



T.C.

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**TÜRK PROPOLİS PREPARATLARININ KOLON
KANSER HÜCRELERİ (CACO-2) HATTINDA
SİTOTOKSİK VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Süreyya KARAASLAN
BİYOKİMYA (VETERİNER) ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Miyase ÇINAR

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

KIRIKKALE - 2022



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

**TÜRK PROPOLİS PREPARATLARININ KOLON
KANSER HÜCRELERİ (CACO-2) HATTINDA
SİTOTOKSİK VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Süreyya KARAASLAN

**BİYOKİMYA (VETERİNER) ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Miyase ÇINAR

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

**Bu tez, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2021/079 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

KIRIKKALE - 2022

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında

- ° Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi
- ° Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu
- ° Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi
- ° Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı
- ° Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi durumda aleyhime doğabilecek hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Süreyya KARAASLAN

Tarih:25.07.2022

ÖZET

TÜRK PROPOLİS PREPARATLARININ KOLON KANSER HÜCRELERİ (CACO-2) HATTINDA SİTOTOKSİK VE ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Miyase ÇINAR

Ortak Danışman: Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

Temmuz 2022, 122 sayfa

Bu çalışma Türk propolis preparatlarının Caco-2 hücre hattında sitotoksik ve antioksidan etkilerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirildi. Çalışmada ülkemizde ticari olarak satışa sunulan yerli üretim 8 adet farklı propolis örneği (4'er adet sulu ve etanolik ekstrakt) kullanıldı. Propolis örneklerinde toplam fenol miktarı, toplam flavanoid miktarı ve antioksidan aktiviteleri sırasıyla Folin-Ciocalteu, alüminyum nitrat ve CUPRAC yöntemleriyle belirlendi. Propolisin 2000 µg/ml su ekstraktı ve 500 µg/ml etanol ekstraktı, insan Caco-2 hücre hattında 24. ve 48. saat'lik inkübasyonlar sonucundaki sitotoksitesisi MTT yöntemiyle belirlendi. Propolisin antioksidan sistem üzerine etkisini değerlendirmek için, propolisin IC₂₅ ve IC₅₀ konsantrasyonlarında hücre medyumunda total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan kapasite (TOK) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeylerine bakıldı.

Propolisin su ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı (TPC) 1910,41-10640,87 µgGAE/ml ve etanolik ekstraktlarda 5893,33-27138,83 µgGAE/ml aralığında, toplam flavonoid madde miktarı (TFC) su ekstraktlarında 5,82-13,37 µgQE/ml ve etanolik ekstraktlarda 14,58-118,39 µgQE/ml aralığında ve CUPRAC antioksidan kapasitesi su ekstraktlarında 47,49-475,55 µg/ml ve etanolik ekstraktlarda 4,82-66,91 µg/ml aralığında bulundu. Propolis ekstraktlarının tümünde doz artışı ile alınan yüzde sitotoksite cevapları arasında pozitif bir ilişki bulundu. IC₅₀ değerleri su ekstraktlarında 32,69-172,82 µg/ml ve etanolik ekstraktlarda ise 38,90-134,65 µg/ml aralığında bulundu. Propolisin bu konsantrasyonlarda doza bağlı olarak sitotoksik ve anti-proliferatif etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Hücre medyumunda propolisin su ekstraktlarının 24. saatte IC₂₅ dozlarında TAK düzeyleri negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK) gruplarına göre P1, P3 ve P4'de, IC₅₀ dozlarında ise PK'ya göre P1 ve P4'de yüksekti. TOK düzeyleri IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında tüm propolis örneklerinde PK ve NK'ya göre düşüktü, OSI değerleri IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında NK ve PK'ya göre tüm propolis örneklerinde düşüktü. Kırk sekizinci saatte TAK düzeyleri P1'de IC₂₅ dozunda PK ve P4'e göre, IC₅₀ dozunda PK, NK ve tüm örneklere göre yüksekti. TOK düzeyi IC₂₅ dozunda PK, NK ve tüm göre tüm propolis örneklerinde düşüktü,

IC₅₀ dozunda ise PK'ya göre NK ve tüm propolis örneklerinde düşüktü, OSİ değerleri IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında PK'ya göre NK ve tüm propolis örneklerinde düşüktü.

Hücre kültür medyumunda propolisin etanolik ekstraktlarının 24 saat'lik inkübasyonda IC₅₀ dozunda TAK düzeyleri PK'ya göre P1 ve P2'de yüksekti. TOK düzeyleri IC₂₅ dozunda NK, C₂H₅OH ve PK'ya göre tüm propolis örneklerinde düşük, IC₅₀ dozlarında ise P1 ve P2'ye göre diğer gruplarda yüksekti. OSİ değerleri IC₂₅ dozlarında PK'ya göre tüm gruplarda düşük, NK'ya göre P1, P2, P3 ve P4'de düşüktü. IC₅₀ dozlarında NK'ya göre P1 ve P2'de düşük, PK'ya göre tüm gruplarda düşüktü. Kırk sekiz saatlik inkübasyonda TAK düzeyleri IC₂₅ dozunda PK'ya göre NK, P1 ve P2 örneklerinde, IC₅₀ dozunda ise PK'ya göre P1 ve P2'de yüksekti.

Sonuç olarak ülkemizde ticari olarak satışı sunulan yerli üretim propolis örneklerinden antioksidan kapasitesi daha yüksek olan etanolik ekstraktların daha düşük sitotoksik etki gösterdiği, antioksidan kapasitesi düşük olan su ekstraktlarının ise daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği görüldü. Genel olarak propolisin sulu ekstraktlarda düşük dozda uzun dönem inkübasyonda, alkolik ekstraktlarda ise düşük dozda kısa dönem inkübasyonda TOK düzeylerini azaltarak antioksidan etkiler bakımından faydalı olabileceği kanaatine varıldı. TAK, TOK, OSİ düzeylerinin kanserin teşhisi ve tedavisinde belirleyici faktörler olabileceği ancak bununla ilgili daha kapsamlı ve ileri düzeyde çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Caco-2, propolis ekstraktları, sitotoksosite.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF TURKISH PROPOLIS PREPARATIONS ON THE COLON CANCER CELLS (CACO-2) LINE

Kırıkkale University

Institute of Health Science

Department of Biochemistry (Veterinary), Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Miyase ÇINAR

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

July 2022, 122 pages

This study was carried out to investigate the cytotoxic and antioxidant effects of Turkish propolis preparations in the Caco-2 cell line. In the study, 8 different propolis samples (4 aqueous and ethanolic extracts each) of native production, which are commercially available in our country, were used. Total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activities in propolis samples were determined by Folin-Ciocalteu, aluminum nitrate, and CUPRAC methods, respectively. The cytotoxicity of 2000 µg/ml water and 500 µg/ml ethanol extracts of propolis in human Caco-2 cell lines were determined by MTT method at 24th and 48th hours. In order to evaluate the effect of propolis on the antioxidant system, total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOC) and oxidative stress index (OSI) levels were measured in the cell culture medium at IC₂₅ and IC₅₀ concentrations.

Total phenolic substance content (TPC) in water extracts of propolis ranges from 1910.41-10640.87 µgGAE/ml and in ethanolic extracts 5893.33-27138.83 µgGAE/ml, total flavonoid substance amount (TFC) ranges from 5.82-13.37 µgGAE/ml in water extracts, and 14.58-118.39 µgQE/ml in ethanolic extracts. CUPRAC antioxidant capacity was found in the range of 47.49-475.55 µg/ml in water extracts and 4.82-66.91 µg/ml in ethanolic extracts. A positive relation was found between dose and % cytotoxicity responses in all of the propolis extracts. IC₅₀ values were found in the range of 32.69-172.82 µg/ml in water extracts and 38.90-134.65 µg/ml in ethanolic extracts. It was observed that propolis had a dose-dependent cytotoxic and anti-proliferative effect at these concentrations. TAC levels of water extracts of propolis in cell culture medium at IC₂₅ doses at the 24th hour were higher in P1, P3 and P4 samples compared to negative control (NK) and positive control (PK) groups, and at IC₅₀ doses it was higher in P1 and P4 compared to PK. TOC levels were lower than PK and NK in all propolis samples at IC₂₅ and IC₅₀ doses. OSI values were lower at IC₂₅ and IC₅₀ doses than NK and PK in all

propolis samples. At the 48th hour, TAC levels in P1 were higher than PK and P4 at IC₂₅ dose, and higher than PK, NK and all samples at IC₅₀. TOC levels were lower in propolis samples than PK and NK at IC₂₅ doses. TOC level was lower in NK and all samples than PK at IC₅₀ doses, OSI values were lower in IC₂₅ and IC₅₀ doses than PK in NK and all propolis samples.

TAC levels of ethanolic extracts of propolis in cell culture medium were higher in P1 and P2 than PK at IC₅₀ dose in 24 hours of incubation. TOC levels were lower in all propolis samples than NK, C₂H₅OH, and PK at IC₂₅ doses, and higher in other groups than P1, and P2 at IC₅₀ doses. OSI values were lower in all groups compared to PK at IC₂₅ doses, while lower in P1, P2, P3 and P4 compared to NK, at IC₅₀ doses OSI values were lower in P1 and P2 compared to NK while found to be lower in all groups compared to PK. In a 48-hour incubation, TAC levels were higher in NK, P1, and P2 samples compared to PK at IC₂₅ dose, and higher in P1 and P2 compared to PK at IC₅₀ dose.

As a result, it was seen that the locally produced ethanolic extracts of propolis samples sold commercially in our country with higher antioxidant capacity had a lower cytotoxic effect, and water extracts with low antioxidant capacity had a higher cytotoxic effect. In general, it was concluded that low-dose long-term incubation in aqueous extracts and low-dose short-term incubation in alcoholic extracts may be beneficial in terms of antioxidant effects by reducing TOC levels. It is thought that TAK, TOC, and OSI levels may be determining factors in the diagnosis and treatment of cancer, but more comprehensive and advanced studies are needed.

Keywords: Antioxidant, Caco-2, cytotoxicity, propolis extracts

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devam etmesinde her türlü desteğini benden esirgemeyen başta değerli danışman hocam Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Miyase ÇINAR'a, hücre kültürü çalışmalarımda, laboratuvar bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen 2. danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN'e; aldığım eğitim esnasında bilgilerini paylaşan Prof. Dr. A. Kadir DEVRİM'e, Dr. Öğr. Üyesi Özkan DURU'ya, laboratuvar çalışmalarımda destek olan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO öğretim üyesi Doç. Dr. Uğur ÖZDEK, Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör. Ali ŞENOL ve A.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nın öğretim üyelerine; hücre kültürü çalışmalarım esnasında yardım ve desteklerini esirgemeyen, Dr. Yağmur TURGUT, A.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Uzm. Vet. Hekim Recep UYAR'a, bu çalışmayı destekleyen Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (Proje no: 2021/079) ve tüm hayatım boyunca desteklerini hiç eksik etmeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VIII
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Propolis.....	3
1.1.1. Propolisin Tarihçesi.....	5
1.1.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri.....	6
1.1.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği.....	6
1.1.3.1. Fenolik Bileşikler.....	7
1.1.3.2. Propolis Ekstraksiyonu.....	10
1.1.4. Propolisin Biyolojik Etkileri.....	10
1.1.5. Propolisin Antitümör/Antikanser Etkisi.....	11
1.1.6. Propolisin Antioksidan Etkisi.....	12
1.2. Kanser.....	13
1.2.1. Kanser Gelişiminde Etkili Olan Genler.....	14
1.2.2. Kanser Gelişiminde Serbest Radikallerin Etkileri.....	15
1.2.3. Kanserde Tedavi Yöntemleri.....	18
1.3. Kolon Kanseri.....	19
1.4. Kanser Tedavisinde Antioksidanların Etkisi.....	23
1.5. Hücre Kültürü ve Özellikleri.....	25
1.5.1. <i>In Vitro</i> Testlerin Avantajları ve Dezavantajları.....	26
1.5.2. Sitotoksikite Testleri.....	27
1.5.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Hattı.....	27
1.5.4. Tezin Amacı.....	29

2. MATERYAL VE YÖNTEM	31
2.1. Materyal	31
2.1.1. Propolis Örnekleri	31
2.1.2. Kullanılan Hücreler.....	32
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	32
2.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	33
2.1.5. Kullanılan Cihazlar.....	34
2.2. Yöntem.....	34
2.2.1. Propolis Örneklerinin Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi.....	34
2.2.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi.....	34
2.2.1.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi.....	37
2.2.1.3. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini.....	40
2.2.2. Hücre Kültürü.....	41
2.2.2.1. <i>In Vitro</i> Analiz.....	41
2.2.2.2. Hücre Kültürü Deneyleri	41
2.2.2.3. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü	42
2.2.2.4. Caco-2 (HTB37) Hücrelerinin Pasajlanması.....	42
2.2.2.5. Caco-2 (HTB37) Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması.....	43
2.2.2.6. Deney Dizayını.....	44
2.2.2.7. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması ve Hücre Kültürüne Uygulanması.....	44
2.2.2.8. Hücrelerin Canlılık Testi, MTT Analizi.....	47
2.2.2.9. Etkili Konsantrasyonun Hesaplanması.....	49
2.2.2.10. Sitotoksosite Değerlendirmesi.....	49
2.2.3. Hücre Kültür Medyumu TAK ve TOK Düzeylerinin Belirlenmesi	50
2.2.3.1. Hücre Kültür Medyum Çalışması.....	50
2.2.3.2. Hücre Kültür Medyumu TAK Düzeylerinin Belirlenmesi	50
2.2.3.3. Hücre Kültür Medyumu TOK Düzeylerinin Belirlenmesi... ..	51
2.2.3.4. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması.....	51
2.2.4. İstatistik Analizler	51
3. BULGULAR	52
3.1. Sulu ve Etanollü Propolis Ekstraktlarının Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi	52
3.1.1. Propolis Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları.....	53
3.1.2. Propolis Ekstraktlarının Toplam Flavonoid Madde Miktarları.....	54

3.1.3. Propolis Ekstraktlarının CUPRAC Yöntemine Göre Antioksidan Kapasiteleri.....	55
3.2. <i>In Vitro</i> Analiz Bulguları	57
3.2.1. Propolis Ekstraktlarının Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Etkisi ve Morfolojik İnceleme.....	57
3.2.2. MTT Testi Sitotoksosite	58
3.2.2.1. Propolisin Su ve Etanolik Ekstraktlarının Caco-2 Hücreleri Üzerindeki <i>In vitro</i> Sitotoksik Etkisi	61
3.2.3. Propolis Ekstraktlarının Hücre Kültür Medyumunda TAK, TOK ve OSİ Düzeyleri	64
3.2.3.1. Hücre Kültür Medyumu TAK Düzeyleri	64
3.2.3.2. Hücre Kültür Medyumu TOK Düzeyleri	67
3.2.3.3. Hücre Kültür Medyumu OSİ Düzeyleri	69
4. TARTIŞMA.....	71
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	89
KAYNAKLAR.....	90
ÖZGEÇMİŞ.....	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

2.1. Çalışmada Kullanılan Ticari Propolis Örneklerinin Kodları ve Özellikleri.....	31
2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	32
2.3. Tez çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeler.....	33
2.4. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar.....	34
2.5. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada pipetleme işlemi.....	36
2.6. Toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada pipetleme işlemi.....	39
3.1. Su ve etanolik propolis ekstraktlarının TPC, TFC ve CUPRAC, antioksidan kapasiteleri.....	52
3.2. Su ve etanolik propolis ekstraktlarında TPC, TFC ve antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması(n =4).....	53
3.3. Caco-2(HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 24 saatlik inkübasyonunu takiben oluşan IC ₅₀ değerlerinin karşılaştırılması....	62
3.4. Caco-2(HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 48 saatlik inkübasyonunu takiben oluşan IC ₅₀ değerlerinin karşılaştırılması....	63
3.5. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin su ekstraktlarının, NK ve PK'nın TAK düzeyleri.....	65
3.6. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin etanolik ekstraktlarının, NK, etil alkol'ün (C ₂ H ₅ OH) ve PK'nın TAK düzeyleri.....	66
3.7. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin su ekstraktlarının, NK ve PK'nın TOK düzeyleri.....	67
3.8. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin etanolik ekstraktlarının, NK, C ₂ H ₅ OH ve PK'nın TOK düzeyleri.....	68

3.9. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin su ekstraktlarının, NK ve PK'nın OSI düzeyleri	69
3.10. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin etanolik ekstraktlarının, NK, C ₂ H ₅ OH ve PK'nın OSI düzeyleri	70



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Flavonoidlerin genel yapısı	8
1.2. Propoliste bulunan önemli flavonoidlerin kimyasal yapısı... ..	9
1.3. Reaktif oksijen türlerinin oluşum yolları ve dönüşümleri	17
1.4. Çalışmada kullanılan farklı konfluenslikteki Caco-2 hücre hattı, JuLi (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri	28
2.1. Gallik Asit (Su) Kalibrasyon Grafiği.....	36
2.2. Gallik Asit (C ₂ H ₅ OH) Kalibrasyon Grafiği.....	37
2.3. Toplam Flavonoid tayini kalibrasyon grafiği.....	39
2.4. CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH) _n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatinin oluşumu	40
2.5. JuLi TM BL, NanoEntek canlı hücre sayım mikroskobu	45
2.6. Caco-2 hücrelerine propolis ekstraktlarının uygulanması aşaması	47
2.7. MTT-Formazon kristallerinin oluşumu.....	48
2.8. MTT testinde oluşan renk değişimi.....	48
3.1. Ticari propolis örneklerinin toplam fenolik (µg GAE/ml) madde miktarları....	54
3.2. Ticari propolis örneklerinin toplam flavonoid (µgQEs/ml) madde miktarları.....	55
3.3. Propolis su ve etanolik ekstraktlarının CUPRAC yöntemine göre antioksidan kapasiteleri	56
3.4. Caco-2 hücrelerinin mikropakta ilk ekildikleri andaki Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri	57
3.5.a. Propolis su ekstraktlarının 24. saat inkübasyonu takiben Caco-2 hücreleri üzerindeki inhibitör konsantrasyon 50 (IC ₅₀) değerlerinin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. A) P1 _{WEP} B) P3 _{WEP} C) P4 _{WEP} D) NK E) PK.....	58

3.5.b. Propolisin su ekstraktlarının 48. saat inkübasyonu takiben Caco-2 hücreleri üzerindeki inhibitör konsantrasyon 50 (IC ₅₀) değerlerinin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. A) P1 _{WEP} B) P3 _{WEP} C) P4 _{WEP} D) NK E) PK.....	59
3.6.a. Propolisin etanolik ekstraktlarının 24. saat inkübasyonu takiben Caco-2 hücreleri üzerindeki inhibitör konsantrasyon 50 (IC ₅₀) değerlerinin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. A) P1 _{EEP} B) P2 _{EEP} C) P3 _{EEP} D) P4 _{EEP} E) NK F) PK	60
3.6.b. Propolisin etanolik ekstraktlarının 48. saat inkübasyonu takiben Caco-2 hücreleri üzerindeki inhibitör konsantrasyon 50 (IC ₅₀) değerlerinin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. A) P1 _{EEP} B) P2 _{EEP} C) P3 _{EEP} D) P4 _{EEP} E) NK E) PK.....	61
3.7. Caco-2(HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 24 saatlik inkübasyonunu takiben oluşan IC ₅₀ (µg/ml) değerlerinin karşılaştırılması (ortalama/standart hata).....	63
3.8. Caco-2(HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 48. saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC ₅₀ (µg/ml) değerlerinin karşılaştırılması (ortalama/standart hata)	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Al(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	Aluminyum nitrat
APC	Adenomatöz polipozis koli
ATCC	Amerikan ortak kanser komitesi
ATP	Adenozin trifosfat
BHA	2(3)-t-bütil-4-hidroksianisol
BHT	2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen
BRCA	Breast cancer
CA 19-9	Kanser antijen
CACO-2	Kanser coli-2
CAPE	Kafeik asit fenil ester
CAT	Katalaz
CEA	Karsino embriyonik antijen
C ₂ H ₅ OH	Etil alkol
CH ₃ COOK	Potasyum asetat
CRC	Kolorektal kanser
CO ₂	Karbondioksit
Cu	Bakır
CuCl ₂ .2H ₂ O	Bakır klorür
CUPRAC	Bakır (II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite
DMSO	Dimetil sülfoksit
FAP	Adenomatöz polipozis
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
Fe	Demir
GAE	Gallik asit
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-Rx	Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit

H ₂ O	Su
HOCl	Hipokloröz asit
L·	Lipid radikali
LDH	Laktat dehidrogenaz
LOO·	Lipit peroksit radikali
MAE	Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MTT	1-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-3,5-difenilformazon testi
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NCI	Amerikan ulusal kanser enstitüsü
NH ₄ Ac	Amonyum asetat
NK	Negatif kontrol
NO·	Nitrik oksit radikali
NO ₂ ·	Nitrojen dioksit radikali
NR	Nötral red
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
O ₂	Oksijen molekülü
O ₃ ·	Ozon
¹ O ₂	Singlet oksijen
O ₂ ·-	Süperoksit radikali
OH·	Hidroksil radikali
8-OHdG	8-Hidroksi-2-deoksi guanozin
ONOO·	Protonlanmış peroksinitrit radikali
OSI	Oksidatif stres indeksi
PE	Etanolik propolis
PK	Pozitif kontrol
R·	Hidrokarbon radikalleri
RNT	Reaktif nitrojen türleri
RO·	Alkoksil radikali
ROO·	Peroksil radikali
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SRB	Sülforadamin
TAK	Total antioksidan kapasite
TEER	Transepitelyal elektrik direnci
TFC	Toplam flavonoid madde miktarı

TOK	Total oksidan kapasite
TPC	Toplam fenolik madde miktarı
UE	Ultrasonik ekstraksiyon
WHO	Dünya sağlık örgütü



1. GİRİŞ

Günümüzde tıp alanında kullanılan ilaçların yan etkilerinin olması, etkinliğinin azalması ve ekonomik kayıplar gibi birçok olumsuz durumların sonucu olarak hastalık etmenlerinin tedavisinde doğal-bitkisel ilaçlara eğilim artmış (Doğan ve Hayoğlu, 2012; Yücel, Topal, Akçiçek ve Kösoğlu, 2014) ve arı ürünlerinden olan bal, polen, propolis, arı zehiri ve arı ekmeği tamamlayıcı tıpta kullanılır hale gelmiştir (Onbaşı, Çelik ve Kahraman, 2019). Apiterapi, hastalığı önlemek, sağlığı korumak, iyileştirmek ve/veya nüksleri önlemek amacıyla arı ürünlerinden olan bal, polen, propolis, arı zehiri, arı sütü ve balmumu'nun destek ve tedavi amacıyla kullanılmasıdır. Apiterapi Latince apis kelimesinden türetilmiştir. Apiterapi dünya'da yaklaşık 3000 yıldır özellikle Japonya gibi uzak doğu ülkelerinde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Çelik ve Aşgun, 2016). Propolisin içerdiği biyoaktif maddeler bilimsel çalışmalarla bildirilmiş ve insan sağlığı için faydalı olduğu tespit edildiğinden takviye edici gıdalar arasında ilk sıralarda bulunmaktadır (Sağdıç, Karasu ve Göktaş, 2020).

Propolis, arılar tarafından tomurcuk ve bitkilerin eksüdalarından toplanan, arı enzimleri eşliğinde dönüştürülen reçineli bir maddedir (Sforcin, 2007; Wagh, 2013). Propolisin bileşimi genellikle, %50 reçine, %30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 çeşitli diğer bileşiklerden ibaret olup bitki orjinine göre değişiklik göstermektedir (Anjum vd., 2019). Propolisin antimikrobiyal, antiseptik, anti-inflammatuar, antioksidan ve antitümoral etkileri bilinmektedir. Bu biyolojik aktivitelerde temel olarak etkisini içeriğinde bulunan fenolik asitler ve flavonoidler yoluyla oluşturmaktadır. Bu maddeler metalleri şelatlayarak, enzimatik aktiviteyi düzenleyerek, serbest radikalleri temizleme özellikleri gibi farklı biyolojik etkilere sahiptir (Memmedov, Aldemir ve Aliyev, 2017).

Kanser, ortak özelliklerle birleştirilen farklı genetik hastalıkların karmaşık bir topluluğudur (Luo, Solimini ve Elledge, 2009). Diğer bir deyişle kanser, hücrenin

çoğalma hızını kontrol eden mekanizmalara uymayarak kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ile karakterize edilen vücutta yayılma yeteneğine sahip bir hastalık grubudur (Nema vd., 2013; Baskar, Dai, Wenlong, Yeo ve Yeoh, 2014). Kanser ile ilgili bilinen en eski kayıtlar MÖ 3000 yılına dayanmaktadır. Kanser, 'canker' veya 'carcinus' kelimelerinden türemiş ve Latince yengeç anlamına gelmektedir. Hipokrat tümörün etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için ilk defa tümör terimini kullanmıştır. Şişme anlamına gelen 'oncos' terimini ise Yunan doktor Galen kullanmıştır (Baykara, 2016).

Kanser, genlerin ardışık bir dizi mutasyona uğraması ve bu mutasyonların hücre fonksiyonlarını değiştirmesi sonucu meydana gelir. Kimyasal bileşiklerin gen mutasyonları oluşturmada bariz bir rolü vardır. Kanserojen özelliklere sahip çevresel kimyasal maddeler, hücrelerin sitoplazmasını ve çekirdeğini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek genetik bozukluklara ve gen mutasyonlarına yol açmaktadırlar. Virüsler, bakteriler ve radyasyon ışınları tüm kanserlerin %7'sine neden olan kanserojen faktörlerdir (Hassanpour ve Dehghani, 2017).

Her yıl teşhis edilen 1,2 milyondan fazla yeni vaka ile kolorektal kanser (CRC) dünya çapında üçüncü en yaygın kanserdir ve bu nedenle önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilir (Bogaert ve Prenen, 2014). Kolorektal kanser, kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Kadın ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Jemal vd., 2006). Kolorektal kanserde tedavi planlamasında evreleme son derece önemlidir. Erken evrelerde (evre-I, II) cerrahi tedavi yeterli iken ileri evrelerde cerrahi ve kemoterapi nüks ve sağkalım için son derece önemlidir. Nükslerin yaklaşık %80'i tanıdan sonraki ilk üç yılda gerçekleşirken, 5 yıldan sonra nüksleme oranı sadece %1'dir (Haraldsdóttir Einarsdóttir, Smáradóttir, Gunnlaugsson ve Hálfánarson, 2014).

Günümüzde kanser tedavisinde; cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi ve immünoterapi ana yaklaşımlardır. Bu tedavi yöntemleri genellikle bitkisel ilaçlar gibi diğer tamamlayıcı ve alternatif tedavilerle desteklenmektedir. Kemoterapi en çok kullanılan yöntem olmasına rağmen, sınırlı etkinlik, şiddetli toksisite ve çoklu ilaç direnci dahil olmak üzere kullanımıyla ilgili çeşitli problemler vardır (Monteiro vd., 2014). Bilim dünyası kanser tedavisinde sentetik ilaçların etkinliğinin sınırlı oluşu nedeniyle geleneksel tedavi yöntemlerinde bitkisel kaynaklı ilaçlara kayıtsız

kalmamış, son yıllarda bitkilerin tıbbi kullanımıyla ilgili çalışmalar artmıştır (Bozyel, Bozyel, Canlı ve Altuner, 2019). Ayrıca birçok çalışmada, anti- tümör etkilerini arttırmak ve/veya toksisitelerini azaltmak için bitkisel ilaçların veya doğal maddelerin kemoterapötik ilaçlarla kombine tedavisinin kullanımı gösterilmiştir (Monteiro vd., 2014).

1.1. Propolis

Propolis, arılar tarafından tomurcuk ve bitkilerin eksüdalarından toplanan, arı enzimleri eşliğinde dönüştürülen reçineli bir maddedir (Sforcin, 2007, Wagh, 2013). Bal arıları (*Apis mellifera L.*), farklı bitki organlarından topladıkları ve bal mumunu karıştırdıkları reçinelerden propolis üretirler. Propolise aynı zamanda arı tutkalı da denilmektedir (Bankova vd., 2019). "Propolis" terimi Yunan'ca kökenlidir: "pro", "önünde/için" ve "polis", "şehir" anlamında, yani şehrin savunması için önünde/önde giden anlamına gelir (Wagh, 2013). Propolisin kendine has bir kokusu vardır ve ciltteki yağlar ve proteinlerle güçlü bir şekilde etkileşime girerek yapışkanlık özelliği kazanır (Sforcin, 2007).

Ağaç boşluklarında yaşayan yabani arılar, boşluğun içini "propolis zarfı" adı verilen bir propolis tabakasıyla kaplarlar (Bankova vd., 2019). Bir başka ifadeyle, bal arıları arka bacaklarındaki polen sepetinde doğadan topladıkları besin maddelerini depolayarak kovana taşımakta ve kovanda polen, bal ve balmumunu farklı dozlarda yutak enzimleri ile karıştırarak kovan içinde amacına uygun olarak kullanmaktadırlar (Yücel vd., 2014).

Arılar, kovanlarını korumak ve güçlendirmek, yapılarını onarmak ve petekleri örtmek için propolis kullanırlar. Propolis kovanların yağmura, böceklere, kemirgenlere ve yabani arılar gibi istenmeyen misafirlerin kovana girmesini önlemeye yarayan yapışkan bir maddedir. Kovandaki aseptik koşulların ve uygun sıcaklığın (yaklaşık 35°C) korunmasına yardımcı olur. Antiseptik görevinin yanında gereksiz su kaybının önlenmesi sonucu ısı ve nem korunur. Kovandaki propolis, istilacı bakterileri, mantarları ve hatta larvaları öldürmek için bir biyosit görevi görür. Kovanın çevresindeki bitki çeşitliliği, propolisin kimyasal bileşiminin belirlenmesinde ana faktördür (Vagish-Kumar, 2014; Memmedov vd., 2017; Anjum

vd., 2019). Propolis, mikroorganizmalara karşı kimyasal savunma rolü oynar ve kovanda ölen ve arılar tarafından uzaklaştırılmayacak kadar büyük olan böcekler ve küçük hayvanlar için mumyalama görevi görür (Bankova vd., 2019). Bir arı kolonisi bir yılda 150 -200 g propolis üretir (Kuropatnic, Szliszka ve Krol, 2013). Ancak tüm arı türleri aynı derecede propolis üretmezler. Dev bal arısı olarak adlandırılan *Apis dorsata* kolonileri, kovanın yapısını güçlendirmek için propolis kullanırken, *Apis cerana* bunu hiç kullanmamakta, *Apis mellifera* ise propolisi mümkün olan her şekilde kullanmaktadır (Vagish-Kumar, 2014).

Bal arılarının depoladığı propolis, bazı bitkilerin yapışkan salgıları olan zambak, sakız, lipofilik maddeler olabileceği gibi resin, bitki ve ağaçların öz suyu olan sızıntılar da olabilmektedir (Kutluca vd., 2008). Propolisin içeriği toplandığı mevsime ve bitki örtüsüne göre değişiklik gösterebilmektedir (Kumovo, Korkmaz, Avcı ve Ceyran, 2002). Arılar propolisi kavak ve kozalaklı ağaçların reçinelerini toplayarak üretirler. Propolisin bitki kaynağı, mevcut görüşe göre; arıların toplama faaliyetleri gözlemlenerek, propolis ve bitki malzemelerinin kimyasal profilleri karşılaştırılarak tanımlanır. Diğer bir görüş ise, bal arılarının bitki materyallerini vejetatif dokuların parçalarını keserek topladıkları için, propolisteki bitki dokusunun anatomik özellikleri propolisin bitki kaynağını oluşturur. (Huang vd., 2014). Kaynağına göre farklı propolis türleri bildirilmiştir; Ilıman bölge propolisi genellikle kavak propolisidir. Esas olarak *Populus* spp. ağaçlarının tomurcuk salgılarından üretilir. Huş ağacı (*Betulaverrucosa*) propolisi özellikle Rusya'da bulunur ve kavak propolisinden farklıdır. Pasifik (*Macaranga tanarius*) propolis, Tayvan, Japonya ve Solomon Adası'nda bulunan bir propolis türüdür. Brezilya propolisinin çeşitli biçimleri mevcuttur ve yeşil propolis, *Baccharis* spp.'den elde edilir. Kahverengi propolis *Copaifera* spp. türlerinden gelirken, kırmızı propolis *Dalbergia* spp.'den elde edilir (Zabaiou vd., 2017). Propolisin kimyasal bileşiminde farklılıklar olmasına rağmen bazı durumlarda aynı tipte ve büyüklükte etkiye yol açabilmektedir. Bununla birlikte, belirli bir propolis türünün bazı özel uygulama alanlarının tercih edilebilir olarak formüle edilip edilemeyeceğine karar vermek için, kimyasal verilerle birlikte her türlü biyolojik etkisi hakkında ayrıntılı ve güvenilir karşılaştırmalı verilere sahip olmakta son derece önemlidir. Biyolojik testler kimyasal olarak iyi karakterize

edilmiş ve mümkünse kimyasal olarak standartlaştırılmış propolis ile yapılmalıdır. Biyo-analiz güdümlü, kimyasal analize dayalı çalışmalar, propolis araştırmalarında çok umut verici bir eğilimi temsil etmektedir (Bankova, 2005). Standardizasyon sorunu, propolisin gıda ve ilaç endüstrilerinde uygulanmasını sınırlamaktadır (Dantas-Silva vd., 2017).

1.1.1. Propolisin Tarihçesi

Arıların tarihi ve ürünleri yapılan kazılar sırasında bulunan arı ve kovan arıcılığı tasvirleri belli bir bilgi düzeyine ulaşmakta ve M.Ö 3000 yıllarına dayanmaktadır. Kaya resimleri vahşi kolonilerden bal toplamanın en eski kanıtlarıdır. İnsanlar, içi boş kütükler, tahta kaplar, çanak-çömlek kapları ve dokuma hasır sepetlerden yapılan kovanlarda yabani arıları evcilleştirmeye başlamışlardır. Eski Mısır'da arılar ve arıcılıkla ilgili hiçbir yazılı açıklama bilinmemekle birlikte, arkeolojik kazılar, bal arılarının burada tutulduğunu ve arıcılığın ana merkezinin çiçekli bitkilerle dolu geniş sulanan toprakları ile aşağı Mısır olduğunu doğrulamaktadır. Eski zamanlardan beri tanrılar arı ile ilişkilendirilmiş ve firavunların unvanlarından biri de "*Arı Kralı*" olarak ifade edilmiştir. Bazı tapınakların ise, bal, baldan ilaç ve merhem yapılmak üzere arılara tahsis edildiği bildirilmektedir. Antik Yunan'da tarihsel belgelerde sunulan arıcılıkla ilgili en eski kişilik tanrı Apollo'nun oğlu Aristaios'tur. Arıcılığın babası olarak kabul edilen, eski Yunan dininin en esrarengiz figürlerinden biridir. Knossos'ta arkeologlar, kovanlar, tencere, bal özleri ve diğer arıcılık gereçlerini bulmuşlardır (Kuropatnicki vd., 2013).

Mısırlıların antik çağlarda propolisi antiseptik özelliğinden dolayı ölülerini mumyalayarak çürümelerini önlemek amacıyla kullandıkları bilinmektedir (Burdock, 1998; Wagh, 2013). Geleneksel tıpta kullanımı M.Ö 300 yıllarına dayanmaktadır (Sforcin, 2007; Anjum vd., 2019). Propolis, Antik Romalı ve Yunanlı hekimler tarafından sikatrizan (Basista-Sołtys, 2013), inkalar tarafından ise antipiretik olarak kullanılmış ve 17. yüzyıl Londra farmakopesinde resmi ilaç olarak yer almıştır (Sforcin ve Bankova, 2011; Anjum vd., 2019). Ayrıca İtalya'da ahşap korumada cila veya vernikleme amacıyla kullanıldığı, propolis ile cilalanan kemanların 400 yıldan daha fazla dayanarak günümüze kadar ulaştığı bildirilmektedir (Kutluca vd., 2008; Wagh, 2013).

Propolis, bileşimi ve kimyasal etkileri hakkında ilk bilimsel rapor 1908 yılına dayanmaktadır (Anjum vd., 2019). Propolis bilim adamlarının 1960 yıllarında dikkatini çekmiş, pek çok araştırmacı propolisin kimyasal yapısı, biyolojik aktivitesi ve tedavi edici-farmakolojik özellikleri üzerine araştırma ve yayınlar yapmışlardır. Bu konuda ilk çalışmalar Ghisalberti tarafından yapılmış ve 1979 yılında yayınlanmıştır (Doğan ve Hayoğlu, 2012). Propolisin günümüze kadar terapötik kullanımı, kimyasal yapısı, farmakolojisi ve biyolojik etkileri ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Atik ve Gümüş, 2015).

1.1.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin görünümü, toplandığı bitki örtüsüne ve yaşına göre koyu yeşilden kahverengiye varan renktedir (Vagish-Kumar, 2014). Ilıman iklimdeki propolisin kahverengi, tropik bölgelerdeki siyah, menekşe renkli propolisin Küba'da üretilen propolis olduğu (Kutluca vd., 2008) hatta şeffaf propolisin varlığı bile rapor edilmiştir (Wagh, 2013).

Propolisin sıcaklığa bağlı olarak fiziksel özellikleri değişmekte, düşük sıcaklıklarda lipofilik yapısı gereği sert ve kırılabilir bir yapıya sahipken, 20 °C'de mum kıvamında yumuşak ve yapışkan bir özellik kazanmaktadır (Wagh, 2013; Damodaran, 2021). Kısmen eridiği sıcaklık 60-80 °C'de bazı örneklerde ise 100 °C'ye ulaşabilmektedir (Anjum vd., 2019). Propolisin yapışkan özelliği bazı arıcılar için sorun teşkil etmekte ve kovan kazınarak temizlenmektedir (Acun ve Gül, 2020).

Propolisin en temiz toplama şeklinin plastik ya da metalden yapılmış aralarında 3 mm aralık bulunan ve arının geçemeyeceği yarıklar ihtiva eden örtü tahtasının iç kapak yerine kullanılmasıdır. Propolisle kaplanarak derin dondurucularda dondurulup, kırılabilir bir yapı kazanmasıyla kolayca temizlenen bu kapaklar en kolay propolis toplama şeklidir (Kutluca vd., 2008).

1.1.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Kimyasal bileşimi, yerel floraya (bitki kaynağı), farklı coğrafi ve iklimsel alanlardan örneklere, toplama süresine (mevsim/iklim) ve arı türlerine bağlı olduğundan çok değişkendir. Bu doğal üründe birçok ülkeden bildirilen 500'den fazla kimyasal bileşik tespit edilmiştir (Huang, Zhang, Wang, Li ve Hu, 2014). Bu bileşikler içeriğe bağlı olarak değişmekle birlikte, genel olarak propolisin bileşimi; reçine (%50),

balmumu (%8-30), bitki mumu (%6), uçucu yağlar (%10-14), polen (%5), tanen (%10) gibi makro besinleri içermektedir (Wagh, 2013; Anjum vd., 2019). Propolis bileşenlerinde tanımlanan maddeler aşağıdaki kimyasal olarak benzer bileşik gruplarına aittir: polifenoller (flavonoidler, flavonlar, flavonoller ve fenolik asitler); benzoik asitler ve türevleri; sinamik alkol, sinamik asit ve türevleri; seskiterpen ve triterpen hidrokarbonlar; benzaldehit türevleri; diğer asitler ve ilgili türevler; alkoller, ketonlar ve heteroaromatik bileşikler; terpen ve seskiterpen alkoller ve bunların türevleri; alifatik hidrokarbonlar; mineraller; steroller ve steroid hidrokarbonlar; şekerler ve amino asitler ve kaynak bitkiler tarafından üretilen düşük miktarda uçucu bileşenlerdir. Şekerlerin, propolisin hazırlanması ve/veya reçinenin üzerinden arıların geçişi sırasında tesadüfen üretildiği düşünülmektedir. Bazı bileşikler tüm propolis örneklerinde ortaktır ve karakteristik özelliklerini belirlerler (Wagh, 2013; Chiu vd., 2020).

Propoliste bulunan balmumu, petek yapımında kullanılan, genç işçi bal arılarının balmumu bezleri tarafından salgılanan sıvı bir maddedir. Bal ve arı poleni ile temastan sonra balmumunun rengi beyazdan-sarımsı kahverengiye döner. Genellikle balmumu, hidrokarbonlarda dahil olmak üzere 300'den fazla bileşenden oluşur. Bal mumunda oleik asit ve palmitik asit gibi yağ asitleri (%10-12), mono esterler ve hidroksimono esterler (%35-45), kompleks mum esterleri (%15-27), vitaminler (A, B1, B4 ve B6) ve mineraller (Ca, Cu, Fe, K, Mn, Na, P ve Zn)'de bulunur (Nainu vd., 2021). Bal mumuna özel rengini veren krisin de bulunmaktadır (Kurek-Górecka vd., 2014). Ayrıca vitaminlerin (C, A, B kompleks) yanı sıra magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), demir (Fe), nikel (Ni) ve çinko (Zn) gibi bazı temel elementler de bulunmuştur (de Groot, 2013).

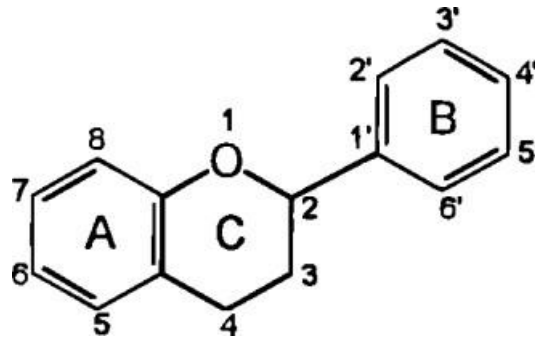
1.1.3.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, basit, düşük moleküler ağırlıklı, tek aromatik halkalı bileşiklerden büyük, karmaşık tanenlere ve türetilmiş polifenollere kadar değişiklik gösterebilen bileşiklerdir. Fenolik bileşiklerden, fenolik asitler ve flavonoidler en fazla miktarda bulunanlardır (Martinello ve Murtinelli, 2021).

Fenolik asitler, aromatik halkanın farklı metilasyonu ve hidroksilasyonu ile çeşitlilik gösterebilmektedir (Martinello ve Murtinelli, 2021). Sinamik asit ve benzoik asit olmak üzere alt gruplara ayrılarak biyolojik olarak farklı etkiler gösterebilmektedir

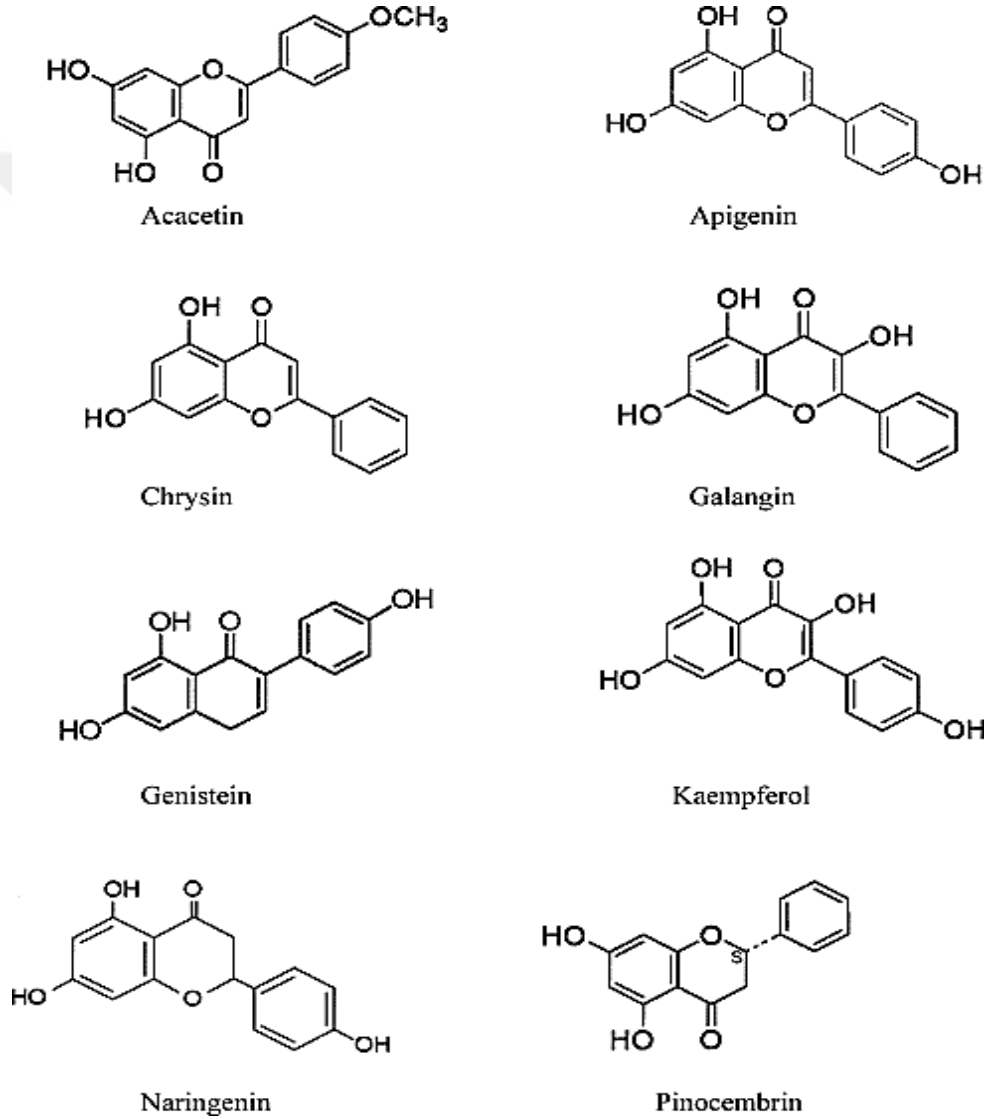
(Karabulut ve Yemiş, 2019). Propolisin fenolik bileşenleri sinnamik alkol, sinnamik asit, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve fenilik asit başlıcaları olarak bulunmaktadır. Propolis içeriğindeki bileşenlerin etki şekli (bileşik etki), tek başlarına oluşturdukları etkilerden daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla ifade edilmektedir (Yücel vd., 2014).

Flavonoidler, sarı anlamına gelen Latince *flavus* kelimesinden türetilmiştir. Bitki dokularının karakteristik kırmızı, mavi ve mor antosiyanin pigmentleridir (Procházková, Bouřov ve Wilhelmov, 2011). Flavanoidler aromatik oksijen içeren heterosiklik yapıda doğal bileşenler ihtiva eden fenolik bir gruptur. Flavonoid iskeleti heterosiklik (C) halka, bir zincirle bağlanmış iki fenolik (A-B) halkadan oluşur. Onbeř karbon atomlu 2-fenil benzopiron (difenilpropan) yapısı (C₆-C₃-C₆) ihtiva ederler. Bu üç karbonlu zincir bazen açık olabilir (Rudrapal vd., 2022; Martinello ve Murtinelli 2021; Atınc e Kalkan, 2018). Flavonoidler, bitkilerin hemen hemen tüm kısımlarından ekstrakte edilebilen bitkilerin polifenol sekonder metabolitleridir. Flavonoidler genel olarak altı sınıfa ayrılır; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavan-3-oller, izoflavonlar ve antosiyaninler, kalkonlar, biflavonlar, kumarinler ve auronlardır. Şimdiye kadar yaklaşık 10.000 flavonoid bilinmektedir ve çeşitli çalışmalar flavonoid ailelerinin antioksidan, prooksidan, antiinflamatuvar, antiviral/bakteriyel, antidiyabetik, kardiyokoruyucu, antikanser ve yaşlanma karşıtı etkilerini desteklemiştir (Grlr Kiraz ve Baran, 2020). Flavonoidlerin genel yapısı Şekil 1.1.' de gösterilmiştir (Procházková vd., 2011).



Şekil 1.1. Flavonoidlerin genel yapısı (Procházková vd., 2011).

Flavonoidler bitkilerdeki fizyolojik rollerinin yanı sıra besin olarak kabul edilmemelerine rağmen insan diyetinin önemli bileşenleridir (Procházková vd., 2011). Propolisten izole edilen flavonoidler aromatik bir halkaya doğrudan bağlanmış bir hidroksil radikali içeren fenolik bileşiklerdir (Vagis Kumar, 2014). Yapısında galangin, kamferol, kuersetin, pinosambrin ve pinobanksin başta olmak üzere 38 tane flavonoid tanımlanmıştır (Yücel vd., 2014). Propoliste bulunan bazı önemli flavonoidlerin kimyasal yapıları Şekil.1.2.'te gösterilmiştir (Volpi ve Bergonzini, 2006).



Şekil 1.2. Propoliste bulunan önemli flavonoidlerin kimyasal yapısı (Volpi ve Bergonzini, 2006).

1.1.3.2. Propolis Ekstraksiyonu

Ham propolis, odun, balmumu, polen ve hatta ölü arılar gibi yabancı maddelerde içerebilir, bu nedenle ekstraksiyondan önce numunelerin makroskopik olarak gözlenmesi ve propolis örneklerinin temizlenmesi gerekir (Sforcin ve Bankova, 2011). Propolisin karmaşık yapısı göz önüne alındığında doğrudan olarak kullanılamaz. Propolis, ticari olarak uygun solvent ile ekstrakte edilirken, inert materyali uzaklaştırmalı ve istenen bileşikleri korumalıdır (Wagh, 2013). Ekstraksiyon yöntemleri, Maserasyon ve soksilet çıkarma gibi geleneksel ekstraksiyon tekniklerinin yanı sıra süperkritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve sonikasyonun (ultrasonik) maksimum biyoaktif kazanımda etkili olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmektedir (Patel, 2016; Bankova, Trusheva ve Popova, 2021). Ekstraksiyon için kullanılan çözücüler; etanol, metanol, kloroform, eter ve aseton gibi uygun çözücüler ile ekstrakte edilirken, (Wagh, 2013) %96'lık etanol ham propolisin en pratik çözücüsüdür (Doğan ve Hayoğlu, 2012). En sık kullanılan çözücü, farklı su yüzdelerini içeren etanol'dür. Etanol'ün (%70) propolisin aktif bileşenlerinin çoğunu ekstrakte ettiği, mumları çözmediği (%20-30 mum içerebilir) bildirilmektedir. Su ise propolisin yaklaşık %10'luk kısmını çözebilmektedir (Sforcin ve Bankova, 2011). Altı ay boyunca maşere edilen propolisin, %70'lik etanolün mutlak etanole göre %20 daha fazla fenolik madde içerdiği, tentürde mum tespit edilmediği bildirilmiştir (Woisky ve Salatino, 1998).

1.1.4. Propolisin Biyolojik Etkileri

Propolis çalışmaları, propolisin bileşimi ve farmakolojisinin karmaşıklığını göstermektedir. Bazı bileşikler bağımsız olarak etki ederken, diğerleri sinerjistik olarak etki etmektedirler (Huang vd., 2014). Propolisin ve bileşenlerinin terapötik potansiyeli, klinik öncesi testlerde farmakolojik etki oluşturan birçok çalışmanın konusu olmuştur. (Daleprane ve Abdalla, 2013). Propolis doğadan arılar tarafından toplanan önemli bir maddedir. İnsanlar çeşitli enfeksiyonlarda propolis'ten yararlanmışlardır. Vazelinle karıştırılarak yara ve doku iyileştirilmesinde merhem olarak, tıbbi mum yerine ise cerrahi müdahalelerden sonra kullanmışlardır (Kumavo vd., 2002). Günümüzde ise propolis ticari olarak diş macunları, pastiller, ağız çalkalama suları, kremler, jeller, öksürük şurupları, sabun, sakızlar, tabletlerin yanı sıra şekerlemeler, şampuanlar, çikolatalar, cilt losyonları, antiseptik karışımlarda

ayrıca gıdaların korunmasında da kullanılabilir (Anjum vd., 2019; Forma ve Brys, 2021). Propolis, arı kovanlarında hijyeni sağlamak ve insan sağlığı için son derece önemlidir (Kumavo vd., 2002).

Propolisin ana bileşenleri balmumu, reçine ve uçucu maddelerdir. Bal arıları balmumu salgılamakta, reçine ve diğer maddeler bitkilerden elde edilir. Bitki materyalini bitki salgılarından veya bitkisel doku parçalarını keserek alırlar. Propolisin biyolojik aktivitesi, bu bitkilerden elde edilen maddelere dayanmaktadır. Bu nedenle, propolis açıkça bir hayvansal ürün olmasına rağmen, bileşenlerinin önemli bir kısmı, özellikle biyolojik aktivitesinin dayandığı bileşenler, bitkilerden türetilmektedir (Salatino, Teixeira ve Negri, 2005). Propolisin şimdiye kadar tanımlanmış aktif bileşenleri polifenoller ve flavonoidler içerir (Daleprane ve Abdalla, 2013). Bitki kaynaklı polifenolik bileşiklerde, yaklaşık 10000 doğal analogla en büyük grubu flavonoidler oluşturur. Bunlar parlak renkli (sarı'dan kırmızı'ya) pigmentler olarak bulunan hidrosillenmiş aromatik bileşiklerdir. Çeşitli çalışmalar flavonoid ailelerinin antioksidan, prooksidan, antiinflamatuvar, antiviral/bakteriyel, antikanser ve yaşlanma karşıtı etkilerini desteklemiştir (Gürler vd., 2020).

Bu nedenle ki propolisin genel biyolojik özellikleri, bileşenlerinin doğal bir karışımından kaynaklanmakta ve tek bir propolis bileşeninin toplam ekstraktından daha büyük bir aktiviteye sahip olmadığı yapılan çalışmalarla bildirilmektedir (Sforcin ve Bankova, 2011).

1.1.5. Propolisin Antitümör/Antikanser Etkisi

Doğal ürünler, kanser kemoterapisi'nde birçok uygulama alanı bulan zengin bir bileşik kaynağıdır. Ayrıca, doğal bileşiklerin geniş yapısal spektrumu, moleküler modifikasyon yoluyla terapötik iyileşme için öncü bileşikler sağlayabilir. Antikanser bileşiklerinin %70'inden fazlası ya doğal ürünler ya da doğal ürünlerden elde edilen maddelerdir. Ayrıca, toksik doğal ürünlerin monoklonal antikörelere veya polimerik taşıyıcılara konjugasyonu, daha etkili hedefe yönelik tedavilere yol açabilir. Biyolojik deneylerde propolisin farklı çözücüler (etanol, metanol, su) kullanılarak yapılan özütlerinde, farklı bileşiklerin çözüldüğü bildirilmektedir. Sudaki çözünürlüğünün düşük olması, minimal sistemik biyoyararlanımı nedeniyle kanser ve diğer hastalıklarda klinik uygulamasını sınırlandırmaktadır. Son dönemde

uygulanmaya başlanan nanopartikül bazlı dağılım yaklaşımları, propolis gibi hidrofobik ajanların sulu ortamda çözünürlüğünü artırmaktadır. Propolisin etanolik özütü, (EEP) fenolik asitlerin ve flavonoidlerin en zengin kaynaklarından biridir (Watanabe, Amarante, Conti ve Sforcin, 2011). Propolis ve bileşenleri antikanser aktiviteye sahiptir (Forma ve Brys, 2021). Terapötik etkilerinin çoğu, immünomodülatör fonksiyonlarına dayanmaktadır. İki ana kimyasal kafeik asit fenil esteri (CAPE) ve 3,5-diprenil-4-hidroksisinamik asit (artepillin-C) tanımlanmıştır. Bu iki bileşik T lenfosit alt kümeleri üzerinde immüno-supresif etkiler gösterirken, makrofaj fonksiyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. Öte yandan anti-enflamatuar etkileri yoluyla kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamak, kanser kök hücre popülasyonlarını azaltmak, spesifik onkojen sinyal yollarını bloke etmek, anti-anjiyojenik etkiler uygulamak gibi propolis için farklı etki mekanizmaları tanımlanmaktadır (Vagis-Kumar, 2014). Ayrıca propolisin bu bileşikleri, antikanser etkisini hücre döngüsünün durdurulması ve anti-anjiyogenez etkisiyle hastalığın yayılımını engelleyerek göstermektedirler. Propolis, tümör hücrelerinde DNA sentezini durdurarak, tümör hücrelerinde apoptozise neden olmaktadır. Galangin, kardanol, nemoroson ve krisin gibi diğer bileşikleri, tümör hücrelerinin hızlı bölünmesini önleyerek etki göstermektedirler (Anjum vd., 2019).

Propolisin bileşimi coğrafi ve farklı faktörlere bağlı değişmektedir. Bu nedenle, propolisin güvenli kullanımı için kemopreventif doz aralıklarının bilinmesi önemlidir. Doğal bir madde olan propolis, alerji riski dışında çok az yan etkiye sahiptir. Bu yan etki, alerjiden sorumlu bileşenler ortadan kaldırılarak en aza indirilebilir. Propolisin güvenli kullanımı için kapsamlı klinik insan deneyleri düşünülmelidir (Vagis Kumar, 2014).

1.1.6. Propolisin Antioksidan Etkisi

Antioksidan, “hedef molekülde oksidatif hasarı geciktiren, önleyen veya ortadan kaldıran herhangi bir madde” olarak tanımlanmaktadır. Bu tanıma göre, bu bileşiklerin fizyolojik rolü, serbest radikalleri içeren kimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak ortaya çıkan hücrenel bileşenlere verilen zararı önlemektir (Procházková vd., 2011). Bu amaçla propolis kullanımının insan sağlığı üzerinde büyük etkisi vardır (Anjum vd., 2019). Propolis içeriğinde bulunan zengin fenolik bileşikleri nedeniyle birçok biyolojik aktiviteye sahip olmakla birlikte, güçlü

antioksidan ve antiinflamatuvar etkiye de sahiptir (Memmedov vd., 2017). Propolis antioksidan özelliğinin mekanizması, hidrojen iyonları veren fenolik bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Propolis antioksidan etkisini, serbest radikalleri temizleyerek lipidlerin, nükleik asitlerin ve proteinlerin oksidasyonunu engelleyerek gösterir (Anjum vd., 2019). Sarı propolis etanolik özütünün 3 aylık wistar sıçanlara uygulamasının antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) seviyelerinde herhangi bir değişim olmadan nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) seviyelerinde düşüş göstermiştir (Zabaiou vd., 2017).

1.2. Kanser

Kanser, Dünya’da ve Türkiye’de ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Küresel olarak yaklaşık her 6 ölümden biri, ülkemizde ise her 5 ölümden biri kanser nedeniyledir (Gültekin, 2016). Genel olarak kanser, tüm toplumların sağlığını etkileyen ciddi bir sorundur. Erkeklerde en fazla görülen kanser türleri prostat, akciğer ve CRC görülürken, kadınlarda, meme, akciğer, CRC ve uterus’tur. Çocuklarda ise kan, beyin ve lenf bezleriyle ilgili kanserlerdir (Hassanpour ve Dehghani, 2017). Dünya Sağlık Örgütü’ne (WHO) göre kanser, batı ülkelerinde ikinci ölüm nedeni olarak nitelendirildiği ve dünya çapındaki ölümlerin %63’ünden sorumlu olan bulaşıcı olmayan hastalıkları temsil ettiği bildirilmektedir (Monteiro vd., 2014).

Kanser, çoklu hücrel sinyal yollarındaki ortak değişikliklerle birleşen heterojen genetik hastalıklar topluluğu olarak tanımlanabilir (Monteiro vd., 2014). İnsan vücudu yaklaşık olarak 10^{15} hücreye sahiptir. Bu hücreler organ ve dokuları yenilemek için bölünür, çoğalır ve ölürlür. Ancak hücrelerin bölünmesi ve ölümleri arasındaki dengenin bozulması hücrelerin kümeleşerek tümör oluşmasına neden olmaktadır. Ancak, tüm tümörler kanserli değildir. İyi huylu tümörler ciddi hastalıklara neden olmazken, kötü huylu tümörler vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler. Kanseri hücrelerinin vücudun bir bölümünden diğer bir bölümüne yayılmasına *metastaz* denir. Kötü huylu tümörler *atak* ve *metastaz* yapabilirken, iyi huylu tümörler bu özelliklere sahip değildir (Nema vd., 2013).

Kanser evrimsel bir hastalıktır. Çok hücreli organizmalar, hücrelerin iş birliği yapmasını ve yalnızca gerektiğinde bölünmesini sağlamak için karmaşık sinyal iletim

yollarına ve gen düzenleme ağlarına sahiptir. Kansere oluşumu sürecinde, tek tek hücreler bu tür ağları değiştirirler (Komarova, Sengupta ve Nowak, 2003). Kalıtım (ebebeynlerden genlerle aktarılan) yoluyla meydana gelen kanserler %10-15'lik kısmı oluştururken, %85-90'lık kısmın ise çeşitli mutajenlerin DNA dizisinde hatalara neden olmasıyla oluştuğu düşünülmektedir. Kansere multifaktöriyel'dir. Kimyasal-fiziksel etmenler, bakteri-viruslar, beslenme alışkanlığı, radyasyon gibi çeşitli faktörler kansere neden olabilmektedir. Çevresel faktörlerin etkisi kalıtım yoluyla kansere meydana gelme olasılığına göre çok daha fazladır (Yokuş ve Çakır, 2012).

1.2.1. Kansere Gelişiminde Etkili Olan Genler

Kansere oluşumunda etkili olan 3 gen grubu bulunmaktadır (Baykara 2016). Kansere proto-onkogenlerdeki, tümör baskılayıcı genlerdeki ve DNA onarım genlerindeki somatik veya kalıtsal mutasyonlar neden olmaktadır (Komarova vd., 2003).

Proto-onkogenler, hücrenin büyümesi ve farklılaşmasını sağlayan normal genlerdir. Çeşitli mutasyonlar, kromozomal yeniden düzenlemeler ve/veya gen duplikasyonları, artmış gen ifadesi gibi nedenlerle etkin hale gelip onkogen haline dönüşebilirler. En bilinen onkogenler kolon kanserinde RAS, akut kan kanserinde C-MYC, kronik kan kanserinde Bcr, gibi genlerdir. Kronik kan kanseri genellikle yaşlılarda 9-22 kromozom arasındaki genetik materyal değişimi nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu durum hastaların %95'inde doğru tanıyı kolaylaştıran ph1 adlı biyobelirteç üretilmesine yol açar. (Baykara, 2016; Hassanpour ve Deghghani, 2017).

Tümör baskılayıcı genler, hücrelerin büyüme düzenleyici veya farklılaşma yollarına katılır. İşlevlerinin kaybı, hücrenin fenotipini kansere hücre olmaya doğru değiştirir. Tipik olarak, bir tümör baskılayıcı genin her iki kopyasının da etkisiz hale getirilmesi gerekir. Tümör baskılayıcı genlerin örnekleri, insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında mutasyona uğrayan p53, ailesel meme kanserinde rol oynayan RB1, retinoblastoma duyarlılık geni, BRCA1 ve BRCA2'dir (Komarova vd., 2003). Sporadik CRC, Adenomatous Polyposis Coli (APC) adı verilen bir tümör baskılayıcı genin inaktivasyonunun kolorektal adenom ve karsinomların yaklaşık %70-80'inde başlatıcı olduğu görülmektedir (Fearon, 2011).

DNA tamir genleri, DNA hasarı sırasında gerekli proteinleri o bölgeye çekerek gerekli onarımın yapılmasını sağlayarak etki ederler. Böylece gen işlevini yeniden kazanmış olur. DNA'da gerekli tamir yapılamadığı takdirde hücrenin apoptotik veya nekrotik yolla ölümünü gerçekleştirirler. Meme kanserinin oluşmasına neden olan BRCA (breast cancer) en çok bilinen DNA tamir genidir (Baykara, 2016).

Kanserin ayırt edici özellikleri, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında kazanılan biyolojik özellikleri içerir. Weinberg vd., 2000'leri 'proliferatif sinyalleme'yi sürdürmek (büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilme), büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, hücre ölümüne direnmek (apoptozis), replikatif ölümsüzlüğü sağlamak (sınırsız bölünebilme ve çoğalmayı sağlamak), anjiyogenez (damarlanmayı) indüklemek ve istila ve metastazı (yayılımı) aktive etmek gibi 6 kanserin ayırt edici özelliğini rapor etmişlerdir. Aynı yazarlar 2011'de ortaya çıkan iki ayırt edici özelliği, yani enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık yıkımından kaçınma'yı tanımlamışlardır (Dai, Xiang, Li ve Bai, 2016). Bu işaretlerin altında yatan olay, genetik çeşitliliği yaratan genom kararsızlığı ve mutasyon, bu da tümörü destekleyen inflamasyonu kolaylaştırmaktadır (Monteiro vd., 2014; Dai vd., 2016).

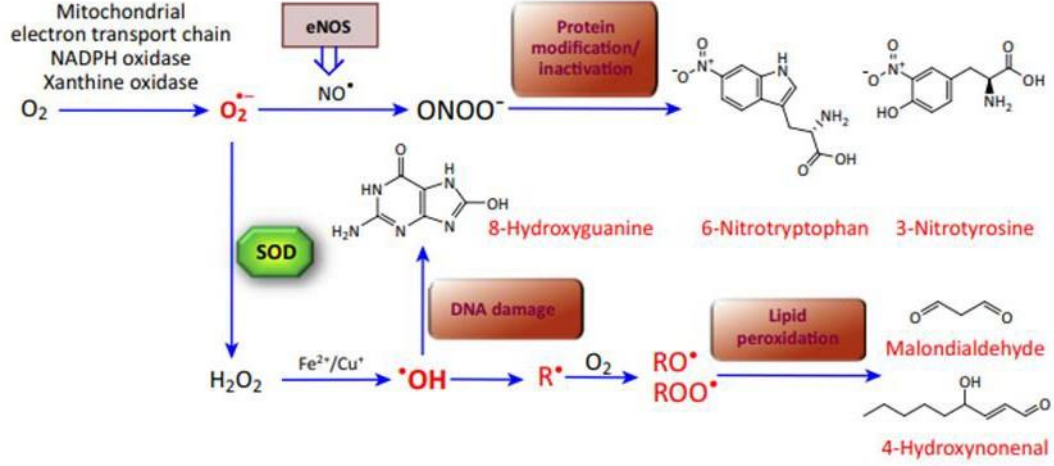
Normal dokular, hücre büyüme ve bölünme döngüsüne girişte ilerleme talimatı veren büyüme teşvik eden sinyallerin üretimini ve salınımını dikkatli bir şekilde kontrol eder, böylece hücre sayısı, normal doku ve fonksiyonunun korunması sağlanırken, kanser hücreleri bir dizi alternatif yolla proliferatif sinyalleme'yi sürdürme kabiliyetini elde edebilirler (Hanahan ve Weinberg, 2011). Hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi koordineli süreçler değiştirilir ve bu spesifik özelliklere sahip değiştirilmiş hücre fenotipleri üretilir (Monteiro vd., 2014). Ayrıca kanser, çoklu biyolojik değişiklikleri içeren uzun süreli ve anormal biyolojik olaylarla ilişkilendirilen çeşitli biyobelirteçler geliştirilmiş ve moleküler epidemiyolojik çalışmalara entegre edilmiştir (Au, 2007).

1.2.2. Kanser Gelişiminde Serbest Radikallerin Etkileri

Hücreler serbest radikalleri, reaktif oksijen türlerini (ROT) ve reaktif nitrojen türlerini (RNT) metabolik süreçlerin bir parçası olarak sürekli üretirler (Karabulut ve Gülay, 2016). Serbest radikaller, eşlenmemiş elektrona sahip atom veya moleküller

olarak tanımlanırlar (Valko vd., 2007; Lawson vd., 2017). Serbest bir elektronun varlığı nedeniyle, bu moleküller oldukça reaktiftir (Nema vd., 2013). Bir elektronu verebilir veya diğer moleküllerden bir elektron alabilir. Bu nedenle oksidan veya redüktan gibi davranabilirler. Birçok hastalık durumunda serbest radikaller, hidroksil (OH \cdot), süperoksit (O $_2$ \cdot -), hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$), ozon (O $_3$ \cdot), singlet oksijen (1 O $_2$), nitrojen dioksit (NO $_2$ \cdot), NO \cdot , hidrokarbon radikalleri (R \cdot), alkoksil (RO \cdot), peroksil (ROO \cdot) lipit (L \cdot), protonlanmış peroksinitrit (ONOO \cdot), hipokloröz asit (HOCl) ve lipit peroksit radikali (LOO \cdot)'dir (Poprac vd., 2017; Lawson vd., 2017). Hücrelerde ROT'lar hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonların bir sonucu olarak üretirler. Enzimatik reaksiyonlar solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde elektron sızıntısı meydana getiren reaksiyonlardır (Lobo, Patil, Phatak ve Chandra, 2010). Reaktif nitrojen türleri ise çeşitli biyolojik süreçlerde anahtar roller oynar. Nitrik oksit (NO \cdot) bir eşlenmemiş elektron içerir bu nedenle de radikaldir. NO \cdot kan basıncının düzenlenmesi, düz kas gevşemesi, bağışıklık savunma mekanizmalarını düzenleme dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir sinyal molekülüdür. NO \cdot biyolojik dokularda spesifik nitrik oksit sentazları tarafından üretilir. Reaktif nitrojen türlerinin aşırı üretimi nitrozatif stres olarak adlandırılır (Lawson vd., 2017). Hücrenin yaşaması ve metabolizması için adenozintrifosfatın (ATP) üretilerek karbonhidratların, proteinlerin ve lipitlerin parçalanması sağlanır. Oksidatif fosforilasyon, ATP ve su (H $_2$ O) veren, oksijen (O $_2$) varlığında iki elektron meydana getiren reaksiyonlardır. Bununla birlikte, besin fazlalığı koşullarında veya elektron taşıma zincirinin bileşenleri değiştirildiğinde, tek elektronlar sızıntı yapabilmektedir. Sızıntının ilk ürünü ROT'lar ve O $_2$ \cdot 'dir. Süperoksit radikali düşük reaktiviteye sahip bir molekül olduğundan oksidatif hasara neden olmaz fakat membran geçirgen olan katalitik demir (Fe) ve bakır (Cu) varlığında fenton reaksiyonu yoluyla OH \cdot 'üreten güçlü bir oksidan olan H $_2$ O $_2$ ile birlikte kendiliğinden ayrışır. Oksidatif stres sırasında, oksidanlar ve antioksidan seviyelerdeki dengesizlik makromoleküllerde oksidatif hasar ile sonuçlanır (Ademowo, Dias, Burton ve Griffiths, 2017; Poprac vd., 2017). Reaktif oksijen türleri üretim kaynağı olan mitokondri, lipidler, DNA ve proteinler üzerinde fizyolojik düzeyde yararlı etkileri olurken bu düzeyin patolojik seviyeye ulaşmasıyla zararlı etkiler göstermektedirler (Valko vd., 2007; Strzelczyk ve Wiczowski, 2012). Ayrıca ROT ve RNT'nin oluşumu; radyasyon, enflamasyon,

normalden yüksek O₂ basıncı, O₃, NO₂, kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle de artar (Flora, 2009; Gupta vd., 2014; Orea ve Akinyole, 2019).



Şekil 1.3. Reaktif oksijen türlerinin oluşum yolları ve dönüşümleri (Poprac vd., 2017).

Reaktif oksijen türleri DNA'daki nükleotidler, proteinlerdeki sülfidril grupları ve ribonükleoproteinler (çapraz bağlanması/parçalanması) ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olabilirler. Reaktif oksijen türlerinin DNA'ya verdiği hasar, kanserin başlıca nedeni olarak geniş çapta kabul görmüştür. Oksidatif DNA hasarının neden olduğu mutasyonlar arasında bir dizi yapısal değişimler meydana gelmektedir. Bunlar, pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma, alkali kararsız bölgeler, tek zincir kırıkları ve onarım süreçleriyle oluşan kararsızlık yer alır. Bu modifiye bazların bazılarının mutajenik özelliklere sahip olduğu, eğer tamir edilmezlerse (Waris ve Ahsan, 2006), premutajenik özellik göstererek hasarlı DNA'nın kopyalanması sonucu tümör gelişebileceği bildirilmektedir. Ayrıca ROT'lar protein ve lipid peroksidasyonu'na neden olarak plazma membranının yapısında değişiklikler oluşturabilir. Reaktif oksijen türleri membrandaki protein kinazları, büyüme faktörleri ve reseptörlerini etkileyerek sinyal iletimini, onkogen aktivasyonunu ve baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu sağlayarak onkogenler ve kanser oluşumuna neden olmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kanser gelişimi, bir hücrede meydana gelen çoklu olaylarla karakterizedir ve 3 aşamada (başlangıç, gelişme ve ilerleme) meydana gelir. Başlangıç (inisiyasyon)

aşamasında metal katalizli (fenton) reaksiyonlar sonucu oluşan OH[·] dir (Lawson ve ark. 2017). Hidroksil radikalının, deoksiriboz molekülü ve azotlu bazlar ile reaksiyonu DNA zincirlerinin hem tek hem de çift kırıklarını oluşturur (Strzelczyk ve Wiczowski, 2012). Gelişme (promosyon) aşamasında, hücre çoğalmasının indüklenmesi ve/veya programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) inhibisyonu ile başlatılan hücrelerin klonal genişlemesidir. Bu aşamada tümör büyümesi ROT ile indüklenmektedir. Bu aşama enzimatik endojen antioksidanlar (CAT, GSH-Px) ile tersine çevrilebilir. İlerleme (progresyon) aşaması ise geri dönüşümsüzdür (Lawson vd., 2017). Hem hayvan modellerinde hem de insanlarda idrar'da 8-hidroksi 2-deoksiguanozinin (8-OHdG) seviyesi, oksidatif DNA hasarının önemli bir biyobelirteci olarak kabul edilir (Henkler, Brinkmann ve Luch, 2010; Strzelczyk ve Wiczowski, 2012). Ayrıca tümör boyutu ile idrada bulunan 8-OHdG seviyesi arasında doğrudan bir korelasyon olduğuda da bildirilmiştir (Lawson vd., 2017).

Biyolojik sistemlerde ROT/RNT vücutta yaşla birlikte birikerek olumsuz değişiklikler meydana getirirler. Bu değişiklikler, genetik ve çevresel faktörler tarafından belirlenen belirli yaşlarda hastalıklar olarak kendini gösterir. İki ana ölüm nedeni olan kanser ve ateroskleroz belirgin "*serbest radikal*" kaynaklı hastalıklardır (Lobo vd., 2010).

1.2.3. Kanserde Tedavi Yöntemleri

Günümüzde kanserle savaşta cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi çeşitli tedavi biçimleri, immünoterapi ve viroterapi gibi yeni tedavi yöntemleri kullanılmasına rağmen kemoterapi hala en yaygın ve ilk tedavi seçeneğidir. Bununla birlikte, bu tedavilerin her birinin kendi dezavantajları ve çeşitli hastalıklarla sonuçlanan yan etkileri de vardır (Monteiro vd., 2014; Vagis-Kumar, 2014; Jing vd., 2020). Kemoterapötik ajanlar büyük ilerleme kaydetmiş olsada, kemoterapi ilaçlarına direncin ortaya çıkması tedavi başarısızlığına, kanserin nüksetmesine ve metastaza yol açmaktadır. Kemoterapi ilaçlarına karşı direnç kanser hastalarındaki ölümlerin %90'dan daha fazlasında sorumlu olduğu bildirilmektedir (Jing vd., 2020). Radyoterapi (RT), iyonizan ışınlarla kanserli hücreleri öldürmeye yarayan yöntemdir. Tedavide vücudun belli bir bölgesi hedef alınarak yapılabildiği gibi, bütün vücuda uygulanan tedaviler de vardır. Radyoterapi, genellikle cerrahi müdahale öncesinde uygulanarak tümörün küçültülmesi hedeflenir. Radyoterapide

hedef kanserli hücrelerin öldürülerek tümörün küçülmesidir. Ancak RT'nin dezavantajlarından birisi kanserli hücreleri öldürürken sağlıklı hücreleri de öldürmesidir (Baykara, 2016). Propolisin antioksidan etkilerinin büyük bir kısmı biyoaktif bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Flavonlar, izoflavonlar, flavonoidler, antosiyaninler, kumarinler, lignanlar, kateşinler ve izokateşinlerin gibi doğal ürünler kanser hücrelerini öldürerek etki ettikleri gibi, kemoterapi ve RT'nin toksik yan etkilerini azaltabilir veya en aza indirebilirler (Nema vd., 2013).

Bitkilerin kanser tedavisinde uzun bir kullanım geçmişi vardır ve yeni ilaçların önemli bir kaynağı olmaya devam etmektedir. Bitkisel ilaçlar, geleneksel ajanları hassaslaştırmada, hasta sağ kalım süresini uzatmada, kemoterapinin yan etkilerini önlemede akciğer kanseri hastalarında yaşam kalitesini iyileştirmede yararlı ve etkili olmaları nedeniyle, 453 akciğer kanseri hastası ile yakın zamanda yapılan bir kohort çalışması, geleneksel kemoterapi ile birlikte bitkisel ilaçları kullanan hastaların yüzdesinin yaklaşık %77 olduğunu bildirilmiştir (Monteiro vd., 2014). Propolis, bu amaçla araştırılan doğal etkenlerden biridir ve antitümör etkisi, yapısında bulunan flavonoidlerine atfedilmektedir (Vagis-Kumar, 2014).

1.3. Kolon Kanseri

Kolon kanseri anatomik ve embriyolojik olarak, proksimal kolon kanseri, distal kolon kanseri ve kolonun son kısmını oluşturan rektumda gözlenir. Proksimal kolon, orta bağırsaktan, distal kolon ve rektum ise arka bağırsaktan kaynaklanır ve üçü birlikte CRC olarak adlandırılır (Bogaert ve Prenen, 2014).

Kolorektal kanser, çevresel ve yaşam tarzı faktörlerini, sıralı genetik değişiklikleri ve farklı coğrafi alanlarda muhtemelen viral bileşenleri içeren, karmaşık çok aşamalı bir süreçtir. Moleküler kusurlar iki tiptir: onkogenlerin yeni veya artan işlevine yol açan değişiklikler ve tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybına yol açan değişikliklerdir. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu lokalize mutasyonlardan, genin tamamen kaybından veya gen ekspresyonuna müdahale eden epigenetik değişikliklerden kaynaklanabilir. Kolorektal kanserlerde sadece somatik gen mutasyonları tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar, kolorektal kanserlerin gelişiminde rol oynarlar (Fearon ve Vogelstein 1990; Fearon, 2011). Kolorektal kanser, gastrointestinal sistemin

malignitesi en yaygın olan, mortalite ve morbiditenin kanser hastalarında ana nedenlerinden biridir (Manoğlu, Altun, Yavuzşen ve Aktaş, 2019).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan 2018 verilerine göre erkeklerde Dünya’da ve Türkiye’de CRC 3. sırada, kadınlarda ise Dünyada 2. Türkiye’de 3. sırada yer almaktadır (Gültekin, 2016). Dünyada, CRC erkeklerde tüm kanser vakalarının %9,4’ünü ve kadınlarda ise %10,1’ini etkilemektedir. Bununla birlikte, CRC tüm dünyada eşit derecede yaygın değildir. Batılı ülkelerde (Kuzey Amerika, Avrupa’nın bazı bölgeleri, Avustralya ve Yeni Zelanda) kolorektal kanser erkeklerde tüm kanser vakalarının %12,6’sını ve kadınlarda %14,1’ini etkilerken, Asya ve Afrika’da CRC, erkeklerde ve kadınlarda tüm vakalarının sırasıyla %7,7’sini ve %7,9’unu oluşturmaktadır (Boyle ve Langman, 2000).

Moleküler genetik alanında son otuz yılda yapılan çalışmalar sporadik ve kalıtsal CRC formlarının patogenezi’nin altında yatan bazı kritik mutasyonları ortaya çıkarmıştır. Nispeten sınırlı sayıda onkogen ve tümör baskılayıcı gen en belirgin olarak *APC*, *KRAS* ve *p53* genler, CRC’lerin büyük bir bölümünde mutasyona uğramıştır ve CRC’lerin alt kümelerinde mutasyona uğramış daha geniş bir gen ailesi tanımlanmaya başlamıştır. Bu mekanizmalar DNA metilasyonu ve kromatin yapısı değişiklikleri ile birlikte mutasyonlar, hücre metabolizmasının düzenlenmesi, çoğalma, farklılaşma ve hayatta kalma dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmaktadır (Fearon, 2011).

Kolorektal kanserlerin gelişiminde genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi önemlidir (Haraldsdóttir ve ark. 2014). Kolorektal kanserin %35’i kalıtsal faktörlere bağlıdır (Granados-Romero vd., 2017). Lynch sendromu olarak bilinen polipozsuz kalıtsal kolon kanseri tüm vakaların %2-5’ini oluşturur. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) tüm vakaların %1’inden daha azdır. Lynch sendromlu hastalarda kolonun sağ tarafında bir tümörle (vakaların %70’inde) daha genç yaşta (ortalama 45 yaş) teşhis edilme olasılığı daha yüksektir (Haraldsdóttir vd., 2014). Kötü DNA bağlanma / eşleşme, yanlış eşleşme onarım genleri (MMR) geninden birindeki germ hattı mutasyonunun neden olduğu en yaygın kalıtsal kolon kanseri sendromu’dur. MMR uyumsuzluk, onarım özellikle MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 genlerindedir. MLH1 ve MLH2’deki mutasyonlar çoğunluktadır (Granados-Romero vd., 2017). Bu durum CRC ve endometriyal kanser riskini artıran, otozomal dominant genetik bir hastalıktır (Bogaert ve Prenen, 2014).

Ailevi Adenomatöz Polipozis, (FAP)'a neden olan bir gen, adenomatous polyposis coli'den (APC) tanımlanan ve kolorektal kansere yatkınlık yaratan durumdur. Klasik olarak kalın bağırsakta 100'den fazla adenomatöz polip ve mikro adenomların varlığı ile karakterize otozomal dominant bir durum olarak tanımlanır. Polip sayısına göre FAP alt grupları tanımlanmıştır: seyrek (polip sayısı 100-500 arasında), bol (> 2.000) ve zayıflatılmış (10-100) tür. Çok çeşitli ekstraintestinal belirtiler gözlemlenebilir.

Kemik, diş ve deri anomalileri, gardner sendromu'nu karakterize eder. Turcot sendromu (TS), kolorektal kanser ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin birlikteliğiyle karakterizedir (Baglioni ve Genuardi, 2004). Erken yaşlarda teşhis edilip tedavi edilmezse, poliplerin başlangıcından 10 yıl sonra kolon kanserinin ortaya çıkmasıyla 40 yaşına kadar kolorektal kanser geliştirme riski %100'dür (Fareon, 2011; Bogaert ve Prenen, 2014). Çoğu hastanın ailesinde hastalık öyküsü vardır, ancak yaklaşık %25'i APC geninde 'de novo gen mutasyonları olarak ortaya çıkar. APC geninin 1000'den fazla farklı mutasyonu, FAP'nin bir nedeni olarak tanımlanmaktadır. Bu mutasyonlar (örneğin, ekleme, silme, anlamsız mutasyon), kesilmiş bir APC proteini ile sonuçlanır. Normal bireylerde, APC tümör baskılayıcı protein, β -katenin yıkımını düzenleyerek Wnt sinyal yolunda merkezi bir rol oynar. β -katenin, çoğalma genleri için bir transkripsiyon faktörü görevi görür. Onkojenik protein β -katenin birikimi, APC-gen ürünü tarafından önlenir, böylece bağırsak kripteitel hücrelerinin proliferasyonu kontrol edilir. APC genindeki mutasyon, APC fonksiyonunun kaybına yol açar ve β -katenin birikimi ile sonuçlanır. Kanser geliştirmek için, bir APC mutasyonunu diğer mutasyonlar takip edebilmektedir (Bogaert ve Prenen 2014). Erişkin hastalarda erken dönemde kolonun profilaktik olarak çıkarılması FAP için klinik tedavinin temel dayanağını oluşturmaktadır (Fareon, 2011).

Kolon ülseri öyküsü olan hastalar, ülseratif kolit ve crohn hastalığı gibi bağırsakların iltihabi hastalıkları kolon kanseri riskini artırmaktadır (Haralldsdóttir vd., 2014). İyi huylu bağırsak mukozanın üzerinde çıkıntı yapan lokalize lezyonlara yaygın olarak polip denir. İnsanlarda kolorektal poliplerin çoğu, özellikle boyutu 5 mm'den küçük olan poliplerin kolorektal kanserlerin majör öncüsü olmadığını göstermektedir; daha ziyade, adenomatöz polip veya adenom, muhtemelen önemli öncü lezyondur. Adenomlar glandüler epitelden kaynaklanır ve displastik morfoloji ve lezyondaki epitel hücrelerinin değişmiş farklılaşması ile karakterize edilir (Fearon, 2011). Hastalık, yüksek dereceli displazi ile ilerlemiş bir adenoma dönüşen ve daha

sonra invaziv bir kansere ilerleyen iyi huylu bir adenomatöz polip olarak başlar (Markowitz ve Bertagnolli, 2009). Çoğu tümörler rektumda (%37) ve sigmoidal kolonda (31) lokalize'dir. Çıkan kolonda daha az sıklıkta (%9), çekum'da (%8), inen kolon'da (%5), enine kolon'da (%4) görülürken, hepatik açı (%4) ve dalak açısı (%2)'dir. Kolon kanserlerinin yaklaşık %65'i dalağın distalinde yer alır ve sigmoidoskopi ile yüksek oranda tespit edilebilir. Sigmoidal ve proksimal kolon kanserlerinin %35'i sigmoidoskopi ile tespit edilememektedir (Granados-Romero vd., 2017).

Erken tanı için CRC tarama yöntemleri değişiklik gösterebilir. Tanı kaynaklarının maliyeti ve bulunabilirliği, programı etkileyen önde gelen faktörlerdir. Kolonoskopi, CRC taraması için "altın standart" olarak kabul edilse bile çoğu ülkede daha fazla kaynak gerektirdiği için daha az uygulanabilir. Bu nedenle, yapısal incelemelere göre daha az duyarlı olmasına rağmen, ucuz ve uygulaması kolay olan gaitada gizli kan testi (FOBT), dünyanın birçok bölgesinde daha uygulanabilir bir CRC tarama seçeneğidir. Elli yaş ve üzeri orta riskli grupta adenomatöz poliplerin ve CRC'nin saptanması için mevcut tarama önerileri, yüksek hassasiyetli guaiac veya immünokimyasal tabanlı bir testle yıllık dışkı kan testi, her 5 yılda bir sigmoidoskopi, her 10 yılda bir kolonoskopi, her 5 yılda bir çift kontrastlı baryumlu lavman veya her 5 yılda bir bilgisayarlı tomografik kolonografi çeşitli risk seviyeleriyle ilişkili invaziv prosedürlerdir (Center, Jemal, Smith ve Ward, 2009).

Kolorektal kanserin sınıflandırılması Dukes tarafından açıklanan evreleme yöntemleri ve Amerikan Ortak Kanser Komitesinin (AJCC) açıkladığı TNM sistemine göre ne kadar yaygın olduğuna dayanmaktadır. Kanserin derecesi bağırsak duvarına tümör invazyonunun derinliği (T), yakındaki etkilenen lenf düğümlerinin sayısı (N) ve kanserin vücudun diğer organlarına metastaz (M) yapıp yapmadığına göre belirlenir (Dursun ve Paşaoğlu, 2018). Erken evredeki hastaların büyük bir kısmında cerrahi tedavi edicidir (Haraldsdóttir vd., 2014). Kolon duvarı içinde sınırlı invaziv kanserler (tümör-düğüm evre I ve II) tedavi edilebilir, ancak tedavi edilmezlerse bölgesel lenf düğümlerine yayılırlar (evre III) ve sonra uzak bölgelere metastaz yaparlar (evre IV). Evre (I ve II) tümörler cerrahi olarak çıkarılarak tedavi olmakla birlikte, ileri evrelerdeki pek çok hasta için cerrahi yeterli olmamaktadır. Bu hastaların çoğu, nüksetmeyi önlemek veya sağ kalımı artırmak için kemoterapiye ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca (evre III) hastalıklarının %73'e kadarı kemoterapi

ile kombine cerrahi olarak tedavi edilebilir. Kemoterapideki son gelişmeler sağ kalımı artırmakla birlikte ancak evre IV hastalık genellikle tedavi edilememektedir (Markowitz ve Bertagnolli, 2009).

Hastalığın takibinde spesifik biyobelirteçler kullanılmaktadır. Bunlar karsino embriyonik antijen (CEA), kanser antijen 19-9 (CA 19-9), mikro satellitin stabilite (MSI), v-Ki-ras2 Kirstenrat sarkoma, viral homolog onkogen (KRAS), p53 proteini (dolaşan DNA ve RNA'da) ve dolaşan tümör hücreleri (CTCs)'dir (Manoğlu vd., 2019). Ayrıca hipalbuminemi'de (<3.5 g/dl) kötü prognozun önemli bir biyobelirteçidir (Granados-Romero vd., 2017).

Çoğu CRC, yaşam tarzı ve artan yaşla ilişkilidir ve vakaların sadece küçük bir kısmında altta yatan bir bozukluk vardır (Kim, Ha, Yoon ve Lee, 2014). Kolorektal kanser, batılı yaşam tarzıyla güçlü bir şekilde ilişkilendirilmektedir. Spesifik beslenme faktörlerinin rolü hakkında tartışmalar olsada, diyet modelinin bir bütün olarak dikkate alınması, fazla miktarda kırmızı ve işlenmiş et, yüksek oranda rafine edilmiş tahıllar, nişastalar ve şeker tüketimi kolorektal kanser riskini artırabilmektedir (Chan ve Giovannucci, 2010).

1.4. Kanser Tedavisinde Antioksidanların Etkisi

Reaktif oksijen türlerinin canlı sistemlerde zararlı veya faydalı olabilen türler olarak ikili rol oynadığı bilinmektedir. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin zararlı etkileri, bir yandan aşırı ROT/RNT üretimi, diğer yandan antioksidan enzimlerin veya düşük moleküler ağırlıklı antioksidanların eksikliğinde ortaya çıkmaktadır. ROT/RNT'nin faydalı ve zararlı etkileri arasında sürekli ve hassas bir denge vardır. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres, ROT/RNT oluşumu ile bir organizmanın bu reaktif ara ürünleri detoksifiye etme veya neden oldukları hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir (Pisoschi ve Pop, 2015; Poprac vd., 2017). Oksidatif hasara karşı geliştirilen antioksidan savunma sistemleri, ROT'ların oluşumunu önleyen ve oluşan radikalleri bloke etmek suretiyle yakalayan moleküllere "antioksidanlar" denir (Pisoschi ve Pop, 2015).

Antioksidanlar; yapılarına göre; enzimatik ve enzimatik olmayanlar (Lobo vd., 2010), çözünürlüklerine göre; lipitte ve suda çözünenler, organizmadaki yerlerine

göre; ekstrasellüler ve intrasellüler, kaynaklarına göre; eksojen ve endojen olmak üzere farklı şekilde sınıflandırılmaktadır (Pisoschi ve Pop, 2015).Vücudun serbest radikallere karşı hücresele düzeyde doğal olarak ürettiği enzimatik endojen antioksidanlar; CAT, SOD, glutasyon (GSH), glutasyon-peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon-redüktaz (GSH-Rx)'dır. Endojen, enzimatik olmayan antioksidanlar ise, Vitamin E (α -tokoferol), β -karoten, melatonin, bilirubin, albümin, ferritin, transferrin vb.'dir. Sağlık açısından önemli diyetle alınan ekzojen, antioksidanlar ise, A ve C vitaminleri, folik asit, fenolik bileşikler ve flavonoidlerdir (Valko vd., 2007).

Antioksidanlar dört farklı şekilde etki ederler: i. Toplayıcı etki; ROT'ları etkileyerek daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, ii. Bastırıcı etki; ROT'larla etkileşip bir hidrojen atomu katarak aktivitelerinin azalması veya inaktif şekle dönüşmeleri, iii. Zincirkırıcı-engelleyici etki; ROT'ları bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını kaybetmelerini sağlayarak, iv. Onarıcı etki; ROT'ların oluşturdukları hasarın onarılmasıdır (Valko vd., 2007; Lobo vd., 2010; Gupta vd., 2014).

Antioksidanlar bu etkilerini iki şekilde göstermektedirler. Serbest radikalleri ve ROT/RNT'leri doğrudan etkileyerek, süpürücü etki ya da serbest radikalleri veya bunların ara ürünlerini zararsız moleküllere metabolize ederek dolaylı etki olarak göstermektedirler (Lobo vd., 2010). Serbest radikallerin uzaklaştırılması; enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar ile gerçekleştirilir. Enzimatik endojen antioksidanlar; SOD, GSH-Px, GSH-Rx, CAT ve diyetsele antioksidan bileşikler (A, E ve C vitaminleri, GSH vb.) ile kontrol altında tutulmaya çalışılan serbest radikallerden GSH-Px ve CAT H_2O_2 'yi suya indirger (Lawson vd., 2017; Poprac vd., 2017).

Kanserden korunmada çevresel faktörler ve beslenme alışkanlıkları oldukça önemlidir (Yokuş ve Çakır, 2012). Doğal olarak bitki kaynaklarında bulunan birçok antioksidan bileşik, ROT/RNT'leri daha az reaktif türlere dönüştürerek temizleyebilmektedir (Lobo vd., 2010; Lawson vd., 2017). Yapılan hayvan çalışmaları, diyetdeki fitokimyasallarda bulunan antioksidanların serbest radikalleri giderebildiklerini göstermiştir. Bunlar arasında fenolikler, flavonoidler ve kateşin gibi polifenolik bileşikler güçlü antioksidan etkileri nedeniyle serbest radikalleri temizleyerek çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve/veya tedavisinde etkindirler (Fang, Yang ve Wu, 2002). Flavonoidlerin Fe ve Cu gibi metal iyonlarını şelatlama yetenekleri serbest radikallerin gelişimini engellemektedir. Özellikle, kuersetin Fe

şelatlayıcı ve stabilize edici özellikleriyle bilinir. (Procházková vd., 2011). Antioksidanların dokuya özgü dağılımı ve biyoyararlanımı farklılık gösterebilmektedir. Flavonoidlerin gastrointestinal sistemde doğrudan emilebilmeleri nedeniyle gastrointestinal sistem kanserlerinde faydalı etkileri vardır. Örneğin, bir flavonoid olan kuersetin gastrointestinal sistemde doğrudan emilirken, O₂ varlığında ayrıştığı için ana formunda diğer hedef dokulara ulaşması oldukça zordur. Ancak bazı araştırmacılar flavonoidlerin hafif pro-oksidanlar olarak hareket ederek, GSH gibi endojen antioksidanların sentezini tetiklemek suretiyle genel hücresel antioksidan kapasitesinin arttırabileceği bildirilmektedir (Poprac vd., 2017).

Antioksidan yönünden zengin besinler ve tıbbi bitkilerin diyet ile alımının hastalıkların görülme sıklığı arasında ters bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Lobo vd., 2010). Hastalıkların önlenmesinde antioksidanların kullanımına ilişkin raporların çoğu *in-vitro* çalışmalara dayanmaktadır. Antioksidanların *in-vivo* koşullar altında nasıl davrandığı ise son derece karmaşıktır. Antioksidanların etki bölgesi, diğer antioksidanlar ve/veya redoks metalleri ile etkileşimi ve kısmi oksijen basıncı son derece önemlidir (Poprac vd., 2017). Finlandiya'da yürütülen bir çalışmada (Poprac vd., 2017), α -Tokoferol ve β -Karoten; erkek sigara içen hastalara uygulanmış, 20 mg β -karoten takviyesinin akciğer kanseri insidansını %18 artırdığı tespit edilmiştir. Karotenoidler gibi bazı antioksidanların, oksijenin düşük kısmi basıncında antioksidan özellikler sergilerken, oksijenin kısmi basıncının yüksek olduğu akciğerler gibi bazı dokularda pro-oksidan davranış sergileyebildiği bildirilmiştir.

1.5. Hücre Kültürü ve Özellikleri

Hücre kültürü, bu yöntemin temel ilkesi, çok hücreli canlılara ait hücrelerin laboratuvar koşullarında yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Bu amaçla özel tasarlanmış kaplar içerisinde hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeler, amino-asitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspanse edilerek steril, 37°C'de ve % 5CO₂'li ortamda bekletildiğinde hücrelerin kabın çeperine yapışarak üremesi sonucu oluşan yapıya hücre kültürü denir. Hücre kültürleri *primer* ve *sürekli* hücre kültürleri olarak ikiye ayrılır. Primer hücre kültürü, dokulardan hücrelerin tripsin vasıtasıyla ayrıştırılarak elde edilen hücrelerin *in-vitro* üretilmeleri ile elde edilen kültürlere denir. Üreyebilme yetenekleri birkaç pasajla sınırlıdır. Sürekli hücre kültürü ise habis tümörlerden elde edilirler. Teorik olarak sonsuz pasajları yapılırken

laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar (Çiçek ve Bilgiç, 2006; Tokur ve Aksoy, 2017).

Hücre kültürünün 1907 yılında Harrison tarafından keşfi hayvan hücrelerinin vücut dışında incelenmesine imkan sağlamıştır. Harrison, kurbağayı hayvan modeli olarak seçmiş ve vücut dışında doku parçalarının canlılığını korumasını amaçlamıştır. Bu çalışmalar başka araştırmacılar ile devam etmiş 1943 yılında Earle ve arkadaşları tümör hücrelerini farelerden izole etmişler ve Leonard Hayflick 1961 yılında kültür ortamında hücrelerin sınırlı yaşam süresinin olabileceğini bildirmiştir (Koçaklı, Akıllıoğlu ve Doğan, 2015).

Sürekli hücre kültürü ABD’de servikal kanser nedeniyle takibi yapılan Afrika kökenli bir hastanın kanser doku kültürünün 1951 yılında Dr. George Gey tarafından laboratuvar ortamında üretilmesiyle başlamış ve Henrietta Lack adındaki hastanın ölümsüz hücrelerinin kültürü adına atfen adının baş harfleri olan HeLa hücresi adını alarak dünyada pek çok laboratuvarda araştırmalarda kullanılmıştır (Akçalı, 2010).

Günümüzdeki hücre kültür modelleri (insan ve hayvan) 2300’den fazladır. Ticari olarak hücre kültürleri sağlanabildiği gibi, araştırmacılar cerrahi operasyon sonrasında çıkarılan doku örneklerinden ya da gönüllülerden özel olarak hücre kültürlerini oluşturabilmektedirler (Saygı, 2003).

1.5.1. *In Vitro* Testlerin Avantajları ve Dezavantajları

In vitro sitotoksosite deneyleri, seri pasajlarla elde edilen hücre tiplerinin homojenliği nedeniyle uygulanan kimyasalların dikkatli bir şekilde kontrol edilmesini sağlar. Fizyolojik olarak çevre ve örnekleme tutarlılığı ve tekrarlanabilir verilerle ilaç konsantrasyonu ve maruz kalma süresi kontrol edilebilir. Ekonomiktir çünkü *in-vivo* deneylerden daha az reaktif ve zaman gerektirir (Freshney, 2001).

Hücre kültürlerinde bu avantajlarının yanı sıra, bazı dezavantajlar da vardır. Hücre kültür çalışmalarında en büyük dezavantaj kontaminasyondur. Kültür ortamında çeşitli bakteri ve mantar oluşumu hücrelerin gelişimini etkilemekte ve çoğalmasını yavaşlatmaktadır. Bu durumu en aza indirmek için çalışmaların uygun steril şartlar altında yapılması gerekmektedir (Koçaklı vd., 2015).

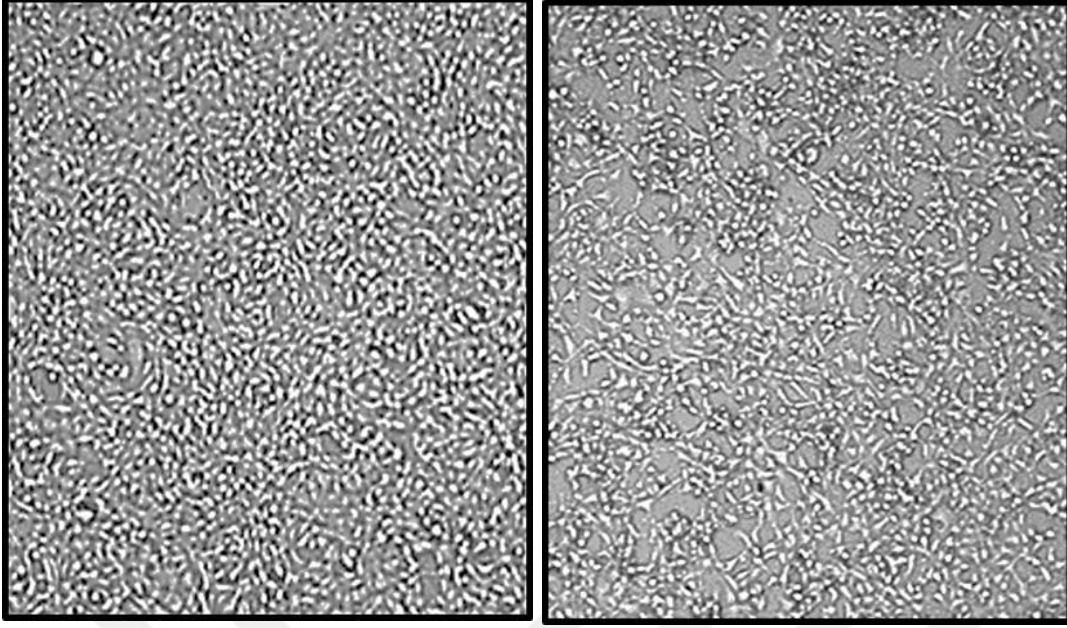
1.5.2. Sitotoksosite Testleri

Hücre kültüründe hücre canlılığı ve proliferasyonunu incelemek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Hücre bazlı testler, test moleküllerinin hücre proliferasyonu üzerinde etkileri olup olmadığını veya hücre ölümüne yol açan doğrudan sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için MTT, ATP, LDH, NR gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. MTT ölçümü ilk kez Mossman (1983), tarafından tanımlanmış *in vitro* koşullarda sitotoksositeyi ölçmek için hızlı, ucuz, hashas ve güvenilir kolorimetrik kantitatif bir yöntemdir. Çalışmamızda sitotoksosite analizi Caco-2 kanser hücrelerinde MTT testi ile gerçekleştirildi (Mossman, 1983; Tokur ve Aksoy, 2017).

1.5.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Hattı

➤ Caco-2 Hücre hattı

Caco-2 (*Cancer coli-2*), Sloan-Kettering Kanser Araştırma Enstitüsünde Jorgen Fogh tarafından 1977 yılında insan kolorektal adeno karsinomundan izole edilmiştir. Kanser gelişimindeki mekanizmaları ve sitoterapinin etkilerini incelemek amacıyla 1970'lerde mide-bağırsak tümörlerinden birkaç epitel hücre hattı kurulmuştur. Hücre hatlarının birçoğu, ortama sentetik veya biyolojik faktörlerin eklenmesiyle kısmen farklılaşabilmektedirler. Ancak insan bağırsak Caco-2 hücre hattı, farklılaştırıcı faktörlerin takviyesi olmadan hücre kültüründe kendiliğinden farklılaşırlar ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları için bağırsak bariyerinin bir modeli olarak yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Lea, 2015).



Şekil 1.4. Çalışmada kullanılan farklı konfluenslikteki Caco-2 hücre hattı, JuLi (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri.

Kuruluşundan bu yana geçen 35 yıl boyunca, Caco-2 hücreleri dünya çapında bir dizi laboratuvarında çoğaltılmıştır. Farklı kültür koşulları ve farklı pasaj sayıları nedeniyle, Caco-2 hücreleri sıklıkla farklı özellikler kazanmıştır. Bu nedenle, enterositlere özgü farklılaşma belirteçlerinin ifadesi, artan sayıda pasajla değişir (Lea, 2015). Normal bağırsak epitelinde birkaç farklı hücre tipinden oluşur ve gen ekspresyon profillerindeki farklılıklar sadece tüm gastrointestinal sistem boyunca mukozal epitelde değil, aynı zamanda kript-villus ekseninde de gözlenir (Anderle vd., 2005). Açıkçası, Caco-2 hücre modelindeki deneylerin veri analizi, *in vivo* durumla doğrudan karşılaştırılamaz. Yinede, Caco-2 modeli gibi bağırsak epitel hücre modelleri, laboratuvarlar arası sonuçların karşılaştırılmasına izin veren basitliği ve tekrarlanabilirliği nedeniyle birçok avantaja sahiptir (Lea, 2015).

Caco-2 hücreleri, olgun bağırsak enterositlerinin morfolojik (polarize kolumnar epitel) ve fonksiyonel özelliklerini ifade etmek için kendiliğinden farklılaşır. Polarize Caco-2 hücre katmanı, HT29 tek katmanlarına kıyasla 4 kat daha yüksek transepitelyal elektrik direnci (TEER) değerleri gösterir, yani *in vivo* duruma daha çok benzerdir. Caco-2 hücreleri, normal epitelde bulunan amino peptidaz, esteraz ve sülfataz gibi çoğu reseptörü, taşıyıcıyı ve ilaç metabolize edici enzimleri eksprese eder (Lea, 2015). Caco-2 hücre hattı, bağırsak fizyolojisini incelemek ve *in vitro*

hücre kültürü testleri yapmak için en iyi seçeneklerden biri olduğu bildirilmektedir (Natoli, Leoni, D’Agnano, Zucco ve Felsani, 2012).

1.5.4. Tezin Amacı

Doğal ürünlerin sağlığın korunması ve/veya hastalıkların tedavisi için kullanımının uzun bir geçmişi vardır. Antik çağlarda çeşitli uygarlıklar hastalıkları tedavi etmek için doğal ürünleri kullanmışlardır. Propolis günümüzde sadece sağlığı korumak amacıyla kullanılmamakta, bilinçli/bilinçsiz olarak çeşitli tedavilere destek olmak amacıyla kullanılmaktadır (Silici, 2019). Bu nedenle ticari olarak propolis ekstraktlarının biyoaktif bileşenleri, kalite parametreleri ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Kosalec, Pepeljnjak, Bakmaz ve Vladimir-Knezević, 2005; Herrera, Alvear, Barrientos, Montenegro ve Salazar, 2010; Keskin, 2018; do Nascimento vd., 2018; Keskin ve Kolaylı, 2019; Sağdıç vd., 2020; Kolaylı, Kara ve Can, 2020; Oruç, Çaycı, Sorucu, Uzabacı ve Nyandwi, 2021).

Yakın tarihli çalışmalar, doğal arı ürünlerinin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak potansiyel bir antikanser aktiviteye sahip olabileceğini bildirmektedir. Heinrich vd., (2008)’e göre, *in vitro* yöntemler, doğal ürünlerin olası yararlı biyolojik etkilerinin ön araştırması için faydalı olduğunu bildirmiştir (Sforjin ve Bankova, 2011). Sıklıkla, uygun hücresel modellerin kullanıldığı *in vitro* testler, daha ileri ilaç testlerinin güvenliğini sağlamak için ilk adım olarak seçilirler (Lavinias vd., 2019). Ayrıca, Heinrich vd., (2008)’e göre bu tür *in vitro* testler pozitif sonuçlar verirse, klinik açıdan anlamlı veri üretmek için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini önermiştir (Sforjin ve Bankova, 2011).

İnsan Caco-2 hücre hattında ve farklı hücre hatlarında ham propolisin farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş sitotoksik etkinliğini araştıran çalışmalar bulunmaktadır (Choudhari, Haghniaz, Rajwade ve Paknikar, 2013; Daikh vd., 2020; Badria, Fathy, Fatehe, Elimam ve Ghazy, 2017; Badria, Fathy, Fatehe, Ahmed ve Ghazy, 2018; Onbas, Kazan, Nalbantsoy ve Yesil-Celiktas, 2016; Russo vd., 2004; Ishihara, Naoi, Hashita, Itoh ve Suzui, 2009). Bununla birlikte ticari propolis örneklerinde farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalar da mevcut (Biray, Gündüz, Yılmaz, Şahin ve Topçuoğlu, 2006; Czyżewska, Siemionow, Zaręba ve Miltyk, 2016) olmakla birlikte ticari olarak satışa sunulan yerli üretim propolis

ekstraktlarının sitotoksik etkinliğini araştıran çalışma sınırlı sayıdadır (Sarıkahya vd., 2021). Sulu ve etanolik ekstraktlarda çözünen ticari Türk propolis örneklerinde Caco-2 hücre hattında sitotoksik ve antioksidan etkisini gösteren çalışmalara rastlanmamıştır. Bu alandaki eksikliği gidermek ve ilerde yapılacak çalışmalara ışık tutması düşüncesiyle, bu çalışma, ülkemizde ticari olarak satılan yerli üretim propolis örneklerinin (Su ve etil alkolde çözünen) toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı, CUPRAC, antioksidan kapasitesi ve *in vitro* analizleri Caco-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkinliğinin araştırılması ve hücre kültür mediumunda TAK, TOK ve OSİ değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Kanser tedavisinde kullanılan bileşiklerin %70'inden fazlası ya doğal ürünler ya da doğal ürünlerden elde edilen maddelerdir (Watanabe vd., 2011). Bu nedenle araştırmadaki ticari propolis ekstraktlarının biyolojik etkinliğinin yüksek olması ve içerdiği fenolik bileşiklerin (fenolik asitler, flavonoidler ve aromatik bileşikler) antioksidan aktiviteleri nedeniyle kanser hücrelerinde sitotoksik etki oluşturabileceği, çalışmanın hipotezini oluşturmaktadır. Son yıllarda sağlığımızın korunmasında beslenme desteğinin önemi artmış, nutrasötikler (nutraceuticals) ve doğal sağlık ürünleri ile yapılacak *in vivo* ve toksikolojik çalışmalar için tez bulgularının yol gösterici olması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı *In Vitro* ve Toksikoloji Laboratuvarları'nda yürütüldü. Kimyasal ve sarf malzemeler Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından 2021/079 no'lu proje ile desteklendi.

2.1. Materyal

2.1.1. Propolis Örnekleri

Bu çalışmada, Türkiye'de üretilen ve ticari olarak satılan propolis örnekleri (4 adet su ekstraktı, 4 adet etanolik ekstrakt) olmak üzere toplam 8 adet propolis ekstraktı örneği raflardan satın alınarak +4 °C'de buzdolabında bekletildi. Çalışmada kullanılan ticari propolis ekstraktlarının markaları verilmemiş olup örnekler su (WEP) ve etanolik (EEP) olarak kodlanarak numaralandırıldı. Ürünlerin etiketlerinde beyan edilen bilgiler ve ambalaj şekilleri Çizelge 2.1. 'de verildi.

Çizelge 2.1. Çalışmada Kullanılan Ticari Propolis Örneklerinin Kodları ve Özellikleri

Ürün	Etiket Beyanı	Ambalaj şekli
P1-WEP	Su bazlı propolis ekstraktı (alkol içermediği beyan edilmiştir)	Damlalıklı şişe
P2-WEP	Organik su bazlı propolis ekstraktı (glikol içermediği beyan edilmiştir)	Damlalıklı şişe
P3-WEP	Su bazlı propolis (herhangi bir kimyasal kullanmadan alkolsüz tekniklerle üretildiği beyan edilmiştir)	Kapaklı şişe
P4-WEP	Su bazlı damla (Distile su, organik propolis, glikol, koruyucu, renklendirici içermediği beyan edilmiştir)	Damlalıklı şişe
P1-EEP	Likit propolis ekstraktı (distile su, etanol (gıda sınıfı) ile hazırlandığı beyan edilmiştir)	Damlalıklı şişe
P2-EEP	Organik propolis (glikol içermediği beyan edilmiştir) propolis, su ve etanol ile hazırlanmıştır.	Damlalıklı şişe
P3-EEP	Sıvı propolis ekstraktı	Damlalıklı şişe
P4-EEP	Organik Propolis, propolis ekstrakt damla (distile su, etanol ve propolis ile hazırlanmıştır)	Damlalıklı şişe

2.1.2. Kullanılan Hücreler

Bu çalışmada kullanılan Caco-2(HTB37), kolorektal adeno karsinoma hücre hattı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'ndan sağlandı.

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez Çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.2.'de gösterildi.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Gallik asit	Sigma	7384
Sodyum molibdat dihidrat ($\text{Na}_2\text{Mo}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck	31439
Sodyum tungustat dihidrat ($\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck	1.06673
Fosforik asit (%85)(H_3PO_4)	Merck	1.00573
Hidroklorik asit (%37) (HCl)	Merck	1.00314
Lityum sülfat (Li_2SO_4)	Merck	1.05694
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Merck	6398
Brom (Br_2)	Merck	101945
Kuersetin	Sigma-Aldrich	117-39-5
Alüminyum nitrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	Merck	101063
Potasyum asetat (CH_3COOK)	Merck	104820
Etil Alkol	Merck	100983
Bakır (II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck	M102733
Amonyum asetat (NH_4Ac)	Merck	101116
Neocuproin(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)	Sigma-Aldrich	N1501
BHT (2,6-di- <i>t</i> -bütil-1-hidroksitoluen)	Sigma-Aldrich	B-1378
BHA (2(3)- <i>t</i> -Butyl-4-hydroxyanisole)	Sigma-Aldrich	B-1253
PBS (Phosphate buffer saline, 7.4 pH, 1X)	Biological Industries	02-023-1A10010-13
Fötal Sığır Serum (FBS)	Gibco	10500-064
% 1 penisilin/streptomisin çözeltisi (Penisillin G Sodyum Tuzu:10000 units/ml, Streptomisin Sülfat 10mg/ml)	Biological Industries	03-031-1B
DMEM (1x) Dulbecco's Modified Eagle Medium 4.5g/L D-Glucose, L-Glutamine (+) Pyruvate	Biological Industries	01-052-1A
1X Triton(%0,25),EDTA(%0,05) B Solusyonu	Biological Industries	BP151-500
% 0.25 Tripsin(1mM'lık EDTA içerisinde)	Biological Industries	03-050-1B

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler (Devamı)

MTT((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma	M5655
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck	L238412
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma	D2650-5x10
Azot gazı (N ₂)	Ildam	CRYO YDS-10
Rel Assay® (TOS, TAS Kiti)	Yerli	

2.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 2.3’de gösterildi.

Çizelge 2.3. Tez çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeler

Kullanılan Sarf Malzeme Adı	Üretici Firma
Hücre Kültürü Flaskları (25, 75’lik)	Sarstedt
96 kuyucuklu hücre kültürü plakası	Sarstedt
24 kuyucuklu hücre kültürü plakası	Sarstedt
Kriyotüp (Hücre Kültürü için)	Sarstedt
Steril Falkon Tüpler (15-50 ml)	NEST Scientific
Filtreli Pipet Uçlar	Sarstedt
Maske	Yerli
Nitril Eldiven	Yerli
Serolojik steril pipetler, 5-10 ml	Sarstedt
Pipet ucu (10-200 µl’lik sarı ve 100-1000 µl’lik mavi)	Italian Spa
Ependorf tüp (1.5 ml)	Lp Italiana®
Steril filtre (0.22 µm)	MS®PES Syringe Filte

2.1.5. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar Çizelge 2.4’de yer almaktadır.

Çizelge 2.4. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar

Çalışmada Kullanılan Cihaz Adı	Üretici Firma
Laminar Akımlı Kabin	Holten.1,8
37°C %5 CO ₂ ’li Etiv	Nüve
JuLi Hücre Mikroskobu	NanoEntek
SpectraMax i3 Spektrofotometre	Molecular Devices (ABD)
Su Banyosu	Nüve
Otoklav	Panasonic
-80°C Dondurucu	Panasonic
+4°C ve -20°C Buzdolabı	Panasonic
Distile Su Cihazı	Merck Millipore
Ultra-Santrifüj	ThermoFischer Scientific
Ultra Distile Su Cihazı	Merck Millipore
Güç Kaynağı	BioRad
Hassas Terazı	Yerli
Azotlu Evaporatör	VLM
Vorteks	Yerli
Mikropipet 1000µl	Eppendorf
Mikropipet 100µl	Eppendorf
Mikropipet 25µl	Eppendorf
Mikropipet 10µl	Eppendorf
Mikropipet 1µl	Eppendorf

2.2. Yöntem

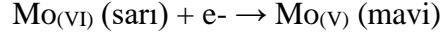
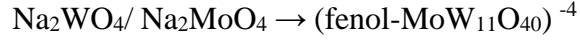
2.2.1. Propolis Örneklerinin Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi

Propolis örneklerinin antioksidan testleri; TPC, TFC ve CUPRAC antioksidan kapasite analizleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

2.2.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Propolis örneklerinde, Slinkard ve Singleton (1977) tarafından bildirilen spektrofotometrik yöntem modifiye edilerek TPC madde miktarı belirlendi. Total

fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak yapıldı. Yöntemin ilkesi, fenolik bileşiklerin bazik ortamda FCR'yi indirgeyip kendilerinin yükseltgenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin-Ciocalteu reaktifi burada yükseltgeyici bileşik olarak rol almaktadır.



Toplam fenolik madde miktarı, reaksiyon sonucunda indirgenmiş ayıracın oluşturduğu mavi rengin fotometrik olarak ölçülmesiyle, analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarının hesaplanması ile ifade edilmektedir. Renk oluşumuna dayalı olan bu yöntemde ekstraktların sahip olduğu toplam fenoller gallik asit eşdeğeri olarak ($\mu\text{gGAE/ml}$) hesaplandı (Slinkard ve Singleton, 1977).

➤ **Kullanılan Çözeltiler**

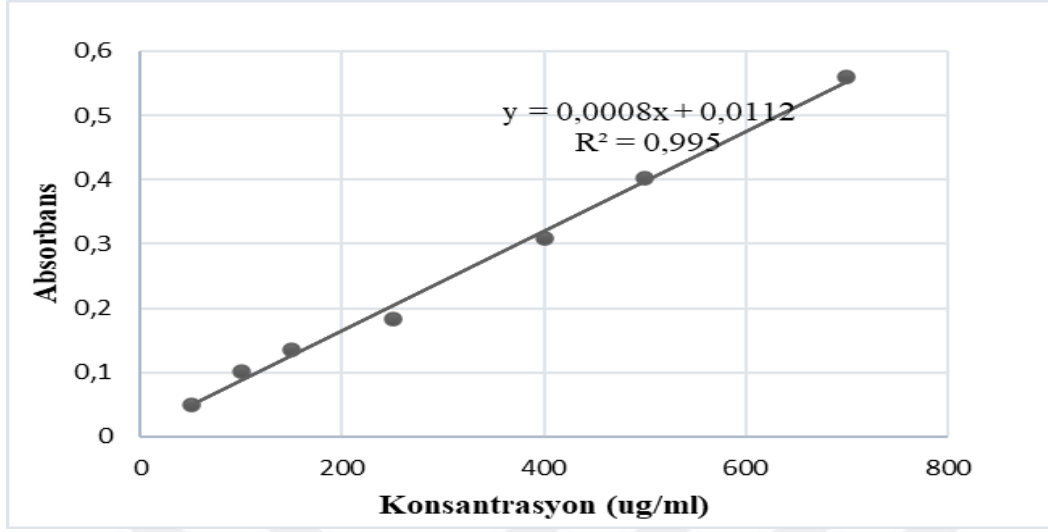
Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR): 100 g sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 700 ml distile su, 50 ml %85'lik o-fosforik asit (H_3PO_4) ve 100 ml derişik hidroklorik asitten (HCl) oluşan karışım dik soğutucu altında 10 saat kaynatılarak hazırlandı. Reaktif soğutulduktan sonra ve 150 g lityum sülfat (Li_2SO_4) ve birkaç damla brom (Br_2) karışıma eklenerek hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (%20): 20 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) deiyonize suda çözdürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

➤ **Gallik Asit Kalibrasyonu**

Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit; $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) 0,5 g tartılarak ultrasonik banyo aracılığı ile 10 ml etanol ve distile suda ayrı ayrı çözdürülerek 100 mL'ye tamamlanarak stok çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan 5 mg/ml'lik stok çözeltiler kendi çözücüsü içerisinde hazırlandı. Stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda (Blank, 50, 100, 150, 250, 400, 500, 700 $\mu\text{g/ml}$ gallik asit taze günlük hazırlandı) çözeltiler hazırlandı. Standart içermeyen reaktif karışımı kontrol olarak kullanıldı. SpectraMax i3 (Molecular Devices, ABD) plaka okuyucuda 760 nm absorbans değerleri okunarak gallik asit konsantrasyonlarına karşılık gelen kalibrasyon grafiği $\mu\text{g GAE/ml}$ olarak elde edildi. Çizilen grafiğe göre propolis ekstraktlarının TPC miktarı ayrı ayrı hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{g GAE/ml}$ propolis ekstraktı olarak ifade edildi (Slinkard ve

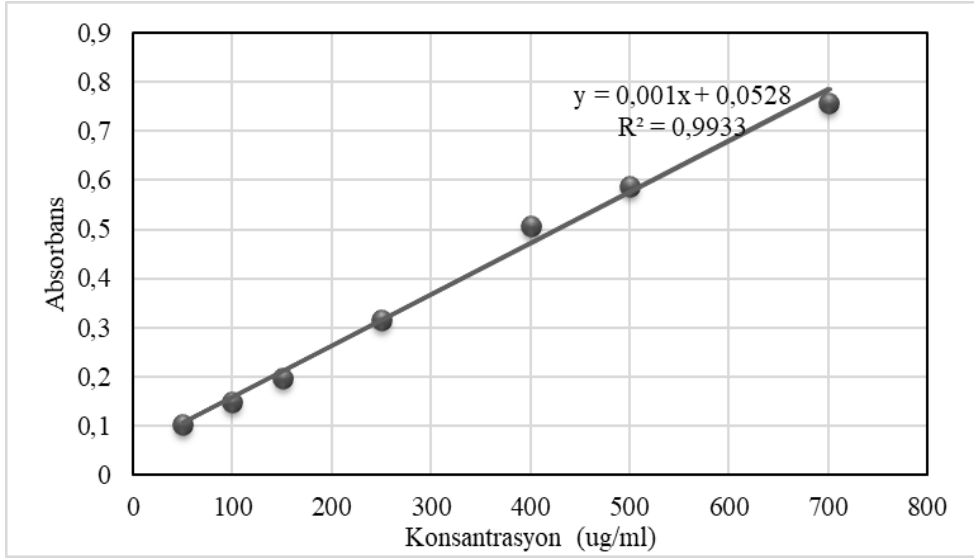
Singleton 1977; Hürkul, 2017). Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada pipetleme işlemi Çizelge 2.5.'daki gibi'dir



Şekil 2.1. Gallik asit (su) kalibrasyon grafiği

Çizelge 2.5. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada pipetleme işlemi.

	Kör	Standart	Numune
Distile su	1600 µl	1580 µl	1580 µl
Standart (değişik konsantrasyonlarda)	-	20 µl	-
Propolis numunesi	-	-	20 µl
Folin-ciocalteu reaktifi	100 µl	100 µl	100 µl
%20 Na ₂ CO ₃ çözeltisi	300 µl	300 µl	300 µl



Şekil 2.2. Gallik asit (C₂H₅OH) kalibrasyon grafiği

➤ **Total Fenolik Madde Miktarı Tayin Yöntemi**

Etanol ve su fazındaki ticari propolis ekstraktları ambalaj etiketinde bildirilen konsantrasyon değerine göre 1:50, 1:100 ve 1:200 oranında kendi çözücüsü ile seyreltildi (seyreltme sonrası çözelti bulanık ise 0,45 µm'lik filtreden geçirildi). Propoliste bulunan toplam fenolik maddelerin ölçümü için 20 µl numune üzerine 1580 µl distile su ve 100 µl Folin-Ciocalteu reaktifi (konsantre haliyle) eklendi. Karışım 2 dk bekledikten sonra 300 µl %20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edildi. Hazırlanan bu karışım vorteks yardımıyla karıştırıldı. Propolis ekstresi içermeyen reaktif karışımı kontrol olarak kullanıldı, 25 °C'de 2 saat boyunca inkübe edildikten sonra SpectraMax i3 (Molecular Devices, ABD) plaka okuyucuda 760 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Çizilen grafiğe göre propolis ekstraktlarının TPC miktarı ayrı ayrı seyreltme faktörleri ile çarpılarak aşağıda verilen formülle hesaplandı. Deney üç tekrarlı olarak yapıldı ve sonuçlar ortalama değer olarak (µg GAE/ml) hesaplandı (Slinkard ve Singleton 1977, Hürkul 2017).

$$\text{TPC} = \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g GAE/ml}) \times \text{seyreltme faktörü}$$

2.2.1.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi

Propolis numunelerinde TFC miktarları (Moreno, Isla, Sampietro ve Vattuone, 2000) tarafından bildirilen alüminyum nitrat (Al(NO₃)₃.9H₂O) kolorimetrik yöntemi modifiye edilerek kuersetin [(2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi 4H-kromen-4-

on; C₁₅H₁₀O₇] eşdeğeri olarak belirlendi. Yöntemin ilkesi, (Al(NO₃)₃.9H₂O) flavonoidlerin A veya C halkasındaki keto grubu ve hidroksil grubu ile aside kararlı kompleksler oluştururken, ayrıca flavonoidlerin A veya B halkasındaki o-dihidroksil grupları ile aside kararsız kompleksler de oluşturmaktadır (Mohammadzadeh vd., 2007).

➤ **Kullanılan çözeltiler**

Aluminyum Nitrat çözeltisi (%10): 1,76 g Al(NO₃)₃.9H₂O deiyonize suda çözdürülerek hacmi 10ml'ye tamamlandı.

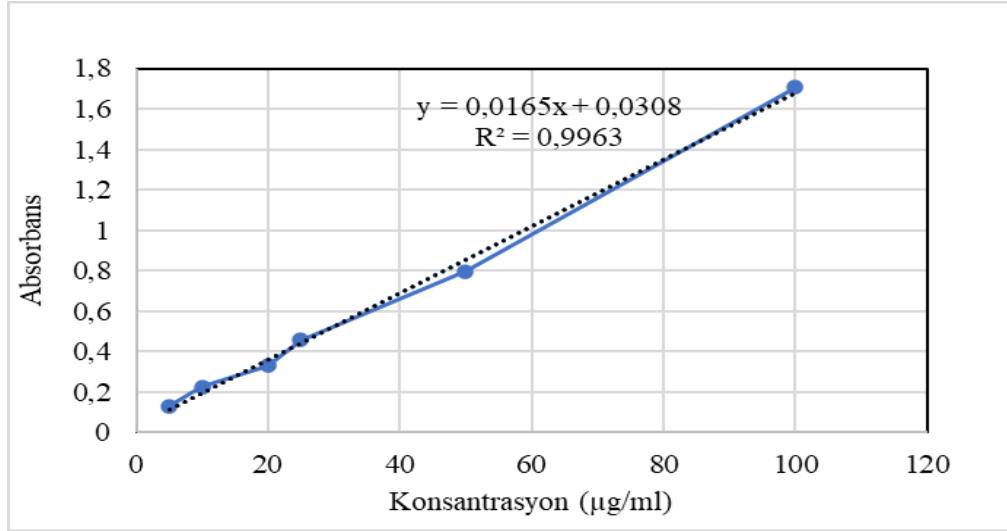
Potasyum asetat çözeltisi (1M): 0,9615 g CH₃COOK deiyonize suda çözdürülerek hacmi 10ml'ye tamamlandı.

Etanol çözeltisi (%80): 80 ml C₂H₅OH deiyonize su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

➤ **Kuersetin Kalibrasyonu**

Kuersetin 25 mg tartılıp 25 ml'lik balon jöjeye alınarak C₂H₅OH ile çözdürüldü ve hacmi distile su ile 25 ml'ye tamamlanarak 1000 µg/ml'lik kuersetin çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda (Blank, 5, 10, 20, 25, 50 ve 100 µg/mL kersetin taze olarak günlük hazırlandı) çözeltiler hazırlandı. Standart içermeyen reaktif karışımı kontrol olarak kullanıldı. SpectraMax i3 (Molecular Devices, ABD) plaka okuyucuda 415 nm'de absorbans değerleri okunarak kersetin konsantrasyonlarına karşılık gelen kalibrasyon grafiği (µg/mL) olarak elde edildi. Çizilen grafiğe göre propolis ekstraktlarının TFC miktarı ayrı ayrı hesaplandı. Deney üç tekrarlı yapılarak sonuçlar ortalama değer olarak (µg QEs/ml) hesaplandı.

$$\text{TFC} = \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g QEs/ml}) \times \text{seyreltme faktörü}$$



Şekil 2.3. Toplam flavonoid tayini kalibrasyon grafiği

Toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada pipetleme işlemi Çizelge 2.6. gibidir.

Çizelge 2.6. Toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmada pipetleme işlemi

	Kör	Standart	Numune
% 80 C ₂ H ₅ OH	172 µL	172 µL	172 µL
Standart (değişik konsantrasyonlarda)	-	20 µL	-
Propolis numunesi	-	-	20 µL
1 M CH ₃ COOK	4 µL	4 µL	4 µL
% 10 Al(NO ₃) ₃	4 µL	4 µL	4 µL

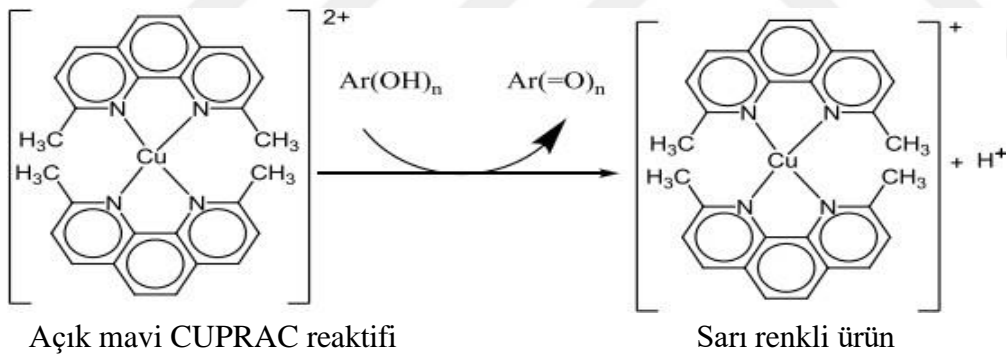
➤ **Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayin Yöntemi**

Etanol ve su fazındaki ticari propolis ekstraktlarından 1000 µg/mL'ye denk gelecek şekilde çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerinden 20 µL alınarak üzerine 172 µL %80'lik C₂H₅OH, 4 µL 1 M CH₃COOK eklendi ve bir dakika sonra 4 µL

%10'luk $AL(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ilave edilerek 40 dk inkübe edildikten sonra SpectraMax i3 (Molecular Devices, ABD) plaka okuyucuda 415 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Deney üç tekrarlı olarak yapıldı ve sonuçlar ortalama değer olarak (μg QEs/ml) hesaplandı. Ekstrelerin TFC içerikleri, standart kersetin kalibrasyon (şekil 2.3.) grafiğinden hesaplandı (Moreno vd., 2000).

2.2.1.3. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

Propolis numunelerinde (Apak, Guclu, K., Ozyurek, M. ve Karademir, 2004) tarafından bildirilen spektrofotometrik yöntem modifiye edilerek antioksidan aktiviteleri belirlendi (Ertas vd., 2021). Yöntemin ilkesi, amonyum asetat tampon ortamında kromojenik bir yükseltgen olan Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifi kullanılarak, uygun konumlanmış fenolik hidroksillerin CUPRAC redoks reaksiyonu ile kinon yapılarına dönüşmesi ve redoks reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli Cu(I)-Nc kelatın 450 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesidir. Bu yöntemde, toplam antioksidan kapasite, bakır (II) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden ölçüldüğünden dünya literatürüne CUPRAC yöntemi olarak kazandırılmıştır.



Şekil 2.4. CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla ($Ar(OH)_n$) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu (Apak vd., 2004).

➤ Kullanılan Çözeltiler

Bakır (II) klorür çözeltisi (0,01 M): 0.4262 g bakır (II) klorür dihidrat ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) deiyonize suda çözülürerek hacmi 250 ml'ye tamamlandı.

Amonyum asetat tamponu (1M (pH=7)): 19.27 g amonyum asetat (NH₄Ac) deiyonize suda çözdürülerek hacmi 250 ml'ye tamamlandı. pH 7'ye ayarlandı.

Neocuproine çözeltisi (7.5 mM): 0.0766 g neocuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) %96'lık etil alkolde çözdürülerek hacmi alkolle 50 mL'ye tamamlandı.

BHT (2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisi (1000 ppm): 10 mg BHT etil alkol'de çözdürülerek hacim 10 ml'ye tamamlandı.

BHA (2(3)-t-Butyl-4-hydroxyanisole) çözeltisi (1000 ppm): 10 mg BHA etil alkol'de çözdürülerek hacim 10 ml'ye tamamlandı.

➤ **Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemi**

Hazırlanan örneklerin ve standartların üzerine, son konsantrasyonları 10, 25, 50, 100 µg/mL olacak şekilde eşit hacimde 250'şer µl CuCl₂, neocuproin ve NH₄Ac (pH=7) tampon solüsyonları ilave edilerek karıştırıldı. Bir saat sonra numunelerin absorbansı SpectraMax i3 (Molecular Devices, ABD) plaka okuyucuda 450 nm'de ölçümü yapıldı (Apak vd., 2004). Örneklerin absorbans değerleri standartlara karşı değerlendirildi. Her bir örnekten 3 paralel 4 ayrı doz çalışma yapıldı. Standart olarak BHT ve BHA kullanıldı.

2.2.2. Hücre Kültürü

Bütün hücre kültürü çalışmaları, steril ortamda hücre kültür kabini içinde gerçekleştirildi. Çalışma öncesi kabin, kullanılacak malzemeler ve çalışma sonrasında ise kabin %70'lik etanol ile silindi. Çalışmalar sonunda kabin ve hücre kültürü odası UV ışığa maruz bırakılarak tekrar kullanıma hazır duruma getirildi.

2.2.2.1. *In Vitro* Analiz

Çalışmanın *in vitro* analizleri; Caco-2 (HTB37) hücre hattı üzerinde gerçekleştirildi. Bu analizler sitotoksikite testi (MTT testi), hücre kültür mediumunda TAK ve TOK alt başlıklarını kapsamaktadır.

2.2.2.2. Hücre Kültürü Deneyleri

Çalışmada A.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen ve -80 °C'de saklanan Caco-2 hücre hattı (HTB37) kullanıldı. Bu hücre hattının seçilme nedeni kolon kanserlerinin ülkemizde de sık görülen kanser türleri

arasında olması ve çok sayıda hastanın tedavisi için yeni ajanlara gereksinim duyulmasıdır. Caco-2 (HTB37) hücrelerine (Lea, 2015) tarafından bildirilen hücre kültürü için genel protokoller uygulandı.

Caco-2 hücre hattı için besiyeri çözeltisi: Caco-2 (HTB37) hücre hattı Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (Gibco, ABD), %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries, Israil) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, Israil) içeren ortamda kültür edildi.

2.2.2.3. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü

Çalışma kapsamında, hücreler temin edilen kriyotüpler içinde saklandıkları derin dondurucudan çıkarılarak 37 °C'deki steril su banyosunda kısa sürede çözdürüldü ve genel sterilizasyon kurallarına göre tüpler %70'lik alkolle silinerek laminar akımlı kabine yerleştirildi. Hücreler hafifçe pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirildi ve %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, %1 esansiyel olmayan aminoasit içeren DMEM kültür besiyerinin olduğu falkon tüpe aktarıldı ve 10 dk. süreyle 4500 rpm devirde santrifüj edildi. Daha sonra tüp tekrar %70'lik etil alkol'le silinerek laminar akımlı kabine yerleştirildi. Santrifüj sonrası üstte kalan supernatant atıldı ve hücre pelleti elde edildi. Hücre pelleti tam hücre kültürü vasatında pipetaj yapıldıktan sonra T75 hücre kültürü üretme kabına (flask) alındı. Mikroskop ile görüntü alınması sonrasında 37 °C'deki %5 karbondioksit (CO₂) ortamındaki etüve inkübasyon için yerleştirildi. Dondurmayı takiben ilk kez çözülmüş olan hücrelerin besi yerleri ertesi gün değiştirilerek hücreler beslendi. Daha sonraki değiştirmeler ise hücrelerin gereksinimlerine bağlı olarak 2-3 günde bir gerçekleştirildi.

2.2.2.4. Caco-2 (HTB37) Hücrelerinin Pasajlanması

İnkübasyon sonrasında hücreler her gün mikroskop (JuLI™ BL, Nano Entek, South Korea) altında kontrol edildi. Üremekte olan hücreler flaskların zemininin %80-90'ını kapladığında (konfluense) hücreler pasajlandı. Pasajlama öncesinde tam hücre kültürü vasatı, PBS 1x (Biological Industries, Israil), ve Trypsin EDTA 1x (Biological Industries, Israil) 37 °C'deki su banyosunda ısıtıldı. Flasklarda %80-90 çoğunluğa ulaşan hücrelerin, Trypsin/EDTA kullanılarak üzerinde büyüdükleri yüzeyden kaldırılması amacıyla, flasklar önce %70'lik alkolle silinerek laminar

kabine alındı. Üzerindeki medyumun uygun şekilde uzaklaştırılması sağlandı ve yerine kültür ortamındaki hücre metabolizma yan ürünlerinin, serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla divalent katyonları (Ca^{++} , Mg^{++}) içermeyen 10 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS 1x) (pH=7.0) ile hücrelerin yüzey yıkaması yapıldı. Bunun nedeni serumun tripsin gibi bazı enzimlerin etkisinin inhibe edilmesidir. Daha sonra PBS uzaklaştırılıp 5 ml (flask yüzeyini kaplayacak kadar) tripsin EDTA 1x (Biological Industries, Israil) solüsyonu eklendi ve %5 CO_2 , 37°C'deki inkübatörde yaklaşık 5 dakika inkübasyonu sağlandı. Bu süre sonunda makroskopik ve mikroskopik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları gözlemlendi. Flask'ın yüzeyinde yapışık olan hücreler kaldırıldıktan sonra tripsin-EDTA (Biological Industries, Israil) solüsyonu süspansiyon halinde 15 ml hacimli steril falkon tüpe aktarıldı ve 10 ml (tripsin hacminin iki katı) tam hücre kültür vasatı ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Tüpe aktarılan süspansiyonun 4500 rpm'de 10 dk.'lik santrifüj işlemine tabii tutulmasının ardından üst kısımda bulunan tripsin-EDTA (Biological Industries, Israil) solüsyonu uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde pellet şeklinde bulunan hücrelerin üzerine taze medyumdan ilave edilerek oluşan süspansiyon 3 adet T75'lik flasklara bölünerek tekrar pasajlandı. Mikroskop ile kontrol sonrası hücreler 37 °C'de %5 CO_2 ortamında inkübasyona bırakıldı.

2.2.2.5. Caco-2 (HTB37) Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması

İnkübasyon sonrasında %80-90 konfluens olan hücreler dondurma için hazırlandı. Dondurma öncesinde tam hücre kültürü vasatı, PBS 1x (Biological Industries, Israil), ve Tripsin EDTA 1x (Biological Industries, Israil) 37 °C'deki su banyosunda ısıtıldı. Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck, ABD) 0,22 µm Millipore™ filtreden geçirildi. T75 flask içerisindeki hücre vasatı boşaltıldıktan sonra, 10ml (1x) PBS (Biological Industries, Israil), ile yıkandı. Daha sonra PBS uzaklaştırılıp 5 ml (flask yüzeyini kaplayacak kadar) tripsin EDTA 1x (Biological Industries, Israil), solüsyonu eklendi ve %5 CO_2 , 37°C'deki inkübatörde yaklaşık 5 dakika inkübasyonu sağlandı. Bu süre sonunda makroskopik ve mikroskopik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrıldıkları gözlemlendi. Hücreler 15 ml steril falkon tüplere alınıp 10 ml tam hücre kültürü vasatı eklenip 4500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Dondurma vasatı 7:2:1 hücre kültürü tam vasatı: FBS:DMSO (v/v) oranında hazırlandı. Hücre

pelleti dondurma vasatı ile pipetaj yapıldıktan sonra steril kriyotüplere aktarıldı. Kriyotüpler; Corning Cool Cell™ hücre dondurma kutularına alınarak -80°C’de ultra derin dondurucuda gerektiğinde kullanılmak üzere saklandı. Dondurma aşaması her hücre pasajı için tekrar edildi.

2.2.2.6. Deney Dizayını

Çalışmada 42-56. pasaj Caco-2 (HTB37) hücreleri kullanıldı ve deney düzeneği 2 günlük kurularak başlandı. Propolisin su ve etanolik ekstraktlarının (ticari preparat) sitotoksik etkileri için literatürde ham propolisin çeşitli çözücülerde çözdürülmüş çok farklı doz aralıkları ve uygulama şekilleri bulunmaktadır (de Francisco vd., 2018). Propolisin su ekstraktları farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (0,97-1,95-3,90-7,81-15,62-31,25-62,5-125-250-500-1000-2000 µg/ml) ekstraktları 12 yarı dilüsyon olarak çalışıldı. Propolisin etanolik ekstraktları ile yapılan ön denemelerde, örneklerin alkol içerikleri 35 °C’de azot evaporatörde uçurularak, farklı çözücüler denenmiş (Etil alkolün farklı %’leri, DMSO, su gibi) en yüksek absorpsiyon değeri %70’lik etil alkol ile hazırlanan stok ile elde edildi ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (0,24-0,48-0,97-1,95-3,90-7,815-15,62-32,25-62,5-125-250-500 µg/ml) ekstraktlara 12 yarı dilüsyon uygulama yapıldı. Bu doz farklılıklarının nedeni etanolik ürünlerin DMEM ile yapılan seyretmelerinde 500 µg/ml’nin üzerindeki dozlarda çözelti bekletildiğinde, çökme meydana gelmesi nedeniyle 500 µg/ml en yüksek doz seçildi. Ayrıca literatürdeki bu doz farklılıklarının sebebi; uygulanan örnek çözücülerinin, hücre tipinin, hücre yoğunluğunun, hücreler için kullanılan medyumların ve laboratuvar koşullarının farklılıkları gibi etkenlerden dolayı da olabilir.

2.2.2.7. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması ve Hücre Kültürüne Uygulanması

T75 flaskta kültür edilen %80-90 konfluense ulaşmış hücreler, tripsinize edildikten sonra 1 ml besiyerinde pipetaj yapılarak homojen bir karışım haline getirildi. Eppendorf tüpe, 1 ml kültür medyumunu ile seyreltilen hücrelerden 10 µl alınarak üzerine 10 µl tripan mavisi boyası ile 1:1 veya 2:2 (v/v) eklenip pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı ve 3 dk beklendi. Bu karışımdan 10 µl alınarak JuLI™ BL, Cell counting slide (NanoEntek, Güney Kore) otomatik hücre sayım cihazında hücre

sayım kiti slaytları ile sayıldı. Tripkan mavisi ile hücre sayımı sonrasında, $1,4 \times 10^7$ hücre/ml bulunan hücre sayısı MTT testi öncesinde 5×10^4 hücre/ml'ye tam hücre vasatı ile seyreltilip, 96 kuyucuklu kültür plağının her bir kuyucuğuna 100 µl ekimi yapıldı ve hücreler 37 °C'de %5 CO₂-li etüve 24 saat inkübasyona bırakıldı (İbrahim ve El-Banna, 2021).

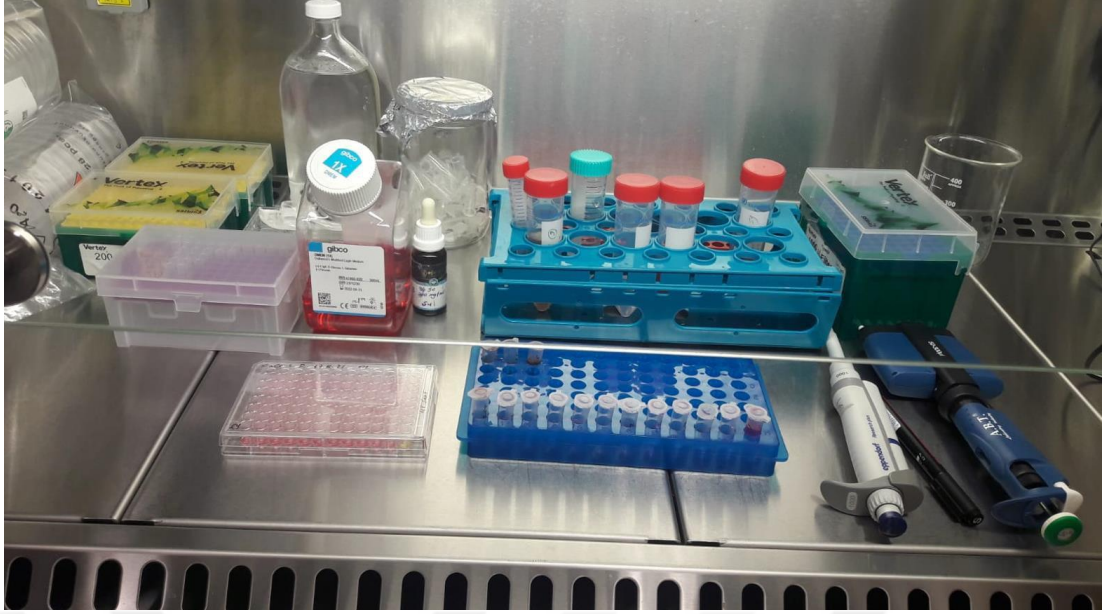


Şekil 2.5. JuLI™ BL, (NanoEntek) canlı hücre sayım mikroskobu

Bu yolla tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zararlar ortadan kaldırılmış oldu. Bu protein ve faktörlerin yeniden sentezlenebilmesi için 24 saatlik bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır (Huang vd., 2010). İnkübasyon sonucunda 96 kuyucuklu kültür plağındaki hücrelerin üremeleri ve ortamın sterilitesi mikroskop (JuLI™ BL, NanoEntek, Güney Kore) altında kontrol edildi. Hücreler % 60-70 konfluens olduğunda DMEM besi ortamı uygun şekilde uzaklaştırılarak ortam 100 µl yeni hazırlanmış tam hücre vasatı ile değiştirildi (Czyżewska vd., 2016). Ticari olarak satılan propolisin su ekstraktlarından 10 mg/ml stok deney günü taze hazırlandı. DMEM high glucose içerisinde 12 yarı dilüsyon (2000-0,9765 µg/ml) olarak seyrelmeler yapıldı ve 96 kuyucuklu plaklardaki hücreler içerisine vasat değişiminden 2 saat sonra ekimi (25 µl DMEM High Glucose (Gibco, ABD) gerçekleştirildi (şekil 2.6.). Ayrıca hücresiz olarak medyum ile propolisin etkileşiminin değerlendirilebilmesi için, yine 96 kuyucuklu kültür plağına medyum ile aynı konsantrasyonlardaki propolis miktarları uygulandı. Pozitif kontrol grubuna medyum uygulaması NK grubuna 1x Triton-X uygulaması

yapıldı ve 24-48 saat süreyle 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda propolis su ekstraktlarının etkileri mikroskop JuLI™ BL (NanoEntek, Güney Kore) altında incelenerek, görüntüler kaydedildi. Yapılan deneyler 3 kez tekrarlandı (n=3).

Propolisin etanolik ekstraktlarının içerikleri 35 °C'de azot evaporatörde uçuruldu. Daha sonra 160 mg/ml %70'lik etil alkol (JT Baker) ile stok deney günü taze hazırlandı. Stok çözeltiden DMEM High glucose içerisinde gerekli seyreltmeler yapılarak 12 yarı dilüsyonun (500-0,2441 µg/ml) 96 kuyucuklu plaklardaki hücreler içerisine ekimi yapıldı. Ayrıca hücresiz olarak medyum ile propolisin etkileşiminin değerlendirilebilmesi için, yine 96 kuyucuklu kültür plağına medyum ile aynı konsantrasyonlardaki propolis miktarları uygulandı. Pozitif kontrol grubuna medium uygulaması, NK grubuna 1x Triton-X uygulamaları yapılarak ve 24-48 saat 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. Ayrıca kontrol olarak kullanılmak üzere %70'lik etil alkol'de çözünen propolis uygulaması yerine yalnızca %70'lik etil alkol solüsyonu aynı volümde bir hücre grubuna eklendi. Etil alkol'ün nihai konsantrasyonu, herhangi bir deney sırasında kültür ortamında %0,2'yi aşmadı ve bu etil alkol konsantrasyonu, hücre morfolojisini veya canlılığını etkilemedi (Bonamigo vd., 2017). İnkübasyon sonunda propolis etanolik ekstraktlarının etkileri mikroskop JuLI™ BL (Nano Entek, Güney Kore) altında incelenerek, görüntüler kaydedildi. Yapılan deneyler 3 kez tekrarlandı (n=3).

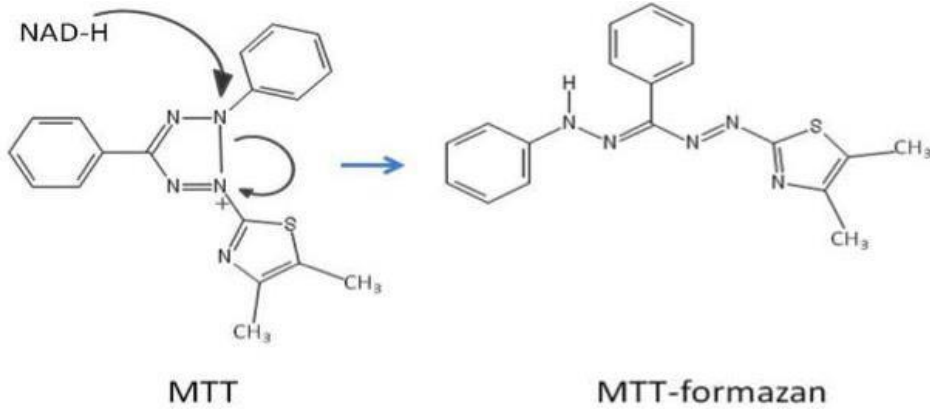


Şekil 2.6. Caco-2 hücrelerine propolis ekstraktlarının uygulanması aşaması.

2.2.2.8. Hücrelerin Canlılık Testi, MTT Analizi

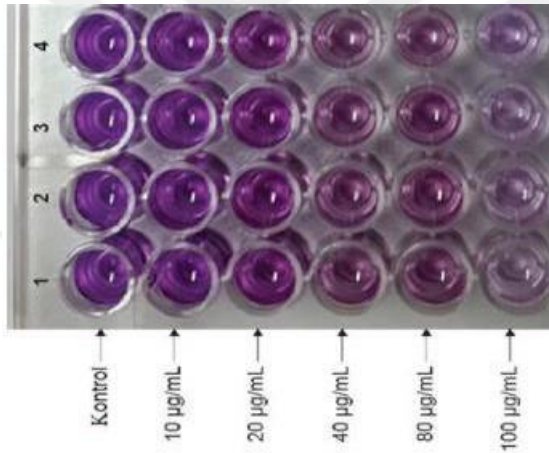
➤ MTT (1-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-3,5-difenilformazon) Testi

MTT testi, mitokondriyal etkinliğe dayalı hücre proliferasyonunu ve canlılığını test etmek için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. İlk kez Mossmann (1983), tarafından tanımlanmıştır. MTT, bir tetrazolyum tuzu olup, hücrelerin metabolik aktivitesi durumunda, mitokondriyal dehidrogenazın etkisiyle indirgenebilir. MTT indirgemesi formazan kristallerinin oluşumuna yol açar. Formazon kristalleri hücre zarından geçemez bu nedenle sağlıklı hücrelerde birikir. Formazon kristalleri kültür ortamında çözünmez, ancak DMSO veya izopropil alkol (C_3H_8O) gibi çözücüler içinde çözünmesi sonucu oluşan mor renk, spektrofotometrik olarak ölçülür. Ölçülen değer canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır.



Şekil 2.7. MTT-Formazon kristallerinin oluşumu (Zerbinati vd., 2018).

Hücresel solunum ve canlılık arasındaki doğrudan ilişki; MTT ölçümü, *in vitro* koşullarda sitotoksiteyi ölçmek için kantitatif bir yöntemdir (Mosmann, 1983; Tokur ve Aksoy, 2017; Zerbinati vd., 2018).



Şekil 2.8. MTT testinde oluşan renk değişimi (Tokur ve Aksoy, 2017).

- **MTT Solüsyonu:** 5 mg/ml konsantrasyonda PBS 1x (Biological Industries, Israil), içerisinde hazırlandı, ışıkla etkileşiminin önlenmesi için alüminyum kaplı steril falkon tüplerde muhafaza edildi.
- **MTT Analizi:** Türkiye’de ticari olarak satışa sunulan (4 adet su ve 4 adet etanol ekstraktı) toplam 8 adet propolis ekstraktı örneğinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde Mossman (1983), tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. 24-48 saat’lik inkübasyon sonunda 96 well pleytlerde bulunan 125 µl medyum ve hücre karışımı üzerine, nihai konsantrasyon 0,5 mg/ml (1/10) olacak şekilde MTT solüsyonundan 15 µl ilave

edildi ve 37°C ve %5 CO₂'li etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı. Uygulanan propolis örneklerinin MTT (sigma, M5655) ile etkileşip etkileşmediğini ölçmek amacıyla hüresiz 96 well pleytlere aynı konsantrasyonlarda uygulama yapılarak aynı prosedür uygulandı ve etkileşmediği tespit edildi. İnkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyinde bulunan medyum aspire edilerek, DMSO çözücü solüsyonundan 100 µl ilave edilerek 30 dk yatay karıştırıcıda formazon kristallerinin çözünmesi sağlandı. Formazon kristallerinin çözünüp çözünmediği (JuLITMBL, NanoEntek, Güney Kore) mikroskop altında kontrol edildi. Plakalar SpectraMax i3 (Molecular Devices, ABD) plaka okuyucuda 570 nm absorbans ölçümü yapıldı. Deneyler üç tekrarlı olarak yapıldı ve sonuçlar ortalama değer olarak hesaplandı (n=3).

2.2.2.9. Etkili Konsantrasyonun Hesaplanması

Propolis uygulamasından 24-48 saat sonra SpectraMax i3 (Molecular Devices, ABD) plaka okuyucuda 570 nm'de absorbans ölçümü yapılan propolis ekstraktlarında, hücreli ve hüresiz her bir konsantrasyon için kuyucuklardan okunan değerlerin ortalaması alındı. Hücreli kuyucukların ortalama değeri ile hüresiz kuyucukların ortalama değerlerinin farkı alındı (Karaca, 2008). Ulukaya, Özdikicioğlu, Yıldıztepe Oral ve Demirci, (2008)'e göre % sitotoksosite hesaplandı (n=3).

2.2.2.10. Sitotoksosite Değerlendirmesi

Numune uygulanan hücrelerdeki sitotoksosite % olarak ifade edildi ve uygulanmayan, %100 canlı kabul edilen PK grubu (Maksimal Viabilite, Max V) ile %0 canlı kabul edilen, Triton-X uygulanan NK grubuna (Minimal Viabilite, Min V) göre aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı: (Ulukaya vd., 2008). Yüzde sitotoksosite hesaplamaları Microsoft Excel kullanılarak yapıldı. IC₅₀ tespiti için test edilen dozların karşılığı olacak yüzde sitotoksosite değerleri ile regresyon eğrisi çizildi. Hem Excel hem de Graph Pad® Prism 9.0 yazılımı kullanılarak yapılan klasik sigmoid-doz modellemelerine göre en yüksek power değerine sahip eğri üzerinden IC₅₀ hesaplaması yapıldı.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = [1 - (\text{test} - \text{MinV}) / (\text{MaxV} - \text{MinV})] \times 100$$

2.2.3. Hücre Kültür Medyumu TAK ve TOK Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücre kültür medyumlarında TAK ve TOK düzeyleri, ticari kitlerle (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) mikropilaka okuyucusu Multiscan Go (Thermo Science, ABD) cihazı ile ölçülerek belirlendi.

2.2.3.1. Hücre Kültür Medyum Çalışması

Hücre kültürü çalışmalarında, hücre kültür medyum solusyonu çalışılmıştır. Hücre medyumlarında TOK ve TAK düzeyleri için; Hücre sayısı JuLI™ BL, Cell counting slide (Nano Entek, South Korea) otomatik hücre sayım cihazında hücre sayım kiti slaytları ile yapıldı. Hücre sayımı sonrasında, 5×10^4 hücre/ml'ye tam hücre vasatı ile seyreltilip, 24 kuyucuklu kültür plağının her bir kuyucuğuna 600 µl ekimi yapıldı ve hücreler 37 °C'de %5 CO₂'li etüve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda pleyt içerikleri uygun şekilde uzaklaştırılarak taze hazırlanmış tam hücre vasatı içerisinde propolisin su ve etanolik ekstraktlarının MTT testi ile belirlenen IC₂₅ ve IC₅₀ konsantrasyonları taze hazırlanarak 24 kuyucuklu plaklara uygulandı. Pozitif kontrol grubuna Triton-X uygulaması, NK grubuna medium uygulaması yapıldı ve 24-48 saat 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. Ayrıca NK olarak kullanılmak üzere %70'lik etil alkol'de çözünen propolis uygulaması yerine yalnızca %70'lik etil alkol solüsyonu aynı volümde bir hücre grubuna eklendi. Etil alkol'ün nihai konsantrasyonu, herhangi bir deney sırasında kültür ortamında > %0.1'dir. Bu etil alkol konsantrasyonu, hücre morfolojisini veya canlılığını etkilemedi. 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda propolis ekstraktlarının etkileri hücre görüntüleme sisteminde incelenerek, görüntüler kaydedildi ve hücrelerin üzerindeki medyum (hücrelerin üzerinden toplanan sıvı besiyeri) eppendorf tüplere alınarak daha sonra çalışılmak üzere -80 °C'de saklandı.

2.2.3.2. Hücre Kültür Medyumu TAK Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücre kültür medyumunu TAK düzeyi; Erel (2004) tarafından geliştirilen metodla belirlendi. Testin çalışma prensibi, örnekte bulunan antioksidan moleküllerin renkli bir radikal olan 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) 'in (ABTS•) renkli radikal antioksidan moleküllerin konsantrasyonlarıyla orantılı bir şekilde renksiz indirgenmiş bir forma dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik yöntem ile standart ve örneklerin absorbanansı 660 nm' de okundu ve E vitamininin suda

çözünür bir analogu olan Trolox kalibratör olarak kullanıldı. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi (Erel, 2004).

2.2.3.3. Hücre Kültür Medyumu TOK Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücre kültür medyumu TOK düzeyi; Erel (2005), tarafından geliştirilen metodla belirlendi. Testin çalışma prensibi, örnekte bulunan oksidanların ferröz iyon-oxidanisine kompleksini ferrik iyon oksitlenmesine dayanmaktadır. Oksidasyon reaksiyonu, ortamda bulunan gliserol molekülleri tarafından güçlendirilir. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Oluşan rengin şiddeti örnekte bulunan oksidanların miktarıyla korelasyon göstererek 530 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak H₂O₂ kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂ Equivalent/L olarak ifade edilir (Erel, 2005).

2.2.3.4. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması

Oksidatif Stres'in bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), TOK düzeylerinin TAK düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Örneklerin Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplanırken TAK düzeyleri ile TOK düzeylerinin birimleri eşitlenir. Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi (Kosecik, Erel, Sevinc ve Selek, 2005).

$$\text{OSİ (AU)} = \text{TOK, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.} / \text{TAK, } \mu\text{mol trolox Equiv. / L} \times 100$$

2.2.4. İstatistik Analizler

Çalışmada elde edilen verilerin analizleri SPSS 25.0 paket programı ile değerlendirildi (SPSS Inc., Chicago, Illinois). İlk olarak verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerinin belirlenmesinde Shapiro-Wilk testi uygulandı. Parametrik dağılım gösteren verilerde gruplar arasında istatistiksel farkın değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi ANOVA testi yapıldı, F değerleri anlamlı olduğunda Duncan's Multiple Range testi yapıldı. Anlamlı farklılıklar P<0,05 düzeyi olarak kabul edildi. Veriler aritmetik ± standart hata (x+SH) olarak verildi. Sulu ve etanolik ekstraktlarda çözünen propolis örneklerinin TPC, TFC, CUPRAC parametrelerinin ikili karşılaştırmasında TPC ve TFC parametrelerinde ManWhitney U testi (mediyan, mean rank, range), CUPRAC ve IC₅₀ değerlerinde ise student t testi (x+SH) yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Sulu ve Etanollü Propolis Ekstraktlarının Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi

Ticari olarak satışa sunulan (4 adet su ve 4 adet etanol ekstraktı) propolis örneklerinin antioksidan özellikleri; TPC, TFC ve CUPRAC, antioksidan kapasite analizleri yapılarak belirlendi.

Çizelge 3.1. Su ve etanolik propolis ekstraktlarının toplam fenolik, flavonoid madde miktarı ve CUPRAC, antioksidan kapasiteleri^a.

Propolis	TPC ($\mu\text{gGAE/ml}$) ^b	TFC ($\mu\text{gQE/ml}$) ^c	CUPRAC ($A_{0,5}$) ^d ($\mu\text{g/ml}$)
P1 _{WEP}	1910,41 \pm 48,62 ^d	5,82 \pm 0,01 ^c	103,17 \pm 0,71 ^c
P2 _{WEP}	10640,87 \pm 394,56 ^a	4,49 \pm 0,01 ^d	475,55 \pm 41,46 ^a
P3 _{WEP}	3295,87 \pm 250,43 ^c	7,45 \pm 0,01 ^b	245,29 \pm 4,53 ^b
P4 _{WEP}	5395,83 \pm 148,14 ^b	13,37 \pm 0,03 ^a	47,49 \pm 0,30 ^d
BHT			6,94 \pm 0,59 ^d
BHA			10,43 \pm 0,89 ^d
p	<0,001	<0,001	<0,001
P1 _{EEP}	18648,30 \pm 119,15 ^c	118,39 \pm 0,25 ^a	4,82 \pm 0,08 ^f
P2 _{EEP}	27138,83 \pm 1222,56 ^a	48,94 \pm 0,10 ^b	35,48 \pm 0,63 ^c
P3 _{EEP}	22697,64 \pm 759,51 ^b	31,01 \pm 0,07 ^c	47,47 \pm 0,14 ^b
P4 _{EEP}	5893,33 \pm 157,16 ^d	14,58 \pm 0,03 ^d	66,91 \pm 0,35 ^a
BHT			6,94 \pm 0,34 ^e
BHA			10,43 \pm 0,51 ^d
p	<0,001	<0,001	<0,001

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir. b: Gallik asite eşdeğer fenolik içerik. ($y = 0,0008x + 0,0112$ $R^2 = 0,9954$, $y=0,001x+0,0528$ $R^2= 0,9933$). ($p<0,001$). c: Kuersetine eşdeğer flavonoid içerik. ($y=0,0165x + 0,0308$ $R^2 = 0,9963$) ($p>0,001$). BHT: Bütillenmiş hidroksitoluen ve BHA: Bütillenmiş hidroksianisol standart olarak kullanılmıştır. d: CUPRAC ($A_{0,5}$). ^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,001$).

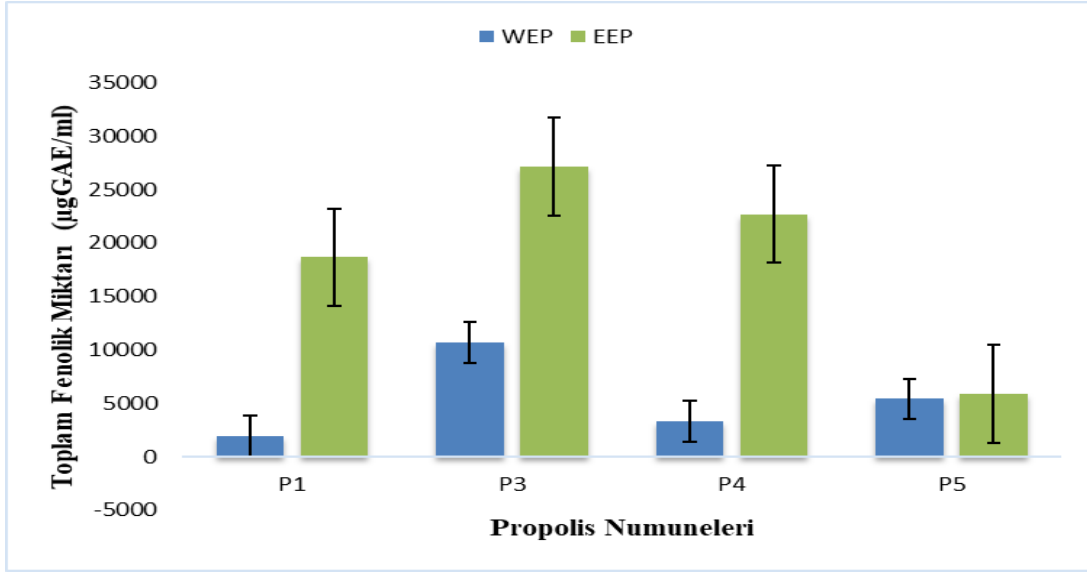
Çizelge 3.2. Su ve etanolik propolis ekstraktlarında TPC, TFC ve antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması (n=4)

Gruplar		x±Sx	Medyan	Mean Rank	P
TPC (µg GAE/ml)	P _{WEP}	5305,75±1003,54	4468,77	8,17	<0,001
	P _{EEP}	16054,29±2343,65	18530	18,67	
TFC (µg QE/ml)	P _{WEP}	7,78±1,02	6,632	8,17	<0,001
	P _{EEP}	64,92±11,33	48,94	18,67	
CUPRAC (A0,5) (µg/ml)	P _{WEP}	217,88±50,64			<0,001
	P _{EEP}	38,67±6,80			

Propolisin su ve etanolik ekstraktlarının ikili olarak karşılaştırılmasında toplam fenol miktarı, toplam flavanoid miktarı ve antioksidan kapasiteleri bakımından istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı fark bulundu (P<0,001).

3.1.1. Propolis Ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları

Yerli üretim ticari olarak satışa sunulan propolisin 4 adet su ve 4 adet etanolik ekstraktın TPC'si, Folin-Ciocalteu yöntemi ile kolorimetrik olarak gallik asite eşdeğer olarak belirlendi ve sonuçlar µg GAE/ml olarak verildi (Çizelge 3.1). Ticari propolisin su ve etanolik ekstraktlarının gallik asid'e eşdeğer TPC madde miktarları bakımından değerlendirildiğinde; en düşük TPC madde miktarı, propolisin su ekstraktı P1'de 1910,41±48,62 µg GAE/ml ve bunu sırasıyla P3'te 3295,87±250,43 µg GAE/ml, P4'te 5395,83±148,14 µg GAE/ml ve P2'de 10640,87±394,56 µg GAE/ml takip etmektedir. Etanolik P2 propolis ekstraktı'nın 27138,83±1222,56 µg GAE/ml en zengin ekstrakt olduğu; bunu sırasıyla P3'te 22697,64±759,51 µg GAE/ml ve P1'de 18648,30±119,15 µg GAE/ml propolis ekstraktı takip etmektedir. (Çizelge 3.1., Şekil 3.1). Propolisin su ve etanolik ekstraktlarında toplam fenol miktarı istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı fark bulundu (P<0,001).



Şekil 3.1. Ticari Propolis örneklerinin toplam fenolik ($\mu\text{g GAE/ml}$) madde miktarları (ortalama/standart hata)

Propolisin su ve etanolik ekstraktlarının TPC değerleri arasında bulunan P1’de 9,76, P2’de 2,56, P3’te 6,89 (P4 hariç 0,92) kat fark ile etanolik ekstraktların daha yüksek TPC madde miktarına sahip olduğu görüldü.

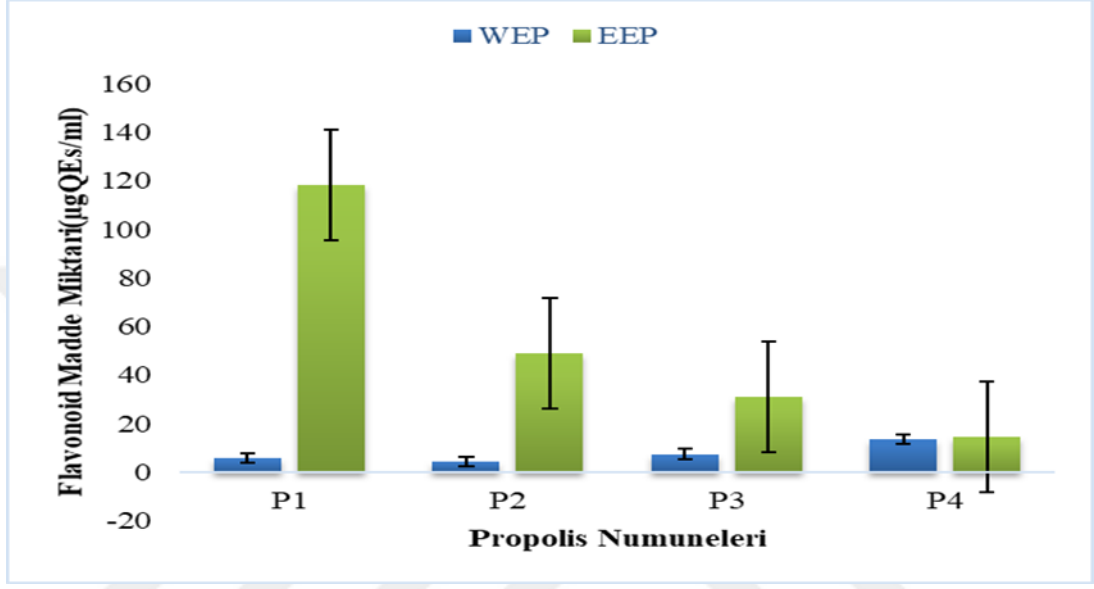
3.1.2. Propolis Ekstraktlarının Toplam Flavonoid Madde Miktarları

Yerli üretim ticari olarak satışa sunulan propolisin 4 adet su ve 4 adet etanolik ekstraktı’nın TFC madde miktarı kuersetine eşdeğer olarak belirlendi ve sonuçlar $\mu\text{g GAE/ml}$ olarak verildi (Çizelge 3.1., Şekil 3.2.).

Ticari propolisin su ve etanolik ekstraktlarının kuersetine eşdeğer TFC madde miktarları bakımından değerlendirildiğinde; en düşük TFC madde miktarı su ekstraktı P2’de $4,49 \pm 0,01 \mu\text{g GAE/ml}$ değeri ve bunu sırasıyla P1 propolis ekstraktı $5,82 \pm 0,01 \mu\text{g GAE/ml}$ ve P4’te $13,37 \pm 0,03 \mu\text{g GAE/ml}$ takip etmektedir. Etanolik P1 propolis ekstraktının $118,39 \pm 0,25 \mu\text{g GAE/ml}$ en zengin ekstrakt olduğu, bunu sırasıyla P2’de $48,94 \pm 0,10 \mu\text{g GAE/ml}$, P3’te $31,01 \pm 0,07 \mu\text{g GAE/ml}$ ve P4’te $14,58 \pm 0,03 \mu\text{g GAE/ml}$ ürünleri takip etmektedir. (Çizelge 3.1., Şekil 3.2.).

Propolisin su ekstraktlarından P2’nin TFC madde miktarı diğer propolis örneklerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulunurken, P4’in TFC madde miktarı diğer propolis su ekstraktlarından istatistiksel olarak önemli düzeyde

yüksekti ($P<0,001$). Propolisin etanolik ekstraktlarından P1'in TFC madde miktarı diğer propolis ekstraktlarından istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulunurken, P4'ün TFC madde miktarı ise düşük bulundu ($P<0,001$). Propolisin etanolik ve su ekstraktlarının TFC değerleri arasında bulunan P1'de 20,34, P2'de 10,90, P3'te 4,16, P4 1,09 kat fark ile etanolik ekstraktların daha yüksek TFC madde miktarına sahip olduğu görüldü.



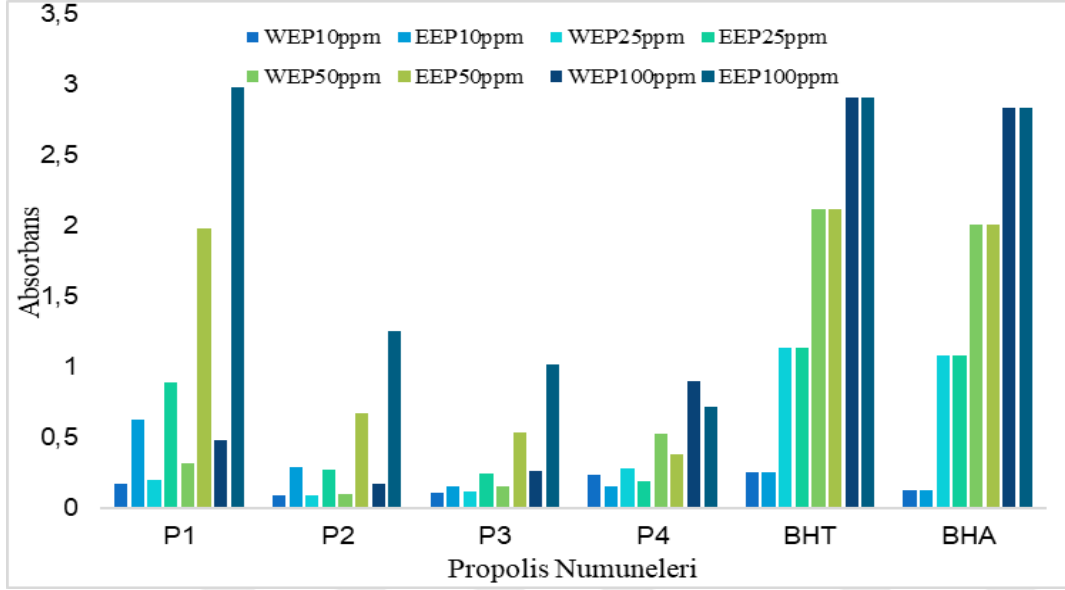
Şekil 3.2. Ticari propolis örneklerinin toplam flavonoid ($\mu\text{g QEs/ml}$) madde miktarları (ortalama/standart hata).

3.1.3. Propolis Ekstraktlarının CUPRAC Yöntemine Göre Antioksidan Kapasiteleri

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (10, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$) propolis ekstraktlarının CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi ile belirlendi (Çizelge 3.1, Şekil 3.3.). Antioksidan aktivite tayin yönteminde BHT ve BHA standart olarak kullanıldı.

Propolisin su ekstraktlarının CUPRAC yöntemine göre antioksidan kapasite sonuçları değerlendirildiğinde; en düşük antioksidan kapasite gösteren propolis ekstraktı P2'de $475,56\pm 41,46 \mu\text{g/ml}$ ve bunu P3'te $245,29\pm 4,53 \mu\text{g/ml}$ takip etmektedir. En yüksek antioksidan kapasite ise propolisin etanolik P1 ekstraktının $4,82\pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ değeri ile en yüksek bulundu. Bunu P2'de $35,48\pm 0,63 \mu\text{g/ml}$

propolis ekstraktı takip etmektedir. (Çizelge 3.1., Şekil 3.3.). Propolisin etanolik ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri su ekstraktlarından daha yüksek (P4 hariç) bulundu. Tüm ekstraktlar içerisinde etanolik P1 ekstraktı örneğinin antioksidan kapasite değeri ($4,82 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$) standart olarak kullanılan BHT ($6,94 \pm 0,34 \mu\text{g/ml}$) ve BHA'dan ($10,43 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$) daha yüksek bulundu. (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Propolisin su ve etanolik ekstraktlarının CUPRAC antioksidan kapasiteleri (ortalama/standart hata)

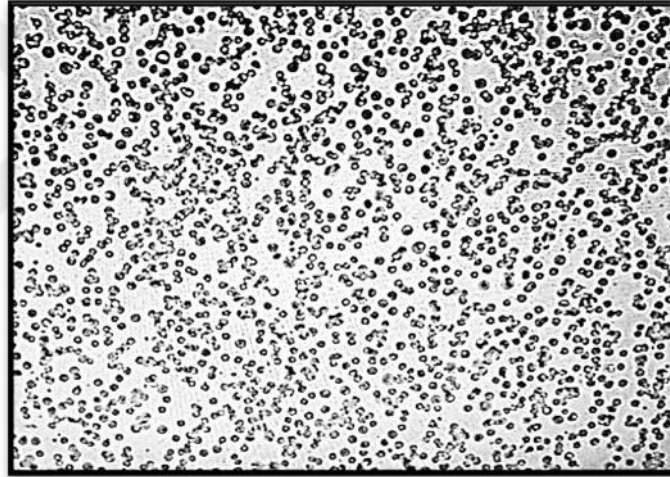
Propolisin su ekstraktlarında P2'nin antioksidan kapasitesi diğer propolis örneklerinden istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulunurken, P4'ün değeri yüksekti ($P < 0,001$). Propolisin su ekstraktlarından P4'ün antioksidan aktivitesi BHT ve BHA'ya göre orta düzeyde aktivite göstermiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak P1, P2 ve P3 örneklerinin antioksidan kapasiteleri her iki standarta göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük olduğu tespit edildi ($P < 0,001$). Propolisin etanolik ekstraktlarından P1 hariç, BHT ve BHA standartlarına göre antioksidan aktivitelerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük olduğu saptandı ($P < 0,001$). Propolisin su ve etanolik ekstraktlarının CUPRAC, antioksidan kapasite değerleri arasında bulunan P1'de 21,40, P2'de 13,40, P3'te 5,17, (P4 hariç 0,71) kat fark ile etanolik ekstraktların daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu görüldü.

3.2. *In Vitro* Analiz Bulguları

In vitro analiz bulguları içerisinde MTT testi, hücre kültür medyumunda MTT testi ile belirlenen IC₂₅ ve IC₅₀ konsantrasyonlarında TAK, TOK ve OSİ düzeyleri yer almaktadır.

3.2.1. Propolis Ekstraktlarının Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Etkisi ve Morfolojik İnceleme

Caco-2 hücreleri tripsinize edildikten sonra JuLI TM BL Cell counting slide (NanoEntek, Güney Kore) otomatik hücre sayım cihazında hücre sayım kiti slaytları ile sayıldı, 5×10^4 hücre/ml'ye tam hücre vasatı ile seyreltilip, 96 kuyucuklu kültür plağının her bir kuyucuğuna 100 μ l ekimi yapıldı ve hücreler mikroskopik olarak incelendi (Şekil 3.4.).

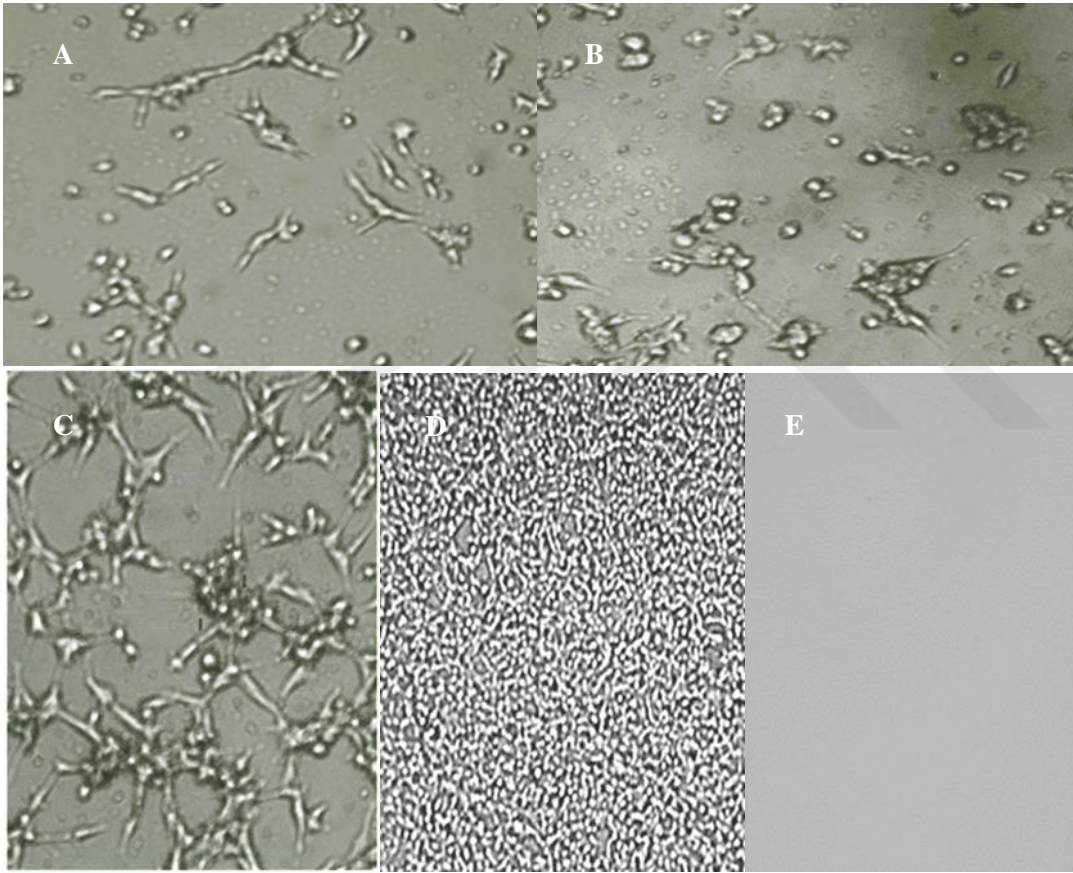


Şekil 3.4. Caco-2 hücrelerinin mikropakta ilk ekildikleri andaki Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri.

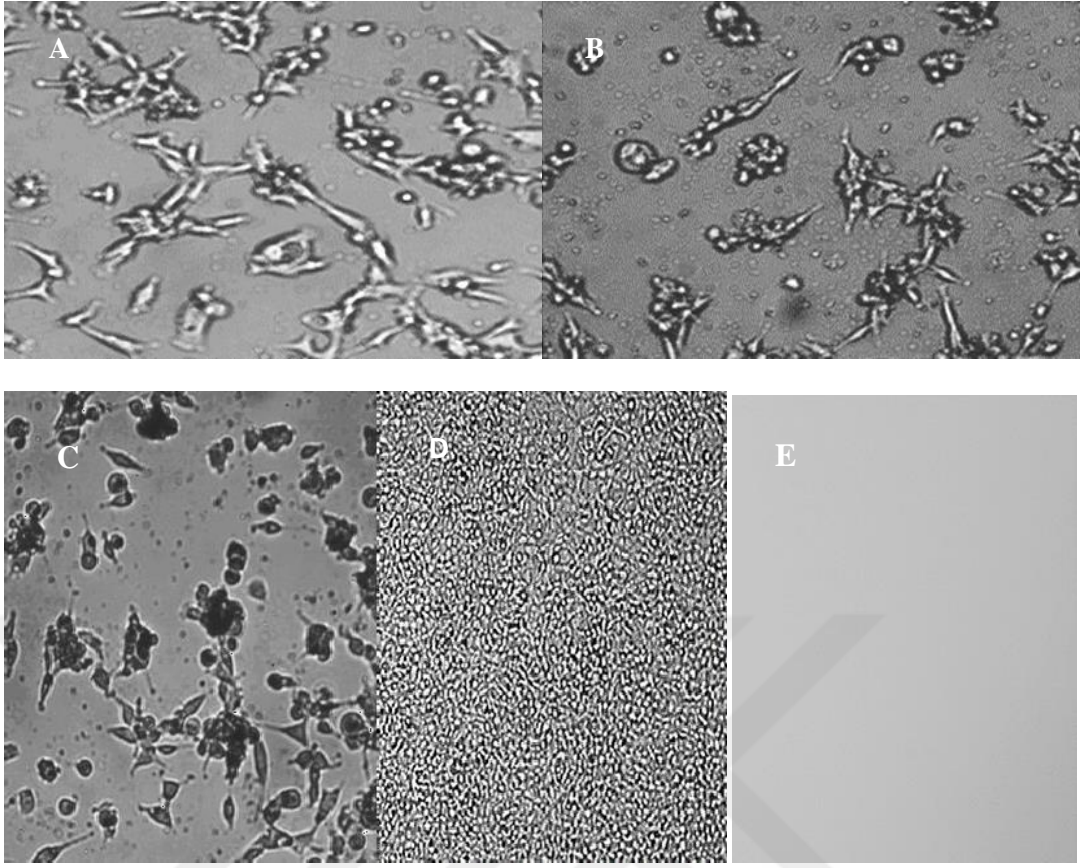
Propolisin su ve etanolik ekstraktlarının ayrı ayrı Caco-2 (HTB 37) insan kolorektal adeno karsinoma hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla metot kısmında belirtilen konsantrasyon aralıklarında 12 farklı dozu uygulanarak 24-48 saat'lik inkübasyon sonrasında invert mikroskopta morfolojik olarak değerlendirildi.

3.2.2. MTT Testi Sitotoksosite

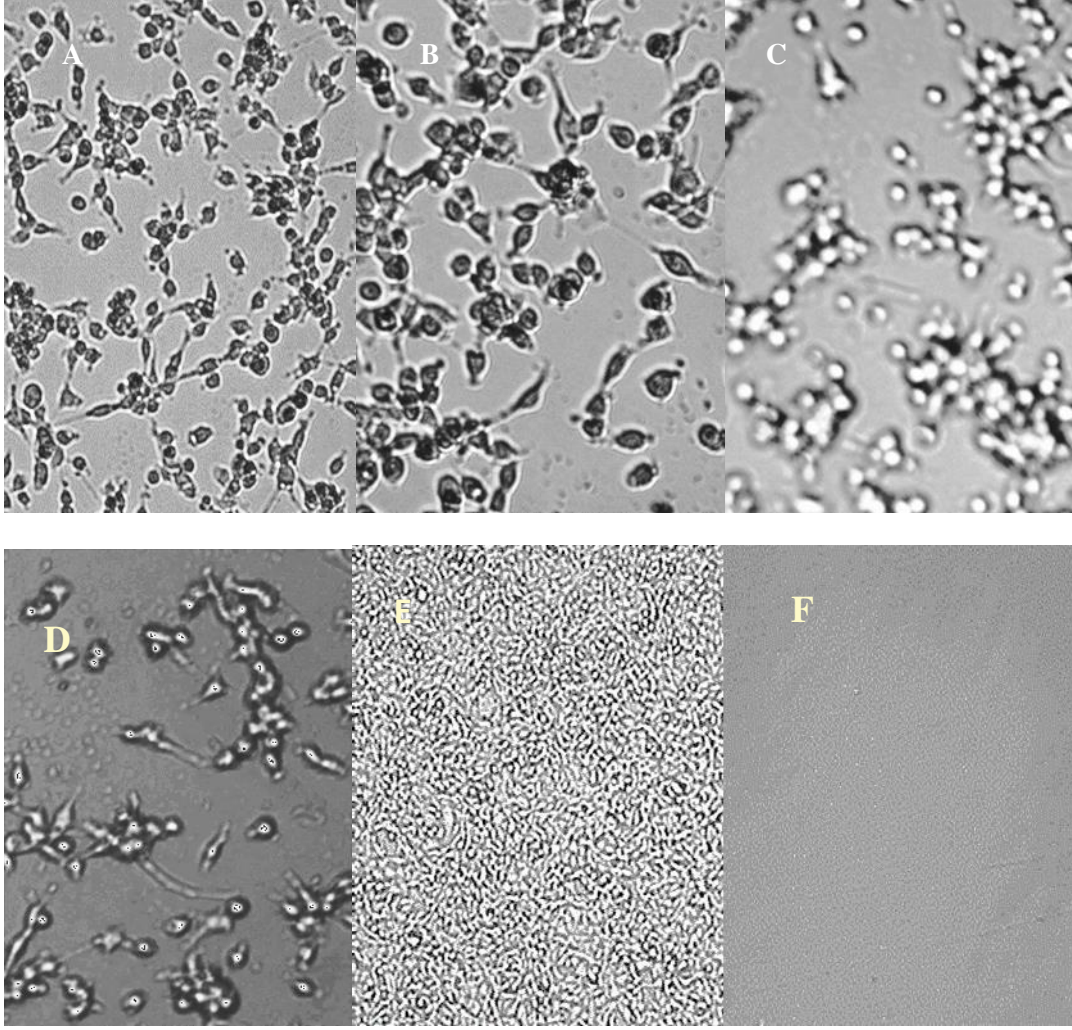
MTT testi, propolisin su ve etanolik ekstraktlarının ayrı ayrı Caco-2 (HTB37) hücrelerinde inhibitör konsantrasyon 50 (IC_{50}) değerlerini belirlemek amacıyla yapıldı. Propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 24 ve 48 saat'lik inkübasyonunu takiben uygulanan MTT testinde IC_{50} konsantrasyonları 570 nm dalga boyunda formazon kristali oluşumuna göre hesaplandı. Şekil 3.5.a., Şekil 3.5.b. ve Şekil 3.6.a., Şekil 3.6.b. propolisin su ve etanolik ekstraktlarının uygulanmasını takiben 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda belirlenen IC_{50} konsantrasyonları ve kontrol gruplarının JuLi canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri bulunmaktadır.



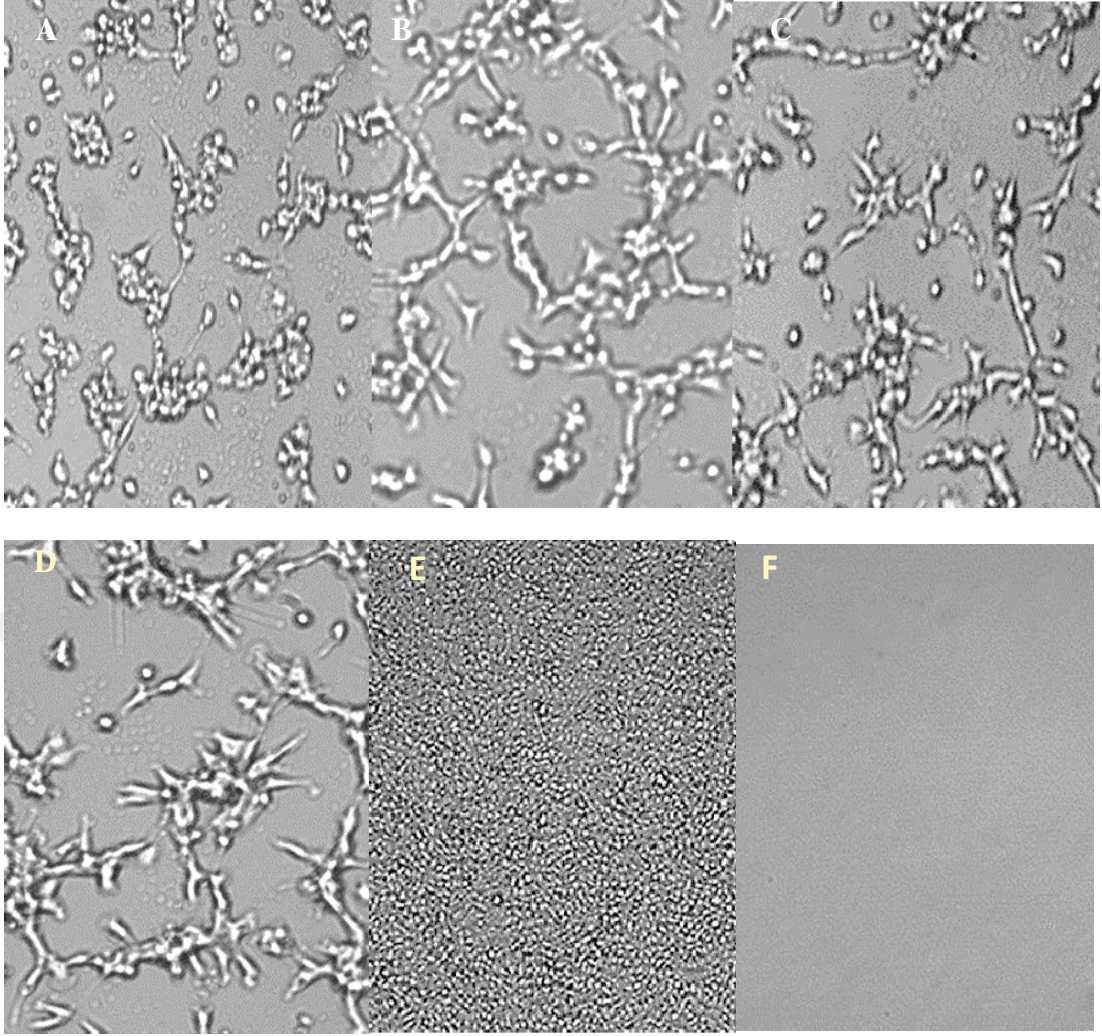
Şekil 3.5.a. Propolisin su ekstraktlarının 24. saat inkübasyonu takiben Caco-2 hücreleri üzerindeki inhibitör konsantrasyon 50 (IC_{50}) değerlerinin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. A) P1_{WEP} B) P3_{WEP} C) P4_{WEP} D) NK E) PK.



Şekil 3.5.b. Propolisin su ekstraktlarının 48. saat inkübasyonu takiben Caco-2 hücreleri üzerindeki inhibitör konsantrasyon 50 (IC_{50}) değerlerinin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. A) $P1_{WEP}$ B) $P3_{WEP}$ C) $P4_{WEP}$ D) NK E) PK.



Şekil 3.6.a. Propolisin etanolik ekstraktlarının 24. saat inkübasyonu takiben Caco-2 hücreleri üzerindeki inhibitör konsantrasyon 50 (IC_{50}) değerlerinin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. A) P1_{EEP} B) P2_{EEP} C) P3_{EEP} D) P4_{EEP} E) NK F) PK.



Şekil 3.6.b. Propolisin etanolik ekstraktlarının 48. saat inkübasyonu takiben Caco-2 hücreleri üzerindeki inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerlerinin Juli (NanoEntek) canlı hücre mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri. A) P1_{EEP} B) P2_{EEP} C) P3_{EEP} D) P4_{EEP} E) NK F) PK.

3.2.2.1. Propolisin Su ve Etanolik Ekstraktlarının Caco-2 Hücreleri Üzerindeki *In Vitro* Sitotoksik Etkisi

Propolisin su ekstraktlarının IC₅₀ değerleri 32,69 µg/ml ile 172,82 µg/ml doz aralığında bulundu ve konsantrasyon artışına bağlı olarak % sitotoksik etki (P2_{WEP} hariç) arttı. En düşük IC₅₀ değeri 32,69 µg/ml 24 saat'lik inkübasyon sonucunda P3_{WEP}'de; en yüksek IC₅₀ değeri 172,82 µg/ml ile 48 saat'lik inkübasyon sonucunda P3_{WEP}'te bulundu. En düşük sitotoksik etki propolisin su ekstraktı P2'nin 24-48

saat'lik inkübasyonu sonucunda sırasıyla %27,49 ve %48,31 olarak bulundu ve IC₅₀ değerleri hesaplanamadı. Propolisin etanolik ekstraktlarında IC₅₀ değerleri 38,9 µg/ml ile 134,65 µg/ml doz aralığında bulundu ve konsantrasyon artışına bağlı olarak % sitotoksik etki arttı. En düşük IC₅₀ değeri 38,90 µg/ml ile 48 saat'lik inkübasyon sonucunda P1'de; en yüksek IC₅₀ değeri 134,65 µg/ml ile 24 saatlik inkübasyon sonucunda P2'de bulundu (Çizelge 3.3., Çizelge 3.4.).

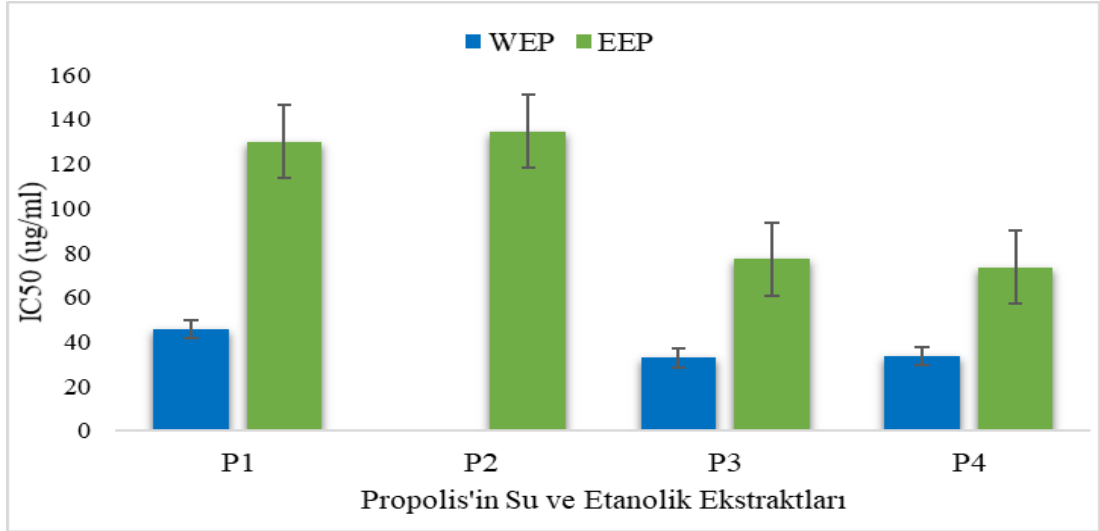
Caco-2 (HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 24 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, en düşük IC₅₀ değeri P_{3WEP}'te 32,69 µg/ml, en yüksek IC₅₀ değeri ise P_{2EEP}'de 134,65 µg/ml bulundu. Propolisin su ekstraktlarının IC₅₀ değerleri, etanolik ekstraktlardan daha düşük (P_{WEP}<P_{EEP}) bulundu (Çizelge 3.3., Şekil 3.7.).

Çizelge 3.3. Caco-2 (HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 24 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması (µg/ml).

IC ₅₀ (µg/ml)			
Propolis Ekstraktı	P _{WEP}	P _{EEP}	P
P1	45,71±2,73	130,03±0,37***	<0,001
P2	-	134,65±8,30***	-
P3	32,69±0,95	77,14±1,93***	<0,001
P4	33,48±0,49	73,57±0,51***	<0,001

***P<0,001

P1, P3 ve P4 ekstraktlarında 24 saatlik inkübasyonu takiben IC₅₀ değerleri P_{WEP}'e göre P_{EEP}'lerde istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulundu (P<0,001). En düşük sitotoksik etki P_{2WEP} propolis ekstraktında % 27,49 olarak bulundu ve IC₅₀ değeri hesaplanamadı. Propolisin etanolik ve su ekstraktlarının 24 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC₅₀ değerleri arasında; P1'de 2,84, P3'te 2,16 ve P4'te 2,20 bulunan kat fark ile su ekstraktları Caco-2 hücreleri üzerine daha yüksek toksik etki gösterdi.



Şekil 3.7. Caco-2 (HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 24 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC₅₀ (µg/ml) değerlerinin karşılaştırılması (ortalama/standart hata).

Caco-2 (HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 48 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, en düşük IC₅₀ değeri P1_{EEP}'de 38,90 µg/ml, en yüksek IC₅₀ değeri ise P3_{WEP}'te 172,82 µg/ml bulundu. Propolis ekstraktlarının IC₅₀ değerleri gruplara göre farklılıklar göstermektedir. (Çizelge 3.4, Şekil 3.8.).

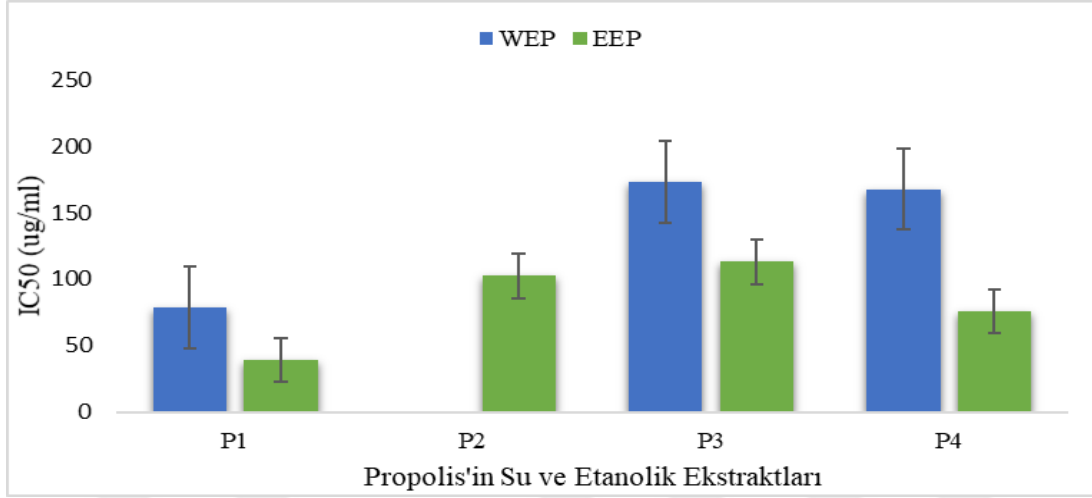
Çizelge 3.4. Caco-2 (HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 48 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması (µg/ml).

Propolis Ekstraktı	IC ₅₀ (µg/ml)		
	P _{WEP}	P _{EEP}	P
P1	78,46±3,83***	38,90±2,10	<0,001
P2	-	102,33±1,45	-
P3	172,82±0,90***	113,02±1,56	<0,001
P4	167,62±0,89***	75,57±0,89	<0,001

***P<0,001

Kırk sekiz saat'lik inkübasyonu takiben P_{WEP}'te P_{EEP}'e göre P1, P3 ve P4 (P<0,001) ekstraktlarında IC₅₀ değeri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. En düşük sitotoksik etki P2_{WEP} propolis ekstraktında %48,31 olarak bulundu ve IC₅₀ değeri hesaplanamadı. Propolisin etanolik ve su ekstraktlarının 48 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC₅₀ değerleri arasında; P1'de 2,02, P3'te 1,53 ve

P4'te 2,22 bulunan kat fark ile etanolik ekstraktları Caco-2 hücreleri üzerine daha yüksek toksik etki gösterdiği tespit edildi.



Şekil 3.8. Caco-2 (HTB37) hücre hattında propolisin su ve etanolik ekstraktlarının 48 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC_{50} (μ g/ml) değerlerinin karşılaştırılması (ortalama/standart hata).

3.2.3. Propolis Ekstraktlarının Hücre Kültür Medyumunda TAK, TOK ve OSİ Düzeyleri

Propolisin su ve etanolik ekstraktlarının hücre kültür medyumunda MTT testi ile belirlenen IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarının, NK, PK ve C_2H_5OH 'ın *in vitro* hücre kültürü ortamında Caco-2 (HTB 37) hücreleri üzerindeki etkisinin 24.saat ve 48. saat'lik inkübasyon sonucu TAK, TOK ve OSİ düzeylerine olan etkileri Çizelge 3.5., 3.6., 3.7., 3.8., 3.9. ve 3.10.'de verildi.

3.2.3.1. Hücre Kültür Medyumu TAK Düzeyleri

Caco-2 (HTB 37) hücre kültür medyumunda propolisin su ekstraktlarının 24. saat inkübasyonunda IC_{25} dozlarında TAK düzeyleri NK, PK gruplarına göre P1, P3 ve P4 örneklerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulundu ($P \leq 0,001$). IC_{50} dozlarında ise PK'ya göre P1 ve P4 örneklerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi ($P < 0,05$). Kırık sekizinci saat inkübasyonunda TAK düzeyleri IC_{25} ($P < 0,05$) ve IC_{50} ($P < 0,001$) dozlarında PK'ya göre P1 örneğinde istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edildi. Yine aynı saatte TAK düzeylerinin IC_{50} dozunda NK'ya göre P1'de yüksek, P4'de düşük olduğu saptandı ($P \leq 0,001$) (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin su ekstraktlarının, NK ve PK' nın TAK düzeyleri.

Propolis Ekstraktı	TAK (mmol Trolox Equiv./L)									
	İnkübasyon süresi ve dozu (µg/ml)									
	IC ₂₅	24saat	IC ₅₀	24saat	IC ₂₅	48saat	IC ₅₀	48saat	IC ₅₀	48saat
P1	2,36±0,24	0,93±0,10 ^a	45,71±4,73	0,76±0,19 ^a	3,32±0,28	1,18±0,14 ^a	78,46±6,64	1,23±0,14 ^a		
P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	3,96±0,20	1,15±0,09 ^a	32,69±1,65	0,50±0,04 ^{ab}	20,07±0,18	0,78±0,31 ^{ab}	172,82±1,56	0,63±0,07 ^{bc}		
P4	5,05±0,13	1,09±0,20 ^a	33,45±0,57	0,98±0,26 ^a	54,28±0,43	0,34±0,03 ^b	167,49±1,32	0,50±0,13 ^c		
NK		0,49±0,08 ^b		0,49±0,08 ^{ab}		0,85±0,08 ^{ab}		0,85±0,08 ^b		
PK		0,24±0,01 ^b		0,24±0,01 ^b		0,39±0,06 ^b		0,39±0,06 ^c		
P		≤0,001		<0,05		<0,05		≤0,001		

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05), (P≤0,001)

Caco-2 (HTB 37) hücre kültür medyumunda propolisin etanolik ekstraktlarının 24 saat'lik inkübasyonunda IC₂₅ dozunda tüm propolis örnekleri ve NK, PK, etil alkol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmedi (P>0,05). Yirmidört saat'lik inkübasyonda IC₅₀'nin tüm dozlarında PK'ya göre P1 ve P2 örnekleri yüksek bulundu (P≤0,05). Kırk sekiz saatlik inkübasyonda ise IC₂₅ dozunda PK'ya göre NK, P2 ve P1 örneklerinde TAK düzeylerinin yüksek olduğu tespit edildi (P<0,05). IC₅₀ dozlarında ise TAK düzeyleri NK'ya göre P1, PK'ya göre P1, P2 ve C₂H₅OH'a göre P1 örneklerinde yüksek bulundu (P<0,01). (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin etanolik ekstraktlarının, NK, C₂H₅OH ve PK' nın TAK düzeyleri.

Propolis Ekstraktı	TAK (nmol Trolox Equiv./L)							
	İnkübasyon süresi ve dozu (µg/ml)							
	IC ₂₅	24saat	IC ₅₀	24saat	IC ₂₅	48saat	IC ₅₀	48saat
P1	3,49±0,01	0,57±0,19	130,18±0,42	0,78±0,24 ^a	1,83±0,17	1,13±0,18 ^a	38,9±3,63	1,83±0,10 ^a
P2	4,15±0,26	1,02±0,44	134,65±8,30	0,82±0,14 ^a	39,60±0,56	0,85±0,19 ^{ab}	102,34±1,45	1,09±0,45 ^b
P3	10,45±0,45	0,47±0,19	77,14±3,35	0,42±0,18 ^{ab}	38,04±0,91	0,75±0,06 ^{abc}	113,02±2,69	0,68±0,17 ^{bc}
P4	14,99±0,95	0,63±0,22	73,58±4,69	0,59±0,13 ^{ab}	25,79±0,30	0,61±0,06 ^{bc}	75,58±0,89	0,61±0,12 ^{bc}
NK		0,49±0,08		0,49±0,08 ^{ab}		0,85±0,08 ^{ab}		0,85±0,08 ^{bc}
C ₂ H ₅ OH		0,41±0,07		0,41±0,07 ^{ab}		0,79±0,17 ^{abc}		0,79±0,17 ^{bc}
PK		0,24±0,06		0,24±0,06 ^b		0,39±0,06 ^c		0,39±0,06 ^c
P		>0,05		≤0,05		<0,05		<0,01

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05), (P<0,01)

3.2.3.2. Hücre Kültür Medyumu TOK Düzeyleri

Propolisin su ekstraktlarının 24 saat'lik inkübasyonunda hücre kültür medyumunda TOK düzeyleri IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında tüm propolis örneklerinde PK ve NK gruplarına göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulundu (P<0,001). En düşük TOK düzeyi P4 örneğinde gözlemlendi (P<0,001). Kırksekiz saatlik inkübasyon sonucunda IC₂₅ dozunda PK ve NK'ya göre propolis uygulanan gruplarda önemli düzeyde düşük olduğu, IC₅₀ dozunda ise PK'ya göre NK ve tüm örneklerde TOK düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük olduğu belirlendi (P<0,001). P1 örneğinin TOK düzeyinin diğerlerine göre en düşük olduğu gözlemlendi. P2 örneği IC₂₅ ve IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanamadı (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin su ekstraktlarının, NK ve TOK düzeyleri.

Propolis Ekstraktı	TOK (µmol H ₂ O ₂ Equiv./L)									
	İnkübasyon süresi ve dozu (µg/ml)									
	IC ₂₅	24saat	IC ₅₀	24saat	IC ₂₅	48saat	IC ₅₀	48saat	IC ₂₅	48saat
P1	2,36±0,24	1,26±0,10 ^e	45,71±4,73	1,76±0,10 ^e	3,32±0,28	1,30±0,28 ^e	78,46±6,64	1,70±0,08 ^e		
P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	3,96±0,20	1,12±0,30 ^e	32,69±1,65	1,60±0,15 ^e	20,07±0,18	1,69±0,28 ^e	172,82±1,56	4,73±0,39 ^b		
P4	5,05±0,13	0,39±0,10 ^d	33,45±0,57	1,51±0,65 ^e	54,28±0,43	1,55±0,24 ^e	167,49±1,32	4,78±0,10 ^b		
NK		4,39±0,37 ^b		4,39±0,37 ^b		4,39±0,18 ^b		4,39±0,18 ^b		
PK		5,58±0,15 ^a		5,58±0,15 ^a		6,47±0,91 ^a		6,47±0,91 ^a		
P		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,001)

Propolisin etanolik ekstraktlarının 24. saatlik inkübasyonunda hücre kültür medyumunda TOK düzeyleri IC₂₅ dozlarında NK, PK ve C₂H₅OH gruplarına göre tüm propolis örneklerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulundu (P<0,001). Total oksidan kapasite düzeyleri IC₅₀ dozlarında ise NK, PK ve etil alkol grupları ile P3 ve P4 örneklerine göre P1 ve P2 örneklerinde TOK istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulundu (P<0,001). Zamana bağlı olarak NK, C₂H₅OH ve PK gruplarında TOK düzeylerinde düşme gözlemlendi (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.8. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin etanolik ekstraktlarının NK, C₂H₅OH ve PK' nin TOK düzeyleri.

Propolis Ekstraktı	TOK ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)									
	İnkübasyon süresi ve dozu ($\mu\text{g/ml}$)									
	IC ₂₅	24saat	IC ₅₀	24saat	IC ₂₅	48saat	IC ₅₀	48saat	IC ₂₅	48saat
P1	3,49±0,01	1,48±0,16 ^b	130,18±0,42	1,44±0,31 ^b	1,83±0,18	1,13±0,18	38,9±3,63	1,44±0,48		
P2	4,15±0,26	1,25±0,24 ^b	134,65±8,30	1,78±0,39 ^b	39,60±0,56	1,34±0,43	102,34±1,45	2,81±0,13		
P3	10,45±0,45	1,03±0,28 ^b	77,14±3,35	4,83±0,54 ^a	38,04±0,91	1,01±0,38	113,02±2,69	1,65±0,56		
P4	14,99±0,95	1,35±0,40 ^b	73,58±4,69	4,80±0,77 ^a	25,79±0,30	1,59±0,27	75,58±0,89	1,07±0,24		
NK		4,39±0,18 ^a		4,39±0,18 ^a		1,51±0,08		1,51±0,08		
C ₂ H ₅ OH		4,39±0,37 ^a		4,39±0,37 ^a		1,60±0,39		1,60±0,39		
PK		5,25±0,20 ^a		5,25±0,20 ^a		2,11±0,52		2,11±0,52		
P		<0,001		<0,001		>0,05		>0,05		

^{a,b,c}. Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,001)

3.2.3.3. Hücre Kültür Medyumu OSİ Düzeyleri

Propolisin su ekstraktlarının 24. saat'lik inkübasyonunda hücre kültür medyumunda OSİ düzeyleri IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında NK ve PK'ya göre tüm propolis örneklerinde düşük bulundu (P<0,001). Ayrıca aynı saat ve dozlarda PK'ya göre NK düşük bulundu (P<0,001), Kırk sekiz saatlik inkübasyonda ise IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında PK'ya göre NK ve tüm propolis örneklerinde OSİ düzeylerinin düşük olduğu tespit edildi (P<0,05). (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.9. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin su ekstraktlarının, NK ve PK' nın OSİ düzeyleri.

Propolis Ekstraktı	OSİ							
	İnkübasyon süresi ve dozu (µg/ml)							
	IC ₂₅	24saat	IC ₅₀	24saat	IC ₂₅	48saat	IC ₅₀	48saat
P1	2,36±0,24	0,14±0,02 ^c	45,71±4,73	0,26±0,06 ^c	3,32±0,28	0,12±0,03 ^b	78,46±6,64	0,15±0,02 ^b
P2	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	3,96±0,20	0,1±0,03 ^c	32,69±1,65	0,32±0,02 ^c	20,07±0,18	0,41±0,26 ^b	172,82±1,56	0,26±0,01 ^b
P4	5,05±0,13	0,03±0,00 ^c	33,45±0,57	0,16±0,06 ^c	54,28±0,43	0,46±0,09 ^b	167,49±1,32	0,31±0,09 ^b
NK		0,96±0,13 ^b		0,96±0,13 ^b		0,53±0,07 ^b		0,53±0,07 ^b
PK		2,33±0,12 ^a		2,33±0,12 ^a		1,84±0,57 ^a		1,84±0,57 ^a
P		<0,001				<0,05		<0,05

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05), (P<0,001)

Propolisin etanolik ekstraktlarının 24. saatlik inkübasyonunda hücre kültür medyumunda OSİ değerleri IC₂₅ dozunda NK, C₂H₅OH ve PK'ya göre tüm propolis örneklerinde düşük, IC₅₀ dozlarında PK'ya göre tüm gruplarda düşük, P1 ve P2 örneklerine göre diğer gruplarda yüksek bulundu (P<0,001). Kırk sekiz saatlik inkübasyonda ise IC₂₅ ve IC₅₀ dozlarında PK'ya göre NK ve tüm propolis örneklerinde OSİ düzeylerinde sayısal azalmalar olduğu, ancak istatistiksel olarak önemli düzeyde değişmediği saptandı (P>0,05). (Çizelge 3.10.).

Çizelge 3.10. Caco-2 hücre kültür medyumunda propolisin etanolik ekstraktlarının, NK, C₂H₅OH ve PK' nin OSİ düzeyleri.

Propolis Ekstraktı	OSİ									
	İnkübasyon Süresi ve dozu (µg/ml)									
	IC ₂₅	24saat	IC ₅₀	24saat	IC ₂₅	48saat	IC ₅₀	48saat	IC ₂₅	48saat
P1	3,49±0,01	0,33±0,13 ^c	130,18±0,42	0,23±0,09 ^c	1,83±0,17	0,10±0,02	38,9±3,63	0,08±0,03		
P2	4,15±0,26	0,19±0,08 ^c	134,65±8,30	0,24±0,07 ^c	39,60±0,56	0,15±0,04	102,34±1,45	0,43±0,23		
P3	10,45±0,45	0,29±0,11 ^c	77,14±3,35	1,14±0,08 ^b	38,04±0,91	0,14±0,06	113,02±2,69	0,27±0,13		
P4	14,99±0,95	0,30±0,13 ^c	73,58±4,69	0,97±0,39 ^b	25,79±0,30	0,27±0,06	75,58±0,89	0,17±0,02		
NK		0,94±0,20 ^b		0,94±0,20 ^b		0,18±0,04		0,18±0,03		
C ₂ H ₅ OH		1,15±0,25 ^b		1,15±0,25 ^b		0,25±0,11		0,25±0,11		
PK		2,19±0,14 ^a		2,19±0,14 ^a		0,61±0,23		0,61±0,23		
P		<0,001		<0,001		>0,05		>0,05		

^{a,b,c,d}. Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05), (P≤0,001)

4. TARTIŞMA

Günümüzde doğal ürünler, insan yaşamı ve çevre için, güvenli olmadığı düşünülen sentetik ürünlere kıyasla, sağlığı korumanın sembolü olarak kabul edilmektedir (Nema vd., 2013). Gelişmiş ülkelerde, özellikle Avrupa ve Kuzey Amerika'da çeşitli tedaviler için kullanılan tüm ilaçların yaklaşık %50'si doğal ürünlerden üretilmektedir. Dünya nüfusunun büyük bir kısmı, bitkiler ve bitkisel ürünler şeklinde doğal olarak oluşan ilaçlara inanmaktadır. Son yıllarda diyetin hastalıkları önleme ve tedavi etmedeki rolü yaygın olarak kabul edilmektedir. Temel beslenme, "yeterli beslenme" kavramı, diyetin sağlığı geliştirmesi ve genel refahı iyileştirmesi olarak tanımlanabilen "optimal beslenme" kavramı (gıdaların fonksiyonel hale getirilmesi) ile yer değiştirme eğilimindedir (Kapare ve Sathiyarayanan, 2020).

Fonksiyonel gıda kavramı, geleneksel, iyileştirilmiş ve besleyici gıdalara kıyasla daha iyi fizyolojik veya psikolojik sağlığı geliştirme yeteneğine sahip gıdaları ifade eder. Bu etkiler, mükemmel sağlık bakımına ve kronik hastalıkların azalmasına olumlu katkıda bulunur (Pasupuleti, Sammugam, Ramesh ve Gan, 2017). Fonksiyonel gıdalar, aynı zamanda nutrasötikler, tasarlanmış gıdalar, tedavi edici veya tıbbi gıdalar olarak da bilinir. Fonksiyonel gıda kavramı bir çok yönü olduğu için karmaşıktır. Fonksiyonel gıda pazarı yıllık %15 ve %20 oranında artmaktadır. Yiyecekleri işlevsel hale getirmek için farklı bileşenler eklenebilir. İşlevsellik özelliği taşıyan besinler arasında arı kovanından elde edilen bal, propolis, polen, arı sütü, balmumu ve arı zehri gibi arı ürünleri en sık kullanılan doğal ürünler arasında yer almaktadır (Kapare ve Sathiyarayanan, 2020).

Propolis, biyolojik ve farmakolojik özellikleri ile yüzyıllardır bilinen bir bal arısı ürünüdür (Krol vd., 2013). Propolisin bileşimi son derece karmaşıktır. Arılar balmumu salgılayan, reçine ve uçucu maddeler, bitki salgılarından ve bitkisel doku parçalarından elde edilir. Propolis hayvansal bir ürün olmasına rağmen biyolojik aktivitesinin dayandığı bileşenler bitki kökenlidir (Salatino vd., 2005). Propolisin

kimyasal bileşimi; coğrafi konum, iklim özellikleri ve yerel bitki örtüsüne göre değişiklik gösterebilmektedir. Kimyasal analizi, biyoaktivitesinden sorumlu bitki kaynaklı bileşiklere yönelik olmalıdır. Kimyasal bilgiler, kalite, kontrol ve standardizasyon için son derece önemlidir (Bankova vd., 2019).

Ham propolis, bitki reçineleri ve balmumu içerdiğinden bu haliyle kullanılamaz. Biyoaktif bileşenlerini elde etmek için ekstrakte edilmelidir (Sawaya, da Silva Cunha ve Marcucci, 2011). Ekstraksiyon propolisin biyoaktif bileşenlerinden yararlanmada önemli bir adımdır. Fazla miktarda biyoaktif bileşeni içeren uygun maliyetli ürünlerin üretimi için ekstraksiyon metodu ve çözücü seçimi son derece önemlidir (Bankova vd., 2021). Ekstraksiyon için su, etanol, heksan, diklorometan veya DMSO gibi çeşitli çözücüler kullanılmaktadır (Patel, 2016). Propolis organik çözücülerde daha kolay çözünür. Propolisin yapısında bulunan bitki reçinelerinin nispeten apolar yapıya sahip olmaları, kimyasal bileşenleri deşışede sudaki çözünürlüğünü sınırlandırmaktadır. Propolisin biyoaktif bileşenlerinin ekstraksiyonu; önemli bitki türevli bileşikleri çözmeyi ve yapısında bulunan mumu (%20'ye kadar) en iyi şekilde ortadan kaldırmayı amaçlar (Bankova vd., 2021). Türk propolisinin biyoaktif bileşenlerini belirlemek amacıyla etanolik ve su ekstraktlarıyla yapılan sınırlı sayıda çalışma vardır (Gulçin, Bursal, Şehitoğlu, Bilsel ve Gören, 2010; Duran, Muz, Culha, Duran ve Ozer, 2011; Ozdal, Sarı-Kaplan, Mutlu-Altundag, Boyacıoğlu ve Capanoğlu, 2018; Sorucu ve Oruç, 2019; Bozkuş, Değer ve Yaşar, 2021; Al-Juhaimi vd., 2021).

Yapılan bir çalışmada (Oruç vd., 2021), Türkiye'de tüketilen ürünlerdeki konsantrasyonların belirlenmesi ve belirlenen sonuçların propolis kalitesi açısından değerlendirilmesi amacıyla 2015-2018 yılları arasında Türkiye'nin farklı illerinden ve farklı ülkelerden Türkiye'de satılan ve kullanılan ticari ham propolis ve propolis ürünlerinden toplam 91 propolis örneği toplanarak 16 ayrı fenolik bileşiğin analizi yapılmış; analiz edilen yerel ham ve etanol bazlı ürünler arasında yüksek oranlarda (%75-100) en baskın bileşikler olarak apigenin, kaempferol, krisin, pinosembrin, galangin, CAPE, naringenin, kafeik asit ve DMCA fenolik bileşikler, bulunmuştur. Analiz edilen ham, etanol bazlı, su bazlı ve propolisin propilen glikol numunelerinde tek tek fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarının büyük ölçüde deşıştiğini göstermiştir. Yerel ve ithal numuneler arasında fenolik bileşiklerde önemli

farklılıklar olduğu bildirilmiştir ($P<0,05$). Mevcut sonuçlar, faydalı fenolik bileşikler için ticari propolis numunelerinin kalitatif ve kantitatif analizinin önemli olduğunu ve propolis ürünlerinin kalite kontrolünü sağlayabileceğini göstermiştir.

Türk propolisinin etanolik ve su ekstraktları hazırlanarak HPLC ve GC-MS teknikleri ile su ekstraktının profilini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada (Bozkuş vd., 2021), Türkiye'nin 4 farklı bölgesinden (Trabzon, Erzurum, Zonguldak ve Adıyaman) toplanan propolis örnekleri ile bir karışım hazırlanarak deiyonize su ve mutlak etanol ile ekstrakte (%90 verimle) edilmiştir. Bu çalışmada, su ekstraktında en bol bulunan bileşik kafeik asit 204 $\mu\text{g/ml}$ olurken, alkol ekstraktında krisin 641,33 $\mu\text{g/ml}$ tespit edilmiştir. Su ekstraktında kafeoilkuinik asit bulunmuştur. Etanolik ekstraktlarda 7 flavonoid, 2 fenolik asit ve 1 fenolik asit ester bulunurken kafeik ve trans-sinamik asitler her 2 ekstraktta ortak bileşenlerdir. Bu çalışmada, etanol ekstraktındaki çözünür bileşik sayısının fazla olması ve yüksek miktarda fenolik bileşik içermesine rağmen, su ekstraktı herhangi bir ekstra maliyet getirmeden hazırlanabileceği ve doğal bir ürün olarak tüketilebileceği, ayrıca biyolojik aktivite üzerine yapılacak çalışmalarda yol gösterici olabileceği bildirilmiştir. Sunulan çalışmadan da görüldüğü üzere farklı polariteli çözücülerin kullanımı analiz edilecek ekstraktların bileşimini etkilemektedir. Hidrofobik maddeler apolar çözücülerde çözünürken, hidrofilik maddeler polar çözücülerde daha iyi çözünürler (Martinello ve Mutinelli, 2021). Propolis ekstraksiyonunda su, gliserol, glikol ve etanolik ekstraktlarının TPC, TFC ve FRAP antioksidan kapasitelerinin kıyaslandığı çalışmada (Yıldız vd. 2020), ekstraktların antioksidan kapasiteleri ile çözücülerin dielektrik sabitleri arasında paralellik gözlenmiş, numunelerin TPC miktarları 0,79-87,56 mg GAE/mL; TFC miktarları 0,73-24,72 mgKE/mL arasında ve FRAP antioksidan kapasite değeri 7,52-870,121 mM Troloks E/mL arasında bulunmuştur. Propolis'te bulunan bileşenlerin polaritelerinin farklı olması nedeniyle "benzer benzeri çözer ilkesi" propolis ekstraksiyonunda da geçerlidir. Çözücüler polar, apolar ve yarı polar olabilirler. Dielektrik sabiti (δ), çözücü polaritesini yaklaşık olarak veren bir niceliktir ve polaritenin artışı ile paralellik gösterir. Çalışmada kullanılan propolis ekstraktlarının, çözücülerinin di elektrik sabitlerine bakıldığında suyun 78,5 ($\delta>50$, polar yapıda), %70'lik etil alkol'ün ise 24,3 ($\delta = 20-50$ yarı polar yapıda) olması nedeniyle, etil alkol'ün polaritesi daha düşük, kısmen apolar moleküllerde bir

dereceye kadar polariteye neden olarak polar-apolar moleküllerin karışabilirliğini sağlarlar. Su ise polaritesi daha yüksek bileşenleri çözerek, propolis ekstraktının kompozisyonunu değiştirdiği bildirilmektedir.

Sunulan çalışmada; propolisin su ve etanolik ekstraktlarının TPC ve TFC miktarları incelendiğinde, Çizelge 3.1.'de görüldüğü üzere etanolik ekstraktların su ekstraktlarına göre TPC, TFC miktarları ve antioksidan kapasiteleri daha yüksek (P4_{WEP} hariç) bulundu. Kosalec vd. (2005), ticari Hırvatistan propolisinin etanolik ekstraktlarının antimikrobiyal, antifungal ve flavonoid miktarını belirlemişlerdir. Standart olarak kuersetinin kullanıldığı bu çalışmada; Hırvat propolis ekstraktlarının TFC madde miktarı %0,78 ile %18,92 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada (do Nascimento vd., 2018); Brezilya'da ticari olarak satılan 3 kahverengi (A, B ve C) ve 1 kırmızı (D) propolis ekstraktında flavonoidler, fenolik bileşikler, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal etki bakımından analiz edilmiş; propolis ekstraktlarının %TPC miktarları 9,388-12,220 aralığında bulunurken, A ve C numunelerinde kendi aralarında anlamlı fark görülmezken, D numunesinin tüm propolis ekstraktları ile anlamlı farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (P<0,05). Birimler farklı olduğu için karşılaştırma yapılamamıştır. Herrera vd. (2010), ticari Şili propolis ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini ve toplam polifenol miktarını belirlemişlerdir. Standart olarak pinosebrin ve galangin (2:1) karışımının kullanıldığı çalışmada, ticari Şili propolis ekstraktlarının TPC miktarı 9 ile 85 mg/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir. Sunulan çalışmada; propolis örneklerinde TPC miktarının Herrera vd. (2010)'nın bildirdiği değerlerden daha düşük bulundu ve bunun nedeninin muhtemelen farklı standart kullanımından ($\mu\text{g QEs/ml}$) kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Keskin (2018), propolisin kalite parametrelerinin belirlenmesi amacıyla Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan ham propolis ve ticari ürünlerin TPC ve TFC içeriklerini analiz ederek ticari EEP'nin TFC miktarını $6,83 \pm 0,09 - 77,68 \pm 6,34$ mg GAE/mL, ticari WEP'in TPC miktarını 0,25 ile 3,40 mg GAE/mL aralıklarda, TFC miktarlarını; ticari EEP'de 1,24 ile 23,33 mgKE/ml, ticari WEP'te ise 0,01 ile 0,75 mgKE/ml olarak tespit etmiş, propolisin ticari olarak satışında kalite parametrelerinde TPC ve TFC miktarının sırasıyla $\%10 \pm 5,7$ ve $\%2 \pm 1,4$ olması gerektiğini bildirmiştir. Bu değerlere bakıldığında, EEP'de TPC miktarı sunulan çalışmada daha düşük bulunurken, propolisin su ekstraktlarında TPC miktarı daha yüksek bulunmuş, TFC miktarı ise daha düşük

bulunmuştur. Keskin ve Kolaylı (2019), 20 adet farklı çözücülerde çözülmüş ticari propolis örneklerini analiz etmişler; TPC içeriklerinin 6,83 ile 77,68 mg GAE/ml arasında değiştiğini, TFC madde miktarlarını ise 0,01 ile 3,33 mg QE/ml aralığında olduğunu iki örnekte flavonoid bulunmadığını beyan etmişlerdir. Ticari propolis örneklerinin biyoaktif bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan başka bir çalışmada (Sağdıç vd., 2020); 14 farklı propolis örneğinde TPC madde miktarları 2431 ile 127318 mg GAE/L, TFC madde miktarları ise 104 ile 40516 mg QE/L aralığında bulunurken su ekstraktı P6 ve P9 örneklerinde flavonoid bulunamamıştır. Kolaylı vd. (2020) yaptıkları çalışmada, 11 adet ticari propolis örneklerinin kalite parametrelerini, taze hazırlanmış Anadolu propolisi (EEP % 70) ile karşılaştırmışlar; etanolik 4 preparatın TPC içerikleri 1093-5931 mg GAE/100 ml, glikol içeren 2 örneğin 2283-3090 mg GAE/100 ml, sulu 2 örneğin 102-645 mg GAE/100 ml, zeytinyağında çözülmüş 2 örneğin 492-642 mg GAE/100 ml aralıklarında bulunurken, en yüksek TPC değerinin EEP ekstraktlarında olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar ticari propolis örneklerinde TFC madde miktarının 17 ile 2116 mg QE/100 ml aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada etanolik ekstraktlarda bulunan değerler yukarıda bildirilen değerden daha düşük, sulu ekstraktlarda ise daha yüksek bulunmuştur. Total flavonoid miktarı ise sunulan çalışmada daha düşük bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda elde edilen konsantrasyonların farklı olmasının nedenlerinin; muhtemelen propolisin toplanma alanına, bitki türüne, arı ırkına, ayrıca ticari örneklerin ekstraktlarının hazırlanma teknikleri ve çözücüye bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Czyzewska vd. (2016), Polonya'da ticari propolis ekstraktlarında, sitotoksik ve proapoptotik etkileri, polifenollerin ve bunların karışımlarının aktivitelerini insan dil skuamöz karsinom (CAL-27) hücre hattında incelemişler; ticari olarak satılan etanolik propolis ekstraktlarının 3 örneğin TPC içeriklerini EEP1 8,76 mg/ml, EEP2 3,79 mg/ml, EEP3'de 6,65 mg/ml olarak tespit etmişlerdir. Bu değerlerin sunulan çalışmanın değerlerinden daha düşük olması, Polonya'da satılan ticari ürünler olduğu için bölgesel farklılıklardan ileri gelebileceğini düşündürmektedir. Polonya pazarında ticari olarak satılan 10 adet sıvı propolis ekstraktında, fenolik bileşiklerin, flavonoidlerin ve fenolik asitlerin toplam içeriği ve antioksidan kapasitesinin belirlendiği başka bir çalışmada (Cabaj ve Juszcak, 2021), TPC miktarları 4,62-215,03 mg GAE/ml, TFC miktarları 0,49-21,26 mg QE/ml ve fenolik asitler 1,16-

28,81 mg GAE/ml aralıklarında tespit edilmiş ve propolis konsantrasyonu ile TPC arasında doğrusal korelasyon ($r=0,69$) olduğu ifade edilmiştir.

Sunulan çalışmada, propolisin su ve etanolik ekstraktlarının TPC ve TFC miktarları incelendiğinde, Çizelge 3.1.'de görüldüğü üzere etanolik ekstraktların su ekstraktlarına göre TPC ve TFC miktarları daha yüksek bulunurken, antioksidan kapasiteleri ($P4_{WEP}$ hariç) yüksek bulundu.

Literatürlerde ticari ürünlerdeki TPC ve TFC miktarları ile ilgili kesin bir aralık verilmemekle birlikte gözlenen konsantrasyon farklılıklarının muhtemelen propolisin toplandığı bölge, toplayan arı ırkı, ekstraksiyon metodu ve kullanılan çözücü gibi nedenlerden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, ham propolisin farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş örneklerinde TPC ve TFC miktarları belirlenen çalışmalarda (Kumazawa, Hamasaka ve Nakayama, 2004; Muhammadzadeh vd., 2007; Çakıroğlu, 2010; Gülçin vd., 2010; Yavuz, 2011; Daraban, Olah, Burtescu, Prıpon ve Hanganu, 2019; Degirmencioglu vd., 2019; Ozdal vd., 2019; Yıldız, 2020; Karabacak vd., 2021; Al-Juhaimi vd., 2021) bulunmaktadır.

Propoliste bulunan fenolik maddelerden olan flavonoidler ve hidroksisinnamik asit türevleri propolisin faydalı biyolojik özelliklerine atfedilmektedir (Silici, 2019). Fenolik asitlere göre, nispeten apolar moleküller olan propoliste bulunan (Keskin ve Kolaylı, 2019), flavonoidler, bitkilerin hemen hemen tüm kısımlarından ekstrakte edilebilirler. Flavonoidler fotosentez yapan hücrelerde bulunurlar, fakat beslenmede insanlar için önemli olmalarına rağmen sentezlenemeyip dışarıdan alınmaları gerekir (Silici, 2019). Antioksidanlar, diğer moleküllerin oksidasyonunu yavaşlatabilen veya inhibe edebilen ve böylece bu tür değişiklikleri önleyebilen moleküllerdir (Martinello ve Mutinelli, 2021). Sunulan çalışmada; propolisin su ve etanolik ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri incelendiğinde, çizelge 3.1.'de görüldüğü üzere, antioksidan kapasiteleri TPC miktarları ile kısmen uyumlu ($P1_{WEP}$ ve $P2_{WEP}$ hariç), TFC miktarları ile uyumlu olduğu görüldü. Propolisin su ekstraktlarında TFC miktarı $13,37\pm0,03$ μg QEs/ml olan $P4$ 'ün antioksidan kapasitesi $47,49\pm0,30$ μg QEs/ml ile en yüksek değere sahipken, en düşük antioksidan kapasite; TFC miktarı $4,49\pm0,01$ μg QEs/ml olan $P2$ 'nin antioksidan kapasite değeri $475,56\pm41,46$ μg QEs/ml'dir. Etanolik ekstraktlarda; TFC miktarı $118,39\pm0,25$ μg QEs/ml en yüksek olan $P1$ 'in antioksidan kapasite değeri, $4,82\pm0,08$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ile en yüksek değere sahiptir. En düşük antioksidan kapasite; TFC miktarı $14,58\pm0,03$ μg QEs/ml olan

P4'ün antioksidan kapasitesi değeri olarak $66,91 \pm 0,35$ μg QEs/ml bulundu. Propolisin etanolik ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri su ekstraktlarından daha yüksek (P4_{WEP} hariç) bulundu. Tüm ekstraktlar içerisinde etanolik P1 ekstraktı örneğinin antioksidan kapasite değeri $4,82 \pm 0,08$ $\mu\text{g/ml}$ standart olarak kullanılan BHT $6,94 \pm 0,34$ $\mu\text{g/ml}$ ve BHA'dan $10,43 \pm 0,51$ $\mu\text{g/ml}$ daha yüksek bulundu (Şekil 3.3.). Fotodiyot dizi algılama (HPLC-PDA) yöntemi ile içerik analizleri sonucunda farklı çözücülerde hazırlanmış propolis ekstraktlarının fenolik bileşiklerinden olan flavonoidleri, pinosembrin>, krisin>, galangin>, pinobanksin>, pinostrobin> ve kafeik asit>, ferulik asit>, p-kumarik asit>, t-sinamik asit dahil olmak üzere fenolik asitleri içerdiği gösterilmiştir (Özdal vd., 2018.). Duran vd. (2011), Türk propolisinin alkoller, aromatik asitler ve esterleri, flavonoller ve ketonları içerdiğinden hem Avrupa hemde Brezilya tipi karışık bir profil sergilediğini, Bozkuş vd. (2021), propolisin su ekstraktında kafeoilkuinik asitin ve her iki ekstrakta (etanolik ve su) kafeik ve trans sinamik asitler ve 7 flavonoid, 2 fenolik asit, 1 fenolik ester bulunduğunu bildirmişlerdir. Türkiye'de beş lokasyondan alınan propolis örneklerinde ana bileşenin bir flavonoid olan pinokembrin'in olduğu bunu pinobanksin'in izlediğini bildirirken (Al-Juhaimi vd., 2021), Marmara bölgesinde mevsime ve rakıma göre galangin, naringenin, pinocembrin, kersetin, luteolin, kafeik asit, trans-sinamik asit, p-kumarik asit, m-kumarik asit ve CAPE seviyelerinde önemli farklılıklar bulunduğu bildirilmiştir (Sorucu ve Oruç, 2019). Sunulan çalışmada; propolisin etanolik ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin yüksek olması, içerdikleri büyük miktarda flavonoidlerden ileri gelebileceğini düşündürmektedir.

Türkiye'nin 39 farklı bölgesinden toplanan propolis örneklerinin ve PK olarak 2 tane ticari ekstraktın kimyasal içeriği, antioksidan, antiviral aktiviteleri, sitotoksitesisi ve nitrik oksit inhibisyonu (iNOS)'nun değerlendirildiği çalışmada (Sarıkahya vd., 2021), TPC miktarları sırasıyla $4,80 \pm 0,07$ ve $5,47 \pm 0,19$ mg GAE/ml bulunmuş, CUPRAC yöntemine göre ham propolis'ten elde edilen ekstraktların antioksidan kapasiteleri $8,24 \pm 0,31$ – $0,71 \pm 0,01$ mmolTR/g aralığında bulunurken, 2 ticari ekstraktın antioksidan kapasitesi sırasıyla $2,67 \pm 0,07$ mmolTR/g ve $2,68 \pm 0,11$ mmolTR/g olarak tespit edilmiş, total fenol miktarı yüksek olan propolis ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinde yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada farklı standart (mmol TR/g) kullanıldığı için karşılaştırma yapılamamıştır.

CUPRAC yöntemine göre antioksidan kapasite tayini, ticari propolis preparatların aksine, ham propolisin çeşitli çözücülerde hazırlanmış ekstraktlar üzerinde yapılmıştır (Sarikaya, Ulusoy, Öztürk, Tuncel ve Kolayli, 2008; Gulcin vd., 2010; Yavuz, 2011; Karabacak vd., 2021).

Doğal ürünler, yapısal olarak çeşitli biyoaktif bileşikleri sentezleme eğilimleri nedeniyle, antitümör ve sitotoksik aktivitelere sahip potansiyel kimyasal bileşen kaynaklarıdır (Nema vd., 2013) Birçok epidemiyolojik gözlem, fitokimyasallar bakımından zengin, bitki bazlı gıdaların tüketimi ile kanser insidansı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir (Chikara vd., 2018). Diyet fitokimyasalları araştırılmış ve antioksidan aktiviteleri ile kansere karşı koruyucu/önleyici etki gösterdikleri rapor edilmiştir (Gürler vd., 2020).

Ham propolisin çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmada (Choudhari vd., 2013), 12. saat'lik inkübasyon sonucunda B16F1, MCF-7, HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde hücre canlılığı sırasıyla ~%1, %12, %26 ve %40 olarak bulunmuş, propolisin EEP ekstraktının, test edilen tüm hücre hatları üzerinde güçlü bir antikanser aktiviteye sahip olduğu ve apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Ishihara vd. (2009), Çin ve Brezilya propolisinin EEP özlerini kullanarak, Caco2, HCT-116, HT-29 ve SW-480 olmak üzere dört farklı insan kolon karsinom hücre hatlarında antikanser aktivitelerini araştırmışlar; ekstraktlar DMSO içinde çözülerek kullanılmış ve 3 hücre hattında 4-41 µg/ml aralığında, Caco-2 hücre hattında ise >50µg/ml IC₅₀ değerleri ile doza bağlı büyüme inhibisyonuna neden olduğunu, HCT116 hücre hattında, Çin propolis özütünün, 72 saat'lik inkübasyondan sonra hücrelerde apoptozu indüklediği, p21 ve p53'ün hücrel mRNA seviyelerinde doza bağlı bir artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar propolisin EEP özlerinin anti-kanser aktiviteye sahip olabilecek bileşenler içerdiğini, bu nedenle propolis ve ilgili ürünlerin, insan kolon karsinomu ve tedavisine yeni bir yaklaşım sağlayabileceğini bildirmişlerdir. Şili propolisinin EEP özütünün antioksidan aktivitesi ve KB, Caco-2 ve DU-145 insan tümör hücre hatları üzerinde antiproliferatif kapasitesi açısından test edilmiş; 72 saatlik inkübasyon sonucunda KB, Caco-2 ve DU-145 hücrelerinde hücre canlılığı sırasıyla %9, %45 ve %23 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlardan propolisin kimyasal bileşimi ile ilişkili olarak serbest radikalleri temizleme ve tümör

hücreyi büyümesini inhibe etme kapasitesinin bulunduğu ve kanser tedavisinde tercih edilebileceği bildirilmiştir (Russo vd., 2004).

Kanser hücreleri, dokulara veya diğer organlara göç ve istila etme yeteneğine sahiptir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalara dayanarak flavonoidler, tümör baskılayıcı etkiler gösterir ve kanser hücrelerinin göçünü, istilasını ve metastaz yeteneğini inhibe eder veya bastırırlar (Gürler vd., 2020). Fitokimyasallar, sekonder bitki metabolitleri, antioksidan özellikleri sayesinde, oksidatif strese bağlı DNA hasarını baskılayarak kanser önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Chikara vd., 2018). Propolis, lipidlerin, nükleik asitlerin ve protein oksidasyonunun birincil nedeni olan serbest radikalleri temizleyerek (Anjum vd., 2019), hücre zarını lipid peroksidasyonuna karşı koruma yeteneğine sahip güçlü antioksidanlardandır (Daleprane ve Abdalla, 2013). Antioksidan etkilerini, oksidatif stres aracılı sinyal yolunu modüle ederler ve sonuçta hücreleri karsinogenezi tetikleyen moleküler değişikliklere uğramaktan korurlar (Chikara vd., 2018). Sunulan çalışmada; çizelge 3.3., çizelge 3.4.'de görüleceği üzere, propolisin su ve etanolik ekstraktlarının ayrı ayrı Caco-2 (HTB37) hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla metod kısmında belirtilen konsantrasyon aralıklarında 12 farklı dozu uygulanarak 24-48 saat'lik inkübasyon sonrasında ortaya çıkan *in vitro* sitotoksik etki doza bağlı olarak arttığı gözlemlendi (P_{2WEP} hariç). Su ve etanolik ekstraktlarının kendi aralarında ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında; 24 saat'lik inkübasyon sonucunda propolisin su ekstraktları P₁'de 45,71±2,73 µg/ml, P₃'te 32,69±0,95 µg/ml ve P₄'te 33,48±0,49 µg/ml'te µg/ml IC₅₀ değerleri ile etanolik ekstraktlarına göre P₁'de 130,03±0,37 µg/ml, P₃'te 77,14±1,93 µg/ml ve P₄'te 73,57±0,51µg/ml daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir (Çizelge 3.4., Şekil 3.7.). Yapılan istatistik analizde P_{WEP}'e göre P_{EWP}'lerde P₁ (P<0,001) ve P₂, P₃ ve P₄ (P<0,001) önemli düzeyde yüksek bulundu. En düşük sitotoksik etki P_{2WEP}'te %27,49 olarak bulunmuş ve IC₅₀ değerleri hesaplanamamıştır. Çizelge 3.1.'de görüldüğü üzere, propolisin su ekstraktının TPC, TFC ve toplam antioksidan kapasiteleri (P_{4WEP} hariç); propolisin etanolik ekstraktlarından daha düşük bulunmuştur. Antioksidan kapasitesi daha düşük olan su ekstraktların daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği, antioksidan kapasitesi yüksek olan etanolik ekstraktlarının ise daha düşük sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Benzer sonuçların alındığı bir çalışmada; Barlak (2009), propolisin DMSO'lu ve su ekstraktlarında polifenol, flavonoid, FRAP, TAK tayini, prostat kanseri (PC-3) hücre hattında sitotoksitesini

(MTT testi) ve hücre lizatlarının CM10 ve Q10 protein çip dizinlerine yüklenerek, SELDI-TOF-MS ile analizini yapmıştır. Bu çalışmada propolis su ve DMSO ekstraktları 0, 5, 10, 20 µg/ml ve % 0,008 % 0,004 % 0,002 DMSO son konsantrasyon olacak şekilde PC-3 hücrelerine uygulanmış ve 24 saat inkübasyon sonucunda propolis 20 µg/ml DMSO ekstraktı hücre canlılığını % 24,5-% 50; 20 µg/ml su ekstraktının ise % 17,7-33,3 aralığına düşürdüğünü, 20 µg/ml DMSO ekstraktı ile aynı yüzdedeki DMSO çözeltisi ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin canlılığının % 75,04 olduğunu ifade etmişlerdir. Aynı araştırmacı, yapılan antioksidan aktivite sonuçlarına göre; propolis DMSO ekstraktının antioksidan potansiyelinin su ekstraktlarına göre daha yüksek olduğunu tesbit etmiştir. İlgili çalışma bulgularına göre bu çalışmada, antioksidan potansiyeli daha düşük olan sulu ekstraktın, daha fazla sitotoksik aktivite gösterdiği ve ekstraktların sitotoksik aktivitesinin antioksidan potansiyelleri ile orantılı olmayabileceği, beraberinde başka mekanizmalar (hücreyi ölüme götürecek protein veya proteinlerin ekspresyonunu artırmak veya aktivitesini artırmak gibi) vasıtasıyla da sitotoksik aktivite gösterebileceği bildirilmiştir. Propolis ve polen'in kimyasal bileşimi, antioksidan kapasitesinin meme kanseri (MCF-7) ve karaciğer kanseri (Hep-G2) hücre hatlarına karşı, farklı çözücülerle (%100, %70 etanol ve WEP) hazırlanmış ekstraktları ve karışımlarının antikanser etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada (Shady, Mohamed, Sayed-Ahmed ve Amer, 2016), propolis, polen ve karışımları farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 200, 400 µg/mL) MCF-7 ve Hep-G2 hücrelerine uygulanarak 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu çalışmada sülfürodamin (SRB) testi uygulanmış; Hep-G2'de daha yüksek antikanser aktivitenin EEP70, WEP ve WPP (WEP+WPE,1:1 karışımı) ile sırasıyla 62.5, 70.31 ve 70.9 µg/mL IC₅₀ olarak bulunmuş, meme kanserinde yüksek antikanser aktivite WEP ve WPP'de gözlenirken, ardından sırasıyla 70.3, 100.2, 124.2 ve 128.1 µg/mL IC₅₀ ile EEP100 ve EEP70'te olduğu gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada ekstraktların fenolik bileşikleri, HPLC analizi ile tespit edilmiş, 25 fenolik asit ve 12 flavonoid tanımlanan bileşiklerin miktarları farklı etanol %'leri ile değişken olup en düşük % çoğunlukla su ekstraktında olduğu, propolis ve polen ekstraktlarının DPPH serbest radikal süpürme aktivitesinin %'si, alkolik ekstraktlarda karşılaştırılabilir düzeylerde bulunurken, en düşük aktivite WEP ve WPE'de (suda ekstrakte edilen polen) saptanmıştır. Bu araştırmada genel olarak propolisin antikanser aktivitesi polen'den

daha yüksek olduğu ve Hep-G2 hücre hattına karşı gözlemlenen sitotoksikite, MCF-7 hücre hattına karşı gözlemlenenden daha fazla olduğu, en şaşırtıcı sonuç ise her iki hücre hattına karşı WEP ve WPP'nin aktivitesinin yüksek olduğu, etkinliklerini tek bir bileşenden ziyade fenolik bileşen karışımları arasındaki sinerjiden kaynaklandığını, Mısır propolis ve polenin polifenol bakımından içeriğinin (çözücü bağımlı) yüksek olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada elde edilen sonuçlarla, bu doğal arı ürününün, oksidatif stres ve tümör hücresi proliferasyonu ile ilgili çeşitli hastalıkların tedavisi ve/veya önlenmesi ve sağlık açısından ileriye dönük, yeni bir fonksiyonel gıda üretimi için umut vaat ettiğini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada elde edilen sonuçlar yukarıdaki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Propolisin su ekstraktı çeşitli fenolik bileşenlere sahip olduğundan dolayı etkinliklerini tek bir bileşenle ilişkilendirmek zordur ve etkinlikleri, tek bileşenden ziyade fenolik bileşen karışımları arasındaki sinerjiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bireysel etkilerine ek olarak, antioksidanlar sinerjistik yollarla etkileşime girer ve birinin, diğerini oksidatif yıkıma karşı koruyabileceği koruyucu bir etkiye sahiptir (Parr ve Bolwell, 2000; Karou, Dicko, Simporé ve Traore, 2005).

Sunulan çalışmada; propolisin 48 saat'lik inkübasyon sonucunda IC₅₀ değerleri etanolik ekstraktlar, su ekstraktlarına göre daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir (Çizelge 3.4., Şekil 3.8.). Kırk sekiz saat'lik inkübasyonu takiben P_{WEP}'te P_{EEP}'e göre P1, P3 ve P4 (P<0,001) ekstraktlarında IC₅₀ değeri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Çizelge 3.1.'de görüldüğü üzere, propolisin etanolik ekstraktlarının TPC, TFC ve toplam antioksidan kapasiteleri (P_{4WEP} hariç); propolisin su ekstraktlarından daha yüksek bulunmuştur. Etanolik propolis ekstraktlarından P1'in antioksidan kapasitesi 4,82±0,08 µg/ml standart olarak kullanılan BHT ve BHA'dan daha yüksek bulunmuş ve 38,90±2,10 µg/ml IC₅₀ değeri ile en yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Su ekstraktlarından P2'nin en düşük antioksidan kapasitesi 475,56±41,46 µg/ml ve %48,31 değeri ile en düşük sitotoksik etki gösterdi ve IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.

Polonya'da ticari olarak temin edilen 3 adet etil alkolde ekstrakte edilmiş propolis örneklerinin kimyasal profilleri tanımlanmış ve etanolik propolis ekstraktlarının TPC, TFC ve CAL-27 hücre hattı canlılığı üzerine etkisinin incelendiği çalışmada (Czyżewska vd. 2016), propolisin etanolik ekstraktları DMSO'da çözülürken MTT

testi ile sitotoksik aktivitesi belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar Propolis ekstraktları 25, 50, 100, 150 µg/ml, flavonoidler ve fenolik asitler (krisin, galangin, pinosembrin, ferulik, kafeik, p-kumarik): 2,5, 12,5, 25, 50 µg/ml dozda ve fenolik bileşiklerin karışımı aynı dozda hazırlanarak CAL-27 hücreleri ile 24 saat inkübasyona bırakılarak IC₅₀ değerlerinin, ticari ekstraktlarda EEP1’de 159,2±5,1 µg/ml, EEP2’de 224,21±8,9 µg/ml ve EEP3’te 179,0±6,5 µg/ml olduğunu, tüm ekstraktların CAL-27 hücrelerinde doza bağılı bir şekilde sitotoksitesinin arttığı ve IC₅₀ değerlerinin; karışım> polifenoller>galangin>krisin>ferulik asit>kafeik asit>pinosembrin>p-kumarik asit > EEP1 >EEP3> EEP2 ile polifenolik bileşiklerin karışımının 10,7 µg/ml IC₅₀ dozuyla, CAL-27 hücreleri üzerinde sitotoksitesinden sinerjistik etkilerinin sorumlu olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca propolisin sinerjik etkisinin CAL-27 hücrelerinde kemopreventif bir ajan olarak kullanılabileceğini de ifade etmişlerdir. Sunulan çalışmada ticari Propolis örneklerinin IC₅₀ değerleri Czyzewska vd. (2016)’nın bildirdiği değerler arasında olduğu gözlenmiştir. Türkiye’nin 39 farklı bölgesine ait ham ve 2 ticari propolis örneklerinin kimyasal içeriği, antioksidan, antiviral aktiviteleri, sitotoksitesi ve nitrik oksitin (iNOS) inhibisyonu RAW 264.7 hücreleri kullanılarak değerlendirildiği ve MDA-MB-231, PC3, A549, HeLa ve tümörojenik olmayan HEK 293 hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisinin incelendiği çalışmada (Sarıkahya vd., 2021), sadece HeLa hücrelerinde, tüm propolis numuneleri için ölçülebilir aralıkta (0,5-50 µg/ml) IC₅₀ değerlerinin elde edildiği ve diğer hücre hatlarında ise önemli sitotoksitesinin gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ticari olarak satışı yapılan 2 tane propolis ekstraktlarında HeLa hücre hattında sırasıyla 27,22±2,67 µg/ml ve 37,64±2,08 µg/ml IC₅₀ değerleri ile sitotoksik etki gösterirken, diğer hücre hatlarında MDA-MB- 231, PC3, A549 50’den büyük IC₅₀ değerleri ile sitotoksik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Çalışmada, doğal bir ürün olarak propolisin immün düzenleyici aktivitelerinde ve antikanser etkilerinde rol oynayabilecek NO üretimi, yeni tedavi alternatiflerinin oluşturulmasına katkı sağlayabileceği bildirilmiştir. Sunulan çalışmada elde edilen değerler Sarıkahya vd. (2021)’nin çalıştığı hücre hatlarında bulunan IC₅₀ değerleri ile benzerlik göstermektedir. Aynı propolis ekstraksiyonu aynı laboratuvar koşullarında farklı hücre hatlarında, farklı değerler verebilmektedir. Sunulan çalışmada, ekstraktların içerik analizleri yapılamadığı için mevcut literatür bilgisine dayanılarak (Al-Juhaimi vd., 2021; Bozkuş vd., 2021; Sorucu ve Oruç,

2019; Özdal vd., 2018; Duran vd., 2011), sitotoksik ve antioksidan etkilerinin bitkiden elde edilen ekstraktların içeriğinde bulunan flavonoidler ve fenolik asitlerin birbirleriyle olan sinerjik etkisi nedeniyle ortaya çıktığı söylenebilir.

Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından belirlenen ham özütlerin sitotoksik aktivitesi için kriteri, 30 µg/ml'den düşük IC₅₀ (IC₅₀ <30 µg/ml) olması gerektiği belirtilmiştir (Itharat vd., 2004). Sunulan çalışmada propolisin su ve etanolik ekstraktlarının IC₅₀ değerleri 30 µg/ml'den büyük çıkmıştır. Bu etkinin antikanser etkinlik bakımından NCI'ya göre zayıf olduğunu göstermekle beraber propolisin su ekstraktlarının 24 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC₅₀ değerlerinin, P3_{WEP} ve P4_{WEP}'te sırasıyla 32,69±0,95 µg/ml ve 33,48±0,49 µg/ml ve etanolik ekstraktlarının 48 saat'lik inkübasyonunu takiben oluşan IC₅₀ değeri ise P1_{EEP}'de 38,90±2,10 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu değerlerin kriterlere tam olarak uymasa da; önemli anti-proliferatif etkiye sahip olduğu, IC₅₀ değerlerinin üst sınırında olması nedeniyle anti-kanser ve/veya, koruyucu/önleyici etkinliğinin olabileceği düşünülmektedir.

Propolisin polifenolik/flavonoid bileşiklerinin, bağışıklık sistemini güçlendirme ve tümör önleyici etkiler dahil olmak üzere birçok biyolojik aktivite sergilediği bilinmektedir (Orsolio, 2010). Propolisteki flavonoidler, serbest radikalleri temizleme ve hücreleri çeşitli makromoleküler hasarlardan koruma yeteneğine sahip güçlü antioksidanlardır (Bhargava vd., 2021). Ayrıca, flavonoidlerin kanser hücrelerinin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozisini etkilediği ve kanser önlenmesinde önemli bir rol oynayabileceği bilinmektedir (Orsolio, 2010). Propolisin etkinliğinin, etken madde miktarı ve absorpsiyon gibi özelliklerinin ekstraksiyon yöntemine ve formülasyona bağlı olarak farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Reis vd., 2020). İlginç bir şekilde, daha yüksek polifenol içeriği nedeniyle, sulu bir propolis özütünün etanol özütlerinden daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Bhargava vd., 2021).

Günümüzde kullanılan propolis formülasyonlarının çoğu, etanol ekstraksiyonu ile hazırlananlar suda zor çözünürler ve bu nedenle ağızdan alındığında çok iyi emilmezler. Bu nedenle absorpsiyon oranı yüksek preparatların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (Kim, Kim, Noh, Hur ve Kim, 2022). Yapılan bir çalışmada (Kim vd., 2022), suda çözünür çözelti formu ve suda çözünür toz formu olmak üzere iki formda propolis ekstresi hazırlanmıştır. Bu çalışmada, 'Unibee sıvı propolis 100

(LP)' ve 'Unibee propolis tozu 500 (PP)' olan suda çözümlenir propolis ekstraktlarının iki formu, herhangi bir emülgatör veya sentetik kullanılmadan yeni bir etanol ekstraksiyon prosedürü ile hazırlanarak farelerde t-BHP enjeksiyonu ile indüklenen oksidatif stres üzerindeki etkileri açısından test edilmiş, t-BHP enjeksiyonunun SOD aktivitelerini ve GSH seviyesini düşürdüğü ancak LP ve PP ile ön tedavilerin serumda SOD aktivitesi ve GSH seviyesindeki düşüşleri engellediği, CAT aktivitesinin arttığı ve hem LP hem de PP artan aktivite üzerinde hiçbir etki göstermediği ortaya konulmuştur. Çalışmada elde edilen verilerden LP ve PP'nin, ROS'u temizleyerek SOD aktivitesinin ve GSH seviyesinin düşmesini önlemek için yeterli antioksidan aktivite sergilediği, CAT aktivitesinin t-BHP tarafından belirgin şekilde artması, bunun ROT'a karşı vücut savunma tepkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, suyla ekstrakte edilen propolisin, ROT oluşumunu etanolde ekstrakte edilenlerden daha etkili bir şekilde inhibe ettiği saptanmıştır. Propolis ve polifenolik bileşiklerin suda çözümlenir türevlerinin, tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasında önemli ölçüde azalttığı da bildirilmiştir (Orsolice ve Basic, 2003; Kubiliene vd., 2015). Sonuç olarak bu çalışmada, iki suda çözümlenir propolis özütü Unibee sıvı 100 ve toz 500, *in vivo* olarak antioksidan ve enflamatuar etkiler göstererek iyi emildiklerini ve kana karıştıklarını, daha kesin kanıtlar elde etmek için insan deneklerde bir farmakokinetik çalışma yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Propolisin en önemli özelliklerinden biri, bazı hastalıkların önlenmesine katkıda bulunan, hücreleri serbest radikaller gibi oksidatif ajanların neden olduğu hasara karşı koruyan antioksidan kapasitesidir (Martinello ve Mutinelli, 2021). Oksidatif stres iltihaplanma, yaşlanma, nörodejeneratif bozukluklar ve kanser gibi patolojik durumların gelişmesine yol açan, birçok moleküle, hücre yapısına ve fonksiyona zarar verir. Reaktif oksijen türleri, kanser gelişiminde büyük ölçüde rol oynar (Snezhkina vd., 2019). Ayrıca, artan oksidatif stres sinyal moleküllerinin modülasyonu, antioksidan enzimlerin ve enzim olmayanların üretimi, hücre büyümesi ve kanser gibi kronik hastalıkların insidansında önemli rol oynayan kronik inflamasyon yoluyla çeşitli hücresel süreçlerin düzensizliğine neden olur (Prasad ve Srivastava, 2020). Bu nedenle, hücresel ROT'u düzenlemek, hücresel homeostazın korunması için kritik öneme sahiptir. Ancak, bazı durumlarda, fitokimyasalların pro-oksidan özelliği, kanser tedavisi ile ilgili olarak faydalı olabilmektedir. Bazı *in vitro*

ve *in vivo* çalışmalar, çeşitli fitokimyasalların, kanser hücrelerinde oksidatif stresi şiddetlendirerek kemoterapötik ajanların etkinliğini güçlendirdiğini göstermektedir (Chikara vd., 2018). Yüksek seviyelerde oksidatif stresin toksik olduğu, ancak düşük seviyelerin hücresel proliferasyona yol açabileceği ve ROT'a hücre tepkisinin doza bağlı olabileceğini gösteren rapor mevcuttur (Ozben, 2007).

Ghanbari Taghiabad (2014), propolisin antikanser üzerindeki etkisini insan HEp-2 hücrelerinde araştırmışlardır. Bu amaçla araştırmada hücrelere farklı konsantrasyonlarda etanolde çözünen propolis ekstraktları ilave etmiş ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda HEp-2 hücrelerine propolis verildikten sonra SOD ve CAT aktivitelerinde azalma olduğunu, bu azalmanın HEp-2 hücrelerinde propolisten kaynaklanabileceğini ve aynı zamanda hücrelerin büyümesine engel olabileceğini, HEp-2 hücrelerinde SOD ve CAT enzim aktivitelerini sulu propolis ekstraktının azaltması, propolisin kanser kemoterapisinde bir ümit olabileceği sonucuna varmıştır. Coşkun, Ersoz, Gecili, Ozden ve Acar, (2020); 100, 250 ve 500 µg/mL etanolik propolis (PE) ile tedavi edilen C6 glioma hücrelerindeki TAK ve TOK düzeylerini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar Glioma hücrelerine 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında etanolik propolis uygulamasının TAK düzeyini kontrol hücrelerine kıyasla önemli ölçüde artırdığı, 100 µg/mL dozunda PE ile tedavi edilen C6 glioma hücrelerindeki TAK düzeyini, 250 µg/mL dozunda PE ile tedavi edilen C6 glioma hücrelerinden daha yüksek olduğu, 100, 250 ve 500 µg/mL dozlarda PE uygulanan C6 glioma hücrelerinde TOK düzeyinin önemsiz derecede düştüğünü, etanolik PE'nin, PE dozuna bağlı olarak GSH seviyesini ve Cu/Zn-SOD aktivitesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen tüm veriler doğrultusunda etanolik PE'nin, C6 glioma hücrelerinde antioksidan savunma sistemi yoluyla oksidatif stresi baskılamak ve/veya ortadan kaldırmak için potansiyel bir doğal ajan olabileceği kanaatine varılmıştır. Aynı araştırmacılar propolis takviyesinin kansere karşı doğal bir terapötik ajan olarak düşünülebileceği, gliomanın önlenmesi ve tedavisi için PE'nin etkinliğini doğrulamak için hayvan ve klinik çalışmalar gerek olduğunu ifade etmişlerdir. Propolisin bileşimi, farklı arı türlerinin ziyaret ettiği bitki türlerinin yanı sıra hava ve iklim farklılıkları nedeniyle de değişebilmektedir (Nna, Abu Bakar, Md Lazin ve Mohamed, 2018). Propolis için su, zeytinyağı, etanol veya polietilen glikol gibi farklı solvent hazırlama yöntemleri vardır. Etanolik PE'nin diğer

preparasyonlardan daha fazla fenolik bileşige sahip olduğu bildirilmiştir (Kubiliene vd., 2015).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, çeşitli temel biyokimyasal reaksiyonların normal bir sonucudur (Skrzydewska vd., 2005). Gastrointestinal sistem, karsinojeneze yol açan reaktif oksijen türlerinin saldırısına özellikle duyarlıdır (Skrzydewska vd., 2003). İnsan kolon içeriği, safra, mukus, epitel hücreleri, çeşitli mikroorganizmalar ve bunların fermentasyon ürünleri, sindirilmemiş gıda, metaller, tuzlar, toksinler, mutajenler, kanserojenler ve çözülmüş gazlar (CO₂, O₂, N₂) gibi metabolik ürünlerinin çeşitli karışımıdır. Bağırsak mukozasının sürekli olarak diyet ve bakteri kaynaklı oksidanlar ve kanserojenlerle tehdit edildiğine inanılmaktadır. Bu tür zorlu koşullara kronik olarak maruz kalma, kontrolsüz ROT üretimine ve kronik iltihaplanmaya neden olabilmektedir (Perse, 2013). Bağırsaktaki oksidanların ana kaynağı ise, bağırsak hastalıkları olan hastaların mukusunda biriken ve aktivasyon üzerine muhtemelen oksidanlar üretebilen fagositlerdir (Wiseman ve Halliwell, 1996; Skrzydewska vd., 2005). Sürekli inflamatuvar /oksidatif ortam, hidroperoksitlerin üretiminin artmasına neden olarak, çevredeki sağlıklı epitelyal ve stromal hücrelere zarar verebilir ve uzun dönemde karsinojeneze yol açabilmektedir (Perše, 2013). Kolon kanseri alanında hücre kültüründe, farklı hücre hatlarında yapılan çalışmaların sınırlı olmasından dolayı kanda (Özgönül, Aksoy, Dilmeç, Uzunköy ve Aksoy, 2009., Bağıryanık, 2020) ve kolon dokusunda (Skrzydewska vd., 2005.; Salehi, Hosseini ve Kazemi, 2022) yapılan çalışmalarda değinilmiştir. Yapılan bir çalışmada (Skrzydewska vd., 2005), hastalığın klinik ilerlemesi ve artan ROT üretimine paralel olarak kolon dokusunda lipid peroksidasyon ürünleri düzeyinin ve antioksidatif enzimlerin aktivitelerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir. Ratlarda deneysel olarak dimetilhidrazin (DMH) ile kolorektal kanser oluşturulup propolisin antioksidan ve antikarsinojenik gücü araştırılan bir çalışmada; (Salehi, Hosseini ve Kazemi, 2022), kolon dokusunda DMH grubunda bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesinin azaldığı, MDA'nın arttığı, 300 mg/kg etanolik propolisin sıçanlara oral yolla verilmesi ile SOD aktivitesini ve TAK düzeyini artırdığı ve MDA'yı azalttığı gözlenmiştir. De Lima vd. (2005), Brezilya propolisinin sulu ekstraktının (içme suyunda %0,01, %0,03, %0,1 ve %0,3 oranında yaklaşık olarak 12, 34, 108 ve 336 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozuna eşdeğer) rat

kolonunu 1,2-dimetilhidrazin kaynaklı DNA hasarına karşı koruduğunu saptamışlardır.

Özgönül, Aksoy, Dilmec, Uzunköy ve Aksoy, (2009), Kolorektal kanserli hastaların serum TAK düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğunu, kolorektal kanserli hastalarda antioksidan durumun bazı bileşenlerinin eksik olduğunu ve oksidatif hasarın meydana geldiğini, kolorektal kanser açısından rutin TAK ölçümü oksidatif stres durumunun değerlendirilmesinde ve uygun bir tedavi planının belirlenmesinde ve ayrıca kolorektal kanserin oksidatif stresinin erken tanınması için faydalı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Kolon kanseri olan insanlarda yapılan çalışmada (Bağrıyanık, 2020), serum TOK ve OSİ düzeylerinde istatistiksel olarak önemli artışlar ($P<0,05$), TAK düzeyinde ise sayısal artışlar olduğu tespit edilmiştir. Oksidatif stres parametreleri, farklı klinik evreleri olan kanser hastaları arasında önemli farklılıklar gösterdiği vurgulanmıştır (Feng vd., 2012).

Sunulan çalışmada; 24. saatte canlı hücre hattı olan NK'ya göre propolis (su ekstraktı) uygulanan gruplarda genel olarak IC_{25} ve IC_{50} 'nın tüm konsantrasyonlarında TAK düzeyinin yüksek, TOK ve OSİ düzeylerinin düşük olmasının muhtemelen propolis içeriğinde bulunan polifenoller ve flavanoidlerin antioksidan etkisinden dolayı kanser hücresinin etkisini azaltmasından ileri gelebileceğini düşündürmektedir. Kırk sekizinci saatte TAK düzeylerinin IC_{25} 'in tüm konsantrasyonlarında ölü hücre hattı olan PK'ya göre P1 ve P4 uygulanan gruplarında yüksek olduğu, TOK düzeyinin ise IC_{25} 'in tüm dozlarında NK'ya göre propolis uygulanan gruplarda düşük çıkması, uzun sürede düşük konsantrasyonlarda propolis uygulamasının yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Sunulan çalışmada; Coşkun vd. (2009)'un bulgularının aksine hücre kültür medyumunda propolisin etanolik ekstraktlarının 24 saat'lik inkübasyonda yüksek dozlarda yani IC_{50} dozunda TAK düzeylerinin PK'ya göre P1(130,18±0,42) ve P2 (134,65±8,30) uygulanan gruplarda yüksek ($P\leq 0,05$) bulunmuş ve bu da kısa sürede yüksek konsantrasyonlu propolis uygulamalarının kanser hücresine etkili olabileceğini düşündürmektedir. Propolisin etanolik ekstraktlarının 48 saat'lik inkübasyonunda ise Coşkun vd. (2009)'un bulgularına benzer olarak düşük dozda yani IC_{25} dozunda PK'ya göre NK, P2 ve P1 uygulanan gruplarda TAK düzeylerinin yüksek olduğu, IC_{50} dozlarında ise TAK düzeylerinin sadece P1 uygulanan gruplarda

NK'ya göre yüksek olduğu belirlenmiştir. IC₅₀ dozlarında ise NK'ya göre P1 ve P2 uygulanan gruplarda TOK düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, son yıllarda artan kanser vakalarından dolayı oluşan oksidatif stresi azaltmak amacıyla gıda takviyesi olarak pek çok antioksidanların alınması tavsiye edilmektedir. Bu antioksidanlar arasında en önemlisinin içeriğinde bulunan polifenoller ve flavanoidlerden dolayı antioksidan aktivitesinin fazla olduğu düşünülen propolis yer almaktadır. Propolis ekstraktlarının alınması akut ve kronik hastalıklardan korunabilmek ve daha sağlıklı bir hayat sürebilmek için tavsiye edilmektedir. Ancak antioksidanların fazlasının da oksidatif stres başta olmak üzere bir takım sağlık sorunlarına yol açabildiği bilinmektedir. Mevcut çalışmada Caco-2 hücre hattına ticari su ve etanolik propolis ekstraktlarının uygulamasının sitotoksikite ve antioksidan etkileri araştırılmıştır. Sunulan çalışmada elde edilen veriler ülkemizde ticari olarak satışa sunulan yerli üretim propolis örneklerinin Caco-2 hücre hattında sitotoksik ve anti-proliferatif etkiye sahip olduğu, NCI'ya göre P3_{WEP}, P4_{WEP}'in 24 saat'lik inkübasyonu ve P1_{EEP}'nin 48 saat'lik inkübasyonu sonucu oluşan IC₅₀ değerleri ile anti-kanser ve/veya, koruyucu/önleyici etkinliğinin olabileceği, genel olarak TOK düzeylerini azaltarak düşük dozda uzun dönem inkübasyonda antioksidan etkiler bakımından faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır.

Ticari türk propolis ekstraktlarının sitotoksik ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi amacıyla bir ya da en fazla iki propolis örneği çalışılarak; içerik analizlerinin yapıldığı, zamanın artırıldığı, (yani 24., 48., 72. ve 96. saatlerde inkübasyon) ve oksidatif stres parametreleri ile birlikte apoptozisin de değerlendirildiği daha kapsamlı çalışmaların yapılması önerilmektedir. Satışa sunulan ürünlerin etkinliği bakımından standardize edilebilmesinde yardımcı olacak etken madde analizlerinin düzenli aralıklarla yetkililer tarafından yapılması; farklı kanser hücre hatları ve kanserli hastalardan alınan örneklerde yapılan çalışmaların artırılması, *in vivo* ve moleküler araştırmalarla desteklenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Acun, S. ve Hülya, G.Ü. (2020). Fonksiyonel bir ürün olan propolisin sağlık üzerine etkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 20 (2), 189-208.
- Ademowo, O.S., Dias, H.K.I., Burton, D.G. ve Griffiths, H.R. (2017). Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process?. *Biogerontology*, 18(6), 859-879.
- Akçalı, A. (2010). Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 25(3), 119-123.
- AL Juhaimi, F., Özcan, M., Mohamed Ahmed, I., Alsawmahia, O., Özcan, M., Ghafoor, K. Babiker, E. (2021). Bioactive compounds, antioxidant activity, fatty acid composition, and antimicrobial activity of propolis from different locations in Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 1-9.
- Anderle, P., Sengstag, T., Mutch, D. M., Rumbo, M., Praz, V., Mansourian, R. ve Roberts, M.A. (2005). Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior-posterior and crypt-villus axes. *BMC Genomics*, 6(1), 1-17.
- Anjum, S.I., Ullah, A., Khan, K.A., Attaullah, M., Khan, H., Al, I.H., Bashir, M.A., Tahir, M., Ansari, M.J., Ghramh, H.A., Adgaba, N. ve Dash, C.K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Science*, 26(7),1695-1703.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M. ve Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Atınç, M. ve Kalkan, İ. (2018). Flavonoidler ve sağlık üzerine etkileri. *Aydın Gastronomy*, 2(1), 31-38.
- Atik, A. ve Gümüş, T. (2017). Propolisin gıda endüstrisinde kullanım olanakları. *Akademik Gıda*, 15(1), 60-65.
- Au, W.W. (2007). Usefulness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(3-4), 239-246.
- Badria, F., Fathy, H., Fatehe, A., Elimam, D. ve Ghazy, M. (2017). Evaluatethe cytotoxic activity of honey, propolis, and bee venom from different localities in Egyptagainstliver, breast, and colorectal cancer. *Journal of Apitherapy*, 2(1), 1-4.
- Badria, F.A., Fathy, H.M., Fatehe, A.S., Ahmed, M.H. ve Ghazy, M.G. (2018). Chemical and biological diversity of propolis samples from Bulgaria, Libya, and Egypt. *Journal Of Apitherapy*, 3(2),17-23. doi.org./10.5455/ja.20180428014109.
- Baglioni, S. ve Genuardi, M. (2004). Simple and complex genetics of colorectal cancer susceptibility. In *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 129(1), 35-43.

- Bağrıyanık H.P. (2020). Çeşitli Kanser Tiplerinde Serum Oksidan, Antioksidan ve Nitrik Oksid Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. *İstanbul Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I.B., Danert, C. ve Papotti, G. (2019). Standard methods for Apismellifera propolis research. *Journal of Apicultura lResearch*, 58(2), 1-49.
- Bankova, V., Trusheva, B. ve Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: A review. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 734-743.
- Barlak, Y. (2009). Türk Propolis Ekstraktlarının Prostat Kanser Hücre Serilerinin Proteomisine Etkisi. Doktora Tezi. *Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon.
- Basista-Sołtys, K. (2013). Allergy to propolis in beekeepers-a literature review. *Occupational Medicine&Health Affairs*, 1, 1.
- Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R. ve Yeoh, K.W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1, 24.
- Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Bhargava, P., Mahanta, D., Kaul, A., Ishida, Y., Terao, K., Wadhwa, R. ve Kaul, S.C. (2021). Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. *Nutrients*, 13, 2528. <https://doi.org/10.3390/nu13082528>.
- Biray, Ç., Gündüz, C., Yılmaz, B., Şahin, F. ve Topçuoğlu, N. (2006). Propolis ve etken maddeleri olan kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve sinamik asitin, insan t hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (ccrf-cem)'de sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 45(2), 83-92.
- Bogaert, J. ve Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, 27(1), 9.
- Bonamigo, T., Campos, J.F., Alfredo, T.M., Balestieri, J.B.P., Cardoso, C.A.L., Paredes-Gamero, E.J. ve Dos Santos, E.L. (2017). Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 12. ID 1038153. <https://doi.org/10.1155/2017/1038153>.
- Boyle, P. ve Langman, M.J. (2000). ABC of colorectal cancer: *Epidemiology. Bmj*, 321(Suppl S6). <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7264.805>.
- Bozkuş, T.N., Değer, O. ve Yaşar, A. (2021). Chemical characterization of water and ethanolic extracts of Turkish propolis by HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of Liquid Chromatography&Related Technologies*, 44(1-2), 77-86.
- Bozyel, M.E., Bozyel, E.M., Canlı, K. ve Altuner, E.M. (2019). Anticancer uses of medicinal plants in Turkish traditional medicine. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(2), 465-484.

- Burdock, G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347-363.
- Cabaj, A. ve Juszczak L. (2021). Antioxidant activity of commercial propolis preparations. *Postepy Fitoterapii*.3/2021,169-178.doi.org/10.25121/PF.2021.22.3.169.
- Center, M.M., Jemal, A., Smith, R.A. ve Ward, E. (2009). World wide variations in colorectal cancer. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 59(6), 366-378.
- Chan, A.T. ve Giovannucci, E.L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2029-2043.
- Chikara, S., Nagaprashantha, L.D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S. ve Singhal, S.S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: *Role in cancer chemoprevention and treatment*. *Cancer Letters*, 413, 122-134. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.002>.
- Chiu, H.F., Han, Y.C., Shen, Y.C., Golovinskaia, O., Venkatakrishnan, K. ve Wang, C.K. (2020). Chemopreventive and chemotherapeutic effect of propolis and its constituents: a mini-review. *Journal of Cancer Prevention*, 25(2), 70.
- Choudhari, M.K., Haghniaz, R., Rajwade, J.M. ve Paknikar, K.M. (2013). Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an *in vitro* study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.ID 928280. 10p. <https://doi.org/10.1155/2013/928280>.
- Coşkun, Z.M., Ersoz, M., Gecili, M., Ozden, A. ve Acar, A. (2020). Cytotoxic and apoptotic effects of ethanolic propolis extract on C6 glioma cells. *Environmental Toxicology*, 1-6, <https://doi.org/10.1002/tox.22911>.
- Czyżewska, U., Siemionow, K., Zaręba, I. ve Milyk, W. (2016). Proapoptotic activity of propolis and their components on human tongue squamous cell carcinoma cell line (CAL-27). *PLoS One*, 11(6), e0157091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157091>.
- Çakıroğlu T.N. (2010). Çeşitli Çözücülerde Türk Propolisinin Çözünürlüğünün İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon.
- Çelik K. ve Aşgun H.F. (2016). Arılarla gelen sağlık “apiterapi”, <http://apitherapy-project.eu/pdf/20160920/apitherapy-handbook-tr.pdf>, Erişim tarihi: 20.02.2022.
- Çiçek, C. ve Bilgiç, A. (2006). Klinik Viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı: Bir model. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 20(3), 231-241.
- Dai, X., Xiang, L., Li, T. ve Bai, Z. (2016). Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *Journal of Cancer*, 7(10), 1281-1294.
- Daikh, A., Segueni, N., Dogan, N. M., Arslan, S., Mutlu, D., Kivrak, I. ve Rhouati, S. (2020). Comparative study of antibiofilm, cytotoxic activity and chemical composition of Algerian propolis. *Journal of Apicultural Research*, 59(2), 160-169.
- Daleprane, J.B. ve Abdalla, D.S. (2013). Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/175135>.

- Damodaran, T. (2021). Propolis. In *Nutraceuticals* (pp. 795-812). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821038-3.00046-X>.
- Dantas Silva, R.P., Machado, B.A.S., Barreto, G.D.A., Costa, S.S., Andrade, L.N., Amaral, R. G. ve Umsza-Guez, M.A. (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plosone*, 12(3), 1-9.
- Dărăban, A., Olah, N.K., Burtescu, R.F., PRIPON, F., ve Hanganu, D. (2019). The evaluation of antioxidant capacity of propolis originating from *Western Romania*. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2019.1.15>.
- De Groot, A.C. (2013). Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, 24(6), 263-282.
- Degirmencioglu, T.H., Guzelmeric, E., Yuksel, P. I., Kırmızıbekmez, H., Deniz, I ve Yesilada, E. (2019). A new type of Anatolian propolis: Evaluation of its chemical composition, activity profile and botanical origin. *Chemistry&biodiversity*, 16(12), 1-12.
- De Francisco, L., Pinto, D., Rosseto, H., Toledo, L., Santos, R., Tobaldini-Valério, F. ve Rodrigues, F. (2018). Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product. *Food Research International*, 105, 537-547.
- De Lima, R.O., Bazo, A.P., Said, R.A., Sforcin, J.M., Bankova, V., Darros, B.R. ve Salvadori, D.M. (2005) Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45, 8-16.
- Doğan, N. ve Hayoğlu, İ. (2012). Propolis ve Kullanım Alanları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 16(3), 39-48.
- Do Nascimento, T.G., Silva, A.D.S., LessaConstant, P.B., da Silva, S.A.S., Fidelis de Moura, M.A.B., de Almeida, C.P. ve Escodro, P.B. (2018). Phytochemicals screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. *Journal of Apicultural Research*, 57(2), 246-254.
- Duran, N., Muz, M., Culha, G., Duran, G. ve Ozer, B. (2011). GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitology Research*, 108, 95-105.
- Dursun, N. ve Paşaoğlu, E. (2018). Kolon-rektum tümörlerinde amerikan ortak kanser komitesi 8. basım evrelemesi ve amerikan patologlar akademisi protokolündeki değişiklikler ve güncellemeler. *Güncel Patoloji Dergisi*, 2(3), 78-84.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277-285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidants status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
- Ertas, A., Firat, M., Yener, I., Akdeniz, M., Yigitkan, S., Bakir, D. ve Kolak, U. (2021). Phytochemical fingerprints and bioactivities of ripe disseminules (fruit-seeds) of seventeen gundelia (kenger-kereng diken) species from anatolia with chemometric approach. *Chemistry & Biodiversity*, 18(8), 1-16.

- Fang, Y.Z. Yang, S. ve Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-9.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 479-507.
- Fearon, E.R. ve Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767.
- Feng, JF., Lu, L., Zeng, P., Yang, Y.H., Luo, J. ve Yang, Y.W. (2012). Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. *International Journal of Clinical Oncology*, 17(6), 575-583.
- Flora, S.J. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(4), 191-206.
- Forma, E. ve Brys, M. (2021). Anticancer activity of propolis and its compounds. *Nutrients*, 13(8), 2594.
- Freshney, I. (2001). Application of cell cultures to toxicology. *Cell Culture Methods for In Vitro Toxicology*, (9-26). <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0996-5>.
- Ghanbari Taghiabad, J. (2014). Türk Propolisinin Sulu Ekstraktının İnsan Laringeal Epidermoid Karsinoma (HEp-2) Hücre Serilerinde Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) Düzeylerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. *Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon.
- Granados-Romero, J.J., Valderrama-Treviño, A.I., Contreras-Flores, E.H., Barrera-Mera, B., HerreraEnríquez, M., Uriarte-Ruiz, K. ve Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(11), 4667-4676.
- Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Choudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C. ve Pakuwal, U. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(11), 4405-4409.
- Gülçin, I., Bursal, E., Şehitoğlu, M. H., Bilsel, M. ve Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2227-2238.
- Gültekin, M. ve İstatistikleri, B.G.T.K. (2016). T.C. Sağlık Bakanlığı. *Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Savaş Daire Başkanlığı*.
- Gürler, S.B., Kiraz, Y. ve Baran, Y. (2020). Flavonoids in cancer therapy: current and future trends. *In Biodiversity and Biomedicine* (403-440). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819541-3.00021-9>.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: henextgeneration. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Haraldsdóttir, S., Einarsdóttir, H.M., Smáradóttir, A., Gunnlaugsson, A. ve Hálfðánarson, Þ. R. (2014). Krabbamein í ristli og endaparmi. (Colorectal cancer-review). *Laeknabladid*, 100(2), 75-82.

- Hassanpour, S.H. ve Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127-129.
- Henkler, F., Brinkmann, J. ve Luch, A. (2010). The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers*, 2(2), 376-396.
- Herrera, C.L., Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G. ve Salazar, L.A. (2010). The antifungal effect of six commercial extracts of chilean propolis on candida spp. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37(1), 75-84.
- Huang, H.L., Hsing, H.W., Lai, T.C., Chen, Y.W., Lee, T.R., Chan, H.T. ve Chan, H.L. (2010). Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), 1-10.
- Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li G.Q. ve Hu F-L. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Moleküller*, 19 (12), 19610-19632.
- Hürkul, M.M. (2017). Türkiye'de Doğal Olarak Yetişen Cotoneaster Medik. (Rosaceae) Türleri Üzerinde Farmasötik Botanik Yönünden Araştırmalar. Doktora Tezi. *Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Ibrahim, R.S. ve El-Banna, A.A. (2021). Network pharmacology-based analysis for unravelling potential cancer-related molecular targets of Egyptian propolis phytoconstituents accompanied with molecular docking and *in vitro* studies. *RSC Advances*, 11(19), 11610-11626.
- Ishihara, M., Naoi, K., Hashita, M., Itoh, Y. ve Suzui, M. (2009). Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncology Reports*, 22(2), 349-354.
- Itharat, A., Houghton, P. J., Eno-Amooquaye, E., Burke, P. J., Sampson, J. H. ve Raman, A. (2004). *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(1), 33-38.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. ve Thun, M.J. (2006). *Cancer statistics*, 56(2), 106-130.
- Jing, Y., Liang, W., Liu, J., Zhang, L., Wei, J., Yang, J. ve Huang, Z. (2020). Autophagy-mediating micro RNAs in cancer chemoresistance. *Cell Biology and Toxicology*, 1-20.
- Karabacak Ö., Özoğlu, Ö., Durgut, S., Bağatırlar, S. R., Kaçar, O., Tamer, C. E. ve Korukluoğlu, M. (2021). Development of purple basil (*Ocimum basilicum* L.) sherbet fortified with propolis extract using response surface methodology. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(6), 4972-4991.
- Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü dergisi*, 4(1), 65-76.
- Karabulut, G. ve Yemiş, O. (2019). Fenolik bileşiklerin bağlı formları ve biyoyararlılığı. *Akademik Gıda*, 17(4), 526-537.
- Karaca, T.D. (2008). İnsan Meme Kanseri Hücre Kültüründe Nerium Oleander Bitkisinden Elde Edilen Ekstraktların Antikanserojen Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya.

Kapare, H.S. ve Sathiyarayanan, L. (2020). Nutritional and therapeutic potential of propolis: A Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(7), 3545-3549.

Karou, D., Dicko, M. H., Simporé, J. ve Traore, A.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 823-828.

Keskin, M. (2018). Propolis ve Özütlerinin Kalite Parametrelerinin Belirlenmesi ve Enkapsülasyonu. Doktora Tezi (Kimya). *Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon.

Keskin ve Kolaylı (2019). Ticari propolis ekstraktlarının kalite parametreleri açısından karşılaştırılması. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 19(1), 43-49.

Kim, M.E., Ha, T.K., Yoon, J.H., ve Lee, J.S. (2014). Myricetin induces cell death of human colon cancer cells via BAX/BCL2-dependent pathway. *Anti Cancer Research*, 34(2), 701-706.

Kim, H.R., Kim, M.J., Noh, H.M., Hur, Y.K. ve Kim, S.Y. (2022) Effects of water-soluble propolis on tert-butyl hydroperoxide-induced acute oxidative stress in mice. *Food Supplements and Biomaterials for Health*, 2,(1) <https://doi.org/10.1155/2022.2.e6> pISSN 2765-4362·eISSN 2765-4699.

Koçaklı, Z., Akıllıoğlu, K. ve Doğan, A. (2015). Vasküler düz kas hücrelerinin izolasyonu ve kültürü. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24(3), 390-401.

Kolaylı, S., Kara Y. ve Can Z. (2020). Comparative study of some commercial propolis extract with new prepared ethanolic propolis extract. *Bee Studies*, 12(2), 27-30.

Komarova, N.L., Sengupta, A. Ve Nowak, M. A. (2003). Mutation–selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal stability. *Journal of theoretical biology*, 223(4), 433-450.

Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M. ve Vladimir-Knezević, S. (2005). Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 55(4), 423-430.

Kosecik, M., Erel, O., Sevinc, E. ve Selek, S. (2005). Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *International Journal of Cardiology*, 100(1), 61-4.

Król, W., Bankova, V., Sforcin, J. M., Szliszka, E., Czuba, Z. ve Kuropatnicki, A. K. (2013). Propolis: properties, application, and its potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/807578>.

Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barauskaite, K. ve Savickas, A. (2015). Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-7.

Kumova, U., Korkmaz, A., Avcı, B.C. ve Ceyran, G. (2002). Propolis: Önemli bir arı ürünü. *Uludağ Arı Journal*, 2(2), 10-24.

Kumazawa, S., Hamasaka, T. ve Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329-339.

- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M. ve Świerczek-Zięba, G. (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19(1), 78.
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E. ve Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. ID 964149, 11s. <http://doi.org/10.1155/2013/964149>.
- Kutluca, S., Genç, F. ve Korkmaz, A. (2006). Propolis. *Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi, Samsun*, 57.
- Lawson, M., Jomova, K., Poprac, P., Kuča, K., Musílek, K., ve Valko, M. (2017). Free radicals and antioxidants in human disease. In *Nutritional Antioxidant Therapies: Treatments and Perspectives* (s.283-305). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.007>.
- Lavinas, F.C., Macedo, E.H.B., Sá, G.B., Amaral, A C.F., Silva, J.R., Azevedo, M. ve Rodrigues, I.A. (2019). Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 389-399.
- Lea, T. (2015). Caco-2 cell line. *The Impact of Food Bioactives on Health*, 103-111. ISBN 978-3-319-16104-4 (eBook). <http://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. ve Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- Luo, J., Solimini, N. L. ve Elledge, S. J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136(5), 823-837.
- Manoğlu, B., Altun, Z., Yavuzşen, T. ve Aktaş, S. (2019). Kolorektal kanser ve dolaşımdaki tümör DNA'sı: Geleceğin Biyobelirteci. *İzmir Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi*, 29(1), 11-20.
- Markowitz, S.D. ve Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *New England Journal of medicine*, 361(25), 2449-2460.
- Martinello, M., & Mutinelli, F. (2021). Antioxidant activity in bee products:A Review. *Antioxidants*, 10(1), 71.
- Memmedov, H., Aldemir, O. ve Aliyev, E. (2017). Propolisin antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi. *Aricılık Araştırma Dergisi*, 9(2), 56-62.
- Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S.E.S. ve Ostad, S.N. (2007). Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, 103(3), 729-733.
- Monteiro, L. D. S., Bastos, K. X., Barbosa-Filho, J. M., de Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. D. F. F. M. ve Sobral, M. V. (2014). Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, <http://doi.org/10.1155/2014/604152>.

- Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R. ve Vattuone, M.A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1-2), 109-114.
- 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.
- Nainu, F., Masyita, A., Bahar, M. A., Raihan, M., Prova, S. R., Mitra, S. ve Simal-Gandara, J. (2021). Pharmaceutical prospects of bee products: special focus on anticancer, antibacterial, antiviral, and antiparasitic properties. *Antibiotics*, 10(7), 822.
- Natoli, M., Leoni, B.D., D'Agnano, I., Zucco, F. ve Felsani, A. (2012). Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in vitro*, 26(8), 1243-1246.
- Nema, R., Khare, S., Jain, P., Pradhan, A., Gupta, A. ve Singh, D. (2013). Natural products potential and scope for modern cancer research. *American Journal of Plant Sciences* 4, 1270-1277. <http://doi.org/10.4236/ajps.2013.46157>.
- Nna, V.U., Abu Bakar, A.B., Md Lazin, M.R.M.L. ve Mohamed, M. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 305-320.
- Onbas, R., Kazan, A., Nalbantsoy, A. ve Yesil-Celiktas, O. (2016). Cytotoxic and nitric oxide inhibition activities of propolis extract along with micro encapsulation by complex coacervation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(3), 286-293.
- Onbaşı, D. (2019). Apiterapi ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 49-56.
- Ore, A. ve Akinloye, O.A. (2019). Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Medicina*, 55(2), 26.
- Oršolić, N. (2010). A review of propolis antitumor action in vivo and in vitro. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2(1), 1-20.
- Orsolich, N. ve Basic, I. (2003). Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *Journal of Ethnopharmacol*, 84, 265-273.
- Oruç, H. H., Çaycı, M., Sorucu, A., Uzabacı, E. ve Nyandwi, R. (2021). Characterization of commercially available propolis products in Turkey based on individual phenolic compounds. *Journal of Apicultural Research*, 1-8. <https://doi/10.1080/00218839.2021.1962110>.
- Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(9), 2181-2196.
- Ozdal T., Sarı-Kaplan G., Mutlu-Altundag E., Boyacıoğlu D. Ve Capanoğlu E. (2018). Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblast and Mouse mesenchymal stem cell line, *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 627-638.

- Ozidal, T., Ceylan, F. D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E. O. ve Capanoglu, E. (2019). Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International*, 122, 528-536. <https://doi/10.1016/j.foodres.2019.05.028>.
- Özgönül, A., Aksoy, N., Dilmec, F., Uzunköy, A. ve Aksoy, Ş. (2009). Measurement of total antioxidant response in colorectal cancer using a novel automated method. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 39(4), 503-506.
- Parr, AJ. ve Bolwell, GP. (2000). Phenols in plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 985-1012.
- Pasupuleti, V.R., Sammugam, L., Ramesh, N. ve Gan, S.H. (2017). Honey, propolis, androyal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>.
- Patel, S. (2016). Emerging adjuvant therapy for cancer: propolis and its constituents. *Journal of Dietary Supplements*, 13(3), 245-268.
- Perse, M. (2013). Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence?. *BioMed Research International*, <https://doi.org/10.1155/2013/725710>.
- Pisoschi, A.M. ve Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J. ve Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592-607.
- Prasad, S. ve Srivastava, SK. (2020). Oxidative Stress and Cancer: *Chemopreventive and Therapeutic Role of Triphala*. *Antioxidants*, 9(72),1-15.
- Procházková, D., Boušová, I. ve Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Reis, J.H.O., Machado, B.A.S., Barreto, G.A., Anjos, J.P.D., Fonseca, L.M. ve Santos AAB. (2020). Supercritical extraction of red propolis: operational conditions and chemical characterization. *Molecules*, 25(20), 4816.
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Dukhyil, A. B., Ansari, M. A., Alomary, M. N., ve Devi, R. (2022). Dietary polyphenols and their role in oxidative stress-induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism (s) of action. *Frontiers in Pharmacology*, 13.
- Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A. ve Garbarino, J. A. (2004). Chileanpropolis: antioxidant activit yandanti proliferativeaction in human tumor cell lines. *Life Sciences*, 76(5), 545-558.
- Sağdıç, O., Karasu, S. ve Goktas, H. (2020). Piyasada satılan ticari propolis örneklerinin biyoaktif bileşenlerinin belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (19), 19-31.

Salatino, A., Teixeira, É. W. ve Negri, G. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 33-38.

Salehi, A., Hosseini, S.M. ve Kazemi, S. (2022). Antioxidant and anticarcinogenic potentials of propolis for dimethylhydrazine-induced colorectal cancer in wistar rats. *Hindawi BioMed Research International*, 1-12.

Sarikahya, N. B., Gören, A. C., Okkalı, G. S., Çöven, F. O., Orman, B., Kırıcı, D., ...ve Nalbantsoy, A. (2021). Chemical composition and biological activities of propolis samples from different geographical regions of Turkey. *Phytochemistry Letters*, 44, 129-136.

Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M. ve Kolaylı, S. (2009). Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*Castaniasativa* Mill.) honey and propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 33(4), 470-481.

Sawaya, A.C.H.F., da Silva Cunha ve Marcucci, M.C. (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 1-10.

Saygı, Ş. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi (gtd) Gülhane Medical Journal (GMJ)*, 45(3), 291-298.

Sforcin, J.M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1-14.

Sforcin, J.M. ve Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of newdrugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253-260.

Shady, H.M.A., Mohamed, W.F., Sayed-Ahmed, E.F. ve Amer, S.A. (2016). A comparatives tudy on propolis and pollen extracts: chemical profile analysis, antioxidant and anticancer activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(3), 397-414.

Silici, S. (2019). Bal arısı ürünleri ve apiterapi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji dergisi*, 7(9), 1249-1262.

Skrzydłewska, E., Kozuszko, B., Sulkowska, M., Bogdan, Z., Kozłowski, M. ve Snarska, J. (2003). Antioxidant potential in esophageal, stomach and colorectal cancers. *Hepatogastroenterology*, 50(49), 126-131.

Skrzydłewska, E., Sulkowski, S., Koda, M., Zalewski, B., Kanczuga-Koda, L. ve Sulkowska, M. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 11(3), 403-6.

Slinkard, K. ve Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.

Snezhkina, A.V., Kudryavtseva, A.V., Kardymon, O.L., Savvateeva, M.V., Melnikova, N.V., Krasnov, G.S. ve Dmitriev, A.A. (2019). ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 6175804, <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>. 17s.

Sorucu, A. (2019). Arı ürünleri ve apiterapi. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 10(1), 1-15.

- Sorucu, A. ve Oruç, H.H. (2019). Determination of biologically active phenolic compounds in propolis by LC–MS/MS according to seasons and altitudes. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 2461-2469.
- Strzelczyk, J. K. ve Wiczowski, A. (2012). Oxidative damage and carcinogenesis. *Contemporary Oncology*, 16(3), 230.
- Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). *In vitro* sitotoksikite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- Ulukaya, E., Özdikicioğlu, F., Yıldıztepe Oral, A. ve Demirci, M. (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*. 22, 232-239.
- Wagh, V.D. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/308249>.
- Waris, G. ve Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, 5(1), 14.
- Watanabe, M.A.E., Amarante, M.K., Conti, B.J. ve Sforcin, J.M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(11), 1378-1386.
- Wiseman, H. ve Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313(1), 17-29.
- Woisky, R.G. ve Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-105.
- Vagish-Kumar LS. (2014). Propolis in dentistry and oral cancer management. *North American journal of medical sciences*, 6(6), 250-259.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. ve Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Volpi, N. ve Bergonzini, G. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42(3), 354-361.
- Yavuz, C. (2011). Türkiye'nin Bazı İllerinden Toplanan Propolislerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri ve Biyoaktif Bileşenlerinin Tayini. Yüksek Lisans Tezi. *Ordu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ordu.
- Yıldız, O. (2020). Tüketilebilir propolis ekstraktlarında kullanılan çözücülerin (menstrumların) değerlendirilmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 20(1), 24-37.
- Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.

Yücel, B., Topal, E., Akçiçek, E. ve Kösoğlu, M. (2014). Propolisin insan sağlığına etkileri. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24(2), 41-49.

Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M. ve Lobaccaro, J.M.A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 214-222.

Zerbinati, N., Lotti, T., Monticelli, D., Rauso, R., González-Isaza, P., D'Este, E. ve França, K. (2018). Invitroevaluation of the biosafety of hyaluronicacid PEG cross-linked with micromolecules of calciumhydroxyapatite in low concentration. *Open Access Macedonianjournal of medical sciences*, 6(1), 15.

