasyonlarda bile etkili olduğu ve benzer radikal süpürücü etkiye sahip oldukları gözlenirken

DMSO'lu propolis ekstraktlarının ise etanol ve metanollü ekstraktlara kıyasla daha düşük süpürücü etkiye sahip olduğu bulundu.

Geckil ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada propolisin etanolik ekstraktlarının radikal süpürücü etkisini 200µg/µL ve üzerindeki konsantrasyonlarda % 90 'larda olduğunu göstermişlerdir (87).

Li-Chang L. ve ark. tarafından Tayvan'nın farklı bölgelerinden, Çin ve Brezilya'dan edinilen propolislerde 80µg/µL ve üzerindeki konsantrasyonlarda %90 üzerinde radikal süpürücü etkiye sahip olduğu gösterildi (88). Bu iki çalışma ile karşılaştırıldığında yöremiz propolisinin radikal süpürücü etkisinin literatürle benzer olduğu görülmektedir. DMSO 'lu propolis ekstraktlarının etanol ve metanollü ekstraktlarla kıyaslandığında daha düşük süpürücü etkiye sahip olmaları DMSO' da çözünen bileşenlerin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Propolisin etanol, metanol ve DMSO'lu ekstraktlarının Fe²⁺ iyonlarını şelatlama aktivitesi 25 mg/mL üzerindeki konsantrasyonlarda % 90 seviyelerinde bulundu.

Wang ve ark. propolisle yapmış oldukları çalışmada 2mg/mL'lik etanolik ekstraktın % 50 düzeyinde metal şelatlayıcı aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (89).

Geckil ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada propolisin etanolik ekstraktlarının metal şelatlama aktivitesinin 2mg/mL'lik konsantrasyonda % 70 olduğu bulunmuştur (87).

Literatürdeki verilerle kıyaslandığında çalışma sonucunda elde ettiğimiz sonuçların literatüre göre daha yüksek konsantrasyonlarda görülmesinin sebebi; bölgemiz propolisinin içeriğinin, literatürde çalışılan propolis örneklerinin içeriklerinden farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

In vitro oksidatif stres çalışmalarında; hücrelerde ROS oluşturmak için, metil metansülfonat (MMS), H₂O₂, ferroz sülfat, tersiyer-bütıl hidroperoksit (t-BHP), formaldehit, 1,2-dimetilhidrazin, doksorubisin gibi kimyasallar kullanılmaktadır (1,3).

Çalışmamızda fibroblast hücrelerinde ROS oluşturmak için bu kimyasallar arasından t-BHP seçildi. Bölümümüzde yapılan bir çalışmada fibroblast hücrelerinde hücre canlılığını azaltmadan maksimum DNA hasarı oluşturabilecek t-BHP konsantrasyonu 300 µM olarak bulunmuştur. DNA hasarlarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olan komet analizi skorlarına göre yapılan değerlendirmede etanolik ekstraktların DNA hasarını engellemede oldukça etkili olduğu ve 4 saatlik iyileşme zamanı sonrası t-BHP kaynaklı hasarın büyük bölümünün ortadan kaldırıldığı gözlenmiştir (3).

Hücrede oluşan ROS üretimini ölçmek için CM-H₂DCFDA kullanıldı. Propolisin ön muamelesinde pozitif kontrol grubuna göre daha az ROS miktarı gözlemlendi. DFO verilen hücrelerde metal iyonlarının şelatlanarak ROS oluşumunun engellendiği ve radikal süpürücü aktivitesinin yüksek olduğu bilinen askorbik asit verilen grupta da reaktif oksijen türlerinin pozitif kontrole göre anlamlı şekilde azaltıldığı gözlemlendi. Propolisin ROS miktarını azaltmasının, radikal süpürücü etkisi ve etkin olarak metal şelatlama özelliğinden kaynaklanabileceği sonucuna varıldı.

Literatürde flavonoidler, fenolik bileşikler ve bunları içeriğinde barındıran doğal ürünlerin hücre içi ROS miktarını azaltarak biyomolekülleri oksidasyondan koruduklarına dair çalışmalar mevcuttur. Sharon ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Caco-2 hücre serisinde t-BHP ve menadione ile indüklenmiş oksidatif hasarının engellenmesinde kuersetin ve rutin hem radikal süpürücü özellikleri hem de ortamdaki geçiş metallerini şelatlayıp radikal üretici reaksiyonları inhibe ederek biyomoleküllerin hasarını engellediklerini bildirmişlerdir. Kuvvetli bir metal şelatörü olan DFO 'nin standart olarak kullanıldığı bu çalışmada DNA hasarını azalttığı da gösterilmiştir (90).

Kang ve ark. ise WI-38 hücre serisinde yaptıkları çalışmada kafeik asidin, H₂O₂ ile uyarılmış hücre hasarı üzerine etkilerini araştırmışlar; kafeik asidin radikal süpürücü özellikleri ile hücre içi ROS miktarını azaltmak ve katalaz enziminin aktivasyonunu arttırmak suretiyle hücre hasarını engellediklerini bildirmişlerdir (84).

Yen ve ark. tarafından lenfosit hücrelerinde yapılan çalışmada askorbik asit ve gallik asidin, H₂O₂ ile uyarılmış oksidatif hasar üzerine etkilerini araştırmışlar; askorbik asit ve gallik asitin yüksek radikal toplayıcı özellikleri ve indirgeyici gücü ile DNA hasarını azalttığı bulunmuştur. Yine aynı çalışmada askorbik asit ve gallik asidin zayıf metal şelatlama özelliği olduğu vurgulanmıştır (91).

In vitro ROS ölçümü bulguları; literatürdeki farklı hücre serilerinde farklı hasarlayıcılarla oluşturulan akut oksidatif stresin neden olduğu hücre içi ROS miktarının flavonoid ve fenolik bileşiklerle azaltılmasının hedeflendiği çalışma sonuçlarıyla örtüşmektedir. Uzel ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Anadolu'nun dört farklı ilinden (Bursa/Orhangazi, Bartın, Ankara/Mamak ve Trabzon) toplanan propolis örneklerinin kimyasal kompozisyonunu GC-MS yöntemiyle ortaya koymuşlardır. Trabzon örneklerinin pinosembrin, naringenin, krisin ve 3, 4', 7-trimetoksi flavanon gibi flavonoidlerce diğer örneklere göre daha zengin olduğu belirtilmiştir (92).Yapılan çalışmada propolis ekstraktlarının hücre içi ROS miktarını azaltmasının nedeni, onun yöreye özgü flavonoid ve polifenolik içeriğinden kaynaklanıyor olabilir. De Flora' ya göre biyopolifenoller; antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerini sadece radikallerin yayılmasını engellemekle değil, aynı zamanda ortamdaki geçiş metallerini şelatlayarak ve radikal üretici reaksiyonları inhibe ederek, dolayısıyla radikal oluşumunu önleyerek gösterirler (93).

8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

8.1. Sonuçlar

1. Yaptığımız bu çalışmada propolisin etanol, metanol, DMSO 'lu ekstraktlarının 25 mg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda % 90'ın üzerinde metal şelatlama etkisi olduğu bulundu.

2. DPPH tayiniyle propolisin ROS süpürücü aktivitesi çalışıldı. Etanol ve metanollü ekstraktlarda 125µg/ mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda % 90 üzerinde süpürücü etki gözlemlendi.

3. Propolisin DMSO ile hazırlanmış ekstraktlarının ROS süpürücü aktivitesi 125µg/ mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda % 73 olarak bulundu.

4. 300µM t-BHP ile hasarlanmış fibroblast hücrelerinde 4 saatlik iyileşme süresi sonunda 200µg/mL propolisin pozitif kontrole göre oluşan ROS miktarını azalttığı, bununla radikal süpürücü etki ve etkin olarak metal şelatlama üzerinden üzerinden gerçekleşmiş olabileceği sonucuna varıldı.

5. 15mM DFO' nun ROS oluşumunu metal şelatlama üzerinden etki ederek azalttığı bulundu.

6. Radikal süpürücü etkisi yüksek olan askorbik asitin 200µM 'nın pozitif kontrole göre oluşan ROS miktarını azalttığı gözlemlendi.

8.2. Öneriler

1. Bu çalışma farklı çözücülerle hazırlanmış propolis ekstraktlarıyla farklı hücre serilerinde yapılabilir.

2. Dört saatlik iyileşme süresi yerine farklı zaman dilimlerinde çalışma planlanabilir.

3. Propolisin farklı antioksidan maddelerle ROS süpürücü etkisi ve metal şelatlama aktivitesi karşılaştırılabilir.

4. Farklı hasarlayıcılar kullanılarak aynı hücre serisinde yeni bir çalışma planlanabilir.

5. Propolisin kimyasal içeriğinin belirlenmesi, gösterdiği aktiviteyi aydınlatmak için yol gösterici olabilir.

6. Deneysel hayvan çalışmaları ile propolisin aynı etkileri *in vivo* koşullarda gerçekleştirip gerçekleştiremediği incelenebilir.

9. KAYNAKLAR

1. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
2. Sforcin JM and Bankova V (2011). Propolis is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 253-260.
3. Turan İ (2012). Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerine etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi. Doktora Tezi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
4. Zumla A and Lulat A (1989). Honey-a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82: 384-385.
5. Burdock GA (1998). Review of the biological propenties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363.
6. Ghisalberti EL (1979). Propolis a review. *Bee World* 60: 59-84.
7. Kolankaya D, Selmanoğlu G, Sorkun K, Salih B (2002). Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chem* 78: 213-217.
8. Bozkurt AF (2010). Farklı düzeylerde propolis uygulamalarının farelerde lipid peroksidasyonu (MDA) ile bazı biyokimyasal parametrelere etkilerinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
9. Heo MY, Sohn SJ, Au WW (2001). Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research* 488: 135-150.
10. Metodiewa D, Kochman A, Karolczak S (1997). Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: A comparision with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 41: 1067-1075.
11. Bencovic V, Orsolic N, Knezevic A, Ramic S, Dikic D, Basic I, Kopjar N (2008). Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: The alkaline comet assay study. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31: 167-172.
12. Storz G and Imlay J (1999). Oxidative Stres, *Current Opinion in Microbiology*, 2, 188-194.

13. Mccord JM and Day ED (1978). Superoxide- depent production of hydroxyl radical catalyzed by iron EDTA complex. FEBS Letters, 86,1, 139-142.
14. Akpolat M, Topçu Y, Kanter M (2008). İyonizan radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcumin ve c-vitaminin koruyucu etkilerinin incelenmesi. Tıp Araştırmaları Dergisi, 6 (2): 77-85.
15. Gutteridge JM (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. Dec; 41(12 Pt 2):1819-28.
16. Mercan U (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. YYÜ Vet. Fak. Derg. 15 (1-2): 91-96.
17. Vercruysse L, Smagghe G, Beckers T, Camp JV (2009). Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. Food Chemistry, 114: 38-43.
18. Gao K, Henning SM, Niu Y, Youssefian AA, Seram NP, Xu A, Heber D (2006). The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. Journal of Nutritional Biochemistry, 17: 89-95.
19. Costa CC and Pereina RG (2002). The influence of propolis on the rheological behaviour of pure honey. Food Chemistry, 76: 417-421.
20. Pietta PG, Gardana C, Pietta AM (2002). Analytical methods quality control of propolis. Fitoterapia 73 Suppl 1, 7–20.
21. Karakaş S (2012). Türk propolisinin ticari bitkisel yağlarda çözünürlüğünün incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
22. Karaman İ (2009). Propolisin kırık iyileşmesi ve oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi ,Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri.
23. Yalçın ÖC (2012). Türk propolis ekstraktlarının iyonizan radyasyonla uyarılmış insan fibroblast hücre serileri üzerine olası radyoprotektif etkisinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
24. Ahn M-R, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food Chemistry 101, 1383–1392.
25. Park JS and Woo KS (1997). The usage and composition of propolis added cosmetics Korea. In *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Mizrahi A And Lensky Y (Eds.) New York, Plenum Press, pp. 121-124.
26. Ghisalberti EL, Jefferies PR, Lanteri R, Matisons J (1978). Constituents of propolis. Experientia 34: 157-158.

27. Çolak M (2009). Arı poleni ve propolisin metastatik insan prostat kanseri hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi. Doktora Tezi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
28. Barbaric M, Miskovic K, Bojic M, Loncar MB, Bubalo AS, Debeljak Z, Medic-Saric M (2011). Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 135 (3): 772-778.
29. Duran GG (2007). *In vitro* koşullarda propolisin antibakteriyel, antifungal ve leiyşmanyasidal etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
30. Borges KS, Brassesco MS, Scrideli CA, Soares AE E, Tone LG (2011). Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genetics and Molecular Biology*, 34 (2): 310-314.
31. 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.
32. Çakıroğlu TN (2010). Çeşitli çözücülerde Türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
33. Ivona Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, Smolcic-Bubalo A, Medic-Saric M, Mayer L, Romic Z, Bucan K, Balog T, Sobocanec S, Sverko V (2007). In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 548–554.
34. Lairon D and Amiot MJ (1999). Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Current Opinion in Lipidology*, 10: 23-28.
35. Polat G, Koçan D (2006). Propolis ve Antimikrobiyel Etkisi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.
36. Çapanoğlu Güven E, Toydemir Otkun G, Boyacıoğlu D (2010). Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. *Gıda*, 35(5): 387-394.
37. Merken HM and Beecher GR (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3).
38. Agrawal AD (2011). Pharmacological activities of flavonoids: a review. *IJPSN*, 4 (2): 1394-1398.
39. Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huaman A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 113: 1243-1251.

40. Buratti S, Benedetti S, Cosio MS (2007). Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta*, 71: 1387-1392.
41. Kanbur M, Eraslan G, Silici S (2009). Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 909-915.
42. Çolak M (2003). Miyeloid kanser hücre serilerinde propolis ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
43. Diaz N J, Quevedo Alvarez O, Saucedo BL (1997). Determination of Fe, Mn, Zn and Cu in an ethanolic extract of Cuban propolis. *Rev. Cienc. Quim.*, 28 : 93-95.
44. Barlak Y (2009). Türk propolisi ekstraktlarının prostat kanser hücre serilerinin proteomikine etkisi. Doktora Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
45. Özcan M, Ceylan D, Ünver A, Yetişir R (2003). Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden sağlanan polen ve propolis ekstraktlarının antifungal etkisi. *Uludag Bee Journal*, 3: 27-34.
46. Barlak Y (2003). Türk propolisi ekstraktlarının solunumsal patlama sonrası PMN lökositlerden PMN elastaz salınımına etkisi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
47. Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan İ, Cakiroglu T N, Akalin I, Deger O, Bedir A (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H₂O₂-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica*, 62 (4): 388-396.
48. Bencovic V, Knezevic Horvat A, Dikic D, Lisic D, Orsolc N, Basic I, Kosalec I, Kopjar N(2008). Radioprotective effects of propolis and quercetin in γ -irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine*, 15: 851-858.
49. Uzel A, Sorkun K, Onçağ O, Coğulu D, Gençay O, Salih B (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 160: 189-195.
50. Ferguson LR (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475:89-111.
51. Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamed M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem* 103: 729-733.

52. Yılmaz Z (2006). Öğrenme ve hafızanın şekillendiği beyin bölgelerinde alkolün oluşturduğu hasarlarda propolisin etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
53. Marghitas LA, Stanciu OG, Dezmirean DS, Bobis O, Popescu O, Bogdanov S, Campos MG (2009). *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. Food Chemistry, 115: 878-883.
54. Nizamlioğlu NM, Nas S (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. Teknolojik Araştırmalar 5 (1): 20-35.
55. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry, 13:572-584.
56. Hepsen F, Tilgen F, Er H (1996). Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. Turgut Özal Tıp Merkezi Derg. 3: 386-391.
57. Hosnuter M, Gürel A, Babuççu O, Armutcu F, Kargı E, Isıkdemir A (2004). The effect of capeon lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. Burns. 30: 121-125.
58. Sarıkaya AO (2009). Kestane bal ve propolisinin fenolik asit kompozisyonu ve antioksidan özelliğinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
59. Takım K (2010). Kiraz yaprağı ekstratlarının antioksidan kapasitesinin ve oksidatif DNA hasarı üzerine etkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya
60. Kaur C, Kapoor HC (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – themillennium’s health. Intl. J. Food Sci. Tech, 36, 703-725.
61. Aliyazıcıoğlu Y, Değer O, Ovalı E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y, Karahan S C (2005). Effects of turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. International Immuno 5: 1652-1657.
62. Tekkeş Y (2006). Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
63. Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. Nutrition Reviews, 52: 253-265.
64. Özden S (2006). Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

65. Akyol MA (2007). Tavşan modelinde laparoskopik iskemik prekondisyon manevrasının oksidatif stres üzerine etkisinin araştırılması. Uzmanlık Tezi , Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Afyonkarahisar.
66. Tokaç D (2007). Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
67. Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ (2003). Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*, 25:259-274.
68. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 266:37-56.
69. Mayer B, Hemmens B (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *TIBS*, 22:477-481.
70. Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79:2056-2068.
71. Dinçer Y ve Akçay T (2000). DNA Hasarı. *Türk Biyokimiya Dergisi* 25(2): 73-79.
72. Sarı S (2008). Farelerde Ehrlich Asit Solid tümör modelinde Thymus Sipyileus ve Taurinin, Böbrek MDA, Glutasyon, AOPP düzeylerine ve SOD aktivitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
73. Halliwell B (1987). Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB Journal*, 1: 358-364.
74. Bilgici B (2005). Behçet hastalığında genotoksisite. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun.
75. Mazlum T (2009). Hiperkkolesterolemik bireylerde fındık tüketiminin serum ve plazmada oksidan- antioksidan dengeye etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
76. Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Nistroj I and Sies H (2001). Profiles of antioxidants in human plasma, *Free Rad. Bio. & Med.*, Vol.30, No.5, 456- 462
77. Abraham RT (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*, 2: 225-231.
78. Gürsoy Ş (2008). Düzenli spor yapan öğrenci gruplarında egzersizin total antioksidan kapasite ve serum lipid profili üzerine etkisi. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Malatya.

79. Halliwell B (1991). Drug antioxidant effects. *Drugs*. 42(4): 569 – 605.
80. Splettstoesser WD, Werner SP(2002). Oxidative stress in phagocytes ‘The Enemy Within’. *Microscopy Research And Technique*, 57:441-455.
81. Breinholt VM, Molck AM, Svendsen GW, Daneshvar B, Vinggaard AM Poulsen M, Dragst ed LO (2003). Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3-methylimidazole(4,5-f)-quinoline (IQ) on preneoplastic lesions and on oxidative damage, hormonal status, and detoxification capacity in the rat. *Food Chemical Toxicology*, 41: 1315-1323.
82. Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1619-1624 1619.
83. Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM (1994). Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 315, 161–169.
84. Kang KA, Lee KH, Zhang R, Piao M, Chae S, Kim KN, Jeon YJ, Park DB, You H J, Kim JS, Hyun JW (2006). Caffeic Acid protects hydrogen peroxide induced cell damage in WI-38 human lung fibroblast cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29(9), 1820-1824.
85. Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, Antunes MD (2010). Phenol and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chem Toxicol* 48: 3418-3423.
86. Chen HY, Lin YC, Hsieh CL (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, 104, 1418-1424.
87. Geckil H, Ateş B, Erdoğan S, Yılmaz I, Durmaz G (2005). Antioxidant, free scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1(1): 27-31.
88. Lu L-C, Chen Y, Chou C-C (2003). Antibacterial and DPPH free radical scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 11, No. 4, 277-282.
89. Wang B-J, Lien Y-H, Yu Z-R (2004). Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chemistry* 86, 237–243.
90. Sharon AA and Nora MOB (2000). Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert- butylhydroperoxide- and menadione- induced DNA single strand breaks in caco-2 cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 6, 507-514.
91. Yen G-C, Duh P-D, Tsai H-L (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* 79, 307–313.

92. Uzel A, Sorkun K, Gençay Ö, Önçağ Ö, Çoğulu D, Salih B (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research* 160, 189-195.
93. Munari CC, Alves JM, Bastos JK, Tavares DC (2009). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology*, 30 (1): 22-28.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport No :40865018642
Soyadı, Adı :MISIR, Sema
Uyruğu :Türk
Doğum tarihi ve yeri :12.04.1985
Medeni hali : Bekar
Telefon :0506 724 87 39
E-Posta :semay-61@hotmail.com
Yazışma adresi : Nefsipulathane mah. Avcılar sok. Birlik
apt. kat: 6
Akçaabat /TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	-
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2009
Lise	Akçaabat Anadolu Lisesi	2003

YABANCI DİL :İngilizce

HOBİLER :Kitap okumak, tenis oynamak, ,
fotoğraf çekmek