



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARADENİZ BÖLGESİ PROPOLİSİNİN
KARAKTERİZASYONU, ANTİOKSİDAN VE
SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ceren BİRİNCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

TRABZON-2021



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARADENİZ BÖLGESİ PROPOLİSİNİN
KARAKTERİZASYONU, AKTİOKSİDAN VE
SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ceren BİRİNCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

TRABZON-2021

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ceren BİRİNCİ'nin hazırladığı “Karadeniz Bölgesi Propolisinin Karakterizasyonu, Antioksidan ve Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi ” başlıklı çalışma Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.03.2021

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlayıp yazdığımı, 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 kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

24/03/2021
Ceren BİRİNCİ

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, her zaman her koşulda yanımda olan, bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, dualarını esirgemeyen Dedelerim Arslan Özçilingir ve Ahmet Fevzi Birinci 'ye Anneannem Zehra Özçilingir'e ve yokluğunu her daim hissettiğim rahmetli Babaannem Sefiye Birinci 'ye ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisini, desteğini ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen verdiği güvenle her zaman yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya; tüm tecrübelerini, önerilerini ve aynı zamanda laboratuvarını paylaşarak desteğini esirgemeyen hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Selcen ÇELİK UZUNER'e teşekkür ederim.

Çalışmanın çeşitli kademelerinde yardımları bulunan ve laboratuvarını paylaşan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a, karşılaştığım deneysel problemlerin çözümünde yardımcı bulunan Arş. Gör. Dr. Merve CORA'ya ve Arş. Gör. Ceren SARI'ya teşekkür ederim.

Tüm lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman her koşulda yanımda olan değerli arkadaşım Esra BİRİNCİ ve ailesine, İnş. Müh. Mehmet Ceyhun BULUT'a çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübeleri, manevi destekleri, motivasyonları, hoş sohbetleri ile yanımda olan Doç. Dr. Zehra CAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Merve KESKİN'e, Arş. Gör. Yakup KARA'ya, Kimyager Hilal Ebru ÇAKIR'a ve Öğr. Gör. Dr. Elif AYAZOĞLU DEMİR'e teşekkür ederim. Çalışmalarımı gerçekleştirdiğim esnada yardımlarını aldığım KTÜ Kimya, Eczacılık, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Tıbbi Biyoloji 'deki tüm hocalarıma, KTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Memeli Hücre Kültürü Laboratuvarı ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemi sağlayan hiçbir fedakarlıktan ve özveriden kaçınmayan, maddi madevi desteklerini ve dualarını esirgemeyen ÖZÇİLİNGİR ve SİYAH ailelerine, hayatımda attığım her adımda, tüm tercihlerimde yanımda olan beni yüreklendiren kendim olmamı sağlayan annem Nurgül BİRİNCİ 'ye, babam Deniz BİRİNCİ'ye ve kardeşim Göksu BİRİNCİ'ye sonsuz teşekkürler.

Ceren BİRİNCİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Propolis	2
2.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri	3
2.3. Propolisin Kimyasal Kompozisyonu	3
2.4. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri	6
2.4.1. Antioksidan Aktivite	10
2.4.2. Antikanser/Antitümör Aktivite	10
2.5. Antioksidanlar	11
2.5.1. Serbest Radikaller ve Türleri	12
2.5.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi	13
2.6. Kanser	13
2.7. Hücre Döngüsü	14
2.8. Hücre Ölümü	15
2.8.1. Apoptoz	15
2.8.2. Nekroz	16
2.9. Sitotoksikite Testleri	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.1.1. Hücre Hatları	18

3.1.2. Propolis Örnekleri	18
3.1.3. Cihazlar	19
3.1.4. Sarf Malzemeler	19
3.1.5. Kimyasallar	20
3.1.6. Çözeltiler ve Hücre Kültür Medyaları	22
3.1.6.1. Hücre Kültür ve Dondurma Medyaları	22
3.1.6.2. HPLC ile Fenolik Bileşen Analizi Çözeltileri	22
3.1.6.3. Toplam Polifenol Madde Miktarı Analizi Çözeltileri	23
3.1.6.4. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analizi Çözeltileri	24
3.1.6.5. DPPH [*] Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini Çözeltileri	24
3.1.6.6. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-Frap Tayini Çözeltileri	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması	25
3.2.2. Briks Değeri Tayini	25
3.2.3. Elektriksel İletkenlik-pH Değeri Analizi	25
3.2.4. % Balsam Miktarı Tayini	25
3.2.5. % Vaks Miktarı Tayini	26
3.2.6. Toplam Polifenol Madde Miktarı Analizi	26
3.2.7. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analizi	27
3.2.8. DPPH [*] Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini	27
3.2.9. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-Frap Tayini	27
3.2.10. HPLC ile Fenolik Bileşen Analizi	28
3.2.10.1. Numunelerin HPLC-UV Analizine Hazırlanması	28
3.2.10.2. HPLC-UV Koşulları	28
3.2.10.3. Standart ve Kalibrasyon	29
3.2.11. Hücrelerin Kültüre Edilmesi, Pasajlanması ve Saklanması	29
3.2.12. Hücrelerin İkiye Katlanma Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi	31
3.2.13. MTT Yöntemi ile Sitotoksikite Analizi	31
3.2.14. Anneksin V-PI Analizi	33
4. BULGULAR	36
4.1. Briks Değeri Tayini Sonuçları	36
4.2. Elektriksel İletkenlik-pH Değeri Analiz Sonuçları	36
4.3. % Balsam Miktarı Tayini Sonuçları	36

4.4. % Vaks Miktarı Tayini Sonuçları	36
4.5. Toplam Polifenol Madde Miktarı Analizi Sonuçları	37
4.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analizi Sonuçları	38
4.7. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini Sonuçları	39
4.8. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-Frap Tayini Sonuçları	41
4.9. HPLC ile Fenolik Bileşen Analizi Sonuçları	42
4.10. Hücrelerin İkilenme Zamanının (Doubling Time) Sonuçları	43
4.11. MTT Yöntemi ile Sitotoksosite Analizi Sonuçları	44
4.12. Anneksin V-PI Analizi Sonuçları	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
6. KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	68

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Propolis içeriğindeki biyoaktif bileşikler, kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri	8
Tablo 2. Tezde kullanılan hücre hatlarına ait bilgiler	18
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazların marka ve modelleri	19
Tablo 4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	20
Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasallar	21
Tablo 6. HPLC ile fenolik bileşen analizinde kullanılan çözeltiler	23
Tablo 7. Toplam polifenol madde miktarı analizinde yapılan pipetleme işlemi	26
Tablo 8. Toplam flavonoid madde miktarı analizinde yapılan pipetleme işlemi	27
Tablo 9. FRAP tayininde yapılan pipetleme işlemi	28
Tablo 10. HPLC-UV gradient programı	29
Tablo 11. Propolis numunelerinin pH, iletkenlik ve briks verileri	36
Tablo 12. Propolis numunelerinin % balsam ve % vaks verileri	37
Tablo 13. Propolis numunelerinin toplam polifenol, toplam flavonoid, DPPH [•] ve FRAP verileri	41
Tablo 14. Propolis numunelerin fenolik bileşen sonuçları	43
Tablo 15. IC ₅₀ değerleri ve seçicilik indeksi	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Polifenol sınıflarının temel iskelet yapıları	5
Şekil 2. Propolisin aktivitelerin şematik gösterimi	7
Şekil 3. Bal ürünlerinin antikanser ve antitümör aktivitelerinden sorumlu moleküler mekanizmalar	11
Şekil 4. Toplam polifenol madde miktarı kalibrasyon grafiği	38
Şekil 5. Toplam flavonoid madde miktarı kalibrasyon grafiği	38
Şekil 6. Propolis numunelerinin DPPH [*] -SC ₅₀ grafikleri	40
Şekil 7. FRAP kalibrasyon grafiği	41
Şekil 8. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının büyüme eğrileri ve ikilenme zamanı	44
Şekil 9. Ordu (Ulubey) propolis ekstraktının hücre hatlarındaki IC ₅₀ değerlerini belirlemede kullanılan grafik	45
Şekil 10. MDA-MB-231 hücre hattı için elde edilen Anneksin V-PI analiz sonucu grafikleri	47
Şekil 11. NIH/3T3 hücre hattı için elde edilen Anneksin V-PI analiz sonucu grafikleri	48

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. Çalışmada kullanılan propolis numunelerinin bazıları	18
Resim 2. Ordu (Ulubey) propolis ekstraktı ile 72 saat inkübe edilen hücrelerin MTT testi pleyt görüntüsü	45
Resim 3. Anneksin V-PI analizi sonucu otomatik hücre sayacından alınan veriler	46



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATCC	American Type Culture Collection
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
BCS	Bovine calf serum
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
CAT	Katalaz
CDK	Siklin bağımlı kinaz
Dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Floroskein izotiyosiyanat
G1	İlk aralık
G2	İkinci aralık
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GST	Glutasyon S-transferaz
IC₅₀	The half maximal inhibitory concentration
LDH	Laktat dehidrogenaz
M	Mitoz
MDA-MB-231	Metastatik meme kanseri hücre serisi
MTT	3-(4,5-dimetil hidrazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NIH/3T3	Sağlıklı fare fibroblast hücre serisi
p53	Tümör protein 53
PBS	Phosphate buffered saline
Pen-Strep	Penisilin- streptomisin
PI	Propidyum iyodür
PS	Propidyum iyodür
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium

S	Sentez Fazı
sa	Saat
TNFα	Tumor necrosis factor alpha

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat
μL	Mikrolitre
g	Gram
nm	Nanometre
α	Alfa
•	Radikal İşareti

Formüller

(CH₃CH₂)₂O	Dietileter
C₂H₅OH	Etanol
C₄H₈O₂	Etil asetat
CH₃CN	Asetonitril
CH₃COOH	Asetik asit
CH₃COONH₄	Amonyum asetat
CH₃OH	Metanol
FeCl₃	Demir (III) klorür
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
O₂•	Süperoksit radikali
OH•	Hidroksil radikali
DPPH•	2,2 Difenil-1-pikrilhidrazil
FeSO₄.7H₂O	Demir (II) sülfat heptahidrat
Al(NO₃)₃.9H₂O	Alüminyum nitrat nonahidrat

ÖZET

Karadeniz Bölgesi Propolisinin Karakterizasyonu, Aktioksidan ve Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Arı ürünleriyle (bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri, ve arı ekmeği) yapılan hastalığı önleyici veya iyileştirici tedavi şekilleri apiterapi olarak adlandırılmaktadır. Önemli bir arı ürünü olan propolis, bal arılarının doğadaki çeşitli bitki ve ağaç türlerinden topladıkları maddeleri kendi salgılarıyla birleştirerek oluşturduğu reçinemsî yapıda doğal bir üründür. Propolisin içeriği buna bağlı olarak biyolojik aktivitesi toplandığı bölgeye, bitki florasına ve arı ırkı gibi faktörlere göre değişkenlik gösterir. Ilıman iklim kuşağında olması ve bitki çeşitliliğinin fazla olması nedeniyle Karadeniz Bölgesi propolis üretimi bakımından yüksek potansiyele sahiptir.

Planlanan bu çalışmada Karadeniz Bölgesi propolislerinin karakteristik özellikleri ile bazı biyolojik aktif özellikleri araştırıldı. Sinoptan Artvine kadar yedi farklı ilden toplanan ham propolis örneklerinin pH, iletkenlik, briks, balsam, vaks, toplam polifenol, toplam flavanoid, toplam antioksidan kapasite ve fenolik profilleri incelendi. Ordu(Ulubey) iline ait propolis örneğinin tüm özellikler bakımından en kaliteli örnek olduğu tespit edildi. Daha sonra Ordu(Ulubey) iline ait propolisin metastatik meme kanser hücresi (MDA-MB-231) üzerindeki sitotoksik etkisi araştırıldı. MTT testi ile yapılan sitotoksikite çalışmasında, Ordu (Ulubey) propolis ekstraktının metastatik meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerinde sağlıklı fibroblast (NIH/3T3) hücrelerine göre 1.92 kat daha seçici etkisinin olduğu belirlendi. Ayrıca yapılan Anneksin V-PI analizi sonuçlarına göre Ordu(Ulubey) propolis ekstraktının MDA-MB-231 hücre serisinde nekrotik ve geç apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: Apiterapi, apoptoz, meme kanseri, propolis, sitotoksikite

ABSTRACT

Characterization of Black Sea Region Propolis, Determination of Antioxidant and Cytotoxic Activities

Preventive or curative treatments made with bee products (honey, pollen, propolis, royal jelly, bee venom, and bee bread) are called apitherapy. Propolis, an important bee product, is a natural resinous product created by honey bees by combining the substances they collect from various plant and tree species in nature with their own secretions. The content of propolis, therefore, its biological activity varies according to the area where it is collected, plant flora and bee race. The Black Sea Region has a high potential in terms of propolis production due to its temperate climate and high plant diversity.

In this planned study, the characteristics and some biologically active properties of the Black Sea Region propolis were investigated. The pH, conductivity, brix, balsam, wax, total polyphenol, total flavanoid, total antioxidant capacity and phenolic profiles of crude propolis samples collected from seven different provinces from Sinop to Artvin were examined. It was determined that the propolis sample belonging to Ordu (Ulubey) province is the best quality sample in terms of all features. Later, the cytotoxic effect of propolis from Ordu (Ulubey) city on metastatic breast cancer cell (MDA-MB-231) was investigated. In the cytotoxicity study performed with the MTT test, it was determined that Ordu (Ulubey) propolis extract had 1.92 times more selective effect on metastatic breast cancer (MDA-MB-231) cells compared to healthy fibroblast (NIH/3T3) cells. In addition, according to the results of Annexin V-PI analysis, it was observed that Ordu (Ulubey) propolis extract significantly increased the number of necrotic and late apoptotic cells in the MDA-MB-231 cell line.

Key Words: Apitherapy, apoptosis, breast cancer, cytotoxicity, propolis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Çok eski çağlardan beri insanlar hastalıkların tedavisinde arı ürünlerinden faydalanmıştır. Arı ürünleriyle (bal, polen, propolis, arı sütü, arı zehri, bal mumu ve arı ekmeği) yapılan hastalığı önleyici veya iyileştirici tedavi şekilleri apiterapi olarak adlandırılmaktadır (1). Arı ürünlerinden biri olan propolis, bal arılarının doğadaki çeşitli bitki ve ağaç türlerinden topladıkları maddeleri kendi salgılarıyla birleştirerek oluşturduğu reçinemsî yapıda doğal bir üründür. Arılar propolisi kovanlarındaki çatlakları kapatmak, kovan dezenfeksiyonu sağlamak, nem ve sıcaklığını dengelemek amacıyla kullanılmaktadır (2-4). Yapılan çalışmalarda propolisin bileşiminin ve ona bağlı olarak biyolojik aktif özelliklerinin toplandığı coğrafik bölgeye, arı ırkına ve floraya göre değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. Propolis genel olarak toplandığı bölgeye göre Asya propolisi, Güney Amerika propolisi, Afrika Propolisi, Brezilya propolisi, Anadolu propolisi gibi adlandırılmaktadır. Bileşimindeki polifenoller bakımından zengin olan propolis, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanser aktiviteleri ile multifonksiyonel doğal bir ilaçtır (4-7).

Kanser, çeşitli faktörlerin etkisiyle hücrelerin kontrolsüz bölünerek çoğalması ve/veya apoptozun azalmasıyla ortaya çıkan patolojik bir durumdur (8). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre meme kanseri %11.7 ile en yaygın görülen kanser türüdür (9). Son yıllarda doğal bir ürün olan propolisin kanser üzerine olan etkisi ile ilgili çok sayıda çalışma olduğu görülmektedir (10-13).

Bu tez çalışmasında çok zengin floraya sahip olan Karadeniz Bölgesi propolisinin karakterizasyonu, antioksidan özellikleri ve dünyada en yaygın olarak görülen meme kanseri (MDA-MB-231) hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Karadeniz Bölgesi propolisinin ilk kez bu özelliklerinin aydınlatılması ülkemiz arıcılığına ve ekonomisine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Propolis

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından ağaçların kozalak ve kabuklarından, bitkilerin yaprak ve tomurcuklarından toplanan çeşitli yağlar, polenler, reçine ve mumlu maddelerin karışımından oluşan yapışkan keskin kokulu doğal bir karışımdır (2).

Propolis sözcük olarak Yunan kökenli bir fiil olan “promalasso” (sürterek yoğurup esnetmek) sözcüğünden türetilmiştir (6). Yunanca’da «pro» = ön-giriş, «polis» = şehir olmak üzere “şehrin önünde” anlamına gelmektedir ve arı kolonilerini koruyucu role sahiptir. Yunan dünyasında propolis ayrıca arı tutkalı olarak bilinip arı kovanındaki açıklıkları kapatan çimento anlamına da gelir (14).

Arılar propolisi kovanlarının iç sıcaklığını (~34°C) ve nemini (%40-65) ayarlamak, kovanlarının çatlak ve hasarlı yerlerini tamir etmek, kovanlarının giriş deliklerini daraltmak, çeşitli mikropların (virüs, bakteri, fungus vb.) üremesini engellemek, kovanın içine giren zararlı maddeler, mikroorganizmalar ve böceklerin mumyalanarak etkisiz hale getirilerek kovanın dezenfekte edilmesi gibi birçok amaç için toplamaktadırlar (3, 4).

Propolis toplanması bal arılarını uğraştıran zor bir süreçtir. Bal arıları bitkilerin tomurcuk ve yapraklarında bulunan yapışkan maddeleri, reçineli sızıntıları arka ayakları ve üst çenelerini kullanarak toplar ve ağızlarında bulunan salgıladıkları enzimler yardımıyla nemlendirerek yumuşatır. Pelet şekline gelen propolis ön ve orta bacaklar kullanılarak arka bacaklardaki polen sepetçiklerine biriktirilerek kovana taşınır (4, 15).

Bal arıları için; Çam reçineleri (*Pinus spp*), Huş (*Betula spp*), Kavak ve türleri (*Populus spp*), At kestanesi (*Aesculus Hippocastanum*), Söğüt (*Salix spp*), Kızılağaç (*Alnus spp*), Köknar (*Abies spp*), Erik (*Prunus spp*), Kara Ağaç (*Ulmus spp*), Meşe (*Quercus spp*), Dişbudak (*Fraxinus Excelsior*) gibi bitki türlerinin salgıları, yapraklarındaki ve tomurcuklarındaki lipofilik maddeler önemli propolis kaynağı olmaktadır (4).

Propolisin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile üretim miktarı toplandığı coğrafi konuma, bölgenin flora çeşitliliğine, iklim şartlarına ve arı ırkına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bir arı kolonisi yılda ortalama 150-200 g propolis toplayabilmektedir. Propolis üreten başlıca arı ırkı Avrupa bal arısı (*Apis mellifera*) ve onun türleri olan İtalyan bal arısı (*Apis mellifera ligustica*), Avrupa kara arısı (*Apis mellifera mellifera*) ve Karniyol bal arısı

(*Apis mellifera carnica*)’dır. İlginç bir şekilde tropik bal arısı (*Apis cerana*, *Apis florum*, *Apis dorsata*) ve Afrika bal arısı (*African Apis mellifera*) türlerinin propolisi kullanmadıkları görülmüştür (2, 6).

Propolis ile ilgili son elli yılda yapılan çok sayıdaki çalışma genel olarak içeriğinde bulunan flavonoidler, fenolik asitler, esterler, aldehytler ve ketonlar gibi aktif bileşenler sayesinde sahip olduğu antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanser gibi birçok biyolojik aktivitesini ortaya çıkarmıştır (5, 7). Bunların sonucunda ilaç endüstrisinde kullanımı sınırlı olmakla beraber gıda ve kozmetik alanlarında takviye edici tablet, burun ve boğaz spreyi, diş macunu, krem, şampuan, sabun vb. birçok üründe propolis kullanılmaktadır (4, 5, 7, 16).

2.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis kendine has keskin bir aromatik kokuya sahiptir ve toplandığı mevsim ile botanik kaynağa bağlı olarak kahverengi, yeşil, sarı, kırmızı gibi değişken renkleri bulunabilir (17, 18). İnsan derisine temas ettiğinde cildin yağları ve proteinleriyle güçlü bir etkileşime girdiğinden çıkarılması güçtür (14). Propolis sıcakta yumuşak, esnek ve yapışkan bir yapıya sahipken soğukta sert ve kırılgan bir yapıya sahiptir. Genellikle 60-70 °C’de sıvı haldeyken bazı propolis örneklerinin sıvılaşması için 100 °C’nin üzerindeki sıcaklıklara ihtiyaç duyulur (7, 19).

Propolis ham formu ile çok fazla kullanılmaz ve çeşitli çözücülerle ekstrakte edilerek saflaştırılır (20). Arılar farklı habitatlarda propolis kaynağı olarak farklı bitki türleri seçerler bu yüzden propolisin içeriği toplanan bölgenin fitocoğrafik özelliklerine göre değişim gösterir. Bu durum propolisin standardizasyonunu zorlaştırır ve kullanılan farklı çözücüler aktivitesini etkileyen farklı bileşikler ortaya çıkarabilir (21). Propolisin ekstraksiyonunda su, etanol, metanol, kloroform, dimetil sülfoksit gibi çözücüler kullanılmaktadır ancak suda az çözünen propolis için aktif bileşenlerinin çoğunu ortaya çıkaran en iyi ve sık kullanılan çözücü %70’lik etanol olarak belirtilmiştir (21-23). Ayrıca tıbbi amaçlı olarak da %70’lik etanolde ekstrakte edilen propolis kullanılmaktadır (24).

2.3. Propolisin Kimyasal Kompozisyonu

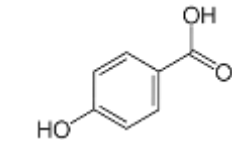
Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada farklı coğrafik bölgelerden toplanan propolislerin kimyasal içeriğinin; toplandığı bölgeye, bitki örtüsüne, iklim koşullara ve arı ırkına bağlı olarak çok değişken olduğu belirtilmiştir. 2000 yılına kadar propoliste

flavonoidler, terpenler ve fenoliklere ait 300'den fazla kimyasal bileşen tanımlanmıştır fakat yapılan son çalışmalarda farklı bileşik ve türevlerinin de olduğu ortaya koyulmuştur (7, 25-28).

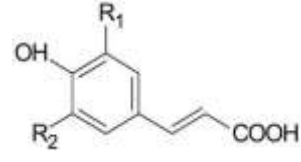
Ham propolis genel olarak %50 reçine, %30 vaks, %10 esansiyel yağlar, %5 polen ve %5 diğer organik bileşenlerden oluşur (29-31). Propolisin yaklaşık yarısı kadar olan büyük bir bölümünü polifenoller oluşturmaktadır (32). Fenolik bileşikler, bitkiler için morfolojik ve fizyolojik öneme sahip olan ikincil metabolitlerdir ve en basit fenolik bileşen, benzen halkasına bağlı tek bir –OH grubu bulunduran fenoldür (33).

Polifenoller; temel iskelet yapıları Şekil 1'de verilen fenolik asitler (hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitler), flavonoidler (flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, antosiyaninler ve flavanoller) ve tanenler (ellagitanenler, gallotananenler, kompleks tanenler, kondense tanenler) olmak üzere üçe ayrılmaktadır (33, 34).

Fenolik Asitler



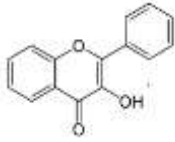
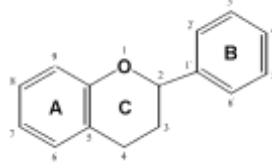
Hidroksibenzoik asit



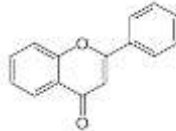
Hidroksisinnamik asit

Flavanoidler

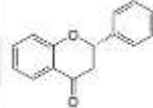
Flavanoidlerin temel iskelet yapısı



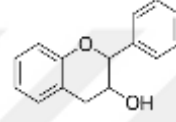
Flavonol



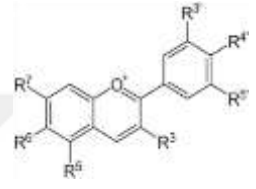
Flavon



Flavanon

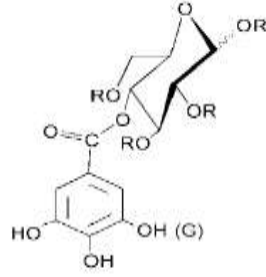


Flavanol

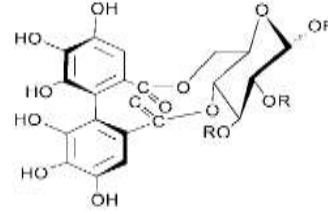


Antosiyanin

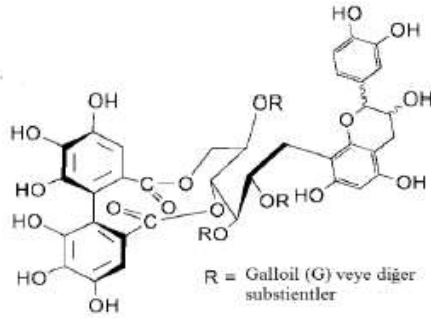
Tanenler



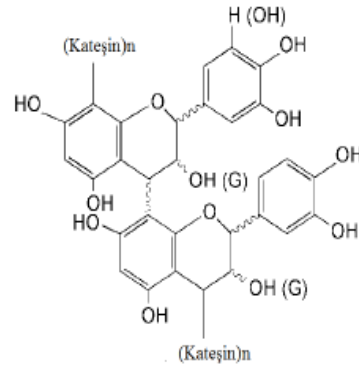
Gallotanenler



Ellagitannanler



Kompleks tanenler



Kondense tanenler

Şekil 1. Polifenol sınıflarının temel iskelet yapıları (Balasundram'dan, 33; Khanbabaee'den, 34)

Propolisteki hidroksibenzoik asit sınıfını gallik asit, *p*-OH benzoik asit ve protokatekuik asidin oluşturduğu, hidroksisinnamik asit sınıfını ise kafeik asit, ferulik asit ve *p*-kumarik asidin oluşturduğu bilinmektedir. Ayrıca propoliste polifenollerin en geniş üyesi olan flavonoid sınıfı (flavonlar: chrysin, apigenin ve luteolin; flavanoller: kateşin, rutin, kuersetin, mirisetin, kemferol, galangin; flavanonlar: pinosembrin, naringin, ($\pm$) naringenin, hesperitin; izoflavonlar: daidzein ve genistein) bileşiklerin de bulunduğu bilinmektedir (32, 35).

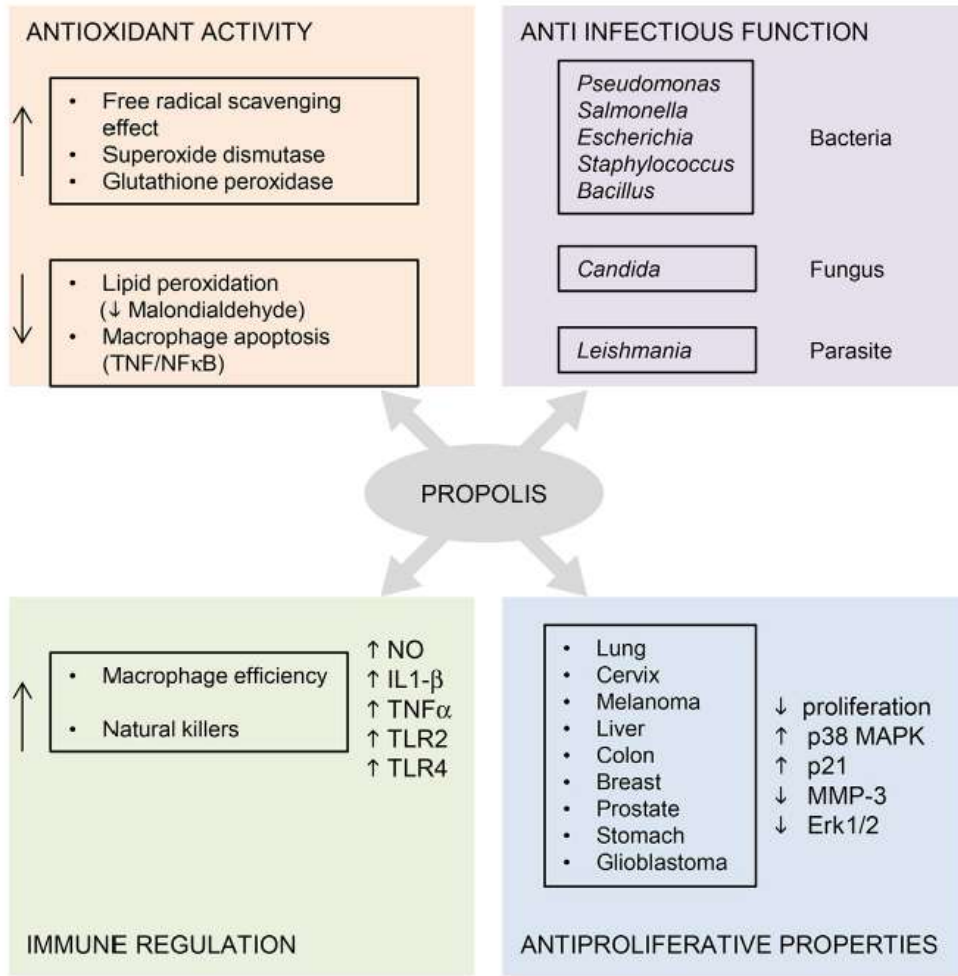
Propolis içeriğinde B1, B2, B6, C ve E gibi önemli vitaminlerin yanı sıra magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), manganez (Mn) ve demir (Fe) gibi eser elementlere de rastlanmıştır. Propoliste süksinik dehidrojenaz, glikoz-6-fosfataz, adenosin trifosfataz ve asit fosfataz gibi birkaç enzim de bulunmaktadır (35).

Yapılan literatür çalışmaları birçok propolis örneğinin içeriğinde antikanser/antitümöral etki gösteren ve meme kanserinde de sitotoksik etkisi bulunan kafeik asit fenetil ester (CAPE) bileşiğinin majör olarak bulunduğunu vurgulamıştır (36-41).

2.4. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri

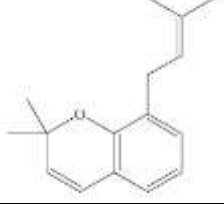
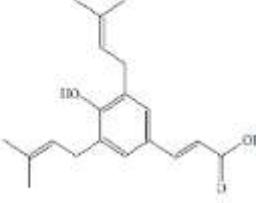
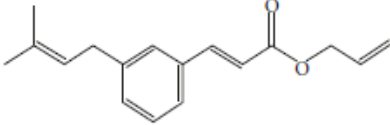
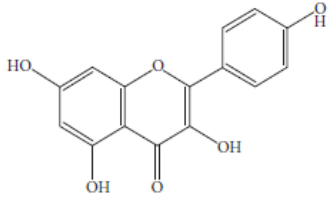
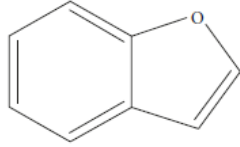
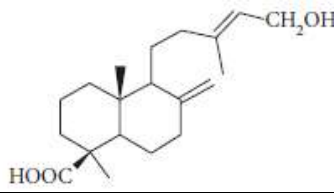
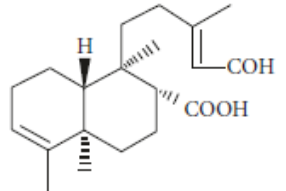
Propolisin biyolojik aktivitesinin içeriğinde bulunan polifenollerden kaynaklandığı vurgulanmaktadır. Ancak propolisin içeriği coğrafi bölge, arı ırkı, bitki örtüsü, iklim koşulu gibi faktörlere bağlı olarak değişebildiğinden tek bir tür propolisten bahsetmek zordur. Farklı kökenlere sahip binlerce propolis ve buna bağlı olarak çeşitli aktif bileşenlerden kaynaklanan farklı biyolojik aktiviteler ortaya çıkmıştır. Ayrıca farklı çözücüler kullanılarak yapılan propolis ekstraksiyonları biyolojik olarak aktif bileşenlerin aktivitesini değiştirmektedir (30, 42).

Literatürde propolisin; anti-inflamatuar, antimikrobiyal, anti-kanser/tümör, antifungal, antioksidan, antibakteriyel, antialerjik, antiviral, lokal anestezik ve yara iyileştirici gibi çeşitli özellikleri çalışmalarla ortaya konulmuştur (2, 4, 5, 14, 16, 30, 35, 42-44).

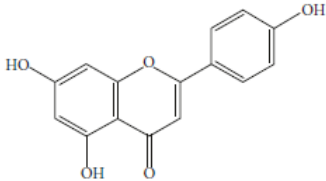
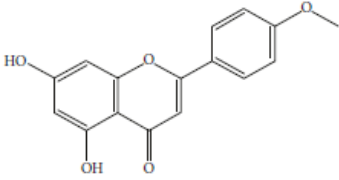
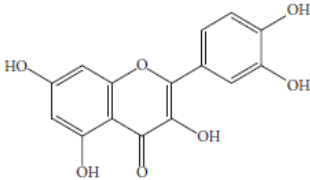
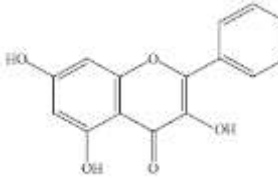
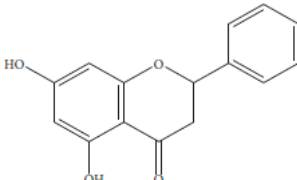
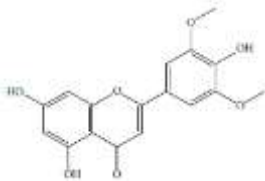
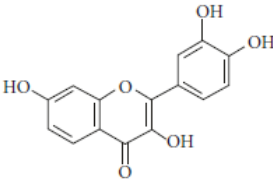
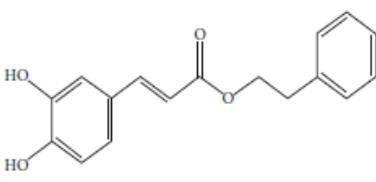
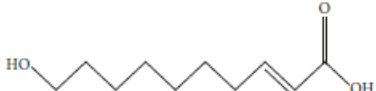


Şekil 2. Propolisin aktivitelerin şematik gösterimi. ERK, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar; IL, interlökin; p38 MAPK, p38 mitojenle aktifleştirilen protein kinaz; NFκB, aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir-güçlendiricisi; NO, nitrik oksit; p21, CDK etkileşimli protein 1; TNF, tümör nekroz faktörü; TLR, Toll benzeri reseptör; MMP, matriks metalloproteinazlar (Zabaiou'dan, 42)

Tablo 1. Propolis içeriğindeki biyoaktif bileşikler, kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri (Pasupuleti'den, 35)

Biyoaktif Bileşik	Kimyasal Yapı	Biyolojik Aktivite
Fenolik bileşen: 2,2-dimetil-8-prenilkromen		Antimikrobiyal
Fenolik bileşen: 3,5-diprenil-4-hidroksisinnamik asit (Artepillin C)		Antimikrobiyal Anti-inflamatuar Antikanser
Fenolik bileşen: 3-prenil sinnamik asit alil ester		Antimikrobiyal
Fenolik bileşen: Kaempferid		Antikanser Antitümör
Fenolik bileşen: Propolis benzofuran		Antifungal
Terpenoid: İzokupresik asit		Antifungal
Terpenoid: 13C-symphoreticolic asit		Antitümör
Terpenoid: Farnesol		Antifungal
Terpenoid: uzun zincirli yağ asitlerinin esterleri, 3-hidroksistearik asit (n = 11) procrim a; 3-hidroksistearik asit (n = 13), procrim b ve bir pentasiklik triterpenoid (lupeol)		Antimikrobiyal Antioksidan Antitümör

Tablo 1. (Devam)

Flavonoid: Apigenin		Antibakteriyel Anti-inflamatuvar
Flavonoid: Akasetin		Antialerjik Antikanser
Flavonoid: Kuersetin		Antialerjik Antikanser Anti-inflamatuvar Antibakteriyel
Flavonoid: Galangin		Antikanser Antioksidan
Flavonoid: Pinosembrin		Antikanser Antimikrobiyal
Flavonoid: Chrysin		Antikanser Anti-inflamatuvar Antibakteriyel
Flavonoid: Fisetin		Antialerjik Antikanser Antibakteriyel
Flavonoid: Kafeik asit fenetil ester (CAPE)		Antikanser Antitümör
10-hidroksi-2-dekanoik asit (10-HDA)		Antitümör Antibiyotik

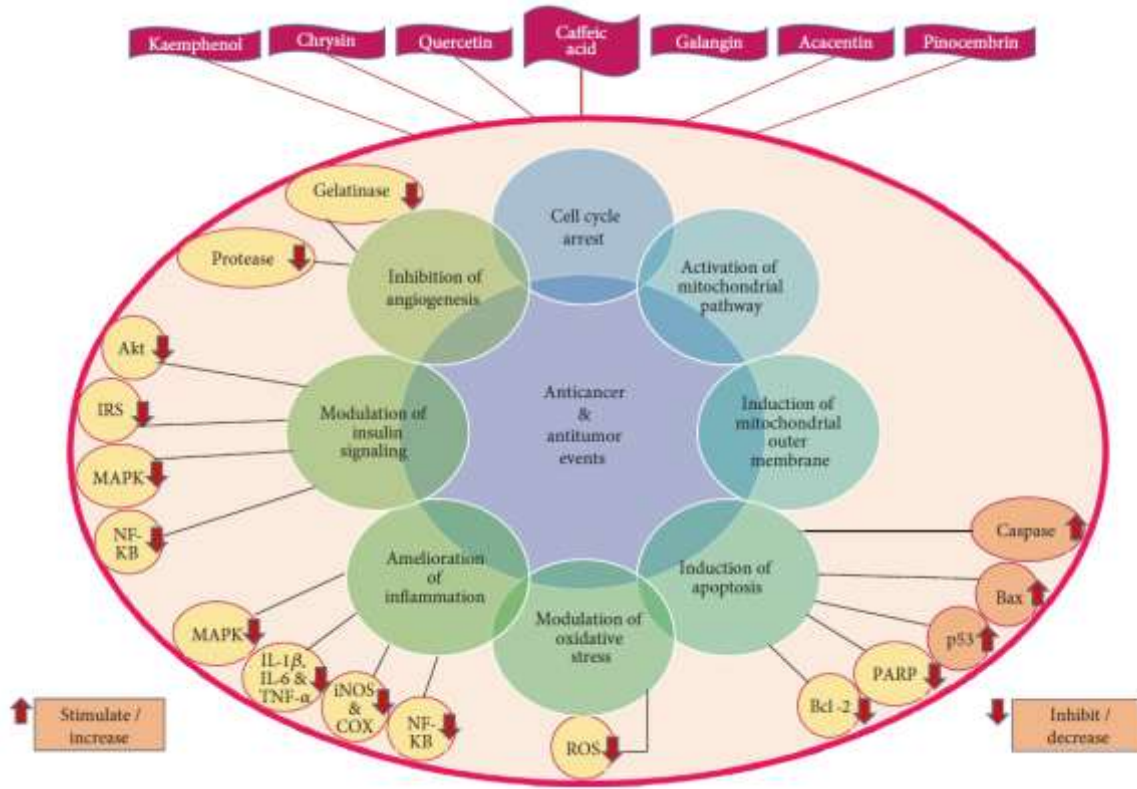
2.4.1. Antioksidan Aktivite

Bitkilerde yaygın olarak bulunan polifenolik bileşiklerin (fenolik asitler, flavonoidler, tanenler) antioksidan aktivite dahil olmak üzere birçok biyolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (33, 45).

Propoliste bulunan ve antioksidan etkiye sahip maddeler; Kafeik asit fenetil ester (CAPE), kafeik asit, ferulik asit, pinosembrin, kuersetin, ellajik asit ve luteolin gibi fenolik bileşiklerdir (46-52). Propolis içeriğinde bulundurduğu fenolik bileşikler açısından tanınan en iyi doğal antioksidanlardan biridir (53, 54). Ayrıca yapılan çalışmalar propolisin antioksidan etkisinin coğrafik koşullara, içerisindeki fenolik bileşiklerin çeşitliliğine ve miktarına bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (53, 55, 56).

2.4.2. Antikanser/Antitümör Aktivite

Son yıllarda propolis ile ilgili yapılan *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar antikanser tedavide etkinliği olan doğal bir ürün olduğunu bildirmektedir (10-12, 57-59). Propolis, hücre çoğalmasını veya apoptozu (programlanmış hücre ölümü) uyaran destekleyiciler olduğu bilinen biyolojik olarak aktif kafeik asit fenetil ester (CAPE), kafeik asit, artepillin C, kuersetin, naringenin, pinosembrin, kaemferol, galangin ve genistein gibi bileşikler içermektedir (28, 60-66).



Şekil 3. Bal ürünlerinin antikanser ve antitümör aktivitelerinden sorumlu moleküler mekanizmalar. IRS, insülin reseptörü substratı; MAPK, mitojenle aktive olan protein kinaz; NFκB, nükleer faktör kappa B; IL-1β, interlökin-1 beta; IL-6, interlökin-6; TNF-α, tümör nekroz faktörü alfa; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; COX, siklooksijenaz; ROS, reaktif oksijen türleri; Bcl-2, B hücreli lenfoma-2; ve PARP, poli (ADP-riboz) polimerazlar (Pasupuleti'den, 35)

Propoliste bulunan artepillin C'nin, özellikle fagositik aktivitelerini arttırıp makrofajları aktive ederek immünostimülasyon yoluyla kanser hücrelerine göre sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (67).

Propolisin ve içerdiği bileşiklerin antitümoral etkisinin ortaya konması, yan etki göstermemesi propolisin potansiyel ilaç olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır (11). Ayrıca deneysel modeller üzerinde yapılan testlerde, propolisin içerdiği flavonoidlerin akciğer, ağız, yemek borusu, mide, kolorektal, prostat ve meme kanserlerinin gelişimini inhibe ettiği ortaya konulmuştur (28).

2.5. Antioksidanlar

Antioksidan; oksidan özellik gösteren serbest radikallerle reaksiyona girerek oksidan özelliği durduran ya da yavaşlatan böylece hücresel hasarı engelleyen

moleküllerdir. Antioksidanlar, hücre içi ve hücre dışı ortamda hem enzimatik hem de enzimatik olmayan formlarda bulunur (68, 69).

Antioksidanlar; aktivitelerine, çözünürlüklerine ve büyüklüklerine göre üç farklı şekilde kategorize edilebilir. Birinci kategoride aktivitelerine göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılır. Enzimatik antioksidanlar oksidatif ürünleri; bakır, çinko, manganez ve demir gibi kofaktörlerin varlığında aşamalı olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve daha sonra suya dönüştürüp parçalayarak ortadan kaldırır. Enzimatik antioksidanlara glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) örnek verilebilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise serbest radikal zincir reaksiyonlarını kesintiye uğratarak çalışır. Enzimatik olmayan antioksidanlara askorbik asit (Vit C), α -Tokoferol (Vit E), polifenoller, glutatyon (GSH), ürik asit, transferrin, bilirubin ve melatonin örnek verilebilir (69, 70). İkinci kategoride çözünürlüklerine göre suda ve yağda çözünür antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılır. Suda çözünür antioksidanlar (Vit C), sitozol gibi hücresel sıvılarda bulunur. Yağda çözünen antioksidanlar (Vit E, karotenoidler ve lipoik asit) ise çoğunlukla hücre zarlarında bulunur. Üçüncü kategoride ise boyutlarına göre küçük moleküllü antioksidanlar (Vit C, Vit E, glutatyon, karotenoidler) ve büyük moleküllü antioksidanlar (süperoksit dismutaz, katalaz) olarak sınıflandırılır (69).

2.5.1. Serbest Radikaller ve Türleri

Serbest radikal, atomik yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron bulunan ve bağımsız olarak var olabilen atom, molekül veya iyonlardır. Serbest radikaller kimyasal simgenin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgi ile ($R^{\bullet}$, $R^{\bullet}$) ifade edilir. Serbest radikallerin çoğu oldukça kararsız ve reaktiftir. Serbest radikaller bir elektronunu başka moleküllere verebilir veya bir elektron başka moleküllerden alabilir bu nedenle oksidan ve indirgen özellik gösterir. Biyolojik öneme sahip reaktif oksijen türleri (ROS); hidroksil ($OH^{\bullet}$), süperoksit ($O_2^{\bullet}$), alkoksil ($RO^{\bullet}$), peroksil ($RO_2^{\bullet}$), nitrik oksit ($NO^{\bullet}$) radikalleridir (69, 71).

Serbest radikaller; hem çevre kirliliği, ozon, radyasyon, UV ışın, sigara kullanımı gibi kimyasal dış faktöre bağlı olarak hem de reperfüzyon hasarı, fagositoz, enzim reaksiyonları, solunum patlaması, araşidonat yolları gibi iç faktörlerin etkisiyle oluşabilir (68, 71).

2.5.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi

Reaktif oksijen türlerinin üretimini ve oluşturduğu zararı engellemek amacıyla vücutta “antioksidan savunma sistemi” adı verilen savunma mekanizmaları bulunmaktadır (70). Serbest radikallerin üretimi ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik sonucu oluşan durum oksidatif stres olarak tanımlanır. Oksidatif stres; travma, enfeksiyon, yaralanma, hipertoksi ve aşırı egzersiz sonucu yaralanan dokularda meydana gelebilir (71). Oksidatif stres oluştuğunda, hücreler oksidan etkilere karşı koymaya ve savunma enzimleri, transkripsiyon faktörleri ve yapısal proteinleri kodlayan genlerin aktivasyonu veya inhibisyonu yoluyla redoks dengesini yeniden sağlamaya çalışır. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek etkilerini durdurup ya da yavaşlatarak bu dengenin korunmasında önemli rol oynar. Oksitlenmiş ve indirgenmiş glutatyon arasındaki oran, vücuttaki oksidatif stresin önemli belirleyicisidir (72).

Vücutta yüksek serbest oksijen türlerinin oluşumu, DNA yapısını değiştirebilir, proteinlerin ve lipidlerin modifikasyonuna neden olabilir. Radikal üretimi ve antioksidan savunma sisteminin arasındaki dengenin sağlanması hücre canlılığı, aktivasyonu, proliferasyonu ve organ işlevi için kritiktir (72, 73). Oksidatif stresin Alzheimer, Parkinson, kanser, yaşlanma, hipertansiyon, iskemik ve enflamatuvar hastalıklara sebep olduğu düşünülmektedir (71, 72).

2.6. Kanser

Kanser, hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki dengenin aşırı hücre çoğalması ya da azalmış apoptoz yönünde bozularak hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu oluşan hastalıktır (74, 75).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) genetik faktörler, radyasyon, kimyasal maddeler, sağlıksız beslenme, aşırı alkol kullanımı, fiziksel aktivite eksikliği, hava-su kirliliği ve tütün kullanımı gibi faktörleri kanserin oluşma sebepleri olarak belirtmektedir (76).

En yaygın kanser türlerinin başında meme kanseri (%11.7), akciğer kanseri (%11.4), kolon rektum kanseri (%10), prostat kanseri (%7.3), mide kanseri (%5.6) ve karaciğer kanseri (%4.7) gelmektedir (77).

Vücutta başladığı yerden başka yerlere sıçrayarak yayılan kansere metastatik kanser, bu sürece ise metastaz denilmektedir (76). Metastaz kanserden ölümün en önemli

sebeplerindendir. Dünyada en fazla ölümün olduğu kanser türlerinin başında ise akciğer kanseri (%18), kolon rektum kanseri (%9.4) karaciğer kanseri (%8.3) ve mide kanseri (%7.7) gelmektedir (77).

2.7. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücre proliferasyonu ile sonuçlanan belirli aşamalar boyunca hücrelerin düzenli olarak ilerlemesidir. DNA'nın kopyalanıp ikiye dağıtılmasıyla yeni hücrelerin oluştuğu bu döngüde, DNA bütünlüğünün nesiller boyunca korunması için hücrelerin geçişinin düzenlenmesi önemlidir. Hücre döngüsü, G1 (ilk aralık), S (DNA sentez evresi), G2 (ikinci aralık) ve M (mitoz) fazları olarak adlandırılan dört aşamadan oluşur (78).

G1 evresi hücrenin metabolik olarak aktif olup büyüdüğü fakat DNA'sını kopyalayamadığı hazırlık evresidir. Sinir hücreleri döngüye girmeyip hep G0 fazında kalırken karaciğer hücreleri gibi bazı hücreler hasar görmedikçe bölünme sürecine girmeyip G0 fazında kalabilir. G1 evresinden sonra gelen S (sentez) evresinde DNA replikasyonu gerçekleşir ve genetik materyal iki katına çıkarılmış olur. S fazını DNA sentezinin tamamlanması, hücre büyümesinin devam ettiği ve proteinlerin mitozu hazırlık için sentezlendiği G2 fazı (ikinci aralık) takip eder. Bölünmeye hazır hale gelen hücre beş evreden oluşan M (mitoz) aşamasına geçer. Mitozdaki birinci aşama olan profazda, kromatinler kısalıp kalınlaşarak kromozoma dönüşür. Bir çift sentrozom ve iğ iplikleri oluşarak hücrenin kutuplarına taşınır. İkinci evre olan prometafazda, iğ iplikleri uzar, çekirdek zarı ve çekirdekçik kaybolur. Üçüncü evre olan metafazda kromozomlar hücrenin ekvator düzleminde tek sıra halinde dizilir. Dördüncü aşama olan anafazda, kromozomlar sentromerlerden ayrılıp zıt kutuplara geçer. Son evre olan telefazda ise kromozomlar çözülmeye başlar ve iki nükleer mebran oluşur. Süreç sitoplazma bölünmesi olan sitokinez ile son bulur ve iki yeni hücre oluşur. Tamamlanan hücre döngüsü bölünmenin bitmesiyle tekrar başlar (78-82).

Hücre döngüsünün sorunsuz ilerleyişi için G1, G2 ve M evresinde olmak üzere üç kontrol noktası vardır. Bu kontroller DNA zarar gördüğünde tamir edilmesi, oluşacak hücrelere genetik materyalin düzgün aktarılması ve kontrolsüz çoğalmayı engellemek için önemlidir. G1 kontrol noktasında, hücrenin bölünmek için yeterli boyutta olup olmadığı, DNA hasarının olup olmadığı, büyüme faktörleri gibi faktörlerin ve besinlerin yeterliliği kontrol edilir. G2 kontrol noktasında, DNA da hasar olup olmadığı ve replikasyonunun

düzgün olup olmadığı kontrol edilir. Son kontrol noktası olan M evresinde ise, kromozomların iç ipliklerine bağlanması kontrol edilir. Döngünün kontrolü siklin ve DNA (siklin bağımlı kinaz) olarak adlandırılan proteinlerin etkileşimine bağımlıdır. Kanseri türlerinin çoğunda bu kontrol mekanizması etkisini kaybetmiş olduğundan kontrol noktalarının aktivasyonu önem taşır. Bu kontrol noktalarında bir sorun olursa döngü durur ve sorun çözülür eğer tamir edilemeyecek kadar büyük bir hasar olursa hücre programlanmış hücre ölümü olan apoptoz yoluna yönlendirilir (83-85).

2.8. Hücre Ölümü

Hücre ölümü, doku fonksiyonlarını korumak için hasar görmüş işlevini yitirmiş veya yaşlanmış hücrelerin ortadan kaldırılmasıdır. Hücre ölümü ile hücre proliferasyonu arasındaki dengenin bozulması otoimmün bozukluklar, nörodejenaratif bozukluklar ve kanser gibi hastalıkların oluşmasında etkilidir (70, 86).

2.8.1. Apoptoz

Apoptoz kelimesi Yunanca'da çiçek ya da ağaçlardan düşen yaprak anlamına gelmektedir ve ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır (87). Apoptoz organizmadaki istenmeyen hücreleri kontrollü bir şekilde diğer hücrelere zarar vermeden öldüren bir ölüm şeklidir. Apoptoz, büyüme faktörlerinin azalması, radyasyon, reaktif oksijen türleri, kemoterapi gibi hücre hasarıyla başlatılabilir.

Apoptozda hücre, komşu hücrelere zararı en aza indirgeyecek şekilde hücre içinden bozulmaya başlar. Morfolojik olarak bir dizi değişikliğe uğrar. İlk olarak çekirdeğin çevresinde kromatin yoğunlaşması gerçekleşir ve hücre, dokuyu çevreleyen hücrelerden ve hücre dışı matristen ayrılır. Apoptoz ilerledikçe hücre küçülerek yuvarlaklaşır, çekirdek sıkışır ve parçalanır. Daha sonra hücre, bir parça plazma zarı ile çevrili hücre materyalin herhangi bir bölümünü içerebilen apoptotik cisimlere parçalanır. Son adımda, apoptotik cisimler makrofajlar ve diğer hücreler tarafından fagositozlanır ve lizozomal yolla sindirilir. Apoptozun tanımlayıcı morfolojik önemli özelliği son aşamaya kadar membran bütünlüğünün korunmasıdır (88).

Apoptoz sitoplazmada proenzim olarak bulunan kaspazların aracılık ettiği bir seri karmaşık biyokimyasal olaylar barındırır. Apoptoz başladığında prokaspazlar bölünür ve aktif kaspazlar hücre materyali parçalar böylece hücrede morfolojik değişiklikler oluşur. Apoptozda içsel ve dışsal olmak üzere iki biyokimyasal yolak vardır.

Ekstrinsik/dışsal apoptoz ölüm ligandlarının (TNF α , FASL) ölüm reseptörlerine (TNFR1, FAS) bağlanmasıyla aktive edilir. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve FAS ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi adaptör proteinlerini ve kaspaz 8 gibi sistein proteazlarını toplayan bir hücre içi ölüm alanına sahiptir. Bütün bu ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi ölüm indükleyici sinyalleşme kompleksi (DISC) olarak adlandırılır. Daha sonra DISC prokaspaz 8'i aktive eder ve kaspaz 8'i oluşturur. Aktif kaspaz 8, apoptozla sonuçlanan prokaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açar (88, 89).

İçsel ya da mitokondriyal apoptoz DNA hasarı, şiddetli oksidatif stress, hipoksi, radyasyon gibi etkenlerle aktive edilir. Bu uyarılar mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybolmasına ve sitokrom c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitozole salınmasına neden olur. Hem pro- hem de antiapoptotik üyeleri içeren Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal geçirgenliği düzenler. Sitozolda sitokrom c, prokaspaz 9'u aktive eden apoptozomu oluşturmak için apoptotik proteaz aktive edici faktörü (APAF-1) bağlar. Oluşan apoptozom prokaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz-3'ü meydana getirir ve süreç apoptozla sonuçlanır (88-90).

Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasında proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin arasındaki dengenin bozulması, azaltılmış kaspaz aktivasyonu, bozulmuş ölüm reseptörü ve çoğunlukla da tümör baskılayıcı gen olan p53 genindeki mutasyonun neden olduğu bildirilmektedir (91, 92).

2.8.2. Nekroz

Nekroz, kontrolsüz bir hücre ölüm şeklidir. Kimyasal etkenler, yaralanma, yanık, enfeksiyon gibi durumlar hücreyi nekroza indükler. Apoptozdan farklı olarak nekrozda hücrenin membran bütünlüğü bozulur ve hücre içi dışarıya salınarak hücrede enflamasyon oluşur (88, 90).

2.9. Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisite, incelenen maddenin miktarına ve etki süresine bağlı olarak hücreler üzerinde oluşturduğu toksik etkiyi gösterir (93). Hücreler sitotoksik etkiye maruz kaldığında apoptoz, nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da çoğalma özelliğini kaybedebilir (94). Sitotoksisite çalışmalarında önemli olan fiziksel, biyolojik ya da kimyasal etkilere maruz bırakılan hücrenin etki sonrası canlı/ölü miktarının belirlenmesidir (95).

Sitotoksosite belirleme yöntemleri genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik metodlardır. Kolorimetrik metodlarda tetrazolyum tuzları olan MTT (3-(4,5 - dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür), XTT, WST, MTS kullanılarak renk değişikliğinin spektrofotometrik ölçümü yapılır. Luminometrik metodlar floresans ve biyölüminesans olarak ikiye ayrılmaktadır. Floresans metodlarda, floresans özellikte maddeler kullanılırken biyölüminesans metodlarda lusiferaz denilen enzimler ve substratları ile canlı/ölü hücre tespiti yapılır. Ayrıca hücre ölümünde sızan enzimler de belirteç olarak kullanılır. Sitoplazmik bir enzim olan laktat dehidrojenaz hücreler hasar gördüğünde hücre dışına sızar bu enzimin aktivitesinin ölçülmesiyle hücre hasarı tespit edilebilmektedir (93).

1983 yılında Tim Mosmann tarafından geliştirilen MTT testi en yaygın kullanılan sitotoksosite testidir. Sarı renkte olan MTT, canlı hücrelerin varlığında NAD(P)H'a bağlı mitokondriyal oksidoredüktaz enzimleri yardımıyla mavi-mor rengindeki suda çözünmeyen formazon adlı yapıya indirgenir. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından yıkılabilir bu yüzden ölü hücreler indirgeme yeteneklerini kaybeder ve renk oluşumuna sebep olmaz. Oluşan mavi-mor rengin spektrofotometrik olarak 540-720 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek canlı/ölü hücre miktarı belirlenir (93, 96).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan hücre hatları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Tezde kullanılan hücre hatlarına ait bilgiler

Hücre Hattı	ATCC Kodu	Temin Edildiği Yer
MDA-MB-231 (Metastatik Meme Kanseri Hücre Serisi)	ATCC® HTB-26™	Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
NIH/3T3 (Fare Embriyonik Fibroblast Hücre Serisi)	ATCC® CRL-1658™	Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

3.1.2. Propolis Örnekleri

Propolis örnekleri Gümüşhane (Kelkit), Bayburt (Demirözü), Ordu (Ulubey), Sinop (Erfelek), Artvin (Borçka), Rize (İkizdere) ve Trabzon (Araklı) illerindeki arıcılardan temin edilerek satın alındı ve -20°C’de muhafaza edildi.



Resim 1. Çalışmada kullanılan propolis numunelerinin bazıları

3.1.3. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazların marka ve modelleri

Cihaz	Marka/Model
Çalkalayıcı	Heidolph Promax 2020
Hassas terazi	Precisa 321
Saf su cihazı	Merck Direct-Q 3UV
Spektrofotometre	Thermo Scientific Evolution 201
HPLC	Elite LaChrom Hitachi L-2300
Ultrasonik banyo	Everest Ultrasonic
Magnetik karıştırıcı/ısıtıcı	Heidolph MR 3001
Rotary evaporatör	IKA®-Werke RV 05 Basic
Öğütücü mikser	Waring Commercial 8010ES
Buzdolabı	Siemens KD53NNW20N
Derin dondurucu	Vestel CDE-L1203 X A+NF
Santrifüj	Nüve NF 1200
İnverted mikroskop	Carl Zeiss VertA1
Hücre kültürü kabini	ESCO Class II BSC (Air Stream)
Karbondioksit destekli inkübatör	Nüve EC 160
Su banyosu	Nüve NB20
Hücre sayacı	Life Technologies Countess II FL
Mikropleyt okuyucu spektrofotometre	Molecular Devices Versamax
Sıvı azot tankı	International Cryogenics Inc IC35D Storage Dewar
Hücre azot tankı	Thermo Scientific Lacator JR
Buz makinesi	Hoshizaki FM-80EE
Mikroplak çalkalayıcı	İsolab 613.11.001
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Socorex Acura 825
pH metre	Hanna HI2030-02 edge
Vorteks (Karıştırıcı)	Vortex EU-plug Starlab
Otoklav	Tommy SS-325
Refraktometre	Aichose SR0017-ATC

3.1.4. Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler Tablo 4’de sunulmuştur.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Marka
Filtre kağıdı	Sartorius Stedim Grade 391
Spektrofotometre küveti	Biosigma BSA001
Membran filtre (0.22µm)	Sartorius Stedim Minisart
Membran filtre (0.45µm)	İsolab 094.01.003
Steril enjektör	Ayset
Steril 15 mL hacimli falkon tüpler	Corning
Steril 50 mL hacimli falkon tüpler	Corning
Steril 96 kuyucuklu pleytler	Nest Scientific
T-25 hücre kültür flaskları	Corning ve Grainer
T-75 hücre kültür flaskları	Sarsted
Steril 5 mL hacimli serolojik pipetler	CAPP
Steril 10 mL hacimli serolojik pipetler	CAPP
Steril 0.1-1000µL hacimli pipet uçları	Axygen ve Grainer
Steril kriyotüp	İsolab 09111102
Vida kapaklı vial	VWR International 548-008
Parafilm	Parafilm-M PM-996
Çeşitli cam malzemeler	İsolab

3.1.5. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Satın alındığı firma/Kodu
Thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT)	Bio Basic,T0793(DB0362)
Steril dimetil sülfoksit(DMSO)	Sigma Aldrich,D8418
Dimetil sülfoksit(DMSO)	Carlo Erba,445103
Tripan mavisi	Sigma Aldrich,T81154
FITC AnneksinV-PI Kit	BD Biosciences,556547
Trypsin-EDTA(%0.25)	Multicell,325-043-EL
Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)	Multicell Wisent,311-010-CL
Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium(RPMI)	Multicell Wisent,350-005-CL
Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)	Multicell Wisent,319-005-CL
Fetal bovin serum(FBS)	Sigma Aldrich,12103C
Bovine serum albumin(BCS)	Sigma Aldrich,12133C
Penisilin/Streptomisin(Pen/Strep)	Multicell,450-201-EL
Glasiyal asetik asit (CH_3COOH)	Merck,137000
Hidroklorik asit %37 (HCl)	Merck,100317
Metanol (CH_3OH)	Merck,106009
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Symras,3050500
Asetonitril (CH_3CN)	Sigma Aldrich,34851
Asetik asit (CH_3COOH)	Sigma Aldrich,27225
Dietileter ($(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$)	Sigma Aldrich,24004
Etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)	Sigma Aldrich,27227
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Sigma Aldrich,13418
Sodyum hidroksit(NaOH)	Merck,106462
Folin Ciocalteu's fenol reaktifi	Sigma Aldrich,F9252
2,2 Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH')	Sigma Aldrich,D9132
Troloks	Sigma Aldrich,238813
TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin)	Sigma Aldrich,T1253
Sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich,25022
Demir (II) sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck,103965
Demir (III) klorür (FeCl_3)	Carlo Erba,451695
Alüminyum nitrat nonahidrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich,237973
Amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)	Carlo Erba,418777
Kuersetin	Lancaster,6151-25-3
Gallik asit	Sigma Aldrich,G7384
Kafeik asit	Sigma Aldrich,C0625
Protokatekuik asit	Sigma Aldrich,03930590
<i>p</i> -OH Benzoik asit	Sigma Aldrich,240141
Şiringik asit	Sigma Aldrich,S6881
Epikateşin	Sigma Aldrich,E1753
<i>p</i> -Kumarik asit	Sigma Aldrich,C9008
Ferulik asit	Sigma Aldrich,128708
Rutin	Sigma Aldrich,R5143
Mirisetin	Sigma Aldrich,M6760
Resveratrol	Sigma Aldrich,R5010
Daidzein	Sigma Aldrich,D7802
Luteolin	Sigma Aldrich,L9283
<i>trans</i> -Sinnamik asit	Sigma Aldrich,C80857
Hesperetin	Sigma Aldrich,W431300
Chrysin	Sigma Aldrich,C80105
Pinosembrin	Sigma Aldrich,P5239
Kafeik asit fenetil ester(CAPE)	Sigma Aldrich,C8221
Klorojenik asit	Sigma Aldrich,C3878
<i>m</i> -OH Benzoik asit	Sigma Aldrich,36333
Ellajik asit	Sigma Aldrich,E2250
Apigenin	Sigma Aldrich,10798
Ramnetin	Sigma Aldrich,17799
Curcumin	Alfa Aesar,B21573

3.1.6. Çözeltiler ve Hücre Kültür Medyaları

3.1.6.1. Hücre Kültür ve Dondurma Medyaları

MDA-MB-231 hücre serisi kültür medyası: 44.5 mL RPMI 1640 medyası içerisine 5mL FBS ve 0.5mL penisilin-streptomisin eklenerek hazırlandı ve 0.22µm'lik filtreden geçirildi. +4°C'de muhafaza edildi.

MDA-MB-231 hücre serisi dondurma medyası: 34.5 mL RPMI 1640 medyası içerisine 10 mL FBS, 5 mL steril DMSO ve 0.5mL penisilin-streptomisin eklenerek hazırlandı ve 0.22µm'lik filtreden geçirildi.

NIH/3T3 hücre serisi kültür medyası: 44.5 mL DMEM medyası içerisine 5mL BCS ve 0.5mL penisilin-streptomisin eklenerek hazırlandı ve 0.22µm'lik filtreden geçirildi. +4°C'de muhafaza edildi.

NIH/3T3 hücre serisi dondurma medyası: 34.5 mL DMEM medyası içerisine 10 mL BCS, 5mL steril DMSO ve 0.5mL penisilin-streptomisin eklenerek hazırlandı ve 0.22µm'lik filtreden geçirildi.

3.1.6.2. HPLC ile Fenolik Bileşen Analizi Çözeltileri

HPLC ile fenolik bileşen analizinde kullanılan çözeltiler Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. HPLC ile fenolik bileşen analizinde kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	Hazırlanışı
Gallik asit	%50-50 metanol-saf suda 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı, 1.25-2.5-5-10-20 ve 40 ppm olacak şekilde %50-50 metanol-saf su ile seyreltmeleri yapıldı.
Protokatekuik asit	
Klorojenik asit	
<i>m</i> -OH Benzoik asit	
Ellajik asit	
<i>p</i> -OH Benzoik asit	
Kafeik asit	
Şiringik asit	
<i>p</i> -Kumarik asit	
Ferulik asit	
<i>trans</i> -Sinnamik asit	%100 metanolde 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı, 1.25-2.5-5-10-20 ve 40 ppm olacak şekilde % 100 metanol ile seyreltmeleri yapıldı.
Rutin	
Mirisetin	
Apigenin	
Epikateşin	
Resveratrol	
Daidzein	
Luteolin	
Hesperetin	
Chrysin	
Pinosembrin	
Ramnetin	
Curcumin	
Kuersetin	
Kafeik asit fenetil ester (CAPE)	
%2'lik Asetik asit	20 mL glasiyal asetik asit balon jojede ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
%70-30 Asetonitril-Saf Su	700 mL asetonitril balon jojede ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.1.6.3. Toplam Polifenol Madde Miktarı Analizi Çözeltileri

1 mg/mL Gallik Asit Çözeltisi: 5 mg gallik asit tartılıp 5 mL metanolde çözülerek 1mg/mL'lik gallik asit standardı elde edildi. Hazırlanan bu stok çözeltiden metanolde çözülmüş 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 mg/mL'lik gallik asit standartları seri dilüsyon ile oluşturuldu.

%10'luk Na₂CO₃ Çözeltisi: 10 g Na₂CO₃ tartılıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim balon jojede saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.5 N Folin Ciocalteu's Fenol Reaktifi: 10 mL 2 N Folin-Ciocalteu reaktifine 40 mL saf su eklenerek 1:4 oranında seyreltilerek kullanıldı.

3.1.6.4. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analizi Çözeltileri

1 mg/mL Kuersetin Çözeltisi: 10 mg kuersetin tartılıp 10 mL metanolde çözülerek 1mg/mL'lik kuersetin standardı hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden metanolde çözülmüş 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 mg/mL'lik kuersetin standartları seri dilüsyon ile elde edildi.

%10'luk $Al(NO_3)_3$ Çözeltisi: 1 g $Al(NO_3)_3$ tartıldı ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim balon jojede saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.

1 M NH_4CH_3COO Çözeltisi: 7.7 g NH_4CH_3COO tartılıp bir miktar saf suda çözüldü ve ardından son hacim 100 mL'ye balon jojede saf su ile tamamlandı.

3.1.6.5. DPPH' Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini Çözeltileri

0.04 mg/mL DPPH' Çözeltisi: 100 mL'si için; 4 mg DPPH' tartıldı, 90 mL metanolle çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı.

0.02 mg/mL Troloks Çözeltisi: 10 mg troloks tartıldı ve 10 mL metanolde çözülerek stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden 0.02 mg/mL'lik ara stok çözelti metanol ile seyreltilerek elde edildi.

3.1.6.6. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-Frap Tayini Çözeltileri

40 mM HCl Çözeltisi: Yaklaşık 30 mL saf suyun üzerine %37'lik HCl'den 340 µL ilave edildi ve saf suyla son hacim balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM TPTZ Çözeltisi: 156.166 mg TPTZ tartıldı ve 50 mL 40 mM'lık HCl içinde çözüldü.

20 mM $FeCl_3$ Çözeltisi: 324,4 mg $FeCl_3$ tartıldı ve bir miktar saf suyla çözüldükten sonra balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

300 mM Asetat Tamponu (pH:3.6): 0.775 g $NaCH_3COO.3H_2O$ bir miktar saf suda çözüldükten sonra üzerine 4 mL glasiyal asetik asit ilave edildi. Son hacim saf suyla 250 mL'ye tamamlandı.

FRAP Reaktifi: 300 mM pH:3.6 asetat tamponu: 10 mM TPTZ: 20 mM $FeCl_3$ (10:1:1) oranında karıştırılarak taze olarak hazırlandı.

1000 μ M $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ Çözeltisi: 27.8 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ tartılıp son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu stok çözeltinin 500, 250, 125, 62.5 ve 31.25 μ M'lık konsantrasyonları saf su ile seyreltilerek oluşturuldu.

3.2. Yöntem

3.2.1. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

-20°C'de muhafaza edilen propolis örnekleri öğütücü mikserde parçalanarak toz hale getirildi. Her propolis örneğinden 3.5 g tartılıp üzerine % 70'lik etanol eklenerek 48 saat oda sıcaklığında 200-225 rpm'de çalkalandı. 48 saat sonunda karışımlar önce adi süzgeç kağıdından ardından mavi bant süzgeç kağıdından süzüldü ve son hacimleri %70'lik etanol ile 30 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan ekstraktlar analizlerde kullanılmak üzere +4°C'de saklandı (32, 97).

3.2.2. Briks Değeri Tayini

Hazırlanan propolis ekstraktlarının % çözünen katı miktarını tayin edebilmek için refraktometre cihazı kullanıldı. Refraktometre, ışığın bir ortamdan diğer ortama geçerken yoğunluk farkından dolayı kırınımına uğraması ile kırılma indisini ölçen cihazdır. % çözünür kuru madde miktarını bulmak için cihaz temizlendi, her bir propolis numunesinin ekstraktından 2-3 damla okuma yapılacak alana damlatıldı ve gözlemlenen değer kaydedildi (98).

3.2.3. Elektriksel İletkenlik-pH Değeri Analizi

Hazırlanan propolis ekstraktlarının pH ve elektriksel iletkenlik değerleri, kalibrasyonu yapılmış iletkenlik probu da bulunan pH metre cihazı ile ölçüldü. İletkenlik değerleri μ S/cm olarak ifade edildi (99).

3.2.4. % Balsam Miktarı Tayini

% Balsam miktarı tayini için sabit tartıma gelen boş balon tartıldı ardından hazırlanan %70'lik etanolik propolis ekstraktından 2 mL içerisine konuldu ve evaporate edildi. Evaporasyon sonrası sabit tartıma gelen dolu balon tekrar tartıldı. Her örnek için üç tekrar yapılarak dolu ve boş balon arasındaki farktan yararlanılarak % balsam değeri hesaplandı (44).

3.2.5. % Vaks Miktarı Tayini

% Vaks miktarı tayini için öğütölüp toz hale getirilmiş propolis örneklerinden 3 g falkona tartılıp üzerine 15 mL mutlak metanol eklendi ve 2 saat 200-225 rpm’de çalkalandı. Ardından falkondaki bu karışımlar 24 saat -20°C’de bekletilmek üzere derin dondurucuya bırakıldı. Süre sonunda falkonun üst kısmındaki çözelti dekante edilip alınarak tartımı alınmış süzgeç kağıdından süzölldü. Süzgeç kağıdında kalan vaks miktarı tartıldı ve her örnek için üç tekrar yapılarak süzgeç kağıdının son tartımı ile ilk tartımı arasındaki fark alındı. % Vaks miktarı ‘Eşitlik 1’ kullanılarak hesaplandı (100).

$$\% \text{ Vaks} = \frac{\text{Son Tartım} - \text{İlk Tartım}}{\text{Propolis Miktarı (3 g)}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

3.2.6. Toplam Polifenol Madde Miktarı Analizi

Toplam fenolik madde miktarı tayininin esası fenolik bileşiklerin bazik ortamda oksitleyici bir bileşik olan Folin-Ciocalteu ayracını indirgeyip kendilerinin yükseltgenmiş forma dönüştüğü redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda indirgenmiş ayracın oluşturduğu mor-mavi rengin 760 nm’de absorbandsının ölçölmesiyle örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarı hesaplanır. Standart grafiğın hazırlanmasında, gallik asidin farklı konsantrasyonları (1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125 ve 0.015625 mg/mL) kullanıldı. Konsantrasyona karşılık bulunan absorbands değeri ile grafik çizilip çizilen grafiğre göre gallik asit eşdeğeri olarak toplam polifenol madde miktarı bulundu (101, 102).

Toplam polifenol madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmadaki pipetleme işleme Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Toplam polifenol madde miktarı analizinde yapılan pipetleme işleme

	Kör	Standart	Numune
Distile su	700 µL	680 µL	680µL
Standart (Gallik asit)	-	20 µL	-
Numune	-	-	20 µL
0,5 N Folin Ciocalteu Reaktifi	400 µL	400 µL	400 µL
Tüpler vorteks ile karıştırılır			
%10 Na ₂ CO ₃	400 µL	400 µL	400 µL
760 nm’de köre karşı absorbands okunur.			

3.2.7. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analizi

Toplam flavonoid madde miktarı analizi Fukumoto ve Mazza 'ya göre yapıldı. Standart grafiğin hazırlanmasında kuersetinin farklı konsantrasyonları (1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125 ve 0.015625 mg/mL) kullanıldı. Konsantrasyona karşı bulunan 415nm'deki absorbans değerleri ile grafik çizilip çizilen grafiğe göre kuersetin eşdeğeri flavonoid madde miktarı bulundu (103).

Toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmadaki pipetleme işleme Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo 8. Toplam flavonoid madde miktarı analizinde yapılan pipetleme işlemi

	Kör	Renk Körü	Standart	Numune
Numune	-	250µL	-	250µL
Standart (Kuersetin)	-	-	250µL	-
Mutlak Metanol	2.4 mL	2.25mL	2.15mL	2.15mL
%10'luk Al(NO ₃) ₃	50µL	-	50µL	50µL
1 M NH ₄ CH ₃ COO	50µL	-	50µL	50µL
40 dk oda sıcaklığında inkübe edilir ve 415 nm'de absorbans okunur.				

3.2.8. DPPH' Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

Radikal temizleme aktivitesi tayini, mor menekşe renkli ticari DPPH' (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin antioksidan madde varlığında 517 nm'deki maksimum absorbansında oluşan azalma ile tespit edildi. Deneyde standart olarak troloks kullanılırken DPPH' radikalinin de 0.04mg/mL'lik çözeltisi kullanıldı. Eşit miktarda DPPH' çözeltisi ve numune çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dakika bekletildi ve absorbanslar ölçüldü. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC₅₀ değerleri hesaplandı (104). SC₅₀ değeri DPPH' radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonunu ifade eder. Her numune için altı farklı konsantrasyonda çalışılarak SC₅₀ değerleri mg/mL cinsinden ifade edildi.

3.2.9. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-Frap Tayini

FRAP metodu (Fe(III)-TPTZ-2,4,6-tris(2-pyridily)-S-triazin) kompleksindeki demir (III) iyonunun antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks olan Fe(II)-

TPTZ oluşturmasına dayanır. Oluşan bu kompleks 593 nm’de maksimum absorbands verir (105). Standart grafiğin hazırlanmasında $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ’un farklı konsantrasyonları (31.25; 62.5; 125; 250; 500; 1000 μM) kullanıldı. Sonuçlar $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ eşdeğeri antioksidan g olarak ifade edildi. Çalışmada kullanılan pipetleme işlemi Tablo 9’daki gibidir.

Tablo 9. FRAP tayininde yapılan pipetleme işlemi

	Kr	Standart	Numune
FRAP Reaktifi	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Standart ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	-	50 μL	-
Numune	-	-	50 μL
Saf Su	50 μL	-	-
4. dakikada 593 nm’de absorbands okunur.			

3.2.10. HPLC ile Fenolik Bileşen Analizi

3.2.10.1. Numunelerin HPLC-UV Analizine Hazırlanması

Bölüm 3.2.1.’de hazırlanan %70’lik propolis ekstraktlarının her birinden 15’er mL bir balona alındı. Balon içerikleri 40-50°C’deki rotary evaporatörde uzaklaştırıldı. Balonlardaki kalıntılara pH:2 olan saf sudan 10 mL koyuldu ve ultrasonik banyo yardımıyla kalıntılar çözüldü. Ardından her balon önce üç kez 5 mL dietil eter ile sonra üç kez 5 mL etil asetat ile ekstrakte edildi. Eksraktsiyon sonucu alınan st fazlar bir balona toplandı ve rotary evaporatörde uçuruldu. Kalan kısım 2 mL metanolde zlp 0.45 μm ’lik filtreden geçirilerek cihaza verildi (106).

3.2.10.2. HPLC-UV Koşulları

HPLC-UV analizi 280-315 nm dalga boyunda UV-VIS dedektör ile donanımlı HPLC sisteminde yapıldı. Analizler ters faz C_{18} kolonu (150 mm x4.6 mm, 5 μm ; Fortis) kullanılarak ve asetonitril, su, asetik asitten oluşan gradient program uygulanarak gerçekleştirildi (107). A rezervuarında % 2 asetik asit (saf suda) ve B rezervuarında % 70-30 asetonitril-saf su bulunan Tablo 10’da verilen gradient program kullanıldı. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 20 μL ’ ye, mobil faz akış hızı 0.75 mL. dk⁻¹’ ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 C’ ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı (106).

Tablo 10. HPLC-UV gradient programı

Zaman(dk)	A Rezervuarı	B Rezervuarı
	% 2 asetik asit (ultra saf suda)	% 70-30 asetonitril-ultra saf su
1.00	95.00	5.00
3.00	95.00	5.00
8.00	85.00	15.00
10.00	80.00	20.00
12.00	75.00	25.00
20.00	60.00	40.00
30.00	20.00	80.00
35.00	95.00	5.00
50.00	95.00	5.00

3.2.10.3. Standart ve Kalibrasyon

Standartlardan; gallik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, şiringik asit, epikateşin, *m*-OH benzoik asit, ellajik asit, *t*-sinnamik asit, hesperetin, chrysin, pinosembrin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) 280 nm’de, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, mirisetin, resveratrol, daidzein, klorojenik asit, kuersetin, apigenin, ramnetin, curcumin, ve luteolin ise 315 nm’de analiz edildi.

Standart çözeltilerden, gallik asit, protokatekuik asit, klorojenik asit, ellajik asit, *p*-OH benzoik asit, *m*-OH benzoik asit, kafeik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asidin %50-50 metanol-saf suda hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltilerinden 1.25-2.5-5-10-20 ve 40 ppm’lik ara stok çözeltileri oluşturularak kalibrasyon eğrileri hazırlandı. Rutin, mirisetin, curcumin, kuersetin, ramnetin, apigenin, epikateşin, resveratrol, daidzein, luteolin, hesperetin, chrysin, *trans*-Sinnamik asit, pinosembrin ve kafeik asit fenetil esterin (CAPE) ise %100 metanolde hazırlanan 1000 ppm’lik stok çözeltilerinden oluşturulan 1.25-2.5-5-10-20 ve 40 ppm’lik ara stok çözeltileri ile kalibrasyon eğrileri hazırlandı.

3.2.11. Hücrelerin Kültüre Edilmesi, Pasajlanması ve Saklanması

Hücre kültürü çalışmaları KTÜ Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Anabilim Dalı ve KTÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarlarında steril ortamda gerçekleştirildi. Tüm çalışmalar öncesinde ve sonrasında hücre kültürü kabini 15 dk UV ışık altında steril edildi.

Ayrıca çalışmalar sırasında kullanılan tüm malzemeler %70 etanol ile dezenfekte edilerek kabine alınıp kullanıldı.

Hücrelerin kültürü için daha önceden üretici firmadan alınan metastatik meme kanseri (MDA-MB-231) ve negatif kontrol olarak kullanılan fare embriyonik fibroblast (NIH/3T3) hücre serilerine ait kriyotüpteki hücreler azot tankından çıkarıldı. Donmuş halde bulunan kriyotüpteki hücreler 37°C'deki su banyosunda 1-2 dk tutularak çözündürüldü. Çözünüp falkona alınan MDA-MB-231 hücre serisi üzerine %10 FBS (Fetal Bovin Serum) ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 kültür medyasından 3 mL eklenirken, çözünüp falkona alınan NIH/3T3 hücre serisine ise %10 BCS (Bovine serum albumin) ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM kültür medyasından 3 mL eklendi. Falkonlar 125g'de 6 dk santrifüjlendi. Santrifüj ardından falkonlardaki süpernatantlar atıldı ve kalan hücre pelletleri 1mL her hücrenin kendi taze kültür medyasında hafif pipetaj ile süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon haline getirilen hücrelerin üzerine kendi medyalarından 10 mL eklenerek hücreler T-75 flasklara alındı ve 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde çoğaltıldı.

Hücreler her gün kontrol edilerek flask içindeki yoğunlukları mikroskopik olarak gözlemlendi. Çoğalan hücrelerin flask yoğunlukları %70-80'e ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Pasajlama işleminde, flasklardaki medya uzaklaştırıldı ve flasklar iki kez 5mL PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra hücreleri kaldırmak için her bir flaska 2 mL Trypsin-EDTA çözeltisi eklendi ve 3 dk 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda hücrelerin kalkıp kalkmadığı invert mikroskop ile kontrol edildi ve flask yüzeyinden ayrıldığı görülen hücrelere tripsinizasyonu durdurmak için her hücrenin kendi kültür medyasından 5 mL eklendi. Ardından flastaki hücreler toplanarak 15mL'lik falkonlara aktarıldı ve falkonlar 125g'de 6 dk santrifüjlendi. Santrifüj ardından falkonlardaki süpernatantlar atıldı ve kalan pelletler 2 mL her hücrenin kendi kültür medyasında hafif pipetaj ile süspansiyon haline getirildi. Hücre sayımı için süspansiyon haline gelmiş hücrelerden ependorfa 10µL alınıp üzerine 10µL tripan mavisi eklenerek karıştırıldı ve bu karışım pipetajlanarak hücre sayacı lamına aktarıldı. Hücre sayacı cihazından alınan hücre sayısına göre hücreler gerekli sayıdaki T-75 flasklara kendi kültür medyalarından 10 mL eklenerek bölündü ve 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde çoğaltılmaya devam edildi.

Çoğaltılan tüm hücreler tez boyunca bütün deneylerde ve tekrarlarında kullanılmak üzere donduruldu. Dondurma işleminde, etüvden alınan flasklardaki hücrelerin medyaları uzaklaştırıldı ve flasklar iki defa 5 mL PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra

flasklardaki hücreleri kaldırmak için her flaska 2 mL Tripsin-EDTA eklendi ve 3 dk 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ardından hücrelerin kalkıp kalkmadığı invert mikroskop ile kontrol edildi ve tripsinizasyonu durdurmak için her flaska hücrelerin kendi kültür medyalarından 5 mL eklendi. Daha sonra flasklardan toplanan hücreler 15 mL'lik falkonlara alındı ve hücreler 125g'de 6 dk santrifüjlendi. Santrifüj ardından süpernatantlar atıldı ve peletler 1 mL her hücrenin kendi kültür medyasında süspanse hale getirildi. Süspanse hale gelen hücrelerden 10 µL alınıp üzerine 10 µL tripan mavisi eklenerek sayım yapıldı. Sayım sonrasında her deneyde ve tekrarında kullanılacak olan hücre sayısı göz önüne alınarak hücreler istenen sayıda kriyotüplere bölündü. Bu işlemde MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücre serileri için Bölüm 3.1.6.1'de belirtildiği gibi dondurma medyası hazırlandı ve karanlık ortamda buzda bekletildi. Sayım sonrası süspanse haldeki hücrelere kendi dondurma medyalarından eklenerek hücreler kriyotüplere alındı. Kriyotüpler 24 saat -80°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına yerleştirildi.

3.2.12. Hücrelerin İkilenme Zamanının (Doubling Time) Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücrelerinin sayılarını iki katına çıkardıkları sürenin tespit edilmesi; hücrelerin büyüme eğrilerinin belirlenmesi, muamele sonrası hücrelerin kültürde ne kadar kalması gerektiği ve çalışılması gereken uygun hücre sayısının belirlenmesi açısından önemlidir.

Kullanılan MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücre hatlarının ikilenme süresi belirlenirken; her hücre hattından 1×10^6 hücre alınarak 24, 48 ve 72 saat bırakılmak üzere üç tane T75 flasklara ekildi. Hücrelerin flaska ekildiği an 0. saat ve 1×10^6 hücre olarak kabul edildi. 24. saatin sonunda flaskdaki hücreler Tripsin-EDTA ile tripsinize edildi ve tripan mavisi ile sayım yapıldı. Aynı işlem 48. ve 72. saat için her iki hücre hattına gerçekleştirildi. Bu işlemler sonucu her iki hücre hattı için 0, 24, 48 ve 72. saat sonucu sayılan hücre sayıları kullanılarak büyüme eğrisi çizildi ve ikilenme zamanı tespit edildi (108).

3.2.13. MTT Yöntemi ile Sitotoksikite Analizi

Bir doğal bileşiğin kemoterapötik açıdan etkili olduğunun belirlenmesinde kanserli hücrelerde gösterdiği sitotoksik etkiyi normal ve sağlıklı hücrelerde göstermemesi önemlidir (109). Bu yüzden propolis ekstraktının MDA-MB-231 kanser hücre serisi

üzerindeki olası sitotoksik etkisinin seçici olduğunun belirlenmesi için analiz sağlıklı fibroblast (NIH/3T3) hücre serisi üzerinde de gerçekleştirildi.

Propolisin MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde tetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT, canlı hücrelerin mitokondriyal enzimleriyle indirgenerek mor renkli formazan adlı yapıya dönüşür. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeyemezler ve dolayısıyla herhangi bir renk değişimine neden olmazlar. Oluşan ve suda çözülmeyen formazan kristalinin DMSO ile çözündürülmesiyle ortaya çıkan renk yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantılı olup 570 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür (95, 96, 110).

MTT analizi, hazırlanan etanolik propolis ekstraktlarına yapılan antioksidan analizler sonucu diğerlerine göre daha yüksek antioksidan etki gösteren Ordu (Ulubey) iline ait propolis ile yapıldı. Etanolik Ordu propolis ekstraktının çözücüsü evaporate edilip DMSO’da çözüldü. Hazırlanan stok çözeltiden belirtilen propolis konsantrasyonları her hücrenin kendi kültür medyasında seyreltilerek kullanıldı. MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücre serilerinin sitotoksikite analizinde MTT yöntemi (70, 96, 110) modifiye edilerek aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

- T-75 flaklarda çoğaltılan MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücreleri tripsinizasyon ile kaldırıldı ve sayıldı. Sayımdan sonra 96 kuyucuklu steril hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 5000 hücre düşecek şekilde 100 µL her hücrenin kendi kültür medyasında ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- 24 saat sonra pleytler inkübatörden alındı ve içerikleri uzaklaştırıldı. Her hücrenin kendi kültür medyasında hazırlanan ve son konsantrasyonu 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µg/mL olan propolis ekstraktından kuyucuklara 100’er µL eklendi. Sonrasında pleytler 72 saat 37°C’de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. Her bir hücre serisi için kullanılan tüm konsantrasyonlar altı kuyucuk olacak şekilde yapıldı.
- Süre sonunda karanlık ortamda steril hücre kültür pleytlerinin her kuyucuğuna 5 mg/mL’lik MTT çözeltisinden 10µL eklendi ve 3.5 saat daha 37°C’de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.

5 mg/mL MTT (Thiazoyl blue tetrazolium bromide) Çözeltisi: 60 mg MTT boyası tartıldı ve 12 mL steril distile suda tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi.

Tamamen çözüldükten sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirilip 1'er mL halinde alikotlanarak deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

- İnkübasyon sonunda pleytlerdeki tüm içerikler uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 100'er µL DMSO ilave edilip pleytler ışık görmemesi için alüminyum folyoya sarılarak 45 dk boyunca oluşan formazan kristallerinin çözünmesi amacıyla çalkalayıcıda bekletildi.
- Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerinin tamamen çözünüp çözünmediği invert mikroskop ile kontrol edildi. Her kuyucukta oluşan mor rengin absorbansı 570 nm'de mikropleyt okuyucu spektrofotometre ile ölçüldü. MTT sitotoksitesite deneyi her hücre serisi için üç kere tekrar edildi.
- Her konsantrasyon için elde edilen absorbans değeri, herhangi bir işlem görmeyen kontrol absorbans değerine oranlandı ve 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı hesaplandı. Elde edilen % hücre canlılığı değerlerinin logaritmik konsantrasyona karşı grafiğinin çizilmesiyle MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücre serilerinde kullanılan propolis ekstraktının IC₅₀ değerleri hesaplandı.

IC₅₀ (yarı inhibitör konsantrasyonu); potansiyel olarak ilaç olabilecek bir maddenin kanser hücresi üzerindeki etkilerinin negatif kontrol grubu ile kıyaslanması sonucu absorbans değerinde %50 azalmaya sebep olan konsantrasyonudur (70, 86).

- Propolis ekstraktının iki hücre serisi üzerindeki IC₅₀ değerleri bulunduğundan sonra aşağıdaki eşitlik yardımıyla kullanılan maddenin kanser hücresini normal hücreden ne kadar daha fazla etkileyebildiğini gösteren seçicilik indeksi (SI) değeri hesaplandı (110).

$$\text{Seçicilik İndeksi (SI)} = \frac{\text{Sağlıklı Hücre IC}_{50} (\text{NIH/3T3})}{\text{Kanser Hücresi IC}_{50} (\text{MDA - MB - 231})} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

3.2.14. Anneksin V-PI Analizi

Propolisin, MDA-MB-231 meme kanseri ve NIH/3T3 sağlıklı fibroblast hücreleri üzerindeki hücre ölümüne (apoptoz ve/veya nekroz) olan etkisini tespit etmek için ticari bir kit olan FITC Anneksin V-PI kiti kullanıldı. Kit içeriğinde, apoptoza uğrayan hücreleri tespit etmek için floresans özellik gösteren madde olan FITC (floreskein izotiyosiyanat) ile

işaretlenmiş anneksin V boyası ve nekroza uğrayan hücreleri tespit etmek için kullanılan propidyum iyodür (PI) boyası olmak üzere iki boya bulunmaktadır.

Programlanmış bir hücre ölümü olan apoptoz sürecinde hücrenin kromatini ve sitoplazmasında yoğunlaşma, hücrede küçülme ve nükleer parçalanma gibi morfolojik değişiklikler oluşur. Apoptoza uğrayan hücrelerde membran bütünlüğü son aşamaya kadar korunur. Apoptoz başladığında hücre membranının iç kısmında bulunan fosfatidilserin (PS) yer değiştirerek dış kısma geçer. Annexin V, fosfatidilserin kalıntıları ile güçlü ve spesifik bir şekilde etkileşime giren proteindir. Bu yüzden FITC (floreskein izotiyosiyanat) gibi floresan özellik gösteren boyalar ile konjuge edilerek yapılan ışımadan apoptoz seviyesinin belirlenmesinde kullanılır. Ancak Annexin V aynı zamanda membran bütünlüğü bozulmuş fakat apoptoza uğramamış hücrelere de girerek ışımaya yapabilmektedir. Bunu engellemek ve apoptotik hücreleri nekrotik hücrelerden ayırmak için ise ikinci bir boya olan propidyum iyodür (PI) kullanılır (70, 86, 89). Yapılan boyama akış sitometresi, floresans mikroskopu ve otomatik hücre sayacı gibi lazer ışını kullanan cihazlar ile tespit edilir (111).

Anneksin V-PI analizi için, MTT analiz sonuçları değerlendirilerek kullanılan Ordu (Ulubey) propolis ekstrakt konsantrasyonları 0, 9, 18, 36 ve 54 µg/mL olarak belirlendi ve aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

- Deneylerde kullanılmak üzere sıvı azot tankında stoklanan MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücreleri açılarak T75 flasklara ekildi ve 24 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.
- T75 flasklara ekilen hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı ve tripan mavisi ile boyanıp otomatik hücre sayacında sayıldı. Her konsantrasyon için ayrı ayrı T25 flasklara birer milyon hücre ekildi ve 24 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.
- 24 saat sonra flasklar inkübatörden alındı, içerikleri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. DMSO'da çözünmüş Ordu propolis ekstraktından her hücrenin kendi kültür medyasında hazırlanan ve son konsantrasyonu 54, 36, 18, 9 µg/mL olan dozlar flasklara eklendi. Aynı zamanda negatif kontrol için propolis ekstraktı içermeyen kültür medyası (0 µg/mL) belirtilen T25 flaska eklendi. Flasklar 72 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.
- Süre sonunda 54, 36, 18, 9 ve 0 µg/mL konsantrasyonlarına ait T25 flasklar inkübatörden alındı, içerikleri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Her

konsantrasyona ait T25 flasklardaki hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak ayrı falkonlara toplandı ve santrifüj yapıldı.

- Santrifüj ardından süpernatant atıldı ve pelet soğuk PBS ile süspanse edilip tekrar santrifüjlendi. Bu yıkama işlemi 2 kez tekrar edildi ve hücreler sayıldı.
- Ardından kit içerisinde bulunan 10X bağlayıcı tampon ddH₂O ile 1X'e seyreltilip falkonlara eklenerek pelet hücreler süspanse hale getirildi. Kullanılan kitin protokolünde bir milyon hücre için 1 mL 1X bağlayıcı tampon kullanılması gerektiği belirtildiği için hücreler sayılarak sayıma uygun miktarda 1X bağlayıcı tampon falkonlara eklenerek hücreler süspanse edildi.
- Falkonlardan 100 bin hücre için 100'er µL alınarak kapaklı 1.5 mL'lik tüplere konuldu. Karanlık ortamda FITC Anneksin V ve PI solüsyonlarından 5'er µL tüplere eklendi ve tüpler hafifçe karıştırıldı. Ardından karanlık ortamda oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonunda her bir tüpe 400'er µL 1X bağlayıcı tampon ilave edildi ve otomatik hücre sayacı cihazında analiz gerçekleştirildi.
- Hem MDA-MB-231 hem de NIH/3T3 hücre hattı için anneksin V-PI analizi üç kez tekrar edildi.

4. BULGULAR

4.1. Briks Değeri Tayini Sonuçları

Hazırlanan etanolik propolis ekstraktlarının refraktometre ile ölçülen % çözünen katı miktarı değerlerinin 23 ile 26 arasında değiştiği, en düşük değerin Trabzon ve Sinop illerine en yüksek değerin ise Ordu iline ait propoliste olduğu tespit edildi (Tablo 11).

4.2. Elektriksel İletkenlik-pH Değeri Analiz Sonuçları

Hazırlanan propolis ekstraktlarının pH ölçümleri sonucu pH değerlerinin 4.81 ile 5.28 aralığında değiştiği, en düşük değerin Gümüşhane iline ve en yüksek değerin Trabzon iline ait olduğu belirlendi. Yapılan elektriksel iletkenlik ölçümleri sonucu ise değerlerin 49.43 ile 93.53 aralığında değiştiği, en düşük değerin Artvin iline ve en yüksek değerin Ordu iline ait olduğu bulundu (Tablo 11).

Tablo 11. Propolis numunelerinin pH, iletkenlik ve briks verileri

Numune	pH	İletkenlik (s/cm)	Briks
Artvin (Borçka)	4.98±0.01	49.43±0.64	23.75
Sinop (Erfelek)	5.14±0.01	60.47±0.49	23.00
Rize (İkizdere)	4.98±0.02	57.43±1.42	25.00
Trabzon (Araklı)	5.28±0.03	54.17±0.35	23.00
Ordu (Ulubey)	5.16±0.01	93.53±0.38	26.00
Gümüşhane (Kelkit)	4.81±0.02	56.45±0.31	23.50
Bayburt (Demirözü)	5.03±0.03	59.62±0.21	24.00
Ortalama	5.05±0.02	61.59±0.54	24.04

4.3. % Balsam Miktarı Tayini Sonuçları

Etanolik ekstrakt içinde çözünen madde miktarını ifade eden balsam miktarı (44) tayini sonucu tespit edilen değerlerin 32.71 ile 67.04 arasında değiştiği, en düşük değerin Trabzon iline en yüksek değerin ise Ordu iline ait propoliste olduğu belirlendi (Tablo 12).

4.4. % Vaks Miktarı Tayini Sonuçları

Propolis numunelerinin % Vaks miktarları Bölüm 3.2.5'te verilen (Eşitlik 1) kullanılarak hesaplandı. Hesaplanan değerlerin 2.40 ile 13.91 arasında değiştiği, en düşük

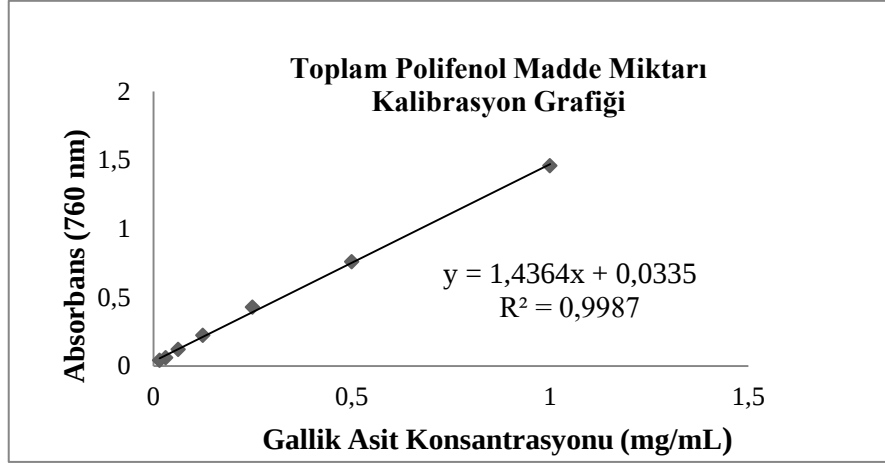
değerin Trabzon iline ve en yüksek değer Ordu iline ait propoliste olduğu tespit edildi (Tablo 12).

Tablo 12. Propolis numunelerinin % balsam ve % vaks verileri

Numune	%Balsam	%Vaks
Artvin (Borçka)	51.41±0.57	10.54±0.68
Sinop (Erfelek)	46.02±0.42	8.98±0.53
Rize (İkizdere)	62.78±0.43	3.83±0.13
Trabzon (Araklı)	32.71±0.62	2.40±0.05
Ordu (Ulubey)	67.04±1.30	13.91±0.91
Gümüşhane (Kelkit)	50.63±0.34	2.96±0.07
Bayburt (Demirözü)	52.58±0.29	8.54±0.41
Ortalama	51.88±0.57	7.31±0.40

4.5. Toplam Polifenol Madde Miktarı Analizi Sonuçları

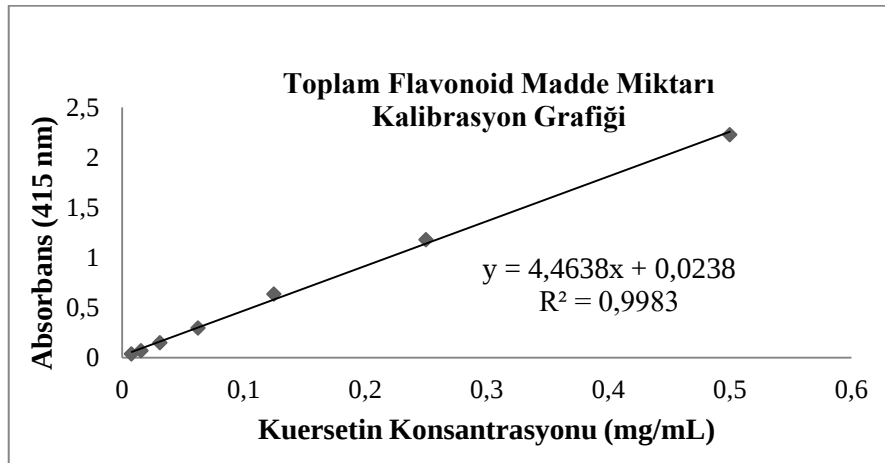
Hazırlanan propolis ekstraktlarına gerekli seyreltmeler yapılarak toplam polifenol madde miktarı Bölüm 3.2.6’da belirtildiği gibi gallik asit standardına göre tayin edildi. Farklı derişimlerde hazırlanan gallik asit standardının 760 nm’deki absorbands değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde standart çalışma grafiğı hazırlandı. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbands konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi $y = 1.4364x + 0.0335$ olarak tespit edildi (Şekil 4). Hazırlanan standart çalışma grafiğı kullanılarak 1g propolisin içerdiği mg cinsinden toplam polifenol madde miktarı belirlendi. Propolislerin toplam polifenol madde miktarları Tablo 13’deki gibidir. Propolislerdeki toplam polifenol madde miktarı 91.86-196.40 mg GAE/g arasında değışim göstermektedir. Sonuçlara göre en yüksek değıer Ordu iline ait propoliste en düşük değıer ise Gümüşhane iline ait propoliste tespit edildi.



Şekil 4. Toplam polifenol madde miktarı kalibrasyon grafiği

4.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Analizi Sonuçları

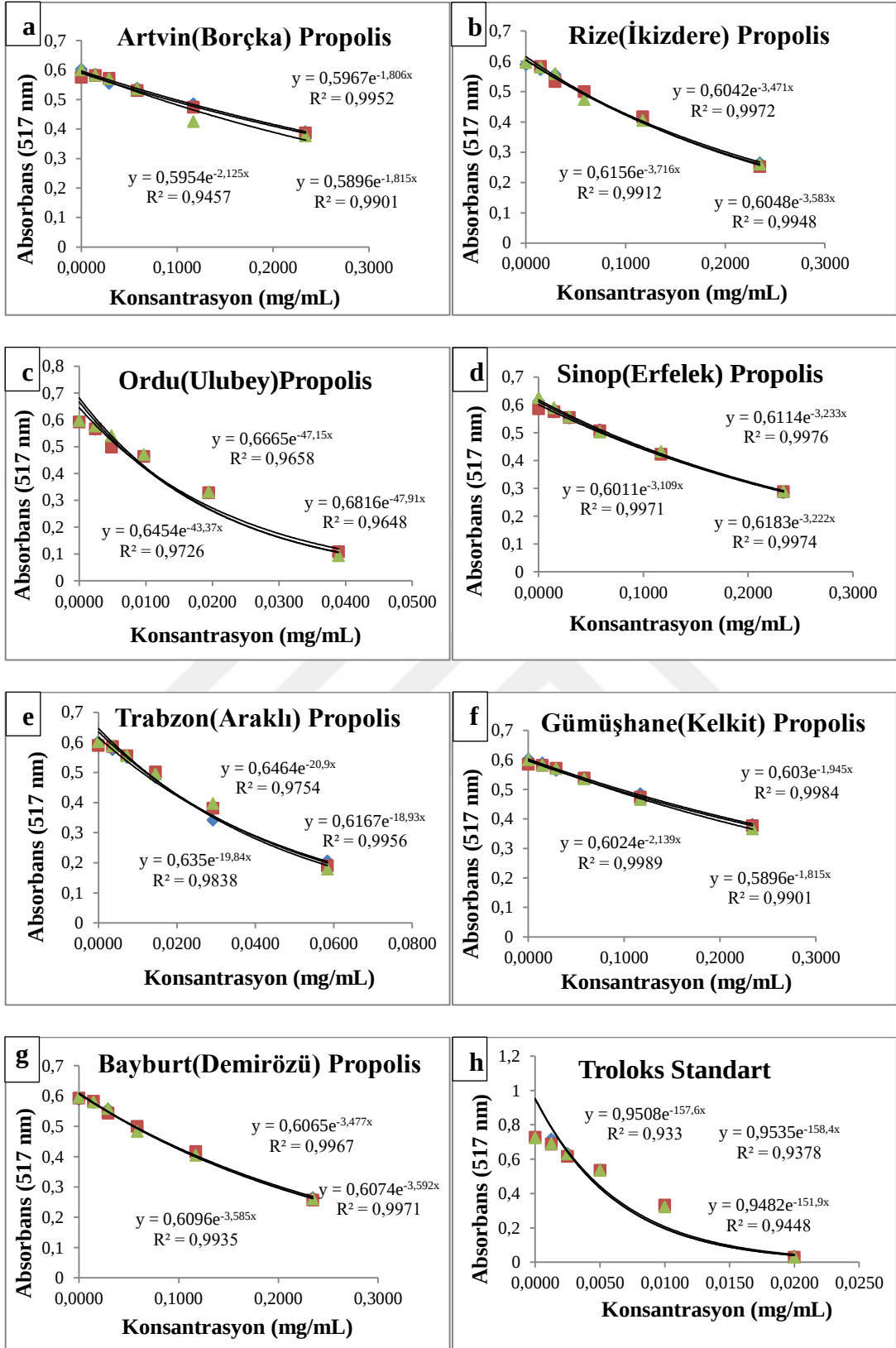
Hazırlanan propolis ekstraktlarına gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra toplam flavonoid madde miktarı Bölüm 3.2.7’de belirtilen şekilde kuersetin standardına göre tayin edildi. Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart kuersetin çözeltilerinin 415 nm’deki absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri x-ekseninde olacak şekilde bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen doğru denklemi $y = 4,4638x + 0,0238$ olarak tespit edilip (Şekil 5), bu denklemden faydalanılarak 1 g propolisin içerdiği mg cinsinden toplam flavonoid madde miktarı belirlendi. Propolislerdeki toplam flavonoid madde miktarının 47.55-68.74mg QE/g arasında değişim gösterdiği, en düşük değer Gümüşhane iline ait propoliste ve en yüksek değer ise Ordu iline ait propoliste olduğu tespit edildi (Tablo 13).



Şekil 5. Toplam flavonoid madde miktarı kalibrasyon grafiği

4.7. DPPH[•] Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini Sonuçları

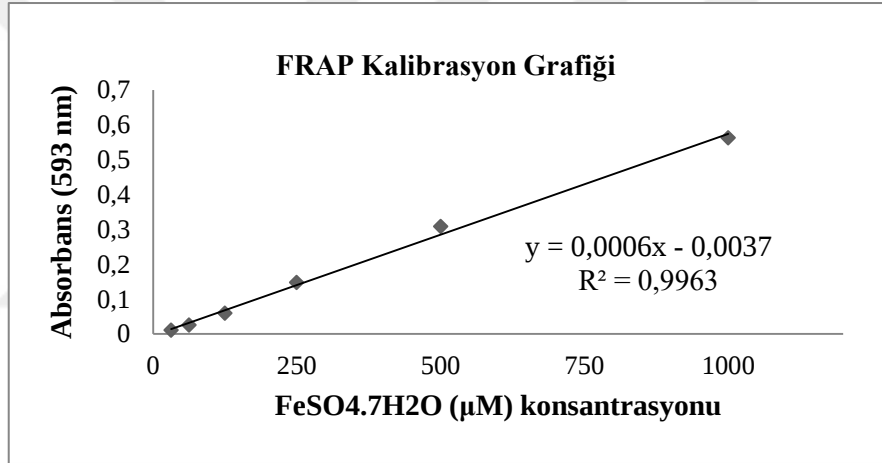
DPPH[•] radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), temizleme aktivitesi tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bölüm 3.2.8’de belirtildiği gibi yapılan analizde, x-ekseninde artan numune konsantrasyonuna karşı y-ekseninde azalan absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve bu grafikten yararlanılarak maksimum absorbansın yarısına denk gelen numune konsantrasyonu SC₅₀ değeri olarak ifade edildi (Şekil 6). DPPH[•] radikali temizleme aktivitesi tayininde küçük SC₅₀ değeri yüksek radikal temizleme kapasitesini göstermektedir. Propolislerin SC₅₀ değerlerinin 0.36-0.01 mg/mL arasında değişim gösterdiği hesaplandı (Tablo 13). Sonuçlara göre en yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip propolis numunesi Ordu iline aitken en düşük radikal temizleme aktivitesine sahip propolisin Gümüşhane iline ait olduğu belirlendi.



Şekil 6. Propolis numunelerinin DPPH•-SC₅₀ grafikleri. **a)** Artvin (Borçka) Propolis, **b)** Rize (İkizdere) Propolis, **c)** Ordu (Ulubey) Propolis, **d)** Sinop (Erfelek) Propolis, **e)** Trabzon (Araklı) Propolis, **f)** Gümüşhane (Kelkit) Propolis, **g)** Bayburt (Demirözü) Propolis, **h)** Troloks Standart

4.8. Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç-Frap Tayini Sonuçları

FRAP yönteminin esası, asidik ortamda antioksidan içeren bir örneğin eklenmesi sonucu, ferrik-tripiridiltriazin kompleksinin (Fe^{+3} -TPTZ), mavi renkli ve 593 nm’de maksimum absorbans veren ferröz kompleksine (Fe^{+2} -TPTZ) indirgenmesine dayanmaktadır. Bölüm 3.2.9’da belirtildiği gibi yapılan analizde değişen konsantrasyonlarda $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak standart çalışma grafiği hazırlandı (Şekil 7). Sonuçlar hazırlanan grafikten yararlanılarak 1g propolisin içerdiği $\mu\text{molFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edildi (Tablo 13). Propolisler için FRAP değerinin 430.24-2242.28 $\mu\text{molFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ arasında değiştiği, en düşük değer Gümüşhane iline ait propoliste en yüksek değer ise Ordu iline ait propoliste olduğu belirlendi.



Şekil 7. FRAP kalibrasyon grafiği

Tablo 13. Propolis numunelerinin toplam polifenol, toplam flavonoid, DPPH[•] ve FRAP verileri

Numune	Toplam Polifenol (mgGAE/g)	Toplam Flavonoid (mg QE/g)	FRAP ($\mu\text{molFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$)	DPPH [•] SC ₅₀ (mg/mL)
Artvin (Borçka)	93.19±2.19	49.95±1.14	446.57±6.02	0.35±0.02
Sinop (Erfelek)	117.45±2.38	55.45±1.09	602.31±4.01	0.07±0.01
Rize (İkizdere)	100.67±2.27	51.06±1.01	515.69±4.00	0.18±0.01
Trabzon (Araklı)	123.06±2.08	56.14±1.17	2205.83±16.89	0.03±0.00
Ordu (Ulubey)	196.40±3.29	68.74±1.35	2242.28±23.10	0.01±0.00
Gümüşhane (Kelkit)	91.86±2.59	47.55±1.42	430.24±4.68	0.36±0.02
Bayburt (Demirözü)	95.27±2.68	50.11±1.36	497.28±5.37	0.19±0.01
				Std.Troloks 0.0044±0.00
Ortalama	116.84±2.50	54.14±1.22	991.46±9.15	0.17±0.01

4.9. HPLC ile Fenolik Bileşen Analizi Sonuçları

HPLC-UV yöntemi ile 25 fenolik bileşen standardının analizi yapıldı. Propolis numunelerine yapılan analizde en çok bulunan standart fenolik bileşenlerin kafeik asit, ellajik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, luteolin, kuersetin, pinosembrin, chrysin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) olduğu tespit edilmiştir. Klorojenik asit, *m*-OH benzoik asit, epikateşin, şiringik asit, mirisetin, apigenin, curcumin, resveratrol ve daidzein fenolik bileşenlerine ise propolis numunelerinde rastlanmamıştır. Ordu iline ait propolis numunesinin fenolik bileşen miktarının diğerlerine göre daha fazla olduğu ve kafeik asit, ellajik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, chrysin, pinosembrin, kafeik asit fenetil ester (CAPE) bakımından zengin olduğu gözlemlendi. Propolis numunelerin fenolik bileşen sonuçları Tablo 14’te sunulmuştur.

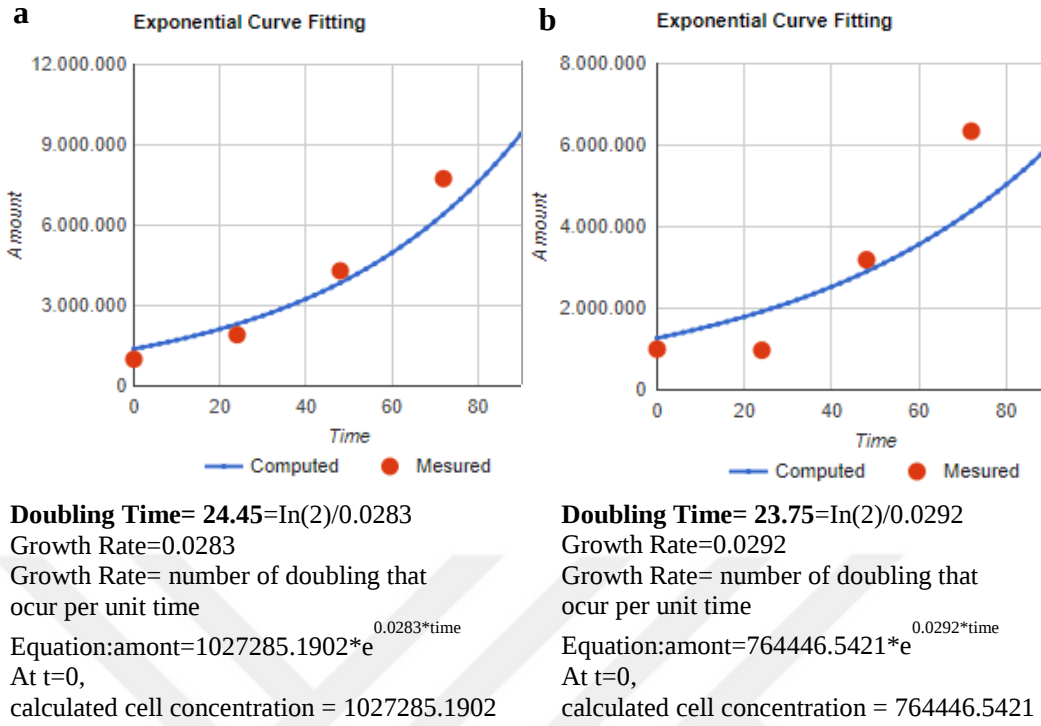
Tablo 14. Propolis numunelerin fenolik bileşen sonuçları

Standartlar (µg fenolik/g)	Rize	Sinop	Trabzon	Artvin	Ordu	Gümüşhane	Bayburt
Gallik asit	42.32	-	42.67	42.08	63.20	25,99	37.98
Protokatekik asit	-	33.03	4.22	53.40	-	27.33	-
Klorojenik asit	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -OH Benzoik asit	-	19.58	29.25	-	-	-	-
Epikateşin	-	-	-	-	-	-	-
Kafeik asit	111.46	365.76	1239.90	168.08	2046.50	72.67	99.34
Şiringik asit	-	-	-	-	-	-	-
<i>m</i> -OH Benzoik asit	-	-	-	-	-	-	-
Rutin	52.28	192.35	-	90.41	103.64	32.00	42.67
Ellajik asit	1867.21	1649.70	-	2302.23	2593.37	1371.35	1578.69
<i>p</i> -Kumarik asit	142.63	270.04	950.93	573.45	2157.92	74.00	78.01
Ferulik asit	58.91	259.32	1233.05	1221.24	1750.89	32.66	42.00
Mirisetin	-	-	-	-	-	-	-
Resveratrol	-	-	-	-	-	-	-
Daidzein	-	-	-	-	-	-	-
Luteolin	16.84	18.37	24.52	29.30	21.10	10.68	12.69
Kuersetin	67.97	200.56	188.73	38.93	262.29	59.33	63.32
<i>t</i> -Sinnamik asit	-	-	452.92	-	456.66	-	-
Apigenin	-	-	-	-	-	-	-
Hesperetin	-	32.04	-	-	115.85	-	-
Ramnetin	-	195.77	139.86	-	281.05	-	-
Chrysin	371.17	1682.78	4062.22	-	5067.36	292.64	333.97
Pinosembrin	459.81	1833.38	5082.92	-	5272.01	-	422.01
CAPE	17.09	121.16	1809.62	715.19	1820.25	12.66	16.65
Curcumin	-	-	-	-	-	-	-

(-) Tespit Edilemedi

4.10. Hücrelerin İkilenme Zamanının (Doubling Time) Sonuçları

MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücre hattı için 0, 24, 48 ve 72. saat sonucu sayılan hücre sayıları kullanılarak büyüme eğrisi çizildi ve ikilenme zamanı tespit edildi (Şekil 8).

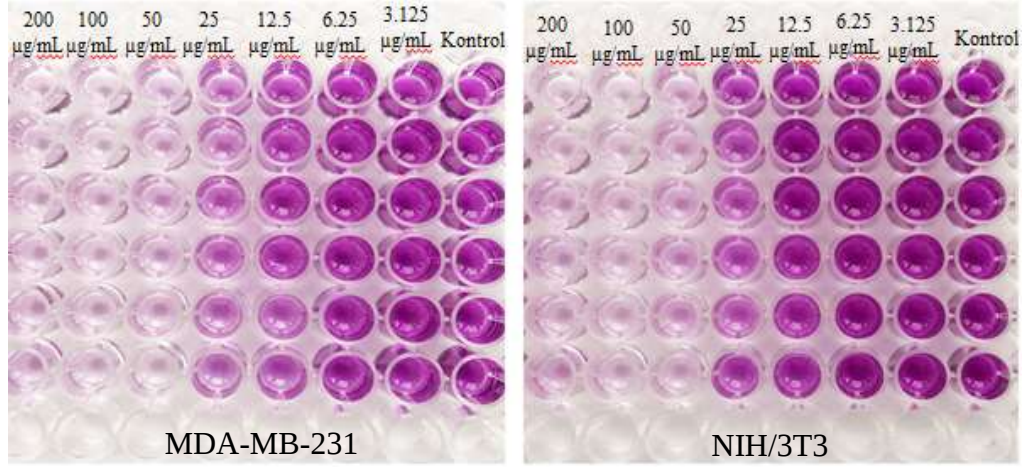


Şekil 8. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının büyüme eğrileri ve ikilenme zamanı
a)MDA-MB-231, b)NIH/3T3

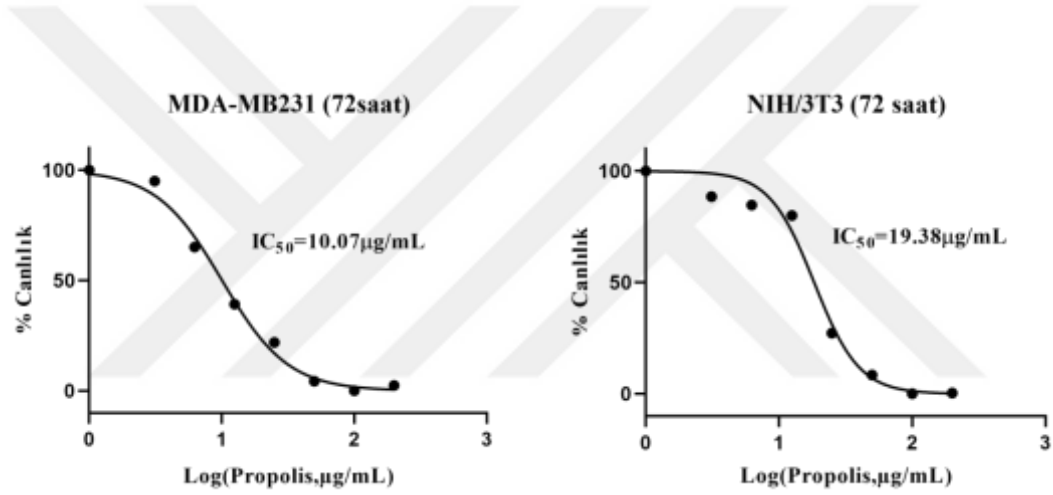
4.11. MTT Yöntemi ile Sitotoksikite Analizi Sonuçları

Ordu (Ulubey) propolis ekstraktı ile inkübe edilen MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücrelerinin canlılığı 72. saatin sonunda değerlendirildi. Propolis ekstraktının her konsantrasyonundan (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 $\mu\text{g/mL}$) ve hiçbir işlem görmeyen kontrol grubundan altışar kuyucuk olduğundan kuyucukların spektrofotometrede verdikleri değerlerin ortalaması alındı (Resim 2). Negatif kontrol kuyucuklarındaki hücrelerin canlılık oranı %100 kabul edilerek propolis ekstraktı bulunan kuyucukların canlılıkları değerlendirildi. Elde edilen % hücre canlılığı değerlerinin logaritmik konsantrasyona karşı grafiğinin çizilmesiyle MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücre serilerinde kullanılan Ordu (Ulubey) propolis ekstraktının IC_{50} değerleri hesaplandı (Şekil 9).

MTT yöntemi ile MDA-MB-231 metastatik meme kanseri ve NIH/3T3 fibroblast hücre serisi üzerine yapılan sitotoksikite analizi sonucu; Ordu (Ulubey) propolis ekstraktının MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücrelerinde sağlıklı NIH/3T3 fibroblast hücrelerine göre 1.92 kat daha seçici sitotoksik etkisinin olduğu belirlendi (Tablo 15).



Resim 2. Ordu (Ulubey) propolis ekstraktı ile 72 saat inkübe edilen hücrelerin MTT testi pleyt görüntüsü



Şekil 9. Ordu (Ulubey) propolis ekstraktının hücre hatlarındaki IC₅₀ değerlerini belirlemede kullanılan grafik

Tablo 15. IC₅₀ değerleri ve seçicilik indeksi

	MDA-MB-231 Hücre Hattı	NIH/3T3 Hücre Hattı	Seçicilik İndeksi
Ordu (Ulubey) Propolis Ekstraktı	10.07±0.13 µg/mL	19.38±0.27 µg/mL	1.92

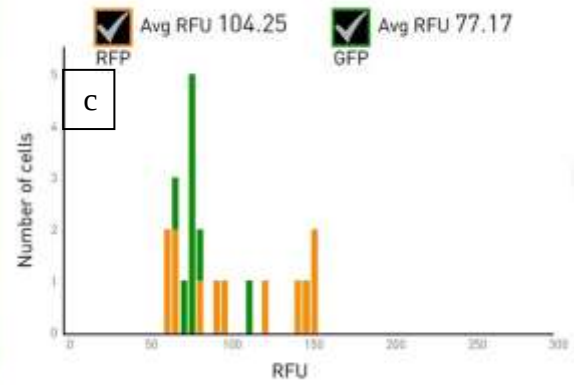
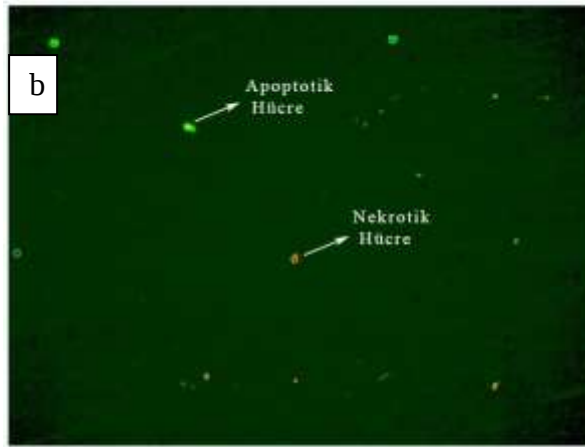
4.12. Anneksin V-PI Analizi Sonuçları

MTT analiz sonuçları değerlendirilerek kullanılan Ordu (Ulubey) propolis ekstrakt konsantrasyonları 0, 9, 18, 36 ve 54 µg/mL ile FITC Anneksin V-PI analizi

gerçekleştirildi. Otomatik hücre sayacı cihazında gerçekleştirilen ölçümler sonucu Resim 3’de görüldüğü gibi veriler elde edildi. Verilerdeki RFP (Red fluorescent protein) değeri propidyum iyodür boyasına ait ışımayı (nekrotik hücreleri), GFP (green fluorescent protein) değeri FITC Anneksin V ışımamasını (erken apoptotik hücreleri) ve RFP+GFP değeri ise geç apoptotik hücreleri ifade etmektedir.

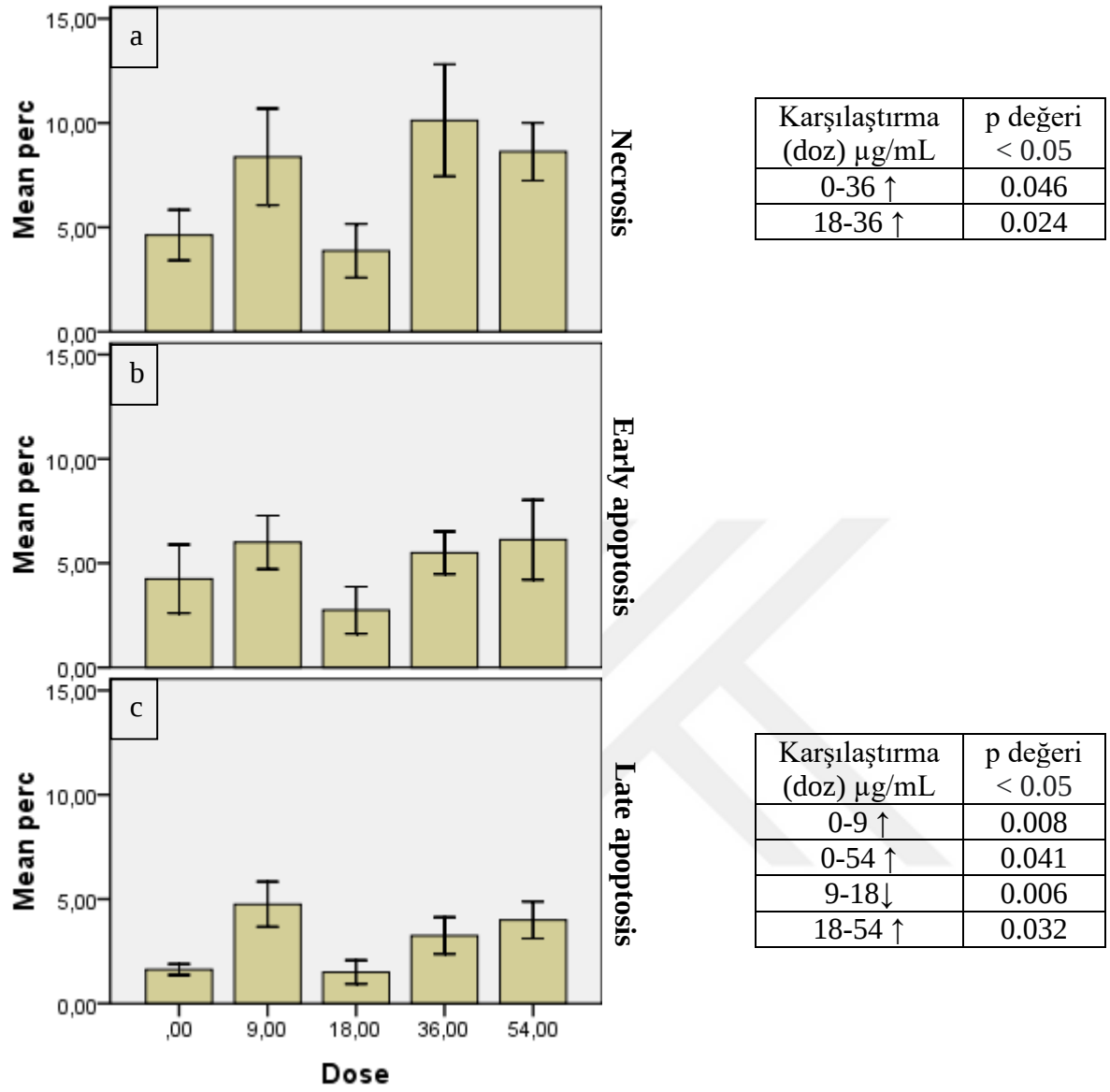
Results:

a	Concentration		
		$2.29 \times 10^5/\text{mL}$	
	RFP	15%	$3.52 \times 10^4/\text{mL}$
	GFP	15%	$3.52 \times 10^4/\text{mL}$
RFP + GFP	8%	$1.76 \times 10^4/\text{mL}$	

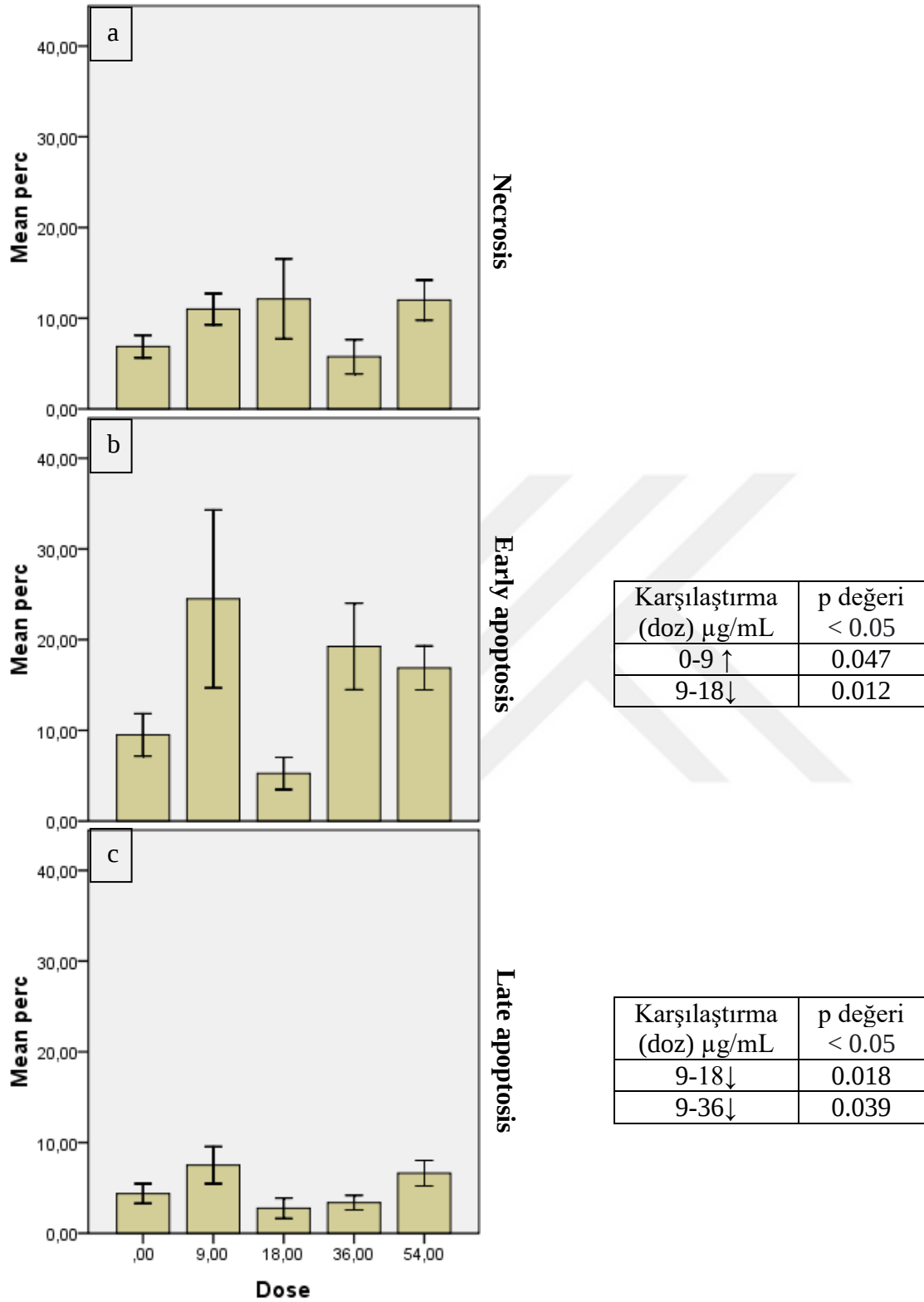


Resim 3. Anneksin V-PI analizi sonucu otomatik hücre sayacından alınan veriler, a)RFP, GFP ve RFP+GFP hücre konsantrasyonu, b) floresans ışına yapan apoptotik ve nektotik hücre görünümü, c) apoptotik ve nektotik hücrelerin floresans miktarı

Anneksin V-PI analizi sonuçlarına göre MDA-MB-231 hücre serisi üzerinde Ordu propolisinin 36 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunun nekrotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı (Şekil 10a), erken apoptozda istatistiksel olarak anlamlılık olmazken (Şekil 10b) geç apoptozda ise 9 ve 54 $\mu\text{g/mL}$ ’de anlamlı bir artış olduğu (Şekil 10c) gözlemlendi. Sağlıklı hücre olan NIH/3T3 hücre serisinde ise nekrotik hücre sayısında anlamlı artış/azalış olmazken (Şekil 11a) erken apoptozda 18 $\mu\text{g/mL}$ ’de (Şekil 11b) geç apoptozda 18 ve 36 $\mu\text{g/mL}$ ’de (Şekil 11c) anlamlı azalma olduğu gözlemlendi.



Şekil 10. MDA-MB-231 hücre hattı için elde edilen Anneksin V-PI analiz sonucu grafikleri, a) nekroz, b) erken apoptoz, c) geç apoptoz



Şekil 11. NIH/3T3 hücre hattı için elde edilen Anneksin V-PI analiz sonucu grafikleri, a) nekroz, b) erken apoptoz, c) geç apoptoz

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Propolis, bal arılarının kovanlarını dış etkilere karşı korumada, dezenfekte etmekte kullandığı önemli bir apiterapi ürünüdür. Yapılan çalışmalarda propolisin sabit bir bileşime sahip olmadığı, toplandığı bölge florasına, iklim özelliklerine, arı ırkına, kovanının ihtiyacına ve şekline göre farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir (4, 112). Nitekim bir çalışmada beş farklı arı ırkına göre aynı bölgeden toplanan propolis örneklerinin fenolik bileşiminin değişim gösterdiği belirtildi (113). Türkiye’de yapılan bir başka çalışmada da Van bölgesinde farklı kovan tiplerinden toplanan propolis örneklerinin bileşiminin farklı olduğu gösterildi (114).

Propolis çoğunlukla bölge adlarına göre adlandırılmaktadır. Yağmur ormanlarının bulunmasıyla uygun iklim ve floraya sahip olan Brezilya bölgesinde bulunan propolis, çok üretilen bir propolis türüdür. Ayrıca Brezilya propolisi kırmızı ve yeşil rengiyle de adlandırılmaktadır (115, 116). Türkiye dünyada ılıman bölge iklim kuşağında bulunduğu için daha çok poplar(kavak) türü propolis bakımından zengin olup bunu çam, ardıç, meşe, kestane gibi türler takip etmektedir (113, 117, 118).

Arılar propolisi çoğunlukla ağaçların yaprak, kabuk ve gövdelerinden sızan reçinelerden toplarken otsu bitkilerden de az miktarda propolis üretilmektedir. Ormanlık alanların ve bitki florasının bol olduğu bölgelerden toplanan propolislerin veriminin ve kalitesinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Yapılan bu çalışmada kestane, kavak, ardıç, fındık ve köknar gibi ağaç türlerinin bol bulunduğu Karadeniz Bölgesi propolisinin fiziksel ve biyolojik aktif özellikleri araştırıldı. Bu amaçla Karadeniz Bölgesinde bulunan yedi farklı ildeki deneyimli arıcılardan 2019 yılında toplanan propolis örnekleri satın alındı.

Propolis ham formu ile çok fazla kullanılmaz ve çoğunlukla metanol, etanol, su, kloroform ve dimetil sülfoksit gibi çözücüler ile saflaştırılarak kullanılır. Kullanılan farklı çözücüler aktiviteyi etkilemekle beraber bileşenlerinin çoğunu ortaya çıkaran en iyi ve sık kullanılan çözücü %70’lik etanol olarak belirtilmiştir (21–23). Bu amaçla 3,5 g öğütülmüş ham propolis 30 ml %70’lik etanolde çözülerek yani yaklaşık %10’luk ekstraktlar hazırlandı ve deneylerde kullanıldı.

Ham propolis özütlerin briks yani çözeltide çözünen katı madde değerlerinin 23 ile 26 arasında değişim gösterdiği ve pH değerlerinin ise 4.81 ile 5.28 aralığında değiştiği tespit edildi. Propolis özütünde briks değeri ile ilgili çalışma literatürde bulunmazken pH değerinin literatürle uyumlu olduğu yani tüm propolislerin asidik özelliğe sahip olduğu

belirlendi (99). Bir fiziksel özellik olan iletkenliğin etanolik özütlerde oldukça değişken özellik gösterdiği (49.43 ile 93.53 $\mu\text{S}/\text{cm}$ arasında) ancak ortalama değeri 61 $\mu\text{S}/\text{cm}$ olduğu tespit edildi.

Propolis temel olarak iki kısımdan oluşur. Alkol ile ekstrakte edilen kısım balsamik olarak adlandırılırken diğer kısım alkol ile ekstrakte edilmeyen yani apolar bileşenlerce zengin olan mumlardan (vaks) oluşan kısımdır. Balsamik kısım ne kadar zengin ise ham propolis o kadar kalitelidir. Yapılan çalışmada ham propolislerin balsamik miktarının % 32.71 ile %67.04 arasında değişim gösterdiği ve en yüksek balsam miktarının Ordu (Ulubey) propolisinde olduğu tespit edildi. %Vaks miktarlarının ise 2.40 ile 13.91 arasında değişim gösterdiği ve en yüksek vaks miktarının yine aynı ildeki propoliste olduğu bulundu. Balsamik ve vaks miktarının aynı propolis de yüksek olması ilgi çekicidir. Düşük vaks miktarına sahip olan Trabzon (Araklı) ilindeki propoliste beklenenin aksine balsamik maddenin düşük çıkmasının sebebi odunsu maddelerin(selülozik) propoliste bulunabileceğidir. Çünkü bu selülozik maddeler Ordu ilinin propolisinde daha az olabileceğinden vaks miktarı yüksek bulunmuştur.

Propolisin biyoaktif değerinin daha çok polifenollerden ileri geldiği yapılan tüm propolis çalışmalarında bildirilmektedir. Bu nedenle yapılan bu çalışmada Karadeniz Bölgesi propolislerinin total polifenol (TP) içeriklerinin 91.86 ile 196.40 mg GAE/g arasında değişim gösterdiği ve Ordu (Ulubey) propolisinin maksimum TP'ye sahip olduğu onu Trabzon propolisinin izlediği tespit edildi. Polifenoller bitkilerin sekonder metabolitleri olup, çok geniş alt sınıfları ile yaklaşık 8000 adet polifenollerin varlığı literatürde zikredilmektedir (119, 120). Flavanoidler en büyük polifenol alt sınıf ailesi olup, antimikrobiyal, antiviral, anti-inflamatuar ve antitümoral özellikleri ile tanınırlar (121, 122). Çalışmada kullanılan örneklerin total flavanoidlerinin 47,55 ile 68.74 mg QE/g arasında değiştiği ve en yüksek değeri Ordu ile Trabzon propolisinde olduğu tespit edildi. Anadolu propolisi ile yapılan bir çalışmada total polifenol miktarının Balıkesir ili propolisinde 186 mg GAE/g, Artvin ili propolisinde ise 86 mg GAE/g olduğu bildirilmektedir (123). Toplam polifenol miktarı ile toplam flavanoid miktarları arasında pozitif bir korelasyon görülürken, literatürde de bu pozitif korelasyonla ilgili makaleler rapor edilmektedir (123, 124).

Propolis örneklerinin antioksidan aktiviteleri FRAP ve DPPH^{*} yöntemi ile test edildi. FRAP yöntemi, demir (III) kompleksini indirgeyebilen antioksidan güç olarak ifade

edilir. FRAP değerinin büyük olması yüksek aktiviteyi ifade eder. Yedi ile ait propolis örneklerinde en yüksek aktiviteyi Ordu (Ulubey) ile Trabzon (Araklı) propolislerinin gösterdiği belirlendi. Antioksidan aktivitenin polifenol miktarı ile ilişkili olduğu bulundu. Serbest radikal temizleme (scavenging) aktivitesi olarak DPPH  radikalı çalışmada kullanıldı. DPPH  radikalı ticari olarak satın alınan bir radikal olup, antioksidan bir madde varlığında hemen indirgendiği için iyi bir antioksidan belirtecidir. Radikal temizleme aktivitesi SC₅₀ olarak ifade edilir ki bu radikalın yarısını temizleyen ekstrakt miktarıdır. FRAP değerinin aksine DPPH  değeri ne kadar düşük olursa antioksidan aktivite o kadar yüksek demektir (106). Çalışmada yine en yüksek radikal temizleme kapasitesinin Ordu (Ulubey) ve Trabzon (Araklı) propolislerine ait olduğu bulundu.

Propolis  rneklerinin fenolik içerikleri UV-VIS dedektör ile donanımlı HPLC sisteminde analiz edildi. 25 adet fenolik bileşiğin kullanıldığı bu çalışmada bazı fenolik bileşenlerin tayin sınırlarının altında kaldığı için tespit edilemediği bulundu. Sinop hariç gallik asit tüm örneklerde tespit edilirken, klorojenik asit, epikateşin, şiringik asit, *m*-OH benzoik asit, mirisetin, resveratrol, daidzein, apigenin ve curcumin hiç bir örnekte tespit edilmedi. Kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, luteolin, kuersetin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) tüm propolis örneklerinde tespit edildi. Çalışmada en yüksek polifenol ve antioksidan değere sahip Ordu (Ulubey)  rneğinin pinosembrin, chrysin, *p*-kumarik asit, ellagik asit ve ferulik asit bakımından zengin olduğu tespit edildi. Kafeik asit ve kafeik asit fenetil ester fenolikleri propolisin en önemli markırları olup, her iki bileşenin Ordu ve Trabzon örneklerinde yüksek olduğu, ancak tüm örneklerde bulunduğu tespit edildi. Bu iki bileşik ile literatürde çok sayıda çalışma mevcut olup, antitümoral aktiviteye sahip olduğu gösterilmektedir (125, 126).

Çalışmada antioksidan aktiviteden başka propolisin sitotoksik etkisi de incelendi. Bunun için kanser hücre hattı olarak metastatik meme kanseri (MDA-MB-231) ile sağlıklı hücre hattı olan fare embriyonik hücre hattı (NIH/3T3) kullanıldı. Çalışmada en iyi propolis  rneği olarak seçilen Ordu (Ulubey) iline ait numune kullanıldı. . Her iki hücre için gerekli pasajlama, hücre sayısını ikiye katlama çalışmalarından sonra uygun konsantrasyon, hücre sayısı ve etki süresi tespit edildi. İn vitro sitotoksik aktivite testleri için çok sayıda tetrazolyum testleri (MTT, MTS, XTT, WST), laktat dehidrojenaz (LDH) testi ve biyoluminesans testler kullanılır. Kolorimetrik yöntem olan MTT (3-(4,5 - dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) testinde, MTT canlı hücreler tarafından

mitokondriyal NAD(P)H'a bağı mitokondriyal oksidoredüktaz tarafından indirgenerek suda çözünmeyen formu olan formazon kristallerine dönüşerek mavi-mor renge dönüşür. Rengin şiddeti formazon kristallerinin miktarıyla doğru orantılı olup, canlı ve çoğalmaya devam eden hücrelerde bu dönüşüm meydana gelirken ölü olan yani metabolik aktivite göstermeyen hücrelerde reaksiyon gerçekleşmez. Rengin şiddetinin spektrofotometrik olarak 540-720 nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesiyle canlı/ölü hücre miktarı belirlenir (93).

Ordu (Ulubey) propolisinin optimum şartlar sağlanarak yapılan sitotoksikite analizi sonucu % hücre canlılıkları logaritmik olarak değerlendirildi. MDA-MB-231 ve NIH/3T3 hücre hatları için IC_{50} değerleri sırasıyla $10.07 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$ ve $19.38 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ bulundu. Ordu(Ulubey) propolis ekstraktının MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücrelerinde normal NIH/3T3 fibroblast hücrelerine göre 1.92 kat daha seçici sitotoksik etkisinin olduğu tespit edildi. Çin propolisi ile yapılan bir çalışmada, propolisin meme kanser hücrelerine karşı yüksek sitotoksik etki sağladığı gösterilmiş (127). 2017 yılında yapılan bir çalışmada ise propolis de bulunan CAPE'in in meme kanser hücrelerinin büyümesini durdurduğu gösterilmiştir (37).

Sitotoksik aktivitenin mekanizmasını aydınlatmak için çeşitli testler yapılır. Bunlardan biri sitotoksikitenin nekroz veya apoptoz olup olmadığının belirlenmesi için yapılan Anneksin V-PI analizidir. Eğer doğal veya sentetik bir ajan hücreyi apoptoza sürüklüyorsa bu onun iyi bir antitümoral ajan olduğunu gösterir. Her iki hücre hattında bu durumun ölçülmesinde FITC AnneksinV-PI kiti kullanıldı. Burada FITC(floreskein izotiyosiyanat) ile işaretlenmiş anneksin V boyası apoptoza, propidyum iyodür (PI) boyası nekroza uğrayan hücreleri tespit etmek için kullanıldı (89, 110). Otomatik hücre sayacı ile yapılan ölçümler sonucu MDA-MB-231 hücre serisi üzerinde Ordu propolisinin $36 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunun nekrotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı, erken apoptozda istatistiksel olarak anlamlılık olmazken geç apoptozda ise 9 ve $54 \mu\text{g/mL}$ 'de anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. Sağlıklı hücre olan NIH/3T3 hücre serisinde ise nekrotik hücre sayısında anlamlı artış/azalış olmazken erken apoptozda $18 \mu\text{g/mL}$ 'de geç apoptozda 18 ve $36 \mu\text{g/mL}$ 'de anlamlı azalma olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, Karadeniz Bölgesi propolislerinin yüksek antioksidan etkiye sahip oldukları, dünyada en yaygın kanser türü olan meme kanseri üzerinde seçici sitotoksik etki gösterdiği ve bu etkiye içeriğindeki tüm bileşenlerin katkı vermiş olabileceği sonucuna

ulaşılmıştır. Bunlar göz önünde bulundurulduğunda propolisinin içeriğinin daha ayrıntılı aydınlatılması, çalışmaların farklı hücre serileri üzerinde de denenmesi, in vivo deneylerle desteklenmesi ile propolisin alternatif tamamlayıcı tıpta kansere karşı kullanılabileceğı öngörülmektedir.



6. KAYNAKLAR

1. Hellner M, Winter D, Von Georgi R, Münstedt K (2008). Apitherapy: Usage and experience in German beekeepers. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 5(4): 475-479.
2. Popova M, Giannopoulou E, Skalicka-Wóznia K, Graikou K, Widelski J, Bankova V, Kalofonos H, Sivolapenko G, Gaweł-Bęben K, Antosiewicz B, Chinou, I (2017). Characterization and biological evaluation of propolis from Poland. *Molecules* 22(7): 1159.
3. Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Czuba Z (1993). Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 43(5): 607–609.
4. Kumova U (2002). Önemli Bir Arı Ürünü: Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 2(2): 10-24.
5. Bankova V, Popova M, Trusheva B (2014). Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. *Chemistry Central Journal* 8: 28.
6. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2013/964149.
7. Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Bashir MA, Tahir M, Ansari MJ, Ghramh HA, Adgaba N, Dash CK (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(7): 1695-1703.
8. Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T (2012). Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry* 3(2): 156-173.
9. WHO (2018). Cancer. World Health Organization [online]. Available at: <https://www.who.int>. [Accessed: 13 February 2021].
10. Sawicka D, Car H, Borawska MH, Nikliński J (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 50(1): 25-37.

11. Watanabe MAE, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63(11): 1378-1386.
12. Chan GC, Cheung KW, Sze DM (2013). The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 44(3): 262-273.
13. Lotfy M (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 7(1): 22-31.
14. Burdock GA (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36(4): 347-363.
15. Ghisalberti EL (1979). Propolis: A Review. *Bee World* 60(2): 59-84.
16. Daleprane JB, Abdalla DS (2013). Emerging roles of propolis: Antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2013/175135.
17. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 80(1): 67-73.
18. Sforcin JM (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 113(1): 1-14.
19. Martinotti S, Ranzato E (2015). Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns & Trauma* 3: 9.
20. Galeotti F, Maccari F, Fachini A, Volpi N (2018). Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. *Foods* 7(3): 41.
21. Sforcin JM, Bankova V (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 133(2): 253-260.

22. Bankova V, Bertelli D, Borba R, Conti B. J, da Silva Cunha I. B, Danert C, Eberlin M. N, I Falcão S, Isla M.I, Moreno M. I. N, Papotti G, Popova M, Santiago K.B, Salas A, Sawaya A.C.H.F, Schwab N.V, Sforcin J.M, Simone-Finstrom M, Spivak M, Trusheva B, Vilas-Boas M, Wilson M, Zampini, C (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research* 58(2): 1-49.
23. Machado BA, Barreto Gde A, Costa AS, Costa SS, Silva RP, da Silva DF, Brandão HN, da Rocha JL, Nunes SB, Umsza-Guez MA, Padilha FF (2015). Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *PLoS ONE* 10(8): e0134489.
24. Abubakar MB, Abdullah WZ, Sulaiman SA, Ang BS (2014). Polyphenols as key players for the antileukaemic effects of propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2014/371730.
25. Falcão SI, Vilas-Boas M, Estevinho LM, Barros C, Domingues MRM, Cardoso SM (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(2): 887-897.
26. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19(12): 19610-19632.
27. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2018/7074209.
28. Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19(1): 78-101.
29. Barbarić M, Mišković K, Bojić M, Lončar MB, Smolčić-Bubalo A, Debeljak Ž, Medić-Šarić M (2011). Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology* 135(3): 772-778.
30. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2013/697390.

31. Volpi N (2004). Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 25(12): 1872-1878.
32. Ramanauskiene K, Inkeniene AM, Petrikaite V, Briedis V (2013). Total phenolic content and antimicrobial activity of different lithuanian propolis solutions. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2013/842985.
33. Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99(1): 191-203.
34. Khanbabaee K, van Ree T (2001). Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports*. doi:10.1039/b101061l.
35. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 1259510.
36. M Demestre , S M Messerli, N Celli, M Shahhossini, L Kluwe, V Mautner HM (2009). CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytotherapy Research* 23(2): 226-230.
37. Kabała-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Jastrzębska-Stojko Z, Stojko R, Wojtyczka RD, Stojko J (2017). Comparison of two components of propolis: Caffeic acid (CA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induce apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells MDA-MB-231. *Molecules* 22(9): 1554.
38. Omene C, Kalac M, Wu J, Marchi E, Frenkel K, O'Connor OA (2013). Propolis and its active component, Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), modulate breast cancer therapeutic targets via an epigenetically mediated mechanism of action. *Journal of Cancer Science and Therapy* 5(10): 334-342.
39. Rzepecka-Stojko A, Kabała-Dzik A, Mozdziej A, Kubina R, Wojtyczka RD, Stojko R, Dziedzic A, Jastrzebska-Stojko Z, Jurzak M, Buszman E, Stojko J (2015). Caffeic acid Phenethyl ester and ethanol extract of Propolis induce the complementary Cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines. *Molecules* 20(5): 9242-9262.

40. Tolba MF, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Rahman SZ, Abdel-Naim AB (2013). Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life* 65(8): 699-709.
41. Tolba MF, Omar HA, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Naim AB, Abdel-Rahman SZ (2016). Caffeic Acid Phenethyl Ester: A review of its antioxidant activity, protective effects against Ischemia-reperfusion injury and drug adverse reactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(13): 2183-2190.
42. Zabaïou N, Fouache A, Trousson A, Baron S, Zellagui A, Lahouel M, Lobaccaro JMA (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids* 207(Pt B): 214-222.
43. De Groot AC (2013). Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis* 24(6): 263-282.
44. Popova M, Trusheva B, Bankova V (2017). Content of biologically active compounds in Bulgarian propolis: A basis for its standardization. *Bulgarian Chemical Communications* 49(Special Edition B): 115-120.
45. Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105(3): 940-949.
46. Russo A, Longo R, Vanella A (2002). Antioxidant activity of propolis: Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73 Supplement 1: 21-29.
47. Liu R, Gao M, Yang ZH, Du GH (2008). Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion both in vivo and in vitro. *Brain Research* 1216: 104-115.
48. Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA (2002). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: Structure-activity studies. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13(5): 273-281.
49. Harborne JB, Williams CA (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6): 481-504.

50. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74(4): 418-425.
51. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H (2002). Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(7): 2200-2206.
52. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2(4): 152-159.
53. Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, De Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL (2009). Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quimica Nova*. doi:10.1590/S0100-40422009000600031.
54. De Castro SL (2001). Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical Sciences*. doi:10.5016/1806-8774.2001v3p49.
55. Choi SJ, Shimomura K, Kumazawa S, Ahn MR (2013). Antioxidant properties and phenolic composition of propolis from diverse geographic regions in Korea. *Food Science and Technology Research* 19(2): 211-222.
56. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84(3): 329-339.
57. Barlak Y, Değer O, Çolak M, Karataylı SC, Bozdayı AM, Yücesan F (2011). Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Science*. doi:10.1186/1477-5956-9-74.
58. Choudhari MK, Haghniaz R, Rajwade JM, Paknikar KM (2013). Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: An in vitro study. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2013/928280.
59. Markiewicz-Zukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, Naliwajko SK, Sawicka D, Car H (2013). Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13: 50.

60. Su ZZ, Lin J, Grunberger D, Fisher PB (1994). Growth suppression and toxicity induced by Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in type 5 Adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression¹. *Cancer Research* 54(7): 1865-1870.
61. Chung T, Moon S, Chang Y, Ko J, Lee Y, Cho G, Kim S, Kim J, Kim C (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB Journal* 18(14): 1670-1681.
62. Márquez N, Sancho R, Macho A, Calzado MA, Fiebich BL, Muñoz E (2004). Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF- κ B transcription factors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308(3): 993-1001.
63. Bankova V (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(2): 23-28.
64. Pandey KB, Rizvi SI (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(5): 270-278.
65. Rasul A, Millimouno FM, Ali Eltayb W, Ali M, Li J, Li X (2013). Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Research International* 2013: 379850.
66. M. Calderon-Montano J, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, Lopez-Lazaro M (2011). A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 11(4): 298-344.
67. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, Kurimoto M, Mito K (1998). Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detection and Prevention* 22(6): 506-515.
68. Young IS, Woodside J V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 54(3): 176-186.
69. Nimse SB, Pal D (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. doi:10.1039/c4ra13315c.

70. Demir S (2015). Türk Propolisinin Akciğer Kanseri(A549) Hücre Serisi Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi. Doktora tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya anabilim Dalı, Trabzon.
71. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4(8): 118-126.
72. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5(1): 9-19.
73. Burton GJ, Jauniaux E (2011). Oxidative stress. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* 25(3): 287-299.
74. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
75. Greaves M, Maley CC (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481(7381): 306-313.
76. Institute NC (2015). What is Cancer? National Cancer Institute [online]. Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. [Accessed: 13 February 2021].
77. IARC (2020). Cancer Today. International Agency for Research on Cancer [online]. Available at: <https://gco.iarc.fr/>. [Accessed: 13 February 2021].
78. Yang N, Sheridan AM (2014). Cell Cycle. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00273-6.
79. Cooper GM (2000). The eukaryotic cell cycle. *The Cell: A Molecular Approach* 2nd edition [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876>. [Accessed: 15 February 2021].
80. Richard McIntosh J (2016). Mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8(9): a023218.
81. Alberts B, Johnson A LJ (2002). An Overview of the Cell Cycle. *Molecular Biology of the Cell* 4th edition New York: Garland Science [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869>. [Accessed: 15 February 2021].
82. Schatten H (2013). Mitosis. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00962-1.

83. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003). The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 36(3): 131-149.
84. Kastan MB, Bartek J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432(7015): 316-323.
85. Barnum KJ, O'Connell MJ (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology* 1170: 29-40.
86. Demir Ayazoğlu E (2019). Bazı Triazol Türevlerinin Klinik Öneme Sahip Alfa Amilaz ve Tirosinaz İnhibisyon Potansiyellerinin İn-Vitro ve İn-Siliko Olarak İncelenmesi. Doktora tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
87. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4): 239-257.
88. Stenson WF, Ciorba MA (2018). Cell Death. *Physiology of the Gastrointestinal Tract: Sixth Edition*. doi:10.1016/B978-0-12-809954-4.00009-8.
89. Elmore S (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495-516.
90. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sáez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee

SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* 25(3): 486-541.

91. Lowe SW, Lin AW (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21(3): 485-495.
92. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
93. Tokur O, Aksoy A (2017). In vitro sitotoksiste testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 6(1): 112-118.
94. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnóczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jäättelä M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nuñez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G (2009).

Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differentiation* 16(8): 1093-1107.

95. Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical Biochemistry* 366(2): 197-206.
96. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2): 55-63.
97. Savka MA, Dailey L, Popova M, Mihaylova R, Merritt B, Masek M, Le P, Nor SRM, Ahmad M, Hudson AO, Bankova V (2015). Chemical composition and disruption of quorum sensing signaling in geographically diverse United States propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2015/472593.
98. Keskin M (2019). Ticari Propolis Ekstraktlarının Kalite Parametreleri Açısından Karşılaştırılması. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 19(1): 43-49.
99. Dias LG, Pereira AP, Estevinho LM (2012). Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology* 50(12): 4246-4253.
100. Feás X, Pacheco L, Iglesias A, Estevinho LM (2014). Use of propolis in the sanitization of lettuce. *International Journal of Molecular Sciences* 15(7): 12243-12257.
101. Slinkard K, Singleton V (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49-55.
102. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
103. Fukumoto LR, Mazza G (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(8): 3597-3604.

104. Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6): 1619-1624.
105. Benzie IFF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239(1): 70-76.
106. Can Z, Yildiz O, Sahin H, Akyuz Turumtay E, Silici S, Kolayli S (2015). An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry* 180: 133-141.
107. De Villiers A, Lynen F, Crouch A, Sandra P (2004). Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine. *Chromatographia* 59(7): 403-409.
108. Sarı C (2016). Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)’in Farklı Kolorektal Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkileri ve Survivin Ekspresyonundaki Değişimler.Yüksek lisans tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
109. Galati G, O’Brien PJ (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine* 37(3): 287-303.
110. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Yaman SO, Akbulut K, Kilinc K, Deger O (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutrition and Cancer* 68(1): 165-172.
111. Koç E, Çelik-Uzuner S, Uzuner U, Çakmak R (2018). The Detailed Comparison of Cell Death Detected by Annexin V-PI Counterstain Using Fluorescence Microscope, Flow Cytometry and Automated Cell Counter in Mammalian and Microalgae Cells. *Journal of Fluorescence* 28(6): 1393-1404.
112. Simões-Ambrosio LMC, Gregório LE, Sousa JPB, Figueiredo-Rinhel ASG, Azzolini AECS, Bastos JK, Lucisano-Valim YM (2010). The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia* 81(8): 1102-1108.

113. Kekeçoğlu M, Keskin M, Birinci C, Birinci E, Kolaylı S (2021). Effects Of Honey Bee Race And Season On Propolis Composition. *Tarım Bilimleri Dergisi*. doi:10.15832/ankutbd.619996.
114. Kızıltas H, Erkan C (2020). The effects of different beehives on propolis production and quality. *Food Science and Technology*. doi:10.1590/fst.20120.
115. Hotta S, Uchiyama S, Ichihara K (2020). Brazilian red propolis extract enhances expression of antioxidant enzyme genes in vitro and in vivo. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 84(9): 1820-1830.
116. Silva RPD, Machado BAS, De Abreu Barreto G, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, Carvalho AA, Padilha FF, Barbosa JDV, Umsza-Guez MA (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS ONE* 12(3): e0172585.
117. Tugba Degirmencioglu H, Guzelmeric E, Yuksel PI, Kırmızıbekmez H, Deniz I, Yesilada E (2019). A New Type of Anatolian Propolis: Evaluation of Its Chemical Composition, Activity Profile and Botanical Origin. *Chemistry and Biodiversity* 16(12): e1900492.
118. Dezmirean DS, Paşca C, Moise AR, Bobiş O (2020). Plant sources responsible for the chemical composition and main bioactive properties of poplar-type propolis. *Plants* 10(1): 22.
119. Durazzo A (2018). Extractable and Non-extractable Polyphenols: an Overview. Non-extractable Polyphenols and Carotenoids: Importance in Human Nutrition and Health The Royal Society of Chemistry. doi:10.1039/9781788013208-00037.
120. Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food and Function* 10(2): 514-528.
121. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry* 299: 125124.
122. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients* 12(2): 457.

123. Kolaylı S, Ayvaz MA, Rakıcı H, Baltaş N, Imran M, IQBALL İ, Karaoğlu Ş (2020). Antibacterial effect of Anatolian ethanolic propolis extracts on clinical strains of *Helicobacter pylori*. *Der Pharma Chemica* 12(1): 28–32.
124. Degirmenci A, Can Z, Boyraci GM, Yildiz O, Asadov E, Kolayli S (2020). Honeys from some different regions of Azerbaijan: bioactive characteristics based on phenolic profile and antioxidant activity. *Journal of Apicultural Research* 59(4): 390-397.
125. Gülçin I (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217(2-3): 213-220.
126. Borrelli F, Izzo AA, Di Carlo G, Maffia P, Russo A, Maiello FM, Capasso F, Mascolo N (2002). Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia* 73 Supplement 1: 38-43.
127. Xuan H, Li Z, Yan H, Sang Q, Wang K, He Q, Wang Y, Hu F (2014). Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2014/280120.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : BİRİNCİ, Ceren

Uyruğu :

Doğum Tarihi ve Yeri

E-Posta

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılıkta Biyokimya	2021
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü	2017
Ön Lisans	Anadolu Üniversitesi, Açık Öğretim Fakültesi, Yönetim ve Organizasyon Bölümü Sağlık Kurumları İşletmeciliği	2016
Lise	Trabzon Yunus Emre Lisesi	2009

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Akçay Ç, Birinci E, **Birinci C**, Kolaylı S (2020). Durability of wood treated with propolis. Bioresources 15(1): 1547-1562.
2. Kara Y, **Birinci C**, Birinci E, Can Z (2020). Characteristic properties of Spurge (Euphorbia macroclada boiss) honey in Diyarbakır Region. Journal of Apitherapy and Nature 3(1): 37-43.
3. Kekeçoğlu M, Keskin M, **Birinci C**, Birinci E, Kolaylı S (2021). Effects of honey bee race and season on propolis composition. Tarım Bilimleri Dergisi. doi:10.15832/ankutbd.619996.