ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI ÇÖZÜCÜLERLE ELDE EDİLEN PROPOLİS EKSTRAKTLARININ KİMYASAL İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

İbrahim ERKAYACAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

İbrahim ERKAYACAN tarafından hazırlanan "**Farklı Çözücülerle Elde Edilen Propolis Ekstraktlarının Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi"** adlı tez çalışması 25/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN
Çankırı Karatekin Üniversitesi,
Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri **:**

Başkan **:** Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Erdin DALKILIÇ
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Organik Kimya Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÖZCAN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum "Farklı Çözücülerle Elde Edilen Propolis Ekstraktlarının Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (25/06/2021).

İbrahim ERKAYACAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI ÇÖZÜCÜLERLE ELDE EDİLEN PROPOLİS EKSTRAKTLARININ KİMYASAL İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

İbrahim ERKAYACAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

Bu çalışmada Samsun ilinden temin edilen propolisin etanol ve etil asetatta ekstraksiyonları yapılmıştır. Toplam fenolik ve flavanoid miktarları tespit edilmiştir. Hücre kültür çalışmaları yapılmış ve antikanser, antimikrobiyal aktivitelerine bakılmıştır. Ayrıca yara iyileşme testleri de yapılmıştır.

Propolis ekstraktları toplam fenol ve toplam flavonoid analizi yapılmıştır. Propolis etanol extraktı için toplam fenol ve toplam flavon sırasıyla 156 mg GAEeq/g ve 44,8 mg QUEeq/g olarak bulunmuştur. Propolis Etil asetat extraktı için toplam fenol ve toplam flavon sırasıyla 204,8 mg GAEeq/g ve 55 mg QUEeq/g olarak bulunmuştur. Sitotoksisite testi sonuçlarına göre kanser ve normal hücrelerde farklı metotlarla elde edilen örneklerinin özellikle ilk oranlarda ve 2 oranlarda toksisite görülür iken ¼ oranından sonra toksisitesi azalmıştır. Apoptoz/nekroz sonuçlarına göre fibroblast ve kanser hücrelerinde ilk iki oran apotoz ve nekroz bakımından yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinde nekroz ile ölüm oranının apoptoza göre daha yüksek olduğu görülmektedir. İn vitro yara iyileşme çalışmasına göre toz, 1 nolu, 2 nolu ve 3 nolu test numunelerinin L929 hücrelerinde boşluğu doldurma ve hücre göçü kapasitesi kontrol grubuna göre fazla bir artış göstermemiştir. Yapılan çalışmada hazırlanan yara bölgesine herhangi bir hücrenin göç ettiği gözlemlenmemiştir. Cell Migration olarak adlandırılan hücre göçü bulunmamakta, kapanan yara yüzdesi yara bölgesi kıyılarından gerçekleştiği tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite test sonuçlarına göre örneklerin *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) karşı normal antimikrobial aktivite gösterirken, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) karşı yüksek antimikrobial aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

2021, 49 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Propolis, Antikanser aktivite, Antimikrobiyal aktivite.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETERMINATION OF CHEMICAL CONTENT OF PROPOLIS EXTRACTS OBTAINED WITH DIFFERENT SOLVENTS AND INVESTIGATION OF SOME BIOLOGICAL AVTIVITIES

İbrahim ERKAYACAN

Cankiri Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Muhammed ALTUN

In this study, extractions of propolis obtained from Samsun province in ethanol and ethyl acetate were carried out. Total phenolic and flavonoid amounts were determined. Cell culture studies were carried out and their anticancer and antimicrobial activities were examined. Wound healing tests were also performed. Total phenol and total flavonoid analyzes of propolis extracts were made. Total phenol and total flavone for propolis ethanol extract were found to be 156 mg GAEeq/g and 44.8 mg QUEeq/g, respectively. Total phenol and total flavone for Propolis Ethyl acetate extract were 204.8 mg GAEeq/g and 55 mg QUEeq/g, respectively. According to the results of the cytotoxicity test, the samples obtained from cancer and normal cells by different methods showed toxicity especially at the first rates and at 2 rates, while the toxicity decreased after ¼ rate. According to the apoptosis/necrosis results, it is seen that the first two rates in fibroblast and cancer cells are high in terms of apoptosis and necrosis. In addition, it is seen that the death rate with necrosis is higher than apoptosis in cancer cells. According to the in vitro wound healing study, the powder did not show much increase in the capacity of filling the gap and cell migration capacity in L929 cells of test samples 1, 2 and 3 compared to the control group. In the study, it was not observed that any cells migrated to the prepared wound area. There is no cell migration, which is called Cell Migration, and it has been determined that the percentage of wound closed occurs from the wound area shores. According to the antimicrobial activity test results, while the samples showed normal antimicrobial activity against *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922), it was determined that they showed high antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus (S. aureus* ATCC 25923).

2021, 49 pages

KEYWORDS: Propolis, Anticancer activity, Antimicrobial activity.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde değerli bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN'a, analiz çalışmalarının gerçekleşmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e, hiçbir zaman desteklerini esirgemeden güvenerek sabırla ve inançla yanımda olan tüm çalışma arkadaşlarıma, bölümümüzün her türlü imkanından faydalanmamı sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne ve her anımda benimle olup destek olan aileme, 15 Temmuz Şehitlerine ve Gazilerine teşekkürlerimi sunarım.

İbrahim ERKAYACAN

Çankırı, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Propolis **1**
1.2 Propolisin Fiziko-Kimyasal Yapısı **2**
1.3 Propolisin Biyolojik Aktivitesi **3**
1.4 Propolisin Etkinlik Değerlendirilmesi **4**
1.4.1 Antimikrobiyal aktivitesi **4**
1.4.2 Anti-İnflamatuar aktivitesi **5**
1.4.3 Antiviral aktivitesi **6**
1.4.4 İmmüno-modüler aktivitesi **6**
1.4.5 Antioksidan aktivitesi **8**
1.4.6 Antikarsiyojenik aktivitesi **8**
1.5 Kanser **9**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **14**
3. MATERYAL VE METOT **19**
3.1 Materyal **19**
3.1.1 Kullanılan doğal ürün ve kimyasallar **19**
3.1.2 Kullanılan alet ve cihazlar **20**
3.2 Metot **21**
3.2.1 Hekzan ile mum ektraksiyonu **21**
3.2.2 Etil asetat- su çözeltisi **21**
3.2.3 Etanol- su çözeltisi **21**
3.2.4 Toplam fenol ve flavon analizi **22**
3.3 Hücre Kültürü **22**
3.4 Sitotoksisite Testi (MTT) **22**

3.5 İkili Boyama Metodu İle Apoptozun Ve Nekrozun Belirlenmesi 23
3.6 Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi İle Kök Hücre İzolasyon Kitinin Etkinliğinin Belirlenmesi 24
3.7 In Vitro Yara iyileşmesi/Hücre Göçü Testi 24
3.8 Antimikrobial Aktivite Testi 24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 26
4.1 Toplam Fenol Ve Flavon Analizi 26
4.2 Sitotoksisite testi (MTT) Sonucu 26
4.3 İkili Boyama Metodu İle Elde Edilen Apoptoz/Nekroz Sonuçları 27
4.4 Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi İle Proliferasyonun Gösterilmesi 30
4.5 İn Vitro Yara İyileşme Deney Sonuçları 32
4.6 Antimikrobial Aktivite Test Sonuçları 35
5. SONUÇLAR 41
KAYNAKLAR 43
ÖZGEÇMİŞ 49

KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AMPK	Aktive Olan Protein Kinaz
Ca	Kalsiyum
Caco-2	Kolon Adenokarsinom Hücreleri
CAPE	Kafeik Asit Fenetil Ester
COX	Flavonoidin Siklooksijenaz
Cu	Bakır
DLD-1	Kolon Karsinoma Hücresi
DU-145	Androjene Duyarsız Prostat Kanseri Hücreleri
EEP	Propolisin Etanol Ekstraktı
FBS	Fetal Bovin Serum
Fe	Demir
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
K	Potasyum
KB	İnsan Ağzı Epidermoid Karsinom Hücreleri
MI	Mitotik İndeks
MN	Mikronükleu
Mn	Mangan
Mg	Magnezyum
MS	Kütle Spektrometrisi
Na	Sodyum
NFAT	T Hücrelerinin Nükleer Faktörü
NF-κB	Nükleer Faktör-k-B
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
SREBP1c	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein-1c
UCP1	Ayrıştırıcı Proteinler 1
UCP2	Ayrıştırıcı Proteinler 2
TEAC	Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi

TUR	Transüretral Rezeksiyon
Zn	Çinko
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Propolis ve arılar 2
Şekil 1.2 Propolisin immünomodülatör aktivitesi ve antiinflamatuar özellikleri 7
Şekil 1.3 Dünya Sağlık Örgütü 2019 verilerine göre kansere bağlı 70 yaş öncesi ölümler 10
Şekil 3.1 Samsun ilinden temin edilen ham propolis 20
Şekil 4.1 Fibroblast hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. 29
Şekil 4.2 DLD-1 kanser hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. 30
Şekil 4.3 Etken madde 1-4 1/1 oranında fibroblast hücrelerindeki proliferasyon etkisi 31
Şekil 4.4 Etken madde 1-4 1/1 oranında DLD-1 kanser hücrelerindeki proliferasyon etkisi 31
Şekil 4.5 Yara modeli uygulanan test materyallerinin 0. , 12. ve 24. Saatteki görüntüleri (görüntüler 10X büyütmede çekilmiştir.) 33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Farlı propolis türlerinin biyolojik aktivilerinin yanıt verdiği bileşikler 4

Çizelge 1.2 2020 yılında bazı kanser bölgelerinde yeni vaka ve ölüm sayısı 11

Çizelge 4.1 Toplam fenol ve flavonoid analiz sonuçları 26

Çizelge 4.2 EA-1-4 nolu örneklerin in vitro L929 fibroblast hüclerine karşı sitotoksik etkisi (%10 etil alkol içeren medium için canlılık değeri %100 olarak alınmıştır) 27

Çizelge 4.3 EA-1-4 nolu örneklerin in vitro DLD-1 kanser hüclerine karşı sitotoksik etkisi (%10 etil alkol içeren medium için canlılık değeri %100 olarak alınmıştır) 27

Çizelge 4.4 1-4 etken maddelerin fibroblast hücrelerindeki % apoptoz/nekroz oranları.....28

Çizelge 4.5 1-4 etken maddelerin DLD-1 kanser hücrelerindeki % apoptoz/nekroz oranları.....28

Çizelge 4.6 Numunenin (EA NUMUNE 1), *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları 36

Çizelge 4.7 Numunenin (EA NUMUNE 1) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları 36

Çizelge 4.8 Numunenin (PRO OLEUROPEİN NUMUNE 2), *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları 37

Çizelge 4.9 Numunenin (PRO OLEUROPEİN NUMUNE 2) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları 37

Çizelge 4.10 Numunenin (PRO ETANOL NUMUNE 3), *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları 38

Çizelge 4.11 Numunenin (PRO ETANOL NUMUNE 3) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları 38

Çizelge 4.12 Numunenin (OLEUROPEİN), *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları 39

Çizelge 4.13 Numunenin (OLEUROPEİN) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları 39

1. GİRİŞ

1.1 Propolis

Propolis Yunanca bir kelimedir. Pro yani önünde, girişinde anlamında polis ise topluluk, şehir anlamlarına gelmekte olup bir bütün oluşturduğunda ise kovanı koruyan anlamına gelmektedir (Castaldo and Capasso 2002). Propolis, işçi arılar (*Apis mellifera*) vasıtasıyla bazı bitkilerin tomurcuk, yaprak ve kabuk gibi kısımlarından elde edilmektedir (El-Sohaimy *et al* 2014). Propolisin kavak, kozalaklı ağaçlar, huş ağacı, çam, kızılağaç, söğüt, palmiye, *Baccharis dracunculifolia* ve *Dalbergia ecastaphyllum* reçinelerinden toplandığı bildirilmiştir (Bankova *et al.* 2000, Kosalec *et al.* 2004). Propolisin reçinemsi bir yapısı vardır. Suda az çözünmekte olup viskoz bir haldedir (Şekil 1.1). Yapışkan ve keskin kokulu, rengi kahverengiden koyu sarıya kadar değişen doğal bir karışımdır(El-Sohaimy *et al* 2014). Arılar bu reçinemsi yapıyı polen ile baş-thoraksı arasındaki bezlerden salgıladığı enzimlerle harmanlamaktadır Gençay ve Sorkun 2002). Propolisin kimyasal bileşimi, bal arıları tarafından ziyaret edilen her bölgenin florasının ekolojisi ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle propolisin fiziksel görünümü çeşitli faktörlere bağlı olarak farklı özelliklere sahiptir. Propolisin bileşimi değişkenlik gösterir ve genel olarak %50 reçine ve bitkisel balsam, %30 mum, %10 uçucu ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 çeşitli diğer maddelerden oluşur (Bayram *et al* 2015).

Bal arılarının propolisi birçok farklı amaç için topladığı bilinmektedir. Bunlardan bazıları şu şekildedir: Kovanlarında oluşan çatlakları sıvamak, kovanlarını olası fiziksel ve kimyasal tehlikelere karşı korumak, kovan girişini küçültmek ve böylelikle yağmacı arıların istilasına engel olmak, kovanın ortalama 35 ºC olan sıcaklığını korumaktır. Bunun yanı sıra arılar kovan içerisindeki kalmış yabancı canlıların ve ölülerin mumyalanması için ve ayrıca hasarlı olan peteklerin onarılması için de propolis kullanmaktadırlar (El-Sohaimy *et al* 2014, Gençay ve Sorkun 2002).

Propolis antibakteriyel, anti-inflamatuar, anti-alerjik ve anti-trombotik gibi biyolojik etkileri ile iyi bir antioksidan kaynağıdır. Bu nedenle propolis, iltihaplanma, diyabet, kalp hastalığı ve kanser gibi hastalıkları önlemek için yiyecek ve içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok ülkede hekim tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Ahn *et al.* 2007, Aliyazıcıoglu *et al.* 2013, Banskota *et al.* 2001).



Şekil 1.1 Propolis ve arılar (https://propolisfaydalari.com/propolis-nasil-uretilir/)

Propolisin ılıman bölgeler dahil olmak üzere farklı bölgeler (Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Amerika) ve hatta tropikal bölgelerde benzer biyolojik aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Banskota *et al.* 2001).

1.2 Propolisin Fiziko-Kimyasal Yapısı

Propolis, 15°C'de sert ve esnektir. Erime noktası 60-69 °C'dir. Propolisin rengi sarıdan koyu kahverengiye kadar değişken olup, termostabildir ve kısmen suda çözünür. Alkol veya kloroform propolisi kolayca çözer (Kun-Suk and Jong-Sung 1997). Propolisin kimyasal bileşimi coğrafi konuma, botanik kökene ve arı türlerine göre değişebilmektedir. Propolis flavonoidler, terpenler, fenolikler ve bunların esterleri, şekerler, hidrokarbonlar ve B1, B2, B6, C ve E gibi önemli vitaminler ve magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), manganez (Mn) ve demir (Fe) gibi faydalı mineralleri içerir. Reçineli yapısından dolayı fenol açısından zengindir. (Huang *et al.* 2014). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (Alencar *et al.* 2007), gaz kromatografisi (GC) gibi ayırma ve saflaştırma tekniklerinin yanı sıra kütle spektroskopisi (MS) (Campo Fernández *et al* 2008), nükleer manyetik rezonans (NMR), gaz kromatografisi ve kütle

spektroskopisi (GC-MS) (Maciejewicz 2001) gibi analiz tekniklerinin geliştirilmesiyle propoliste daha fazla bileşik tanımlanmıştır. Propolisin hazırlanmasında ticari ve de bilimsel olarak tercih %100 (ya da %98) etanol ya da %70-80 etanol ile %20-30 oranında su kullanılmaktadır (Huang *et al.* 2014).

1.3 Propolisin Biyolojik Aktivitesi

Propolis, antibakteriyel, antioksidan, antitümör, antiinflamatuar ve immünomodülatör gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik etkilere sahiptir. Bununla birlikte, propolis bir hammadde olarak kullanılamaz, bu nedenle inert materyali çıkarmak ve aktivitesinden birincil olarak sorumlu olan polifenolik fraksiyonu korumak için ekstraksiyon yoluyla saflaştırılmalıdır. Genel olarak, etanol propolis hazırlanması için iyi bir çözücüdür, fakat, örneğin, etil eter, su gibi diğer çözücüler, metanol ve kloroform da propolis bileşenlerin ekstraksiyonu ve tanımlanması [için kullanılabilir. Propoliste fenoller, tanenler, polisakkaritler, terpenler, alifatik asitler, esterler, aromatik asitler, yağ asitleri, aldehitler, amino asitler, ketonlar, kalkonlar, dihidrokalkonlar, vitaminler ve inorganik maddeler dahil olmak üzere 300'den fazla farklı bileşik tanımlanmıştır. Bunlar arasında flavonoidler ve fenolik asitler, araştırmacıların en çok ilgisini çekenlerdir (Wolska *et al.* 2019). Propolisin en önemli aktif bileşenleri flavonoidler, fenolikler ve aromatiklerdir (Bankova 2005, Mani *et al.* 2006). Flavonoidlerin propolisin biyolojik aktivitesinin çoğundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Flavonoidler arasında, propoliste yüksek konsantrasyonlarda bulunan chrysin'in bir aromataz inhibitörü olduğu kadar antikanser, antioksidan ve antiinflamatur bir ajan olduğu bilinmektedir (Izuta *et al.* 2008, Kasala *et al* 2015, Sun *et al*. 2012). Propolisin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktivitesi genel olarak birçok ülkede kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Ahn *et al.* 2004, Banskota *et al.* 2001). Çizelge 1.1'de bazı bölgelerdeki propolis türlerinin biyolojik aktivitelerine göre bulundurduğu bileşikler verilmiştir.

Çizelge 1.1 Farlı propolis türlerinin biyolojik aktivilerinin yanıt verdiği bileşikler (Bankova 2005)

Propolis türü	**Antibakteriyel aktivite**	**Antiinflamatuar aktivite**	**Antitümör aktivitesi**	**Antioksidan aktivite**	**Alerjik etkisi**
Avrupa (kavak tipi)	Flavanonlar,flavonlar, fenolik asitler ve diğer esterler	Flavanonlar,flavonlar, fenolik asitler ve diğer esterler	Kafeik asit fenetil ester (CAPE)	Flavanoidlar, fenolik ve diğer esterler	3,3-Dimetilallil kafeat
Brezilya	Prenile p-kumarik asit, labdan diterpenler	-	Prenile p-kumarik asit, klerodan diterpenler benzofuranlar	Prenile p-kumarik asit, flavanoidler	-
Küba	Prenile benzofenonlar	-	Prenile benzofenonlar	Prenile benzofenonlar	-
Tayvan	-	-	Prenile flavanonlar	Prenile flavanonlar	-

1.4 Propolisin Etkinlik Değerlendirilmesi

1.4.1 Antimikrobiyal aktivitesi

Propolis ekstraktları ve antimikrobiyal ajanların kombinasyonunun sinerjistik aktivitesi ilk olarak dama tahtası yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (White *et al.* 1996). Günümüzde propolisin in vivo ve in vitro ortamlarda antimikrobiyal aktivitesini bakılmıştır. Güçlü antimikrobiyal etkileri sayesinde arı çalışanları, propolisi kovanları yalıtmak, kovana giren ölü böcekleri ve hayvanları mumyalamak ve diğer dezenfeksiyon amaçları için kullanırlar. Aynı nedenden dolayı propolis, gıdaların, içeceklerin ve ilaçların koruyucusu olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Ali and Kunugi 2021, Noronha et al. 2014). Kanser ve bakteriyel enfeksiyonlar tıpta güncel sorunlardandır. Tümör ve bakteri hücreleri, yüksek replikasyon ve yayılma oranları ve ilaç direncinin hızlı gelişimi gibi benzer özellikler taşır. Antitümör ilaçlar genellikle direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek ve normal hücrelere toksisiteyi azaltmak için bir strateji olarak kombinasyonlar halinde kullanılır (Soo *et al.* 2017). Ayrıca yeni geliştirilen antibakteriyel ajanların azlığı nedeniyle antibakteriyel ilaçların kombinasyonu önemli bir strateji haline gelmiştir. Son zamanlarda, propolisin antibiyotikler ve kemoterapötiklerle birleştirilmesinin etkisi de umut vericidir (Liu *et al.* 2017, Surek *et al*. 2021). Çalışmalarda membran geçirgenliği fazla olduğu için antibakteriyel etkisini

kullanmak adına galangin, rutin, naringenin, kuersetin ve pinokembrin gibi flavonoidler ve CAPE tercih edilenler arasındandır. Bakteriyel RNA polimerazı da galangin, pinokembrin ve CAPE ile kullanılarak inhibisyonu gerçekleştirilmiştir. Brezilya kırmızı propolisinde izoflavonların kendine has içeriğinde de antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır. *C. albicans*, *C. tropicalis C. glabrata*, ve *C. parapsilosis* gibi mayalarla da antifungal ajan etkisini kullanarak çalışılmıştır. Antifungal aktivite Türk propolislerinde benzil alkol, fenil ve etil içeriğiyle bağlantılıdır. Brezilya propolislerinde ise α-pinen, β-pinen ve δ-kadinenler ile bağlantılıdır (Freires *et al.* 2016, Mutlu Sariguzel *et al.* 2016, Noori *et al.* 2012, Stepanović *et al.* 2003, Speciale *et al.* 2006).

1.4.2 Anti-İnflamatuar aktivitesi

Çeşitli in vitro ve in vivo hayvan çalışmaları, beyin-karaciğer-bağırsak ekseninde polifenollerin antioksidan ve anti-inflamatuar etkilerini göstermiştir (Park *et al.* 1996) ve polifenollerin inflamasyonun şiddetini azaltmak için inflamatuar kaskadın farklı aşamalarını hedef aldığı gösterilmiştir (Armutcu *et al.* 2015).

Propoliste bulunan polifenoller, örneğin AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein a (C/EBPa), peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör y (PPARy) ile etkileşim yoluyla çeşitli sinyal yollarını da düzenleyebilmektedir. Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör-gama koaktivatörü 1-alfa (PGC-1α), sirtuin 1 ve sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1c (SREBP1c) esas olarak adipogenez ile birlikte ayrıştırıcı proteinler 1 ve 2 (UCP1 ve UCP2) hücresel enerji metabolizmasını içerir. NF-κB antioksidan ve anti-inflamatuar yanıtları düzenlemektedir (De Almeida and Menezes 2002).

Borrelli ve arkadaşları 2002 yılında yaptığı çalışmada propolisin anti-inflamatuar aktivitesinin, flavonoidlerin, özellikle galanginin varlığından kaynaklanıyor olabileceği öngörmüştür. Aslında, bu flavonoidin siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği, PGE_2 salınımını ve indüklenebilir COX (COX-2) izoformunun ekspresyonunu azalttığı göstermişlerdir (Borelli et al. 2002). Birkaç çalışma ise propolisin anti-inflamatuar etkisinin CAPE ve galanginin birleşik etkisine bağlı

olabileceğine ve CAPE'nin galanginin etkisini güçlendirebileceğine işaret etmiştir (Borelli et al. 2002, Higashi and De Castro 1994).

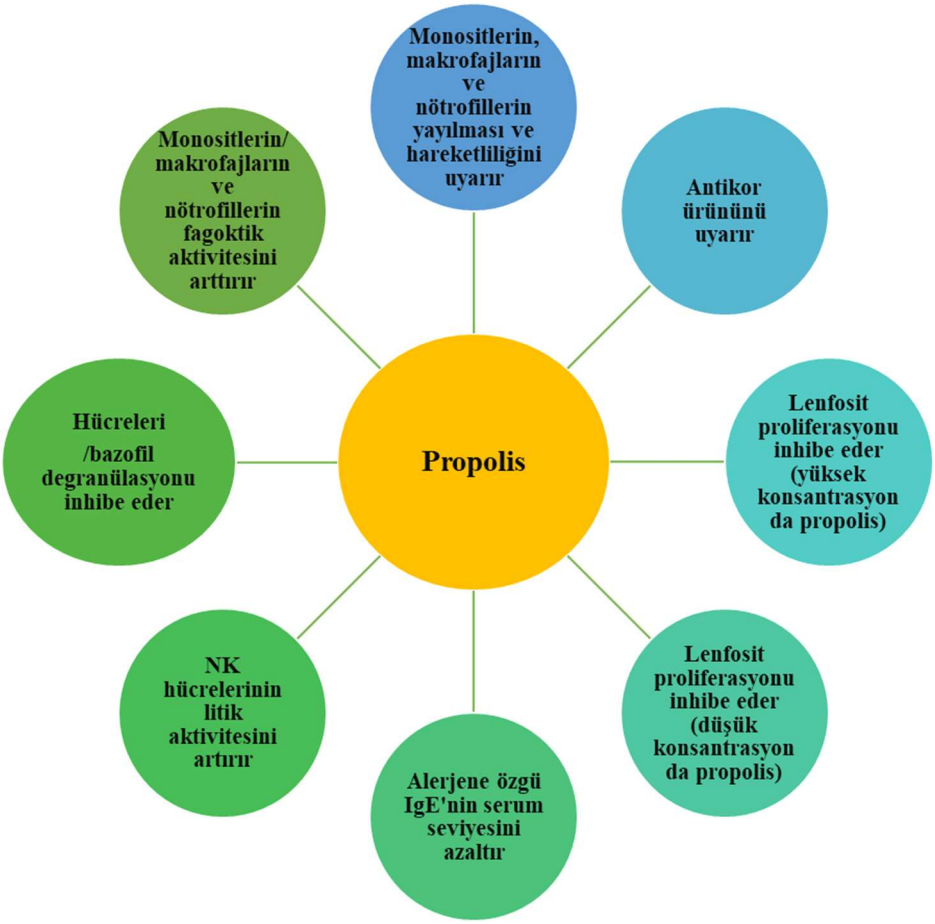
1.4.3 Antiviral aktivitesi

Propolis viral kökenli olanlar da dahil olmak üzere patojenik mikroorganizmalara karşı biyolojik özellikleri için kullanılmıştır. Bir çalışmada, Meksika propolisinin yanı sıra bileşiminde bulunan üç ticari flavonoidin (kersetin, naringenin ve pinocembrin) Canine Distemper Virüsü ile enfekte hücre kültürlerinde antiviral etkisi incelenmiştir (González-Búrquez *et al.* 2018). Tedaviler propolis, flavonoidler ayrı ayrı ve üç flavonoid karışımı ile üç farklı zamanda gerçekleştirilmiştir. Antiviral aktivite, virüs nükleoprotein geninin (Real-Time qPCR) nispi ekspresyonunun inhibisyonu ve hücresel canlılığın belirlenmesi (MTT tahlili) ile değerlendirilmiştir (González-Búrquez *et al.* 2018). Bazı durumlarda ise propolisin antiviral etkisi ticari satılan ilaçlardan daha iyi sonuç vermiştir. Bir çalışmada Kanada propolisi kullanılmış ve bir merhem üretilmiştir. Genital Herpes simpleks virüsünün sözü geçen bu merhem ve klinik asiklovir tedavisi uygulanmış ve propolisin daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur (Vynograd *et al.* 2000).

1.4.4 İmmüno-modüler aktivitesi

Propolisin immünomodülatör aktivitesi ve antiinflamatuar özellikleri Şekil 1.2'de verilmiştir (Wolska *et al.* 2019). Ökaryotik transkripsiyon faktörleri, aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) ve nükleer faktör-k-B (NF-kB), immün ve inflamatuar yanıtlarda merkezi bir rol oynamaktadır. NFAT ve NF-κB proteinlerinin aktivasyonu, inflamatuar sitokinler (interlökin-1, IL-1 ve tümör nekroz faktörü, TNF), bakteriyel ürünler ve oksidatif stres gibi birçok faktör tarafından indüklenir. Bu iki ana transkripsiyon faktörü, T hücresi aktivasyonu ve proliferasyonu için gerekli olan IL-2 ve IL-2R genlerinin ekspresyonunda rol oynar (Márquez *et al.* 2004). Propolisin immünomodülatör özelliklerine, içerdiği flavonoidler ve fenolik asitler katkıda bulunur (Sforcin 2007, Sforcin and Bankova 2011, Szliszka and Krol 2013, Yuan *et al.* 2012). Yuan ve arkadaşları bu fenolik bileşiklerin doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık hücrelerini aktive eden önemli bileşenler olabileceğini bildirmiştir (Yuan *et al.* 2012). Propolisin bağışıklık hücreleri üzerindeki kesin etki mekanizması bilinmemekle

birlikte, flavonoidlerin makrofajları ve lenfositleri sırasıyla B ve T lenfositleri üzerinde mitojenik etkiye sahip olan IL-1 ve IL-2 üretmeleri için uyarması mümkündür (Havsteen 2002). Örneğin yeşil propolis örneklerinde büyük miktarlarda bulunan artepilin C, Th1 lenfosit yanıtını uyaran ve Th2 yanıtını inhibe eden IL-12 üretimini uyararak makrofajlar üzerinde etki gösterir. Propolis numunelerinde bulunan sinnamik asit gibi diğer fenolik bileşikler de aktive makrofajlar tarafından IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin üretimini ve salınımını indükler, B lenfositleri tarafından antikor üretimini uyarır ve kemotaktik olarak etki eder (Havsteen 2002).



Şekil 1.2 Propolisin immünomodülatör aktivitesi ve antiinflamatuar özellikleri (Wolska *et al.* 2019)

1.4.5 Antioksidan aktivitesi

Arjantin'de bulunan propolis ekstraktlarında yüksek toplam flavonoid içeriği ile serbest radikal süpürücü aktivite arasında önemli bir korelasyon bulunmuştur (Hamasaka *et al.* 2004, Kolankaya *et al.* 2002, Özen *et al.* 2004, Shimizu *et al.* 2004). Bu çalışmalar ışığında propolisin hastalık önleyici aktivitesi, antioksidan aktivitesine bağlanabilmektedir.

Yamauchi, Kato, Oida, Kanaeda ve Ueno (1992) Çin, Japonya, Brezilya ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki propolisi, metil linoleat otooksidasyonunun inhibisyonuna karşı Çin'de toplanan propolisten antioksidanlardan biri olarak izole edilmiş benzil kafeat ile karşılaştırmışlardır. Banskota ve arkadaşları ise (2001), Çin ve Brezilya propolisinin su ekstraktlarının, karşılık gelen metanol ekstraktlarına kıyasla güçlü 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) su ekstraktlarından daha fazla serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğunu, buna karşın Hollanda ve Peru propolisinin metanol ekstraktlarının daha güçlü DPPH sergilediğini bildirmiştir. Çin'den gelen propolis, yukarıda açıklandığı gibi flavonoidler ve fenolik asit esterleri gibi birçok polifenol içerir. Bununla birlikte, Çin propolisinin antioksidan aktivitesindeki ve kimyasal bileşenlerindeki coğrafi varyasyon hakkında hiçbir çalışma bildirilmemiştir (Banskota *et al.* 2001, Yamauchi *et al*. 1992).

Çok sayıda çalışma, propolisin bileşiminin, menşe bölgesine ve hepsinden önemlisi, menşe yerinde bulunan bitki örtüsüne bağlı olduğunu göstermiştir. Örneğin Polonya'da propolis üretimi için balzamik maddelerin ana kaynakları karakavak (*Populus nigra*) ve çeşitli huş (*Betula*) ve kızılağaç (*Alus*) yaprak tomurcuklarıdır. Bu, ürünlerin yalnızca bileşim açısından değil, aynı zamanda sergiledikleri özellikler açısından da farklılık gösterdiği anlamına gelmektedir (Kędzia 2009, Socha *et al.* 2015).

1.4.6 Antikarsiyojenik aktivitesi

Alkol tüketimi, sigara içme, X ve gama ışınlarına maruz kalma, kanser gelişimi için en sık görülen eksojenik risk faktörleri olarak görünmektedir (Seitz *et al.* 1998). Kanserojen maddeler hedef hücrelere geçer ve ayrıca sistematik olarak hücre metabolizmasının azalmasına yol açarak nispi bir bağışıklık yetmezliği üretir (Carvalho 1997). Bununla

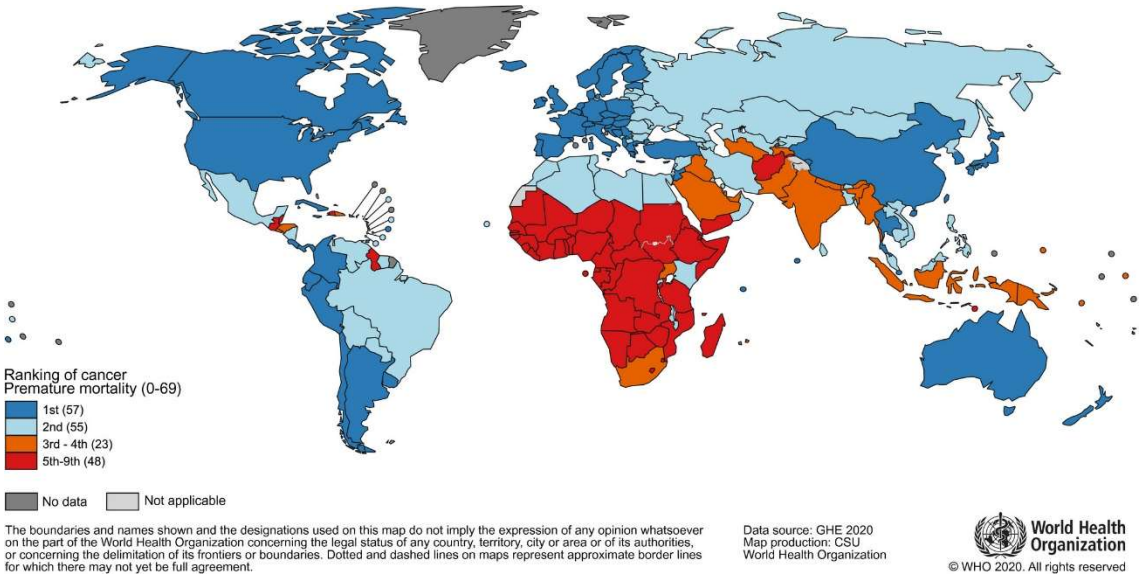
birlikte, belirli diyet bileşenleri, örneğinβ-karoten, retina, α-tokoferol ve flavonoidlerin, mikronükleus (MN) frekanslarına dayalı olarak kanserojen sürece karşı koruma ve hatta remisyon sağladığı tutarlı bir şekilde kanıtlanmıştır (Benner *et al.* 1994, Stich *et al* 1982). Sonuç olarak, şu anda MN tahlili olarak bilinen MN testi (Obe ve Natarajan 1990), mutajenik ajanlar riski altındaki popülasyonları taramak için kullanılmıştır (Kumar 2000). Ayrıca mitotik indeks (MI) tahlili, çoğalan hücreleri karakterize etmek ve mitotik ilerlemeyi inhibe eden veya indükleyen bileşikleri tanımlamak için kullanılır. Mitotik ilerlemeyi engelleyen bileşikler, popülasyonun MI'sında bir artışa neden olmaktadır. MN frekansları üzerindeki araştırmalar, MN'nin insan kanserojen süreçlerindeki erken olayların bir ürünü olduğu konusunda yaygın olarak kabul edilen varsayımı desteklemektedir. Farklı propolis konsantrasyonlarına sahip periferik kan lenfositlerinde MN ve MI oranlarını değerlendirmiş ve kontrol grubuyla sağlıklı hastalardan oluşan bir çalışma sunulmuştur (Ozkul *et al* 2005).

Yüzeysel mesane kanserleri, tüm mesane kanserlerinin ortalama %80'ini oluşturur. Bu kanserlerin çoğu cerrahi olarak transüretral rezeksiyon (TUR) ile alınmasına rağmen tekrar oranları %40 ile %80 arasında değişmektedir. Mitotik indeks (MI) tahlili, çoğalan hücreleri karakterize etmek ve mitotik ilerlemeyi inhibe eden veya indükleyen bileşikleri belirlemek için kullanılır. Mitotik ilerlemeyi engelleyen bileşikler, bir popülasyonun MI'sinde bir azalmaya neden olur. Örneğin intravezikal MMC, bu oranı azaltmak için kemoterapötik olarak kullanılan bir ajandır ve antikanserojenik ve antitümör aktivite sergilemektedir (Eroğlu *et al.* 2008).

1.5 Kanser

Kanser, hücrelerin aşırı çoğalması ve apoptoz fonksiyonlarını kaybetmesi sonucu genetik ve gelişimsel süreçte ortaya çıkan patolojik bir durumdur (Mısır vd. 2020). Kanser, dünyanın her ülkesinde önde gelen ölüm nedeni ve artan yaşam beklentisinin önünde önemli bir engel olarak yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2019 yılı tahminlerine göre kanser, 183 ülkenin 112'sinde 70 yaş öncesi ölümlerin birinci veya ikinci önde gelen nedenidir ve 23 ülkede üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1.3). Kanserin önde gelen bir ölüm nedeni olarak artan önemi, birçok ülkede

kansere göre felç ve koroner kalp hastalığına bağlı ölüm oranlarındaki belirgin düşüşleri kısmen yansıtmaktadır (Sung *et al.* 2021).



Şekil 1.3 Dünya Sağlık Örgütü 2019 verilerine göre kansere bağlı 70 yaş öncesi ölümler (Sung *et al.* 2021)

Genel olarak, kanser insidansı ve mortalite yükü dünya çapında hızla artmaktadır. Bu hem nüfusun yaşlanmasını hem de büyümesini engeller. Ayrıca birçoğu sosyoekonomik gelişme ile ilişkili olan kanser için ana risk faktörlerinin yaygınlığı ve dağılımındaki değişiklikleri yansıtır (Sung *et al.* 2021).

2020'de dünya çapında tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 18,1 milyon) ve yaklaşık 10 milyon kanser ölümü (melanom dışı cilt kanseri hariç 9,9 milyon) meydana geldi (Çizelge 1.2). Meme kanseri, en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır. Yaklaşık 2,3 milyon yeni vaka (%11,7), bunu akciğer (%11,4), kolorektal (%10,0), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri izlemektedir. Akciğer kanseri, yaklaşık 1,8 milyon ölümle (%18) kanser ölümünün önde gelen nedeni olmaya devam ederken, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve meme (%6,9) kanseri izledi. Genel insidans, geçiş yapan ülkelere karşı geçiş ülkelerinde her iki cinsiyet için 2 kattan 3 kata daha yüksek iken, ölüm oranı erkekler için 2 kat ve kadınlar için çok az değişiklik göstermiştir (Sung *et al.* 2021).

Çizelge 1.2 2020 yılında bazı kanser bölgelerinde yeni vaka ve ölüm sayısı (Sung *et al.* 2021)

Kanser bölgesi	**Yeni vaka sayısı (Yüzdelik dilimi %)**	**Ölüm sayısı (Yüzdelik dilimi %)**
Göğüs	2.261.419 (11,7)	684.996 (6,9)
Akciğer	2.206.771 (11,4)	1.796.144 (18,0)
Prostat	1.414.259 (7,3)	375.304 (3,8)
Derinin melonomu olmayan	1.198.073 (6,2)	63.731 (0,6)
Kolon	1.148.515 (6,0)	576.858 (5,8)
Mide	1.089.103 (5,6)	768.793 (7,7)
Karaciğer	905.677 (4,7)	830.180 (8,3)
Rektum	732.210 (3,8)	339.022 (3,4)
Rahim ağzı	604.127 (3,1)	341.831 (3,4)
Yemek borusu	604.100 (3,1)	544.076 (5,5)
Tiroid	586.202 (3,0)	43.646 (0,4)
Mesane	573.278 (3,0)	212.536 (2,1)
Pankreas	495.773 (2,6)	466.003 (4,7)
Lösemi	474.519 (2,5)	311.594 (3,1)
Böbrek	431.288 (2,2)	179.368 (1,8)
Dudak, ağız boşluğu	377.713 (2,0)	177.757 (1,8)
Deri melanomu	324.635 (1,7)	57.043 (0,6)
Yumurtalık	313.959 (1,6)	207.252 (2,1)
Beyin, sinir sistemi	308.102 (1,6)	251.329 (2,5)
Safra kesesi	115.949 (0,6)	84.695 (0,9)
Testis	74.458 (0,4)	9334 (0,1)
Tükürük bezleri	53.583 (0,3)	22.778 (0,2)
Anüs	50.865 (0,3)	19.293 (0,2)

Her yıl kanser araştırmalarına milyarlarca dolar harcanmasına rağmen, kanserin nasıl geliştiği hala tam olarak anlaşılmış değildir. Günümüzde kanserin tedavisi için kullanılan yöntemlerin ilerlemesine rağmen hastalığın ileri evrelerinde beklenen iyileşme istenilen düzeyde değildir. İlaçların yan etkilerinin ortaya çıkması insanları ilaç olarak bilinen doğal ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Bu noktada doğal ürünler, yeni ilaçların keşfi için potansiyel hammadde olarak kabul edilmektedir (Tan *et al.* 2011).

Propolis, fenolik bileşikler açısından oldukça zengin bir arı doğal ürünüdür. Geleneksel tedavide en sık kullanılan ürünlerden biri propolistir. Son çalışmalar, antitümör, antioksidan, antimutajenik, antibakteriyel ve antikanser gibi birçok biyolojik aktiviteye

sahip olduğunu göstermiştir (Bankova *et al.* 2014, Aliyazicioglu *et al.* 2011). Polifenollerin çeşitli sinyal yollarını etkilediği gösterilmiştir; hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi ve hücre-hücre sinyalleşme mekanizmasını inhibe eder ve antioksidan aktivitelerine ek olarak DNA onarım enzimlerini aktive ederler (Mısır vd. 2020).

Türkiye kanser tablosu ise WHO'nun 2018 yılında yayınladığı verilere göre 210,537'dir. Bunların %56,5'i erkek hastaları oluştururken %43,5'i kadın hastaları kapsamaktadır. 2018'de kanser sebebiyle hayatını kaybeden 116,710 kişi kayıtlara geçmiştir. Bu verilere göre ise %64 erkek, %36 kadın hastaları oluşturmaktadır. Bu verilere dayanarak Türkiye'de kadınlara nazaran erkeklerde kanser vakası ve ölümleri çoğunluktadır. Bu bilgilere ek olarak Türkiye'de erkeklerde en sık görülen kanser türleri akciğer, prostat, kolon, mesane ve mide olarak sıralanmaktadır. Dünya geneline baktığımızda ise Türkiye'ye benzer şekilde akciğer, prostat ve kolon kanserlerinin erkeklerde en sık rastlanan kanser türleri olduğu görülmektedir. Bununla birlikte kadınlarda e sık tanısı konan kanser türleri sırasıyla meme, tiroid, kolon, rahim ağzı ve akciğer kanserleridir. Dünya genelinde ise kadınlarda en çok görülen kanser türü meme kanseridir (Küresel Kanser Gözlemevi (GCO) 2021).

Kanserli hastalar tedavilerinin yanı sigara, alkol gibi alışkanlıklarını bırakıp beslenme şekillerinde değişiklik yapmak ve fiziksel aktivitelerini arttırmak istemektedir. Böyle bir yaşam tarzını edinen kanserli hastalar tamamlayıcı sağlık yaklaşımlarını da özümsemektedirler. Tamamlayıcı sağlık yaklaşımları geniş bir alanı kapsar ve farklı şekillerde gruplandırılır. Tamamlayıcı tıp konvansiyonel tıpla birlikte kullanılırken alternatif tıp konvansiyonel tıp yerine kullanılan yaklaşımları kapsamaktadır. İntegratif tıp ise konvansiyonel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarının birlikte kullanıldığı yaklaşımlardır. Bütünleyici tıp olarak bilinmektedir. Bütünleyici tıp başlıca iki grupta sınıflandırmıştır. Bunlar doğal ürünler ve zihin ve beden uygulamalarıdır. Doğal ürünler çeşitli diyet uygulamaları, vitaminler ve bitkisel tedavileri kapsamaktadır. Zihin ve beden uygulamaları ise masaj, akupresör, yoga ve refleksoloji şeklindeki zihni ve bedeni dinlendiren uygulamalardır. Geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları Türkiye'de 2014 yılından itibaren kanunlaştırılmıştır. Bu yönetmelik bu yöntemlerin kimler tarafından ve ne şekilde uygulanması gerektiği ve uygulayacak kişilerin eğitimlerini,

yetkilendirilmelerini kapsamaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda dünya çapında tamamlayıcı sağlık yaklaşımları kullanımlarının kanser hastaları dışında genel popülasyonda da giderek arttığı görülmektedir (Çınar vd. 2019).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ahn ve arkadaşları 2007 yılında Çin'in çeşitli bölgelerinden (Heilongjiang, Neimongol, Hebei, Shandong, Shanxi, Gansu, Henan, Hubei, Sichuan, Hunan, Yunnan ve Hainan) temin edilen propolisin antioksidan aktivitesini incelemiştir. Propolisin etanol özütleri (EEP) hazırlanmış ve β-karoten ağartma, 1,1-difenil-2 pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal temizleme ve 2,2′-azinobis(3 etilbenzotiazolin-6- sülfonik asit) radikal katyon renk giderme deneyleri ile antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, EEP'deki ana bileşenler, bir fotodiyot dizisi (PDA) ve kütle spektrometre (MS) tespiti ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi ile tanımlanmış ve her bir bileşen nicel olarak analiz edilmiştir. Yunnan dışındaki tüm propolis numuneleri, yüksek toplam polifenol içeriği ile birlikte nispeten güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. Güçlü antioksidan aktiviteye sahip propolis, kafeik asit, ferulik asit ve kafeik asit fenetil ester gibi büyük miktarda antioksidan bileşikler içermektedir. Öte yandan, Yunnan ve Hainan'dan gelen propolis, diğer bölgelerdeki propoliste bulunmayan bileşiklere sahip olduğu bulunmuştur.

Alıyazıcıoglu ve arkadaşları 2012 yılında Türkiye'den temin edilen propolisin fenolik bileşiklerinin özelliklerini ve biyolojik aktivitelerini incelemiştir. Fenolik bileşiklerin farklı bölgelerden toplanan 10 çeşit propolisdeki biyolojik aktiviteleri in vitro ortamda çalışılmıştır. 17 farklı fenolik bileşik ters fazlı-yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analiz edilmiştir. Toplam fenolik bileşikler ve demir indirgeyici antioksidan güç, antioksidan kapasite belirleyicileri olarak kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite, altı bakteri ve iki maya kullanılarak agar difüzyon yöntemiyle incelenmiştir. Tüm propolisler, güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktivite göstermiş ve büyük miktarlarda antioksidan bileşikler içermektedir. Tüm propolis örneklerinde kuersetin, benzoik asit, kafeik asit, ferulik asit ve kumarik asit yüksek miktarda bulunurken, vanilik asit, klorojenik asit, epikatesin, rutin, siringik asit ve o kumarik asit çok az miktarda bulunmuştur. Katesin ise hiçbirinde bulunamamıştır. Metanolik ekstraktlar tüm bakteri ve mayalara karşı aktif özellik göstermiştir. Özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853'e karşı etkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile propolis ekstratlarının, sağlığı korumaya ve çeşitli hastalıklara karşı savaşmaya hizmet edebilecek iyi bir antioksidan ve antimikrobiyal ajan kaynağı olduğu kanıtlanmıştır.

Bayram ve arkadaşlarının 2015'te yaptığı çalışma, propolisin etanol ekstraktının (EEP) kimyasal bileşimini belirlemek ve *Ames/Salmonella* ve *E. coli* WP2 kısa süreli test sistemlerini kullanarak genotoksisitesini ve antijenotoksisitesini değerlendirmektir. Test edici suşlar için canlılık testinden elde edilen sonuçlar, 1 mg/plaka üzerindeki konsantrasyonlarda EEP oldukça toksikti, ancak daha düşük konsantrasyonun herhangi bir toksisitesi yok. Genotoksisite test sonuçlarına göre, 1 mg/plaka'ya kadar herhangi bir EEP konsantrasyonu, S. typhimurium TA1535, 1537 ve E. coli WP2uvrA tester suşları üzerinde genotoksik etki göstermedi. Öte yandan, antijenotoksisite tahlil sonuçları, EEP'nin aynı test suşları üzerinde NaN3, 9-AA ve MNNG kaynaklı mutajeniteye karşı önemli ölçüde antijenotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

5,7-dihidroksiflavon olarak da adlandırılan krisin, bal, propolis, çarkıfelek çiçeği, *Passiflora caerulea* ve *Passiflora incarnata* ve *Oroxylum indicum*'da bulunan bir flavondur. Mavi çarkıfelek çiçeği (*Passiflora caerulea*) gibi çeşitli bitkilerden ekstrakte edilir. İnsanlar tarafından ağızdan alındıktan sonra, krisin düşük biyoyararlanım ve hızlı atılıma sahiptir. Diyet takvimlerinde de kullanılmaktadır. Han ve arkadaşları 2021 yılında ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) kullanarak Kore propolisindeki krisin içeriğini karakterize etmiştir. Propolis, yüzyıllardır tedavi edici faydaları olan bir nutrasötik ajan olarak insanlar tarafından kullanılmıştır. Propolisin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri, botanik ve coğrafi kökenlerine bağlıdır. Propolisin metanol özütleri, farklı kökenlerden propoliste krisinin izolasyonu ve miktar tayini için UPLC tarafından kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. Yöntemin tekrarlanabilirliği %1,9-6,0 arasındadır ve %98,2 ila %101,0 arasında değişen ortalama geri kazanıma sahiptir. Bu çalışmada Jeju Adası dışındaki tüm propolis örnekleri krisin içermektedir. Farklı lokasyonlardan alınan propolis numuneleri arasında krisin konsantrasyonunda bazı farklılıklar vardır. Analiz edilen propolis örneklerinin krisini, Jeju Adası'ndan alınanlar dışında Kore propolisiyle uyumludur ve önerilen UPLC yöntemi, iyi bir duyarlılık, doğrusallık, tekrarlanabilirlik ve doğruluk sağlamıştır.

Özkök ve arkadaşları Türk propolisinin standardizasyonu için propolisin standart antioksidan içeriği ve bileşiklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 23 propolis örneğinde HPLC ile belirlenen bu propolis örneklerinin toplam flavonoidler, toplam fenolik, CUPRAC antioksidan kapasite

içerikleri ve fenolik ve flavonoid bileşenlerinin çeşitliliği tespit edilmiştir. Ayrıca Türkiye'deki 23 ilin antioksidan kapasitelerine göre birbirlerine olan benzerlikleri ve farklılıkları çok boyutlu ölçekleme analizi ile araştırılmıştır. Propolis numunelerindeki toplam flavonoid içeriği 21,28 ile 152,56 mg CE/g arasında belirlenmiştir. Propolis numunelerindeki toplam fenolik içeriği 34,53 mg ile 259,4 mg GAE/g arasında bulunmuştur. Propolis örneklerinin CUPRAC antioksidan kapasitesi ve antioksidan aralığı 95,35 ile 710,43 mg TE/g arasında bulunmuştur. Bu çalışmanın öne çıkan özelliği Türk propolisini temsil eden maksimum örnek sayısına sahip olmasıdır. Bu çalışma ile ulusal ve uluslararası propolis standardizasyon çalışmalarına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Erhan Eroğlu ve arkadaşları 2008 yılında propolis ve mitomisin-C'nin (MMC) transizyonel karsinom hücre kültürleri üzerindeki in vitro antikanserojenik ve antimitotik etkilerini araştırmıştır. Propolis (0,1 mL) ve MMC'ye (1.6 µL) maruz bırakılan mesane karsinomalı 22 hastadan doku örnekleri alınmıştır. Kontrol, propolis ve MMC için ortalama MI (Miyokardiyal enfarktüs) oranları sırasıyla 8,327 ± 0,624, 6,990 ± 0,519 ve 5,423 ± 0,479 idi. Bu çalışmada kontrol ve maruz kalan hücreler arasındaki farklar önemlidir ($p < 0.05$). Propolise maruz kalmanın hücre bölünmesini azaltabileceği ve antimitotik ve antikanserojen bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Moreira ve arkadaşları Portekiz'den topladı propolis örneklerinde 2008 yılında toplam fenol ve antioksidan aktivitesini incelemiştir. Propolis ekstraktlarının antioksidan kapasitesi, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) üzerindeki süpürücü etkiler ve demirin (III)/ferrisiyanür kompleksi deneylerinin indirgeme gücü ile değerlendirilmiştir. Konsantrasyona bağlı bir antioksidatif kapasite, DPPH ve azaltıcı güç deneyleriyle doğrulanmıştır. AT_{50} değerleri DPPH tutucu tahlilinde Bornes ve Fundão propolis için sırasıyla 6,22 µg/mL ve 52,00 µg/mL arasında elde edilmiştir. Bornes kaynaklı propolisin yüksek aktivitesi, farklı polen kompozisyonları ile ilişkili olabilir. Elde edilen sonuçlar, Portekiz propolisinin insan sağlığı için faydalı olabilecek antioksidan özellikler gösteren önemli bir toplam fenol kaynağı olduğunu göstermektedir.

Benhanifia ve arkadaşları (2014), çeşitli ülkelerden topladığı propolis ile Özbekistan'daki propolisin antioksidan aktivitesini karşılaştırmıştır. Bu çalışmada yer verilen ülkeler Arjantin, Avustralya, Brezilya, Bulgaristan, Şili, Çin (Hebei, Hubei ve Zhejiang), Macaristan, Yeni Zelanda, Güney Afrika, Tayland, Ukrayna, Uruguay, Amerika Birleşik Devletleri'dir. Yapılan çalışmaya göre propolisin etanol ekstreleri (EEP) hazırlanmış ve β-karoten ağartma ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü deney sistemleri ile EEP numunelerinin antioksidan aktiviteleri için değerlendirilmiştir. EEP'de ana bileşenler, foto-diyot dizisi (PDA) ve kütle spektrometre (MS) tespiti ve HPLC analizi yapıldı ve nicel olarak analiz edilmiştir. Arjantin, Avustralya, Çin, Macaristan ve Yeni Zelanda'dan gelen EEP, nispeten güçlü antioksidan aktivitelere sahiptir ve ayrıca toplam polifenol ve flavonoid içerikleri ile uyumludur. Güçlü antioksidan aktiviteye sahip propolis, kaempferol ve fenetil kafeat gibi antioksidan bileşikler içermektedir.

2004 yılında Russo ve arkadaşları ise insan tümör hücre dizilerinde antioksidan aktivite ve antiproliferatif etkiyi incelemiştir. Bu çalışmada Şili'den temin edilen propolis kullanılmıştır. Bu doğal bileşik, KB (insan ağzı epidermoid karsinom hücreleri), Caco-2 (kolon adenokarsinom hücreleri) ve DU-145 (androjene duyarsız prostat kanseri hücreleri) insan tümör hücre hatları üzerinde antiproliferatif kapasitesi açısından test edilmiştir. Sonuçlara göre, propolis numunesinin, kimyasal bileşimi ile ilişkili ve serbest radikalleri temizleme etkisi gösterdiği vurgulanmıştır. Ayrıca tümör hücresi büyümesini inhibe etme kapasitesi ile ifade edilen ilginç biyolojik özellikler sergilediğini göstermiştir.

Osés ve arkadaşları (2020), farklı coğrafi bölgelerden 13 arı propolisinin ortak fenolik profillerini ve antioksidan kapasitelerini incelemiştir. Hem hiyalüronidaz hem de anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör aktiviteleri de değerlendirilmiştir ve belirli fenolik bileşiklerle ilişkilendirilmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ultraviyole (HPLC-UV) analizi ile propolisin p-kumarik asit içeriği 1,2–12,2 mg/g ve ferulik asit içeriği 0,3–11,0 mg/g olarak bulunmuştur.

Pinocembrin, kateşin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve galangin başlıca bulunan flavonoidlerdir. Antioksidan aktiviteler, trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) için 280 μmol trolox/g'dan, hidroksil radikalleri üzerindeki radikal süpürücü etki için 0.099 mmol ürik asit/g olarak bulunmuştur.

Bu nedenle propolis, gıda, ilaç ve kozmetik şirketleri için yararlı olabilir ve ayrıca oksidatif hasar, inflamatuar süreçler ve hipertansiyon ile ilgili hastalıklar için risk faktörlerini azaltmaya yardımcı olabilir. Bu çalışma aynı zamanda uyumlaştırılmış analiz yöntemlerinin gerekliliğini ve propolis için sonuçların ifade edilmesini vurgulamaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan doğal ürün ve kimyasallar

Bu çalışmada ham propolis Samsun 19 Mayıs ilçesinden temin edilmiştir. Hegzan (C_6H_{14}), etil asetat ($C_4H_8O_2$), etanol (C_2H_5OH) ve diğer kimyasal maddeler Merck firmasından satın alınmıştır. Ham propolis etanol ve etil asetat içerisinde ekstrakte edilmiştir. L929 fibroblast hücresi, (ATCC). DLD-1 kolon karsinoma hücresi Sağlık Bilimleri Üniversitesi hücre kültür kolleksiyonundan temin edilmiştir. Hücrelerin komplet (tam) kültür ortamı olarak Dulbecco Modified Medium (DMEM; Biological Industries), Fetal Bovin Serum (FBS; Biological Industries), L-glutamin, Penisilin/Streptomisin kullanılmıştır. Hücrelerin bulunduğu kültür kaplarından uzaklaştırılması Tripsin–EDTA (Tripsin–Etilendiamin tetraasetik asit) ile yıkamalar fosfat tamponu (PBS) ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin sayımı, tripan mavisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İkili boyamada Ribonükleaz-A, Propidyum İyodür (Serva, İsrail), Hoechst 33342 (Serva, İsrail) kullanılarak apoptoz/nekroz oranları belirlenmiştir. Hücre kültür çalışmalarının tamamında kullanılan sarf malzemeleri, kültür kapları, pipet, pipet uçları, falkon tüpleri ve çoklu kuyucuklu plakalar vb. Corning (ABD) firmasından satın alınmıştır.



Şekil 3.1 Samsun ilinden temin edilen ham propolis

3.1.2 Kullanılan alet ve cihazlar

Deneylerde kullanılan alet ve cihazlar; Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA SP, ACEABIO), deionize su cihazı, mikser, Hücre Sayım Cihazı (CedexHiResInnovatis, Roche), Etüv, Steril kabin, Rotary evaparatör, buzdolabı -20 °C, derin dondurucu -80 °C, su banyosu, CO_2 İnkibatörü, pH-metre, hassas terazi, otomatik pipetler, vorteks, manyetik karıştırıcı.

3.2 Metot

3.2.1 Hekzan ile mum ektraksiyonu

Ham propolis -30 ºC'ye kadar soğutularak mikserde parçalandı. 200 g propolis hassas terazide tartıldı ve 2 L'lik behere konuldu. Daha sonra üzerine 800 mL hegzan eklenerek manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Oluşan karışım dinlendirilerek hekzan ile birlikte propolis içinde bulunan mum ayrıştırıldı. Aynı işlem propolis içinde mum kalmayıncaya kadar 4 defa tekrar edildi. Kalan propolis alınıp evaparatör ile içinde bulunan hegzan tamamen uçuruldu. Sonra iyice kurutulduktan sonra etanol ve etil asetatli ekstraktların oluşturulmasına geçildi.

3.2.2 Etil asetat- su çözeltisi

500 mL'lik steril şişede bulunan etil asetat çözeltisinden 150 mL alınıp bir kaba aktarıldı. 150 mL etil asetat çözeltisine 750 mL deiyonize su ve 100 g mumu alınmış propolis eklenip yeterince karıştırıldı. 0,22 µm steril filtreden süzülerek kullanıma hazır hale getirildi. Tüm işlemler steril malzemeler kullanılarak steril kabinde, koşullara uygun gerçekleştirildi. Steril şişelere alındı ve kapakları kapatılıp kullanıma hazır hale getirildi. +4ºC'de muhafaza edildi.

3.2.3 Etanol- su çözeltisi

500 mL'lik steril şişede bulunan etanol çözeltisinden 150 mL alınıp başka bir kaba aktarıldı. 150 mL etanol çözeltisine 750 mL deiyonize su ve 100 g mumu alınmış propolis eklenip yeterince karıştırıldı. 0,22 µm steril filtreden süzülerek kullanıma hazır hale getirildi. Tüm işlemler steril malzemeler kullanılarak steril kabinde, koşullara uygun gerçekleştirildi. Steril şişelere alındı ve kapakları kapatılıp kullanıma hazır hale getirildi. +4ºC'de muhafaza edildi.

3.2.4 Toplam fenol ve flavon analizi

Total fenol'ün spektrofotometrik tayini, Folin-Ciocalteu yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Singleton *et al*. 1999). Standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Bu yöntem, bir fosfotungstenfofomolibdat'ın fenolikler tarafından mavi reaksiyon ürünlerine indirgenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon sonunda oluşan rengin absorbansı 750 nm'de spektrofotometrede (Variokcan Flash Çok modlu Okuyucu, Thermo Fisher, USA) okunarak toplam fenol miktarları; gallik asitle çizilen kalibrasyon eğrisinden, mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır. Sonuçlar, L zeytinyağı başına mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE/L) olarak ifade edilmiştir.

Zeytinyağı örneklerinin toplam flavonoid içeriği fotometrik yöntem ile belirlenmiştir (Jia *et el.* 1999). Oluşan reaksiyonun absorbansı 510 nm'de spektrofotometre (Varioskan Flash Çok Modlu Okuyucu, Thermo Scientific, USA) okunmuştur. Toplam flavonoid içeriği mg kuersetin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

3.3 Hücre Kültürü

Steril Laminar flow kabin içerisinde çözülen L929 vve DLD-1 kanser hücreleri 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkon 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Falkona 3 mL (%10 FBS , %1 antibiyotik içeren) DMEM besiyeri konuldu ve homojen hale getirildikten sonra 25cm²' lik flasklara ekim yapıldı. Flask 37 °C'de % 5 CO_2'li inkübatörde inkübasyonda kültüre edilecektir.

3.4 Sitotoksisite Testi (MTT)

Bu deney yöntemi için referans standart 10993-5 de geçen MTT yöntemi standarta uygun olarak uygulandı. Toksisite deneyi için 96 well plate kullanıldı. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her well'de $10x10^3$ hücre olacak şekilde hesaplama yapıldı. 96 well plate'de her kuyucuğa 100 µL tam besiyeri içerisinde hücre koyuldu ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda hücrelerin well plate yüzeyine tutunup tutunmadığı kontrol edildi. Kuyucuklardaki medyum boşaltıldı. 1-3 nolu örnekler %10 etil alkol içeren medium içersinde bire bir seyreltildi ve stok olarak kullanıldı. 4 nolu örnek 3mg/mL %10 etil alkol içeren medium içersinde çözünerek stok çözelti hazırlandı

elde edilen stok solusyonlardan well plate kuyucuklarına 3 tekrarlı olarak yukarıdan aşağı doğru 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 oranlarında hücrelerin üzerine eklendi. Negatif kontrol grubuna sadece medyum, pozitif kontrol grubuna lateks kauçuk konuldu. 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda well platelerdeki medyum boşaltıldı. MTT (1mg/mL) solüsyonu 50 µl kuyucuklara eklendi. 37 °C'de 2-2,5 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki MTT solüsyonu boşaltıldı, üzerine 100 µl MTT çözücüsü (izopropanol) eklendi. Hücre canlılığının tespiti için 96 kuyucuklu plate'in absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate kuyucuda 570 nm'de okundu. Her grubun hücre canlılığı yüzdesi, kontrol hücresi canlılığı %100 kabul edilerek aşağıdaki denkleme göre yapıldı.

Denklem (1)

Hücre canlılığı% = Optik Yoğunluk, OD570 (numune)/ Optik Yoğunluk, OD570 (kontrol) x 100

3.5 İkili Boyama Metodu İle Apoptozun Ve Nekrozun Belirlenmesi

Hücreler 48 well plate'e, her kuyucuğa $15x10^3$ hücre olacak şekilde ekim yapılacak. Hücreler 24 saat süreyle inkübe edildi (% 5 CO_2 , 37°C, >% 90 nem). İnkübasyon sonunda platelerdeki vasatlar atılıp 200 µL 1/1, 1/2, 1/4 ve 1/16 oranında numuneler eklendi, negatif kontrol olarak sadece hücre koyuldu. 24 saat inkübasyona bırakılacak. İnkübasyonun ardından platelerdeki vasatlar atılıp 70 µL ikili boyama solüsyonu eklendi, hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edilecek. İnkübasyon sonunda inverted mikroskopta (Leica, DM6000B, Germany) DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirmesi yapılacak. İkili boyama solüsyonunun hazırlanışı: Ribonükleaz A 10 mg/1 mL PBS, Hoechst 33342 200 µg/1mL PBS, Propodium iodid 100 µg/1mL PBS olacak şekilde stok solüsyonlardan hazırlanarak 10 mL PBS içerisine 500 µL hoechst 33342, 100 µL propodium iodide, 100 µL Ribonükleaz A eklenecektir.

3.6 Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi İle Kök Hücre İzolasyon Kitinin Etkinliğinin Belirlenmesi

Altın kaplı 96 well plate her kuyucuğuna $5X10^4$ e plate bir kısmına L929, diğer kısmına ise DLD-1 kanser hücrelerinin ekimi yapılarak sistem üzerinden hücre proliferasyon ölçümü yapılmıştır. Ardından faida 1-4 nolu örneklerin 1/1, ¼ ve 1/16 konsantrasyonları 100 mikro litre kuyucuklara ilave edilmiştir. Kontrol grubu olarak sadece medium kullanılacaktır. Ardından sistem tekrar aktif hale geçirilerek her 10 dak. Hücre proliferasyonu 96 saat boyunca ölçülecektir. Böylece uygulanan örneklerin hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi belirlenecektir.

3.7 In Vitro Yara iyileşmesi/Hücre Göçü Testi

Bu test yöntemi, hücre göçünü tespit etmek için in vitro olarak kullanılan yararlı bir yöntemdir. L929 fibroblast veya Koyun derisinden elde edilmiş fibroblast hücrelerinin hücre göçü ve yayılma yetenekleri, yüzeyler üzerindeki bir hücre popülasyonunun genişlemesini ölçen bir çizik yarası analizi kullanılarak değerlendirilir. L929 hücrleri $30x10^3$ olacak şekilde 24 well plakaya ekilecek ve 37 °C, %5 CO_2 ortamında 24 saat inkübasyona bırakılacak. Daha sonra, steril 100 µL plastik pipet ucu ile tek seferde tabaka üzerinde doğrusal bir yara oluşturulacak. Mikroplakalar fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanarak herhangi bir hücre döküntüsü kalması engellenecek, yağ doku izolasyonu son ürünü ve elde edilen kök hücreler 400 µL olacak şekilde kuyucuklara uygulanacak ve 72 saat inkübe edilecek. yara bölgeleri 0,12 ve 24 saate fotoğrafları çekilerek sadece medium uygulanmış kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Böylece faida 1-4 nolu örneklerin in vitro yara modelinde etkinliği araştırılmıştır.

3.8 Antimikrobial Aktivite Testi

Numunenin (EA NUMUNE 1) antimikrobiyal aktivite tayini için agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Deneyde *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşlarının 24 saatlik taze kültürlerinden hazırlanan 0,5 Macfarland bulanıklık standartına uygun hücre süspansiyonu kullanılmıştır. Bulanıklığı elde etmek için; *E. coli* ve *S. aureus* suşlarının 24 saatlik taze

kültürlerinden alınan 4-5 koloni, steril serum fizyolojik içinde homojenize edilmiş ve 600 nm'de spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. 600 nm'de 0,08-0,10 absorbans değer aralığı okunan bakteri süspansiyonlarından Mueller Hinton Agar üzerine steril eküvyon ile ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan agar üzerinde kuyular açılmış ve kuyular içine 50'şer µL numuneden (EA NUMUNE 1) konulmuştur. Deney 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak Gentamisin (CN 10 µg) ve Kloramfenikol (C 30 µg) diskleri kullanılmıştır. Petriler 18-24 saat 37± 2 °C'de inkübe edilmiş ve oluşan zon çapları ölçülmüştür.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Toplam Fenol Ve Flavon Analizi

Propolis ekstraktları toplam fenol ve toplam flavonoid analizi için Bezmialem Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Toplam fenol ve flavonoid analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Toplam fenol ve flavonoid analiz sonuçları

Propolis	Toplam Fenolik	Toplam Flavon
Propolis Etanol	156 mgGAEeq/g	44,8 mgQUEeq/g
Propolis Etil Asetat	204,8 mgGAEeq/g	55 mgQUEeq/g

4.2 Sitotoksisite testi (MTT) Sonucu

MTT testi ile yapılan toksisite değerlendirilmesinde elde edilen sonuçlar normal hücreler için Çizelge 4.2, kanser hücreleri için Çizelge 4.3'te verilmiştir. Çizelgelerde görüldüğü gibi kanser ve normal hücrelerde farklı metotlarla elde edilen örneklerinin özellikle ilk oranlarda ve ikinci oranlarda toksisite görülür iken ¼ oranından sonra toksisitenin azaldığı görülmektedir. EA-1 ve 4 nolu örneklerin L929 fibroblast hücrelerine göre kanser hücrelerinde biraz daha fazla toksik olduğu görülmektedir. Çalışmamız literatürle uyumludur (Surek *et al*. 2021).

Çizelge 4.2 EA-1-4 nolu örneklerin in vitro L929 fibroblast hüclerine karşı sitotoksik etkisi (%10 etil alkol içeren medium için canlılık değeri %100 olarak alınmıştır)

	NUMUNE 1 Faida-EA		NUMUNE 2 Faida Pro-Oleuropein		NUMUNE 3 Faida Pro Etanol		4 Oleuropein (TOZ)	
KONSANTRASYON	Canlılık (%)	Standart Sapma	Canlılık (%)	Standart Sapma	Canlılık (%)	Standart Sapma	Canlılık (%)	Standart Sapma
1/1	56,6	1,1	63,3	3,3	62,2	3,2	70,5	3,6
1/2	82,6	3,1	64,9	0,05	74,2	5,8	74,4	2,5
1/4	89,4	0,7	85,4	4,9	78,5	0,7	82,6	2,2
1/8	90,06	8,5	93,3	6,4	84,1	5,7	87,2	2,5
1/16	91,2	3,7	99,8	1,2	86,5	6,1	96,7	3,9
1/32	95,8	3,9	101,1	2,03	92,5	5,7	99,9	1,5
1/64	97,09	1,2	104,3	9,6	103,4	1,9	104,2	3,5
Pozitif	45,4	0,6						

Çizelge 4.3 EA-1-4 nolu örneklerin in vitro DLD-1 kanser hüclerine karşı sitotoksik etkisi (%10 etil alkol içeren medium için canlılık değeri %100 olarak alınmıştır)

	NUMUNE 1 Faida-EA		NUMUNE 2 Faida Pro-Oleuropein		NUMUNE 3 Faida Pro Etanol		4 Oleuropein (TOZ)	
KONSANTRASYON	Canlılık (%)	Standart Sapma	Canlılık (%)	Standart Sapma	Canlılık (%)	Standart Sapma	Canlılık (%)	Standart Sapma
1/1	50,4	1,1	61,9	2,1	67,1	3,1	53,5	1,4
1/2	54,3	2,6	65,3	4,3	70,02	5,7	61,9	3,08
¼	63,6	1,9	75,8	2,6	89,9	1,5	64,4	2,3
1/8	70,5	0,04	92,5	2,7	87,7	3,5	76,7	2,8
1/16	81,6	0,1	95,2	3,2	97,9	5,8	81,1	0,6
1/32	89,9	3,4	91,2	3,5	100,09	6,4	88,2	2,01
1/64	87,1	3,3	108,2	1,2	111,4	7,8	93,02	5,7
Pozitif	43,1	2,4						

4.3 İkili Boyama Metodu İle Elde Edilen Apoptoz/Nekroz Sonuçları

Normal ve kanser hücreleri hoechst 33342 ve Propodium iyodide floresan boyaları ile analiz edilmiştir. Sadece hoechst ile boyanan ve parlak görünen, parçalı çekirdekli, yoğunlaşmış yapıda çekirdekli ve çekirdekleri küçülmüş hücreler apoptotik olarak değerlendirilmiştir. Çekirdekleri sadece kırmızıya boyana hücreler nekrotik olarak kabul edilmektedir. Buna göre hücrelerin farklı oranlarda eken madde ile etkileştirdikten sonra hücre sayımları sonucu elde edilen Apotoz/Nekroz oranları Çizelge 4.4 ve 4.5'te

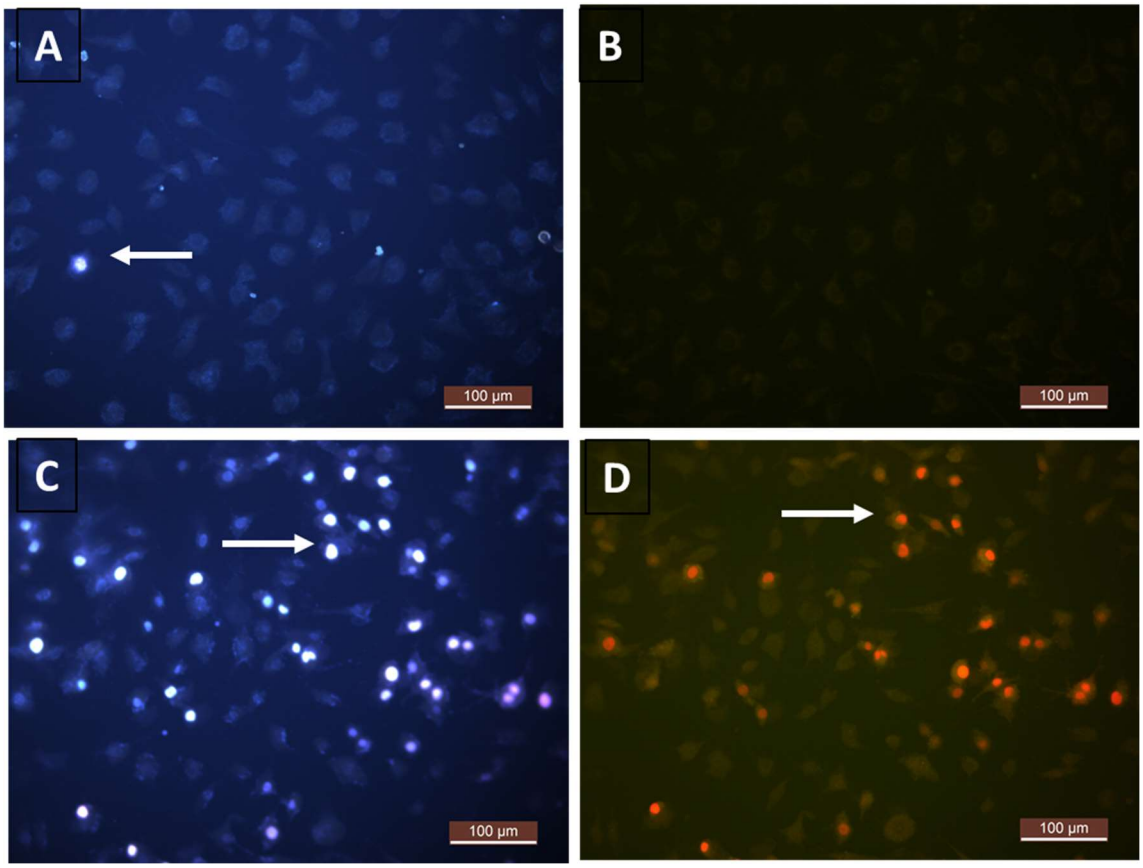
verilmiştir. Çizelgelere göre Fibroblast ve kanser hücrelerinde ilk iki oran apotoz ve nekroz bakımından yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinde nekroz ile ölüm oranının apoptoza göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca floresan mikroskopta apototik ve nekrotik hücrelerin görüntürleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Çalışmamız literatürle uyumludur (Amalia *et al*. 2020)

Çizelge 4.4 1-4 etken maddelerin fibroblast hücrelerindeki % apoptoz/nekroz oranları

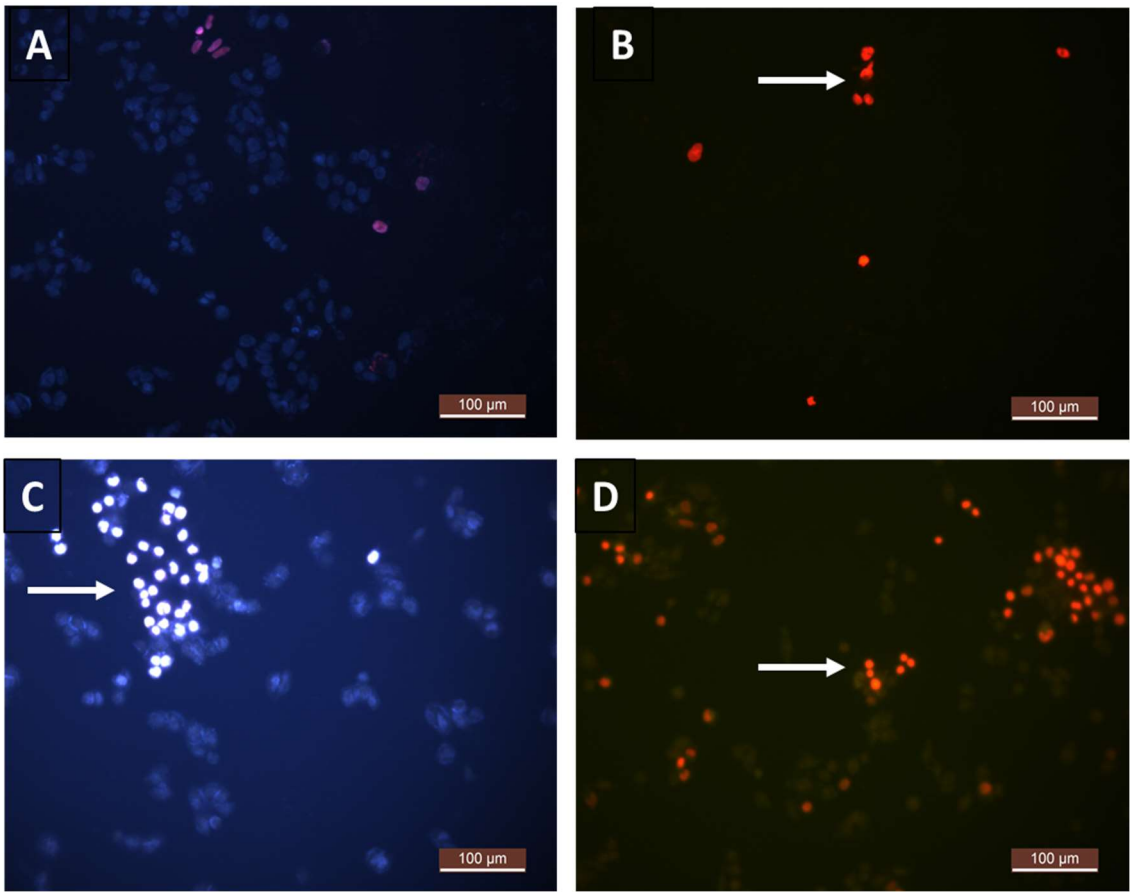
Oranlar	EA 1		2		3		4	
	%apoptoz	%nekroz	%apoptoz	%nekroz	%apoptoz	%nekroz	%apoptoz	%nekroz
1/1	20 ±2	24±3	13±2	19±3	11±2	23±3	14±2	16±3
½	12±2	8±2	6±2	12±1	7±2	15±2	10±2	9±1
¼	5±1	3±2	3±2	4±1	2±2	6±2	5±1	6±2
1/16	3±1	2±1	2±1	3±2	2±1	2±1	3±2	4±2
Kontrol	4±2	4±2	4±2	4±2	4±2	4±2	4±2	4±2

Çizelge 4.5 1-4 etken maddelerin DLD-1 kanser hücrelerindeki % apoptoz/nekroz oranları

Oranlar	EA 1		2		3		4	
	%apoptoz	%nekroz	%apoptoz	%nekroz	%apoptoz	%nekroz	%apoptoz	%nekroz
1/1	22±2	29±3	14±2	35±3	11±2	23±3	16±1	27±1
½	12±2	17±1	12±2	32±2	6±2	19±2	13±2	24±2
¼	8±2	14±2	7±2	24±2	4±1	13±2	6±2	16±2
1/16	4±1	6±1	3±2	8±1	4±2	9±1	5±1	9±2
Kontrol	2±1	2±1	2±1	2±1	2±1	2±1	2±1	2±1



Şekil 4.1 Fibroblast hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. A) kontrol grubu(sadece medium ile etkileştirilmiş fibroblastların apoptotik görüntüsü, B) kontrol grubu(sadece medium ile etkileştirilmiş fibroblastların nekrotik hücre çekirdek görüntüsü, C) Örnek 1'in 1/1 konsantrasyonu ile etkileştirilmiş fibroblastların apoptotik görüntüsü(ok; parlak çekirdekler apoptotik hücreleri göstermektedir), D) Örnek 1'in 1/1 konsantrasyonu ile etkileştirilmiş fibroblastların nekrotik görüntüsü(ok; kırmızı hücre çekirdeklerini yani nekrotik hücreleri göstermektedir), Fotoğraflar leica DBMI 6000 inverted mikroskop ile çekilmiştir.

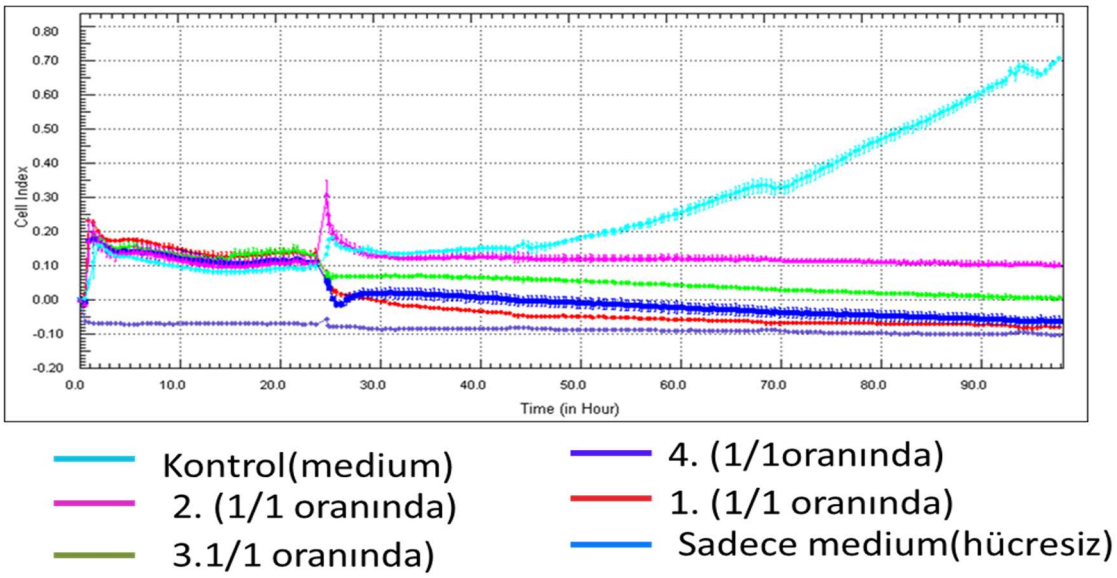


Şekil 4.2 DLD-1 kanser hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. A) kontrol grubu(sadece medium ile etkileştirilmiş kanser hücrelerinin apoptotik görüntüsü, B) kontrol grubu(sadece medium ile etkileştirilmiş kanser hücrelerinin nekrotik çekirdek görüntüsü, C) Örnek 1'in 1/1 konsantrasyonu ile etkileştirilmiş kanser hücrelerinin apoptotik görüntüsü(ok; parlak çekirdekler apoptotik hücreleri göstermektedir), D) Örnek 1'in 1/1 konsantrasyonu ile etkileştirilmiş Kanser hücrelerinin nekrotik görüntüsü(ok; kırmızı hücre çekirdeklerini yani nekrotik hücreleri göstermektedir), Fotoğraflar leica DBMI 6000 inverted mikroskop ile çekilmiştir.

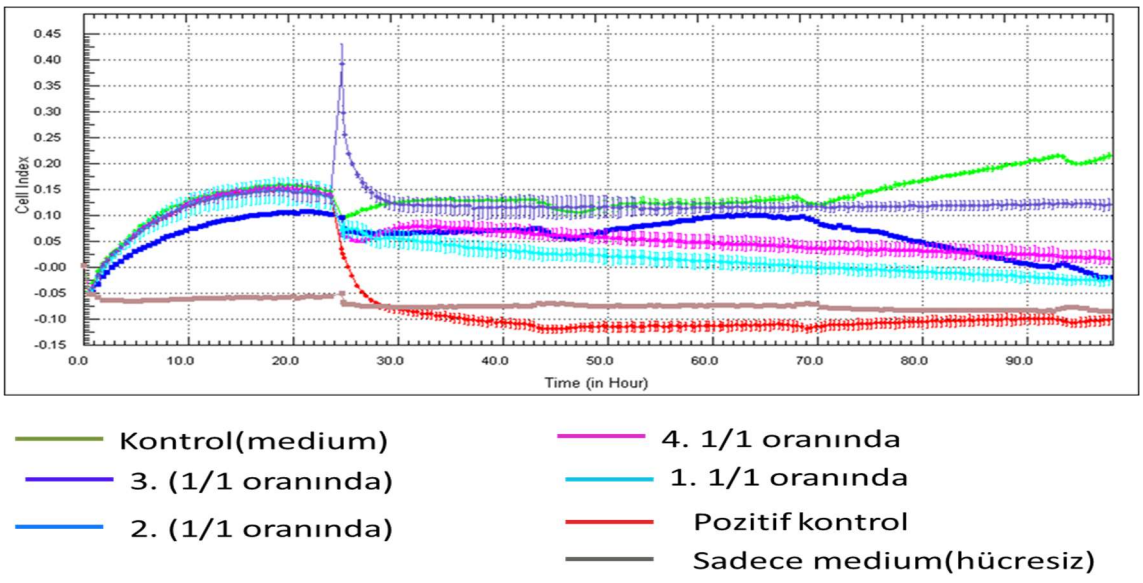
4.4 Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi İle Proliferasyonun Gösterilmesi

Bu testte gerçek zamanlı olarak 1-96 saat boyunca hücre kültüründe nasıl bir değişiklik olduğu takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3 ve 4.4'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hem kanser hücrelerinde hem de normal hücrelerde konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonun azaldığı gözlenmiştir. Bu testte hücre sayısı ve hacimsel artısı plate tabanını daha fazla kapatmaktadır. Yüzeyi altın kaplı olan well plate in empedans ölçümüne göre hücre sayısında artış olarak yansımaktadır. Artmış bir hücre popülasyonunda ise hücre ölümüne bağlı olarak epedansta azalma meydana gelerek

grafikte aşağı doğru bir yönelme görülmektedir. Sonuçlar literatür ile uyumludur (Mısır vd. 2020).



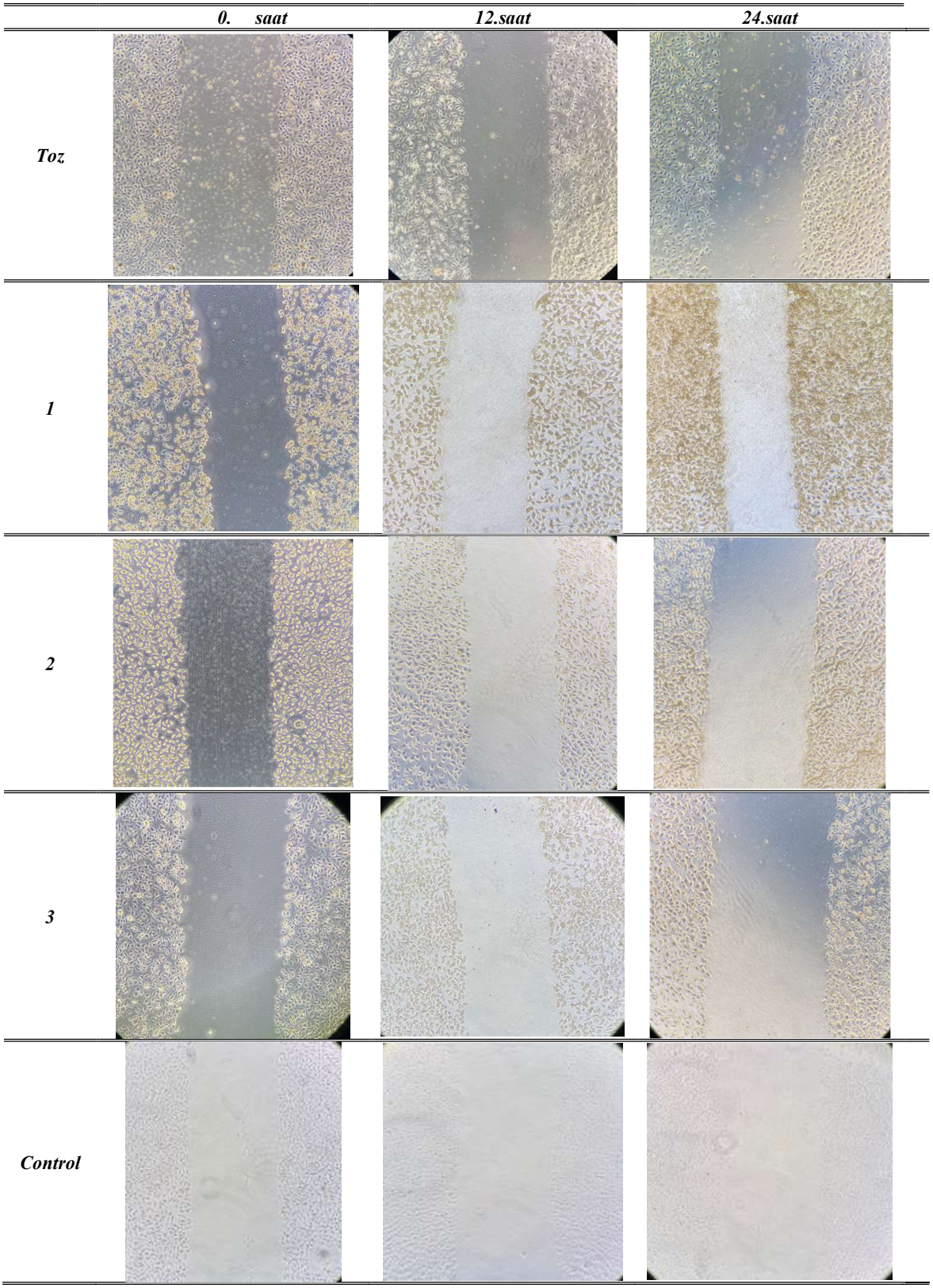
Şekil 4.3 Etken madde 1-4 1/1 oranında fibroblast hücrelerindeki proliferasyon etkisi



Şekil 4.4 Etken madde 1-4 1/1 oranında DLD-1 kanser hücrelerindeki proliferasyon etkisi

4.5 İn Vitro Yara İyileşme Deney Sonuçları

Bu test yöntemi, hücre göçünü tespit etmek için in vitro olarak kullanılan yararlı bir yöntemdir. L929 fibroblast hücrelerinin hücre göçü ve yayılma yetenekleri, yüzeyler üzerindeki bir hücre popülasyonunun genişlemesini ölçen bir çizik yarası analizi kullanılarak değerlendirildi. Hücreler $2{,}5 \times 10^5$ hücre/mL olacak şekilde 24 oyuklu hücre kültürü kaplarına ekildi, 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin konfluent olmasının ve plağı kaplamasının ardından steril 100 µL plastik pipet ucu ile tek seferde tabaka üzerinde doğrusal bir yara örneği oluşturuldu, kalkan hücreler ve vasat kalıntısının giderilmesi amacıyla plaklar PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkandı. Kontrol grubu olarak yalnızca DMEM ile hazırlanmış besiyeri ve test maddesi olarak malzemenin (1/1 (%100)) ekstresi uygulandı ve %5 CO_2 içeren, 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşturulan yara çiziği 24 saat inkübe edilirken, yara bölgeleri 0, 12 ve 24 saatlerde fotoğraflanmıştır. Yara modeli uygulanan test materyallerinin 0., 12. ve 24. saatteki görüntüleri Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5 Yara modeli uygulanan test materyallerinin 0. , 12. ve 24. Saatteki görüntüleri (görüntüler 10X büyütmede çekilmiştir.)

Yapılan bu yöntem, confluense olmuş bir hücre tek tabakası üzerinde çizik yöntemiyle yapay bir boşluğun yaratılması ve boşluğun kenarında kalan hücrelerin o boşluğu (in vitro yara modelini) kapatmak için açıklığa doğru hareket edeceğini ve bu açıklığı kapatma kapasitesini gözlemlemeye dayanmaktadır. Yöntemin uygulanması basittir ve birçok avantaj sağlar; in vivo hücre hücrelerin göçlerini bir dereceye kadar taklit eder, hücre dışı matris (ECM) ve hücre-hücre etkileşimleri ile hücre göçünün düzenlenmesini incelemek için uygundur. Uygulanan hücre cephesinin hareket etme hızı, ortamda bulunan hücrelerin hem çoğalma hızına hem de hareketliliğine bağlıdır (Chigurupati *et al.* 2013). Oluşturulan yara boşluğunun boyutu SEM ile ölçeklendirildi ve boşluğa hücrelerin göçü kaydedildi. Bu veriler ışığında toz, 1 nolu, 2 nolu ve 3 nolu test numunelerinin L929 hücrelerinde boşluğu doldurma ve hücre göçü kapasitesi kontrol grubuna göre fazla bir artış göstermemiştir.

Hesaplama Yöntemi

In vitro yara iyileşmesi ve hücre göçü açık kaynaklı bir görüntü işleme programı olan ImageJ kullanarak alan görüntülerin çekildikleri saatlerdeki alanlar ölçülerek hesaplanmıştır. Yara kapanma yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

%kapanma= (başlangıç çizik alanı-t anında ölçülen çizik alanı) / başlangıç çizik alanı x 100 (Eq1)

Yara modelleri ayrıca L929 fibroblast hücrelerinde uygulanmıştır. Fibroblast hücreleri hem biyouyumluluk açısından önemlidir hem de insan vücudunda birçok dokuda bulunmaktadır. Yara kapanma yüzdesi yukarıdaki formülle (Eq1) hesaplanmıştır, sonuçlar aşağıdaki gibidir. Fibroblast hücrelerinin yara kapanma yüzdesi; toz numune uygulama sonrası %kapanma 12 h için;

(5586 μm^2)-(4746 μm^2)/(5586 μm^2)*100= %15 oranında yara kapanması gerçekleşmiştir.

%kapanma 24 h için; (5586 μm^2)-(4592 μm^2)/ (5586 μm^2)*100= %18 oranında yara kapanması gerçekleşmiştir. 1 Nolu Numune uygulama sonrası;

%kapanma 12 h için; (4852 μm^2)-(4609 μm^2)/(4852 μm^2)*100= %5 oranında yara kapanması gerçekleşmiştir.

%kapanma 24 h için; (4852 μm^2)-(3828 μm^2)/ (4852 μm^2)*100= %21 oranında yara kapanması gerçekleşmiştir. 2 Nolu Numune uygulama sonrası;

%kapanma 12 h için; (5104 μm^2)-(4956 μm^2)/(5104 μm^2)*100= %3 oranında yara kapanması gerçekleşmiştir.

%kapanma 24 h için; (5104 μm^2)-(4752 μm^2)/ (5104 μm^2)*100= %7 oranında yara kapanması gerçekleşmiştir. 3 Nolu Numune uygulama sonrası;

%kapanma 12 h için; (5995 μm^2)-(5445 μm^2)/(5495 μm^2)*100= %10 oranında yara kapanması gerçekleşmiştir.

%kapanma 24 h için; (5995 μm^2)-(4674 μm^2)/ (5995 μm^2)*100= %22 oranında yara kapanması gerçekleşmiştir.

Yapılan çalışmada hazırlanan yara bölgesine herhangi bir hücrenin göç ettiği gözlemlenmemiştir. Cell Migration olarak adlandırılan hücre göçü bulunmamakta, kapanan yara yüzdesi yara bölgesi kıyılarından gerçekleştiği tespit edilmiştir.

4.6 Antimikrobial Aktivite Test Sonuçları

Escherichia coli (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşlarında yapılan agar difüzyon test sonuçları ayrı ayrı aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

EA NUMUNE 1 adlı örneğin, Escherichia coli ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Numunenin (EA NUMUNE 1), *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları

	Kuyu (50 µL numune) zon çapı (mm)	Kontrol (Gentamisin) zon çapı (mm)	Kontrol (Kloramfenikol) zon çapı (mm)
1.Petri	9	24	29
2.Petri	8	24	30
3.Petri	8	25	29
Sonuç	8,3±0,5	24,3±0,5	29,3±0,5

EA NUMUNE 1 adlı örneğin, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Numunenin (EA NUMUNE 1) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları

	Kuyu (50 µL numune) zon çapı (mm)	Kontrol (Gentamisin) zon çapı (mm)	Kontrol (Kloramfenikol) zon çapı (mm)
1.Petri	17	22	29
2.Petri	19	23	29
3.Petri	17	22	29
Sonuç	17,6±1,2	22,3±0,5	29±0,0

Sonuç: Numunenin (PRO OLEUROPEİN NUMUNE 1), *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşları üzerinde deneyi yapılan konsantrasyonda antimikrobiyal etkisi olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar literatür ile uyumludur (Benhanifia *et al*. 2014).

PRO OLEUROPEİN NUMUNE 2 adlı örneğin, Escherichia coli ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Numunenin (PRO OLEUROPEİN NUMUNE 2), *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları

	Kuyu (50 µL numune) zon çapı (mm)	Kontrol (Gentamisin) zon çapı (mm)	Kontrol (Kloramfenikol) zon çapı (mm)
1.Petri	9	24	29
2.Petri	9	24	30
3.Petri	10	25	29
Sonuç	9,3±0,5	24,3±0,5	29,3±0,5

PRO OLEUROPEİN NUMUNE 2 adlı örneğin, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Numunenin (PRO OLEUROPEİN NUMUNE 2) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları

	Kuyu (50 µL numune) zon çapı (mm)	Kontrol (Gentamisin) zon çapı (mm)	Kontrol (Kloramfenikol) zon çapı (mm)
1.Petri	18	22	29
2.Petri	19	23	29
3.Petri	21	22	29
Sonuç	19,3±1,5	22,3±0,5	29±0,0

Sonuç: Numunenin (PRO OLEUROPEİN NUMUNE 2), *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşları üzerinde deneyi yapılan konsantrasyonda antimikrobiyal etkisi olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar literatür ile uyumludur (Okińczyc *et al*. 2020).

PRO ETANOL NUMUNE 3 adlı örneğin, *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10 Numunenin (PRO ETANOL NUMUNE 3), *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları

	Kuyu (50 µL numune) zon çapı (mm)	Kontrol (Gentamisin) zon çapı (mm)	Kontrol (Kloramfenikol) zon çapı (mm)
1.Petri	8	24	29
2.Petri	9	24	30
3.Petri	10	25	29
Sonuç	9,0±1,0	24,3±0,5	29,3±0,5

PRO ETANOL NUMUNE 3 adlı örneğin, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11 Numunenin (PRO ETANOL NUMUNE 3) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları

	Kuyu (50 µL numune) zon çapı (mm)	Kontrol (Gentamisin) zon çapı (mm)	Kontrol (Kloramfenikol) zon çapı (mm)
1.Petri	18	22	29
2.Petri	19	23	29
3.Petri	17	22	29
Sonuç	18±1,0	22,3±0,5	29±0,0

Sonuç: Numunenin (PRO ETANOL NUMUNE 3), *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşları üzerinde deneyi yapılan konsantrasyonda antimikrobiyal etkisi olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar literatür ile uyumludur (Vică *et al*. 2021).

OLEUROPEİN adlı örneğin, *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12 Numunenin (OLEUROPEİN), *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları

	Kuyu (50 µL numune) zon çapı (mm)	Kontrol (Gentamisin) zon çapı (mm)	Kontrol (Kloramfenikol) zon çapı (mm)
1.Petri	11	24	29
2.Petri	11	24	30
3.Petri	10	25	29
Sonuç	10,6±0,5	24,3±0,5	29,3±0,5

OLEUROPEİN adlı örneğin, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13 Numunenin (OLEUROPEİN) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanılarak elde edilen antimikrobiyal aktivite (agar difüzyon) zon çapı sonuçları

	Kuyu (50 µL numune) zon çapı (mm)	Kontrol (Gentamisin) zon çapı (mm)	Kontrol (Kloramfenikol) zon çapı (mm)
1.Petri	28	22	29
2.Petri	27	23	29
3.Petri	27	22	29
Sonuç	27,3±0,5	22,3±0,5	29

Sonuç: Numunenin (OLEUROPEİN), *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşları üzerinde deneyi yapılan konsantrasyonda antimikrobiyal etkisi olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar literatür ile uyumludur (Azevedo *et al*. 2020).

Örneklerin *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922)'ye karşı normal antimikrobial aktivite gösterirken, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923)'a karşı yüksek antimikrobial aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir.

5. SONUÇLAR

Propolis ekstraktları toplam fenol ve toplam flavonoid analizi yapılmıştır. Propolis Etanol extraktı için toplam fenol ve toplam flavon sırasıyla 156 mg GAEeq/g ve 44,8 mg QUEeq/g olarak bulunmuştur. Propolis Etil asetat extraktı için toplam fenol ve toplam flavon sırasıyla 204,8 mg GAEeq/g ve 55 mg QUEeq/g olarak bulunmuştur.

Sitotoksisite testi sonuçlarına göre kanser ve normal hücrelerde farklı metotlarla elde edilen örneklerinin özellikle ilk oranlarda ve 2 oranlarda toksisite görülür iken ¼ oranından sonra toksisitesi azalmıştır.

Apoptoz/nekroz sonuçlarına göre fibroblast ve kanser hücrelerinde ilk iki oran apotoz ve nekroz bakımından yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinde nekroz ile ölüm oranının apoptoza göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile proliferasyonun gösterilmesi testi yapılmıştır. Bu testte gerçek zamanlı olarak 1-96 saat boyunca hücre kültüründe nasıl bir değişiklik olduğu takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hem kanser hücrelerinde hem de normal hücrelerde konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonun azaldığı gözlenmiştir. Bu testte hücre sayısı ve hacimsel artısı plate tabanını daha fazla kapatmaktadır. Yüzeyi altın kaplı olan well plate in empedans ölçümüne göre hücre sayısında artış olarak yansımaktadır. Artmış bir hücre popülasyonunda ise hücre ölümüne bağlı olarak epedansta azalma meydana gelerek grafikte aşağı doğru bir yönelme görülmektedir.

İn vitro yara iyileşme çalışması da yapılmıştır. Oluşturulan yara boşluğunun boyutu SEM ile ölçeklendirilmiş ve boşluğa hücrelerin göçü kaydedilmiştir. Bu veriler ışığında toz, 1 nolu, 2 nolu ve 3 nolu test numunelerinin L929 hücrelerinde boşluğu doldurma ve hücre göçü kapasitesi kontrol grubuna göre fazla bir artış göstermemiştir. Yapılan çalışmada hazırlanan yara bölgesine herhangi bir hücrenin göç ettiği gözlemlenmemiştir. Cell Migration olarak adlandırılan hücre göçü bulunmamakta, kapanan yara yüzdesi yara bölgesi kıyılarından gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Antimikrobial aktivite *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşlarında yapılan agar difüzyon testi ile yapılmıştır.

Numunenin (PRO OLEUROPEİN NUMUNE 1), *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşları üzerinde deneyi yapılan konsantrasyonda antimikrobiyal etkisi olduğu gözlenmiştir.

Numunenin (PRO OLEUROPEİN NUMUNE 2), *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşları üzerinde deneyi yapılan konsantrasyonda antimikrobiyal etkisi olduğu gözlenmiştir.

Numunenin (PRO ETANOL NUMUNE 3), *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşları üzerinde deneyi yapılan konsantrasyonda antimikrobiyal etkisi olduğu gözlenmiştir.

Numunenin (OLEUROPEİN), *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) suşları üzerinde deneyi yapılan konsantrasyonda antimikrobiyal etkisi olduğu gözlenmiştir.

Örneklerin *Escherichia coli* (*E. coli* - ATCC 25922) karşı normal antimikrobial aktivite gösterirken, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 25923) karşı yüksek antimikrobial aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir.

KAYNAKLAR

Alencar, S. M., Oldoni, T. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., Ikegaki, M. 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. Journal of ethnopharmacology, 113(2), 278-283.

Ali, A. M., & Kunugi, H. 2021. Propolis, bee honey, and their components protect against Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A review of in silico, in vitro, and clinical studies. Molecules, 26(5), 1232.

Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, I., Cakiroglu, T. N., Akalin, I., Deger, O., & Bedir, A. 2011. Preventive and protective effects of Turkish propolis on H 2 O 2-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. Acta Biologica Hungarica, 62(4), 388-396.

Amalia, E., Diantini, A., & Subarnas, A. 2020. Water soluble propolis and bee pollen of Trigona spp. from South Sulawesi Indonesia induce apoptosis in the human breast cancer MCF 7 cell line. Oncology Letters, 20(5), 1-1.

Armutcu, F., Akyol, S., Ustunsoy, S., & Turan, F. F. 2015. Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Experimental and therapeutic medicine, 9(5), 1582-1588.

Azevedo de M. Oliveira, L. F., Teles da Silva, L. V. D. A., do Nascimento, T. G., de Almeida, L. M., Calumby, R. J. N., Nunes, Á. M., Oliveria, M. T., da Silva Fonseca, E. J. 2020. Antioxidant and antimicrobial activity of red propolis embedded mesoporous silica nanoparticles. Drug development and industrial pharmacy, 46(7), 1199-1208.

Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 31(1), 3-15.

Bankova, V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2(1), 29-32.

Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. Chemistry Central Journal, 8(1), 1-8.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytotherapy research, 15(7), 561-571.

Bayram, N. E., Karadayı, M., Güllüce, M., Bayram, S., Sorkun, K., Gül Cevahir, Ö. Z., Salih, B. 2015. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of propolis by using in vitro bacterial assay systems. Mellifera, 15(1), 29-36.

Benner, S. E., Wargovich, M. J., Lippman, S. M., Fisher, R., Velasco, M., Winn, R. J., & Hong, W. K. 1994. Reduction in oral mucosa micronuclei frequency following alpha-tocopherol treatment of oral leukoplakia. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 3(1), 73-76.

Benhanifia, M., Shimomura, K., Tsuchiya, I., Inui, S., Kumazawa, S., Mohamed, W., & Benbarek, H. 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of propolis collected from some localities of Western Algeria. Acta Alimentaria, 43(3), 482-488.

Campo Fernández, M., Cuesta-Rubio, O., Rosado Perez, A., Montes De Oca Porto, R., Márquez Hernández, I., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. 2008. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. Journal of agricultural and food chemistry, 56(21), 9927-9932.

Carvalho, M. B. 1997. História natural do câncer da cavidade oral. Câncer da Boca, 17-29.

Castaldo, S., & Capasso, F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 73, S1-S6.

Chigurupati, S., Mughal, M. R., Okun, E., Das, S., Kumar, A., McCaffery, M., Mattson, M. P. 2013. Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. Biomaterials, 34(9), 2194-2201.

Çınar, F. İ., Yılmaz, Z., & Özen, N. 2019. Kemoterapi Tedavisi Devam Eden Meme Kanserli Hastalarda Kullanılan Tamamlayıcı Sağlık Yaklaşımları ve Etkileyen Faktörlerin Değerlendirilmesi. Koç Üniversitesi Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi, 16(3), 191-197.

De Almeida, E. C., & Menezes, H. 2002. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. Journal of Venomous Animals and Toxins, 8(2), 191-212.

Freires, I. A., Queiroz, V. C. P. P., Furletti, V. F., Ikegaki, M., de Alencar, S. M., Duarte, M. C. T., & Rosalen, P. L. 2016. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against Candida spp. Journal de mycologie medicale, 26(2), 122-132.

Gençay, Ö., & Sorkun, K. 2002. Propolis hakkında neler biliyoruz. Teknik arıcılık, 75, 17-21.

González-Búrquez, M. D. J., González-Díaz, F. R., García-Tovar, C. G., Carrillo-Miranda, L., Soto-Zárate, C. I., Canales-Martínez, M. M., & Fonseca-Coronado, S. 2018. Comparison between in vitro antiviral effect of Mexican propolis and three commercial flavonoids against canine distemper virus. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018.

Hamasaka, T., Kumazawa, S., Fujimoto, T., & Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. Food Science and Technology Research, 10(1), 86-92.

Havsteen, B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & therapeutics, 96(2-3), 67-202.

Higashi, K. O., & De Castro, S. L. 1994. Propolis extracts are effective against Trypanosoma cruzi and have an impact on its interaction with host cells. Journal of Ethnopharmacology, 43(2), 149-155.

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. Molecules, 19(12), 19610-19632.

Izuta, H., Shimazawa, M., Tazawa, S., Araki, Y., Mishima, S., & Hara, H. 2008. Protective effects of Chinese propolis and its component, chrysin, against neuronal cell death via inhibition of mitochondrial apoptosis pathway in SH-SY5Y cells. Journal of agricultural and food chemistry, 56(19), 8944-8953.

Jia, Z.S., Tang, M.C. and Wu, J.M. 1999 The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. Food Chemistry , 64, 555-559.

Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Madana, R. M., Gogoi, R., & Barua, C. C. 2015. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. Toxicology letters, 233(2), 214-225.

Kędzia, B. 2009. Chemical composition of Polish propolis. Part II. New studies. Postępy Fitoterapii. 10(2), 122-128.

Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., & Salih, B. 2002. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. Food chemistry, 78(2), 213-217.

Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knezevic, S. 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. Acta Pharmaceutıca-Zagreb-, 54(1), 65-72.

Kumar, V. 2000. Micronuclei in oral squamous cell carcinoma: A marker of genotoxic damage. Indian J. Dent. Res., 11, 101-106.

Kun-Suk, W., & Jong-Sung, P. 1997. Eucalyptus Propolis Beverages with Their Composition and Effects. In Bee Products (pp. 125-127). Springer, Boston, MA.

Küresel Kanser Gözlemevi (GCO), 2021. Web sitesi. https://gco.iarc.fr/. Erişim Tarihi: 05.06.2021.

Liu, J., Zhu, J., Xue, J., Qin, Z., Shen, F., Liu, J., & Wang, Y. 2017. In silico-based screen synergistic drug combinations from herb medicines: a case using Cistanche tubulosa. Scientific reports, 7(1), 1-12.

Maciejewicz, W. 2001. Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. Journal of liquid chromatography & related technologies, 24(8), 1171-1179.

Mani, F., Damasceno, H. C. R., Novelli, E. L. B., Martins, E. A. M., & Sforcin, J. M. 2006. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. Journal of ethnopharmacology, 105(1-2), 95-98.

Márquez, N., Sancho, R., Macho, A., Calzado, M. A., Fiebich, B. L., & Muñoz, E. 2004. Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-κB transcription factors. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 308(3), 993-1001.

Mısır, S., Aliyazıcıoğlu, Y., Demir, S., Turan, İ., & Hepokur, C. 2020. Türk propolisinin insan meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde miRNA ekspresyonu, hücre döngüsü ve apoptoz üzerine etkisi. Beslenme ve kanser, 72 (1), 133-145.

Mutlu Sariguzel, F., Berk, E., Koc, A. N., Sav, H., & Demir, G. 2016. Antifungal activity of propolis against yeasts isolated from blood culture: In Vitro evaluation. Journal of clinical laboratory analysis, 30(5), 513-516.

Noori, A. L., Al-Ghamdi, A., Ansari, M. J., Al-Attal, Y., & Salom, K. 2012. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans isolates in single and polymicrobial cultures. International journal of medical sciences, 9(9), 793.

Noronha, V., S Araujo, G., T Gomes, R., H Iwanaga, S., C Barbosa, M., N Abdo, E., & R Santos, V. 2014. Mucoadhesive propolis gel for prevention of radiation-induced oral mucositis. Current clinical pharmacology, 9(4), 359-364.

Okińczyc, P., Paluch, E., Franiczek, R., Widelski, J., Wojtanowski, K. K., Mroczek, T., K. Barbara, Wozniak, K. S., Sroka, Z. 2020. Antimicrobial activity of Apis mellifera L. and Trigona sp. propolis from Nepal and its phytochemical analysis. Biomedicine & Pharmacotherapy, 129, 110435.

Osés, S. M., Marcos, P., Azofra, P., de Pablo, A., Fernández-Muíño, M. Á., & Sancho, M. T. 2020. Phenolic profile, antioxidant capacities and enzymatic inhibitory activities of propolis from different geographical areas: Needs for analytical harmonization. Antioxidants, 9(1), 75.

Ozkul, Y., Silici, S., & Eroğlu, E. 2005. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. Phytomedicine, 12(10), 742-747.

Özen, S., Akyol, Ö., Iraz, M., Söğüt, S., Özuğurlu, F., Özyurt, H., & Yıldırım, Z. 2004. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Journal of Applied Toxicology: An International Journal, 24(1), 27-35.

Park, E. H., Kim, S. H., & Park, S. S. 1996. Anti-inflammatory activity of propolis. Archives of Pharmacal Research, 19(5), 337-341.

Propolis ve arılar, 2021. Web sitesi. https://propolisfaydalari.com/propolis-nasil-uretilir/. Erişim Tarihi: 05.06.2021.

Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., & Garbarino, J. A. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. Life sciences, 76(5), 545-558.

Seitz, H. K., Pöschl, G., & Simanowski, U. A. 1998. Alcohol and cancer. Recent developments in alcoholism, 67-95.

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

Sforcin, J. M., & Bankova, V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. Journal of ethnopharmacology, 133(2), 253-260.

Shimizu, K., Ashida, H., Matsuura, Y., & Kanazawa, K. 2004. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. Archives of biochemistry and biophysics, 424(2), 181-188.

Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology , 299, 152-178.

Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M., & Juszczak, L. 2015. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. Natural Product Research, 29(5), 416-422.

Speciale, A., Costanzo, R., Puglisi, S., Musumeci, R., Catania, M. R., Caccamo, F., 2006. Antibacterial activity of propolis and its active principles alone and in combination with macrolides, beta-lactams and fluoroquinolones against microorganisms responsible for respiratory infections. Journal Chemotherapy, 18:164–171.

Stepanović, S., Antić, N., Dakić, I., & Švabić-Vlahović, M. 2003. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. Microbiological Research, 158(4), 353-357.

Stich, H. F., Curtis, J. R., & Parida, B. B. 1982. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. International Journal of Cancer, 30(5), 553-559.

Sun, L. P., Chen, A. L., Hung, H. C., Chien, Y. H., Huang, J. S., Huang, C. Y., & Chen, C. N. 2012. Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. Journal of agricultural and food chemistry, 60(47), 11748-11758.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 71(3), 209-249.

Surek, M., Fachi, M. M., de Fátima Cobre, A., de Oliveira, F. F., Pontarolo, R., Crisma, A. R., & Felipe, K. B. 2021. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. Journal of Ethnopharmacology, 269, 113662.

Szliszka, E., & Krol, W. 2013. Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2013, Artiicle ID 731940, 10 pages.

Tan, W., Lu, J., Huang, M., Li, Y., Chen, M., Wu, G., & Wang, Y. 2011. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. Chinese medicine, 6(1), 1-15.

Vică, M. L., Glevitzky, M., Tit, D. M., Behl, T., Heghedűş-Mîndru, R. C., Zaha, D. C., Ursu, F., Popa, M. Glevitzky, I., Bungău, S. 2021. The antimicrobial activity of honey and propolis extracts from the central region of Romania. Food Bioscience, 41, 101014.

Vynograd, N., Vynograd, I., & Sosnowski, Z. 2000. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). Phytomedicine, 7(1), 1-6.

Wolska, K., Gorska, A., Antosik, K., & Lugowska, K. 2019. Immunomodulatory effects of propolis and its components on basic immune cell functions. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 81(4), 575-588.

Yamauchi, R., Kato, K., Oida, S., Kanaeda, J., & Ueno, Y. 1992. Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 56(8), 1321-1322.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: İbrahim ERKAYACAN
Medeni Hali	: Evli
Yabancı Dili	: İngilizce
Mesleği	: Fizikçi

Eğitim Durumu

Lise	: Isparta Gülkent Lisesi (1996)
Lisans	: Erciyes Üniversitesi Yozgat Fen Edebiyat Fakültesi (2003)
Yüksek Lisans	: Çankırı Karatekin Üniversitesi FBE Kimya Anabilim Dalı (2021)