

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**A549 KANSER HÜCRE HATTINDA PROPOLİSİN ANTI-
KANSEROJEN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra ERKOÇ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN

HATAY-2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**A549 KANSER HÜCRE HATTINDA PROPOLİSİN ANTI-
KANSEROJEN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kübra ERKOÇ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 18.YL.083 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY - 2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL
ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA.VE GENETİK (TIP) ANA BİLİM DALI

**A549 KANSER HÜCRE HATTINDA PROPOLİSİN ANTI-KANSEROJEN ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kübra ERKOÇ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 16.07.2019 günü sözlü olarak yapılan
tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof. Dr. Abdullah ARPACI

Üye: Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Ana Bilim Dalında
hazırlanmıştır.

16.07.2019

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecince akademik bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, deneylerin gerçekleştirilmesi ve yazım aşamasında bilimsel katkılarıyla yardım ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülşay GÜLBOL DURAN'a

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah ARPACI'ya, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK'e ve Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğr. Üyesi Sayın Dr. Menderes Yusuf TERZİ'ye

Tez çalışmamda kullanılan Propolis teminini sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi/Ziraat Fakültesi/Zootekni Bölümü/Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı Sayın Doç. Dr. Aziz GÜL'e

Tez çalışmamda kullanılan Propolis'i kullanıma hazır hale getiren Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi/Kimya Bölümü/Organik Kimya Anabilim Dalı Sayın Doç. Dr. Neslihan BEYAZID'a

Tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Arş. Gör. Dr. Hasret ECEVİT'e, laboratuvar aşamasındaki yardımlarından dolayı Moleküler Biyokimya ve Genetik Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Zehra ULUTAŞ ve Cem ABİDOĞLU'na

Her konuda koşulsuz sevgi ve sabırla yanımda olan, benden bir an olsun maddi manevi yardımlarını esirgemeyen çok değerli biricik babam, annem ve canım kardeşlerim Özlem, Aynur ve Serdar'a

Teşekkürlerimi Sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ÖZET.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.PropolisinTarihçesi Ve Özellikleri.....	2
2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri.....	4
2.1.2. Hatay Propolisinin Özellikleri.....	5
2.1.3. Propolis Ve Kanser.....	6
2.1.4. Propolis Bileşenleri.....	6
2.1.4.1.Kafeik Asit Fenetil Ester.....	7
2.1.4.2.Flavonoidler.....	8
2.1.4.3. Cyrisin.....	8
2.1.4.4.Galangin.....	9
2.1.4.5.Artepillin C.....	9
2.2. Apoptoz.....	9
2.2.1. Apoptozun Düzenlenmesi.....	11
2.2.1.1. Kaspaz Ailesi.....	11
2.2.1.2. Bcl-2 Ailesi.....	12
2.2.1.2.1. Antiapoptotik Bcl-2 Proteinleri.....	13
2.2.1.2.2. Proapoptotik Bcl-2 Proteinleri.....	14
2.2.1.2.3. BH3-only Proteinler.....	15
2.2.1.3. p53.....	15
2.2.1.4. p21.....	16
2.2.2. Apoptoz Mekanizmaları.....	17
2.2.2.1. İntrinsik Yolak.....	18

2.2.2.2. Ekstrinsik Yolak.....	19
2.2.3. Kanser ve Apoptoz.....	20
2.2.3.1. Akciğer Kanseri ve Apoptoz	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
3.1.Cihazlar.....	24
3.2.Kimyasallar.....	25
3.3.Hücre Kültürü.....	25
3.4. Propolis Dozlarının Hazırlanması.....	26
3.5. Propolis Temini ve Kimyasal Kompozisyonları.....	28
3.6. MTT Testi.....	29
3.7. RNA İzolasyonu.....	31
3.8. cDNA Sentezi.....	32
3.9. Real Time PCR Analizi.....	34
3.10. İstatistiksel Analizler.....	35
4. BULGULAR.....	37
4.1.DMSO'nun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	37
4.2. Propolisin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	38
4.3.Propolisin Apoptoz Mekanizmasında Rol Alan Genlerin Ekspresyonu Üzerine Etkileri.....	40
4.3.1. Propolisin Kaspaz 3 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	41
4.3.2. Propolisin Kaspaz 8 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	41
4.3.3. Propolisin Kaspaz 9 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	42
4.3.4. Propolisin p21 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	42
4.3.5. Propolisin Bcl-2 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	43
4.3.6. Propolisin Bax Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	44
4.3.7. Propolisin Bid Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	44
4.3.8. Propolis ile Muamele Edilmiş A549 Hücrelerinde Apoptoz Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	44
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ.....	52
7. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Apis mellifera L.'nin kovana propolis işlemesi.....	3
Şekil 2.2. Propolisin farmakolojik özellikleri.....	4
Şekil 2.3. Propolisin Yapısal Özellikleri.....	7
Şekil 2.4. Apoptozu uyaran sinyaller.....	11
Şekil 2.5. Bcl-2 domain (BH) alanı.....	13
Şekil 2.6.Hücre döngüsünün p21 aracılığıyla düzenlenmesi.....	17
Şekil 2.7. Apoptoz mekanizmaları.....	18
Şekil 2.8. Her iki cinsiyette 0-74 yaş aralığındaki tahmini kanserçeşitlerinin mortalite ve insidans verileri.....	22
Şekil 2.9. 2018'de akciğer kanserinin bölgesel spesifik gelişimine ilişkin cinsiyete ve yaşa göre standartlaştırılmış oranları.....	23
Şekil 3.1. A549 hücrelerinin ışık mikroskobu ile görünümü.....	26
Şekil 3.2. 24 Saatlik sırasıyla 125, 62.5, 31.25, 15.625 ve 7.8125µg/ml propolis muamelesinin ışık mikroskobu ile görünümü.....	27
Şekil 3.3. Evaporatör.....	28
Şekil 3.4. Spektrofotometre.....	30
Şekil 3.5. Thermal Cycler.....	34
Şekil 3.6.QIAGEN Rotor-Gene Q Cihazı.....	35
Şekil 4.1.DMSO'nun A549 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.2. Propolisin 125 -7,8125µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.3. A549 hücrelerinde Propolisin 125 µg/ml 7.8125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında%inhibisyon grafiği.....	41
Şekil 4. 4. Propolisin Kaspaz 3 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.5. Propolisin Kaspaz 8 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.6. Propolisin Kaspaz 9 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.7. Propolisinp21 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.8. Propolisin Bcl-2 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.9. Propolisin Bax geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.10. Propolisin Bid geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	45

Şekil 4.11. Propolisin apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.12. Apoptoz mekanizmasında rol alan genlerde kontrol grubu ve 15.625 µg/ml Propolis konsantrasyon dozunun ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması.....	47



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	24
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	25
Çizelge 3.3. Propolisin içerdiği bileşenleri miktarı.....	28
Çizelge 3.4. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	32
Çizelge 3.5. Thermal Cycler cihazı çalışma programı.....	32
Çizelge 3.6. qRT-PCR reaksiyon karışım bileşen ve miktarları.....	34
Çizelge 3.7. qRT-PCR reaksiyon koşulları	35
Çizelge 4.1. 125 µg/ml-7.8125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında 'optik dansite' nin ortalama± standart sapma değerleri.....	37
Çizelge 4.2. 125 µg/ml-7.8125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon oranla- rını.....	38
Çizelge 4.3. 125 µg/ml-7.8125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon ve% canlılık oranları.....	40
Çizelge 4.4. Kontrol grubu ve 15.625 µg/ml propolis dozunun ortalama Ct±standart sapma değerleri.....	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Actnb	:Actin Beta
Apaf1	:Apoptotic protease activating factor 1; apoptotik proteaz aktive edici faktör
Bad	:Bcl-2 associated death promoter; Bcl-2 ilişkili ölüm promoteri
Bak	:Bcl-2 antagonist killer; Bcl-2 antagonist öldürücü
Bax	:Bcl-2-associated X protein; Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	:B-Cell CLL/Lymphoma 2
Bcl-W	:Bcl-2-like protein 2; Bcl-2 benzeri protein 2
Bcl-xL	:B-Cell lymphoma extra large
BH	:Bcl-2 domain alanı
Bid	:BH3 interacting domain death agonist; BH3 ile etkileşen domain ölüm agonisti
Bik	:Bcl-2 interacting kille
Bim	:Bcl-2 interacting mediator; Bcl-2 ile etkileşen aracı
Bmf	:Bcl-2 modifying factor; Bcl-2 değiştirici faktör
Bok	:Bcl-2 related ovarian killer; Bcl-2 ile ilişkili yumurtalık katili
CA	:Kafeik asit
Ca	:Kalsiyum
CAD	:Caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz
CAPE	:Kafeik Asit Fenetil Ester
Cas 3	:Caspase 3
Cas 6	:Caspase 6
Cas 7	:Caspase 7
Cas 8	:Caspase 8
Cas 9	:Caspase 9
Cd	:Kadminyum
cDNA	:Komplementer DNA
Cu	:Bakır
Ct	:Comparative Treshold

DED	:Death effect domain (Ölüm Efektör Bölgesi)
DIABLO	:Düşük PI
DISC	:Death-inducing signaling complex; ölüm uyarıcı sinyal kompleksi
dk	:Dakika
DMSO	:Dimethyl Sulfoxide; dimetil sülfoksitfaktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand
ER	:Endoplazmik retikulum
FBS	:Fetal bovine serum; fetal sığır serum
Fe	:Demir
g	:g-force; g kuvveti
Hg	:Civa
Hrk	:Harakiri
IAP	:Inhibitors of apoptosis proteins; apoptoz proteinlerinin inhibitörleri
ICAD	:Inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease
K	:Potasyum
Mg	:Magnezyum
ml	:Mili litre
Mn	:Manganez
MOM	:Mitochondrial outer membrane; mitokondriyal dış zar
Na	:Sodyum
Noxa	:Latin for damage (zarar, hasar)
NSLC	:non-small-cell lung cancer
Ort	:Ortalama
p21	:CDKN1A; cyclin dependent kinase inhibitor 1A; siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A
p53	:TP53; Tumor Protein p53
PAK(1)	:p21 aktive edilmiş kinaz
Pb	:Kurşun
Puma	:p53 upregulated modulator of apoptosis; p53 up-regüle modülator apoptoz
qRT-PCR	:Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RCF	:Relative centrifugal force; nispi merkezkaç kuvveti

RNA	:Ribonükleik asit
Rpm	:Revolutions per minute; dakikadaki devir sayısı
SCLC	:small-cell lung cancer
SF	:Serumsuz vasat
Smac	:Second mitochondria-derived activator of caspase; mitokondriyen türevli kaspaz
sn	:Saniye
tBid	:Truncated Bid; kesilmiş Bid
TM	:Transmembran Alanı
TNF	:Tumor necrosis factor; tümör nekroz faktörü
TNFR	:Tumor necrosis factor receptors; tümör nekrozis faktör reseptörü
TNF α	:Tumor necrosis factor alpha; tümör nekroz faktör alfa
TRAIL	:Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; tümör nekrozis
Zn	:Çinko
μ g	:Mikrogram
μ l	:Mikrolitre
$^{\circ}$ C	:Santigrat derece

ÖZET

A549 Kanser Hücre Hattında Propolisin Antikanserojen Etkinliğinin Araştırılması

Propolis antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar, immünmodülatör, antimikotik, antifungal, antiülser, antikanserojen etki gibi farmakolojik etkilere sahip yapısında 300'den fazla biyoaktif bileşen bulunduran arı ürünüdür. Propolisin kompozisyonu ve içerdiği biyoaktif bileşenlerin oranları bölgeden bölgeye ve elde edildiği kaynağa bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Kanser tedavi yöntem araştırmalarında apoptotik hücre ölümünün moleküler mekanizmasının anlaşılması antikanserojen etkinin belirlenmesinde büyük önem arz etmektedir. Çalışmamızın amacı, propolisin A549 akciğer kanser hücre hattında apoptozu uyarıp uyarmadığı, uyarıyor ise hangi yolak üzerinden hücreleri apoptoza yönlendirdiğini araştırarak Hatay propolisinin antikanserojen etkisini belirlemektir. Bu bağlamda çalışmamızda, A549 hücreleri 24 saat süreyle 125 ve 7.81 µg/ml konsantrasyon aralığındaki Hatay propolis dozları ile muamele edildi. 24 saat sonunda MTT testi yapılarak sitotoksosite ölçüldü ve hücre ölümünün gerçekleştiği ilk konsantrasyon dozu çalışmada kullanılacak doz olarak belirlendi. Sonrasında hücreler 15.625 µg/ml konsantrasyona sahip Hatay propolisi ile muamele edilerek 24 saatin sonunda RNA ve cDNA izolasyonlarının ardından Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bcl-2, Bax, Bid ve p21 genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR analiz yöntemiyle belirlendi.

Sonuçlarımız Hatay propolisinin A549 kanser hücrelerinin canlılığını kontrol grubu ile kıyaslandığında 15.625 µg/ml ve daha yüksek dozlarda anlamlı olarak baskıladığını gösterdi. Sonuçlarımız Hatay propolisinin A549 kanser hücrelerini 15.625 µg/ml'lik konsantrasyonda 24 saat süreli inkübasyonunda Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bcl-2, Bax, Bid ve p21 genlerinin ekspresyon seviyelerini artırarak kanser hücrelerinin apoptoza teşvik ettiği saptandı (p<0.001). Propolisin ekstrinsik ve intrinsik yolağı tetikleyerek A549 kanser hücre hattını apoptoza teşvik ettiği saptandı.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında propolisin intrinsik ve ekstrinsik yolak aracılığıyla apoptozu indüklediği gösterilmiş olup propolisin kanser tedavisinde doğal yeni bir kemoterapötik ajan olarak potansiyel teşkil ettiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Apoptoz, A549 Hücre Hattı, Antikanserojen Etki

ABSTRACT

Investigation of Anticarcinogenic Activity of Propolis in A549 Cancer Cell Line

Propolis is a bee product containing more than 300 bioactive components in its composition and has many pharmacologic effects such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, antimycotic, antifungal, antiulcer, and anticarcinogenic. The composition of propolis and the proportions of the bioactive components it contains vary depending on the region and the source it is extracted from. Understanding the molecular mechanism of apoptotic cell death in the search of cancer treatment methods is of great importance in determining the anticarcinogenic effect. The aim of this study is to determine the anticancer effect of Hatay propolis by investigating whether propolis stimulates apoptosis in the A549 lung cancer cell line and, if so, by which pathway it leads the cells to apoptosis. In our study, A549 cells were treated with Hatay propolis at concentrations between 125 and 7.81 µg/ml for 24 hours. At the end of 24 hours, cytotoxicity was measured with MTT test and the first concentration at which cell death occurred was determined as the dose to be used in the study. Cells were then treated with Hatay propolis at a concentration of 15.625 µg/ml for 24 hours and after RNA and cDNA isolation, expression levels of caspase 3, caspase 8, caspase 9, Bcl-2, Bax, Bid and p21 genes were determined with qRT-PCR analysis.

Our results showed that Hatay propolis significantly suppressed the cell viability of A549 cancer cells at concentrations of 31.25 µg/ml and higher compared to the control group. Our results showed that 24-hour incubation of Hatay propolis A549 cancer cells at a concentration of 15.625 µg / ml increased the expression levels of Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9, Bcl-2, Bax, Bid and p21 genes ($p < 0.001$). Propolis was found to trigger the extrinsic and intrinsic pathways to induce apoptosis of the A549 cancer cell line.

In conclusion, propolis has been shown to induce apoptosis via the intrinsic and extrinsic pathways in the our study and is thought to be a potential new natural chemotherapeutic agent in cancer treatment.

Keywords: Propolis, Apoptosis, A549 Cell Line, Anticarcinogenic Effect

1.GİRİŞ

Propolis eski Yunanca'dan gelen “pro”; ön, giriş ve “polis”; şehir kelimelerinden oluşan ve bal arılarının kovan savunması ile ilgili olarak kullanılmış bir terimdir (Pasupuleti ve ark. 2017). Arı tutkalı olarak da bilinen propolis, bal arısı olan *Apis mellifera* L. 'nin çeşitli bitkilerden topladığı kokusuz reçineli bir maddedir, çeşitli bitkilerden toplanması dolayısıyla biyolojik olarak aktif bileşikler bakımından zengindir (Zaccaria ve ark. 2017, Chang ve ark. 2018). Propolis arılar tarafından koruyucu bir bariyer, kovanları sterilize edici bir madde olarak kullanılırken, çatlakların kapatılmasında da kullanılmaktadır (Vukovic ve ark. 2018). Antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, immünmodülatör, antifungal, antiülser, antikanserojen ve kardiyoprotektif etkiler gibi birçok farmakolojik aktivitelere sahip olduğu için uzun yıllardır sağlık alanında kullanımı yaygın bir maddedir (Pasupuleti ve ark. 2017, Chang ve ark. 2018). Son zamanlarda in vivo ve in vitro olarak yapılan çalışmalar propolis ve bileşenlerinin kanser hücre hatlarında antikanserojen etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Vukovic ve ark. 2018). Propolisin antikanserojen aktivitesi üzerindeki in vitro olarak yapılan moleküler çalışmalar, fenolik bileşenlerinin hücre döngüsünü durdurmasına ve apoptoza, mitokondriyal strese ve tümör büyümesinin önlenmesine neden olduğunu göstermiştir (Bhargava ve ark. 2018).

Kanser, somatik mutasyonların birikimi sonucunda genler ve sinyal yollarının moleküler fonksiyonlarının etkilenmesi sonucunda hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalmasıdır (Ahmed ve ark. 2006). Kanser, dünya çapında ölümlerin %63'ünden sorumlu olan bulaşıcı olmayan hastalıkları temsil etmektedir (Demir ve ark. 2016). Akciğer kanseri dünya çapında en yaygın kanserlerden biri ve hayatta kalma oranı %15 olan, hem genetik hem de epigenetik değişikliklerin birikimi ile oluşan kanser çeşididir. Akciğer kanseri ölümcül malign tümörlerden biridir. Bu nedenlerle, akciğer kanserinin erken teşhisini mümkün kılmak ve tedavisinin gerçekleştirilmesini sağlamak için moleküler mekanizmalarını aydınlatmak gereklidir (Tauchi Nishi ve ark. 2014). Kemoterapi günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan kanser tedavi yöntemidir. Ancak kemoterapi normal hücrelerde görülen yüksek orandaki toksisitesi, tedavide sonuç alamama ve kanser hücrelerinde kademeli ilaç direnci gibi bir dizi dezavantajlara sahip bir tedavi yöntemidir. Bu nedenlerden ötürü oluşan sorunları ortadan kaldırmak için yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal birleşikler ise bu anlamda umut vaat etmektedirler. Doğal

bileşikler sağlıklı hücreler üzerindeki zararsız, kanser hücrelerinde apoptoz ve hücre döngüsü üzerindeki modüle edici etkilerinden ötürü yeni antikanserojen ilaçların önemli bir kaynağı olarak kabul edilmektedir. Yeni nesil kemoterapötik ajanların %70'inden fazlası doğrudan veya dolaylı olarak doğal ürünlerden elde edilmektedir (Demir ve ark. 2016).

Apoptoz, Bcl-2 ve Bcl-2 ilişkili Bax gibi Bcl-2 ailesinin anti ve proapoptotik üyeleri ile Kaspaz 3 (Cas 3), Kaspaz 6 (Cas 6) ve Kaspaz 7 (Cas 7) dahil olmak üzere çoklu moleküler seviyelerde düzenlenen, hasar görmüş veya normal olmayan hücrelerin yok edilmesinde ve doku hemostazının korunmasında etkili olan programlandırılmış hücre ölümünün fizyolojik bir sürecidir (Bejarano ve ark. 2018, Yamagata ve ark. 2018). Kanser hücreleri, antiapoptotik olan Bcl-2 gibi proteinlerin ekspresyonu ile veya Bax gibi proapoptotik proteinlerin down regülasyonu ile apoptoza karşı dirençli hala gelebilirler (Hassan ve ark. 2014). Kanser hücrelerinin sıklıkla apoptoz aktivasyonuna karşı direnmede önemli rol oynayan birçok proteini eksprese ettikleri bildirilmiştir. Çeşitli mekanizmalar, hücrelerin programlanmış hücre ölümünden kurtulmasını sağlar ve aralarında antiapoptotik moleküllerin aşırı ifadesi vardır (Radogna ve ark. 2015).

Bu çalışmada; propolisin, in vitro ortamda A549 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı) hücrelerinde, apoptoz üzerine etkilerinin olup olmadığı, varsa hangi apoptotik yolak üzerinden düzenlendiği belirlenerek propolisin antikanserojen etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENELBİLGİLER

2.1. Propolisin Tarihçesi ve Özellikleri

Antik çağlardan beri insanlık özellikle geleneksel tıp başta olmak üzere farklı alanlarda propolisi kullanmaktadır. Geçmişe bakıldığında Yunanlılar propolisi dezenfektan olarak ve vücutta oluşan bazı enfeksiyonlar için antiseptik olarak kullanırken, Mısırlılar ölüleri mumyalamak için kullanmışlardır (Havsteen 1983, Zabaïou ve ark. 2017). Romalı hekimler tarafından propolis sikatrizan ajan olarak kullanırken, İnkalar ateş düşürücü bir ajan olarak propolisi kullanmışlardır. 17. yüzyılda ise Londra farmakopelerinde propolis resmi bir ilaç olarak listelere geçmiştir (Ghisalberti 1979, Castaldo ve Capasso 2002, Sforcin 2007, Sforcin ve Bankova 2011). Propolis kullanımını daha sonra zamanla üzerine yapılan araştırmaların hız kazanmasıyla artmıştır.

Arı tutkalı olarak da bilinen propolis, bal arısı olan *Apis mellifera* L. 'nin çeşitli bitkilerden topladığı ve arıların tükürük enzimleri tarafından işlenen karmaşık yapıdaki reçinemsî birleşiktir (Zaccaria ve ark. 2017) (Şekil 2.1.). Propolis, arıların genellikle ağaç tomurcuklarından ve bitkilerden topladıkları ve arılar tarafından kovanlarında oluşan çatlakları veya açık alanları kapatmada zambak olarak kullanılır ki bu da yıl boyunca kovanın içerisindeki sıcaklığı ve nemi sabit tutmayı sağlar. Ayrıca propolis, koruyucu bir bariyer olarak kovanı dış etkenlerden korumaktadır ve kovanları sterilize edici bir madde olarak arılar tarafından üretilen doğal bir bileşendir (Vukovic ve ark. 2018).



Şekil 2.1.. *Apis mellifera* L.'nin kovana propolis işleme (The entomoloji today, 2019)

Arı kovanları için propolisin yapısal ve işlevsel niteliklerinden ayrı olarak, propolisin insan popülasyonu için çeşitli hastalık önleyici ve tedavi edici potansiyele sahip olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Propolis tanımlanan geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahiptir. Antienflamatuar, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiülseratif, antiseptik, antioksidan, immünmodülatör, antikanserojen ve kardiyoprotektif etkiler gibi farmakolojik aktivitelere sahip olduğu için uzun yıllardır sağlık alanında kullanımı yaygın bir maddedir (Velikova ve ark. 2000, Jafarzadeh Kashi ve ark. 2011, Sartori ve ark. 2012) (Şekil 2.2). Sahip olduğu bu özellikler sebebiyle propolis vücut losyonları, merhemler, yüz kremleri gibi kozmetik ürünlerde ve diş macunu, gargara gibi çeşitli şekillerde fonksiyonel olarak kullanılmaktadır (Choudhari ve ark. 2013, Bhargava ve ark. 2018).



Şekil 2.2. Propolisin farmakolojik özellikleri

2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin rengi; sarımsı, yeşil ve koyu kahverengi olabilirken kokusu aromatik ile kokusuz olarak değişmektedir. Propolisin renk ve koku özellikleri botanik kaynağına, elde edilen coğrafi bölgenin kökenine, arının yaş ve yapısı gibi özelliklerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Bhargava ve ark. 2018). Propolis sert reçineli bir ürün olduğundan, doğal haliyle tüketilemez. Propolis saf haliyle kullanılmayan doğal bir

maddedir. Propolis çözücülerini etanol, su, metanol, heksan ve aseton şeklinde sıralanmaktadır. Genel olarak propolis çözültüsü hazırlamanın şekli reçineyi toza dönüştürerek ve ardından alkollü veya sulu ortamda ekstraksiyon yapmaktır (Beatriz ve ark. 2012). Yüksek sıcaklıklarda, propolis yumuşak, esnek ve yapışkan yapıdadır; düşük sıcaklıklarda ise donma anında sertleşir ve kırılabilir hale gelir (Sforcin 2016, Zabaoui ve ark. 2017).

2.1.2. Hatay Propolisinin Özellikleri

Propolisin farmakolojik özellikleri son derece karmaşık ve bölgeden bölgeye değişen kimyasal bileşimi ile alakalı farklılıklar göstermektedir. Hatay ilinden toplanan propolis içerik açısından zengindir. Bunun sebebi; Hatay'ın bitki örtüsünün, tipik Akdeniz ekolojisinden daha çeşitli olarak çam ormanı, okaliptüs, kavak ağaçları ve çok çeşitli meyve bahçeleri içermesidir (Sahinler ve Kaftanoğlu 2005). Hatay'dan elde edilen propolisin; kafeik asit fenetil ester (Urruticococha ve ark.), galangin, chrysin, dimetoksisinamik asit, kafeik asit (CA) gibi fenolik bileşikler açısından zengin olduğu bildirilmiştir. Bu fenolik bileşikler de propolisin farmakolojik açıdan daha etkin olmasını sağlamaktadır (Yıldırım ve ark. 2016).

Türkiye bölgesindeki propolis endoplazmik retikulum stresini inhibe ederek, apoptozu ve kaspaz aktivitesini indükleyerek ve mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak, insan akciğer kanseri hücrelerinde seçici bir sitotoksik etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Bu sonuç propolisin akciğer kanser hücresi proliferasyonunu en aza indirebileceğini göstermektedir (Demir ve ark. 2016).

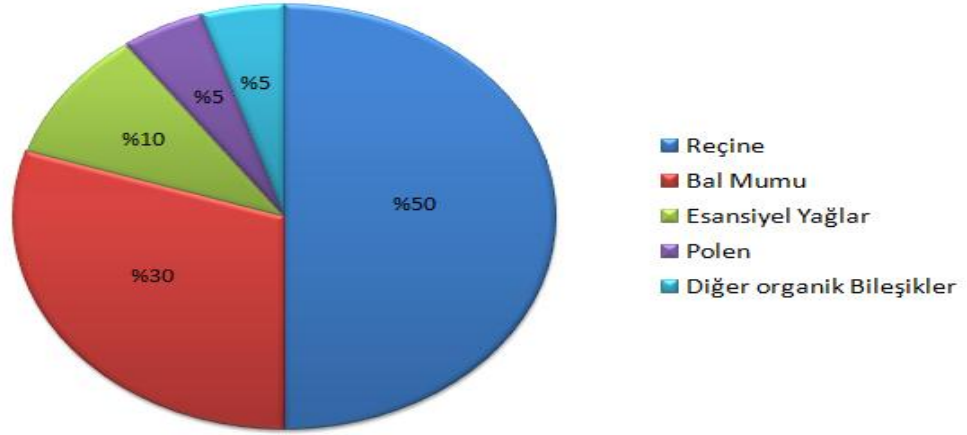
2.1.3. Propolis ve Kanser

Son zamanlardaki çalışmalarda propolis ve bileşenlerinin in vitro olarak hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin görülmesinin yanı sıra in vivo olarak antikanserojen etkisinin de olduğu gösterilmiştir (Banskota ve ark. 1998, Birt ve ark. 2001, Vukovic ve ark. 2018). Propolisin kimyasal bileşikleri, kanser hücre çoğalmasını durdurmak için

biyokimyasal ve genetik yolları hedef almaktadır (Kakehashi ve ark. 2016). Propolisin antikanserojen aktivitesi üzerine yapılan moleküler çalışmalar fenolik bileşenlerinin hücre döngüsünün durması ve apoptozise, mitokondriyal stres ve tümör büyümesinin inhibisyonuna neden olduğunu ortaya koymaktadır (Bhargava ve ark. 2018). Propolis bileşenlerinin, hücre döngüsünün durması ve apoptozun indüklenmesi, matriks metaloproteinazlarının baskılanması, antianjiyogenez, metastazın önlenmesi ve kemoterapi ile indüklenen yan etkilerin azaltılmasında rol oynadığı kanıtlanmıştır. Propolisin in vitro ve in vivo olarak yapılan çalışmalarda meme, karaciğer, pankreas, böbrek, mesane, prostat, kolon, beyin, baş ve boyun, cilt ve kan kanserlerine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ancak bulguların klinik etkinliği konusunda çalışmalar yetersizdir (Kakehashi ve ark. 2016). Yapılan çalışmalar incelendiğinde propolisteki etkili olan antikanserojen bileşenlerinin kafeik asit fenetil ester, chrysin, artepilin C, nemoroson, galangin ve kardanol olduğu ortaya koyulmuştur (Patel ve ark. 2016).

2.1.4. Propolis Bileşenleri

Propolisin kimyasal karakterizasyonu üzerine yapılan ilk çalışmalar 20. yüzyılın başlarına dayanmaktadır. Analitik yöntemlerde ilerleme kaydedilmesiyle flavonoidler, terpenoidler, fenolik asitler, fenolik esterler ve şekerler dahil üzere bugüne kadar propoliste 300'den fazla bileşik tanımlanmıştır. Propolisin yaklaşık olarak %50'si bitki reçinesinden, %30'u bal mumundan, geri kalanın %10'u esansiyel yağlardan, %5'i polen ve %5'i ise fenolik bileşikler, esterler, flavonoidler, terpenler, beta-steroidler, aromatik aldehytler ve alkoller şeklinde sıralanan organik maddelerden oluşmaktadır (Pasupuleti ve ark. 2017) (Şekil 2.3). Bunların yanı sıra propolis B1, B2, B6, C ve E gibi vitaminleri ve arıların metabolizmalarından elde edilen amino asitleri de içermektedir. Propolis ayrıca Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn ve Fe gibi bazı mineral elementleri ve Cd, Hg ve Pb gibi ağır metalleri içermektedir (Zaccaria ve ark. 2017). Propolis süksinat dehidrojenaz, glukoz-6-fosfataz, adenosin trifosfataz ve asit fosfataz gibi enzimleri de içermektedir (Pasupuleti ve ark. 2017). Propolisin modern tıptaki giderek artan geniş uygulaması kimyasal bileşimine dayanmaktadır.



Şekil 2.3.. Propolisin Yapısal Özellikleri

2.1.4.1. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

Propolisteki en çok araştırılan bileşenlerden biri olan kafeik asit fenetil esterinin, çeşitli patolojilere karşı çoklu ve etkili olan antitümör, immünomodülatör, antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal gibi birçok biyoaktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda yaygın olarak bildirilmiştir (Urruticoechea ve ark. 2010, Wu ve ark. 2011, Omene ve ark. 2012, Morin ve ark. 2017, Kabala-Dzik ve ark. 2018). CAPE, insan lösemik hücre hattında (HL-60), kolorektal kanser (CRC) hücre hattı ve meme kanseri hücre hattı gibi kanser hücre hatlarında ve viral etkiye sahip hücrelerde önemli sitotoksikite gösterdiği bildirilmiştir (Sawicka ve ark. 2012, Teerasripreecha ve ark. 2012). CAPE'nin kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda karsinoma hücrelerine kıyasla sağlıklı hücrelerde çok düşük toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, CAPE antikanserojen materyal olarak düşünülmektedir (Kuo ve ark. 2006, Teerasripreecha ve ark. 2012). CAPE bazlı propolis ekstraktının, p21 aktive edilmiş kinaz 1 (PAK1) sinyalini bloke ettiği ve nörofibromatozis'teki tümörleri baskıladığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Bhargava ve ark. 2018).

2.1.4.2. Flavonoidler

Flavonoidler, biyolojik özelliklerinden dolayı insan sağlığına fayda sağlayan, bitkilerde ve propoliste yüksek oranda bulunan düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşikler içeren metabolitlerdir. Tanımlanmış 5000 çeşit flavonoid vardır (Mani ve Natesan 2018). Flavonoidler (flavonlar, flavonoller ve flavanonlar), insan kolorektal, meme ve mide kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu üzerinde etkili olan çok çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip olan birleşiklerdir (Graf ve ark. 2005). Ayrıca serbest radikallerin üretimini önleme ve azaltma özelliklerinden dolayı, bu bileşikler önemli ölçüde kemoterapotik aktiviteye sahiptirler (Kundu ve Surh 2008, Vukovic ve ark. 2018).

2.1.4.3. Chrysin

Yapılan çalışmalar propolisin chrysin içeriğinin 28 gr/l kadar yüksek oranda olduğunu göstermektedir (Mani ve Natesan 2018). Chrysin uygulamasının, kanser oluşumu sırasında oksidan ve antioksidan metabolizmasının homeostazisini dengeleyerek ve lipid peroksidasyon ile antioksidanların aktivitesini düzenleyerek antikanserojen aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Sekar Karthikeyan 2013, Mani ve Natesan 2018). Chrysinin, hem in vitro hem de in vivo olarak yapılan çalışmalarda Notch 1 sinyal yolağının aktivasyonu ile apoptoz aracılığıyla tümör büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır. Chrysinin etki mekanizması, hücre çoğalmasında, apoptozla hücre ölümünün indüklenmesinde ve inflamatuvarın azaltılmasında rol oynamaktadır (Xue ve ark. 2016, Mani ve Natesan 2018). Chrysin, renal karsinogenez sırasında çeşitli tümör oluşumunu ve inflamatuvarın biyolojik biyomarkerlerinin aktivasyonunu sınırladığı için renal karsinogenezin önlenmesinde etkili bir biyoajandır. Chrysin, tümör hücresi kaynaklı anjiyogenezin etkili bir inhibitörüdür (Fu ve ark. 2007, Mani ve Natesan 2018).

2.1.4.4. Galangin

Galanginin antioksidan, antitümör ve antiinflamatuar etkilerine ilaveten, çeşitli in vitro ve in vivo testlerle antikanserojen aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Heo ve ark. 2001, Su ve ark. 2013). Ren ve arkadaşlarının 2016'da yaptıkları bir çalışmada galanginin, tümör hücresinin proliferasyonunun inhibisyonuyla Kaspaz 3'ü ve ROS (Reaktif oksijen türleri) üretimini aktive ederek, apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada, tümörün baskılanmasının yanı sıra fosfatidilinositol-3-kinazın (PI3K)/Akt yolağı ve Bcl-2'nin down regülasyonu ile kanser hücresinin hücre döngüsünü durdurabileceği bildirilmiştir. Tümör süppressor proteinlerin düzenlenmesinin yanı sıra p27 ve p53 regülasyonu, galanginin umut verici antikanser özelliğini göstermektedir (Ren ve ark. 2016).

2.1.4.5. Artepillin C

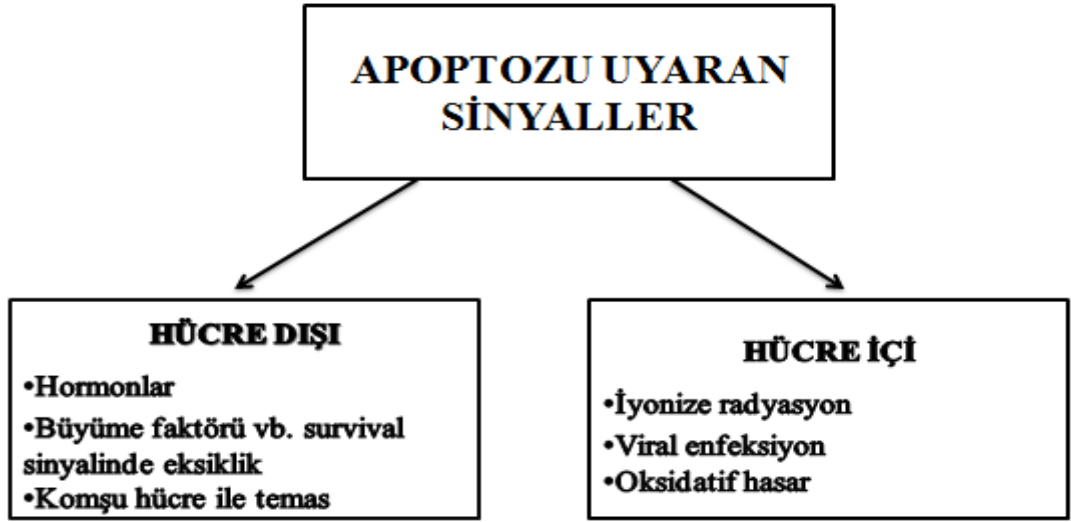
Artepillin C, farklı doku kökenli çeşitli kanser hücrelerine karşı antikanserojen aktiviteye sahip bir moleküldür. Artepillin C, apoptozu indükleyerek hem in vivo hem de in vitro olarak yapılan çalışmalarda tümör büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (Pang ve ark. 2018).

2.2. Apoptoz

“Apoptosis” terimi, Yunanca “apo” ayrılma, “ptosis” düşme olarak çevrilen ve ağaçtan sonbaharda düşen yaprakları tanımlamak için kullanılan eski bir kelimedir (Duque Parra 2005). Tıpta “apoptoz” teriminin ilk kullanımı Hipokrat tarafından 4. yy da fizyolojik bir hücre/doku ölüm şeklini tanımlamak için kullanılmıştır. 1972 yılında Kerr ve arkadaşları ise “büzülme nekrozu” terimi altında bir tür hücre ölümünü tanımlamak için apoptoz terimini kullanmışlardır. 19. yüzyılın sonuna doğru apoptoz ile ilgili moleküler çalışmalar hız kazanmış ve hücre ölümü ile ilgili çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalar detaylı bir şekilde incelendiğinde, birçoğunun aslında apoptotik hücre

ölümünün tipik biçimlerini tanımladığını görülmektedir (Diamantis ve ark. 2008). Memeli hücrelerinde apoptozis sürecinde yer alan mekanizmaların anlaşılması, nematod *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi sırasında ortaya çıkan programlanmış hücre ölümünün araştırılmasından geçmiştir (Kaczanowski ve ark. 2016). Apoptoz, bu çalışma ile hücrelerin genetik olarak belirlenmiş bir şekilde elimine edilmesini içeren “programlanmış” hücre ölümünün farklı ve önemli bir modu olarak kabul edilmiştir (Anita ve ark. 2014). Bu çalışma da *C. elegans*'lar önceden belirlenmiş sayıda hücreye sahiptir: yetişkin bir hermafrodit 959 hücreye sahiptir ve yetişkin bir erkeğin 1031 hücresi vardır. Sulston ve Horvith, her bir *C. elegans* hücresinin embriyodan yetişkine, aile ağacı olarak gelişim sürecini tanımlayarak ölen hücrelerin keşfedilmesini sağlamıştır. Bu tanımlama ile apoptozun kazara oluşan bir mekanizma değil de programlanmış olduğu kanıtlandı (Hedgecock ve ark. 1983, Kaczanowski ve ark. 2016).

Apoptozun morfolojik ve biyokimyasal özellikleri, onu diğer hücre ölümlerinden kolayca ayırt edilmesini sağlamaktadır. Apoptozda gözlenen kaspazların aktivasyonu, DNA ve proteinin parçalanması ve membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınması şeklinde üç ana biyokimyasal değişiklik gözlemlenmektedir (Anita ve ark. 2014). Apoptoz hücre içi ve hücre dışı sinyaller aracılığıyla uyarılır (Şekil 2.4). Apoptoz başladığında, iç mitokondriyal transmembran potansiyelinin bozulmasıyla karakterize edilen bir membran geçirgenliği, ardından kromatin yoğunlaşması ve nükleer fragmentasyon gözlemlenmektedir. Daha sonra hücre, makrofajlar tarafından tanınan ve inflamasyonun indüklenmesini önleyen, membran bağlı, ultrastrüktürel olarak iyi korunmuş fragmanlara bölünür ve apoptoz gerçekleşir (Sulston ve Horvitz 1977, Kaczanowski 2016).



Şekil 2.4. Apoptozu uyaran sinyaller

2.2.1. Apoptozun Düzenlenmesi

Apoptozun düzenlenmesinde kaspazlar, Bcl-2 protein ailesi üyeleri, p53, p21, sitokrom c gibi proteinler ve mitokondriyeler rol oynamaktadırlar (Coşkun ve Özgür 2011).

2.2.1.1.Kaspaz Ailesi

Apoptozun bir başka spesifik özelliği, kaspaz adı verilen sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonudur. Kaspaz, "c" si sistein proteazı belirtirken, "aspaz" enzimin aspartik asit kalıntılarından sonra ayrılma özelliğine işaret eden sistein bağımlı aspartata özgü proteazları ifade eder. Kaspazlar apoptotik mekanizmada büyük ve merkezi bir role sahiptirler. Kaspazlar hem başlatıcı hem de uygulayıcı olarak görev yaptıkları için apoptozis mekanizmasının merkezindedirler. Apoptozun indüklenmesi ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonu, kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanır. Kaspazlar protein substratları içindeki benzersiz bir 4 amino asit sekansını tanıyan sistein proteazlarıdır (Savitskaya Ma 2015). Kaspazların aktive edilebileceği üç yolak vardır. Yaygın olarak tarif edilen iki başlangıç yolağı, apoptozun intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü) yolaklarıdır. Her iki yolak da en sonunda ortak bir yola ya da apoptozun yürütme aşamasına yol açar. Daha az bilinen bir üçüncü başlangıç yolu, iç

endoplazmik retikulum yolu olarak bilinir. Aktif kaspazlar, birçok hayati hücrel proteini ayırır; nükleer iskeleti ve hücre iskeleti parçalanır. Ayrıca nükleer DNA'yı daha da bozan DNAaz'ı aktive ederler (Anita ve ark. 2014).

Kaspazlar genel anlamda 2 gruba ayrılabilir:

Başlatıcı Kaspazlar: Kaspaz 2, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Kaspaz 10

Yürütücü (efektör) Kaspazlar: Kaspaz 3, Kaspaz 6, Kaspaz 7 (Savitskaya Ma 2015)

Kaspaz 3: apoptozun nispeten geç aşamalarında aktif hale gelen ve hem intrinsik hem de ekstrinsik yolda rol alan efektör kaspazdır. Kaspaz 9 ile aktif hale gelmekte ve hücreyi apoptoza sürüklemektedir (Zlobovskaya ve ark. 2016).

Kaspaz 8: ekstrinsik yola için başlatıcı kaspazdır. Kaspaz 8'in hedefi mitokondriyel olup mitokondriden Sitokrom C'nin sitozole salınmasına neden olur. Kaspaz 8 DNA yapılarını degrade ederek doğrudan olarak apoptoza yol açar ve aynı zamanda ekstrinsik yolda Kaspaz 3'ü aktif bir formuna dönüştürür (Lan ve ark. 2017).

Kaspaz 9: intrinsik yola için başlatıcıdır ve efektörkaspaz olan Kaspaz 3'ün belirli kısımlarını keserek aktif formuna dönüştürür (Timucin ve Basaga 2017).

2.2.1.2. Bcl-2 Ailesi

B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesi, apoptozisin kilit düzenleyicileri olarak görev yaparlar. Bunlar, ağırlıklı olarak kritik karar noktası olan, sitokrom c salınımının düzenlendiği mitokondri üzerinde bulunurlar (Opferman ve Kothari 2018). Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyel apoptoz yolağının temel düzenleyicileridir. Bcl-2 ailesi üyeleri intrinsik yolda protein membran ve protein-protein etkileşimlerine aracılık ederek apoptozun düzenlenmesinde rol alırlar (Chipuk ve ark. 2004). Bcl-2 protein ailesi, proapoptotik ve antiapoptotik olmak üzere 25 üye içerir. Hücre sağkalımı bu proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye bağlıdır. Denge bozulduğu takdirde hücre ölümü tetiklendiğinde dış mitokondriyel zardeki proapoptotik efektör proteinlerin oligomerizasyonu, mitokondriyel dış zar geçirgenliğine ve sitokrom c salımına yol açar. Bu, hücre ölümüne yol açan substratları parçalayan kaspaz kaskatlarının aktivasyonunu tetikler ve hücre apoptoza sürüklenir (Opferman ve Kothari 2018). Tüm Bcl-2 üyelerinin

yerleri dış mitokondriyal zar üzerindedir. Bcl-2 ailesi üyeleri, bir iyon kanalı formunda bulunarak gözeneklerin oluşturulması yoluyla membran geçirgenliğinden sorumlu olan dimerlerdir (Anita ve ark. 2014). Bcl-2 ailesinin antiapoptotik ve proapoptotik proteinleri arasındaki denge, sağlıklı hücrelerde mitokondride bulunan apoptojenik proteinlerin salınımı ile düzenlenmektedir (Vela ve Marzo 2015).

Bcl-2 protein ailesi üyeleri bir veya daha fazla Bcl-2 domain homoloji (BH) alanı içerirler. İşlevleri ve içerdikleri homoloji etki alanlarına göre Bcl-2 ailesi üyeleri üç gruba ayrılmaktadırlar (Şekil 2.5). Dört Bcl-2 domain alanı içeren üyeler Bcl-2, MCL-1, A1/Bfl-1, Bcl-B/Bcl2L10, Bcl-W ve Bcl-xL'dir (Czabotar ve ark. 2014). İkinci grup sadece BH-3 proteinlerinden oluşur, bu nedenle diğer üyelere kıyasla BH3 alanı ile sınırlıdır. Bu grubun üyeleri Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk ve Bik şeklinde sıralanmaktadır. DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve endoplazmik retikulum stres gibi hücrel stres zamanlarında apoptozun başlatıcısı olarak BH3 only proteinleri aktive olurlar. Bu nedenle proapoptotiktirler. Üçüncü grubun üyeleri dört BH alanının tümünü içerir ve ayrıca proapoptotiktir. Bu grubun üyeleri Bax, Bak ve Bok/Mtd.'dir (Anita ve ark. 2014).



Şekil 2.5. Bcl-2 domain (BH) alanı

2.2.1.3. Antiapoptotik Bcl-2 Proteinleri

Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-B, Bcl-W antiapoptotik Bcl-2 protein ailesi üyeleridir (Vela ve Marzo 2015). Bcl-2, Bcl-xL (Bcl-ekstra uzun), A1, Bcl-W, Bok (Bcl-2 ile ilişkili yumurtalık katili) ve Mcl-1 (miyeloid hücre lösemi-1). Bunlar, dört BH domain (BH1, BH2, BH3 ve BH4) etki alanlarını içeren multidomain proteinlerini temsil etmektedirler. Antiapoptotik proteinler ayrıca mitokondrial dış zar (Mitochondrial outer membrane: MOM), ER (Endoplazmik Retikulum) veya nükleer membranlar dahil membranlarla birleşmeyi sağlayan bir transmembran alanı (TM) içerirler (Krajewski ve

ark. 1993, Kroemer ve ark. 2007). Antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin temel biyolojik fonksiyonlarından biri proapoptotik üyeleri inhibe ederek mitokondriyal zar bütünlüğün bozulmasını önlemektir (Dorsi ve ark. 2017). Antiapoptotik üyeler apoptozu inhibe ederek hücre sağkalımını sağlarlar. Bcl-xL, proapoptotik etkileşimleri protein-protein etkileşimleri yoluyla inhibe ederek apoptozu bloke eden antiapoptotik gendir (Czabotar ve ark. 2014).

Bcl-2: Bcl-2 geni ilk kez B hücreli foliküler lenfomada klonlanmış bir onkogen olmakla birlikte mitokondrinin dış membranında yer almaktadır. Bcl-2 proteini antiapoptotik proteinlerden olması sebebiyle aşırı ekspresyonu apoptozu engellemektedir (Vaux ve ark. 1988, Tunç ve ark. 2004).

2.2.1.4. Proapoptotik Bcl-2 Proteinleri

Proapoptotik Bcl-2 protein aile üyeleri BH3 alanını içerip içermediklerine göre ve birden fazla BH alanına sahip olmalarına göre iki alt gruba ayrılmaktadırlar. Birden fazla BH alanına sahip efektör proteinler; Bak, Bax, Bok ve tekli korunmuş BH3 alanına sahip Bim, Puma, Noxa, Bid, vb. şeklinde gruplandırılmaktadırlar (Opferman ve Kothari 2018). Bak ve Bax mitokondriyal yolakta önemli bir role sahip olarak sitokrom c'nin salınımını gerçekleştirirler. Bax, öncelikle monomerik bir protein olarak hücrede bulunur ve mitokondriyal dış zarın sitoplazmik tarafında yer alır. Hücreden apoptotik sinyal aldıktan sonra, Bax'taki konformasyonel değişim, C terminal hidrofobik alanının açığa çıkmasına ve ardından mitokondriyal membrana ve oligomerizasyonuna bağlanmaya neden olur. Apoptotik uyarılara bağlı Bak aktivasyonu, Bax genine benzer işlev görmektedir (Timucin ve Basaga 2017).

Bax: Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax), Bcl-2'nin aksine, stres uyarıcılarına cevap olarak apoptozu tetikleyen Bcl-2'nin homolog bağlanma proteini olarak tanımlanmıştır. Bax, sitokrom c'nin sitozole geçişini sağlayarak apoptozu inhibe etmektedir (Edlich 2018).

2.2.1.5. BH3-only Proteinler

“BH3-only” proteinleri çeşitli çevresel uyarılar aracılığıyla veya büyüme

sinyalleri aracılığıyla düzenlenirler ve hücrel homeostazda önemli bir rol oynarak hücrel stresin nöbetçileri olarak homeostazı dengede tutarlar (Doerflinger ve ark. 2015). Bu protein ailesi üyeleri ölüm sinyallerinin entegratörü olarak görev yapan güçlü apoptoz indükleyicileridir (Vela ve Marzo 2015). "BH3-only" proteinleri mitokondriyal apoptotik yolun temel başlatıcıları olarak kabul edilmektedirler (Doerflinger ve ark. 2015). "BH3-only" proteinleri farklı dokuz amino asitlik homolog BH3 bölgesini içerirler. Mutasyonel analizler, bu bölgenin proteinlerin Bcl-2 benzeri hayatta kalma proteinlerine bağlanma veya apoptozu başlatma kabiliyeti için gerekli olduğunu göstermiştir. Memelilerde, BH3 only 8 tane proteini tanımlanmıştır. Bunlar Bim (Bcl-2 inhibitör molekülü), Bad (Bcl-2 ile ilişkili ölüm promotörü), Bmf (Bcl-2 değiştirici faktör), Bid (BH3 etkileşimli-domain ölüm agonisti), Noxa (hasar, zarar), Bik (Bcl-2 etkileşimli Bcl-2 etkileşimli öldürücü protein), Bak (Bcl-2 homolog antagonist katili), Puma (p53 apoptoz düzenleyici) ve Hrk (Hara-kiri) (Glab ve ark. 2017). BH3-only protein ailesi apoptozisin başlatılması için esastır ve proapoptotik efektör proteinleri Bax/Bak proteinlerinin doğrudan veya dolaylı olarak nötrleştirilmesiyle bağlanması ve aktive edilmesinde rol alarak hücreyi apoptozise sürüklerler (Margaroli ve ark. 2016).

2.2.1.6. p53

p53 proteini, 53 tümör proteini (veya TP53) olarak da bilinmektedir. 17. kromozomun kısa kolunda bulunan tümör baskılayıcı gen TP53 tarafından kodlanan tümör baskılayıcı proteinlerden biridir. Sahip olduğu moleküler ağırlığından dolayı (53 kDa) adlandırılmaktadır. İlk olarak 1979'da p53 proteini Simian virüsü 40 (SV40)'ın T antijenine sıkıca bağlanmış bir şekilde keşfedilerek kanser hücrelerinin çekirdeğinde biriken hücrel bir protein olarak tanımlanmıştır. Başlangıçta zayıf onkogenik olduğu bulunmuştur. Ancak daha sonra yapılan araştırmalarda onkogenik özelliğin bir p53 mutasyonundan veya daha sonra "onkogenik fonksiyon kazancı" olarak adlandırılmasından kaynaklandığı keşfedilmiştir. Yapılan birçok araştırma, p53'ün keşfinden bu yana fonksiyonu ve kanserdeki rolünü araştırmayı amaçlamıştır. p53 apoptozun indüksiyonunda rol oynayan bir proteindir. Ayrıca hücre döngüsünün düzenlemesiyle hücre büyüme, farklılaşma, gen amplifikasyonu, DNA rekombinasyonu, kromozomal degradasyon ve hücrel yaşlanma da rol alması dolayısıyla "genomun koruyucusu" olarak adlandırılan

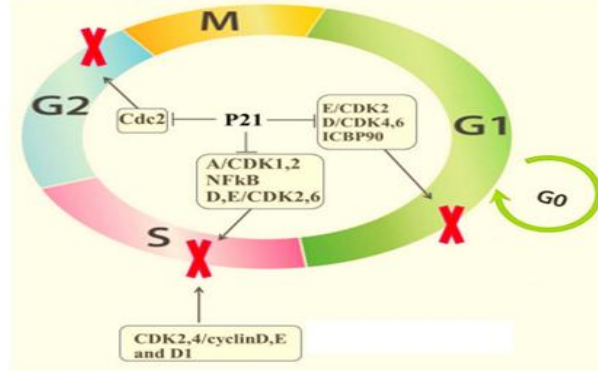
önemli bir rol oynamaktadır. İnsan kanserlerinin %50'den fazlası, p53 tümör baskılayıcı gendeki mutasyonlara bağlanmıştır (Anita 2014). p53 gen mutantının susturulması durumunda, mutant p53 ekspresyonunun bu tür aşağı regülasyonunun, insan kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonuna bağlı olduğu tespit edilerek hücre koloni büyümesinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Muller ve Vousden 2014). Tümör baskılayıcı p53'ün temel fonksiyonları, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozun uyarılması şeklinde sıralanmaktadır. Etkin rolü, hedef genlerin ekspresyonunu aktive ederek veya azaltarak transkripsiyon faktörü görevi görmektir (Fischer ve ark. 2016).

Fonksiyonel p53 sağlıklı hücrede sitoplazmada bulunur ve hücre stresine bağlı olarak çeşitli kinazların doğrudan veya dolaylı olarak fosforilasyonunun ardından çekirdeğe yer değiştirir. Fosforile edilmiş nükleer p53 bir tetramer oluşturur ve Fas, Bax, Bim, Noxa ve Puma gibi hem ölüm reseptörüne hem de mitokondriyal yollara aracılık eden çeşitli proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu destekleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür (Liu ve ark. 2017).

2.2.1.7. p21

p21, hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynayan genlerin ifadesinde, DNA onarımında ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir işleve sahiptir. p21'in p53 ile düzenlenen bir hücre döngüsü inhibitörü olarak keşfedilmesinden bu yana 20 yıldan fazla bir süre geçmiştir. p21 ilk önce bir tümör baskılayıcı ve sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olarak keşfedilmiş ancak daha sonra hücre ölümü, DNA replikasyonu/onarımı, gen transkripsiyonu ve hücre motilitesi gibi diğer önemli hücre işlevlerine de katıldığı bulunan siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörüdür (Dutto ve ark. 2015). p53, p21'in ana transkripsiyonel regülatörüdür. DNA hasarı ve oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli stresler, p53 aktivitesini yükseltir ve p53 aktivitesinin yükselmesi p21 ekspresyonuna neden olur. p21 proteini bazı CDK/Siklin komplekslerini inhibe ederek hücre siklusunun durmasına neden olur. p21'ler, CDK'larla etkileşime geçerek hücre döngüsünü durdurmanın yanı sıra doğrudan DNA replikasyonunu da inhibe ederler. p21 siklin A/CDK2, E/CDK2, D1/CDK4 ve D2/CDK4 kompleksine bağlanır ve bu nedenle pRB proteininin fosforilasyonunu inhibe eder. p21'in DNA hasarı üzerine p53 ile uyarılması,

siklin E/CDK2'yi inhibe ederek hücrenin G1/S evresine geçişini inhibe eder (Karimian ve ark. 2016) (Şekil 2.6).

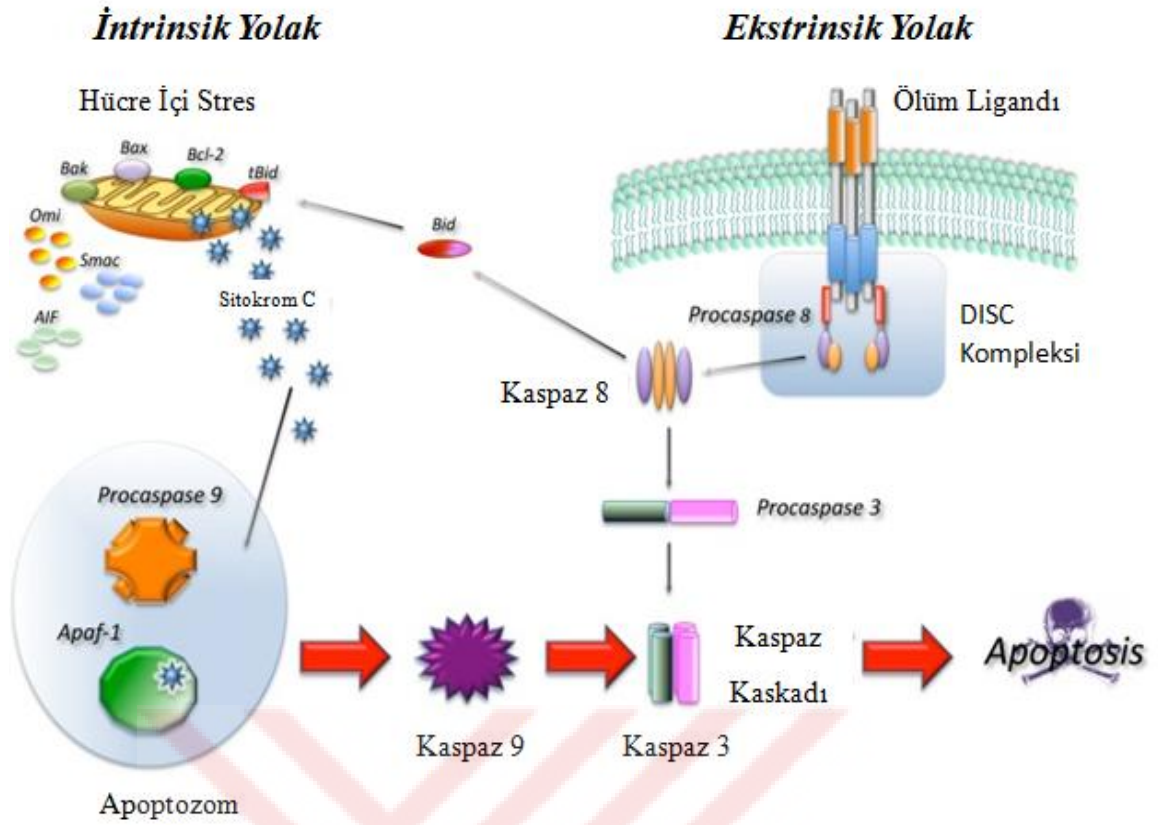


Şekil 2.6. Hücre döngüsünün p21 aracılığıyla düzenlenmesi (Karimian ve ark. 2016)

Yapılan çalışmalarla, p21'in antikanserojen etkisi ve tümörlerin tanınmasında anahtar bir role sahip olduğu ortaya koyulmuştur. Apoptozun inhibisyonu, p21'in en iyi bilinen onkogenik fonksiyonudur (Prives ve Gottifredi 2008, Karimian ve ark. 2016).

2.2.3. Apoptoz Mekanizmaları

Memelilerde tanımlanmış iki merkezi apoptotik yolak vardır: ekstrinsik yolak (ölüm reseptörü aracılı yol) ve intrinsik yolak (mitokondriyal aracılı yol) (Şekil2.7). Ayrıca, bu iki yolağın yanı sıra apoptozda, endoplazmik retikulum stresi (ER) tarafından aktive olan Kaspaz 12 veya Kaspaz 2'nin başlatıcı bir rolü dahil olmak üzere az bilinen başka kaspaz aktivasyon yolları da vardır (Goldar ve ark. 2015).



Şekil 2.7. Apoptoz mekanizmaları (Favaloro ve ark. 2012)

2.2.3.1. İntrinsik Yolak

Mitokondriyal yol olarak da adlandırılan intrinsik yolak, apoptozisin indüklenmesi için iç mitokondriyal zardaki değişiklikleri kullanır (Timucin ve Basaga 2017). Bir dizi sinyal molekülü mitokondriyal membran geçirgenliğinde bir artışa neden olur. Hipoksi, sitokin yoksunluğu, genetik hasar, yüksek sitozolik kalsiyum iyonları konsantrasyonu, aşırı oksidatif stres gibi faktörler, mitokondriyal geçirgenliğin artması ile sonuçlanan intrinsik yolağın aktivasyonunun başlatılmasını tetikler (Anita 2014). Bu farklı stresörler, MOM permeabilizasyonu ile biten, mitokondriye sinyal gönderen birkaç hücre içi protein tarafından tanınmaktadır. MOM permeabilizasyonuna Bcl-2 protein ailesinin çeşitli proapoptotik ve antiapoptotik ajanlar aracılığıyla eder (Chipuk ve Green 2006). Bcl-2 protein ailesi, 25 proapoptotik ve antiapoptotik üye içerir; hücre sağlığı bu proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye dayanmaktadır. Antiapoptotik

proteinler, sitokrom c'nin mitokondriyal zardan geçişini bloke ederek apoptozu düzenlerken, proapoptotik proteinler sitokrom c'nin sitozole salınmasına etki ederek apoptozu tetiklerler. İntrinsik yolak, Bax ve Bak'ın aktivasyonundan kaynaklanan mitokondriyal dış membran geçirgenliğini içermektedir (Margaroli ve ark. 2016). Mitokondriyal intermembran alandan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler arasında apoptoz indükleyici faktör (AIF), kaspazın ikinci mitokondri türevli aktivatörü (Smac), Düşük pI (DIABLO) ve Omi/yüksek sıcaklık gereksinimi proteinli doğrudan IAP bağlanma proteini bulunur. Sitokrom c'nin sitoplazmik salınımı, sitokrom c, Apaf-1 ve Kaspaz 9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşumu yoluyla Kaspaz 3'ü aktive eder. Apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörü, daha sonra, IAP'lerin Kaspaz 3 veya Kaspaz 9 ile etkileşiminde bozulmaya neden olur. Aktivasyondan sonra, Kaspaz 9 efektör kaspazlarını Kaspaz 3, Kaspaz 6 ve Kaspaz 7'yi ayırır ve aktive eder, bu da hücre yıkımına neden olur (Margaroli ve ark. 2016). Aktif forma gelen efektör kaspazlar, sitozolde bulunan ICAD (inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease-CAD'ın inhibitörü)'ü inaktifleştirir. İnaktif forma gelen ICAD, hücre de normal haldeyken bağlı bulunduğu CAD (Caspase activated deoxyribonuclease) dan ayrılır. Serbest kalan CAD, nukleusa girerek kromatin yoğunlaşması ve DNA kırıklarının oluşmasını sağlayarak hücrenin apoptoza gitmesine neden olur (Anita 2014).

2.2.3.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik ölüm reseptörü yolağı, ölüm ligandlarının bir ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Bu yolakta temel olarak ligand-reseptör etkileşiminin ardından reseptöre bağlanan bir adaptör içerir (Timucin ve Basaga 2017). Ekstrinsik yoldan apoptotik sinyal, hücre dışı ligandların, örneğin, tümör nekroz faktörü (TNF), Fas ligandının (Fas-L) ve TNF ile ilişkili apoptoz-indükleyen ligandın (TRAIL) transmembran reseptörlerinin ligandına bağlanması ile başlar. Ligandın reseptöre bağlanmasından sonra, ölüm reseptörleri, Fas-ilişkili ölüm alanı (FADD) ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) gibi adaptör proteinlerinde hücre içi ölüm alanı ile ilgili protein motifiyle bağlanır. Bu bağdaştırıcı proteinleri ayrıca ölüm efektör bölgesi (DED) olarak adlandırılan başka bir protein etkileşim alanına sahiptir. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi bağdaştırıcı proteinleri ve

ayrıca Kaspaz 8 gibi sistein proteazlarını bağlayan hücre içi bir ölüm alanına sahiptir (Lan ve ark. 2017). Ölüm ligandının reseptörüne bağlanması, bir adaptör proteini için bir bağlanma bölgesi oluşumu ile sonuçlanır ve tüm ligand-reseptör-adaptör proteini kompleksi, ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinir. Prokaspaz 8 ayrıca FADD'nin DED'i ile etkileşime giren bir dizi de içerir. Bu sırada prokaspaz 10 ve prokaspaz 8'in otomatik katalitik aktivasyonuna yol açan bir ölüm azaltıcı sinyal kompleksi (DISC) geliştirilmiştir. DISC aracılığıyla Kaspaz 8 ve Kaspaz 10 aktif hale gelir. Aktif Kaspaz 8 ve Kaspaz 10, çekirdeğin ve diğer hücre içi yapıların zarar görmesi veya tahrip olması sonucu hücre ölümüne neden olan efektör/yürütücü Kaspaz 3, Kaspaz 6 ve Kaspaz 7'yi aktive eder (Goldar ve ark. 2015). Kaspaz 8, mitokondriden sitokrom c'nin sitozole salınmasına neden olur. Sitokrom c'de proenzim halindeki etkili kaspazlara bağlanır ve Kaspaz 8 varlığında etkili kaspazların aktifleşmesine neden olur. Kaspaz 8 bir DNA parçalama enzimidir; DNA yapılarını degrade ederek doğrudan apoptozise yol açar ve aynı zamanda Kaspaz3'ü aktif bir formuna dönüştürür (Lan ve ark. 2017). Aktifleşen kaspazlar da hücreyi ölüme götürür. Sitokrom c'nin salınımıyla prokaspaz 9'u aktif formu olan Kaspaz 9 formuna çevirmesiyle prokaspaz 3'ü aktif formu Kaspaz 3'e dönüştürerek nükleik asitlerin bozunmasıyla hücreyi apoptoza sürükler (Wong 2011).

Bid, 22 kDa ağırlığında alfa-heliks yapısında bir proteindir. Bid, proapoptotik olan Bax'a benzer bir şekilde, apoptozun başlangıcında sitozolden mitokondriye taşınır (Gahl ve ark. 2016). Ölüm reseptörü aracılığıyla Bid aktif konformasyonu tBid'e dönüştürebilir. Bu aktivasyon Bcl-2 ve Bcl-xL'nin antiapoptotik etkisini inhibe ederek mitokondri yolağını tetikler. Aktive edildiğinde, Bax ve Bak dimerize olarak mitokondri zarından sitokrom c'nin salınmasına neden olarak DNA'nın parçalanmasına, Kaspaz 9 ve Kaspaz 3'ü aktive edilmesini sağlar. Daha sonra apoptotik downstream kaskatı tetiklenir, DNA parçalara bölünür ve apoptotik cisimler oluşarak hücre apoptoza gider (Lan ve ark. 2017).

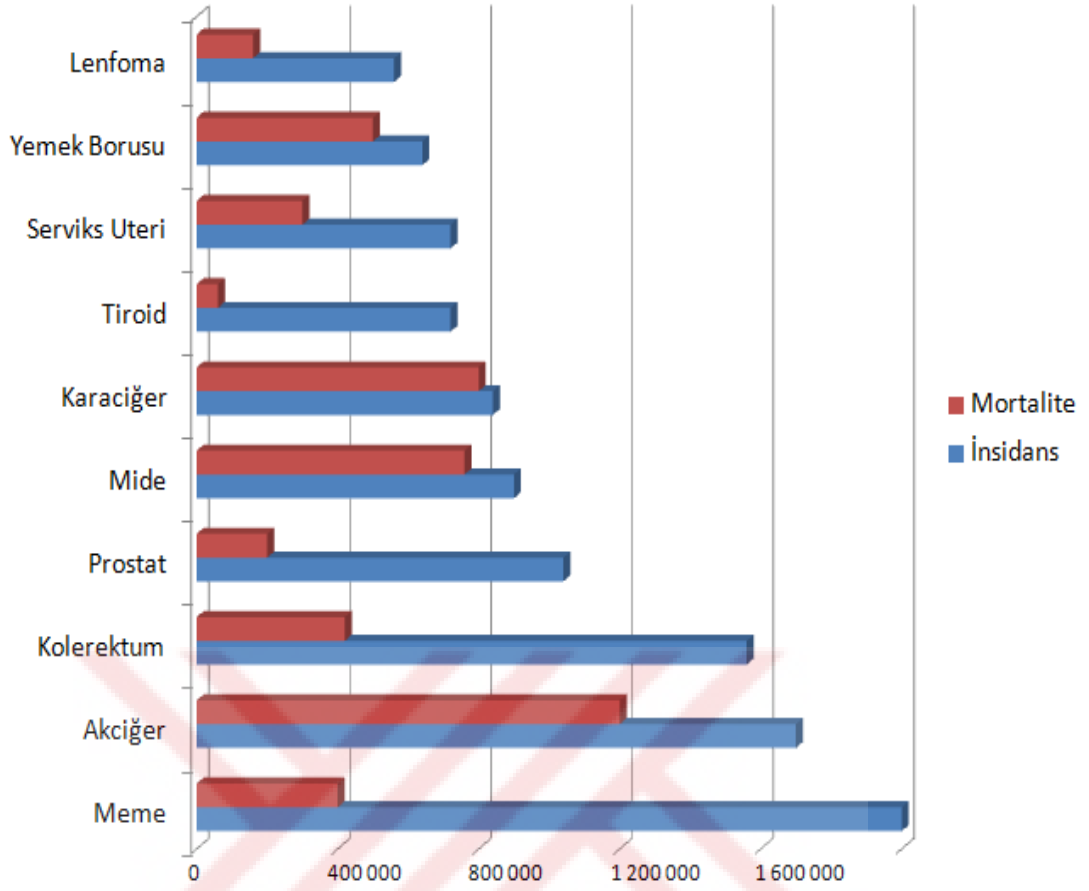
2.2.4. Kanser ve Apoptoz

Kanser, somatik mutasyonların birikimiyle hücrenin motilitesinin bozulmasıyla genlerin ve sinyal yollarının moleküler fonksiyonların da meydana gelen değişiklikler sonucunda hücrelerin kontrolsüz olarak normal olmayan biçimde çoğalmasıdır (Ahmed ve ark. 2006). Kanser, yüzyılın sorunu olup gittikçe artan mortalite ve insidansa sahip dünya

çapında büyük bir halk sağlığı sorunudur (Zugazagoitia ve ark. 2016) (Şekil 2.8). Kanser oluşumu son derece karmaşık bir olay olmakla birlikte kanseri tetiklediği belirlenen birçok iç ve dış etken bulunmaktadır (Bayık 1989).

Kanser tedavisi, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi bir veya daha fazla müdahalenin dikkatlice seçilmesini ve uygulanmasını gerektirmektedir. Kanser tedavisinde en çok kullanılan yöntem olan kemoterapi aktif olarak bölünen ve büyüyen hücrelere etki etmektedir. Kemoterapi kanser hücresinin yanı sıra sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Kemoterapi bu sağlıklı hücrelere zarar verdiğinde yan etkiler meydana gelir (Urruticoechea ve ark. 2010). Bu nedenle, kemoterapide kullanılan etken maddelerin yeni hedeflenen ilaç geliştirmedeki önemli gelişmelere ve uyarlanmış klinik olarak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Mohammad ve ark. 2015).

Apoptoz, homeostazın dengelenmesinde kalite kontrol görevi gören immün reaksiyonlarda veya hasar görmüş hücrelerin yok edilmesinde savunma rolü oynamaktadır (Fuchs ve Steller 2011, Liu ve ark. 2017). Apoptoz, hücreler stres altındayken ortaya çıkar; normalde, otofaji apoptozdan önce gelir ve hücre homeostazını korur. Apoptoz veya diğer programlanmış hücre ölümü tipleri, stres kritik bir süre boyunca uzadığında veya yoğunluk eşiğini aştığında aktive olur (Liu ve ark. 2017). Kanser öncesi lezyonlar gibi stresli koşullar altında, DNA hasarı kontrol noktası yolunun aktivasyonu, kanserojen ajanlarını bloke etmek için apoptoz indüksiyonu yoluyla potansiyel olarak zararlı DNA hasarlı hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Hassan ve ark. 2014). Kanserde, hücreler kontrolsüz çoğalmaya yol açan apoptoza bağlı ölüme maruz kalma yeteneklerini kaybederler. Kanser hücrelerinin sıklıkla apoptotik kaskadın aktivasyonuna direnmede önemli rol oynayan birçok proteini aşırı eksprese ettiği bulunmuştur. Birkaç mekanizma, antiapoptotik genlerin aşırı ifadesi ile hücrelerin programlanmış hücre ölümünden kaçmasına sağlamaktadır (Mohammad ve ark. 2015).



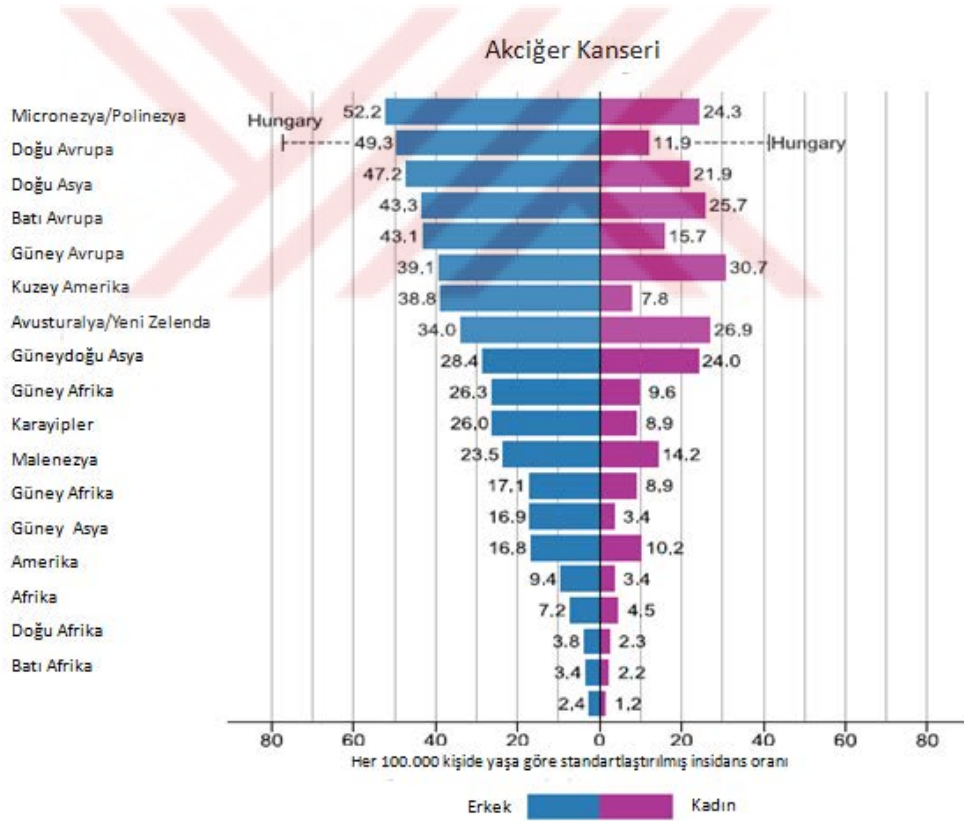
Şekil 2.8. Her iki cinsiyette 0-74 yaş aralığındaki tahmini kanser çeşitlerinin mortalite ve insidans verileri (GLOBOCAN 2018 kanser verileri)

2.2.4.1. Akciğer Kanseri ve Apoptoz

Akciğer kanseri, dünya çapında en sık rastlanan malign kanser türüdür (Rivera ve Wakelee 2016). Her yıl yaklaşık olarak 1.8 milyon kişiye akciğer kanseri teşhisi konmakta ve hastalığın 1.6 milyonu ölümlle sonuçlanmaktadır (Ferlay ve ark. 2015, Hirsch ve ark. 2017). Akciğer kanseri histolojik olarak sınıflandırıldığında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC: non-small-cell lung cancer) ve küçük hücreli (SCLC: small-cell lung cancer) akciğer kanseri olmak üzere iki türe ayrılmaktadır (Liu ve ark. 2017). İnsidans ve ölüm oranlarına bakıldığında akciğer kanseri tüm dünyada kanser türleri arasında ilk sırada yer almaktadır ve bu oranlar her yıl artma eğilimindedir (Şekil 2.9). Akciğer kanserinde son 5 yılda sağkalım oranı ortaya konulduğunda bu oran sadece %16'dır. Bu nedenle

akciğer kanserinin etiyolojisi, önlenmesi, teşhisi ve tedavisi üzerine yapılan araştırmalar önemlilik arz etmektedir (Li ve ark. 2018). Akciğer kanseri, dünya çapında kanser insidansı ve mortalitesinin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir (Zugazagoitia ve ark. 2016).

Apoptoz normal olmayan, kontrolsüz büyüyen ve DNA hasarı bulunan hücreleri ortadan kaldırmaya yönelik bir mekanizmadır. Ancak bu mekanizma kanser hücrelerinde görülen mutasyonlar sebebiyle devre dışı bırakılmıştır (Fernald ve Kurokawa 2013). Kanser hücreleri böylelikle kendilerini koruma altına alıp sağkalımlarını sağlayarak proliferasyonlarına devam ederler. Akciğer kanseri malign tümör olması sebebiyle proliferasyonu diğer kanser türlerine kıyasla daha hızlı olmaktadır. Ölüm oranı en yüksek olan akciğer kanserinin proliferasyonun önlenmesi ve mekanizmasının anlaşılması amacıyla yapılan çalışmalar akciğer hastalığının önlenmesinde ve tedavisinde büyük önem arz etmektedir (Sethi ve ark. 1999).



Şekil 2.9. 2018'de Akciğer Kanserinin Bölgesel Spesifik Gelişimine İlişkin Cinsiyete ve Yaşa Göre Standartlaştırılmış Oranları (GLOBOCAN 2018, Bray ve ark. 2018)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar aşağıdaki çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı (Laboratuvar, Araç, Makine- Teçhizat vb.)	Cihazın Markası	Mevcut Olduğu Kurum/Kuruluş	Çalışmada Kullanım Amacı
Biyogüvenlik kabini (sınıf 2)	Thermo, HeraSafe KS Class II	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Hücre kültürü ve steril ortam gerektiren deneysel çalışmaların yapılması
CO ₂ inkübatörü	NuAire NU-5830	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Hücre Kültürü Uygulamaları
Faz-kontrast ışık mikroskobu	(Nikon, TS100)	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Hücre kültürlerinin, büyüme ve kontaminasyon açısından gözlenmesi
Işık mikroskobu	(Nikon, Eclipse E200- Novel,N-120)	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Hücre sayımı uygulamaları
Derin dondurucu (-80 C°)	Wisd B	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Hücre supernatanlarının ve diğer biyolojik numunelerin saklanması
Derin dondurucu (+4 C°,-20 C°)	Bosh	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Sarf malzemelerin saklanması
Mikro santrifüj	Hettich soğutuculu	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Örneklerin santrifüj işlemi
Santrifüj	Hettich soğutuculu	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Hücre dizilerinin hazırlanması ve diğer örneklerin santrifüj işlemi
Vortex karıştırıcı	IsoLab Dragon	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Numunelerin karıştırılması
Spin		Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Numunelerin bir araya toplanması
Hassas terazi	OHAUS, Pioneer PA214C	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Deneyde kullanılacak kimyasalların ve propolisin tartılması
Spektrofotometre	Thermo Scientific, Multiscan GO	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	MTT Analizinin yapılması
Evaporatör	Heidolph, Hei-VAP Advantage	Mustafa Kemal Üniversitesi Organik Kimya AD	Propolisin hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirilmesi
Thermal Cycler	Biorad, T100	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	cDNA Temini
Q Real Time PCR cihazı	Qiagen Rotor-Gene	Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD	Gen ekspresyon analizleri

3.2. Kimyasallar

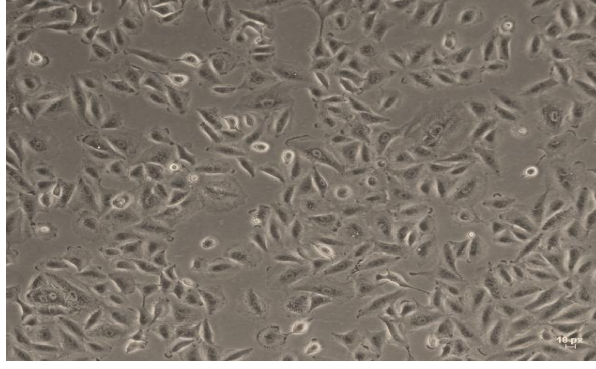
Çalışmada kullanılan kimyasallar aşağıdakiçizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2.Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasalın Adı	Kimyasalın Markası	Çalışmada Kullanım Amacı
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1X) (DMEM)	Gibco	Hücrelerin büyümesini sağlayacak ortam olması
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco	Hücrelerin büyümesini sağlayacak proteinleri barındırması
Hank's Balanced Salt Solution (1X) (HBSS)	Gibco	Hücreleri yıkama solüsyonu
Trypsin/EDTA (1X)	Gibco	Hücreleri buldukları ortamdaki başka bir ortama kaldırmak
Penicilin (10.000 Units/ml)/ Streptomycin (10.000 µl/ml)	Gibco	Hücreyi oluşabilecek herhangi mikroorganizmadan korumak
3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5 - diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma	Hücre canlılığını belirlemeyi sağlayan belirteç
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma	Propolisi çözdürmek ve MTT analizleri

3.3. Hücre Kültürü

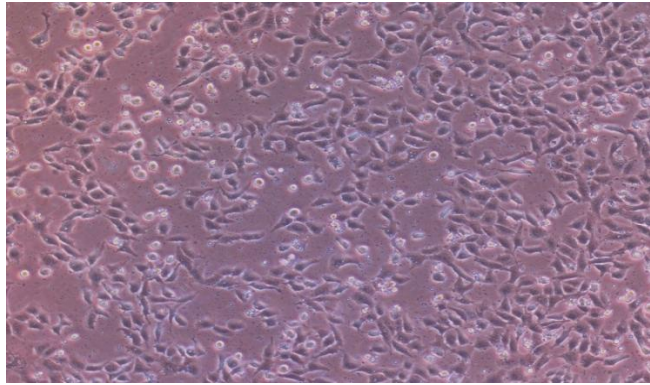
Deneylerde A549 hücre hattı kullanıldı (A549 hücre hattı Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında mevcuttur). A549 hücre hattı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak da isimlendirilen insan alveolar bazal epitelyum hücresi kaynaklı bir hücre hattıdır (Şekil 3.1). A549 hücreleri %10 fetal sığır serumu (FCS), 2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco Modifiye Edilmiş ortamda (DMEM, Gibco, Invitrogen), 175 cm²'lik kültür 'flask'larında %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C koşullarındaki etüvde kültüre edildi. Kültür ortamı haftada en az iki kez değiştirilerek ve hücreler %70-80 konfluense ulaştıklarında deneylerde kullanıldı.



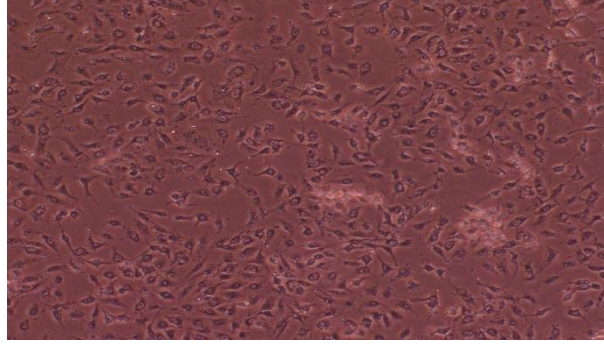
Şekil 3.1. A549 hücrelerinin ışık mikroskobu ile görünümü

3.4. Propolis Dozlarının Hazırlanması

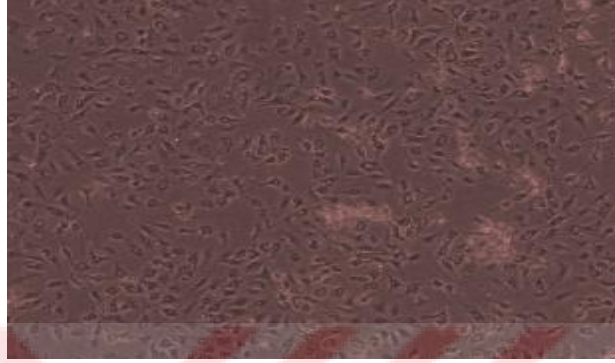
Çalışmada kullanılacak propolis Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü'nden temin edildi. Propolis 125, 62.5, 31.25, 15.625 ve 7.8125 µg/ml dozlarda %1 oranında DMSO (Dimethyl Sulfoxide, SİGMA) içeren serumsuz besiyeri içerisinde hazırlanarak deneylerde kullanıldı. Dimetil sülfoksitin %1 oranındaki konsantrasyonunun nonsitotoksik olduğunu ve yaptığımız çalışmayı etkilemediği yapılan MTT testi ile saptandı. Çalışmada kullanılan %1 oranındaki DMSO konsantrasyonu hazırlanan 1000 µg/ml konsantrasyona sahip propolis dozunda bulunarak bu oran her dilue oranında yarıya düşmektedir.



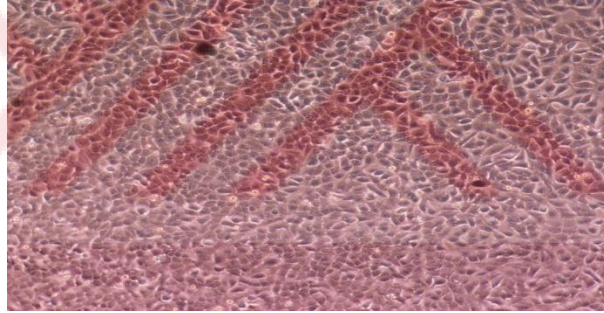
125 µg/ml propolis dozu



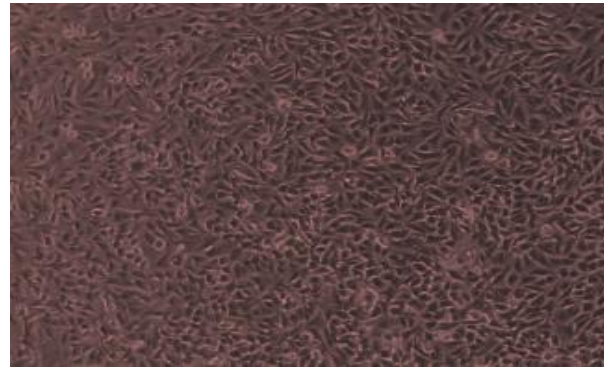
62.5 µg/ml propolis dozu



31.25 µg/ml propolis dozu



15.625 µg/ml propolis dozu



7.81 µg/ml propolis dozu

Şekil 3.2. Sırasıyla 125, 62.5, 31.25, 15.625 ve 7.8125 µg/ml dozlarda propolis uygulanan A549 hücrelerinin ışık mikroskobu ile görünümü

3.4.1. Propolis Temini ve Kimyasal Kompozisyonları

Hatay ilinden toplanan propolis örnekleri toz haline getirildi. 300 g toz propolis tartıldı. 300 g propolis %70 etanol/suçözeltisi ile çözdürülerek %30 oranında propolis ekstraktı elde edildi. Elde edilen ekstrakt iyice vorteksenerek homojen hale gelmesi sağlandı. Homojen hale gelen propolis ekstraktı hücre kültürü deneylerinde kullanılacak forma gelmesi için 50-55 °C' de dakika da 45 rpm hıza sahip buharlaştırıcı da (evaporatör) 36 saat sürekli olarak çalkalandı ve içerisindeki alkolün buharlaşması sağlandı (Mendonca ve ark. 2015). Böylece propolis hücre kültürü deneylerinde kullanılacak forma getirildi.



Şekil 3.3. Evaporatör (Heidolph, Hei-VAP Advantage)

Hatay bölgesinden toplanılan propolis örnekleri Yıldırım ve ark. tarafından etanol içerisinde çözdürülerek HPLC-DAD yöntemi ile 1.2 mL/dakika akış hızında analiz edilerek içeriği bildirilmiştir (Yıldırım ve ark. 2016). HPLC-DAD yöntemi, uçucu olmayan bileşiklerin analizinde tercih edilen yöntemdir.

Çizelge 3.3. Propolisin içerdiği bileşenlerin miktarı (Yıldırım ve ark. 2016)

Fenolik bileşikler	İçerik %(µg/g)
Gallik Asit	8.5
Protocatechuic Asit	42.5
(±)-Catechin	80.7
Kafeik Asit	5756.8
Şınga Asidi	84.7
Epigalokateçin	200.8
P-Kumarik Asit	1207.3
Trans Ferulik Asit	1792.9
Benzoik Asit	3588.9
M-Kumarik Asit	35.2
Trans İzofेरulik Asit	3391.9
Viteksin	Belirlenmemiş
Ellagik Asit	Belirlenmemiş
Rutin	Belirlenmemiş
Metil Şınga	Belirlenmemiş
Naringin	Belirlenmemiş
3-4 Dimetoksisinamik Asit	6646.0
Quercetin	Belirlenmemiş
Mirisetin	538.3
Rosmarinik Asit	Belirlenmemiş
Trans-Sinamik Asit	2665.7
Daidzein	462.8
Luteolin	2164.4
Pinobanksin	6043.5
(±)-Naringenin	563.6
Apigenin	3270.9
Kaempferol	2767.6
Isorhamnetin	Belirlenmemiş
Chrysin	22480.0
Pinocembrin	8265.1
Galangin	28772.8
Caffeic Acid Phenethyl Ester	20072.9
Emodin	Belirlenmemiş
Trans-Chalcon	Belirlenmemiş

3.5. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (MTT)

Propolisin hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için tetrazolium tuzu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide'un (MTT) testi yapıldı. MTT testinin sonucunda çalışmamızda kullanılacak doz belirlendi. Bu yöntem MTT

solüsyonu ile inkübe edilen hücrelerde meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Hücrelerin canlılığı tetrazolium tuzu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide'un (MTT) bir çözünmez formazan boyasına metabolik aktivitenin bir göstergesi olan mitokondriyal enzimler tarafından indirgenmesi esasına dayanan, bu şekilde canlı hücre sayısını belirlememizi sağlayan bir yöntemdir. MTT testi için hücreler, 24 kuyucuklu 'plate'lere %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyeri ortamında ml'sinde 1×10^5 hücre olacak şekilde ekimi yapıldı ve %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sağlayan inkübatör koşullarında inkübe edildi. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra, hücrelerin üzerine %10 FBS içeren vasatın yerine serumsuz vasat eklenerek 24 saat süreyle %5 CO₂ ve 37°C sağlayan inkübatör koşullarında inkübe edildi. Hücreler 24 saatin sonunda 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125µg/ml Propolis ile 24 saat süreyle muamele edildi. 24 saatin sonunda MTT protokolü uygulandı;

Gerekli olan her 1 ml için 1 mg MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich, USA) birleşigi tartıldı ve MTT solüsyonu hazırlanarak sonikatörde 2-3 dk bırakıldı. 24 kuyucuklu 'plate'deki mevcut sıvı ortam vakumlanarak her bir kuyuya 500 µl MTT solüsyonu eklendi. Hücreler 1 saat % 5 CO₂ ve 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bittiğinde plate içindeki MTT solüsyonu döküldü. Her bir kuyuya 0,5 ml dimethyl sulphoxide (DMSO) eklendi ve 3-5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Her kuyucuktan 2 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu 'plate' e 100 µl eklendi. Renkteki değişim spektrofotometre ile 590 nm'de 670 nm referans dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucunda %canlılık ve %inhibisyon oranları belirlendi. Tüm deneyler 3 set olarak çalışıldı.

Aşağıdaki formüller kullanılarak %canlılık ve %inhibisyon oranları belirlendi.

- Hücrenin %canlılık oranı= $(100 \times \text{Uygulanan propolis dozun optik dansitesi}) / \text{Kontrol grubun optik dansitesi}$
- Hücre canlılığının %inhibisyonu= $100 - (\%canlılık oranı)$

MTT sonuçları sonrasında hücre ölümünü tetikleyen ilk doz (15.625 µg/ml) propolisin antikanserojen etkisinin incelenmesinde apoptoz mekanizmalarını araştırmak için seçilmiştir.



Şekil 3.4. Spektrofotometre (Thermo Scientific,GO)

3.6. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için hücreler 6 kuyucuklu 'plate'lere %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyeri ortamında ml'sinde 1×10^5 hücre olacak şekilde ekimi yapıldı ve %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sağlayan inkübatör koşullarında inkübe edildi. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini %70-80 konfluense ulaştıktan sonra, hücrelerin üzerine %10 FBS içeren ortamın yerine serumsuz vasat eklenerek 24 saat süreyle %5 CO₂ ve 37°C inkübe edildi. 24 saat sonra hücreler 15,625 µg/ml dozdaki propolis ile muamele edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra aşağıdaki protokol uygulanarak RNA izolasyonu yapıldı.

1. Hücreler tripsin yardımıyla kaldırıldı ve kalkan hücreler platede kalmamasına dikkat edilerek falkon tüpe toplandı ve 250 g 23°C'de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonunda sıvı kısım vakumlanarak her örneğe 1 ml PBS eklendi ve 5 dk 250 g 'de santrifüjlenerek besiyerinin iyice uzaklaşması sağlandı. Santrifüj sonunda PBS uzaklaştırıldı. Sonrasında RNeasy Mini Kit ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu yapıldı (Thermo Scientific, GeneJet RNA Purification Kit, Lithuania, Lot: 00720496).

2. Hücrelere 600 µl β-mercaptoethanol ilave edilmiş Lizis Buffer eklenerek 5-10 defa pipetaj yapıldı.
3. 360 µL etanol (%96-100) eklendi ve pipetleyerek örnek karıştırıldı.
4. Toplama tüpüne yerleştirilmiş olan GeneJET RNA saflaştırma kolonuna 700 µL lisat aktarılıp örnekler +4 °C'de $\geq 12000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi. Alt faz atıldı ve spin kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
5. GeneJET RNA saflaştırma kolonuna 700 µL Wash Buffer 1 (etanol ile desteklenmiş) eklendi ve +4 °C'de $\geq 12000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi. Alt faz atıldı ve arıtma kolonunu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
6. GeneJET RNA saflaştırma kolonuna 600 µL Wash Buffer 2 (etanol ile desteklenmiş) eklenerek +4 °C'de $\geq 12000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi. Alt faz atıldı ve arıtma kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
7. GeneJET RNA saflaştırma kolonuna 250 µL Wash Buffer 2 ilave edildi ve $\geq 12000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüjlendi. Alt faz çözeltisini içeren toplama tüpü atıldı ve GeneJET RNA saflaştırma kolonu steril bir 1.5 mL RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne alındı.
8. GeneJET RNA saflaştırma kolon membranının merkezine, nükleaz free water dan 50 µL eklenerek örnekler oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edildi. RNA'yı elute etmek için örnekler +4 °C'de $\geq 12000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda örnekler soğuk raga alınarak bundan sonraki işlemler uygulandı.

Multiskan Go cihazı ile elde edilen RNA'ların kalite ve konsantrasyonları belirlendi. Elde edilen RNA'lar 0.2 µg/µl olacak şekilde dilüe edildi ve cDNA sentezi için kullanıldı. Kalan stok RNA'lar ise -80°C' de saklandı.

3.7. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar 0.2 µg/µl olacak şekilde dilüe edilerek cDNA sentez kiti (High Capacity cDNA, Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Lithuania, Lot: 00709629) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları çizelge 3.4.'teki gibidir.

Çizelge 3.4.cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Miktar
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP	0.8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-Free Water	4.2 µl

Kit bileşenleri buz üzerinde çözdürüldü ve belirtilen oranlardaki bileşenler eklenerek cDNA sentez karışımı hazırlandı. Her bir örnek tüpüne 10 µL 2X RT mix karışımından eklendi. Daha sonra her bir örnek tüpüne 10 µL dilue RNA örneği eklenerek pipetaj yapıldı. Tüpler kısa süreli vortekslenip ardından spin yapılarak Thermal Cycler (T100,BİO-RAD) cihazına yerleştirildi ve reverse transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.5.Thermal Cycler (T100,BİO-RAD) cihazı çalışma programı.

Sıcaklık	Süre
25 °C	10 Dk
37 °C	120 Dk (2 Sa)
85 °C	5 Dk
4 °C	~

Elde edilen cDNA örnekleri üzerine 90 µl Nuclease-free su eklenerek dilüe edildi ve toplam 110 µl olan cDNA'lar -20°C'de saklandı.



Şekil 3.5. Thermal Cycler (T100,BİO-RAD)

3.8. Real Time PCR Analizi

QIAGEN Rotor-Gene Q, Germany cihazı kullanılarak Kaspaz 3 (Fw: 5'-CTTCTACAACGATCCCCTCTG-3', Rw: 5'-TGTGCTTCTGAGCCATGGGTG-3'), Kaspaz 8 (Fw: 5'-AGGGCTCAATTTCTGCCTAC-3', Rw: 5'-GGCACTGGCTGTTTGCTT-3'), Kaspaz 9 (Fw: 5'-GTCACAAGACCTTGACACCCG-3', Rw: 5'-ACCAGGTGGTCTAGGGGTTT-3'), Bcl-2 (QuantiTect Primer Assay Cat No: QT00025011, Lot No: 286236904), p21 (Fw: 5'-CCGAAGTCAGTTCCTTGTGG-3', Rw:5'-AGTACGGCCAGAGGTGTACG-3'), Bax (QuantiTect Primer Assay Cat No: QT00031192, Lot No: 286236902) ve Bid (QuantiTect Primer Assay Cat No: QT00077833, Lot No: 286236903) genleri ve 'ev' (housekeeping) geni β -aktin (Fw: 5'-TCAACACCCCAGCCATGTA-3', Rw: 5'-AGTACGGCCAGAGGTGTACG-3') (RT² qPCR Primer Assay QIAGEN, USA) genlerinin gen transkripsiyon düzeyleri Rotor Genecihazı kullanılarak (QIAGEN Rotor-Gene Q, Germany)'real time' PCR (qRT-PCR) yöntemiyle belirlendi. QRT-PCR verileri Δ Ct (comparative threshold) yöntemiyle analiz edildi ve muamele grubunun kat değişimleri (fold change) kontrol grubuyla karşılaştırılarak hesaplandı (W Pfaff 1997). β -aktin, apoptoz markerlarının ekspresyon seylerinin normalizasyonunda house keeping geni olarak kullanılmıştır. Tüm deneyler 3

set olarak çalışıldı.

Reaksiyon toplamda her örnek için 25 µl olacak şekilde olacak şekilde hazırlanarak QIAGEN Rotor-Gene Q cihazında gerçekleştirildi.

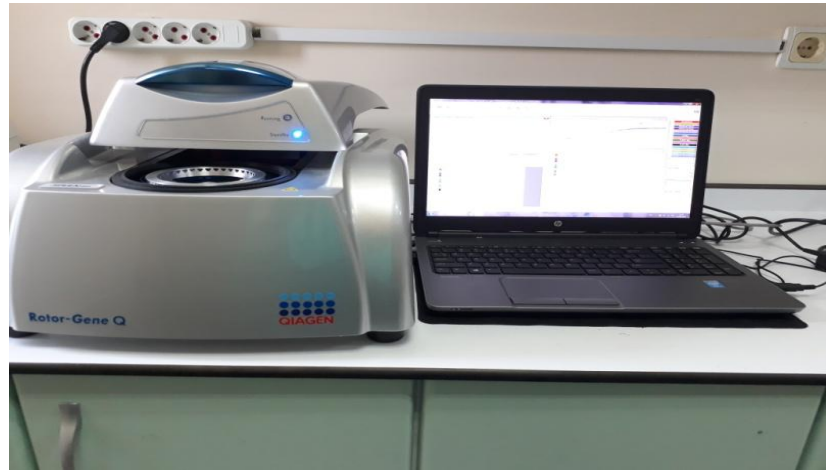
Çizelge 3.6. qRT-PCR reaksiyon karışım bileşen ve miktarları.

Bileşen	Miktar
Primer (10 µM stok) (QIAGEN, USA)	2 µl
qRT-PCR mixi (Power SYBR Green Pcr Master Mix, Applied Biosystems)	12.5 µl
cDNA	5 µl
Nuclease free water	5.5 µl

Çizelge 3.7. qRT-PCR reaksiyon koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
UDG pre-treatment	50 °C	2 Dk	1 Döngü
Initial denaturation	95 °C	10 Dk	1 Döngü
Denaturation	95 °C	15 Sn	40 Döngü
Anneling and extention	60 °C	1 Dk	40 Döngü

*UDG: Uracil-DNA glycosylase



Şekil 3.6. QIAGEN Rotor-Gene Q Cihazı

3.9. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın MTT analiz sonuçlarının belirlenmesi için GraphPad Prism Version 6.01 (GraphPad Software Inc., USA) programı kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı fark bulunup bulunmadığının saptanması için One way anova analizi yapıldı. Anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunun belirlenmesinde ise Dunn's Multiple Comparison Test kullanıldı. Her test grubukontrol grubu ile karşılaştırıldı ve $p < 0,05$ 'den küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi.

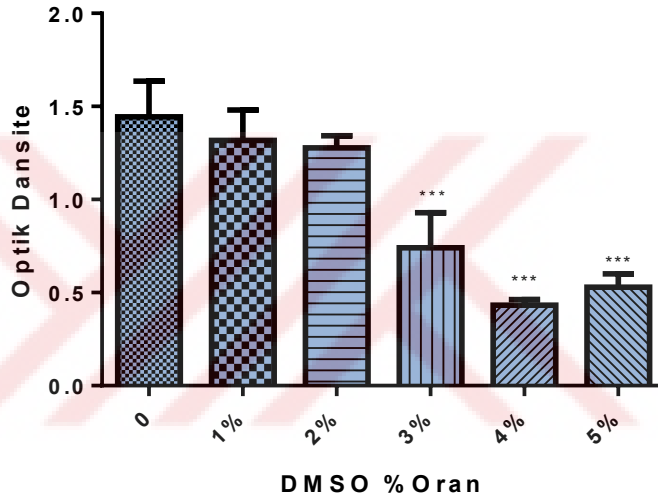
Gen ekspresyon verilerinin analizi RT² profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 ile yapıldı. β -aktin "housekeeping gen" olarak normalizasyonda kullanıldı. Gen ekspresyon değişimleri Fold change (kat değişimi) olarak ifade edildi.



4. BULGULAR

4.1. DMSO'nun Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Deneyde propolisi çözdürmek için kullanılacak olan DMSO'nun sitotoksik olmayan dozunun belirlenmesi amacıyla MTT testi yapıldı. DMSO'nun hücre canlılığına etkisi MTT yöntemiyle incelendiğinde 24 saatlik süre sonunda DMSO'nun artan % oranı ile birlikte A549 hücrelerinde hücre canlılığının azaldığı saptanmıştır. Bu nedenle istatistiksel olarak kontrol grubu hücreleri ile arasında anlamlı bir fark bulunmayan %1'lik DMSO oranı seçilerek propolis çözdürüldü.



Şekil 4.1. DMSO'nun A549 hücre canlılığı üzerine etkisi
(İstatistiksel anlamlılık * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 şeklinde ifade edilmiştir.)

Çizelge 4.1. %5-%1 DMSO oran aralıklarında % inhibisyon ve %canlılık oranları

DMSO Oranı	% Canlılık Oranı	%İnhibisyon
%5***	36,7043	63,2957
%4***	29,9361	70,0639
%3***	51,31	48,69
%2	88,51735	11,48265
%1	91,22567	8,77433
Kontrol (0)	100	0

İstatistiksel anlamlılık * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 şeklinde ifade edilmiştir.

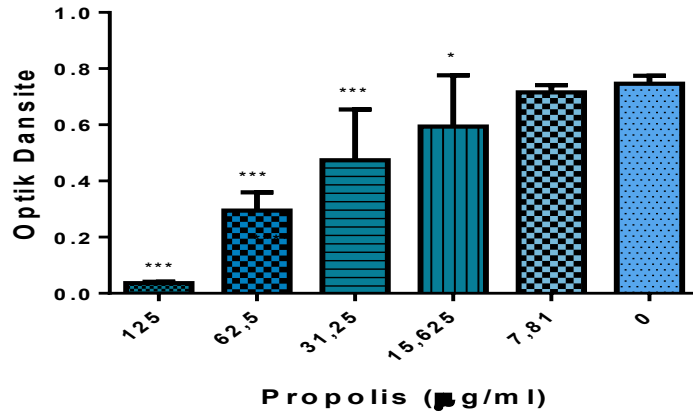
4.2. Propolisin (125 µg/ml-7,8125 µg/ml) Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında propolisin 125 µg/ml ve 7,8125 µg/ml konsantrasyon aralıklarındaki dozlarının hücre canlılığına etkisi MTT yöntemiyle incelendiğinde 24 saatlik süre sonunda propolisin artan dozları ile birlikte A549 hücrelerinde canlılığını azalttığı saptanmıştır.

Çizelge 4.2. 125 µg/ml-7.8125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında 'optik dansite' nin ortalama±standart sapma değerleri

Propolisin Konsantrasyonu	Optik Dansite Ortalama ± Standart Sapma	p Value
125 µg/ml	0,0362875 ± 0,004744	***
62.5 µg/ml	0,294263 ± 0,06499	***
31.25 µg/ml	0,473575 ± 0,1810	***
15.625 µg/ml	0,594063 ± 0,1822	*
7.8125 µg/ml	0,715650 ± 0,02592	-
Kontrol (0)	0,745900 ± 0,02862	-

İstatistiksel anlamlılık *<0.05, **<0.01, ***<0.001 şeklinde ifade edilmiştir. MTT testi ile elde ettiğimiz verilerin optik dansite ortalamalarının ± standart sapma değerlerinin 1'i geçmemesi tekrarlar arasındaki verilerin tutarlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.2. Propolisin 125 -7,8125µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücre canlılığı üzerine etkisi(İstatistiksel anlamlılık *<0.05, **<0.01, ***<0.001 şeklinde ifade edilmiştir.

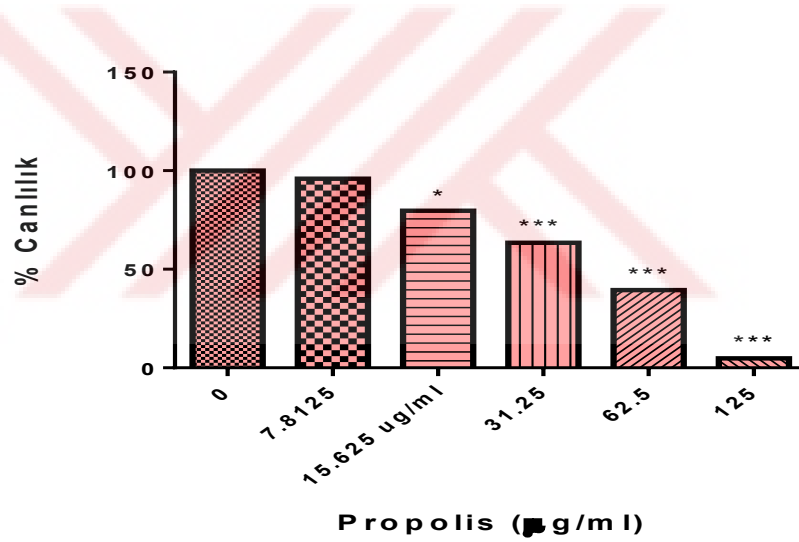
Propolisin 125 µg/ml ve 7.8125 µg/ml konsantrasyon aralıklarındaki dozlarının, A549 hücre canlılığı üzerine etkilerine bakıldığında; 24 saatlik maruziyet süresi sonunda,

125 ve 15.625 $\mu\text{g/ml}$ aralığındaki dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlenirken, 7.8125 $\mu\text{g/ml}$ doz da ise hücre canlılığını etkilemediği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3. 125 $\mu\text{g/ml}$ -7.8125 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon ve % canlılık oranları

Propolisin Konsantrasyonu	% Canlılık Oranı	% İnhibisyon	p Value
125 $\mu\text{g/ml}$ ***	4,864930	95,13507	<0,001
62.5 $\mu\text{g/ml}$ ***	39,45066	60,54934	<0,001
31.25 $\mu\text{g/ml}$ ***	63,49041	36,50959	<0,001
15.625 $\mu\text{g/ml}$ *	79,64372	20,35628	0,0337
7.8125 $\mu\text{g/ml}$	95,9445	4,0555	0,9730
Kontrol (0)	100	0	-

İstatistiksel anlamlılık *<0.05, **<0.01, ***<0.001 şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 4.3. A549 hücrelerinde Propolisin 125 $\mu\text{g/ml}$ -7.8125 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralıklarında % canlılık grafiği (İstatistiksel anlamlılık *<0.05, **<0.01, ***<0.001 şeklinde ifade edilmiştir.)

MTT testi sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; 24 saatlik süre sonunda A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında 125, 62.5, 31.25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki propolis dozlarında %95.13507, 60.54934, 36.50959 inhibisyon oranları ile hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskılandığı gözlemlendi. Daha düşük konsantrasyona sahip olan 15.625 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyona sahip propolis dozunda ise

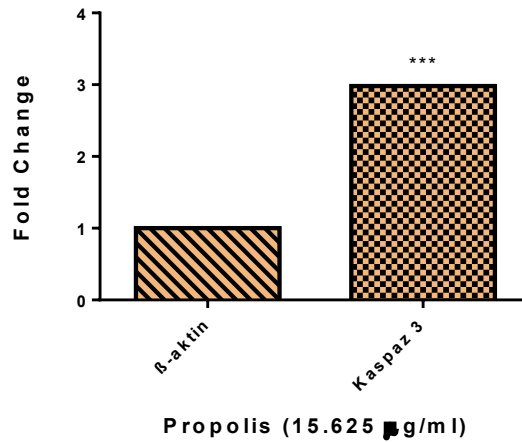
%20.35628 inhibisyon oranı ile hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik olduğu saptandı ($p<0,05$). 7.8125 $\mu\text{g/ml}$ 'lik propolis dozunun A549 hücre canlılığını etkilemediği gözlemlendi. Elde ettiğimiz bu veriler doğrultusunda hücre ölümünün ilk gerçekleştiği doz olan 15.625 $\mu\text{g/ml}$ 'lik propolis dozu A549 hücrelerine 24 saatlik süre ile uygulanarak apoptoz markerlarının değerlendirilmesi için kullanıldı.

4.3. Propolisin Apoptoz Mekanizmasında Rol Alan Genlerin Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Propolisin A549 kanser hücre hattındaki antikanserojen etkisini belirlemek amacıyla 15,625 $\mu\text{g/ml}$ propolis dozunun 24 saatlik muamelesi ile apoptotik markerlar incelendi.

4.3.1. Propolisin Kaspaz 3 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

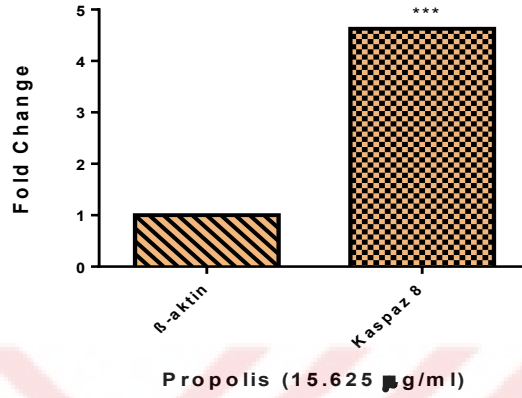
A549 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında propolisin 15.625 $\mu\text{g/ml}$ dozunda 24. saatte kontrol grubuna kıyasla Kaspaz 3 geninin ekspresyon seviyesinin 2.9 kat arttığı gözlemlendi ($p<0,001$). İstatistiksel anlamlılık $*<0,05$, $**<0,01$, $***<0,001$ şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 4.4. Propolisin (15.625 $\mu\text{g/ml}$) Kaspaz 3 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.2. Propolisin Kaspaz 8 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

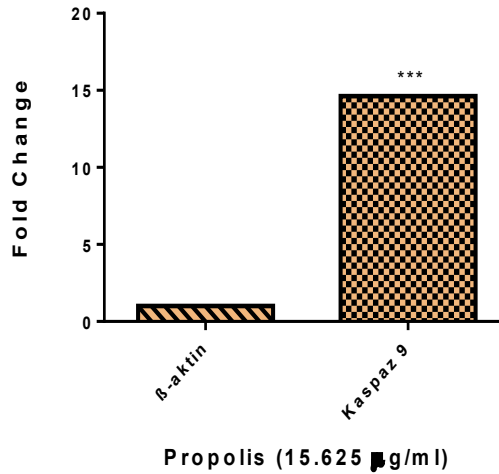
A549 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında propolisin 15.625 µg/ml dozunda 24. saatte Kaspaz 8 geninin ekspresyon seviyesinin 4.6 kat gözlemlendi ($p<0,001$). İstatistiksel anlamlılık $*<0.05$, $**<0.01$, $***<0.001$ şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 4.5. Propolisin (15.625µg/ml) Kaspaz 8 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.3. Propolisin Kaspaz 9 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

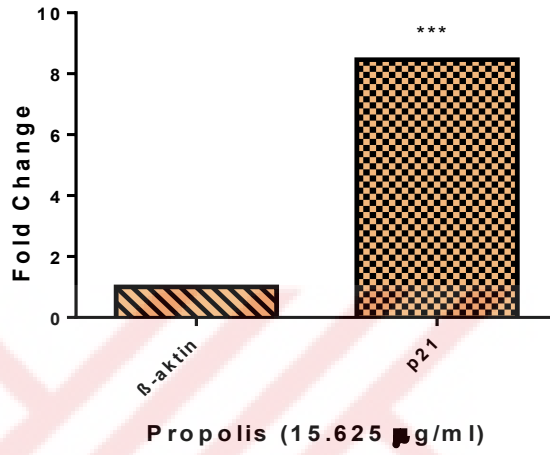
A549 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında propolisin 15.625 µg/ml dozunda 24. saatte Kaspaz 9 geninin ekspresyon seviyesinin 14.6 kat arttığı gözlemlendi ($p<0,001$). İstatistiksel anlamlılık $*<0.05$, $**<0.01$, $***<0.001$ şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 4.6. Propolisin (15.625µg/ml) Kaspaz 9 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.4. Propolisin p21 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

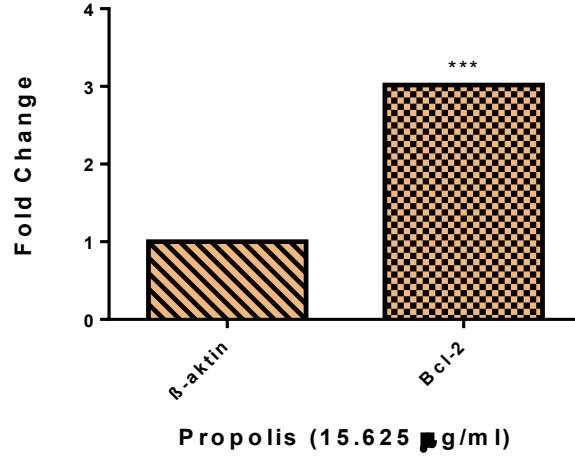
A549 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında propolisin 15.625 µg/ml dozunda 24. saatte p21 geninin ekspresyon seviyesinin 8.4 kat arttığı gözlemlendi ($p<0,001$). İstatistiksel anlamlılık $*<0.05$, $**<0.01$, $***<0.001$ şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 4.7. Propolisin (15.625µg/ml) p21 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.5. Propolisin Bcl-2 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

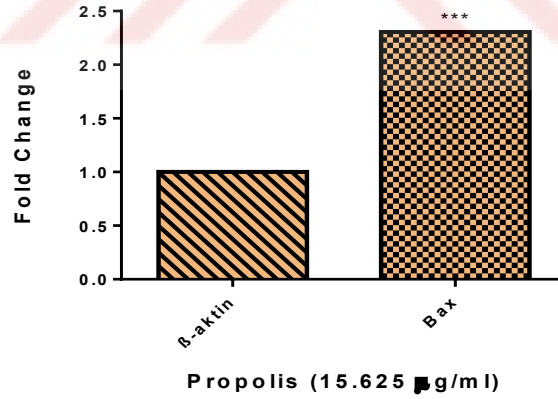
A549 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında propolisin 15.625 µg/ml dozunda 24. saatte Bcl-2 geninin ekspresyon seviyesinin 3 kat arttığı gözlemlendi ($p<0,001$). İstatistiksel anlamlılık $*<0.05$, $**<0.01$, $***<0.001$ şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 4. 8. Propolisin (15.625µg/ml) Bcl-2 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.6. Propolisin Bax Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

A549 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında propolisin 15.625 µg/ml dozunda 24. saatte Bax geninin ekspresyon seviyesinin 2.3 kat arttığı gözlemlendi ($p < 0.001$). İstatistiksel anlamlılık $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$ şeklinde ifade edilmiştir.

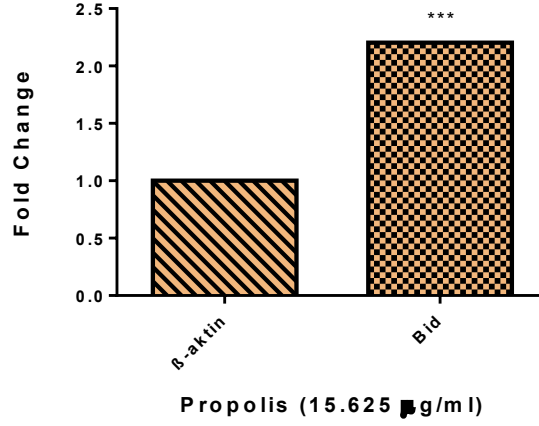


Şekil 4. 9. Propolisin (15.625µg/ml) Bax geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.7. Propolisin Bid Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

A549 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında propolisin 15.625 µg/ml dozunda 24. saatte Bid geninin ekspresyon seviyesinin 2.2 kat arttığı gözlemlendi

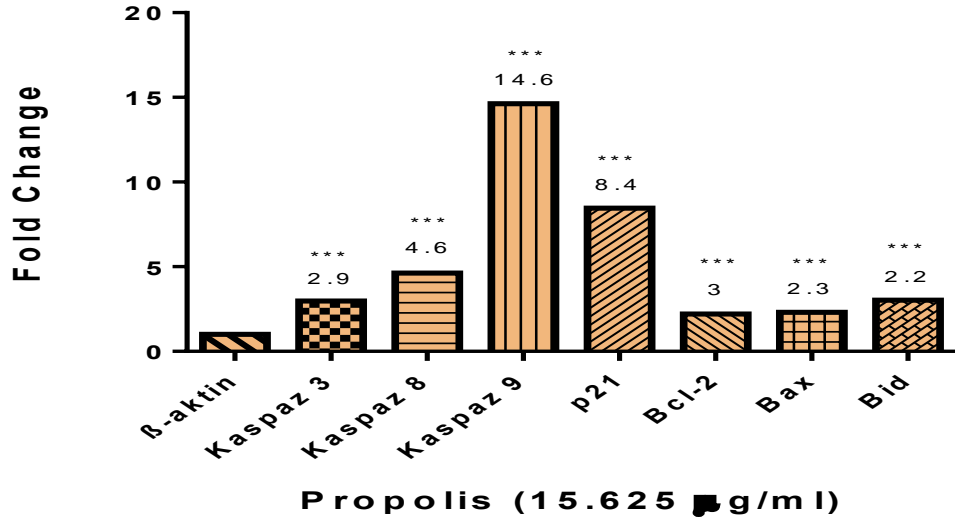
($p < 0,001$). İstatistiksel anlamlılık $* < 0,05$, $** < 0,01$, $*** < 0,001$ şeklinde ifade edilmiştir.



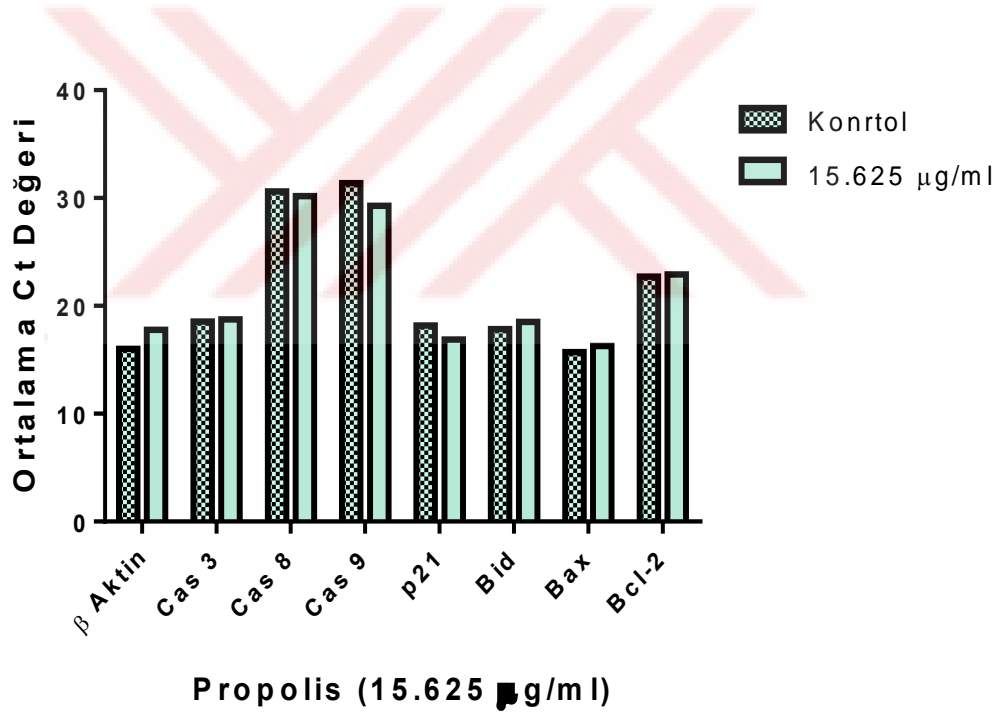
Şekil 4.10. Propolisin (15.625µg/ml) Bid geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.8. Propolisile Muamele Edilmiş A549 Hücrelerinde Apoptoz Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

A549 hücrelerinde Propolisin 15.625 µg/ml dozunda 24. saatte Kaspaz 3, Kaspaz8, Kaspaz 9, p21, Bcl-2, Bid ve Bax genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Bulgularımız neticesinde propolisin 15.625 µg/ml dozunun A549 hücrelerini 24. saatlik muamelesi sonucunda propolisin etkisiyle proapoptotik markerların seviyelerinin artarak hücrelerin hem ekstrinsik yolak hem de intrinsik yolak aracılığıyla apoptoza teşvik ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Propolisin (15.625 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması



Şekil 4.12. Apoptoz mekanizmasında rol alan genlerde kontrol grubu ve 15.625 µg/ml propolis konsantrasyon dozunun ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.4. Kontrol grubu ve 15.625 µg/ml propolis dozunun ortalama Ct±standart sapma değerleri

Genler	Kontrol Grubu Ort Ct±Standart Sapma	15.625 µg/ml propolis konsantrasyonu Ort Ct±Standart Sapma
β-aktin	16,02±0,230123	17,8±0,15426
Kaspaz 3	18,54±0,40777	18,75±0,39859
Kaspaz 8	30,61±0,630503	30,18±0,48357
Kaspaz 9	31,38±0,496369	29,3±0,77831
p21	18,18±0,529571	16,88±0,27019
Bid	17,86±0,907132	18,5±0,57499
Bax	15,72±0,517455	16,3±0,83279
Bcl-2	22,73±0,559731	22,92±0,15456

Ortalama Ct değerlerindeki ± standart sapma değerlerinin 1'i geçmemesi tekrarlar arasındaki tutarlılığı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, propolisin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırarak propolisin antikanserojen etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bubağlamda insan akciğer adenokarsinom hücresi olan A549 hücreleri, propolis ile 24 saat süreyle muamele edilerek propolisin apoptoz yolları üzerindeki etkileri araştırıldı. İlk olarak çalışılacak propolis dozunun belirlenmesi amacıyla MTT testi yapıldı ve sonrasında apoptotik yolda rol alan Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bid, Bax, Bcl-2 ve p21 genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi.

Kanser hücrede mutasyon sonucunda hücre homeostazisinin bozulması hücrenin normal olmayan biçimde çoğalmasıdır (Ahmed ve ark. 2006). Kanser dünya genelinde en yüksek ölüm oranına sahip olan sağlık sorunudur (Radogna ve ark. 2015). Akciğer kanseri ise dünya çapında yaygın şekilde görülen ve çok düşük hayatta kalma oranına sahip kanser çeşididir (Tauchi-Nishi ve ark. 2014). Akciğer kanserinin tedavisinde en çok kullanılan yöntem kemoterapidir. Ancak kemoterapi aktif olarak bölünen ve büyüyen hücrelere sitotoksik etki gösterebilmektedir (Mohammad ve ark. 2015, Cho 2017). Akciğer kanseri için güncel tedaviler yetersizdir ve bu nedenle yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Son zamanlarda bu hastalığın tedavisinde bitkisel ilaçlar etkin olarak kullanılmış ve yeni tedavi yöntem arayışlarına gidilmiştir (Frion-Herrera ve ark. 2015). Akciğer kanser tedavilerinin spesifikasyonlarından biri, tümör hücrelerinde apoptoz indüksiyonu ve hücre döngüsünün durmasıdır (Amini-Sarteshnizi1 ve ark. 2015).

Propolis, sahip olduğu farmakolojik etkiler sebebiyle, antik çağlardan itibaren birçok medeniyet tarafından pek çok hastalığa karşı tedavi amaçlı alternatif bir ilaç olarak kullanılmıştır (Zabaiou ve ark. 2017). Propolis ve içerdiği 300'den fazla bileşenin antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif, etkilerinin yanısıra antikanserojen aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Banskota ve ark. 1998, Birt ve ark. 2001, Vukovic ve ark. 2018). Propolis bileşenlerinin, hücre döngüsünün durması ve apoptozun indüklenmesi, matriks metaloproteinazlarının baskılanması, antiangiyojen, metastazın önlenmesi ve kemoterapi ile indüklenen yan etkilerin azaltılmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Kakehashi ve ark. 2016).

Propolis ile akciğer kanseri üzerine yapılan çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Bu nedenle çalışmamızda antikanserojen, antiproliferatif ve antiapoptotik etkilere sahip olduğu bildirilmiş olan propolisin A549 hücrelerinin üzerinde apoptotik etkisinin var olup

olmadığı, var olduğu gözlemlenirse apoptozun hangi apoptotik yolak üzerinden düzenlendiği belirlenerek, propolisin antikanserojen etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Daha önce propolis ile ilgili hücre hatlarıyla yapılan in vitro çalışmalarda; Brezilya yeşil propolisinin A549 hücrelerinin canlılığını etkileyen muamele miktarı $69,17 \pm 11,28$ $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuş ve artan propolis dozuyla birlikte $69,17$ $\mu\text{g/ml}$ 'de %55 ve $11,28$ $\mu\text{g/ml}$ 'de %18 olan inhibisyon oranları ile A549 hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra aynı çalışmada Brezilya yeşil propolisinin 100 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar ki dozlarında sağlıklı vero hücrelerinin canlılığını etkilenmediği gözlemlenerek propolisin tümör hücreleri için yüksek bir seçicilik sergilediği bildirilmiştir (Frion-Herrera ve ark. 2015). Propolisin etanolik ekstraktının, insan mesane kanseri hücreleri (Mcf-7) üzerindeki etkin dozu 95 g/mL olarak belirlenmiş (Begnini ve ark. 2014) ve 81.40 g/ml konsantrasyona sahip propolis dozunun Hela hücreleri üzerinde etken olduğu bildirilmiştir (Frozza ve ark. 2013). Hep-2 hücre hattında ise kırmızı propolisin etken dozunun 74.60 g/mL olarak belirlenerek artan propolis dozuyla birlikte hücrelerin morfolojilerinin değiştiği bildirilmiştir (Dos Santos ve ark. 2019). Bizim çalışmamızda ise yukarıdaki çalışmalarla uyumlu olarak propolisin artan doz ile birlikte sitotoksitesinin değiştiği gözlemlenmiştir. MTT testi sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; 24 saatlik süre sonunda A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında 125 , 62.5 , 31.25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyona sahip propolis dozlarında %95.13507, 60.54934, 36.50959 inhibisyon oranları ile hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskılandığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3). Daha düşük bir doz olan 15.625 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki propolis muamelesinde ise %20.35628'lik bir inhibisyon oranı saptanmış ($p < 0,05$), ilk hücre ölümünün görüldüğü doz olduğu için çalışmadaki uygulama dozu olarak seçilmiştir (Çizelge 4.3). $7,8125$ $\mu\text{g/ml}$ dozunda ise %4.055503 inhibisyon oranı ve %95.9445 canlılık oranları ile hücre canlılığında anlamlı değişiklik olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Daha önce bildirilen bu sonuçlar ile bizim sonuçlarımız arasındaki konsantrasyon farklılığının, propolisin içeriğinde bulunan biyoaktif bileşenlerinin elde edildiği bölgenin fitocoğrafik özelliklerine bağlı olarak farklılık göstermesinden (Bhargava ve ark. 2018) ve propolisin uyguladığımız formundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Farklı hücre hatlarında farklı özelliklere sahip olması yine uygulanan propolis konsantrasyonlarını etkilemektedir.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda çalışmamızın ikinci bölümü olan apoptozun saptanmasında kullanılacak olan uygun doz 15.625 µg/ml seçilerek 24 saatlik muamele süresiyle çalışmalar devam ettirilmiştir. 31.25 µg/ml ve üzerindeki dozlarda hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etkiler gözlemlendiği için bu dozlar çalışmada kullanılmadı (Çizelge 4.3). Hücre ölümünün ilk gerçekleştiği doz olan 15.625 µg/ml'lik propolis dozu A549 hücrelerine 24 saatlik süre ile uygulanarak gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesiyle apoptoz değerlendirilmiştir.

Apoptoz genlerinin gen ekspresyonu yöntemi ile elde ettiğimiz verilerimize göre; A549 hücrelerinde 15.625 µg/ml konsantrasyona sahip propolis dozunun 24 saatlik süre sonunda Kaspaz 3 geninin ekspresyon seviyesini 2.9 kat, Kaspaz 8 geninin ekspresyon seviyesini 4.6 kat, Kaspaz 9 geninin ekspresyonunu ise 14.6 kat, p21 geninin ekspresyon seviyesinin 8.4 kat, Bid geninin ekspresyon seviyesinin 2.2 kat, Bax geninin ekspresyon seviyesinin 2.3 kat ve Bcl-2 geninin ekspresyon seviyesinin ise 3 kat arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.11). Bu sonuçlar, intrinsik yolda rol alan Kaspaz 9'un artışını, ekstrinsik yoldan rol alan Kaspaz 8'in, Bid'in ve Bax'ın artışını tetikleyerek propolisin intrinsik yoldan ve ekstrinsik yoldan aracılığıyla A549 hücre hattında apoptoza neden olarak antikanserijen aktivite gösterdiğini düşündürmektedir (Şekil 4.11).

Sawicka ve arkadaşlarının insan lösemi HL-60 hücrelerinde yaptığı çalışmada propolis konsantrasyonuna bağlı bir şekilde Kaspaz 3'ün aktive edilmesiyle propolisin apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Sawicka ve ark. 2012). Brezilya dayalı propolisin A549 hücrelerinde apoptotik etkisinin incelendiği çalışmada ise Kaspaz 3 geninin ekspresyon seviyesinin değişmediği bildirilmiştir (Frion-Herrera ve ark. 2015). Bizim çalışmamızda da Sawicka ve arkadaşlarının bildirmiş olduğu sonuç ile uyumlu olarak Kaspaz 3 geninin gen ekspresyon seviyesi 2.9 kat artmıştır (Şekil 4.4). Kaspaz 3 geni hem intrinsik hem de ekstrinsik yolda yer alan efektör kaspazdır. Dolayısıyla Kaspaz 3 geninin artması bize propolisin A549 hücrelerini apoptoza teşvik ettiğini düşündürmektedir.

Türk propolisinin insan meme karsinomu hücre hattında (Mcf-7) kaspazların aktivasyonunun incelendiği çalışmada Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 genlerinin aktivasyonu hücrelerin intrinsik ve ekstrinsik yoldan aracılığıyla apoptoza sürüklendiği bildirilmiştir (Vatansever ve ark. 2010). Szliszka ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla propolisin antikanserijen etkisinin, kanser hücrelerinde hem intrinsik hem de ekstrinsik yoldan aktive

ederek apoptozu başlatma kabiliyeti olduğu bildirilmiştir (Szlizka ve ark. 2009). Bizim yapmış olduğumuz mevcut çalışmada da benzer şekilde, 15.625 µg/ml propolis dozunun etkisiyle Kaspaz 8 ve Kaspaz 9'un gen ekspresyon seviyesinin artması, A549 hücrelerinde, intrinsik ve ekstrinsik yolların her ikisinin kullanılmasıyla, apoptozu indüklemiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6).

Sarteshnizi ve arkadaşlarının İran propolisi ile yapmış oldukları bir çalışmada, AGS (gastrik kanser) hücre hattı üzerinde etanolik propolis ekstraktının antikanserojen aktivitesi araştırılmış ve propolisin siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan p21'in seviyesini arttırarak, hücre aktivitesinin durdurulmasını teşvik ettiği bildirilmiştir (Sarteshnizi ve ark. 2015). Aynı çalışmada p21'in uyarılması ile ilgili olarak, p21'in hücre döngüsünü durdurması sonucunda oluşan DNA hasarının giderilerek hücre döngüsünün devam edildiği ya da DNA hasarının onarılamayarak hücrenin apoptoza sürükleneceği bildirilmektedir (Dutto ve ark. 2015). Bizim çalışmamızda propolisin 15.625 µg/ml dozu A549 hücrelerinde p21'in ekspresyonunu 8.4 kat arttığı saptanmıştır (Şekil 4.7).

Mısır propolisinin PC3 prostat kanser hücreleri üzerindeki aktivitesinin incelendiği çalışmada propolisin etkisiyle Bax geninin ekspresyon seviyesinin artan propolis dozuyla ilişkili olarak arttığı bildirilmiştir (Salim ve ark. 2015). Brezilya'da yapılan bir çalışmada da propolisin A549 hücrelerinde Bax geninin ekspresyon seviyesini arttırdığı ve hücreleri intrinsik yolak üzerinden apoptoza sürüklediği bildirilmiştir (Frion-Herrera ve ark. 2015). İnsan lösemi HL-60 hücre hattında propolisin apoptotik etkisinin incelendiği bir çalışmada propolisin etkisiyle Bax geninin up regülasyonu hücreleri apoptoza teşvik ettiği bildirilmiştir (Chen ve ark. 2001). Bu çalışmalarla uyumlu olarak biz de mevcut çalışmada Bax geninin ekspresyon seviyesinde 2.3 katlık bir artış saptayarak apoptozun indüklendiği yönünde veriler elde ettik (Şekil 4.9). Ancak çalışmamızda aynı zamanda Kaspaz 8 artışında görülmesi, bu çalışmadan farklı olarak apoptozun hem intrinsik hem ekstrinsik yolak üzerinden indüklendiğini düşündürmektedir.

Yahima ve arkadaşlarının Brezilya yeşil propolisinin A549 hücrelerinde mitokondri aracılı yolak yoluyla apoptozu başlattığını inceledikleri çalışmalarında Brezilya propolisinin proapoptotik Bax seviyesini yükselttiğini ancak antiapoptotik Bcl-2 seviyesini değiştirmediğini bildirmişlerdir (Frion-Herrera ve ark. 2015). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu genellikle pek çok kanserle ve bununla birlikte kemoterapiye direnci ile ilişkili olduğu bildirilmektedir ancak, alveoler epitel hücrelerinde düşük seviyelerde eksprese edildiği

yapılan çalışma ile bildirilmiştir (Lu ve ark. 1996, Bojes ve ark. 1998). Muneo ve arkadaşları ise insan lösemik U937 hücreleri üzerinde propolisin konsantrasyonuna bağlı olarak Bcl-2 geninin down regülasyonu ile apoptozun inhibisyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir (Motomura ve ark. 2008). Propolisin antikanserojen etkisini araştırdığımız çalışmamızda yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak, şaşırtıcı bir şekilde Bcl-2 geninin ekspresyon seviyesi 3 kat artmıştır (Şekil 4.8).

Begnini ve arkadaşlarının Brezilya kırmızı propolisi (BRP) ile prostat kanseri 5637 hücre hattında yaptıkları çalışmada hem Bax hem de Bcl-2 genlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığını ve bu durumun da Bax ve Bcl-2'nin BRP'nin sitotoksik etkileri ile ilişkili olarak apoptotik oluşumunda yer alabileceğini düşündüğü sonucuna vardıklarını bildirmişlerdir (Begnini ve ark. 2014). Biz de çalışmamızda Begnini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla uyumlu olarak propolisin etkisiyle Bcl-2 ve Bax genlerinin arttığını saptadık (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Apoptoza dirençli olduğu bilinen adenokarsinomik insan alveol epitel hücresi olan A549'un Bcl-2 gen ekspresyonunu arttırarak apoptoz direnci göstermeye çalıştığını, ancak öte yandan proapoptotik genlerin ekspresyon seviyelerinin artışı ile galip gelen tarafın apoptoz olduğu düşünmekteyiz.

Yapılan literatür araştırmaları ve çalışmamızdan elde edilen veriler ışığında apoptotik dolayısıyla antikanserojenik etkilere sahip olan propolisin, yüzyılın en önemli sağlık sorunlarının başında gelen kanser tedavisinde, diğer birçok alanda olduğu gibi umut vaat eden bir teröpatik ajan olduğu sonucuna varılmaktadır.

Çalışmamızda; apoptotik hücrelerin ve gen ürünü olan protein düzeylerinin gösterilememesi temel kısıtlılıklar olarak sıralanabilir. İleriki çalışmalarda, daha ileri yöntemlerle apoptotik hücrelerin tespit edilmesi ve gen ürünlerinin Western Blot gibi yöntemlerle gösterilmesi planlanmaktadır. Ayrıca deney hayvanları ile yapılacak in vivo çalışmaların eklenmesiyle propolisin teröpatik etkilerinin daha iyi anlaşılabilceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Propolisin, A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırdığımız bu çalışmada; 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 µg/ml propolis dozları kullanıldı. MTT testi ile farklı propolis dozlarının hücre canlılığına etkisi saptandı. Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bcl-2, Bid, Bax ve p21 genlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi.

1. Propolisin 0-7.8125 µg/ml doz aralığında sitotoksik olmadığı ve propolisin 15.625-125 µg/ml doz aralığında sitotoksik olduğu tespit edildi.
2. 15.625 µg/ml'nin hücre ölümünün görüldüğü en düşük doz olduğu saptandı.
3. A549 hücrelerinde 15.625 µg/ml propolis muamelesi, intrinsik yolda yer alan proapoptotik Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve Bax genlerinin ekspresyon seviyelerini sırasıyla 2.9 kat, 14.6 kat ve 2.3 kat arttırmıştır.
4. A549 hücrelerinde 15.625 µg/ml propolis muamelesi, ekstrinsik yolda yer alan proapoptotik Kaspaz 8 ve Bid genlerinin ekspresyon seviyelerini sırasıyla 4.6 kat ve 2.2 kat arttırmıştır.
5. A549 hücrelerinde 15.625 µg/ml propolis muamelesi ile CDK inhibitörü olan p21 geninin ekspresyonu 8.4 kat artmıştır.
6. A549 hücrelerinde 15.625 µg/ml propolis muamelesi ile antiapoptotik Bcl-2 geninin ekspresyonu 3 kat artmıştır.
7. A549 hücrelerinde propolisin apoptozu intrinsik ve ekstrinsik yoldan aracılığıyla uyardığı belirlenmiştir.

Bu çalışma ile elde edilen bulgulara ilave olarak, sağlıklı bir hücre hattının eklendiği, apoptotik cisim oluşumunun daha ileri yöntemlerle tespit edildiği in vitro çalışmalar ile in vivo koşullarda deney hayvanlarıyla çalışmaların yapılması, propolisin apoptotik etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi açısından fayda sağlayacaktır. Sonuç olarak çalışmamızda Hatay bölgesinden toplanan propolisin A549 hücre hattında apoptozu indükleyerek antikanserojen etki gösterdiği saptanmıştır. Propolisin kanser tedavisinde doğal bir kemoteröpatik ajan olarak güçlü bir potansiyelinin olduğunu düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Ahmed, R. L., K. H. Schmitz, K. E. Anderson, W. D. Rosamond and A. R. Folsom** The metabolic syndrome and risk of incident colorectal cancer. *Cancer*. **2006**, **107**(1): 28-36.
2. **Amini-Sarteshnizi, N., M. M.-D. , S. K.-F. and H. T.** Anticancer activity of ethanolic extract of propolis on
3. AGS cell line. *Journal of HerbMed Pharmacology*. **2015**, **4**(1): 5.
4. **Anita, H. P. S., Paras Jain and Patnaik Amit** Apoptosis (Programmed Cell Death) -A Review. **2014**.
5. **Anna Kakehashi, N. I., Masaki Fujioka, Kenichiro Doi, Min Gi, Hideki Wanibuchi** Inhibition of Rat Tumorigenesis by Ethanol-Extracted Brazilian Propolis *plus one* **2016**: 15.
6. **B. Favaloro 1, N. Allocati 1 and V. G. , 2, C. Di Ilio 1, 2 and V. De Laurenzi 1,2,3** Role of Apoptosis in disease. *Acta Histochem*. **2012**, **4**: 20.
7. **Banskota, A. H., Y. Tezuka, J. K. Prasain, K. Matsushige, I. Saiki and S. Kadota** Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J Nat Prod*. **1998**, **61**(7): 896-900.
8. **Bayik, A.** Kanser Epidemiyolojisi. *Ege üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi - Dergipark*. **1989**, **5**(3): 15.
9. **Beatriz, C. B. S., D. Mello Miriam and Hubinger** Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. *International Journal of Food Science & Technology*. **2012**, **47**(12).
10. **Begnini, K. R., P. M. Moura de Leon, H. Thurow, E. Schultze, V. F. Campos, F. Martins Rodrigues, S. Borsuk, O. A. Dellagostin, L. Savegnago, M. Roesch-Ely, S. Moura, F. F. Padilha, T. Collares, J. A. Pegas Henriques and F. K. Seixas** Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. **2014**, **2014**: 639856.
11. **Bejarano, I., A. B. Rodriguez and J. A. Pariente** Apoptosis Is a Demanding Selective Tool During the Development of Fetal Male Germ Cells. *Front Cell Dev Biol*. **2018**, **6**: 65.
12. **Bhargava, P., A. Grover, N. Nigam, A. Kaul, M. Doi, Y. Ishida, H. Kakuta, S. C. Kaul, K. Terao and R. Wadhwa** Anticancer activity of the supercritical extract of Brazilian green propolis and its active component, artepillin C: Bioinformatics and experimental analyses of its mechanisms of action. *Int J Oncol*. **2018**, **52**(3): 925-932.
13. **Birt, D. F., S. Hendrich and W. Wang** Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*. **2001**, **90**(2-3): 157-177.
14. **Bojes, H. K., P. K. Suresh, E. M. Mills, D. R. Spitz, J. E. Sim and J. P. Kehrer** Bcl-2 and Bcl-xL in peroxide-resistant A549 and U87MG cells. *Toxicol Sci*. **1998**, **42**(2): 109-116.
15. **Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. **2018**, **68**(6): 394-424.
16. **Castaldo, S. and F. Capasso** Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. **2002**, **73 Suppl 1**: S1-6.
17. **Chang, H., W. Yuan, H. Wu, X. Yin and H. Xuan** Bioactive components and mechanisms of Chinese poplar propolis alleviates oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial cells injury. *BMC Complement Altern Med*. **2018**, **18**(1): 142.
18. **Chen, Y., M. Shiao, M. Hsu, T. Tsai and W. SY.** Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Antioxidant from
19. Propolis, on Inducing Apoptosis in Human Leukemic HL-60 Cells. *Agric. Food Chem*. **2001**, **4**(19): 5.
20. **Chipuk, J. E. and D. R. Green** Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*. **2006**, **13**(6): 994-1002.
21. **Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Drain, D. D. Newmeyer, M. Schuler and D. R. Green** Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. **2004**, **303**(5660): 1010-1014.
22. **Cho, J. H.** Immunotherapy for Non-small-cell Lung Cancer: Current Status and Future

- Obstacles. *Immune Netw.* **2017**, **17**(6): 378-391.
23. **Choudhari, M. K., R. Haghniaz, J. M. Rajwade and K. M. Paknikar** Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an in vitro study. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2013**, **2013**: 928280.
 24. **Coşkun, A. and H. Özgür** Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *dergipark.* **2011**, **20**(145): 13.
 25. **Czabotar, P. E., G. Lessene, A. Strasser and J. M. Adams** Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2014**, **15**(1): 49-63.
 26. **D'Orsi, B., J. Mateyka and J. H. M. Prehn** Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem Int.* **2017**, **109**: 162-170.
 27. **Demir, S., Y. Aliyazicioglu, I. Turan, S. Misir, A. Mentese, S. O. Yaman, K. Akbulut, K. Kilinc and O. Deger** Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutr Cancer.* **2016**, **68**(1): 165-172.
 28. **Diamantis, A., E. Magiorkinis, G. H. Sakorafas and G. Androutsos** A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Onkologie.* **2008**, **31**(12): 702-706.
 29. **Doerflinger, M., J. A. Glab and H. Puthalakath** BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *FEBS J.* **2015**, **282**(6): 1006-1016.
 30. **Dos Santos, D., F. Munari, C. da Silva Frozza, S. Moura, T. Barcellos, J. Pêgas Henriques and M. Roesch-Elya** Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. *Biotechnology Research and Innovation* **2019**.
 31. **Duque Parra, J. E.** Note on the origin and history of the term "apoptosis". *Anat Rec B New Anat.* **2005**, **283**(1): 2-4.
 32. **Dutto, I., M. Tillhon, O. Cazzalini, L. A. Stivala and E. Prosperi** Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch Toxicol.* **2015**, **89**(2): 155-178.
 33. **Edlich, F.** BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochem Biophys Res Commun.* **2018**, **500**(1): 26-34.
 34. **Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman and F. Bray** Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* **2015**, **136**(5): E359-386.
 35. **Fernald, K. and M. Kurokawa** Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* **2013**, **23**(12): 620-633.
 36. **Fischer, M., M. Quaas, L. Steiner and K. Engeland** The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* **2016**, **44**(1): 164-174.
 37. **Frion-Herrera, Y., A. Diaz-Garcia, J. Ruiz-Fuentes, H. Rodriguez-Sanchez and J. M. Sforcin** Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *J Pharm Pharmacol.* **2015**, **67**(10): 1448-1456.
 38. **Frozza, C. O., C. S. Garcia, G. Gambato, M. D. de Souza, M. Salvador, S. Moura, F. F. Padilha, F. K. Seixas, T. Collares, S. Borsuk, O. A. Dellagostin, J. A. Henriques and M. Roesch-Ely** Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol.* **2013**, **52**: 137-142.
 39. **Fu, B., J. Xue, Z. Li, X. Shi, B. H. Jiang and J. Fang** Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1alpha through reducing hypoxia-inducible factor-1alpha stability and inhibiting its protein synthesis. *Mol Cancer Ther.* **2007**, **6**(1): 220-226.
 40. **Fuchs, Y. and H. Steller** Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* **2011**, **147**(4): 742-758.
 41. **Gahl, R. F., P. Dwivedi and N. Tjandra** Bcl-2 proteins bcl-2 and bax form a network to permeabilize the mitochondria at the onset of apoptosis. *Cell Death Dis.* **2016**, **7**(10): e2424.
 42. **Ghisalberti, E. L.** Propolis: A Review. *Bee World.* **1979**, **60**(2): 59-84.
 43. **Glab, J. A., G. W. Mbogo and H. Puthalakath** BH3-Only Proteins in Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol.* **2017**, **328**: 163-196.
 44. **Goldar, S., M. S. Khaniani, S. M. Derakhshan and B. Baradaran** Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* **2015**, **16**(6): 2129-2144.
 45. **Graf, B. A., P. E. Milbury and J. B. Blumberg** Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food.* **2005**, **8**(3): 281-290.

46. **Hassan, M., H. Watari, A. AbuAlmaaty, Y. Ohba and N. Sakuragi** Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* **2014**, **2014**: 150845.
47. **Havsteen, B.** Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.* **1983**, **32**(7): 1141-1148.
48. **Hedgecock, E. M., J. E. Sulston and J. N. Thomson** Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science.* **1983**, **220**(4603): 1277-1279.
49. **Heo, M. Y., S. J. Sohn and W. W. Au** Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat Res.* **2001**, **488**(2): 135-150.
50. **Hirsch, F. R., G. V. Scagliotti, J. L. Mulshine, R. Kwon, W. J. Curran, Jr., Y. L. Wu and L. Paz-Ares** Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet.* **2017**, **389**(10066): 299-311.
51. **Jafarzadeh Kashi, T. S., R. Kasra Kermanshahi, M. Erfan, E. Vahid Dastjerdi, Y. Rezaei and F. S. Tabatabaei** Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. *Iran J Pharm Res.* **2011**, **10**(2): 363-368.
52. **Kabala-Dzik, A., A. Rzepecka-Stojko, R. Kubina, R. D. Wojtyczka, E. Buszman and J. Stojko** Caffeic Acid Versus Caffeic Acid Phenethyl Ester in the Treatment of Breast Cancer MCF-7 Cells: Migration Rate Inhibition. *Integr Cancer Ther.* **2018**, **17**(4): 1247-1259.
53. **Kaczanowski, S.** Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol.* **2016**, **13**(3): 031001.
54. **Kakehashi, A., N. Ishii, M. Fujioka, K. Doi, M. Gi and H. Wanibuchi** Ethanol-Extracted Brazilian Propolis Exerts Protective Effects on Tumorigenesis in Wistar Hannover Rats. *PLoS One.* **2016**, **11**(7): e0158654.
55. **Karimian, A., Y. Ahmadi and B. Yousefi** Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst).* **2016**, **42**: 63-71.
56. **Kundu, J. K. and Y. J. Surh** Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett.* **2008**, **269**(2): 243-261.
57. **Kuo, H. C., W. H. Kuo, Y. J. Lee, W. L. Lin, F. P. Chou and T. H. Tseng** Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* **2006**, **234**(2): 199-208.
58. **Lan, T., H. Zhao, B. Xiang, J. Wang and Y. Liu** Suture compression induced midpalatal suture chondrocyte apoptosis with increased caspase-3, caspase-9, Bad, Bak, Bax and Bid expression. *Biochem Biophys Res Commun.* **2017**, **489**(2): 179-186.
59. **Li, Y., H. Yu, F. Han, M. Wang, Y. Luo and X. Guo** Biochanin A Induces S Phase Arrest and Apoptosis in Lung Cancer Cells. *Biomed Res Int.* **2018**, **2018**: 3545376.
60. **Liu, G., F. Pei, F. Yang, L. Li, A. D. Amin, S. Liu, J. R. Buchan and W. C. Cho** Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* **2017**, **18**(2).
61. **Lu, Q. L., P. Abel, C. S. Foster and E. N. Lalani** bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol.* **1996**, **27**(2): 102-110.
62. **Mani, R. and V. Natesan** Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry.* **2018**, **145**: 187-196.
63. **Margaroli, C., S. Oberle, C. Lavanchy, S. Scherer, M. Rosa, A. Strasser, M. Pellegrini, D. Zehn, H. Acha-Orbea and D. Ehrchiou** Role of proapoptotic BH3-only proteins in *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol.* **2016**, **46**(6): 1427-1437.
64. **Mendonca, I. C., I. C. Porto, T. G. Nascimento, N. S. Souza, J. M. Oliveira, R. E. Arruda, K. C. Mousinho, A. F. Santos, I. D. Basilio-Junior, A. Parolia and F. S. Barreto** Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* **2015**, **15**: 357.
65. **Mohammad, R. M., I. Muqbil, L. Lowe, C. Yedjou, H. Y. Hsu, L. T. Lin, M. D. Siegelin, C. Fimognari, N. B. Kumar, Q. P. Dou, H. Yang, A. K. Samadi, G. L. Russo, C. Spagnuolo, S. K. Ray, M. Chakrabarti, J. D. Morre, H. M. Coley, K. Honoki, H. Fujii, A. G. Georgakilas, A. Amedei, E. Niccolai, A. Amin, S. S. Ashraf, W. G. Helderich, X. Yang, C. S. Boosani, G. Guha, D. Bhakta, M. R. Ciriolo, K. Aquilano, S. Chen, S. I. Mohammed, W. N. Keith, A. Bilsland, D. Halicka, S. Nowsheen and A. S. Azmi** Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol.* **2015**, **35** Suppl: S78-S103.
66. **Morin, P., P. D. St-Coeur, J. A. Doiron, M. Cormier, J. J. Poitras, M. E. Surette and M. Touaibia** Substituted Caffeic and Ferulic Acid Phenethyl Esters: Synthesis, Leukotrienes Biosynthesis Inhibition, and Cytotoxic Activity. *Molecules.* **2017**, **22**(7).
67. **Motomuraa, M., K. Kwonb, S. Jong, S. Young, C. Yeon and K. Kimd** In Propolis induces

- cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *elsevier*. **2008**: 6.
68. **Muller, P. A. and K. H. Vousden** Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*. **2014**, **25**(3): 304-317.
 69. **Omene, C. O., J. Wu and K. Frenkel** Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. *Invest New Drugs*. **2012**, **30**(4): 1279-1288.
 70. **Opferman, J. T. and A. Kothari** Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ*. **2018**, **25**(1): 37-45.
 71. **Pang, S., M. Yee, Y. Saba and T. Chino** Artepillin C as a targeting survivin molecule in oral squamous cell carcinoma cells in vitro: A preliminary study. *J Oral Pathol Med*. **2018**, **47**(1): 48-52.
 72. **Pasupuleti, V. R., L. Sammugam, N. Ramesh and S. H. Gan** Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev*. **2017**, **2017**: 1259510.
 73. **Patel, S.** Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. *J Diet Suppl*. **2016**, **13**(3): 245-268.
 74. **Prives, C. and V. Gottifredi** The p21 and PCNA partnership: a new twist for an old plot. *Cell Cycle*. **2008**, **7**(24): 3840-3846.
 75. **Radogna, F., M. Dicato and M. Diederich** Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *Biochem Pharmacol*. **2015**, **94**(1): 1-11.
 76. **Ren, K., W. Zhang, G. Wu, J. Ren, H. Lu, Z. Li and X. Han** Synergistic anti-cancer effects of galangin and berberine through apoptosis induction and proliferation inhibition in oesophageal carcinoma cells. *Biomed Pharmacother*. **2016**, **84**: 1748-1759.
 77. **Rivera, G. A. and H. Wakelee** Lung Cancer in Never Smokers. *Adv Exp Med Biol*. **2016**, **893**: 43-57.
 78. **Sahinler, N. and O. Kaftanoglu** Natural product propolis: chemical composition. *Nat Prod Res*. **2005**, **19**(2): 183-188.
 79. **Salim, E. I., A. D. Abd El-Magid, K. M. Farara and D. S. Maria** Antitumoral and Antioxidant Potential of Egyptian Propolis Against the PC3 Prostate Cancer Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev*. **2015**, **16**(17): 7641-7651.
 80. **Sartori, G., A. P. Pesarico, S. Pinton, F. Dobrachinski, S. S. Roman, F. Pauletto, L. C. Rodrigues, Jr. and M. Prigol** Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Cell Biochem Funct*. **2012**, **30**(1): 1-10.
 81. **Savitskaya Ma, O. G.** Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry (Mosc)*. **2015**, **80** (11): 1393-1405.
 82. **Sawicka, D., H. Car, M. H. Borawska and J. Niklinski** The anticancer activity of propolis. *Folia Histochem Cytobiol*. **2012**, **50**(1): 25-37.
 83. **Seda Vatansver, H., K. Sorkun, S. Ismet Deliloglu Gurhan, F. Ozdal-Kurt, E. Turkoz, O. Gencay and B. Salih** Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem*. **2010**, **112**(6): 546-556.
 84. **Sekar Karthikeyan, R. S., Shamsul Afaq Wani, Shanmugam Manoharan** Chemopreventive potential of chrysin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **2013**, **3**(1): 46-53.
 85. **Sethi, T., R. C. Rintoul, S. M. Moore, A. C. MacKinnon, D. Salter, C. Choo, E. R. Chilvers, I. Dransfield, S. C. Donnelly, R. Strieter and C. Haslett** Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*. **1999**, **5**(6): 662-668.
 86. **Sforcin, J. M.** Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*. **2007**, **113**(1): 1-14.
 87. **Sforcin, J. M.** Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res*. **2016**, **30**(6): 894-905.
 88. **Sforcin, J. M. and V. Bankova** Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. **2011**, **133**(2): 253-260.
 89. **Su, L., X. Chen, J. Wu, B. Lin, H. Zhang, L. Lan and H. Luo** Galangin inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing endoplasmic reticulum stress. *Food Chem Toxicol*. **2013**, **62**: 810-816.

90. Sulston, J. E. and H. R. Horvitz Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* **1977**, **56**(1): 110-156.
91. Szliszka, E., Z. P. Czuba, M. Domino, B. Mazur, G. Zydowicz and W. Krol Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis- inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules.* **2009**, **14**(2): 738-754.
92. Tauchi-Nishi, P., W. Sae-ow, R. Kaneshiro, B. Lyon, P. Morris and C. Lum Metastatic lung adenocarcinoma to the kidney diagnosed by urine cytology: a case report. *Anal Quant Cytopathol Histopathol.* **2014**, **36**(6): 345-350.
93. Teerasripreecha, D., P. Phuwapraisrisan, S. Puthong, K. Kimura, M. Okuyama, H. Mori, A. Kimura and C. Chanchao In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complement Altern Med.* **2012**, **12**: 27.
94. Timucin, A. C. and H. Basaga Pro-apoptotic effects of lipid oxidation products: HNE at the crossroads of NF-kappaB pathway and anti-apoptotic Bcl-2. *Free Radic Biol Med.* **2017**, **111**: 209-218.
95. Tunç, İ., S. Zergeroğlu, B. Daylan, T. Aydoğdu and L. Mollamahmutoğlu Serviks Kanserlerinde BCL-2 ve BAX Protein Expresyonları ve Prognostik Faktörlerle Korelasyonu. *Dergipark.* **2004**, **7**(4): 140-148.
96. Urruticoechea, A., R. Alemany, J. Balart, A. Villanueva, F. Vinals and G. Capella Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des.* **2010**, **16**(1): 3-10.
97. Vaux, D. L., S. Cory and J. M. Adams Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* **1988**, **335**(6189): 440-442.
98. Vela, L. and I. Marzo Bcl-2 family of proteins as drug targets for cancer chemotherapy: the long way of BH3 mimetics from bench to bedside. *Curr Opin Pharmacol.* **2015**, **23**: 74-81.
99. Velikova, M., V. Bankova, I. Tsvetkova, A. Kujumgiev and M. C. Marcucci Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia.* **2000**, **71**(6): 693-696.
100. Vukovic, N. L., A. D. Obradovic, M. D. Vukic, D. Jovanovic and P. M. Djurdjevic Cytotoxic, proapoptotic and antioxidative potential of flavonoids isolated from propolis against colon (HCT-116) and breast (MDA-MB-231) cancer cell lines. *Food Res Int.* **2018**, **106**: 71-80.
101. W Pfaff, M. Relative quantification-Real-time PCR. *Published by International University Line.* **1997**: 19.
102. Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* **2011**, **30**: 87.
103. Wu, J., C. Omene, J. Karkoszka, M. Bosland, J. Eckard, C. B. Klein and K. Frenkel Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett.* **2011**, **308**(1): 43-53.
104. Xue, C., Y. Chen, D. N. Hu, C. Iacob, C. Lu and Z. Huang Chrysin induces cell apoptosis in human uveal melanoma cells via intrinsic apoptosis. *Oncol Lett.* **2016**, **12**(6): 4813-4820.
105. Yamagata, K., Y. Izawa, D. Onodera and M. Tagami Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Mol Cell Biochem.* **2018**, **441**(1-2): 9-19.
106. Yildirim, A., G. G. Duran, N. Duran, K. Jenedi, B. S. Bolgul, M. Miraloglu and M. Muz Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Med Sci Monit.* **2016**, **22**: 422-430.
107. Yildirim, A., G. G. Duran, N. Duran, K. Jenedi, B. S. Bolgul, M. Miraloglu and M. Muz Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Med Sci Monit.* **2016**, **22**: 422-430.
108. Yu, X. M., T. Phan, P. N. Patel, R. Jaskula-Sztul and H. Chen Chrysin activates Notch1 signaling and suppresses tumor growth of anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer.* **2013**, **119**(4): 774-781.
109. Zabaoui, N., A. Fouache, A. Trousson, S. Baron, A. Zellagui, M. Lahouel and J. A. Lobaccaro Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chem Phys Lipids.* **2017**, **207**(Pt B): 214-222.
110. Zaccaria, V., V. Curti, A. Di Lorenzo, A. Baldi, C. Maccario, S. Sommati, R. Mocchi and M. Daglia Effect of Green and Brown Propolis Extracts on the Expression Levels of microRNAs, mRNAs and Proteins, Related to Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients.* **2017**, **9**(10).

111. **Zlobovskaya, O. A., T. F. Sergeeva, M. V. Shirmanova, V. V. Dudenkova, G. V. Sharonov, E. V. Zagaynova and K. A. Lukyanov** Genetically encoded far-red fluorescent sensors for caspase-3 activity. *Biotechniques*. **2016**, **60**(2): 62-68.
112. **Zugazagoitia, J., C. Guedes, S. Ponce, I. Ferrer, S. Molina-Pinelo and L. Paz-Ares** Current Challenges in Cancer Treatment. *Clin Ther*. **2016**, **38**(7): 1551-1566.



ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Hatay'da doğdu. İlk, ortaokul eğitimini İstanbul'da lise eğitimini ise Hatay'da tamamladı. 2012 yılında Kafkas Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2017 yılında mezun oldu. 2017 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

