

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DOKTORA PROGRAMI**

**TÜRK PROPOLİS EKSTRAKTLARININ FİBROBLAST HÜCRE SERİLERİNDE**  
**GENOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN DNA TAMİR ENZİMLERİ**  
**VASITASIYLA İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**İbrahim TURAN**

**ARALIK - 2011**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA PROGRAMI**

**TÜRK PROPOLİS EKSTRAKTLARININ FİBROBLAST HÜCRE SERİLERİNDE**  
**GENOTOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİSİNİN DNA TAMİR ENZİMLERİ**  
**VASITASIYLA İNCELENMESİ**

**İbrahim TURAN**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21.11.2011**

**Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 06.12.2011**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Orhan DEĞER**  
**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU**  
**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Abdülkerim BEDİR**  
**Jüri Üyesi : Doç. Dr. Birgül KURAL**  
**Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM**  
**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Ahmet KALKAN**

**ARALIK - 2011**

**TRABZON**

## ÖNSÖZ

Propolisin DNA hasarını engelleme özelliğinin aydınlatılmasına katkı sağlayacak olan ve literatürde bazı eksiklikleri kapatacağı düşünülen bu doktora tezinin hazırlanmasında değerli katkılarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. Orhan DEĞER' e, her aşamada desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU' na, yüksek lisans ve doktora eğitimimde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Doç. Dr. Birgül KURAL, Doç. Dr. Ahmet ALVER, Yrd. Doç. Dr. Fulya YÜCESAN, Yrd. Doç. Dr. Kağan KILINÇ, Yrd. Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE, ve rahmetli hocamız Prof. Dr. Ekin ÖNDER' e, bölümümüz çalışma arkadaşlarımdan tezimin tüm aşamalarında yanımda olan Arş. Gör. Selim DEMİR başta olmak üzere, Arş. Gör. Tuğba N. ÇAKIROĞLU, Arş. Gör. Ayşegül UZUN, Sema MISIR, Arş. Gör. Dr. Selçuk YAMAN, Arş. Gör. Dr. Hüseyin YAMAN, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı' nda bulunan bütün arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına ve eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen aileme yaptıkları katkılardan dolayı çok teşekkür ederim.

**Aralık, 2011**

**İbrahim TURAN**

Bu çalışma

K.T.Ü.B.A.P.2007.114.001.3 ve K.T.Ü.B.A.P.2008.114.001.5

kod numaralı projeler ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Propolis	4
2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	6
2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	6
2.1.2.1. Flavonoidler	7
2.1.2.2. Arı Mumu ve Yağ Asitleri	9
2.1.2.3. Esansiyel Yağlar	9
2.1.2.4. Mineral Elementler	10
2.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri	10
2.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres	11
2.2.1. Serbest Radikaller	11
2.2.1.1. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri	12
2.2.1.2. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları	13
2.2.1.3. Serbest Radikal Türleri	14
2.2.1.3.1. Süperoksit Radikalleri (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	14

2.2.1.3.2. Hidroksil Radikalleri (OH <sup>·</sup> )	15
2.2.1.3.3. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	15
2.2.1.3.4. Tersiyer Bütül Hidroperoksit (t-BHP)	16
2.2.1.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri	17
2.2.2. Oksidatif Stres ve Hastalıklardaki Rolü	18
2.3. DNA Hasarı ve Tamir Mekanizmaları	19
2.3.1. DNA Hasarı	19
2.3.1.1. DNA Hasarının Yol Açtığı Yanıtlar	21
2.3.2. DNA Tamir Mekanizmaları	21
2.3.2.1. Baz Eksizyon Tamiri	22
2.3.2.1.1. hOGG-1	24
2.3.2.1.2. Neil-1	24
2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	25
2.4.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları	26
2.5. Hücre Canlılık Testleri	26
2.6. Oksidatif DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler	27
2.6.1. Komet Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	28
2.7. mRNA Ekspresyon Çalışmaları	29
2.7.1. Real-Time PCR	29
3. MATERYAL VE METOD	31
3.1. Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme ve Kimyasallar	31
3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	31
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.2. Kullanılan Metodlar	33
3.2.1. Deneyin Planlanması	33
3.2.2. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Madde ve Malzemelerin Hazırlanması	34
3.2.3. Hücre Kültürü	38
3.2.3.1. Primer Fibroblast Hücrelerinin Çözülmesi, Çoğaltılması	38
3.2.3.2. Primer Fibroblast Hücrelerinin Pasajlanması	39
3.2.3.3. Primer Fibroblast Hücrelerinin Sayılması	39
3.2.3.4. Hücrelerin Canlılık Testi, MTT Analizi	40
3.2.4. Deneylerde Kullanılacak t-BHP ve Etanolik Propolis Ekstraktı Dozlarının Bulunması	41

3.2.4.1. Fibroblast Hücre Serisi İçin Uygun t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi	41
3.2.4.2. t-BHP Kaynaklı DNA Hasarını Engelleyebilecek Propolis Konsantrasyonunun Belirlenmesi	41
3.2.5. Fibroblast Hücrelerinin Deney İçin Hazırlanması	41
3.2.6. Hücrelere İlgili Kimyasalların Uygulanması	42
3.2.7. Total RNA İzolasyonu	43
3.2.8. Komet Analizi	43
3.2.8.1. Jellerin Döküleceği Lamaların Polilizin ve NMP Agaroz ile Kaplanması	43
3.2.8.2. Komet Analizi Protokolü	44
3.2.9. mRNA Ekspresyon Çalışmaları	46
3.2.9.1. Deneyde Kullanılan Primer Dizileri	46
3.2.9.2. Real-Time PCR Protokolü	47
3.2.9.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	48
3.2.9.4. Örneklerin Real-Time PCR Sonuçlarının Analizi	48
3.2.10. Kullanılan İstatistik	49
4. BULGULAR	50
4.1. Komet Analizi Sonuçları	50
4.1.1. t-BHP Doz Tespit Çalışması	50
4.1.2. Propolis Doz Tespit Çalışması	51
4.2. Canlılık Testleri	52
4.2.1. t-BHP' nin Hücreler Üzerine Toksik Etkisi	52
4.2.2. Propolisin Etanolik Ekstraktının Hücreler Üzerine Toksik Etkisi	52
4.2.3. Deney Grubu Şartlarının Hücreler Üzerine Toksik Etkisi	53
4.3. Real-Time PCR Analizi Sonuçları	53
4.3.1. Erime Eğrisi Analizi ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	53
4.3.2. Neil-1 ve hOGG-1 mRNA Ekspresyon Sonuçları	55
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66
6.1. Sonuçlar	66
6.2. Öneriler	67
7. ÖZET	69

8.SUMMARY	71
9. KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	84

**TABLolar DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>	
Tablo 1.	Propoliste bulunan başlıca bileşenler	7
Tablo 2.	Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler	9
Tablo 3.	Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri	14
Tablo 4.	Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri	17
Tablo 5.	Antioksidan sistem	25
Tablo 6.	Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	31
Tablo 7.	Kullanılan kimyasal maddeler	33
Tablo 8.	Oluşturulan deney grupları ve muamele şartları	34
Tablo 9.	Deneyde kullanılan primer dizileri	46
Tablo 10.	Real-Time PCR için karışım hazırlanması	47
Tablo 11.	Real-Time PCR protokolü	48
Tablo 12.	t-BHP' nin yaptığı DNA hasarının komet skorları	50
Tablo 13.	t-BHP' nin hücreler üzerine toksik etkisi	52
Tablo 14.	Propolisin etanolik ekstraktının hücreler üzerine toksik etkisi	52
Tablo 15.	Deney grubu şartlarının hücreler üzerine toksik etkisi	53



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. Çalışmada kullanılan propolis örnekleri	6
Şekil 2. Propoliste bulunan tipik flavonoid ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları	8
Şekil 3. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	12
Şekil 4. t-BHP' nin açık kimyasal formülü	17
Şekil 5. Hücrede radikal aracılı hasar	18
Şekil 6. DNA' da hasar oluşturan ajanlar, hasar tipleri ve tamir mekanizmaları	22
Şekil 7. Baz kesip çıkarma tamir yolu	23
Şekil 8. Görsel analiz ile komet skorlaması	29
Şekil 9. Çalışmada kometlerin skorlanmasında kullanılan skala	45
Şekil 10. Sabit doz hasarlayıcı ile dört farklı doz propolis ekstraktı muamelesinin komet analizi sonuçları	51
Şekil 11. Real-Time PCR erime eğrisi analizi sonuçları	54
Şekil 12. PCR ürünleri jel elektroforezi	54
Şekil 13. Numunelerin $\beta$ -aktin, Neil-1 ve hOGG-1 amplifikasyon eğrileri	55
Şekil 14. Neil-1 mRNA ekspresyon analizi sonuçları	56
Şekil 15. hOGG-1 mRNA ekspresyon analizi sonuçları	57

**KISALTMALAR**

BER	:	Baz kesip çıkarma tamiri
NER	:	Nükleotid kesip çıkarma tamiri
NHEJ	:	Serbest uçların homolog olmayan bağlanması
HR	:	Homolog rekombinasyon
APE	:	Apürinik/aprimidinik endonükleaz
GC-MS	:	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HPLC	:	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
Neil-1	:	NTH benzeri DNA glikozilaz 1
hOGG-1	:	İnsan 8-oxo guanin DNA glikozilaz 1
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
O <sub>2</sub> '	:	Süperoksit radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen peroksit
OH'	:	Hidroksil radikali
t-BHP	:	Tersiyer bütül hidroperoksit

AP	:	Apürinik/aprimidinik bölge
XRCC1	:	X ışını hasarını çapraz tamamlama ile tamir eden protein
PARP1	:	Poli ADP-riboz polimeraz 1
NTH-1	:	E.coli endonükleaz III benzeri protein 1
SOD	:	Süperoksit dismutaz
CAT	:	Katalaz
GSH-Px	:	Glutatyon peroksidaz
GR	:	Glutatyon redüktaz
GST	:	Glutatyon S-transferaz
LDH	:	Laktat dehidrogenaz
DSB	:	DNA çift zincir kırığı
SSB	:	DNA tek zincir kırığı
DMEM	:	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	:	Fetal bovin serum
PBS	:	Fosfat tampon solüsyonu
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
LMP Agaroz	:	Düşük kaynama noktalı agaroz
NMP Agaroz	:	Normal kaynama noktalı agaroz
TAE	:	Tris-asetik asit-EDTA tamponu
NaOH	:	Sodyum hidroksit
MTT	:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
Tm	:	Erime Sıcaklığı
MMS	:	Metil metan sülfonat
FISH	:	Floresan in situ hibridizasyon

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Doğal ürünler yeni farmakolojik keşifler için gelecek vadeden kaynaklardır. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arı ürünleridir. Arı ürünleri birçok hastalıkta, hastalığın ilerlemesinin önüne geçmek, ağrıların azaltılması ve hastalığın tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına *Apiterapi* denilmektedir. Apiterapi, arıcılık kadar eskidir (1, 2).

Bir arı ürünü olan propolis; bal arıları tarafından ağaçların kabuk ve kozalaklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli polenler, yağlar, özel reçine ve mumsu maddelerden oluşur (3). Diğer adı *bee glue* olan propolis pro- ve -polis köklerinden oluşur ve kovanın (şehrin) savunması anlamını taşır (4, 5). Propolis; Tayvan, Japonya, Brezilya, ABD ve Avrupa ülkeleri gibi dünyanın pek çok yerinde, sağlıklı yaşam ve hastalıkların önlenmesinde bir gıda ürünü ve alternatif ilaç olarak oldukça ilgi görmektedir (6).

Flavonoidler; meyvelerde, sebzelerde, çay, üzüm, meyve suyu gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir (7). Flavonoid terimi Latince sarı anlamına gelen *flavus* kelimesinden türemiştir. Bitkilerdeki fizyolojik rollerinin yanı sıra insan diyetinin de önemli bir parçası olmasına rağmen flavonoidler besin olarak değerlendirilmezler (8).

Bugüne kadar propolisten 38' den fazla flavonoid izole edilmiştir. Bunlara galangin, kaempferol, kuersetin, pinosembirin, pinostrobin ve pinobanksin örnek olarak verilebilir.

Propolisin fenolik bileşikleri arasında başlıca; sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve esterleri, ferulik asit yer almaktadır (9).

Flavonoidler biyolojik aktivitelerini ağır metal iyonlarını, biyolojik polimerleri bağlayarak, elektron transportunu katalizleyerek ve serbest radikalleri yok ederek dört farklı şekilde gösterir (10). Flavonoidler; alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahiptir (11). Flavonoidler antioksidan özelliğini yapılarındaki karbonil ve hidroksil gruplar, çift bağlar ve 3',4'-dihidroksi katekol konfigürasyonları ile kazanırlar (11, 12).

Epidemiyolojik çalışmalar; günlük diyetle ilaveten çeşitli kaynaklardan (yeşil çay, üzüm, propolis gibi) alınan polifenollerin, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruyucu olabileceğini ortaya koymuştur (13, 14).

Oksidatif stres; ateroskleroz, diyabet, kanser, kronik inflamasyon hastalıkları, santral sinir sistemi bozuklukları gibi fizyopatolojik olaylarda, hücre yaşlanmasında ve dolayısıyla hücresel yıkım, hücre hasarı ve hücre ölümünde rol oynayan önemli bir mekanizma olarak son yıllarda büyük önem kazanmıştır (15, 16, 17). Oksidatif stres serbest radikal oluşumu ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulduğu durumda ortaya çıkar (18).

Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde, devamlı olarak hasarlar oluşmakta ve oluşan hasarlar DNA tamir sistemleri tarafından onarılmaya çalışılmakla birlikte, hasarın çok büyük boyutta olduğu veya DNA onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasarlar birikmektedir. Bu birikme zamanla mutasyonlara ve hücre ölümüne neden olmaktadır (17).

Hasar tipine bağlı olarak ökaryotlardaki DNA tamir mekanizmaları dört ana yolakla özetlenebilir:

1. Baz eksizyon tamiri, (base excision repair); (BER)
2. Nükleotid eksizyon tamiri, (nucleotide excision repair); (NER)
3. Serbest uçların homolog olmayan bağlanması, (Non-homolog end joining); (NHEJ)
4. Homolog rekombinasyon, (Homolog recombination); (HR)

Baz eksizyon tamiri dört temel basamakta gerçekleşir (hasarlı bazın uzaklaştırılması, apürinik/aprimidinik bölgenin oluşturulması, doğru bazın yerleştirilmesi ve ligasyon). Bu reaksiyonların gerçekleştirilmesinde dört enzim sınıfı görev alır; DNA glikozilazlar, (apürinik/aprimidinik endonükleaz) APE, DNA polimerazlar ve DNA ligazlar (19).

Alkali elüsyon, alkali açılım, GC-MS, HPLC (elektrokimyasal dedektör ile) ve komet analizi günümüzde oksidatif DNA hasarını belirlemede kullanılan yöntemlerdir. Alkali

elüsyon ve alkali açılım güvenilir ve duyarlılığı yüksek metodlar olmasına rağmen, komet analizine göre daha kısıtlı uygulama alanına sahiptirler. HPLC ve GC-MS, DNA hasarını belirlemede ileri teknikler olmalarına rağmen işlem süresinin uzun olması, daha maliyetli olmaları ve analize hazırlık aşamasında numunelerde oksidasyon reaksiyonlarının gelişebilmesi sebebiyle, komet analizine göre nispeten daha az tercih edilmektedirler (20).

Son zamanlarda bilimsel araştırmalar için kullanılan gen ekspresyon çalışmalarında kantitatif real-time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilmekte ve gen ekspresyon seviyeleri hassas bir şekilde belirlenebilmektedir (21). Literatürde bulunan benzer gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan bu yöntem bu çalışmada da kullanılarak ilgilenilen hedef genin mRNA ekspresyon miktarı negatif kontrol grubunun mRNA ekspresyon miktarına göre artan ya da azalan katları şeklinde ifade edilmiştir (22, 23, 24).

Bu çalışmada Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanan propolisin etanolik ekstraktının DNA tamir enzimlerinin ekspresyonu üzerine etkisi incelenecektir. Propolisin yüksek polifenolik bileşikler içermesi biyolojik özelliklerinin kaynağını oluşturmaktadır. Bölümümüzde yapılan bir çalışmada propolisin etanolik ekstraktının DNA hasarını engellediği bulunmuştur. Bu bilgi ile şekillenen çalışmamız, propolisin DNA hasarını engelleme rolünün ne tür bir mekanizma ile gerçekleştiğini göstermek için planlanmıştır. Çalışmada hücrelere öncelikle propolis ekstraktları verilmiştir. Daha sonra kimyasal bir ajanla oksidatif DNA hasarı oluşturularak, oksidatif DNA hasarını tamir etmede görevli DNA tamir enzimlerinden Neil-1 ve hOGG-1 mRNA ekspresyon seviyeleri real-time PCR yöntemi ile tespit edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Propolis

Günümüzde kullanılan sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Doğal ürünler yeni farmakolojik keşifler için gelecek vadeden kaynaklardır. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan birisi de arı ürünleridir. Arı ürünleri birçok hastalıkta, hastalığın ilerlemesinin önüne geçmek, ağrıların azaltılması ve hastalığın tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına *Apiterapi* denilmektedir. Apiterapi, arıcılık kadar eskidir (1, 2).

Apiterapi; bal, propolis, arı sütü, polen ve arı zehiri kullanımını kapsar (25). Son yıllarda, propolisin bileşimi ve biyolojik özellikleriyle alakalı olarak, arı ürünlerine olan ilgi hızla artmakta ve arı ürünlerinin ilaç formülasyonlarında kullanılmasına yönelik pek çok çalışma yapılmaktadır (2).

İnsanoğlu propolisi çok eski çağlardan beri farklı amaçlar için kullanmıştır. Uzun yıllar boyunca propolisten tıpta çeşitli amaçlar için yararlanılmıştır. Mısırlılar ölülerini mumyalamak için propolisin çürümeyi engelleyici özelliğinden yararlanırlarken, Romalı ve Yunanlı hekimler propolisi antiseptik ve yaranın kabuk bağlamasını kolaylaştırıcı madde olarak, İnkalar ise ateş düşürücü olarak kullanmışlardır. Avrupa' daki 12. yüzyıl kayıtları, propolisin medikal preparatlarının ağız ve yara enfeksiyonlarının tedavisi ve diş sağlığı için kullanımından bahsetmektedir. Propolis 17. yüzyılda Londra ilaç kitabında resmi ilaç olarak

yerini almıştır. Arılar propolisi milyonlarca, insanlar ise binlerce yıldır kullanmaktadır. Arılar ve insanoğlu propolisin birçok yararlı özelliğinden faydalanmışlardır. İnsanlık için bu reçinemsî yapının keşfedilen yararları henüz çok az aydınlatılabilmıştır (1, 2, 27, 28).

Bir arı ürünü olan propolis; bal arıları tarafından ağaçların kabuk ve kozalaklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli polenler, yağlar, özel reçine ve mumsu maddelerden oluşur (3). Diğer adı *bee glue* olan propolis pro- ve -polis köklerinden oluşur ve kovanın (şehirin) savunması anlamını taşır (4, 5).

Bal arıları reçineyi toplarken çiğneyip tükürük enzimleri ile karıştırarak kısmen sindirirler ve kısmen sindirilmiş materyal, balmumu ile karıştırılarak kovanda kullanılmaktadır. Tükürük enzimleriyle karışan propolisin kimyasal yapısında meydana gelen değişikliklerden dolayı, propolisin standardize edilmesinde güçlükler oluşur (10, 29).

Propolis kovanda çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Arılar propolisi; kovan deliklerinin ve çatlaklarının kapatılmasında, peteklerin tamir edilmesinde ve birbirine yapıştırılmasında, çeşitli arı hastalıklarından koloninin korunmasında ve hastalık etmenlerinin etkisiz duruma getirilmesinde kullanırlar (5, 30). Ayrıca yavru yetiştirme döneminde yarık ve çatlaklardan suyun buharlaşp kaybolması engellenir. Böylece kovan için gerekli olan nem de korunmuş olur. Bunların yanında olumsuz çevre koşullarından kovayı korumak, kovan giriş deliğini küçültmek amacıyla da kullanılmaktadır (31).

Propolisin en önemli kaynağını kavak, kızılbaş, huş ağacı, kestane, dişbudak ağacı ve çeşitli *Pinus* (çam) ve *Salix* (söğüt) türleri gibi bitkiler oluşturmaktadır. Ham propolisin kimyasal yapısını arı mumunun içeriğindeki çeşitlilik etkilemektedir (9).

Propolisin; antibakteriyel, antikaryojenik, antiinflamatuvar, antioksidatif, tümörisidal ve antimutajenik özellikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (6). Propolis bu faydalı özelliklerinden dolayı son yıllarda pek çok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Ayrıca farmasötik ve gıda endüstrisinde propolis içeren ürünlerin sayısı da hızla artmaktadır (32).

Propolis; Tayvan, Japonya, Brezilya, ABD ve Avrupa ülkeleri gibi dünyanın pek çok yerinde, sağlıklı yaşam ve hastalıkların önlenmesinde bir gıda ürünü ve alternatif ilaç olarak oldukça ilgi görmektedir (6).

Cildi nemlendirme, yenileme, kırışıklıkları giderme ve antibakteriyel özelliklerinden dolayı güzellik kremlerinde, çeşitli losyonlarda kullanılarak kozmetik endüstrisinde yer alır (33). Ayrıca propolis; dişeti, dudak ve ağız iltihaplarını iyileştirebilmek için diş macunları ile ağız yıkama solüsyonlarında da kullanılmaktadır (10).



Yiyecek teknolojisinde de önemli bir yere sahip olan propolis, konservecilikte kimyasal koruyucu olarak (10) ve insan vücuduna yararlı bileşenler içermesi nedeniyle de mineral destekli diyetetik ürünlerde yer almaktadır (34). Propolis içeren meşrubat ve yiyeceklere kanserden, diyabetten, inflamasyondan ve çeşitli kalp hastalıklarından korunmak isteyen tüketiciler rağbet etmektedirler (29, 35). Özellikle son yıllarda; propolis içeren tablet, toz ve sakız ürünleri marketlerde tüketicinin hizmetine sunulmuştur (10).



**Şekil 1.** Çalışmada kullanılan propolis örnekleri (1)

### **2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri**

Propolis yapışkan ve reçineli bir madde olup, rengi kaynağına ve depolama süresine bağlı olarak, sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar değişebilmektedir (29, 35). Genel olarak 60-69 °C arasında bir erime noktasına sahiptir (36). Soğukta sert ve kırılabilir, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapısı vardır (10). Çalışmada kullanılan propolis örnekleri şekil 1’ de gösterilmiştir.

Propolis su ve hidrokarbon çözücülerde düşük, alkollerde ise yüksek oranda çözünürlük gösterir (37).

### **2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği**

Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Asya ve Afrika’ dan toplanan propolis örnekleri kimyasal içerikleri bakımından incelendiğinde, aralarında farklılıklar olduğu rapor edilmiştir (35, 38). Ham propolisin bileşimi kaynağına göre değişmekle birlikte, genellikle % 50 reçine,

% 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (10, 39).

Propolisteki temel kimyasal sınıflar; flavonoidler, fenolik ve çeşitli aromatik bileşiklerdir. Bu sınıflar dışında birçok B-kompleks vitamini, önemli mineralleri ve eser elementleri de içerir (37). Ilıman bölgelere ait propolis örnekleri flavonoidler ve sinnamik asit türevleri gibi fenolik bileşiklerce zengindir. Ilıman bölge propolisinde diterpenler ve prenilenmiş bileşikler yok denecek kadar azken, tropikal Güney Amerika propolisinde bu bileşiklerle beraber lignanlar ve flavonoidler de bulunurlar (40).

Ilıman kuşak ülkelerinden elde edilen propolis örneklerinden bugüne kadar fenolik asitler, fenolik asit esterleri ve flavonoidler gibi ana sınıflara dahil 300 kadar bileşik belirlenmiştir (32). Propoliste bulunan başlıca bileşikler tablo 1' de verilmiştir.

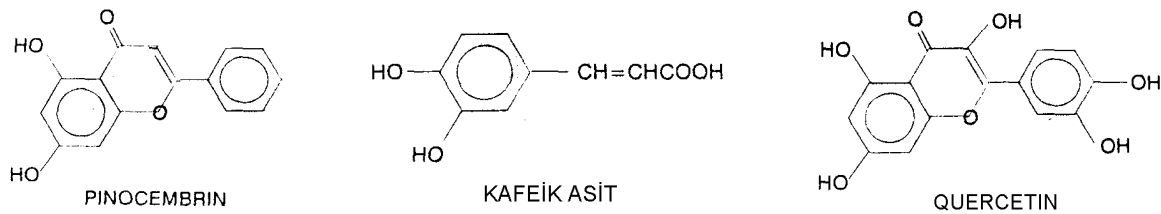
**Tablo 1.** Propoliste bulunan başlıca bileşenler (1)

Bileşenler (%)	Ana Maddeler	Miktar
Reçine	Flavonoidler Terpenler Fenolik asitler ve esterler	% 45-55
Mum ve yağ asitleri	Arılardan veya bitkilerden mum, Bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	% 25-35
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	% 10
Polen	Eser elementler Serbest amino asitler	% 5
Diğer maddeler	Laktonlar Steroidler Şekerler Kinonlar	% 5

### 2.1.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler; meyvelerde, sebzelerde, çay, meyve suyu gibi içeceklerde doğal olarak bulunan polifenolik bileşiklerdir (7). Flavonoid terimi Latince sarı anlamına gelen *flavus* kelimesinden türemiştir. Bitkilerdeki fizyolojik rollerinin yanı sıra insan diyetinin de önemli bir parçası olmasına rağmen flavonoidler besin olarak değerlendirilmezler (8).

Bugüne kadar propolisten 38' den fazla flavonoid izole edilmiştir. Bunlara galangin, kaempferol, kuersetin, pinosembrin, pinostrobin ve pinobanksin örnek olarak verilebilir. Propolisin fenolik bileşikleri arasında başlıca; sinnamil alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve esterleri, ferulik asit yer almaktadır (9). Propoliste bulunan tipik flavonoid ve fenolik bileşiklere ait örnekler şekil 2' de verilmiştir.



**Şekil 2.** Propoliste bulunan tipik flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları (37)

Flavonoidlerin serbest radikal toplama kapasitelerinden dolayı gösterdikleri antioksidan özellikleri, onlar hakkında daha pek çok alanda çalışma yapma ihtiyacını beraberinde getirmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, flavonoidlerin antioksidan özellikleri yanında; hücre proliferasyonu üzerine etkili oldukları, angiogenezi ve hücreler arası sinyal mekanizmasını inhibe ettikleri ve DNA tamir enzimlerini stimüle ettikleri ortaya konulmuştur (22). Flavonoidlerin metabolizması sonucu çok sayıda fenolik asit türevi oluşur ve oluşan ürünlerin çoğu serbest radikal oluşumunu inhibe eder (41).

Flavonoidler biyolojik aktivitelerini ağır metal iyonlarını, biyolojik polimerleri bağlayarak, elektron transportunu katalizleyerek ve serbest radikalleri yok ederek dört farklı şekilde gösterir (10). Flavonoidler alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahiptir (11). Flavonoidler antioksidan özelliğini yapılarındaki karbonil ve hidroksil gruplar, çift bağlar ve 3',4'-dihidroksi katekol konfigürasyonları ile kazanırlar (11, 12).

Epidemiyolojik çalışmalar; günlük diyete ilaveten çeşitli kaynaklardan (yeşil çay, kırmızı üzüm, propolis gibi) alınan polifenollerin, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruyucu olabileceğini ortaya koymuştur (13, 14). Bu özellikleri gösteren ve propoliste bulunan bazı flavonoid ve fenolik bileşikler tablo 2' de verilmiştir.

**Tablo 2.** Propoliste bulunan bazı flavonoidler ve fenolik bileşikler (37)

Flavonlar	Flavonoller	Flavononlar	Dihidro Flavonoller	Sinnamik asit türevleri	Diğerleri
Apigenin	Kaempferol	Pinosembrin	Pinobanksin	Ferulik asit	11-Farnesol (seskiterpen)
Akasetin	Kaempferid	Sakuranetin	Pinobanksin-3-asetat	Kafeik asit	$\beta$ -karyofilen (terpenoid)
Baisetin	Galangin	İzosakuranetin	Pinobanksin-7-metil eter	<i>p</i> -Kumarik asit	Terpinkol (terpenoid)
Krisin	İzorannetin				Benzoik asit
Luteolin	Ramnetin				Syringaldehit (diterpenikasit)
Tektokrisin	Mirisetin				Protokateşuik asit (benzoik asit türevi)
	Fisetin				Vanillin (benzaldehit türevi)
	Rutin				

### 2.1.2.2. Arı Mumu ve Yağ Asitleri

Propoliste bulunan arı mumu ve yağ asitleri propolisin yaklaşık % 30' unu oluşturur (42). Arı mumu başlıca mono esterler, diesterler, uzun zincirli hidrokarbonlar, hidroksiesterler, poliesterler, uzun zincirli yağ asitleri, triesterler ve asit esterlerinden oluşur (38).

### 2.1.2.3. Esansiyel Yağlar

Propolisteki uçucu bileşenler propolisin yaklaşık % 10' unu oluşturur (42). Ancak Schmidt ve arkadaşlarına göre propoliste bulunan uçucu yağlar, terpenler ve arı mumu propolisin etkisini ve kimyasal özelliklerini anlamlı bir şekilde etkilememektedir (38).

#### 2.1.2.4. Mineral Elementler

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

#### 2.1.3. Propolisin Biyolojik Özellikleri

Propolisin; en fazla *Candida albicans*' a olmakla birlikte Candida türleri ve dermatofitlere karşı antifungal, influenza, herpes simpleks ve reovirüs üzerine antiviral, lokal anestetik, nöroprotektif (44), antibakteriyel, antikaryojenik, tümörisidal, antimitojenik (6), radyoprotektif (45), kardiyoprotektif (46), hepatoprotektif (47), immünoestimülantör (48), sitostatik (49), yara iyileştirici (50), apoptotik (42), antioksidatif (51), antiinflamatuvar (52), antimetastatik (37), antigenotoksik (53) ve antiproliferatif (54) özellikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu özelliklerinden dolayı hastalıklardan korunma ve genom kararlılığının sürdürülmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (13).

Polifenoller pek çok biyolojik aktiviteye sahip sekonder bitkisel metabolitlerdir ve antioksidan aktivitelerinin yanı sıra diğer enzim ve antioksidanlarla sinerjik etkileşimleri tanımlanmıştır. Polifenollerin değişik hücre tiplerinde oksidatif DNA hasarını engellediğine dair pek çok çalışma mevcuttur (23, 53).

Bununla beraber tüm flavonoidlerin tamamen sağlıklı olduğunu düşünmek yanlış olur. Bazı polifenol türlerinin konsantrasyona bağlı olarak mutajenik ve pro-oksidan özellik gösterebileceği, dolayısıyla topoizomeras enzim aktiviteleri, prostanoid biyosentezi ve sinyal transdüksiyonu gibi esansiyel biyokimyasal yolları olumsuz etkileyebileceği de ileri sürülmektedir (13).

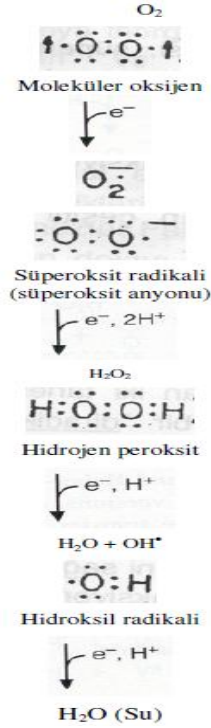
Değişik ülkelerden elde edilen propolisin farklı kimyasal yapıya sahip olması, onların farklı biyolojik aktiviteye sahip olmasına neden olmaktadır. Ancak bu durum her farmakolojik özellik için aynı değildir. İlginç bir şekilde karasal ve ekvatorial bölgeleri de içine alan farklı bölgelerden toplanan ve farklı kimyasal yapıya sahip olan propolis örneklerinin, benzer biyolojik aktiviteler gösterdiği bulunmuştur. Propolis kovanda enfeksiyonlardan korunma amaçlı kullanılmaktadır ve bu nedenle değişik propolis tiplerinin hem antibakteriyel hem de antifungal özellik göstermesi doğaldır. Bu sebeple gözlenen aktivitenin sadece belirli bir bileşik grubuna atfedilmesi doğru değildir. Nitekim propolisin

antibakteriyel aktivitesinden sorumlu bileşik grupları; kavak tipi propoliste flavonlar, flavononlar, fenolik asitler ve onların esterleri iken, *Baccharis* tipi (Brezilya) propoliste prenilenmiş *p*-kumarik asitler, diterpenler, kırmızı Küba propolisinde ise prenilenmiş benzofenonlardır. Bu nedenle propolisin antibakteriyel özelliği tüm dünyada propolisin üzerinde en çok çalışılan özelliği olmuştur (31).

## 2.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres

### 2.2.1. Serbest Radikaller

Atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma ya da moleküle büyük bir aktiflik kazandırır. Bir ya da daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren, bağımsız olarak varlığını sürdürebilen molekül, atom veya atom grupları *serbest radikal* olarak tanımlanır ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle ( $R^{\cdot}$ ,  $R^{\cdot}$ ) gösterilir (15).  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Mo^{5+}$  gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen biradikal olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji olarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Organizmada geçiş metallerini ( $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{+}$  gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle, oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturma eğilimindedir (51). Reaktif oksijen türlerinin oluşum mekanizması şekil 3' te özetlenmiştir.

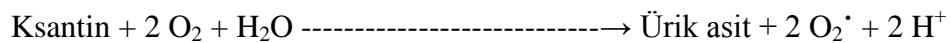


Şekil 3. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu (56)

### 2.2.1.1. Serbest Radikal Oluşum Nedenleri

- 1- Aktive olmuş fagositler (respiratory burst)
- 2- Radyasyon
- 3- Alkol, uyuşturucu
- 4- Çevresel faktörler (sigara dumanı, aromatik hidrokarbonlar )
- 5- Cerrahi stres
- 6- Mitokondriyal elektron ( $e^-$ ) transportu: Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağıdır.  $e^-$  transportu sırasında,  $e^-$  sızması olur. Sızan  $e^-$  ların  $O_2$ ' i indirgemesi ile ROS meydana gelir.
- 7- Ksantin oksidaz: Enerji azlığı ve artmış intraselüler kalsiyum varlığında kalsiyuma bağımlı proteaz aktive olarak, ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. Ksantin oksidaz, ksantin ürik aside dönüşümü sırasında  $O_2^{\cdot}$  oluşumuna neden olur.

#### Ksantin Oksidaz



**8-** Hemoglobin yıkımı: Hem yıkımında görevli bir enzim olan, hem oksidaz enzimi ROS oluşumuna neden olur.

**9-** Endoplazmik retikulum e<sup>-</sup> transport sistemleri

**10-** Peroksizomlarda bulunan oksidazlar: Bol miktarda hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) üretirler.

**11-** Araşidonik asit metabolizması: Lipooksigenaz ve siklooksigenaz, reaksiyonun katalizi sırasında ROS oluştururlar.

**12-** İskemi, travma, intoksikasyon (57).

### 2.2.1.2. Serbest Radikallerin Genel Reaksiyonları

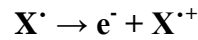
Serbest radikaller, diğer moleküllerle çeşitli şekillerde reaksiyona girerler.

**1.** İki serbest radikal karşılaştıklarında, her ikisinin de ortaklanmamış elektronları bir kovalent bağ oluşturacak şekilde birleşirler ve radikal özelliklerini kaybederler (58).

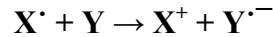


**2.** Bir serbest radikal, radikal olmayan bir bileşikle reaksiyona girdiğinde yeni bir radikal oluşur:

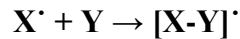
► Radikal, ortaklanmamış elektronunu eşlemek üzere radikal olmayan başka bir bileşikten elektron alabilir (okside edici radikal).



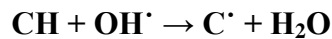
► Radikal, ortaklanmamış elektronunu radikal olmayan bir bileşiğe verebilir (redükte edici radikal).



► Radikal, radikal olmayan bir bileşiğe katılabilir.



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





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

Bu özellikleri ile reaktif oksijen türleri; tablo 3' te verildiği gibi radikaller ve radikal olmayanlar olarak iki ana başlık altında incelenmektedir (59).

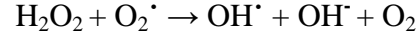
**Tablo 3.** Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (59)

<b>Radikaller</b>	<b>Radikal Olmayanlar</b>
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$ Hidroksil, $OH^{\cdot}$ Peroksil, $RO_2^{\cdot}$ Alkoksil, $RO^{\cdot}$ Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$ Nitrik oksit, $NO^{\cdot}$	Hidrojen peroksit, $H_2O_2$ Hipokloröz asit, $HOCl$ Ozon, $O_3$ Singlet Oksijen, $O^{\cdot}$ Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$ Hidroperoksit, $L(R)OOH$

### 2.2.1.3. Serbest Radikal Türleri

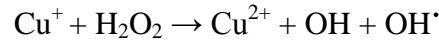
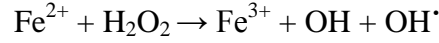
#### 2.2.1.3.1. Süperoksit Radikalleri ( $O_2^{\cdot-}$ )

Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan bir ajandır.  $O_2^{\cdot-}$  radikalleri hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedirler.  $O_2^{\cdot-}$  oluşumu; elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Uzun bir yarı ömre sahip olup, lipofilik özellik gösterir. Bu özelliğinden dolayı da oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir. Zayıf bir oksidan olan  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak  $O_2^{\cdot-}$  radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir. Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda  $O_2$  ve  $H_2O_2$ ,  $Fe^{2+}$  varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ) radikallerini oluşturmaktadır. Üretilen bu  $OH^{\cdot}$  radikalleri oldukça reaktif olup, DNA gibi yapılarla reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir (56, 57).



### 2.2.1.3.2. Hidroksil Radikalleri (OH<sup>·</sup>)

Hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin Fe<sup>2+</sup> veya Cu<sup>2+</sup> ile reaksiyona girmesiyle OH<sup>·</sup> oluşmaktadır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde, bu oluşan OH<sup>·</sup> radikalinin olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiştir ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.

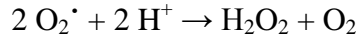


Hidroksil radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücrel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. OH<sup>·</sup> radikallerinin, DNA' da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve oluşan bu ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine OH<sup>·</sup> radikalleri aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiğinden, DNA ve RNA' da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak, radikal oluşumuna neden olurlar. Örneğin; timine katılarak timin radikalini oluşturabilir ve timin radikali de oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil radikaline dönüşebilir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen OH<sup>·</sup> radikali, DNA' nın baz ve şeker yapılarında da ciddi hasarlar oluşturarak DNA üzerinde zincir kırıkları meydana getirirler. Hasarın çok kapsamlı olması durumunda, oluşan hasar hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelebilir (56, 57, 60).

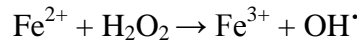
### 2.2.1.3.3. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. O<sub>2</sub><sup>·</sup> radikalinin, hidrojenle verdiği reaksiyona '*Dismutasyon Reaksiyonu*' adı verilir

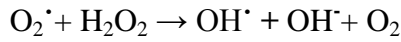
ve dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanır (56, 57). Reaksiyon şu şekilde ifade edilir:



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen bileşikleri kapsamına girer. Çünkü  $Fe^{2+}$  veya diğer geçiş metallere varlığında Fenton reaksiyonu,  $O_2^{\cdot}$  radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan  $OH^{\cdot}$  radikali oluşturur (59).



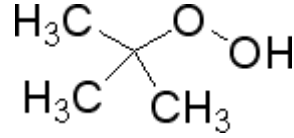
### **Fenton Reaksiyonu**



### **Haber – Weiss Reaksiyonu**

#### **2.2.1.3.4. Tersiyer Bütil Hidroperoksit (t-BHP)**

Organik bir hidroperoksit olan t-BHP, oksidatif hücre hasarı mekanizmalarını kapsayan çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir bileşiktir ve açık formülü şekil 4’ te verilmiştir. Organik hidroperoksitler alkil radikallerine bir oksijen eklenmesi ve/veya peroksil radikallerinden bir hidrojen atomunun çıkarılması sonucu oluşurlar. t-BHP sonradan diğer alkoksil ya da peroksil radikallerine ayrışabilir ve bu durum lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını hızlandırabilir. Bu ayrışma reaksiyonları metal iyonları ve onların kompleksleri vasıtasıyla gerçekleşir. t-BHP kaynaklı toksisitenin nedenleri için önerilen etki mekanizmaları şöyledir; intraselüler kalsiyum dengesindeki değişiklikler ve bunu takiben glutatyon ve protein tiyol düzeyindeki azalma, DNA tek zincir kırıklarının oluşumu, lipid peroksidasyonunun başlaması ya da tersiyer bütoksil radikallerinin oluşması. t-BHP kaynaklı genotoksisite; bir geçiş metali aracılıklı reaksiyon ile  $H_2O_2$  gibi değişik tipteki ROS’ ların üretimiyle sonuçlanan bir süreçtir (61, 62).



**Şekil 4.** t-BHP' nin açık kimyasal formülü

#### 2.2.1.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu; inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı ( $pO_2$ ), ozon ( $O_3$ ), azot dioksit ( $NO_2$ ), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikallerin; hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine olan zararlı etkileri tablo 4 ve şekil 5' te özetlenmiştir.  $O_2^{\cdot}$  radikali ve  $OH^{\cdot}$  radikali; sitoplazma, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır, nüklear ve mitokondriyal DNA okside olur (17, 55).

**Tablo 4.** Serbest radikallerin hücredeki başlıca zararlı etkileri

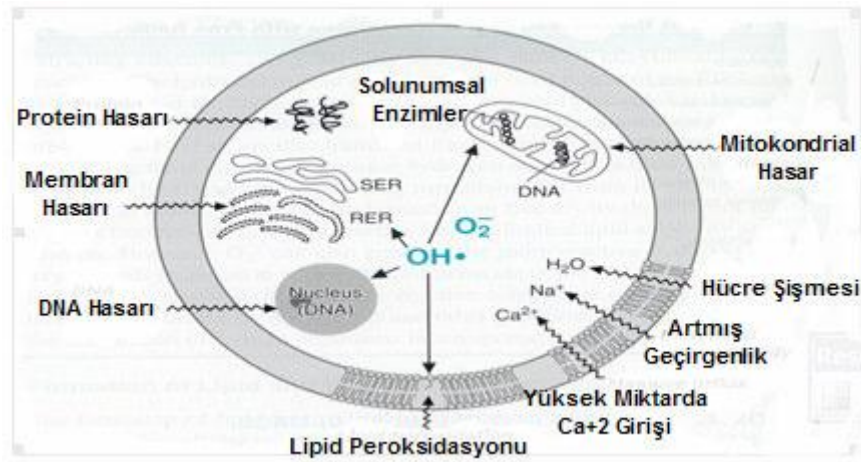
Lipidler	Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon Lipidlerde çapraz bağlanmalar
Karbohidratlar	Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asitler	Tek ve çift zincir kırıkları, protein çapraz bağları, baz içermeyen bölgeler, kimyasal modifikasyonlar
Proteinler	Peptid zincirinde kopmalar, denatürasyonlar, enzim inhibisyonu

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının, birçok patolojik olayda ve hastalıkta rolü olduğu düşünülmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarı, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, akut renal yetmezlik, diyabet, böbrek yetmezliği, anfiyem/bronşit, kanser, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar gibi durumlarda ROS aracılıklı hücre hasarı söz konusudur (55, 63).

## 2.2.2. Oksidatif Stres ve Hastalıklardaki Rolü

Oksidatif stres serbest radikal oluşumu ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulduğu durumda ortaya çıkar (18).

Serbest tiyol oksidasyonu ve protein disüflitlerinin ortaya çıkması, ATP havuzundaki azalma, serbest sitozolik kalsiyumun yükselmesi, sitoskelet elemanlarının bütünlüğünün kaybolması, plazma membranı geçirgenliğinin artması, plazma membranında artmış peroksidasyon, sitozolik bileşenlerin hücre dışına çıkması ve artmış DNA hasarı oksidatif stresin bulguları arasında gösterilebilir (61).



Şekil 5. Hücrede radikal aracılı hasar (56)

Oksidatif stresin biyolojik etkileri; oluşan ROS' ların içeriğine, kokarsinojenlerin varlığına, maruz kalma süresine ve konsantrasyonu ile maruz kalma sırasında hücre siklusunun durumuna bağlıdır (63).

Endojen ROS' ların esas kaynağı öncelikle mitokondrilerdeki oksidatif metabolizmanın ürünleridir. Reaktif oksijen türleri her zaman hücresel metabolizmanın bir ürünü olmayabilir; sitokinlere, büyüme faktörlerine ve spesifik sinyal yollarındaki ikincil habercilere cevap olarak özel plazma membran oksidazları tarafından da üretilir (64).

Hücresel oksijen konsantrasyonu, metabolik ölüme yol açan yetersiz oksijenden ve oksidatif hasara yol açan aşırı oksijenden kaçınarak sağlanır. Enerji üretiminin esas bileşeni olan oksijen, gerçekten de çoğu yaşamsal yapılar için tehlikelidir. Oksijen toksisitesine karşı ilk savunma sistemi, tüm memelilerde görülen % 20' lik çevresel oksijenin, % 0,5-5' lik

dokulardaki konsantrasyonunu sağlayan oksijen basıncının net gradientidir. Dokulardaki bu rölatif oksijenin düşük konsantrasyonu, canlıyı oksidatif hasardan korumaktadır (63).

Oksidatif stres, ateroskleroz, diyabet, kanser, kronik inflamasyon hastalıkları, santral sinir sistemi bozuklukları gibi fizyopatolojik olaylarda, hücre yaşlanmasında ve dolayısıyla hücresel yıkım, hücre hasarı ve hücre ölümünde rol oynayan önemli bir mekanizma olarak son yıllarda büyük önem kazanmıştır (15, 16).

## **2.3. DNA Hasarı ve Tamir Mekanizmaları**

### **2.3.1. DNA Hasarı**

Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde devamlı olarak hasarlar oluşmakta, oluşan hasarlar DNA tamir sistemleri tarafından onarılmaya çalışılmakla birlikte, hasarın çok büyük boyutta olduğu veya DNA onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasarlar birikmektedir. Bu birikme zamanla mutasyonlara ve hücre ölümüne neden olmaktadır. DNA' da hasar oluşturan ajanlar, hasar tipleri ve tamir mekanizmaları şekil 6' da özetlenmiştir.

DNA üzerinde oluşan hasar iki grupta incelenebilir:

#### **A. Kendiliğinden değişimler sonucu oluşan hasar**

- a) Yanlış eşleşme
- b) Bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimler
  - 1- Keto-enol tautomerizasyonu
  - 2- Bazların deaminasyonu
- c) Baz kaybı
- d) Oksidatif hasar

#### **B. Çevresel hasar**

- a) DNA hasarına yol açan fiziksel etkenler
  - 1- İyonizan radyasyon
  - 2- Ultraviyole (UV)
- b) DNA hasarına yol açan kimyasal etkenler
  - 1- Alkilleiyici maddeler
  - 2- Çapraz bağlayıcılar
  - 3- Elektrofilik reaktanlara metabolize edilen kimyasallar (17).

Oksidatif hasara bağı olarak DNA' da, tek ve çift zincir kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker-fosfat omurgası hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (65, 66).

ROS kaynaklı hasarın iki farklı şekilde olduğu öne sürülmektedir:

**1- Fenton Kimyası** hipotezinde OH<sup>•</sup> radikalleri DNA' ya saldırarak hasar oluşturur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> gibi radikaller doğrudan DNA hasarı oluşturamazlar. OH<sup>•</sup> radikalinin DNA üzerine etkili olabilmesi için bizzat DNA' da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. Fe<sup>2+/3+</sup> ve Cu<sup>+2+</sup> iyonları negatif yüklü DNA' ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi, oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA' ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin hedefi haline getirmektedir (58, 59). DNA' ya bağlı metal iyonları ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin DNA üzerindeki reaksiyonu sonucu oluşan OH<sup>•</sup> radikalleri, OH<sup>•</sup> radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, OH<sup>•</sup> radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA' ya hasar verebilmektedirler (67).

**2- Nükleaz Aktivasyonu** hipotezine göre oksidatif stres, sitozolik Ca<sup>2+</sup> iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olarak, nukleusdaki Ca<sup>2+</sup> bağımlı endonükleazları aktive etmekte ve DNA' nın fragmantasyonuna neden olmaktadır. Nükleaz aktivasyonu DNA bazlarında kimyasal değişikliklere neden olmamaktadır. Ca<sup>2+</sup> şelatörlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır.

*In vivo* koşullarda her iki hipotezin de birlikte geçerli olduğu kabul edilmektedir. Hücre tipine ve oksidatif stres etkenine bağlı olarak mekanizmalardan biri öne çıkmaktadır. Metal iyonlarının varlığı reaksiyon hızını, mekanizmasını ve baz modifikasyonunun türünü etkilemektedir (68).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. Cu<sup>2+</sup> iyonları DNA' da G-C' den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. DNA yapısında bulunan 8-OH guaninin, G≡C → T=A mutasyonuna neden olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (17). Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-OH-dG' dir (65, 66, 69). Normal insan hücresinde bile yaklaşık olarak 10<sup>5</sup> guanin rezidüsünde, bir 8-OH guanin oluşmaktadır (70). Günümüzde HPLC ve GC-MS ile düzeyi belirlenebilen 8-OH guanin, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu DNA hasarının belirlenmesinde en çok kullanılan belirteçtir (17).

### 2.3.1.1. DNA Hasarının Yol Açtığı Yanıtlar

Hücrede DNA hasarı oluştuğunda dört önemli yanıt meydana gelir:

1. Hasarlı DNA' nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA tamir mekanizması),
2. DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin onarımına imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,
3. Hücredeki gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi (transkripsiyonel cevap),
4. Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elenmesi (programlı hücre ölümü, apoptoz)

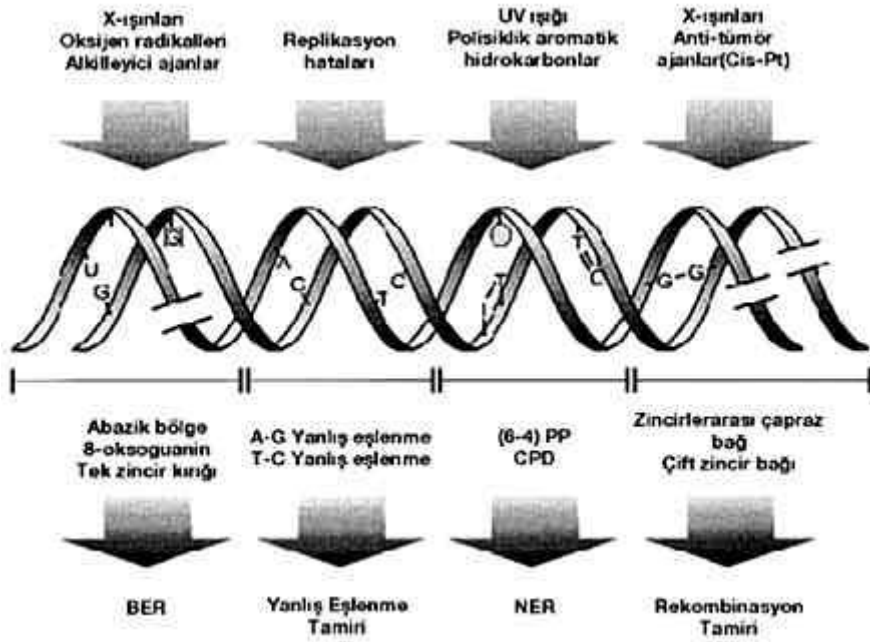
Bu yanıtlardan herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (71).

### 2.3.2. DNA Tamir Mekanizmaları

Hasar tipine bağlı olarak ökaryotlardaki DNA tamir mekanizmaları dört ana yolakla özetlenebilir:

1. Baz eksizyon tamiri, (base excision repair); (BER)
2. Nükleotid eksizyon tamiri, (nucleotide excision repair); (NER)
3. Serbest uçların homolog olmayan bağlanması, (Non-homolog end joining); (NHEJ)
4. Homolog rekombinasyon, (Homolog recombination); (HR) (19).





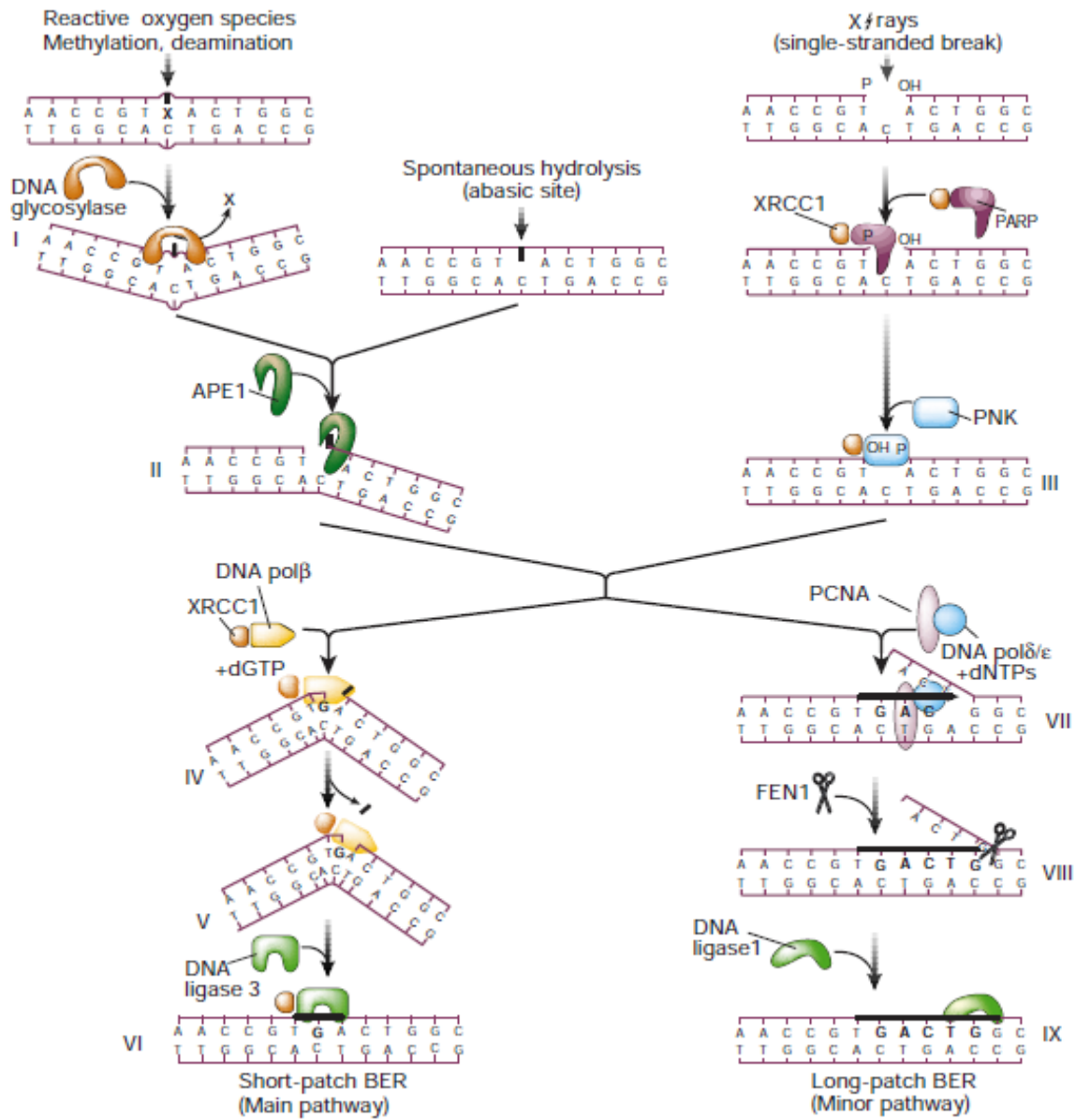
**Şekil 6.** DNA’ da hasar oluşturan ajanlar, hasar tipleri ve tamir mekanizmaları (71)

Oksidatif stres sonucunda ortaya çıkan serbest radikaller genellikle baz değişimlerine, tek ve çift DNA ipliği kırıklarına neden olduğundan dolayı DNA tamir yollarından baz kesip çıkarma tamiri, homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi tamiri devreye girmektedir. ROS’ un yol açtığı tek zincir DNA kırıkları BER ile tamir edilmektedir (72).

### 2.3.2.1. Baz Eksizyon Tamiri

Baz eksizyon tamiri dört temel basamakta gerçekleşir (hasarlı bazın uzaklaştırılması, apürinik/aprimidinik bölgenin oluşturulması, doğru bazın yerleştirilmesi ve ligasyon). Şekil 7’ de verilmiştir. Bu reaksiyonların gerçekleştirilmesinde dört enzim sınıfı görev alır; DNA glikozilazlar (hOGG (human 8-oxoguanin DNA glikozilaz)-1, Neil-1/2 (human Nei-like enzim, NTH (endonükleaz III)), APE, DNA polimerazlar ve DNA ligazlar.

Bu tamir mekanizmasının ilk basamağı, hasarlı bölgenin DNA glikozilaz enzimi tarafından tanınma aşamasıdır. DNA glikozilaz enzimi hasarlı bölgeyi tanımak için DNA’ nın küçük oyuna yerleşir ve hasar gören baz ile nükleotidin şeker birimi arasında bulunan N-β glikozid bağı kırarak bazın polinükleotidden ayrılmasını gerçekleştirir. DNA glikozilazın hasarlı bazı ayırmasından sonra oluşan bazsız bölge apürinik/aprimidinik bölge (AP bölgesi) olarak adlandırılır. AP bölgesi AP endonükleazlar (insanda APE1) tarafından tanınır.



Şekil 7. Baz kesip çıkarma tamir yolu (19)

XRCC1 enzimi (X-ray cross complementing enzyme) ise hasarlı bölgede DNA glikozilaz enziminin APE1 ile yer değiştirmesini sağlar ve hasarlı bazın çıkarılmasını hızlandırır. AP bölgesindeki fosfodiester bağlarının APE1 tarafından yıkılmasının ardından poli ADP-riboz polimeraz-1 (PARP-1) enzimi kırık DNA uçlarına bağlanarak bu uçları yıkımdan korumaktadır. PARP-1 kendisini ADP-ribozilasyonla aktifleştirmektedir. PARP-1 aktive olduktan sonra BER mekanizmasında fonksiyon gören enzimlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. PARP-1 tarafından aktive edilen XRCC1 enzimi, APE1 enziminin polimeraz  $\beta$  ile bağlantısını sağlayarak polimerizasyon ve bağlama basamağının aktivite kazanmasını

sağlamaktadır. Bu aşama sonrasında tamir, kısa ve uzun olmak üzere iki alternatif yoldan devam eder. Memelilerde, kısa yolda sadece bir hatalı nükleotid, uzun yolda ise 2-12 nükleotidden oluşan fragmentler kesilip çıkartılır. AP bölgesinin bağlanması kısa yolda DNA polimeraz  $\beta$  tarafından gerçekleştirilir. BER' in en son basamağında ise oluşan boşluk DNA polimeraz  $\beta$  ile doldurulur ve DNA ligaz ile fosfodiester bağının oluşumu katalizlenir. Kısa BER yolağında Ligaz 3, uzun BER yolağında ise Ligaz 1 adı verilen DNA ligaz enzimleri görev almaktadır (19, 72, 73, 74, 75).

### **2.3.2.1.1. hOGG-1**

hOGG-1 hem okside guanin (8-OHG) ile deoksiriboz yapısı arasındaki N-glikozid bağlarını keserek 8-OHG' nin uzaklaştırılmasını hem de  $\beta$ -eliminasyon reaksiyonu ile fosfodiester bağını keserek abazik bölge oluşmasını katalizleyen DNA glikozilaz/AP liyaz aktivitesine sahip bifonksiyonel bir enzimdir. Ancak hOGG-1' in AP liyaz aktivitesi glikozilaz aktivitesinden daha zayıftır. Memeli hOGG-1 enziminin serbest hali ile DNA' ya bağlanmış şekli konformasyonel olarak birbirinden farklıdır. Enzimin aktif bölgesi Lys249 olarak belirlenmiştir ve 8-OHG:C baz çiftinin tanınması için bu bölgeden hem 8-OHG' ye hem de sitozine hidrojen bağlarıyla bağlanması gerekmektedir (76, 77).

### **2.3.2.1.2. Neil-1**

Neil endonükleazlar bakteriyel MutM/Nei ailesinin homologudurlar. Neil-1 endonükleaz oldukça geniş bir substrat havuzuna sahiptir ve formamidoprimidin A (FapyA), formamidoprimidin G (Fapy G), timin glikol, 5-hidroksi urasil gibi modifiye bazları tanıyarak DNA zincirinden çıkarabilmektedir (78).

Neil endonükleazlar, OGG-1 ve NHT-1' den farklı olarak DNA replikasyonu veya transkripsiyon esnasında oluşan tek zincir üzerindeki baz lezyonlarını da kesip çıkarabilmektedirler (79).

DNA zinciri üzerinde tek zincir kırıklarının yakınında bulunan 5-OH-Urasil ve 8-OH Guanin lezyonlarının NTH-1 ve hOGG-1 DNA glikozilaz enzimleri tarafından etkili bir şekilde ortadan kaldırılamadığı Neil-1 enziminin bu kesme işlemini etkili bir şekilde yaptığı bildirilmiştir (80, 81).

## 2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta *antioksidan savunma sistemi* adı verilen birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Tablo 5’ te verilmiştir. Bütün hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı mücadele etmektedirler. Savunma sistemleri; serbest radikal toplayıcılar ve bazı enzimlerden oluşmakta olup, savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır. Antioksidanlar reaktif oksijen ürünlerini inaktive eden ve bu nedenle oksidatif hasarı önleyen ya da geciktiren bileşiklerdir (82). Gıdalar ile alınan antioksidanların başında E vitamini, C vitamini, fenolik bileşikler ve karotenoidler gelir (56).

**Tablo 5.** Antioksidan sistem (1)

Enzimatik	Non-enzimatik	
Sürekoksit dismutaz (SOD)	Glutatyon	Bilirubin
Katalaz (CAT)	$\alpha$ -tokoferol (Vit E)	Ürik asit
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	Askorbik asit (Vit C)	Melatonin
Glutatyon redüktaz (GR)	$\beta$ -karoten	Laktoferrin
Glutatyon S-transferaz (GST)	Flavonoidler	Albümin
Mitokondriyal sitokrom oksidaz	Seruloplazmin	Transferrin

Antioksidanların oksidatif strese karşı koruyuculukları, reaktif oksijen bileşiklerine karşı reaktivitelerine bağlıdır. *In vitro* çalışmalarda flavonoidler, basit fenolik asitler ve karotenoidler gibi doğal bileşiklerin çok etkili serbest reaktif oksijen süpürücüleri olduğu ancak bunların kendilerinin de reaktif sekonder radikaller olabileceğine ilişkin bulgular elde edilmiştir. Bu sekonder radikaller hücre içine ulaşıp burada lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hedeflerde sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açabilecek değişiklikler yapabilir. Gıdalarda bulunan antikarsinojen özellikteki bileşiklerin antioksidan özellik taşıdığı bilinmektedir. Bu bileşiklerin işlevleri; serbest radikallerin süpürülmesi, antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesini artırma ya da redoks homeostazındaki biyokimyasal olayları etkilemektir. Birçok rahatsızlığa karşı koruyucu olduğu varsayılan antioksidanlar ile ilgili

çalışmalar *in vitro* koşullarda yapılmış olup, *in vivo* çalışmalardan elde edilen bilgiler sınırlıdır. Antioksidan etkinin kansere karşı koruyucu rolü henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır (83).

#### 2.4.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları

**A. Toplayıcı (scavenging) etki:** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler ve fenolik bileşikler bu tipte etki gösterirler.

**B. Bastırıcı (quenching) etki:** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak, aktivitelerini azaltan ve inaktif şekle dönüştüren mekanizmadır. A vitamini ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

**C. Onarıcı (repair) etki:** Antioksidan özelliğe sahip polifenolik bileşiklerin, BER mekanizmasında görevli olan 8-oxoguanin DNA glikozilaz 1, apürinik/aprimidinik endonükleaz ve DNA polimeraz beta gibi DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini ve ekspresyonlarını indüklediği ortaya konulmuştur.

**D. Zincir kırıcı (chain breaking) etki:** Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak, zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller zincir kırıcı özellik gösterirler (22, 84, 85).

#### 2.5. Hücre Canlılık Testleri

Hücre sayımında klasik yöntem bir mikroskop altında sayım için hazırlanmış bir lam (hematositometre) ile ölü-canlı hücre ayrımını sağlayacak olan bir boyanın (tripan blue) kombine kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Günümüzde ise elektronik sayıcı ünitelere sahip özellikle kümeleşmeyen hücreler için tasarlanmış otomatik cihazlar kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra organel canlılığını esas alan yöntemler de geliştirilmiştir.

Mikroskop altında yapılan hücre canlılığı analizlerinde sıklıkla tripan blue yöntemi kullanılabilir. Burada hematositometre lamı olarak Neubauer lamı yaygın bir kullanıma sahiptir. Hücre solüsyonu tripan blue boyasıyla karıştırılınca canlı hücreler küçük ve yuvarlak halde kalırken, ölü hücreler  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz' ın işlevsizliği nedeniyle hücre içinde biriken  $\text{K}^{++}$  dan dolayı şişkin, büyümüş ve koyu mavi olarak görülürler.

MTT yöntemi ilk kez Mosmann tarafından 1983 yılında tanımlanmıştır. Hücre canlılığı, proliferasyonu ve aktivasyonu hakkında fikir verebilen hassas, kantitatif ve güvenilir bir kolorimetrik metottur. Yöntemin esası yaşayan hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin kapasitelerine göre sarı renkli suda çözünebilen 3-(4,5-dimetil hidrazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür boyasını suda çözünmeyen koyu mavi formazan kristallerine dönüştürebilmesine dayanır. Üretilen formazan kristallerinin miktarı çalışılan hücre serisinin canlılığı ile doğrudan orantılıdır. MTT yöntemi özellikle bölünmeyen aktif hücrelerin canlılığının belirlenmesinde çok kullanışlıdır.

Nötral red yöntemi *in vitro* hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla tasarlanmış, yıllar içerisinde modifiye edilerek *in vitro* sitotoksite çalışmalarında kullanılabilir hale getirilmiştir. Nötral red (3-amino-7-dimetil-2-metilfenazin hidroklorür) suda çözünebilen, zayıf bazik karakterde, supravital bir boyadır ve canlı hücrelerin lizozomlarında birikir. Boyanın hücrelere girişi membrandan pasif transport ile gerçekleşir. Hasarlı ya da ölü hücreler lizozoma giren nötral red boyasını sitoplazmik vakuollerde daha fazla tutamazlar ve plazma membranı da boyanın hücre içerisinde kalmasını sağlayacak bir bariyer görevi göremezler.

LDH yönteminin esası pirüvatın laktata indirgenmesini sağlayan laktat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.27) enziminin aktivitesinin ölçülmesine dayanır. Bu indirgenme NADH' ın NAD<sup>+</sup> ya oksidasyonu eşliğinde 340 nm' de spektrofotometrik olarak izlenir (86).

## **2.6. Oksidatif DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler**

Alkali elüsyon, alkali unwinding, GC-MS, HPLC (elektrokimyasal dedektör ile) ve komet analizi günümüzde oksidatif DNA hasarını belirlemede kullanılan yöntemlerdir. Alkali elüsyon ve alkali unwinding güvenilir ve duyarlılığı yüksek metodlar olmasına rağmen, komet analizine göre daha kısıtlı uygulama alanına sahiptirler. HPLC ve GC-MS, DNA hasarını belirlemede ileri teknikler olmalarına rağmen işlem süresinin uzun olması, daha maliyetli olmaları ve analize hazırlık aşamasında numunelerde, oksidasyon reaksiyonlarının gelişebilmesi sebebiyle, komet analizine göre nispeten daha az tercih edilmektedirler (20).

### 2.6.1. Komet Analizi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Sitogenetik yöntemler, mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişen komet analizi de çeşitli tipte DNA hasarlarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle yaygın kullanım görmektedir (63).

Tek hücre jel elektforez yöntemi ilk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek hücre DNA hasarını görüntülemek amacıyla geliştirilmiştir. Geliştirilen bu tekniğe göre hücreler mikroskopik lamalar üzerindeki agaroz jelle gömülür, tuz ve deterjan içeren çözeltilerle muamele edilip lizise uğrattılmakta ve nötral şartlarda elektforez yapılarak, DNA serbestleştirilmekteydi. Elektrik akımı uygulanması, kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmanlarının, çekirdekten hızla göçünü sağlamaktaydı. Özellikle DNA çift zincir kırığı (DSB) artmış hücrelerde, kırık DNA'nın katottan anoda göçü floresans bir boya ile boyanarak görüntülenmekteydi. Görünüşleri itibariyle kuyruklu yıldız benzediklerinden *comet* diye adlandırılan bu görüntüler ölçülüp değerlendirilmekteydi (87).

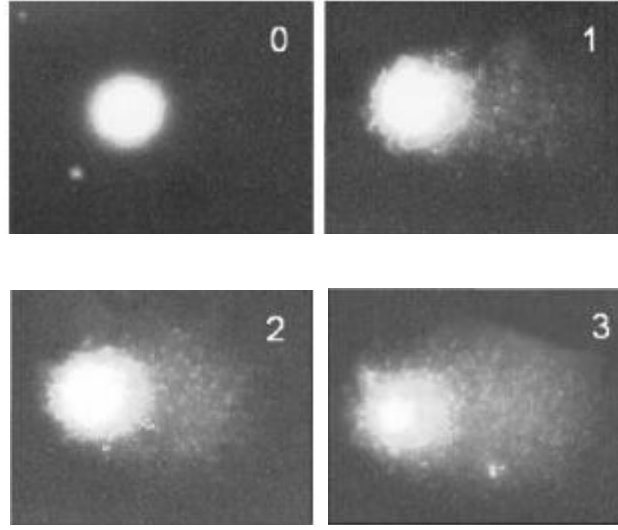
DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermemekteydi. Ayrıca, DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı daha sonradan Singh ve arkadaşları (1988) ile Olive ve arkadaşları tarafından (1989), alkali şartlarda (pH >13) elektforeze dayalı mikrojel tekniği tanımlanmıştır. Olive ve arkadaşları da bundan iki yıl sonra bu tekniğin başka bir alkali versiyonunu (pH >12.3) geliştirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda da Collins ve arkadaşları (1993) ile Singh ve arkadaşları (1994) tarafından modifiye protokoller geliştirilmiştir (63). Böylelikle komet tekniğinin yeni dizaynı, insan hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasarı büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır. Bunun yanı sıra DNA hasar/onarım tespiti ve mekanizması ile genotoksisite çalışmalarında da kullanılabilir (87, 88, 89, 90).

Komet görüntülerinin değerlendirilmesi iki şekilde yapılır:

- 1- Görsel analiz
- 2- Bilgisayar analizi

Gözlemler için 515-600 nm eksitasyon filtreli epi-floresans mikroskop kullanılır. Floresans boya ile boyanan hücreler floresans mikroskopta her alana birkaç hücre düşecek

şekilde, en azından 100 hücre olacak şekilde değerlendirilir. Komet skorlamasında en basit yöntem görsel değerlendirmedir. Hasar büyüklüğü; hasarsızlıktan en çok hasara doğru 0-3 arasında olacak şekilde sınıflandırılır. Şekil 8’ de verilmiştir. Görsel analiz, komet görüntülerinin değerlendirilmesinde yaygın kullanıma sahiptir. Özellikle basit olması, daha az zaman alması ve pahalı bilgisayar sistemlerine gereksinim göstermemesi sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Uzman gözlerin yaptığı görsel analiz sonuçları ile bilgisayarlı analiz sonuçları arasında önemli farklar olmadığı otoritelerce vurgulanmaktadır (88, 89, 90, 91, 92).



**Şekil 8.** Görsel analiz ile komet skorlaması (92)

## **2.7. mRNA Ekspresyon Çalışmaları**

### **2.7.1. Real-Time PCR**

Real-time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu), DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir.

Bilim ve tıp alanındaki çalışmalarda nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniğin real-time PCR olduğu ortaya konulmuştur. Bu teknik 80’li yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PCR’ ın ileri bir versiyonudur. Klasik PCR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz etmek için çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek



başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte, işlem sonrasında da ürün miktarını net olarak belirlemek oldukça güçtür. Çünkü klasik PCR başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak bir ürün miktarı ortaya çıkarır. Higuchi ve arkadaşları 1992 yılında real-time PCR' ı geliştirmişlerdir. Real-time PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünün miktarını real-time PCR sırasında gözlemek mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi real-time PCR' ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkan reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü floresans işaretli probalar ile sağlanır (93, 94).

Son zamanlarda bilimsel araştırmalar için kullanılan gen ekspresyon çalışmalarında kantitatif real-time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilmekte ve gen ekspresyon seviyeleri hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Real-time PCR ile elde edilen veriler mutlak kantitasyon (absolute quantification) veya göreceli kantitasyon (relative quantification) analiz teknikleri ile değerlendirilmektedir. mRNA ekspresyon çalışmalarında ise relative quantification kullanılmaktadır. Bu teknikte aynı örneğe ait iki farklı hedef genin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılır ve sonuç bu hedeflerin oranı olarak ifade edilir. Karşılaştırma amacıyla kullanılan ikinci gen ekspresyonu referans gen olarak isimlendirilir ve tüm deney şartlarında değişmez miktarda eksprese olduğu kabul edilir. Bu referans gen internal kontrol olarak bilinir ve örnekten örneğe olan farklılıkların değişiminin normalizasyonu için kullanılır. İlgilenilen genin deney gruplarının ekspresyon seviyeleri muamelesiz grup (negatif kontrol) ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak rölatif olarak ifade edilir. Böylelikle rölatif kantitasyon kullanıcılar bir hedef genin en az iki farklı durumdaki ekspresyon profilini kolayca karşılaştırmaya olanak sağlar. Rölatif kantifikasyon gen ekspresyonunun belirlenmesinde en iyi teknik olarak kabul edilmektedir (21).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Kullanılan Cihaz, Alet, Malzeme ve Kimyasallar

##### 3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Tezde kullanılan cihaz, alet ve malzemeler tablo 6' da verilmiştir.

**Tablo 6.** Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka / Model
Derin dondurucu, -20°C	Vestel
Derin dondurucu, -80°C	Thermo Electron Corporation
Dalga boyu ayarlanabilir mikropleyt okuyucu	VERSAmax Molecular Devices
Etüv	Heraeus
Çalkalayıcı	Eppendorf Thermo Mixer Comfort
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Manyetik karıştırıcı	Termal
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Pipet pompası	JetPip Pipette Aid
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Mikro santrifüj	Thermo EC Micromax Eppendorf 5810
Spektrofotometre	Shimadzu, UV – 1601
Vorteks (Karıştırıcı)	IKA Genius 3
Membran filtreleri	Agilent Econofilter 0,22µm

**Tablo 6.**Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler (Devamı)

Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO <sub>2</sub> inkübatör	Thermo Forma 381
Mikro dalga fırın	Altus ALMD 17I
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	Greiner Cellstar
Santrifüj	Eppendorf 5810
15 mL' lik ve 50 mL' lik steril falkon tüpler	TPP, Greiner
10 mL' lik steril disposable pipetler	Grenierbio-one, 607 180
Steril DNAaz, RNAaz free pipet uçları	Greiner (0,5-10, 1-200, 100-1000 µL )
Neubauer lamı ve lameli	Marienfeld
0,5 ve 1,5 mL' lik eppendorf tüpler	Greiner
Elektroforez tankı	Thermo EC320
Elektroforez güç kaynağı	Thermo EC250-90
Çalkalayıcı inkübatör	Shellab/Sheldon S14-2
Real-Time PCR Cihazı	Roche Light cyclers 480 II
RNA Konsantrasyon Ölçüm Cihazı	Nanodrop
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV
Gel Görüntüleme Sistemi	Gel Logic 200 Imaging System Carestream Health
Floresans mikroskop	Nikon Eclipse E800
Cam malzemeler (beher, erlen, balon joje, cam şişe)	Isolab
Pudrasız eldiven	Seasoul
EtBr Koruyucu eldiven	Broche
1/3 rodajlı lamalar	Honka
24x24 lameller	Marienfeld
Yatay ve dikey tip boyama şaleleri	Marienfeld
Tüp sporu	LP- Italiana
Çeker ocak	Gürçelik
Buzdolabı, +4 °C	Altus
Manyetik barlar	Marienfeld
Pens	Isolab
Lam sepeti	Marienfeld

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tezde kullanılan kimyasal maddeler tablo 7' de verilmiştir.

**Tablo 7.** Kullanılan kimyasal maddeler

<b>Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	<b>Satın Alındığı Firma, Kodu ve Saflığı</b>
Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)	Sigma
Etilen Diamin Tetra Asetik asit (EDTA)	Sigma
[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT)	Sigma, M2128-1G
Etanol	Merck, 1.00986, absolute
Real-Time PCR kiti (One step)	Qiagen Quantitect SYBR Green RT-PCR Cat. No. 204243
Metanol	J.T.Barker
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Carlo Erba reagents
Penisilin+Streptomisin	Gibco 15140
Fetal Bovine Serum	Biochrom S0113
Tripsin/ EDTA çözeltisi	Gibco 25300
Tripan Blue	Sigma, T8154
DMEM (yüksek glukoz ve L-glutamin içeren)	Lonza
Etidyum Bromür	Sigma, E7637-1G
PBS Tablet	Medicago, 09-2051-100
NMP Agaroz	Sigma
Agarose Type 1-A Low EEO	Sigma
Poly L-Lysine	Biochrom
pH-metre kalibrasyon çözelti (4.01, 7.00, 9.18)	Merck
Sodyum Klorür	Merck
Tris Baz	Sigma
Triton X-100	Sigma
Sodyum hidroksit	Riedel-de-Haen
RNA İzolasyon Kiti	Qiagen (RNeasy Mini Kit (50) Cat. No. 74104)

### 3.2. Kullanılan Metodlar

#### 3.2.1. Deneyin Planlanması

Daha önceden bölümümüzde yapılan bir başka çalışmada propolisin etanolik ekstraktlarının DNA hasarını engellediğinin tespit edilmesi üzerine planlanan bu çalışmada, propolis verilen hücrelerde DNA hasarı yapılarak DNA tamir enzimlerinin ekspresyonu üzerine etkisi tespit edilmeye çalışıldı. Öncelikle uygun hasarlayıcı t-BHP konsantrasyonunun tespiti için 0-1000  $\mu$ M arası konsantrasyonlarda t-BHP hücrelere verilerek 4 saat sonra komet analizi yapıldı ve en uygun hasarlayıcı konsantrasyonu bulundu. Daha sonra t-BHP ile verilen hasarın tamirini gerçekleştiren propolis ekstrakt konsantrasyonlarının bulunması için sabit

konsantrasyonda hasarlayıcı ile birlikte 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL konsantrasyonlarda ve 4, 8, 12, 24 saatlik periyotlarda hücelere etanolik propolis ekstraktı verilerek komet analizleri yapıldı. Komet analizlerinin sonuçlarına göre en uygun etanolik propolis ekstraktı konsantrasyonu tespit edildi. Son olarak mRNA ekspresyon çalışması için tablo 8’ de verilen şartlarda dört farklı saat için üç farklı grup deney koşulu oluşturularak RNA izolasyonları ve komet analizleri yapıldı.

**Tablo 8.** Oluşturulan deney grupları ve muamele şartları

Muamele Süreleri	Flask Numarası	İçerik
4 saat	111, 112, 113	Negatif (-) Kontrol Grubu: 200.000 hücre / flask
8 saat	121, 122, 123	
12 saat	131, 132, 133	
24 saat	141, 142, 143	
4 saat	114, 115, 116	Pozitif (+) Kontrol Grubu: 200.000 hücre / flask ve 300 µM t-BHP ile muamele
8 saat	124, 125, 126	
12 saat	134, 135, 136	
24 saat	144, 145, 146	
4 saat	117, 118, 119	Deney Grubu: 200.000 hücre / flask, 200 µg/mL propolis ekstraktı ve t-BHP ile muamele
8 saat	127, 128, 129	
12 saat	137, 138, 139	
24 saat	147, 148, 149	

### 3.2.2. Kullanılan Çözelti, Kimyasal Madde ve Malzemelerin Hazırlanması

#### DMEM Hazırlanması

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

### **Propolisin Etanolik Ekstraktlarının Hazırlanması (25 mg/mL)**

Fanus Gıda tarafından, Türkiye' nin çeşitli yörelerinden toplanarak temin edilen ve buzdolabında -20 °C' de dondurulmuş olan doğal propolis ürünü rendelendi. Rendelenen propolis, öğütücüde toz haline getirildi ve -20 °C' de donduruldu.

0,5 g toz propolis 10 mL saf etanol ile çözüldü. Saf etanol ile 20 mL' ye tamamlandı. İyice vortekslendikten sonra 60 °C' de 150 rpm' de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000 rpm' de 10 dk santrifüjlendi. Partikülleri tam çökmeyen propolis ekstraktları 10000 g' de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar süzgeç kağıdından süzüldü ve ardından 0,22 µm' lik filtrelerden geçirildi. Daha sonra kullanılmak üzere alikotlanıp -20 °C' de, karanlıkta saklandı.

### **t-BHP Hazırlanması**

1987,8 µL PBS steril 15 mL' lik falkon tüpe alındı. Üzerine stok t-BHP şişesinden (7.989 M) 12,5 µL konuldu. İyice vortekslenerek tamamen çözülmesi sağlandı. Böylece 50000 µM konsantrasyonda ara stok oluşturulmuş oldu.

### **MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) Çözeltisi (5 mg/mL) Hazırlanması**

1000 mg MTT boyası 6 mL dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldükten sonra hacmi steril PBS ile 200 mL' ye tamamlandı. İşlemler manyetik karıştırıcı üzerinde yapıldı. Tamamen çözüldükten sonra 0,22 µm' lik filtreden geçirilerek 1' er mL (5 mg/mL) alikotlanarak -20 °C' ye kaldırıldı.

### **PBS (Phosphate Buffer Solution), pH 7.4, 1 L**

Temiz bir behere 900 mL kadar saf su ve 10 tane PBS tablet konularak manyetik karıştırıcıda manyetik bar yardımıyla çözüldü. pH-metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra çözeltinin pH' sı 7.4' e ayarlandı. Çözelti balon jojeye aktarılarak, saf su ile son hacim 1 L' ye tamamlandı ve +4 °C' de saklandı.

**Liziz Çözeltisi, pH 10, 250 mL**

- NaCl, 2.5 M, 36,525 g
- EDTA, 100 mM, 9,305 g
- TRİS, 10 mM, 0,3025 g

Her biri tartılarak behere konuldu. Üzerine 200 mL saf su ilave edilip manyetik karıştırıcıda manyetik bar yardımıyla çözüldü. Kalibre edilmiş pH-metre ile pH 10' a ayarlandı. Balon jojeye aktarıldıktan sonra saf su ile son hacim 250 mL' ye tamamlandı ve +4 °C' de saklandı. Kullanılmadan önce son konsantrasyonu % 1 (v/v) olacak şekilde Triton X-100 eklendi.

**Elektroforez Tampon Çözeltisi, pH 13.1, 500 mL**

- 3M NaOH : 60 g NaOH tartıldı, 500 mL saf suda çözüldü ve +4 °C' de saklandı.
- 10 mM EDTA : 0,37224 g EDTA tartıldı, 100 mL saf suda çözüldü ve +4 °C' de saklandı.
- 50 mL 3M NaOH
- 50 mL 10mM EDTA
- 10 mL DMSO

mezürle ölçülerek behere aktarıldı ve üzerine 400 mL saf su ilave edildi. Kalibre edilmiş pH-metrede pH 13.1' e ayarlandı. Çözelti balon jojeye aktarılıp saf su ile son hacim 500 mL' ye tamamlandı ve çözelti +4 °C' de saklandı.

**Nötralizasyon Tampon Çözeltisi, 0.4 M, pH 7.5, 250 mL**

24,2289 g Tris tartıldı, temiz bir behere aktarıldı ve 200 mL kadar saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda manyetik bar yardımıyla çözüldü. Çözelti balon jojeye aktarılarak son hacim saf su ile 250 mL' ye tamamlandı ve +4 °C' de saklandı.

**LMP Agaroz Jel, % 1 (PBS içinde)**

0,1 g LMP agaroz tartıldı, üzerine 10 mL PBS (pH 7.4) eklendi. Mikrodalga fırında orta ısı ayarında 30 saniye kaynatılarak hazırlandı.

**NMP Agaroz Jel, % 0,5 (PBS içinde)**

0,05 g NMP agaroz tartıldı, üzerine 10 mL PBS (pH 7.4) eklendi. Mikrodalga fırında orta ısı ayarında 30 saniye kaynatılarak hazırlandı.

**Polilizin Kaplama Çözeltisi, 70 mL**

7 mL poli L-Lizin, 7 mL PBS ile karıştırıldı ve üzerine 56 mL saf su ilave edildi. Karışım +4 °C' de saklandı.

**Etidyum Bromür (100 µg/mL saf suda)**

80 mL PBS (pH 7.4) içine 32 µL etidyum bromür (100 µg/mL) eklenerek hazırlandı.

**1 N NaOH çözeltisi**

4 g NaOH 70-80 mL deiyonize suda çözüldü ve hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. TAE elektroforez tamponunun pH ayarlanmasında kullanıldı.

**Stok TAE (Tris-asetikasit-EDTA) Elektroforez Tamponu**

242 g Tris, 37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir miktar deiyonize suda çözüldü ve üzerine 57,1 mL asetik asit ilave edildi. 1 N NaOH ile pH 8.5'a ayarlandı ve son hacim 1 L' ye tamamlandı. Bu çözelti 50 kat seyreltilerek, hem elektroforez tamponu olarak, hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.



### **% 70 Etanol Hazırlanması**

% 100 etanol şişesinden 7 mL alındı, üzerine 3 mL DNAaz, RNAaz içermeyen su konularak karıştırıldı.

### **% 2' lik Agaroz Jel Hazırlanması**

0,8 g agaroz 40 mL TAE (tris-asetikasit-EDTA) tamponunda kaynatılarak çözüldü. Elde edilen jel biraz soğutulduktan sonra 10 µL etidyum bromür eklendi ve tarak yerleştirilmiş jel kabına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra jel elektroforez tankına yerleştirildi.

### **3.2.3. Hücre Kültürü**

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

#### **3.2.3.1. Primer Fibroblast Hücrelerinin Çözülmesi, Çoğaltılması**

Bu çalışmada, bölümümüzde yapılmış başka bir çalışmada dondurularak saklanmış olan primer fibroblast hücreleri kullanıldı. Fibroblast hücreleri L-Glutaminli, % 10 FBS, % 1 penisilin + streptomisin içeren DMEM (yüksek glukoz içeren) besiyerinde, % 5 CO<sub>2</sub> ortamında, 37 °C' de, T-25 ve T-75' lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı. Donmuş hücreler aşağıdaki şekilde çözüldü.

1. Kriyovial içinde bulunan 1 mL fibroblast hücreleri azot tankından çıkarıldıktan sonra 37 °C su banyosunda tamamen çözüldü.

2. Fibroblast hücreleri (1 mL) 15 mL' lik falkon tüpe aktarıldı ve hacmi L-Glutaminli, % 10 FBS, % 1 penisilin + streptomisin ve yüksek oranda (4,5 g/dL) glukoz içeren DMEM besiyeri ile 10 mL' ye tamamlandı.

3. Hücre süspansiyonu 400 g' de 5 dakika santrifüj edildi.

4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve hücre çökeleği tüpün ucuna parmak ucuyla vurularak, hücreler 1 mL besiyeri içinde çözüldü.

5. Çözülen hücrelerin üzerine istenilen miktarda taze DMEM (yüksek glukoz içeren) besiyeri eklendi ve % 5 CO<sub>2</sub> ortamında, 37 °C' de, T-75' lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı.

### 3.2.3.2. Primer Fibroblast Hücrelerinin Pasajlanması

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

1. Pasajlama için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.

2. 8 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra 75 cm<sup>2</sup>' lik flasklara, 3 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 3 dakika inkübatörde bekletildi.

3. İnkübasyon sonrası 9 mL % 10 FBS içeren DMEM (yüksek glukoz ve L-glutamin içeren) ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g' de 5 dakika santrifüjlendi.

4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra T-75 flasklara uygun sayıda hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi de 15 mL' ye tamamlandı.

### 3.2.3.3. Primer Fibroblast Hücrelerinin Sayılması

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

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

3. Işık mikroskobu altında 10x objektif kullanarak canlı ve ölü hücreler sayıldı. Ölü hücrelerde işlev görmeyen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz pompası nedeniyle boya membran tarafından absorblanmakta ve dışarı atılamamakta, dolayısıyla hücreler mavi renkte görülmektedir.

Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanlar sarı-yeşil renkte, ölü olanlar mavi renkte görüldü.

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

### 3.2.3.4. Hücrelerin Canlılık Testi, MTT Analizi

Bu yöntemde canlı hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenmesi özelliğinden yararlanır. Canlı hücreler mitokondriyal enzimleriyle MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak sarı renkli MTT boyası mor renkli formazan ürününe dönüştürülür. Hücre içerisinde tutulan formazan kristalleri DMSO ile çözündürüldüğünde oluşan renk yoğunluğu 570 nm' de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Renk yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile orantılıdır (95, 96). MTT testi için aşağıdaki işlemler sırası ile yapıldı.

#### Yöntemin Uygulanması

1. Hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 200  $\mu$ L besiyeri içinde 5000 hücre ekildi (97).
2. Başlangıçtan 24 saat sonra pleyt inkübatörden alındı, içeriği uzaklaştırıldı ve ilgili örnekten tablolardaki gibi eklendi. 24 saat 37 °C' de inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra pleyt içeriği uzaklaştırıldı ve kağıt peçete üzerine, ters çevrilerek vuruldu ve kalan besiyerinin uzaklaştırılması sağlandı.
4. Bütün kuyucuklara 190  $\mu$ L DMEM eklendi ve üzerine son konsantrasyonu 0,25 mg/mL olacak şekilde herbir kuyucuğa 10  $\mu$ L MTT boyası eklendi.
5. 2 saat 37 °C' de inkübe edildi.
6. Pleyt içeriği uzaklaştırıldı ve kağıt peçete üzerine, ters çevrilerek vuruldu ve kalan içerik uzaklaştırıldı.
7. Her kuyucuğa 200  $\mu$ L DMSO eklendi ve pleyt 30 dakika çalkalayıcıda bekletildi.
8. İnvirt mikroskop altında kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği kontrol edildi.

9. Mor renk şiddetinin absorbansı mikropleyt okuyucuda 570 nm dalga boyunda okundu. Her örneğin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin, kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı hesaplandı.

### **3.2.4. Deneylerde Kullanılacak t-BHP ve Etanolik Propolis Ekstraktı Dozlarının Bulunması**

#### **3.2.4.1. Fibroblast Hücre Serisi İçin Uygun t-BHP Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Hücrelerde toksik etki oluşturmadan, DNA hasarı oluşturacak t-BHP konsantrasyonun belirlenmesi için, flasttaki son konsantrasyonu 100-1000  $\mu$ M olacak şekilde t-BHP hücelere verilip 1 saat daha inkübe edildi. 1 saat sonunda flastklar PBS ile yıkanarak 4 saat boyunca hüceler kendi haline bırakıldı. Bu süre sonunda hüceler tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip ardından komet protokolü başlatıldı.

#### **3.2.4.2. t-BHP Kaynaklı DNA Hasarını Engelleyebilecek Propolis Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Hücelerde toksik etki oluşturmadan, t-BHP kaynaklı DNA hasarını engelleyebilecek propolis konsantrasyonun belirlenmesi için flasttaki son konsantrasyonu 100, 150, 200  $\mu$ g/mL olacak şekilde propolis ekstraktları verilip, 1 saat sonra flastklar PBS ile yıkandıktan sonra belirlenen konsantrasyondaki t-BHP flastklara ilave edilerek, hüceler 1 saat daha inkübe edildi. 1 saat sonunda flastklar PBS ile yıkanarak, 4, 8, 12, 24 saatlik gruplar şeklinde hüceler kendi haline bırakıldı. Bu süre sonunda hüceler tripsinizasyonla kaldırıldı, santrifüjlenip ardından komet protokolü başlatıldı.

### **3.2.5. Fibroblast Hücrelerinin Deney İçin Hazırlanması**

Hüceler yeterli miktarda çoğaltıldıktan sonra 4, 8, 12, 24 saatlik deneylerin yapılması için her saat grubunda hiç bir şey yapılmayan, sadece hasarlayıcı olan ve propolis ile hasarlayıcının bulunduğu deney flastkı olmak üzere 3' er adet 200.000 hücre içeren 25 cm<sup>2</sup> lik flastklar hazırlandı. Her çalışma 3' er kez tekrarlandı.

1. 75 cm<sup>2</sup> lik flasklardaki hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. 8 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra flasklara, 3 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 3 dakika inkübatörde bekletildi.
3. İnkübasyon sonrası 9 mL % 10 FBS içeren DMEM (yüksek glukoz ve L-glutamin içeren) ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g' de 5 dakika santrifüjlendi.
4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı tamamen uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde çözülerek hücre sayımı yapıldı.
5. Her grup arasında 5 dakika bırakılarak 3' er adet (1. flask: – kontrol, 4. flask: + kontrol, 7. flask: deney grubu bkz tablo 8 deney grupları planı) 25 cm<sup>2</sup> lik flask hazırlandı. Her bir flaska 200.000 hücre konuldu ve üzerine 5 mL DMEM(yüksek glukoz ve L-glutamin içeren) eklendi.
6. 24 saat hücrelerin oturması ve deneye hazır hale gelmesi beklendi.

### **3.2.6. Hücrelere İlgili Kimyasalların Uygulanması**

1. 7. Flaskın içeriği uzaklaştırıldı ve 5 mL PBS ile 2 kez yıkandı.
2. 7. Flaska 4 mL taze DMEM eklendi.
3. Taze DMEM (yüksek glukoz ve L-glutamin içeren) içine 32,5 µL 25000 µg/mL konsantrasyonda etanolik propolis ekstraktı eklenerek flask hafifçe öne arkaya hareket ettirilerek iyice karışması sağlandı. 1 saat inkübasyona bırakıldı.
4. 1 saat sonunda 7. ve 4. flask içeriği uzaklaştırılarak 5 mL PBS ile yıkandı.
5. İki flaska da 4 mL taze DMEM eklendi.
6. Eklenen taze DMEM (yüksek glukoz ve L-glutamin içeren) içine 50000 µM konsantrasyonda t-BHP çözeltisinden 24,1µL eklendi ve flask hafifçe öne arkaya hareket ettirilerek iyice karışması sağlandı. 1 saat inkübasyona bırakıldı.
7. 1 saat sonunda 1., 4. ve 7. flaskın içeriği uzaklaştırılarak 5 mL PBS ile yıkandı.
8. Flaska 5 mL taze DMEM (yüksek glukoz ve L-glutamin içeren) konularak 1. grup 4 saat, 2. grup 8 saat, 3. grup 12 saat ve 4. grup ise 24 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonların bitiminde hücrelerin bir kısmı komet analizi için geriye kalan kısmı ise total RNA izolasyonu için kullanıldı.

### 3.2.7. Total RNA İzolasyonu

1. Hücreler 25 cm<sup>2</sup>' lik flasktan kaldırıldıktan sonra 15 mL' lik falkon tüpüne alınarak 300 g' de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.

2. Pellet halindeki hücrelerin üzerine 350 µL Buffer RLT eklenerek 1 dakika vortekslendi.

3. Homojenize lizata 350 µL % 70' lik etanol eklendi ve pipetajlanarak iyice karışması sağlandı.

4. Elde edilen yaklaşık 700 µL örnek, 2 mL' lik tüpe yerleştirilmiş RNeasy spin kolona transfer edildi ve kapağı kapatılarak 8000 g' de 15 saniye santrifüjlendi. Eluat atıldı ve toplama kabı bir sonraki adımlarda tekrar kullanıldı.

5. 700 µL Buffer RW1 RNeasy spin kolona eklendi, kapağı kapatılarak 8000 g' de 15 saniye santrifüjlendi. Eluat atıldı.

6. 500 µL Buffer RPE RNeasy spin kolona aktararak 8000 g' de 15 saniye santrifüjlendi.

7. 500 µL Buffer RPE RNeasy spin kolona aktararak 8000 g' de 2 dakika santrifüjlendi.

8. Spin kolon yeni bir kolon tüpüne alınarak en yüksek hızda 1 dakika santrifüjlendi.

9. Spin kolon 1,5 mL' lik ependorf tüpe alınarak üzerine 40 µL RNAaz içermeyen su eklenerek 8000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen RNA çalışma gününe kadar -20 °C' de saklandı.

### 3.2.8. Komet Analizi

#### 3.2.8.1. Jellerin Döküleceği Lamaların Polilizin ve NMP Agaroz ile Kaplanması

Lamlar polilizin ile normal kaynama noktalı agaroz jelin tutunmasını kolaylaştırmak için önceden kaplandı (87, 63).

Bu kaplama işleminde sırasıyla;

1. Lamlar ve lameller % 70' lik etanol çözeltisiyle iyice silinerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

2. Kuruyan lam üzerine 75 µL polilizin damlatılıp ikinci bir lam ile sandviç modeliyle sıkıca bastırılıp çekilmek suretiyle polilizin her iki lam arasında yayılması sağlandı ve lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3. Kuruyan lamlar üzerine % 0,05' lik NMP agaroz çözeltisinden 75 µL aktarılıp, kabarcık oluşturmadan lamel kapatıldı. Lamel kapatılan lamlar +4 °C' de 5 dakika bekletildi. Süre sonunda çıkarılan lamların üzerindeki lameller çekilerek alındı ve lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

### 3.2.8.2. Komet Analizi Protokolü

Kısım 3.2.6' da anlatılan inkübasyon sonunda tripsinizasyonla kaldırılan hücreler santrifüjlendi, çöken kısım DMEM ile sulandırılarak canlılık sayımı yapıldı ve ardından komet protokolü başlatıldı.

Canlılık sayımı ardından hücreler komet laboratuvarına getirildi ve bundan sonraki aşamalar mümkün olduğu kadar karanlıkta gerçekleştirildi. Önceden polilizin ve NMP agaroz ile kaplanmış lamlar çıkarılıp numaralandırıldı. Farklı gruptaki hücreleri içeren falkonlardan 40 µL hücre süspansiyonu alınarak 0,5 mL' lik ependorf tüplere dağıtıldı. Bu esnada çalışma sabahı hazırlanan LMP agaroz, mikrodalga fırının orta ısı ayarında 30 saniye kaynatıldı ve bir müddet bekletilerek 37 °C' ye gelmesi sağlandı. LMP agarozdan 80 µL alınarak ependorfa aktarıldı ve pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu ile homojen bir şekilde karışması sağlandı. Bu karışımdan 80 µL alınarak daha önceden polilizin ve NMP agaroz ile kaplanmış ve uygun numaradaki lama otomatik pipet ile yayılarak üzerine lamel kapatıldı. Lamlar bu şekilde hazırlandıktan sonra lamlar +4 °C' de 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda buzdolabından çıkarılan lamlar üzerindeki lameller hafifçe çekilerek uzaklaştırıldı ve lamlar tekrar +4 °C' de 5 dakika bekletildi. Daha sonra liziz çözeltisi içine son konsantrasyonu % 1 (v/v) olacak şekilde Triton X-100 ilave edildi ve karıştırıldı. Hazırlanan çözelti +4 °C' de bekleyen hücreler üzerine hafifçe tatbik edildi ve hücreler liziz çözeltisi içinde 1 saatlik inkübasyona bırakılarak, lizize uğratıldı.

Bir saatlik lizizden sonra, lamlar liziz çözeltisinden çıkarılarak hepsi aynı yöne bakacak şekilde elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı lamaların üzerini kapayacak seviyeye kadar elektroforez tamponuyla (pH 13.1) dolduruldu. Elektroforeze tabi tutulmadan önce hücrelerin nükleuslarındaki DNA, pH 13.1' de 30 dakika süreyle alkali muameleye uğratıldı. Böylece, DNA denatüre edilerek, tek zincir haline gelmesi sağlandı.

Alkali muamelenin bitiminde elektroforez tankının üzerine ve kenarlarına buz aküleri yerleştirildi. Güç kaynağı açılarak volt değeri 22 V (1 V/cm), akım değeri 300 mA olacak şekilde ayarlandı ve hücreler 20 dakika elektroforeze tabi tutuldu.

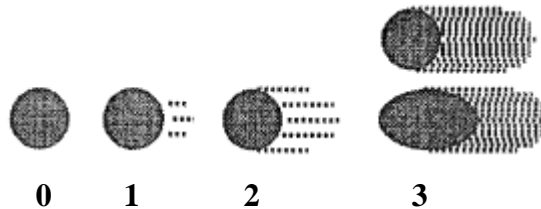
Elektroforezden sonra lamlar, elektroforez tankından çıkarılarak pH 7.4' te nötralizasyon tamponu içerisinde 20 dakika nötralize edildi. Nötral pH değerinde DNA' nın renatürasyonu sağlanmış oldu.

40 mL PBS içerisine 16 µL etidyum bromür ilave edilerek karıştırıldı. Nötralize edilen DNA' ları içeren lamlar bu boyanın içinde 20 dakika bekletildi. Bu sayede DNA' nın floresans boya ile boyanması sağlandı.

Boyanan jellerdeki DNA' lar, fotoğraf makinesi ile bağlantılı olan floresans mikroskopta (Nikon Eclipse E800) etidyum bromürün dalga boyuna uygun olarak (G-2A, Eksitasyon 510-565 nm, DM 575, BA 590) 40 kat büyütmede değerlendirildi. Skorlamada görsel analiz metodu kullanıldı. Tüm jel taranarak üst üste gelen ve aşırı kuyruk oluşturmuş hücreler dikkate alınmadan rastgele 100 hücre seçildi. Seçilen hücreler kuyruk uzunluğuna göre en hasarsız 0 ve en çok hasarlı olan 3 olmak üzere, 0-3 arasında sınıflandırıldı. Baş yapısı kaybolmuş ve aşırı uzamış kuyruğa sahip, skorlamada +4 derecesine girebilecek DNA görüntüleri değerlendirme dışı bırakıldı (98). Çalışmada kullanılan skala Şekil 9' da gösterilmiştir.

#### Kometlerin Skorlanması:

- 0 → hasarsız, kuyuksuz DNA
- 1 → baş yapısı korunmuş, kuyruk uzunluğu baş çapından küçük DNA
- 2 → kuyruk uzunluğu, başın çap uzunluğundan 1 ile 2 katı kadar uzun DNA
- 3 → kuyruk uzunluğu, başın çap uzunluğundan 2 kattan daha uzun DNA



**Şekil 9.** Çalışmada kometlerin skorlanmasında kullanılan skala (92).



Maksimum hasar 300 olabilecek şekilde bütün lamlar aşağıdaki formüle göre skorlandı (98).

$$\text{Skor} = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) \quad (\text{n: Her skor için sayılan hücre sayısı})$$

Genotoksik ajan (t-BHP) ile indüklenmiş DNA hasarının propolisle giderilme oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (98).

$$\% \text{ Azalma} = (A-B) / (A-C)$$

A: Pozitif kontrol skoru

B: Ekstraktla muamele skoru

C: Negatif kontrol skoru

### 3.2.9. mRNA Ekspresyon Çalışmaları

#### 3.2.9.1. Deneyde Kullanılan Primer Dizileri

Bu çalışmada kullanılan primerler tablo 9' da verilmiştir.

**Tablo 9.** Deneyde kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi	Ürün Uzunluğu
$\beta$ -Aktin Forward	5'- TCACCCAACACTGTGCCCATCTACGA-3'	109 baz
$\beta$ -Aktin Reverse	5'- TCGGTGAGGATCTTCATGAGGTA -3'	
Neil-1 Forward	5'- CGGCGGCTGCGTGGAGAAGTC -3'	304 baz
Neil-1 Reverse	5'- GTCCCAGCGGCCGAACCGGCG -3'	
hOGG-1 Forward	5'- AACAAACAACATCGCCCGCATCACT -3'	218 baz
hOGG-1 Reverse	5'- GCTAGCCCGCCCTGTTCTTCC -3'	

### 3.2.9.2. Real-Time PCR Protokolü

PCR reaksiyon karışımı, SYBR Green içeren One step reaksiyon karışımı, primerler ve total RNA' dan oluşur.

Her PCR döngüsünün elongasyon basamağının sonunda floresans ışık şiddeti ölçümü amplifiye olmuş DNA' nın miktarındaki artışı monitörden izleyebilmek için yapılır. Sadece istenen PCR ürününün amplifiye olduğundan emin olmak için erime eğrisi analizi PCR' dan sonra yapılabilir. Erime eğrisi analizinde reaksiyon karışımı yavaşça 95 °C' ye kadar ısıtarak çift zincirli DNA eritilir ve SYBR Green I floresansındaki sürekli azalış tespit edilir. Floresans ışık şiddetindeki bu azalış erime piki olarak monitörden görülebilir. Her bir erime piki DNA ürün partikülünün karakteristik erime sıcaklığını (T<sub>m</sub>) gösterir. T<sub>m</sub> sıcaklığında DNA' nın % 50' si çift zincirli, % 50' si tek zincirlidir.

Her bir örnek için tablo 10' daki gibi pipetlemeler 96 kuyucuklu LightCycler pleyte yapıldı. 5 saniyelik spindown işlemi gerçekleştirildikten sonra LightCycler 480 II (Roche, Germany) cihazında tablo 11' deki program eşliğinde real-time PCR yapıldı (96).

**Tablo 10.** Real-Time PCR için karışım hazırlanması

<b>Eklenecek Reaktifler</b>	<b>1 örnek için hacim</b>	<b>35 örnek için hacim</b>
SYBR Green Master Mix	5 µL	175 µL
7,5 µM forward primer	1 µL	35 µL
7,5 µM reverse primer	1 µL	35 µL
RT	0,1 µL	3,5 µL
RNAaz içermeyen su	5,9 µL	206,5 µL

Tablo 10' da verilen miktarlarda β-aktin, Neil-1 ve OGG-1 için ayrı ayrı reaksiyon karışımları hazırlandı. Roche LightCycler 480 II marka qPCR cihazının özel pleytine her bir örnek için PCR karışımı her örnek için üç farklı kuyucuğa 13 µL pipetlendi. β-aktin, Neil-1 ve OGG-1 kuyucuklarına her örneğe ait total RNA örneklerinden 2 µL ilave edilerek toplam hacim 15 µL' ye tamamlandı. Her örneğe ait total RNA yüklendikten sonra pleytin üzeri özel cover ile kaplandı. Pleyt kısa süreli santrifüjlendikten sonra Roche LightCycler 480II marka

qPCR cihazına yerleştirildi. Aşağıdaki tabloda denemelerle optimize edilmiş qPCR programı cihaza programlandı ve PCR işlemi gerçekleştirildi.

**Tablo 11.** Real-Time PCR protokolü

	Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
Reverse Transkripsiyon	50	None	00:30:00	4.4		0	0	0
Denatürasyon	95	None	00:15:00	4.4		0	0	0
PCR	94	None	00:00:15	2.2		0	0	0
	50	Single	00:00:30	2.2		0	0	0
	72	None	00:00:30	4.4		0	0	0
Erime Eğrisi Analizi	95	None	00:00:10	4.4				
	55	None	00:01:00	2.2				
	95	Continuous		0.11	5			
Soğuma	40	None	00:00:30	2.2		0	0	0

### 3.2.9.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Real-time PCR sonunda elde edilen PCR ürünleri % 2' lik agaroz jelde yürütüldü ve elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına atıldı ve görüntü kaydedildi. Jel ve kullanılan çözeltiler kısım 3.2.2' de verildiği gibi hazırlandı.

Her bir örneğe ait 5 µL PCR ürünü 2,5 µL yükleme tamponu ile karıştırıldı ve elektroforez tankındaki jele, kuyucuklara zarar vermeden yüklendi ve 80 volt' ta 1 saat jelde yürütüldü. Yürütme işleminin sonunda elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve görüntü kaydedildi. Marker olarak NEB 100 bazlık (100 bp DNA Ladder) kullanıldı.

### 3.2.9.4. Örneklerin Real-Time PCR Sonuçlarının Analizi

Sonuçların analizi Roche Light Cycler 480-II cihazında bulunan Basic Relative Quantification programı ile yapıldı.

### **3.2.10. Kullanılan İstatistik**

Elde edilen değerler, aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma ( $x \pm SD$ ) olarak ifade edildi. Grupların normal dağılıma uyup uymadığı kolmogorov-smirnov testi ile belirlendi. Gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konulabilmesi için One Way ANOVA analizi kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Komet Analizi Sonuçları

#### 4.1.1. t-BHP Doz Tespit Çalışması

Deneyde kullanılacak olan t-BHP dozunun bulunması için farklı dozlarda t- BHP kullanılarak komet analizleri yapıldı. Sonuçlar tablo 12’ de verildi. Bu sonuçlara göre varyans analizi ve post-hoc Tukey testi sonuçları değerlendirildiğinde komet skorlarının birbirinden anlamlı farklı olduğu görüldü. 4 saatte 300 komet skoru hasarlama yapan doz olan 300  $\mu$ M t-BHP bundan sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçildi.

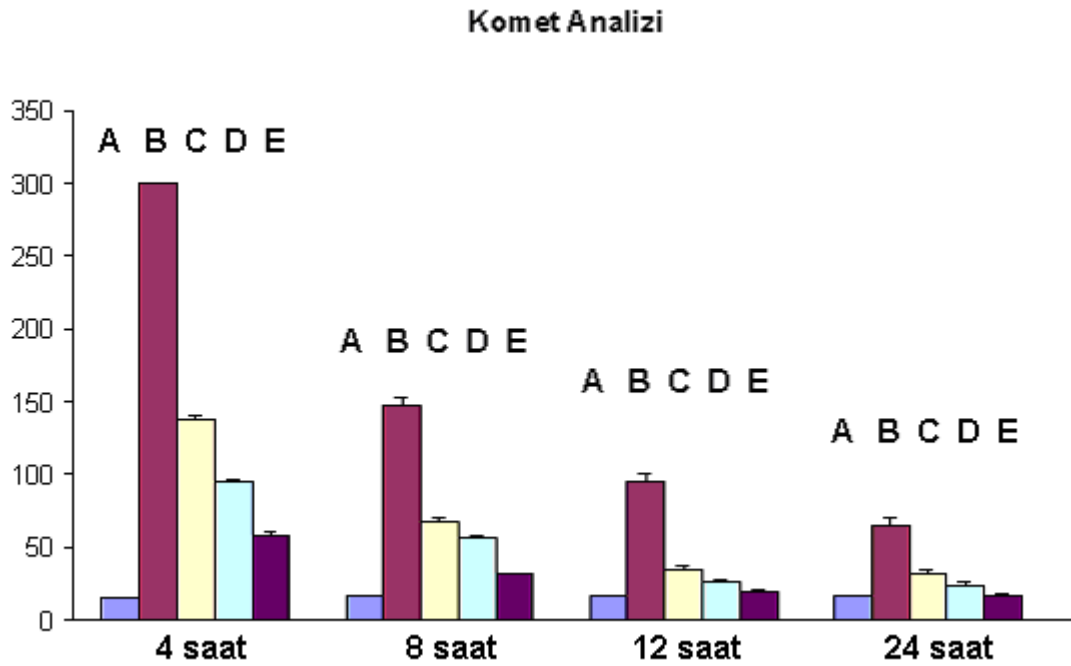
**Tablo 12.** t-BHP’ nin yaptığı DNA hasarının komet skorları

t- BHP	0 t-BHP	100 $\mu$ M t-BHP	200 $\mu$ M t-BHP	<b>300 <math>\mu</math>M t-BHP</b>	400 $\mu$ M t-BHP	500 $\mu$ M t-BHP	600 $\mu$ M t-BHP
<b>Komet Skoru</b>	15 $\pm$ 0.5	145 $\pm$ 3.5	212 $\pm$ 5.3	<b>300</b>	300+	300+	300+

(ANOVA F: 11275.7, p < 0.05)

#### 4.1.2. Propolis Doz Tespit Çalışması

3 farklı dozda propolis verilen hücrelerde 300  $\mu$ M t-BHP ile hasar verildikten sonra elde edilen komet skorları karşılaştırılarak ekspresyon analizinde kullanılacak propolis dozu 200  $\mu$ g/mL olarak seçildi. Komet sonuçları şekil 10' da verildi.



**Şekil 10.** Sabit doz 300  $\mu$ M t-BHP hasarlayıcı ile 4 farklı doz propolis ekstraktı muamelesinin komet analizi sonuçları

**A:** Negatif Kontrol, **B:** 0  $\mu$ g/mL (DMEM) propolis ile muamele **C:** 100  $\mu$ g/mL propolis ile muamele, **D:** 150  $\mu$ g/mL propolis ile muamele **E:** 200  $\mu$ g/mL propolis ile muamele

A grubunda saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi( $p > 0.05$ ).

B grubunda saatler arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark görüldü( $p < 0.0001$ ).

C grubunda 12 ve 24. saatler arasında fark görülmedi( $p > 0.05$ ). Ancak diğer saatler arasında anlamlı fark vardı( $p < 0.0001$ ).

D grubunda 12 ve 24. saatler arasında fark görülmedi( $p > 0.05$ ). Ancak diğer saatler arasında anlamlı fark vardı( $p < 0.0001$ ).

E grubunda 12 ve 24. saatler arasında fark görülmedi( $p > 0.05$ ). Ancak diğer saatler arasında anlamlı fark vardı( $p < 0.0001$ ).

F: A (0.211), B (1560.5), C (1034.1), D (812.7), E (407.5)

## 4.2. Canlılık Testleri

### 4.2.1. t-BHP' nin Hücreler Üzerine Toksik Etkisi

Hücre kültürü deneyinde kullanılacak t-BHP için en uygun dozların belirlenmesi için MTT testi yapıldı.

MTT testi sonunda farklı t-BHP konsantrasyonlarına karşılık elde edilen % canlılık sonuçları tablo 13' te verildi. Elde edilen bu sonuçlara göre t-BHP' nin tüm dozlarda da toksik olmadığı anlaşıldı.

**Tablo 13.** t-BHP' nin hücreler üzerine toksik etkisi (% canlılık testi)

t-BHP ( $\mu$ M)	100	200	300	400	500	600
% canlılık	103 $\pm$ 0.79	101 $\pm$ 0.82	100 $\pm$ 1	100 $\pm$ 0.67	99 $\pm$ 1.2	99 $\pm$ 0.95

n = 4

### 4.2.2. Propolisin Etanolik Ekstraktının Hücreler Üzerine Toksik Etkisi

Deneylerde kullanılacak propolisin etanolik ekstraktlarının dozunun hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi için yapılan MTT testlerinin sonuçları tablo 14' te verildi. Bu sonuçlara göre propolis ekstraktlarının toksik etkisinin olmadığı anlaşıldı.

**Tablo 14.** Propolisin etanolik ekstraktının hücreler üzerine toksik etkisi (% canlılık testi)

Etanolik Ekstrakt $\mu$ g/mL	50	100	150	200	250
% canlılık	103 $\pm$ 0.92	105 $\pm$ 0.85	99.5 $\pm$ 0.78	99.5 $\pm$ 0.98	96.5 $\pm$ 1

n = 4

### 4.2.3. Deney Grubu Şartlarının Hücreler Üzerine Toksik Etkisi

Deney şartlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi için MTT testi yapıldı ve sonuçlar tablo 15' te verildi. 200 µg/mL propolis ekstraktı ve 300 µM t-BHP şartlarında hücrelerin zarar görmediği tespit edildi.

**Tablo 15.** Deney grubu şartlarının hücreler üzerine toksik etkisi (% canlılık)

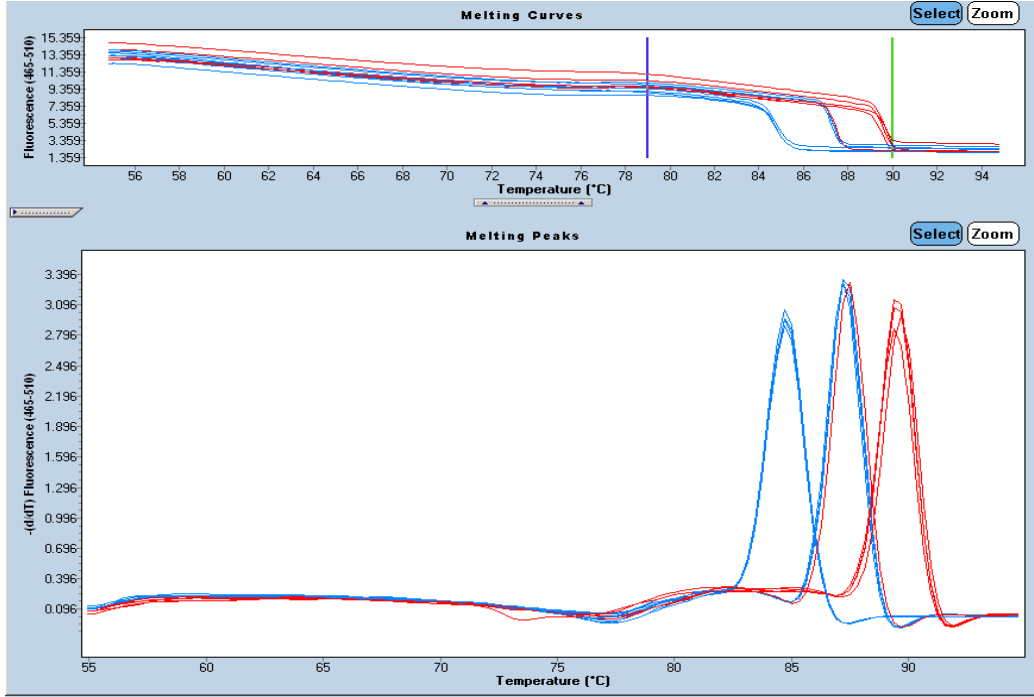
n	4	4	4	4	4
Propolis Ekstraktı (µg/mL)	50	100	150	200	250
t-BHP (µM)	300	300	300	300	300
% canlılık	113±1	115±1.2	113±2	114±1	116±2

### 4.3. Real-Time PCR Analizi Sonuçları

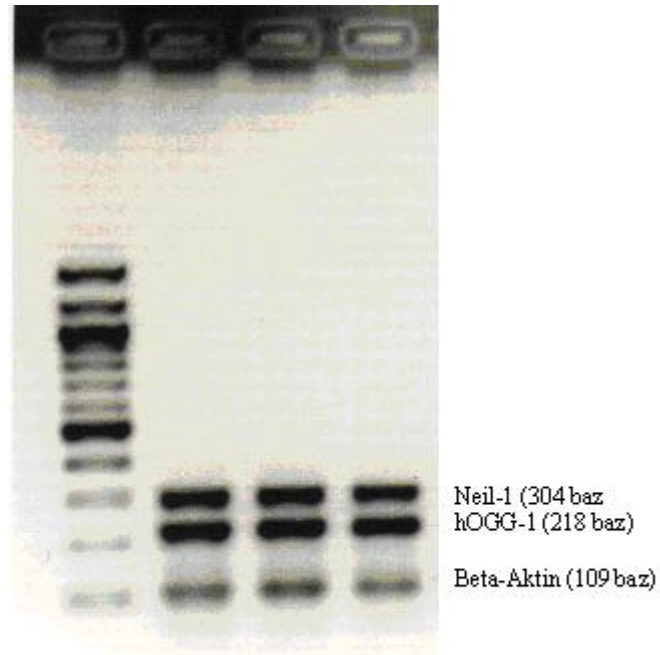
#### 4.3.1. Erime Eğrisi Analizi ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Cihazın yazılımından alınan erime eğrisi analizleri şekil 11' de verildi. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroferez sonuçları ise şekil 12' de verildi. Bu sonuçlara göre saf PCR ürünleri elde edildiği istenmeyen ürün oluşmadığı tespit edildi.





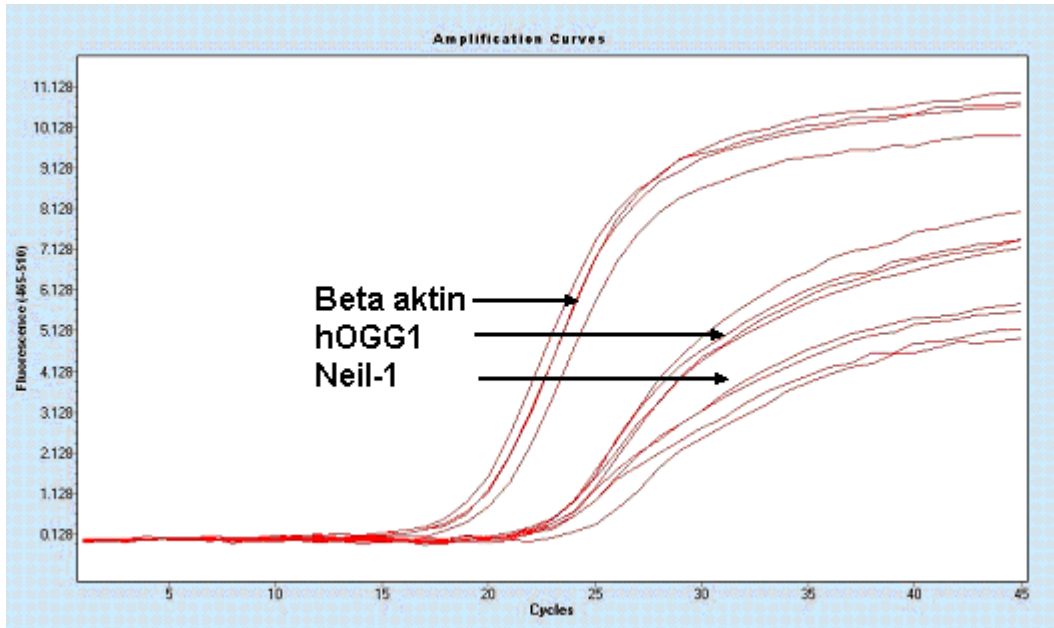
Şekil 11. Real-Time PCR erime eğrisi analizi sonuçları



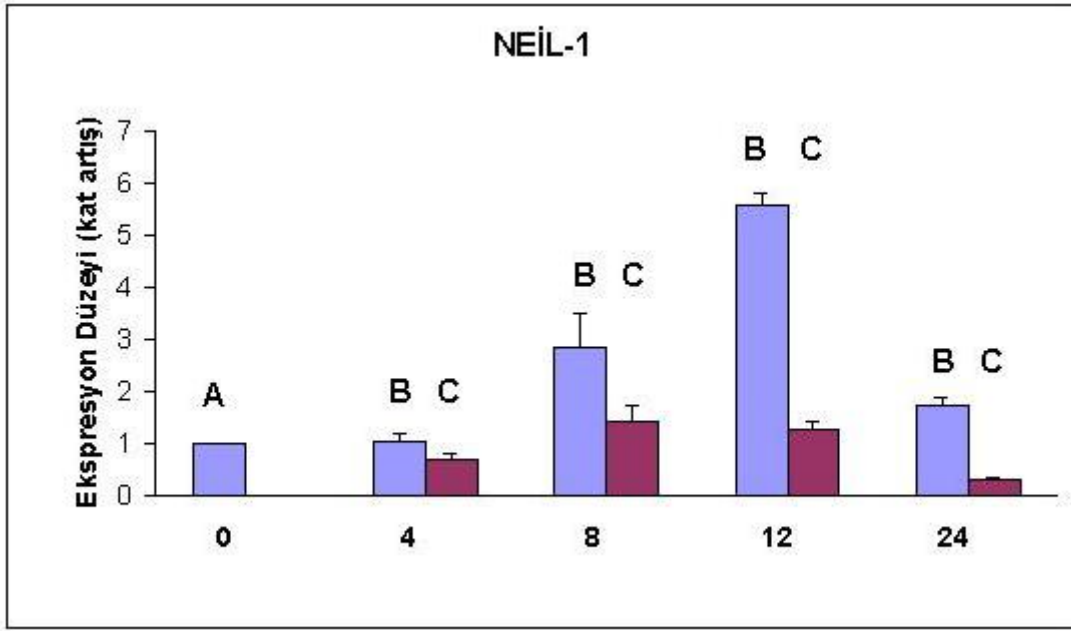
Şekil 12. PCR ürünleri jel elektroforezi

### 4.3.2. Neil-1 ve hOGG-1 mRNA Ekspresyon Sonuçları

Real-time PCR sonuçlarından  $\beta$ -aktin, Neil-1 ve hOGG-1 analizlerinin amplifikasyon eğrileri şekil 13’ de verildi. Hasarlayıcı t-BHP dozu ve tamir edici propolis ekstraktı dozu bulunduktan sonra yapılan mRNA ekspresyon analizlerinin sonuçları Neil-1 için şekil 14’ te, hOGG-1 için ise şekil 15’ te verildi. Sonuçlara göre deney grubu pozitif kontrolle karşılaştırıldığında pozitif kontrol grubunun Neil-1 mRNA ekspresyonunun deney grubuna oranla anlamlı derecede artış gösterdiği bulundu. Neil-1 ekspresyonunun deney grubunda 8 ve 12 saatleri arasında anlamlı fark bulunmazken, diğer bütün gruplar açısından anlamlı fark tespit edildi. hOGG-1 mRNA ekspresyonunun da pozitif kontrolde deney grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu bulundu. hOGG-1 ekspresyonunda deney grubunda saatler arasında 4 ile 24 ve 8 ile 12. saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, diğerleri arasında anlamlı fark tespit edildi.

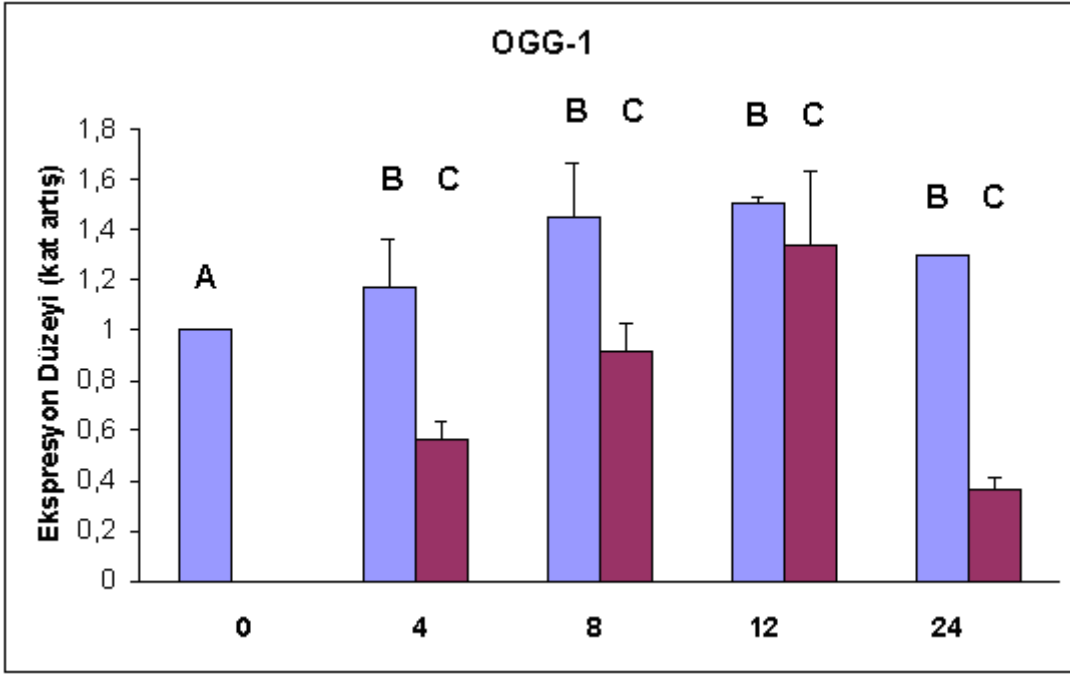


Şekil 13. Numunelerin  $\beta$ -aktin, Neil-1 ve hOGG-1 amplifikasyon eğrileri



**Şekil 14.** Neil-1 mRNA ekspresyon analizi sonuçları

- A:** Roche Basic Relative Quantification modülünde – kontrolün normalizasyonu
- B:** + Kontrolün – kontrole göre göreceli Neil-1 ekspresyonu artış miktarı  
(ANOVA: F: 154.3,  $p < 0.05$ )
- C:** Deney grubunun – kontrole göre göreceli Neil-1 ekspresyonu artış miktarı  
(ANOVA : F: 47.5,  $p < 0.05$ )



**Şekil 15.** hOGG-1 mRNA ekspresyon analizi sonuçları

- A:** Roche Basic Relative Quantification modülünde – kontrolün normalizasyonu  
**B:** + Kontrolün – kontrole göre göreceli hOGG-1 ekspresyonu artış miktarı  
 (ANOVA : F: 8.0, p=0.007)  
**C:** Deney grubunun – kontrole göre göreceli hOGG-1 ekspresyonu artış miktarı  
 (ANOVA : F: 74.5, p < 0.05)

## 5. TARTIŞMA

Çeşitli biyomoleküllerde meydana gelen oksidasyon reaksiyonları sonucu kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi hastalıkların oluşum süreci hızlanmaktadır. Dolayısıyla antioksidanlar bu kronik hastalıkların oluşum ve gelişiminin önlenmesinde oldukça önemli rollere sahiptirler. Özellikle son yıllarda doğal ürünlerden yeni antioksidanların izolasyonu ve karakterizasyonu bilim insanları için yeni bir araştırma sahası oluşturmuştur. Bu çalışmalar sonucu gerek doğal ürünlerin bütün halde kullanımı, gerekse doğal ürünlerden elde edilen flavonoidler, fenolik bileşikler ve terpenler gibi bileşiklerin potansiyel antioksidan özellikleri çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla ortaya konulmuştur (32).

Propoliste bulunan flavonoidler ve çeşitli fenolik bileşikler çok önemli farmakolojik özellikleri olan bileşiklerdir. Serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında oldukça etkili olduklarından dolayı biyomoleküllerin oksidasyonunu engellerler. Propolisin, önemli farmakolojik özelliklerinden dolayı inflamasyon, diyabet, kanser ve kalp hastalıklarından korunmada ve genom kararlılığının sürdürülmesinde önemli rolü olabileceği düşünülmektedir (13). Bu açıdan bakıldığında doğal ürünlerin güvenilirliği ve etkinliği, yapılacak mutajenite ve antimutajenite çalışmalarıyla ortaya konulmalıdır (22, 99).

Günümüzde Brezilya dünya piyasasında propolis konusunda söz sahibi olan ülkelerin başında gelmektedir. Güneybatı Brezilya' dan toplanan ve yeşil renkli olan propolis her yıl artan şekilde tüm dünya ülkelerine ihraç edilmektedir. Bu nedenle yeşil Brezilya propolisi üzerine çok sayıda ayrıntılı çalışma yapılmıştır (100).

Türk propolisinin de en az diğer ülke propolisleri kadar faydalı biyolojik özelliklere sahip olduğunun bilimsel çalışmalarla ortaya konulması, bu sayede Türk propolisinin de tüm dünyaya ihraç edilebilecek bir doğal ürün haline gelmesinin önünü açacaktır. Bu açıdan bakıldığında özellikle moleküler alanda Türk propolisiyle yapılan çalışmalar sınırlıdır. Daha önce Aliyazıcıoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Türk propolisinin etanolik ekstraktlarının 50 µg/mL konsantrasyonda hasarlayıcı olarak 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile ön, anlık ve sonradan muamele protokollerinde DNA hasarını anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiş ve Türk propolisinin antijenotoksik özelliği ilk kez ortaya konulmuştur (53). Bu çalışmada ise Türk propolisinin antijenotoksik özelliğinin DNA tamir enzimlerinde ekspresyon artışı sağlamasından kaynaklanıp kaynaklanmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmada Türk propolisinin etanolik ekstraktlarının her konsantrasyonda 300 µM t-BHP ile indüklenmiş DNA hasarına karşı ön muamele protokolünde DNA hasarını anlamlı şekilde azalttığı bulunmuştur. Propolis ile muamele edilen hücrelerden elde edilen mRNA örneklerinde gerçekleştirilen real-time PCR ekspresyon analizinde hOGG-1 ekspresyon seviyelerinin 12. saatte ve Neil-1 enzimlerinin ise 8. saatte anlamlı olarak arttığı ortaya konulmuştur.

*In vitro* antijenotoksisite çalışmalarında; hücrelerde DNA hasarı oluşturmak için, metil metansülfonat (MMS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ferroz sülfat, tersiyer-bütül hidroperoksit (t-BHP), formaldehit, 1,2-dimetilhidrazin, doksorubisin gibi kimyasallar kullanılmaktadır (22, 98, 101, 102, 103, 104). Çalışmamızda fibroblast hücrelerinde oksidatif stres oluşturmak için bu kimyasallar arasından t-BHP seçildi. t-BHP akut oksidatif stres tarafından başlatılan hücre hasarının mekanizmasının ortaya konulmasında kullanılan bir bileşiktir (104). Organik hidroperoksitler sınıfından t-BHP, alkali labil bölgeler ve tek zincir kırıkları meydana getirerek oksidatif DNA hasarı oluşturabilen bir kimyasaldır. Reaksiyonun demire bağımlı olduğu gösterilmiştir. Bu şekilde oluşturulan DNA hasarı DNA komet analizi ile kolayca ortaya konulabilmektedir (62, 105).

Genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar birçok *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testi geliştirilmiştir. *In vitro* bakteriyel reverse-mutasyon testi (Ames Testi), kromozomal hasar için *in vitro* timidin kinaz testi, *in vivo* mikronükleus testi, kromozom aberasyon testi, floresans *in situ* hibridizasyon (FISH) ve komet analizi bu yöntemler arasında sayılabilir. Bu yöntemlerden komet analizi özellikle kimyasal bileşiklerin genotoksisite üzerine etkisinin belirlenmesinde oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir (63, 107). Bu çalışmada hem çalışma prensibine uygun olması hem de kolay, hassas, hızlı,

ekonomik, güvenilir olması (89, 107) gibi diğer yöntemlere olan üstünlüklerinden dolayı komet analizi tercih edildi.

Oksidatif strese karşı hücre direnci; hücre tipleri arasında farklılık gösterebileceği gibi aynı tipteki hücrelerde bile farklı direnç tablolarıyla karşılaşılmaktadır. Bu nedenle deneysel olarak aynı derecede hasar yaratılan hücrelerde dahi, tamamen aynı cevabın alınması beklenmemelidir. Hücrelerin aşırı t-BHP' ye maruz bırakılması DNA' yı parçalara ayıracak ve oluşan parçalar komet yöntemiyle görülemeyeceği için hücreleri parçalamadan, maksimum hasar verebilecek doz seçilmelidir (108). Yapılan çalışmalarda, DNA hasarı oluşturmak için kullanılan t-BHP konsantrasyonunun, kullanılan hücre tipine göre oldukça farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Farklı orjinli hücre serilerinde farklı konsantrasyon aralıklarında t-BHP kullanıldığı görülmüştür. Bu çalışmada 100-1000 µM konsantrasyon aralığında t-BHP hasarlayıcı ile komet analizleri görsel analiz yöntemiyle hasarsızlığın 0 en büyük hasarın ise 3 olduğu skala kullanılarak komet skorlaması yapıldı. Bu skalaya göre en büyük komet skoru 300 olacağı için en uygun doz olan 300 µM t-BHP seçildi ve bu konsantrasyonda t-BHP' nin yapılan MTT analizlerinde de hücre canlılığını etkilemediği görüldü. Bu sonuçlar da literatürle uyumlu bulundu (23, 104, 105, 109, 110).

*In vitro* genotoksisite çalışmalarında genotoksik ajanlar tarafından yaratılan DNA hasarının engellenmesinde, propolis ve onun botanik orjinlerinin etil asetatlı ve çeşitli oranlarda hazırlanmış etanolik ekstraktları kullanılmaktadır. Tavares ve arkadaşları CHO (chinese hamster ovary cells) hücre serisinde yaptıkları çalışmada doksorubisin ile indüklenmiş DNA hasarına karşı propolis etanolik ekstraktlarının, Munari ve arkadaşlarının ise V79 (Chinese hamster lung fibroblast) hücre serisinde metil metansülfonat ile indüklenmiş DNA hasarına karşı propolis botanik orjini olan *Baccharis dracunculifolia*' nin etil asetat ekstraktlarının koruyucu olduğunu ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde gerçekleştirilen çalışmalarda propolis ekstraktları ile DNA hasarının engellendiği ortaya konulmuştur (6, 45, 98, 103). Bunların yanında Aliyazıcıoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Türk propolisinin etanolik ekstraktlarının hasarlayıcı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile ön, anlık ve sonradan muamele protokollerinde DNA hasarını anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiş ve Türk propolisinin antigenotoksik özelliği ilk kez ortaya konulmuştur (53). Sunulan doktora tez çalışmasında da literatür desteği alınarak propolis etanolik ekstraktları kullanılmış, ayrıca propolis ekstraktı hazırlamada kullanılan etanolün fibroblast hücreleri üzerinde herhangi bir genotoksik etki göstermediği de daha önce bölümümüzde yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur (1). Bu çalışmada 100, 150, 200 µg/mL konsantrasyonlarda etanolik propolis ekstraktı ile muamele

ve sonrasında sabit konsantrasyonda hasar verilerek yapılan komet analizleri sonucu, en etkili antigenotoksik özelliği gösteren ekstrakt konsantrasyonunun 200 µg/mL olduğu tespit edildi. Yapılan MTT analizleri sonucunda hücre canlılığını etkilemediğinden ekspresyon analizleri için bu konsantrasyondaki ekstraktın kullanılmasına karar verildi.

Son zamanlarda bilimsel araştırmalar için kullanılan gen ekspresyon çalışmalarında kantitatif real-time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilmekte ve gen ekspresyon seviyeleri hassas bir şekilde belirlenebilmektedir (21). Literatürde bulunan benzer gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan bu yöntem, bu çalışmada da kullanılarak ilgilenilen hedef genin mRNA ekspresyon miktarı negatif kontrol grubunun mRNA ekspresyon miktarına göre artan yada azalan katları şeklinde ifade edilmiştir (22, 23, 24).

Oksidatif baz hasarının tamirinde hücrenin BER kullandığı bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada BER mekanizmasında görevli hOGG-1 ve Neil-1 enzimlerinin gen ekspresyon miktarları analiz edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada fibroblast hücre serisinde propolisin etanolik ekstraktlarının deney protokolünde 100, 150 ve 200 µg/mL konsantrasyon aralığında 300 µM t-BHP ile indüklenmiş DNA hasarına karşı toksik etki yaratmadan antigenotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlardan en iyi iyileşmenin görüldüğü 200 µg/mL konsantrasyondaki ekstrakt seçilmiş ve bu grupta 4, 8, 12 ve 24 saatlik iyileşme zamanlarında DNA tamirinde BER mekanizmasında görevli Neil-1 ve hOGG-1 enzimlerinin ekspresyon seviyeleri β-aktin' e karşı rölatif kantitasyon ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda hOGG-1 mRNA ekspresyon analizi sonuçlarına göre pozitif kontrol grubunda daha yüksek olmakla birlikte deney grubunda da mRNA ekspresyonlarının arttığı gözlemlendi. 12. saatte her iki grupta da en yüksek ekspresyon seviyeleri tespit edildi. 24 saat sonunda deney grubu ekspresyon seviyesinin bazal seviyenin altına düştüğü pozitif kontrol grubunda ise bazal seviye civarında kaldığı gözlemlendi. Gao ve arkadaşlarının LNCaP (insan prostat kanser) hücre serisi üzerinde yaptıkları çalışmada bir flavonoid olan naringenin; ferroz sülfat ile oluşturulan DNA hasarını engellemede baz eksizyon tamir mekanizmasında görevli olan 8-oksoguanin-DNA-glikozilaz ve DNA polimeraz enzimlerinin ekspresyonunu arttırmak suretiyle etki gösterdiğini ve DNA hasarını engellediğini ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada pozitif kontrolde daha yüksek olmakla birlikte deney gruplarında da en yüksek hOGG-1 ekspresyon seviyelerine 8. saatte ulaşmışlardır. 24 saat sonunda ise deney grubunda ekspresyon artışının devam ettiğı, pozitif kontrolde ise bazal seviyeye düştüğü bildirilmiştir (22). Bu farklılıkların kullanılan hücre



tipinin, kullanılan hasarlayıcının farklı olmasından ve özellikle çalışmada tek bir flavonoidin kullanılmasından kaynaklanması muhtemeldir. LNCaP hücre serisinin oksidatif strese karşı oldukça dirençli olduğu, fakat oksidatif DNA hasarı tamir kapasitesinin oldukça sınırlı olduğu yazar tarafından da belirtilmiştir. Ayrıca çalışmamızda 24 saatte tüm hasarın ortadan kaldırılma sebebi; tek bir flavonoid yerine, propolisin içeriğinde geniş flavonoid türlerinin bulunması ve bu flavonoidlerin sinerjik etki göstermesinden kaynaklanıyor olabilir. Erdoğan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Anadolu propolis örneklerinin içeriği araştırılmış ve bu örneklerin kafeik asit, gallik asit, *p*-kumarik asit, klorogenik asit, mirisetin, kateşin ve luteolin gibi fenolik bileşiklerce zengin olduğu ortaya konulmuştur (111). Anabilim dalımızda daha önce yapılan bir çalışmada Türk propolisinin farklı çözücülerdeki çözünürlüğü incelenmiş, çalışma sonunda Türk propolisinin etanolik ekstraktlarının antioksidan özellikleri yüksek bulunmuş, HPLC ile yapılan kalitatif içerik çalışmasında ise kuersetin açısından zengin olduğu ortaya konulmuştur (85).

Silva ve arkadaşları ise PC12 hücre serisinde yaptıkları çalışmada polifenolik bileşiklerden luteolin, kuersetin ve rosmarinik asidin, t-BHP ve ışığa duyarlı bileşik olan Ro19-8022 ile uyarılmış DNA hasarı üzerine etkilerini araştırmışlar; luteolin ve kuersetinin yüksek radikal toplayıcı özellikleri ile, rosmarinik asidin ise doğrudan DNA tamirinde görevli OGG1 enziminin ekspresyonunu arttırmak suretiyle DNA hasarını engellediklerini tespit etmişlerdir. Ancak mRNA ekspresyon seviyelerinin negatif kontrolün ekspresyon seviyeleri üzerine çıkamadığı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da deney grubunda 4. saatte hOGG-1 ekspresyon seviyesinin negatif kontrole oranla daha düşük miktarda eksprese olduğu görüldü. Bu durum oksidatif DNA hasarının dinamik denge durumu ile açıklanabilir. Bu teoriye göre propolis varlığında çeşitli uyarıcılarla oluşan bazal DNA hasarı, propolis yokluğundaki bazal DNA hasarından daha az olabilir. Bu durum da az miktarda okside bazların oluşması beklendiği için DNA tamir enzimlerinin negatif kontroldeki miktarı kadar oluşmasına gerek kalmamış olması ile açıklanabilir (23).

Min ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Caco-2 hücre serisinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenmiş DNA hasarının engellenmesinde, kuersetinin muhtemel etki mekanizmasını araştırmışlar ve kuersetinin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı DNA hasarını hem radikal toplayıcı özelliğiyle hem de DNA tamir enzimlerinden hOGG-1 ekspresyonunu modüle etmek suretiyle DNA tamir kapasitesini arttırarak ortaya koyduğunu bildirmişlerdir (24). Çalışmamızdan farklı olarak pozitif kontrol grubunda en yüksek hOGG-1 mRNA ekspresyon seviyesi 4. saatte gözlenmiş ve 8. saatte bazal seviyenin de altına inerek 12. saatte tekrar bazal seviyeye ulaşmıştır. 1 µM kuersetin

muamelesi yapılan grupta pozitif kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edilmekle beraber, 4. saatteki ekspresyon artışı bu grupta gözlenmemiştir. Bu farklılıkların sebebinin açıklamasına makale içerisinde yer verilmemiştir. 100 µM kuersetin ile muamele edilen grupta 4. saatte en yüksek hOGG-1 mRNA seviyesine ulaşılmış ve 12. saat sonunda kademeli olarak ekspresyon düzeyi bazal seviyeye inmiştir. Bu farklılıkların kullanılan hücre tipi, hasarlayıcı türü ve o çalışmada tek flavonoid kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda Neil-1 mRNA ekspresyon analizi sonuçlarına göre pozitif kontrol grubunda daha yüksek olmakla birlikte deney grubunda da mRNA ekspresyonlarının arttığı gözlemlendi. En yüksek artış pozitif kontrol grubunda 12. saatte, deney grubunda ise 8. saatte gözlemlendi. 24 saat sonunda deney grubu ekspresyon seviyesinin bazal seviyenin altına düştüğü, pozitif kontrol grubunda ise bazal seviye civarında kaldığı gözlemlendi. Doğal ürünlerin Neil-1 mRNA ekspresyonuna etkisi üzerine literatürde doyurucu çalışma bulunmaması nedeniyle çalışmamız bu alanda ilk çalışmadır. Das ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada insan kolon karsinoma hücreleri (HCT116) hücre serisinde glukoz oksidaz tarafından üretilen hidrojen peroksitin Neil-1 mRNA ve polipeptid seviyesini muameleden 6 saat sonra 2-4 kat arttırdığını ortaya koymuşlardır. Bu sonucu da Neil-1 geni promotor bölgesinin ROS tarafından transaktive edilmesiyle açıklamışlardır (112). Bu açıdan baktığımızda 300 µM t-BHP grubunda 4 saatten başlayıp 12 saate kadar devam eden Neil-1 ekspresyon artışı literatür ile uyumludur. Bu grupta propolis ile bu seviyede bir ekspresyon artışı görülebilmesi komet skorlarına bakıldığında ortamda düşük düzeyde DNA hasarı olmasıyla açıklanabilir. Sadece t-BHP ile muamele grubunda Neil-1' in hOGG-1' e göre daha fazla eksprese olması, onun daha geniş bir okside baz substrat spesifikliğine sahip olmasından ya da oluşan hasarlı bazların DNA zinciri üzerindeki konumundan kaynaklanıyor olabilir (80, 81, 112).

Shinmura ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Neil-1 geninde gerek mutasyon gerekse ekspresyon azalmasının mide kanserinin gelişim patogenezinde etkili olduğunu ve hücrelerdeki tamir kapasitesinin % 20-35 azalmasının kanser gelişim riskini 4-6 kat arttırdığını öne sürmüşlerdir (113). Herhangi bir nedenle DNA' da hasar oluşup Neil-1 aktivasyonu olmaması kanser gelişimini tetiklemektedir. Fakat propolis kullanımı ile Neil-1 aktivasyonuna neden olan oksidatif hasarın oluşumu engellenebildiği için Neil-1 aktivasyonuna gerek kalmadan oksidatif stresin kanser yapıcı etkisi ortadan kaldırılabilir.

Propolisin antigenotoksik ve antimutajenik aktivitesinin ortaya konulabilmesi için gerek *in vivo* gerekse *in vitro* pek çok çalışma yapılmıştır. Munari ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, yeşil propolisin ana botanik kaynaklarından biri olan *Baccharis dracunculifolia*'

nın etil asetat ekstraktlarının, V79 (Chinese hamster lung fibroblast) hücre serisinde metil metansülfonat (MMS) ile indüklenmiş DNA hasarına karşı, anlık ve sonradan muamele protokollerinde koruyucu etkisinin olduğu ortaya konulmuştur. Bu etkinin *Baccharis dracunculifoliai*' nin polifenolik içeriğinin hem serbest radikal toplayıcısı olarak görev yapması hem de DNA tamir enzimlerinin aktivitelerini arttırmak suretiyle ortaya çıkabileceğini savunmuşlardır (98).

Chen ve arkadaşları NIH3T3 fare fibroblast hücre serisinde yaptıkları çalışmada *Scutellaria baicalensis* bitkisinin köklerinden izole edilen bir flavonoid olan baicalinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile uyarılmış DNA hasarı üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığını incelemiştir. Hücrelerin 24 saatlik baicalin ile ön muamelesi sonrası 15 dakikalık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muamelesine karşı baicalin ile muamele edilmeyen kontrol grubuna göre DNA hasarında anlamlı bir azalmanın olduğunu ve bunun baicalinin antioksidan özelliğinin yanı sıra, DNA tamir sistemini stimüle etmesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (102).

Komet skorlarına göre yaptığımız değerlendirmede propolisin etanolik ekstraktlarının DNA hasarını engellemede oldukça etkili olduğu ve 4 saatlik iyileşme zamanı sonrası t-BHP kaynaklı hasarın büyük bölümünün ortadan kaldırıldığı görülmektedir. Buradaki antigenotoksik etkinin DNA tamir yolağının BER mekanizmasında görevli hOGG-1 ve Neil-1 enzimlerinin ekspresyonlarının artışından ziyade 4 saatlik iyileşme zamanındaki pozitif etkinin propolisin antioksidan savunma sistemini gerek aktivite gerekse mRNA seviyesinde indüklemesinden kaynaklanıyor olabilir. Diğer bir olasılık ise propolis ön muamelesinde ortamdaki metal iyonlarının, propolis tarafından şelatlanması sonucu ortama t-BHP verildiğinde fazla miktarda Fenton reaksiyonu oluşmadığı için büyük bir DNA hasarı meydana gelmemektedir. Propolisin düşük konsantrasyonlarda, kimyasalların zararlı etkilerini önleyici, yüksek konsantrasyonlarda ise mutajenik etki göstermesi onun karakteristik bir janus bileşiği olmasıyla açıklanabilir. Janus bileşikleri; mutajenik iken şartlar değiştirildiğinde, antimutajenik etki gösterebilen bileşiklerdir. Janus cevabın ortaya çıkmasını, hücre çeşidi ile hücrelerin bu ajana maruz kaldığı konsantrasyon ve maruz kalma süresi belirler. Von Borstel ve Higgins' e göre kimyasal bileşiklerin Janus aktivite göstermesinde pek çok moleküler mekanizma görev alır. Bu genellikle hem antimutajenik sistemdeki bir enzimin spesifik indüksiyonu hem de DNA tamir mekanizmasında görev alan enzimatik sistemlerin doygunluğu ile sağlanır. Propoliste bulunan flavonoidler de janus bileşikleri grubunda değerlendirilmektedir ve konsantrasyonlarına göre pro-oksidant ya da radikal toplayıcı olarak görev yaparak mutajenik veya antimutajenik etki gösterebilirler (6, 114, 115). De Flora' ya

göre biyopolifenoller; antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerini sadece radikallerin yayılmasını engellemekle değil, aynı zamanda ortamdaki geçiş metalleri şelatlayarak ve radikal üretici reaksiyonları inhibe ederek, dolayısıyla radikal oluşumunu önleyerek gösterirler (98).

Ayrıca çalışmamızda propolisle muamele grubunda hem Neil-1 hem de hOGG-1 açısından çok büyük ekspresyon seviyeleri görmememiz, DNA tamirinde görevli bu enzimlerin hücrelerin bu hayati mekanizmasında yer aldıkları için sıkıca kontrol edilmelerinden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle bu genlerin ekspresyonlarından toksik olan ya da olmayan uyarıcıların etkisiyle küçük miktarlarda değişiklikler elde etmek bu teorik bilgiyi desteklemektedir (23).

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

1. Çalışmada kullanılan fibroblast hücrelerinde hücre canlılığını azaltmadan 4 saatlik iyileşme zamanı sonunda maksimum DNA hasarı oluşturabilecek t-BHP konsantrasyonu 300  $\mu$ M olarak bulundu.
2. Hücrelerde t-BHP ile oluşturulan hasarın tamirini gerçekleştirebilecek propolis ekstrakt konsantrasyonlarının bulunması için sabit konsantrasyonda hasarlayıcı (300  $\mu$ M t-BHP) ile birlikte 100  $\mu$ g/mL, 150  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ g/mL konsantrasyonlarda ve 4, 8, 12, 24 saatlik periyotlarda hücelere propolis ekstraktı verilerek komet analizleri yapıldı ve çalışılan propolis konsantrasyonlarından 200  $\mu$ g/mL' nin en iyi iyileşmeyi sağladığı görüldü. Bu konsantrasyondaki propolis seçilerek gen ekspresyon düzeyi çalışmasına geçildi.
3. MTT testi sonunda farklı t-BHP konsantrasyonlarına karşılık elde edilen % canlılık sonuçlarına göre t-BHP'nin çalışılan tüm dozlarda toksik olmadığı anlaşıldı.
4. Etanolik propolis ekstraktının 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 150  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ g/mL konsantrasyonlarda, kullandığımız fibroblast hücrelerine toksik etkisinin olmadığı gözlemlendi.
5. Deneyde 200  $\mu$ g/mL etanolik propolis ekstraktı ve 300  $\mu$ M t-BHP' nin birlikte kullanılmasının da toksik etkisinin olmadığı tespit edildi.
6. mRNA ekspresyon çalışmaları sırasında real-time PCR cihazında yapılan erime eğrisi analizleri ve agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre saf PCR ürünleri elde edildiği ve istenmeyen ürün oluşmadığı gözlemlendi.

7. Deneysel grubu pozitif kontrolle karşılaştırıldığında pozitif kontrol grubunun Neil-1 mRNA ekspresyonunun deneysel gruba oranla anlamlı derecede artış gösterdiği bulundu. Neil-1 ekspresyonunun deneysel grubunda 8 ve 12 saatleri arasında anlamlı fark bulunmazken, diğer bütün gruplar açısından anlamlı fark tespit edildi.

8. hOGG-1 mRNA ekspresyonunun da, pozitif kontrolde deneysel gruba göre anlamlı derecede artmış olduğu bulundu. hOGG-1 ekspresyonunda deneysel grubunda saatler arasında 4 ile 24 ve 8 ile 12 saatleri arasında anlamlı fark bulunmazken, diğerleri arasında anlamlı fark tespit edildi.

## 6.2. Öneriler

1. Bu çalışma farklı çözücülerde hazırlanmış propolis ekstraktlarıyla, farklı hücre serilerinde de yapılabilir.
2. Benzer gruplar oluşturularak BER yolağındaki diğer enzimlerin ekspresyon düzeyleri bakılabilir.
3. Benzer gruplar oluşturularak hasar sonrası propolis muamelesinin DNA tamir enzimleri ekspresyonu üzerine etkisi incelenebilir.
4. Propolisi çözmeye kullanılan farklı çözücüler, farklı molekülleri ekstrakte edeceği için, kullanılan ekstraktın, kalitatif ve kantitatif içeriği HPLC ve GC-MS gibi ileri kromatografik yöntemlerle ortaya konulabilir.
5. Bu şekilde yapılacak propolis karakterizasyonu ile propolisin antigenotoksik etkisini hangi etken bileşiklerle yaptığı, literatür karşılaştırması ile ortaya konulabilir. İçeriğinde bulunan fenolik asit türevleri hücrelerle ayrı ayrı muamele edilerek, bu bileşiklerin tek başlarına olan etkisi propolisin sinerjik etkisiyle karşılaştırılabilir.
6. Propolisin desmutajen özelliğinin ortaya konulması için, t-BHP ile muamele öncesi propolise maruz bırakılan grup ile negatif ve pozitif kontrol grubunda ortamdaki metal iyonu konsantrasyonu ölçülerek, bu etkide propolisin metal şelatörü özelliğinin rolü değerlendirilebilir.
7. Propolisin antigenotoksik özelliğinin endojen antioksidan sistemde görevli enzimlerin (katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz gibi) aktivitesi üzerinden etki gösterip göstermediği, bu enzimlerin aktivitesi ölçülerek ortaya konulabilir.
8. Hücrelerin bulunduğu ortamda total antioksidan ve total oksidan kapasite ölçülerek, propolis ilave edilen grupta antioksidan ve oksidan kapasitenin değişimi incelenebilir.

9. Deneysel hayvan çalışmaları ile propolisin benzer etkileri *in vivo* koşullarda gerçekleştirip gerçekleştiremediği incelenebilir.

## 7. ÖZET

Propolis, polifenolik bileşikler ve flavonoidler açısından zengin, toplandığı bölgenin coğrafyasına ve iklimine göre kompozisyonu değişebilen, antibakteriyel, antitümöral, antiinflamatuvar, antioksidatif, antimutajenik ve diğer faydalı aktiviteleri ile doğal bir ilaç olarak kullanılan önemli bir arı ürünüdür. Oksidatif stres serbest radikal oluşumu ve antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkan bir durumdur. Oksidatif stres sonucu oluşan hasarlardan biri de DNA hasarıdır. DNA’ da oluşan hasar, çeşitli mekanizmalar ile sürekli tamir edilmektedir. Oksidatif hasarın tamirinde görevli en aktif mekanizma BER tamir yolağıdır. Bu yolakta önemli enzimlerden ikisi hOGG-1 ve Neil-1 DNA glikozilaz enzimleridir. Bu çalışmada Türkiye’ nin çeşitli yörelerinden toplanan karma propolis örneklerinden hazırlanan etanolik ekstraktların DNA tamir enzimlerinin ekspresyonu üzerine etkisi incelendi. 4 saatlik iyileşme zamanlarında uygun hasarlayıcı t-BHP konsantrasyonu 300 µM, optimum propolis konsantrasyonu 200 µg/mL olarak bulundu. Daha sonra literatürde bulunan benzer gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan real-time PCR yöntemi kullanılarak ilgilenilen hedef genin mRNA ekspresyon miktarı negatif kontrol grubunun mRNA ekspresyon miktarına göre artan ya da azalan katları şeklinde ifade edildi. DNA hasarının tespiti için ise komet analizi kullanıldı. Çalışmamızda hOGG-1 mRNA ekspresyon analizi sonuçlarına göre pozitif kontrol grubunda daha yüksek olmakla birlikte, deney grubunda da mRNA ekspresyonlarının arttığı gözlemlendi. 12. saatte her iki grupta da en yüksek ekspresyon seviyeleri tespit edildi. 24 saat sonunda deney grubu ekspresyon seviyesinin bazal seviyenin altına düştüğü pozitif kontrol grubunda ise bazal seviyede kaldığı



gözlendi. Neil-1 mRNA ekspresyon analizi sonuçlarına göre ise pozitif kontrol grubunda daha yüksek olmakla birlikte deney grubunda da mRNA ekspresyonlarının arttığı gözlendi. En yüksek artış pozitif kontrol grubunda 12. saatte, deney grubunda ise 8. saatte gözlendi. Komet sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde etanolik propolis ekstraktlarının antijenotoksik özelliğinin, DNA tamir enzimlerinin ekspresyonlarında artıştan ziyade farklı mekanizmalar ile hasarı oluşmadan engelleme özelliğinden kaynaklanabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Propolis, DNA komet analizi, Real-time PCR, Neil-1, hOGG-1

## 8. SUMMARY

### **Investigation of effect of Turkish propolis extracts on genotoxicity of fibroblast cell lines by DNA repair enzymes**

Propolis is an important bee product, rich of polyphenolic compounds and flavonoids. It has antibacterial, antitumoral, anti-inflammatory, antioxidative, antimutagenic properties and changeable composition according to climate and geography of harvest region, and is used as a natural drug with other useful activities. Biological effect of propolis is predominantly attributed to its content of flavonoids. Oxidative stress is impairment of equilibrium between free radical formation and antioxidant system. One of the damages resulting from oxidative stress is DNA damage which is being repaired permanently by several mechanisms. The most active mechanism on repairment (repairment ?) of oxidative stress is BER pathway. hOGG-1 and Neil-1 DNA glycosylases are two of (Kaldır) the important enzymes partaking (working daha iyi olur) in this pathway. In this study, effects of ethanolic extracts of mixed propolis samples, collected different regions of Turkey, on expression of DNA repair enzymes were investigated. In recuperation time of 4 hours, appropriate concentration for damager agent t-BHP and optimum propolis concentration were found as 300  $\mu$ M and 200  $\mu$ g/mL, respectively. mRNA levels of the target genes were implied as decreasing or increasing folds of mRNA expression of negative control group using real-time PCR method that used in similar gene expression studies in the literature. For the determination of DNA damage levels, comet assay was used. In our study, according to analysis of hOGG-1 mRNA expression, as well as more in the positive control group, mRNA levels were found to be increased in the study group. At the twelfth hour, the highest expression levels were detected in both groups. At the end of the twenty fourth hour

expression levels of study group decreased under the basal level while those of the positive control group were at the basal level. According to mRNA expression analysis of Neil-1, it was found that, as well as more in the positive control group, mRNA levels were increased in the study group. The most increase in the positive control group and the study group were observed at hours 12 and 8, respectively. It was concluded that with the evaluation of comet assay results, antigenotoxic activity of ethanolic propolis extracts may be resulted from prevention of the damage before formation with different mechanisms rather than increase of DNA repair enzymes levels.

**Keywords:** Propolis, DNA comet assay, Real-time PCR, Neil-1, hOGG-1

## 9. KAYNAKLAR

1. Demir, S.: Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2010.
2. Sforcin, J.M. and Bankova, V.: Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 253-260, 2011.
3. Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., Bruni, A.: Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy Research*, 10 (4): 335-336, 1996.
4. Costa, C.C. and Pereina, R.G.: The influence of propolis on the rheological behaviour of pure honey. *Food Chemistry*, 76: 417-421, 2002.
5. Bankova, V., Castro, S.L., Marcucci, M.C.: Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15, 2000.
6. Pereira, A.D., Andrade, S.F., Oliveira Swerts, M.S., Maistro, E.L.: First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2580-2584, 2008.
7. Lairon, D. and Amiot, M.J.: Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Current Opinion in Lipidology*, 10: 23-28, 1999.
8. Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N.: Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82: 513-523, 2011.

9. Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., Salih, B.: Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 78: 213-217, 2002.
10. Burdock, G.A.: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363, 1998.
11. Heo, M.Y., Sohn, S.J., Au, W.W.: Antigenotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research*, 448: 135-150, 2001.
12. Metodiewa, D., Kochman, A., Karolczak, S.: Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N,N-diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 41: 1067-1075, 1997.
13. Ferguson LR.: Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475: 89-111, 2001.
14. Marchand, L.: Cancer preventive effects of flavonoids- a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56: 296-301, 2002.
15. Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T.: Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107 (6): 526-545, 1987.
16. Sorg, O.: Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327: 649-662, 2004.
17. Dinçer, Y. ve Akçay, T.: DNA Hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25 (2): 73-79, 2000.
18. Ramos, A.A., Azqueta, A., Pereira-Wilson, C., Collins, A.R.: Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7465-7471, 2010.
19. Hoeijmakers, J.H.J.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 441: 366-374, 2001.
20. Azqueta, A., Shaposhnikov, S., Collins, A.R.: DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research*, 674: 101-108, 2009.
21. Telmann G., Geulen O.: Light Cycler 480 Real-Time PCR System: Innovative Solutions for Relative Quantification. *Biochemica*, 4: 16-18, 2006

22. Gao, K., Henning, S.M., Niu, Y., Youssefian, A.A., Seram, N.P., Xu, A., Heber, D.: The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 89-95, 2006.
23. Silva, J.P., Gomes, A.C., Coutinho, O.P.: Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*, 601: 50-60, 2008.
24. Min, K. and Ebeler, S.E.: Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced DNA damage and enhances DNA repair in Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2716-2722, 2009.
25. Zumla, A. and Lulat, A.: Honey-a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82: 384-385, 1989.
26. Castaldo, S. and Capasso, F.: Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73: 1-6, 2002.
27. Bankova, V.: Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 114-117, 2005.
28. Sforcin, J.M.: Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 1-14, 2007.
29. Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S.: Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 67-73, 2002.
30. Shaheen, S.A., AbuZarga, M.H., Nazer, I.K., Darwish, R.M., Al-Jaber, H.: Chemical constituents of Jordanian propolis. *Natural Product Research*, 1: 1-7, 2011.
31. Ghisalbertie, E.L.: Propolis: a review. *Bee World*, 60:59-84, 1979.
32. Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., Li, X.: Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*, 16: 3444-3455, 2011.
33. Park, J. S. and Woo, K.S.: The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea. In *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Mizrahi, A. and Lensky, Y. (Eds.) New York, Plenum Press, 1997, pp. 121-124.
34. Rodriguez, E.G., Abellan, G.B., Villanueva, M.T.: Macroelements in dietetic products containing propolis. *Food Chemistry*, 66: 15-19, 1999.

35. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Andyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A.G., Kadota, S.: Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, Netherlands and Chile. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 239-246, 2000.
36. Woo, K.S. and Park, J.S.: Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects. In *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Mizrahi, A. and Lensky, Y. (Eds.) New York, Plenum Pres, 1997, pp. 125-128.
37. Çolak, M.: Arı poleni ve propolisin metastatik insan prostat kanseri hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2009.
38. Campos, M.G., Cunha, A., Markham, K.R.: Bee products chemical composition and application. In *Bee-Pollen composition, Properties and Applications*. Mizrahi, A. and Lensky, Y.(Eds), New York, Plenum Press, 1997, pp. 93-100.
39. Barbaric, M., Miskovic, K., Bojic, M., Loncar, M.B., Bubalo, A.S., Debeljak, Z., Medic-Saric, M.: Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 135 (3): 772-778, 2011.
40. Borges, K.S., Brassesco, M.S., Scrideli, C.A., Soares, A.E.E., Tone, L.G.: Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genetics and Molecular Biology*, 34 (2): 310-314, 2011.
41. Pietta, P.G.: Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042, 2000.
42. Çolak, M.: Miyeloid kanser hücre serilerinde propolis ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
43. Duran, G.G.: *In vitro* koşullarda propolisin antibakteriyel, antifungal ve leyişmanyasidal etkilerinin araştırılması, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Hatay, 2007.
44. Eser, B.: Ratlarda metotreksatin yol açtığı intestinal mukoza hasarı ve oksidatif stres üzerine propolisin etkisi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri, 2009.
45. Benkovic, V., Orsolich, N., Knezevic, A., Ramic, S., Dikic, D., Basic, I., Kopjar, N.: Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: The alkaline comet assay study. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31: 167-172, 2008.

46. Benguedouar, L., Boussenane, H.N., Wided, K., Alyane, M., Rouibah, H., Lahouel, M.: Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46: 112-119, 2008.
47. Bhadauria, M.: Propolis prevents hepatorenal injury induced by chronic exposure to carbon tetrachloride. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 1-12, 2011.
48. Fischer, G., Leite, F.P., Conceicao, F.R., Dummer, L.A., Vargas, G.D., Hübner Sde, O., Dellagostin, O.A., Paulino, N., Paulino, A.S., Vidor, T.: Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, 25: 1250-1256, 2007.
49. Trusehva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M.C., Miorin, P.L., Pasin, F.R., Tsvetkova, I.: Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Oxford University Press*, 3: 249-254, 2006.
50. Lima de Moura, S.P., Negri, G., Salatino, A., Cunha Lima, L.D., Dourado, L.P.A., Mendes, J.B., Andrade, S.P., Ferreira, M.A.N.D., Cara, D.C.: Aqueous extract of Brazilian green propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 1-8, 2011.
51. Aliyazicioglu, Y., Deger, O., Ovali, E., Barlak, Y., Hosver, I., Tekelioglu, Y., Karahan, S.C.: Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *International Immunopharmacology*, 5: 1652-1657, 2005.
52. Barlak, Y.: Türk propolisi ekstraktlarının solunumsal patlama sonrası PMN lökositlerden PMN elastaz salınımına etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
53. Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, İ., Cakiroglu, T.N., Akalin, I., Deger, O., Bedir, A.: Preventive and protective effects of Turkish propolis on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica*, 62 (4): 388-396, 2011.
54. Barlak, Y.: Türk propolisi ekstraktlarının prostat kanser hücre serilerinin proteomisine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2009.
55. Halliwell, B.: Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB Journal*, 1: 358-364, 1987.



56. Akyol, M.A.: Tavşan modelinde laparoskopik iskemik prekondisyon manevrasının oksidatif stres üzerine etkisinin araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Afyonkarahisar, 2007.
57. Tokaç, D.: Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2007.
58. Halliwell, B.: Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52: 253-265, 1994.
59. Özden, S.: Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2006.
60. Brent, J., Rumack B.: Role of free radicals in toxic hepatic injury I. Free radical Biochemistry. *Clinical Toxicology*, 31: 139-171, 1993.
61. Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C.: Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79: 2056-2068, 2006.
62. Smart, R.C and Hodgson, E.: *Molecular and biochemical toxicology*. Wiley fourth edition, 2008, p. 342-343.
63. Bilgici, B.: Behçet hastalığında genotoksisite, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Samsun, 2005.
64. Abraham, R.T.: Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*, 2: 225-231, 2001.
65. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J.: Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17: 1195-1214, 2003.
66. Evans, M.D. and Cooke, M.S.: Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays*, 26: 533-542, 2004.
67. Milligan, J.R. and Ward, J.F.: Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiation Research*, 137: 295-299, 1994.
68. Halliwell, B. and Aruoma, O.I.: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281: 9-19, 1991.

69. Halliwell, B.: Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research*, 443: 37-52, 1999.
70. Allen, R.G. and Tresini, M.: Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine*, 28: 463-499, 2000.
71. Onur, E., Tuğrul, B., Bozyiğit, B.: DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 7 (2): 61-70, 2009.
72. Karataş, L.: DNA onarım mekanizması ile ilişkili; XRCC1, PARP1, OGG1 ve APE1 gen polimorfizmleri ile diyabetik nefropati arasındaki ilişkinin araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2009.
73. Martin, L.J.: DNA damage and repair: Relevance to mechanisms of neurodegeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67 (5): 377-387, 2008.
74. Hegde, M.L., Hazra, K.T., Sankar Mitra, S.: Early steps in the DNA base excision/single strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research*, 18 (1): 27-47, 2008.
75. Marsin, S., Vidal, A.E., Sossou, M., Menissier-de Murcia, J., Le Page, F., Boiteux, S., Murcia, G., Radicella, J.P.: Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 44068-44074, 2003.
76. Tufan, E.E.: DNA onarım enzimi OGG1 SER326CYS polimorfizmi ile akciğer kanseri ilişkisinin Türk popülasyonunda araştırılması ve oksidatif hasarın biyogöstergesi olarak 8-OHdG ölçümü, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2007.
77. Hirano, T.: Repair system of 7,8-dihydro-8-oxoguanine as a defence line against carcinogenesis. *Journal of Radiation Research*, 49: 329-340, 2008.
78. Dou, H., Mitra, S., Hazra, T.K.: Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 49679-49684, 2003.
79. Das, A., Boldogh, I., Lee, J.W., Harrigan, J.A., Hegde, M.L., Piotrowski, J., de Souza Pinto, N., Ramos, W., Greenberg, M.M., Hazra, T.K., Mitra, S., Bohr, A.V.: The human Werner Syndrome protein stimulates repair of oxidative DNA base damage by the DNA glycosylase NEIL1. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 26591-26602, 2007.

80. Parsons, J.L., Bodil Kavli, B., Slupphaug, G., Grigory L. Dianov, G.L.: NEIL1 is the major DNA glycosylase that processes 5-hydroxyuracil in the proximity of a DNA single-strand break. *Biochemistry*, 46: 4158-4163, 2007.
81. Parsons, J.L., Zharkov, D.O., Dianov, G.L.: NEIL1 excises 3' end proximal oxidative DNA lesions resistant to cleavage by NTH1 and OGG1. *Nucleic Acids Research*, 33 (15): 4849-4856, 2005.
82. Halliwell, B.: Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept. *Nutrition Reviews*, 57: 104-113, 1999.
83. Breinholt, V.M., Molck, A.M., Svendsen, G.W., Daneshvar, B., Vinggaard, A.M., Poulsen, M., Dragsted, L.O.: Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3-methylimidazole (4,5-f)-quinoline (IQ) on preneoplastic lesions and on oxidative damage, hormonal status, and detoxification capacity in the rat. *Food Chemical Toxicology*, 41: 1315-1323, 2003.
84. Halliwell, B.: Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutrition Reviews*, 55: 44-49, 1997.
85. Çakıroğlu, T.N.: Çeşitli çözücülerde Türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2010.
86. Doyle, E. and Griffiths, J.B.: Cell and tissue culture: Laboratory procedures in biotechnology. John Wiley & Sons, Guildford, UK, 1999, pp. 55-76.
87. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F.: Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221, 2000.
88. Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E.: Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the comet assay. *Radiation Research*, 122: 86-94, 1990.
89. Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinka, M., Kennedy, G., Stetina, R.: The comet assay: What can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183-193, 1997.
90. Lee, R.F. and Steinert, S.: Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43-64, 2003.
91. Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Boedecker, R.H., Mann, M., Sundermann, V.M.: The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 566: 209-229, 2004.

92. Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Awadhesh, N.J.: Comet assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25: 53-64, 2007.
93. Kubista, M., Andrade, J.M., Bangtsson, M., Forootan, A.: The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2-3): 95-125, 2006.
94. Wilhelm, J. and Pingoud, A.: Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem*, 4 (11): 1120-1128, 2003.
95. Abdelwahab, S., Mohan, S., Elhassan, M., Al-Mekhlafi, N., Mariod, A., Abdul, A., Abdulla, M., Alkharfy, K.: Antiapoptotic and antioxidant properties of orthosiphon stamineus benth (Cat's Whiskers): Intervention in the Bcl-2-mediated apoptotic pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 1-11, 2011.
96. Menteşe, A. Homosisteinin yağ dokusunda okside LDL (OxLDL) reseptörü gen ekspresyonu üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2011.
97. Skinner, R., Trujillo, A., Ma, X., Beierle, E.: Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells. *Journal of Pediatric Surgery*, 44: 212-216, 2009.
98. Munari, C.C., Alves, J.M., Bastos, J.K., Tavares, D.C.: Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology*, 30 (1): 22-28, 2009.
99. Sulaiman, G.M., Al Sammarrae, K.W., Ad'hiah, A.H., Zucchetti, M., Frapolli, R., Bello, E., Erba, E., D'Incalci, M., Bagnati, R.: Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2415-2421, 2011.
100. Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B.S., Marcucci, M.C.: Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, 5: 27-37, 2011.
101. Lima, R.O.A., Bazo, A.P., Said, R.A., Sforcin, J.M., Bankova, V., Darros, B.R., Salvadori, D.M.F.: Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45: 8-16, 2005.
102. Chen, X., Nishida, H., Konishi, T.: Baicalin promoted the repair of DNA single strand breakage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured NIH3T3 fibroblasts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26: 282-284, 2003.
103. Tavares, D.C., Barcelos, G.R.M., Silva, L.F., Tonin, C.C.C.T., Bastos, J.K.: Propolis induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in Vitro*, 20: 1154-1158, 2006.

104. Lee, K.J., Choi, J.H., Hwang, Y.P., Chung, Y.C., Jeong, H.G.: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester on tert-butyl hydroperoxide induced oxidative hepatotoxicity and DNA damage. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2445-2450, 2008.
105. Ramos, A.A., Lima, C.F., Pereira, M.L., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C.: Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicology Letters*, 177: 66-73, 2008.
106. Riberio, D.A., Carlin, V., Fracalossi, A.C.C., Oyama, L.M.: Radiopacifiers do not induce genetic damage in murine fibroblasts: An *in vitro* study. *International Endodontic Journal*, 42: 987-991, 2009.
107. Hartmann, A., Agurell, A., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A.R., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R.: Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 18 (1): 45-51, 2003.
108. Panayiotidis, M., Tsolas, O., Galaris, D.: Glucose oxidase-produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces Ca<sup>+2</sup>-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 548-556, 1999.
109. Huang, Q., Wu, L.J., Tashiro, S., Gao, H.Y., Onodera, S., Ikejima, T.: (+)-Catechin, an ingredient of green tea, protects murine microglia from oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle arrest. *Journal of Pharmacological Sciences*, 98: 16-24, 2005.
110. Maher, P. and Hanneken, A.: Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46 (12): 4796-4803, 2005.
111. Erdogan, S., Ates, B., Durmaz, G., Yilmaz, İ., Seckin, T.: Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1592-1597, 2011.
112. Das, A., Hazra, T.K., Boldogh, I., Mitra, S., Bhakat, K.K.: Induction of the human oxidized base-specific DNA glycosylase NEIL1 by reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (42): 35272-35280, 2005.
113. Shinmura, K., Tao, H., Goto, M., Igarashi, H., Taniguchi, T., Maekawa, M., Takezaki, T., Sugimura, H.: Inactivating mutations of the human base excision repair gene NEIL1 in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 25 (12): 2311-2317, 2004.
114. Von Borstel, R.C. and Higgins, J.A.: Janus carcinogens and mutagens. *Mutation Research*, 402: 321-329, 1998.

115. Munari, C.C., Resende, F.A., Alves, J.M., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Tavares, D.C.: Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in chinese hamster ovary cells. *Planta Medica*, 74: 1363-1367, 2008.

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Beypazarı' nda doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara' da tamamladı. 2001 yılında Ankara Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar programını bitirerek, aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne dikey geçiş yaptı. 2004 yılında Biyoloji bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı' nda yüksek lisansa başladı. 2008 yılında yüksek lisansını tamamlayarak, aynı bölümde doktora programına kayıt yaptırdı. Halen aynı programda eğitimine devam etmektedir. Aynı zamanda 2009 yılından itibaren Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu' nda Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır.

**İbrahim TURAN**