



**T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DÜZCE YÖRESİNE AİT PROPOLİSLERDEN HAZIRLANAN
EKSTRAKTLARIN BAZI KİMYASAL VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

HAVA KAMUK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HALİL İBRAHİM UĞRAŞ**

DÜZCE, 2020

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DÜZCE YÖRESİNE AİT PROPOLİSLERDEN HAZIRLANAN
EKSTRAKTLARIN BAZI KİMYASAL VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Hava KAMUK tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Baki ÇİÇEK

Balıkesir Üniversitesi

Doç. Dr. Haydar GÖKSU

Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 24/06/2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

24 Haziran 2020

Hava KAMUK



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Halil İbrahim Uğraş'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen öğretim görevlileri Dr. Şeref Karadeniz, Elif Sine Düvenci, Aydan Fülden Ağan ve Pınar Yoldaş'a şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgmeden benimle paylaşan değerli iş arkadaşım Uzman Furkan Yünkül'e ve her zaman bana değer katarak öğreten, bu tez çalışmamda bana her zaman yardımcı olan çok sevgili dostum Elmashan Gökesaoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yorulduğumda, durmam gerektiğini düşündüğümde bana hep yol alabileceğimi inandıran kuzenlerim Büşra Çakmakçı, Tuğba Tuksavul ve onun minik oğlu Özgür Tuksavul'a, maddi-manevi hiçbir desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve olacağını bildiğim babam Yakup Kamuk'a, annem Ayşe Kamuk'a, kar bastırıp okulda mahsur kaldığım gecelerde beni almaya gelen ve benim hep yanımda olan sevgili abim Ahmet Kamuk'a, iş ve okul çıkışlarımda leziz yemeklerinin hep hazır olduğunu bildiğim ve gerçek bir abla olduğu için sevgili ablam Melek Baykal'a, her dara düştüğümde aradığımda asla cevapsız bırakmayan sevgili abim Abdussamed Baykal'a minnetlerimi sunarım. Son olarak en büyük destekçim Kağan Alp Baykal'a sonsuz sevgimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım sürecimde beni sakinleştiren arkadan gelen ezgilerin bestecileri Nalmes, Bzabza, Kok albüm ekibi ve daha nicelerine teşekkürlerimi sunarım.

Unuttuğum sayısız kahramana, özellikle yukarıda adı geçen her kişiye sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

24 Haziran 2020

Hava KAMUK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	x
SİMGELER	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. PROPOLİS NEDİR?	1
1.2. PROPOLİSİN BİTKİSEL KAYNAĞI	2
1.3. PROPOLİSİN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ	3
1.4. PROPOLİSİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE İÇERİĞİNDE BULUNAN BİLEŞENLER	4
1.4.1. Flavanoid Bileşikler	5
1.4.1.1. <i>Flavonlar</i>	6
1.4.1.2. <i>Flavonoller</i>	8
1.4.1.3. <i>Flavanonlar</i>	9
1.4.1.4. <i>İzoflavanoidler</i>	9
1.4.1.5. <i>Neoflavanoidler</i>	10
1.4.2. Terpenler	11
1.4.2.1. <i>Monoterpenler</i>	12
1.4.2.2. <i>Seskiterpenler</i>	12
1.4.2.3. <i>Diterpenler</i>	12
1.4.2.4. <i>Triterpenler</i>	13
1.4.3. Kumarinler	13
1.4.4. Fenolik Bileşikler	14
1.4.4.1. <i>Benzoik Asit ve Türevleri</i>	16
1.4.4.2. <i>Benzaldehit Türevleri</i>	16
1.4.4.3. <i>Sinamil alkol ve sinamik asit türevleri</i>	16
1.4.5. Yağ Asitleri	17
1.4.6. Diğer Bileşenler	17
1.5. PROPOLİSİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİ	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM	21

2.1. MATERYAL	21
2.1.1. Propolis	21
2.1.2. C6 Gliyal Tümör Hücresi	21
2.1.3. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler	21
2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
2.2. YÖNTEM	23
2.2.1. Propolis Örneklerinin Toplanması	23
2.2.2. Çözünürlük Çalışmaları	23
2.2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	24
2.2.4. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması	25
2.2.4.1. <i>Etanolik Propolis Ekstraksiyonu</i>	25
2.2.4.2. <i>Etanol/Su Karışımı ile Propolis Ekstraksiyonu</i>	25
2.2.4.3. <i>Su ile Propolis Ekstraksiyonu</i>	26
2.2.4.4. <i>Bitkisel Gliserin ile Propolis Ekstraksiyonu</i>	26
2.2.4.5. <i>Su ile Propolis Ekstraksiyonu (File Denemesi)</i>	26
2.2.5. Toplam Fenolik Tayini	27
2.2.6. Toplam Flavanoid Tayini	29
2.2.7. Hücre Hattı ile %Canlılık Testi	30
2.2.7.1. <i>Hücre Kültürü</i>	30
2.2.7.2. <i>C6 Gliyal Hücresinin Çoğaltılması ve Sayılması</i>	30
2.2.7.3. <i>Hücrelerin Canlılık Testi, WST-1 Analizi</i>	31
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
3.1. ÇÖZÜNÜRLÜK ÇALIŞMASI SONUÇLARI	33
3.2. PROPOLİS EKSTRAKTLARININ % VERİM SONUÇLARI	36
3.3. EKSTRAKTLARDA TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ	37
3.4. PROPOLİS EKSTRAKTLARINDA TOPLAM FLAVANOİD MADDE ANALİZİ	39
3.5. PROPOLİS EKSTRAKTLARI İLE YAPILAN HÜCRE CANLILIK ÇALIŞMASI (WST-1 ANALİZİ)	41
3.5.1. <i>Propolisin Etanol/Su karışımli Ekstraktlarının % Canlılık Sonuçları</i> ...	41
3.5.2. <i>Propolis Etanolik Ekstraktlarının % Canlılık Sonuçları</i>	41
3.5.3. <i>Propolisin Sulu Ekstraktlarının % Canlılık Sonuçları</i>	42
3.5.4. <i>Propolisin Sulu Ekstraktlarının (File Denemesi) % Canlılık Sonuçları</i> . 43	
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	44
5. KAYNAKLAR	53



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Propolis toplayan bal arısı [6].....	1
Şekil 1.2. Propolis örneği a) İşlem görmemiş propolis b) Blenderdan geçirilmiş propolis.....	4
Şekil 1.3. Flavanoidlerin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 1.4. Flavonların kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.5. Kalkonların kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.6. Flavanonların kimyasal gösterimi.....	9
Şekil 1.7. İzoflavonların kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.8. Neoflavanoidlerin kimyasal yapıları a) 3,4-dehidro-4-arilkumarin b) Neoflaven c) 4-arilkumarin.....	11
Şekil 1.9. Propolis içeriğinde bulunan terpen grupları a) Monoterpen b) Diterpen c) Triterpen d) Seskiterpen.....	12
Şekil 1.10. Kumarinin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.11. Fenolik halkanın gösterimi.....	15
Şekil 2.1. Farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltiler.....	28
Şekil 2.2. Hücre kültürü kabini.....	30
Şekil 2.3. C6 gliyal tümör hücresi mikroskop görüntüsü.....	31
Şekil 3.1. Propolis-etanol karışımı.....	33
Şekil 3.2. Propolis-gliserin karışımı.....	34
Şekil 3.3. Propolis-distile su karışımı.....	34
Şekil 3.4. Propolis-sıcak su karışımı.....	35
Şekil 3.5. Propolis/etanol+sıcak su ve propolis/etanol+distile su karışımı.....	35
Şekil 3.6. Farklı etanol:distile su karışımlarıyla hazırlanan propolis dispersiyonları.....	36
Şekil 3.7. Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen evaporasyon işlemine tabi tutulmuş ve bu işleme tabi tutulacak propolis ekstraktları.....	37
Şekil 3.8. Gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	38
Şekil 3.9. Toplam fenolik madde miktar grafiği.....	39
Şekil 3.10. Kuersetin kalibrasyon eğrisi.....	39
Şekil 3.11. Toplam flavanoid madde miktar grafiği.....	40
Şekil 3.12. Propolisin etanol/su karışımli ekstraktlarının karşılaştırmalı % canlılık sonuçları.....	41
Şekil 3.13. Propolisin etanolik ekstraktlarının karşılaştırmalı % canlılık sonuçları.....	42
Şekil 3.14. Propolisin sulu ekstraktlarının karşılaştırmalı % canlılık sonuçları.....	42
Şekil 3.15. Propolisin sulu ekstraktlarının (file denemesi) karşılaştırmalı % canlılık sonuçları.....	43

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Bitki türü, coğrafik bölge ve iklime göre propolis içeriği [19].	3
Çizelge 1.2. Propolisin bileşiminde bulunan maddelerin oranları [22].	4
Çizelge 1.3. Bitkilerdeki Fenolik Bileşik Sınıfları [30].	15
Çizelge 1.4. Propolis içeriğindeki diğer bileşenler [22], [40], [46], [74], [79]-[81].	18
Çizelge 2.1. Deney sırasında kullanılan cihazlar.	21
Çizelge 2.2. Deney sırasında kullanılan kimyasal maddeler.	22
Çizelge 2.3. Su+etanol/propolis (11:1.1) ve sıcak su+etanol/propolis (11:1.1).	24
Çizelge 2.4. Toplam fenolik tayini analizinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri.	28
Çizelge 2.5. Toplam flavanoid tayini analizinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri.	29
Çizelge 3.1. Farklı çözücüler ile elde edilen propolis ekstraksiyon verimleri.	37
Çizelge 3.2. Propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı.	38
Çizelge 3.3. Propolis ekstraktlarının toplam flavanoid madde miktarı.	40
Çizelge 3.4. Propolisin etanol/su karışımli ekstraktlarının % canlılık sonuçları.	41
Çizelge 3.5. Propolisin etanolik ekstraktlarının % canlılık sonuçları.	42
Çizelge 3.6. Propolisin sulu ekstraktlarının % canlılık sonuçları.	42
Çizelge 3.7. Propolisin sulu ekstraktlarının (file denemesi) % canlılık sonuçları.	43

KISALTMALAR

A549, CH27	Akciğer kanseri hücre hattı
Al	Alüminyum
AlCl ₃	Alüminyum klorür
AChE	Asetilkolinesteraz
As	Arsenik
B	Bor
Ba	Baryum
BACE-1	B-amiloid bölünme enzimi
C	Karbon
Ca	Kalsiyum
CAPE	Kafeik asit fenil esteri
CCD-841 CoN	İnsan kolon epitel hücresi
CCRF-SB	Lösemi hücre hattı
Cd	Kadmiyum
Co	Kobalt
COX	Siklooksijenaz
CO ₂	Karbondioksit
Cr	Krom
Cu	Bakır
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DÜBİT	Düzce Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
DÜGETAM	Düzce Üniversitesi Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EMA	European Medicines Agency
Fe	Demir
GA	Gallik asit
HCT-116	Kolon kanseri hücre hattı
Hep G2, Hep 3B	Karaciğer kanseri hücre hattı
Hg	Cıva
HL-60, U937	Lösemi hücre hattı
HUVEC	Endotel hücreler
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
K	Potasyum
MCF-7	İnsan meme kanseri (ER+) hücre hattı
MDA-MB-231	İnsan meme kanseri (ER-) hücre hattı
MSC	Mezenkimal stromal hücreleri
Mg	Magnezyum
MiRNA	MikroRNA
Mn	Mangan
Na	Sodyum
Ni	Nikel

OH ⁻	Hidroksil
P	Fosfor
Pb	Kurşun
Pen-Strep	Penisilin-Streptomisin
QE	Kuersetin
RNA	Ribonükleik asit
S	Kükürt
Sr	Stronsiyum
UV	Ultraviyole
V	Vanadyum
WST-1	Water soluble tetrazolium salt-81/2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum
Zn	Çinko
°2	Sekonder ya da ikincil



SİMGELER

A	Alfa
B	Beta
G	Gram
m-	Meta
o-	Orto
Ppm	Milyonda bir kısım
Mg	Mikrogram
Mbar	Milibar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
Mm	Milimetre
Nm	Nanometre
Rpm	Dakikada devir sayısı
°C	Celcius
%	Yüzde konsantrasyon

ÖZET

DÜZCE YÖRESİNE AİT PROPOLİSLERDEN HAZIRLANAN EKSTRAKTLARIN BAZI KİMYASAL VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Hava KAMUK
Düzce Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ
Haziran 2020, 60 sayfa

Propolis, eski çağlardan bu yana birçok alanda kullanılmakta olan *Apidae* ailesinden *Apis mellifera* türü bal arıları tarafından toplanan doğal bir üründür. Propolis, yapışkan, reçinemsî bir madde olmasının yanı sıra içeriğinde bulunan farklı bileşenler propolisin kullanım alanını belirlemektedir. Propolisin fenolik ve flavanoid içeriği sebebiyle antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiülser, antiinflamatuvar, antioksidan ve antikanser gibi çeşitli biyolojik aktivite göstermektedir. Türkiye’de propolis üzerine birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte bu çalışmalarda kullanılan propolise ait lokasyon bilgisinin verilerek kimyasal kompozisyonlarının belirlendiği çalışmalar oldukça azdır. Literatüre bilgi kazandırmak amacıyla yapılan bu çalışmada Düzce ilinden toplanan propolis örneklerinden farklı çözücüler kullanılarak ekstraktları hazırlanmıştır ve bu çözücüler için % verim sonuçları hesaplanmıştır. Hazırlanan ekstraktların fenolik ve flavanoid içerikleri belirlenerek propolis ekstraktlarının *in vitro* şartlarda C6 gliyal tümör hücre hattı üzerinde etkinliğini göstermek amacıyla WST-1 testi ile % canlılık çalışılmıştır. Sonuç olarak; farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlar için % verim, fenolik ve flavanoid bileşen miktarında farklılıklar olduğu görülmüştür. En yüksek verim sonucu etanolik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiştir. En yüksek fenolik içerik 40,04 (mg GA/g) ve en yüksek flavanoid içerik 2,30 (mg QE/g) etanol-su karışımının kullanıldığı ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiştir. Ayrıca C6 gliyal tümör hücreleri ile yapılan çalışmada propolis ekstraktının konsantrasyonu arttığında % canlılığın azaldığı gösterilmiştir. Propolisin hücre hattı üzerine farmakolojik etki göstermesi sebebiyle ilaç veya koruyucu/yardımcı madde olarak kullanımına olanak tanıyabilir.

Anahtar sözcükler: C6 gliyal tümör hücresi, Ekstraksiyon, Fenolik / Flavanoid bileşen, Propolis, % Canlılık.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME CHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EXTRACTS PREPARED FROM PROPOLIS OF DUZCE

Hava KAMUK

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry

Master's Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

June 2020, 60 pages

Propolis is a natural product collected by a type of honey bee named *Apis Mellifera* from the *Apidae* family; which has been used in many areas since the ancient times. Besides its sticky, adhesive and resinous structure, the substances of propolis determine its area of usage. Due to its phenolic and flavonoid content, Propolis exhibits various biological activities such as antibacterial, antiviral, antifungal, antiulcer, anti-inflammatory, antioxidant and anticancer. Although there is a considerable amount of studies on propolis in Turkey, it has been observed that these studies do not determine chemical compositions of propolis by taking the factor of location into account. The study is conducted in order to contribute data to the existing literature; while doing so, extracts were prepared using different solvents retrieved from propolis samples gathered in Duzce province and % yield results were calculated from these solvents. The phenolic and flavonoid contents of the prepared extracts were determined and % viability was studied with WST-1 test in order to demonstrate the efficacy of propolis extracts on the C6 glial tumor cell line in vitro conditions. As a result; for extracts prepared with different solvents, there were differences in % yield, amount of phenolic and flavonoid components. The highest yield result was obtained by the ethanolic extraction method. The highest phenolic content 40,04 (mg GA/g) and the highest flavonoid content 2,30 (mg QE/g) were obtained by the extraction method using a mixture of ethanol-water. In addition, in the study with C6 glial tumor cells, it has been presented that when the concentration of propolis extract increases, % viability decreases. It has also been shown that propolis collected from Duzce region can be used as a drug or preservative / auxiliary agent since it has a pharmacological effect on the cell line.

Keywords: C6 glial tumor cell, Extraction, Phenolic / Flavonoid component, Propolis % Viability.

1. GİRİŞ

1.1. PROPOLİS NEDİR?

Günümüzde kullanılan kimyasal kökenli ilaçların istenmeyen bazı yan etkilerinin oluşması ve hastalığa sebep olan etmenlerin bu gibi ilaçlara direnç göstermesi insanları bitkisel ilaç olarak isimlendirilen doğal ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. En çok kullanılan doğal ürünlerden biri de arı ürünleridir [1].

Arılar uzun yıllar varlıklarını sürdürebilen, kendilerine ait doğal yaşam ortamları ve çok çeşitli türleri olan canlılardır. Çeşitliliklerinin zenginliği ve varoluşlarının önemi arı ürünlerinin kullanım alanlarını arttırmaktadır [2]. Arı ürünlerinin pek çok hastalığın tedavisinde ve hastalığın ilerlemesini engellemek için kullanıldığı görülmektedir. Bal, polen, arı zehri, arı sütü ve propolisin tıbbi amaçlı kullanımına *Apiterapi* denilmektedir ve geçmişi çok eskilere dayanmaktadır [3].

Propolis, genellikle *Apis mellifera* olarak adlandırılan bal arıları tarafından toplanmaktadır. Bal arıları bitkilerden propolisi toplama işleminde, önce çeneleri yardımıyla çekerek koparırlar. Ardından ağızlarında ıslatarak yumuşak hale getirirler. Bazı enzimlerin ilavesiyle pellet haline getirirler. Daha sonra pelleti arka bacaklarında Şekil 1.1’de gösterildiği gibi polen sepetlerinde depo ederek koloniye taşımaktadırlar [4], [5].



Şekil 1.1. Propolis toplayan bal arısı [6].

Propolisin sözcük anlamı eski Yunanca’dan gelmektedir. ‘Pro’, savunma, koruma anlamına, ‘polis’ ise şehir anlamına gelir. Propolis, bal arılarının kovanlarının savunması

ile ilgili olarak kullanılmıştır [4]. Yunan yazıtlarında ve Romalılar döneminde arıların zararlı mikroorganizmalara karşı en güçlü kimyasal silahı olan propolisin dış hastalıklarında, iltihaplı yara tedavilerinde kullanıldığı aynı zamanda propolis özünün lapa benzeri bir karışıma eklenerek kullanıldığından söz edilmektedir [2], [7]. Aynı zamanda propolisin reçinemsî özelliğinden dolayı arılar tarafından mumyalama maddesi, tutkal ve dolgu maddesi olarak da kullanıldığı bilinmektedir. Arılar kovana yaklaşan canlıları kovandan uzaklaştıramadıklarında bu canlıları propolis ile mumyalayarak mikroorganizma üremesini durdurur ve kolonilerin hastalık etmenlerine karşı korunmasını sağlamaktadırlar [4], [8].

Günümüze ulaşan çalışmalar sonucunda, propolisin antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar, anti-neoplastik, antiülser, hepatoprotektif, antitümöral, spazmolitik, anesteziik, antioksidan, antikanser özelliklere sahip olması ve içeriğinde bulunan zengin kimyasal bileşenler sayesinde apiterapi, ilaç, gıda ve biyokozmetik sektöründe etken ve koruyucu madde olarak kullanılmasını sağlamıştır [9]-[12]. Propolisin düşük kan basıncını, enfeksiyonlara karşı vücut direncini ve kolesterol seviyelerini arttırdığı, dermatit türlerini hafiflettiği görülmüştür [13]. Propolisin bunun gibi pek çok özelliği bilim adamlarının dikkatini çekmiş ve bu alanda propolisin biyolojik aktiviteleri, farmakolojisi, kimyasal yapısı ve terapötik kullanımı ile ilgili araştırmalar hala devamlılığını sürdürmektedir [14].

1.2. PROPOLİSİN BİTKİSEL KAYNAĞI

Propolis, genellikle *Apis mellifera* olarak adlandırılan bal arıları tarafından huş (*Betula alba*), at kestanesi (*Aesculus hippocastanum*), kavak (*Populus spp.*), kestane (*Castanea sativa*), kayın (*Fagus sylvatica*), akçağaç (*Alnus glutinosa*) ağaçlarından ve bazı otsu bitkilerin kozalak, genç sürgün, yaprak, kabuk ve bitki tomurcuklarından elde edilir [15]-[17].

Propolis içeriğindeki bileşen miktarları bitki türüne ve coğrafi bölgelere göre değişkenlik göstermekte ve buna bağlı olarak biyolojik aktivitelerinin şiddetinde farklılıklar olmaktadır.

Ek olarak aynı ülke sınırları içinde bile toplanma yeri ve zamanı farklı olduğunda yapılan araştırma sonuçları kantitatif ve kalitatif olarak etkilenmektedir. Propolis içeriğindeki farklılıklar bitki türüne, coğrafik bölgeye ve iklim çeşitliliğine göre Çizelge 1.1'de

gösterilmiştir [18].

Çizelge 1.1. Bitki türü, coğrafik bölge ve iklime göre propolis içeriği [19].

	Ilıman Bölge	Tropikal Bölge
Coğrafi Konum	Batı Asya, Avrupa, Yeni Zelanda, Kuzey Amerika	Brezilya, Güney Amerika, Avusturalya, Venezüella
Yaygın Bitki Türü	Kavak ağaçları zengin bir propolis kaynağıdır. Fenolik bileşen kavak ağaçlarında bol miktarda bulunur.	Yeşil propolis üretimi için <i>Baccharis dracunculifolia</i> , <i>Clusia minor</i> , imza ağacı (<i>Clusia Major</i>), salon çamı (<i>Araucaria heterophylla</i>), gibi bitkilerde bulunmaktadır.
Propolis Bileşen İçeriği	Bileşen açısından zengindir. Ilıman bölgede flavanoidler, fenolikler, aromatik asit ve esterleri içerir.	Flavanoid bileşen sayısı azdır. Tropikal kesim terpenler açısından zengindir. Kumarik asit ve türevlerini içermektedir.

1.3. PROPOLİSİN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ

Propolis, belirli kendine özgü keskin kokusu olan, yapışkan ve alkolde çözünebilen bir maddedir. Genelde 60-70°C’de eriyen propolisin bazı çeşitlerinin erime sıcaklığı 100°C’yi bulmaktadır. Dondurulduğunda sert bir yapı kazanır. Propolisin bileşen içeriği gibi rengi de toplandığı bölgenin coğrafik koşullarına, toplanma zamanına, toplandığı bitki türüne, iklim kuşaklarına ve bekleme süresine bağlı olarak mat, parlak, lifli ve farklı renklerde bir görüntüye sahiptir. Propolisin rengi Şekil 1.2’de gösterildiği üzere sarıdan kahverengiye kadar birçok şekilde gözlenir [20].



Şekil 1.2. Propolis örneği a) İşlem görmemiş propolis b) Blenderdan geçirilmiş propolis.

1.4. PROPOLİSİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE İÇERİĞİNDE BULUNAN BİLEŞENLER

Propolisin kimyasal içeriği çok bileşenli olup arılar tarafından toplandığı bölgenin florasıyla yakından ilişkilidir [21]. Propolis, fenolik asitler ve esterleri, polifenoller, yağ asitleri, kumarinler, β -steroidler, steroidler, alkoller, terpenler, seskiterpenler, flavanoidler (flavonlar, flavononlar, flavonoller, dihidroflavonoller, kalkonlar), stilbenler, aminoasitler ve inorganik bileşiklerden oluşan 300'den fazla bileşen içerir ve bileşen zenginliğinden dolayı farklı biyolojik özellikler sergilemektedir [22]-[24]. Bu bileşenlerden en önde gelenlerinden biri de polifenollerdir [25]. Propolis bileşiminde bulunan başlıca bileşenler Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Propolisin bileşiminde bulunan maddelerin oranları [22].

Bileşenler	Ana Madde	Miktar %
Reçine	Flavonoidler	45-55
	Terpenler	
	Kumarinler	
	Fenolik asit ve esterleri	
Bal mumu	Doymamış yağ asidi	25-35
Esansiyel Yağlar	Uçucu bileşenler	10

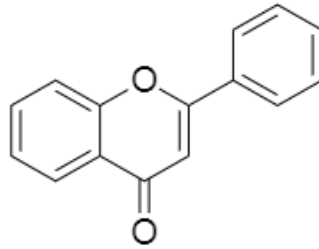
Çizelge 1.2. (devam) Propolisin bileşiminde bulunan maddelerin oranları [22].

Bileşenler	Ana Madde	Miktar %
Polen	Serbest aminoasitler	5
	Proteinler	
	Vitaminler (A, B, C vs.)	
Organik madde ve mineraller	Ketonlar	5

1.4.1. Flavanoid Bileşikler

Flavanoidler, bitkisel kökenli olup meyve ve sebzelerde bulunan, yapıları ve özellikleri bakımından çeşitlilik gösteren düşük moleküler ağırlıklı, genelinde flavon çekirdeğine sahip üç benzen halkasından oluşmakta olan heterosiklik yapıdaki polifenolik bileşik grubudur [26]-[29]. Günümüze ulaşan kaynaklar incelendiğinde bitkilerin birçok kısmında rastlanan yaklaşık 4000'den fazla flavanoid bitkilerin aroma, koku ve renk vermesini sağlamaktadır [27].

Flavanoidler, antioksidan özellik gösteren biyolojik aktiviteye sahip ikincil bitki bileşenleridir [29]. Aynı zamanda serbest radikalleri yakalamaları, antialerjen, antibiyotik, antiülser, antiinflamatuar, ışıktan koruma ve enzim aktiviteleri düzenleme gibi etkileri olduğundan araştırmacıların ve bu araştırmalar sonucunda tıp dünyasının ilgisini çekmektedir [30], [31]. Flavanoidlerin genel yapısı Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Flavanoidlerin kimyasal yapısı.

Propolisin yapısında bulunan flavanoid bileşenler;

- Krisin (C₁₅H₁₀O₄)
- Ramnositrin (C₁₆H₁₂O₆)
- Galangin (C₁₅H₁₀O₅)

- Kaempferid (C₁₆H₁₂O₆)
- Kaempferol (C₁₅H₁₀O₆)
- Apigenin (C₁₅H₁₀O₅)
- Asesetin (C₁₆H₁₂O₅)
- İzohamnetin (C₁₆H₁₂O₇)
- Kuarsetin (C₁₅H₁₀O₇)
- Ramnetin (C₁₆H₁₂O₇)
- İzosakuranetin (C₁₆H₁₄O₅)
- Sakuranetin (C₁₆H₁₄O₅)
- Pinosembrin (C₁₅H₁₂O₄)
- İzalpinin (C₁₆H₁₂O₅)
- Ermanin (C₁₇H₁₄O₆)
- Ramnazin (C₁₇H₁₄O₇)
- İnositol (C₆H₁₂O₆)
- Pinostrobin (C₁₆H₁₄O₄)
- Luteolin (C₁₅H₁₀O₆)
- Kuarsetin-3,3'-dimetil (C₁₇H₁₄O₇)
- Pinobanksin (C₁₅H₁₂O₅)
- Pinobanksin-3-asetil (C₁₇H₁₄O₆)
- Pektonaringenin (C₁₇H₁₄O₆) [32].

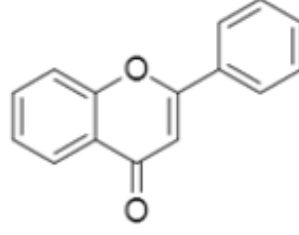
Flavanoidler ve diğer bileşenlerin biyokimyasal aktiviteleri moleküldeki çeşitli bölgelerin yönelimleriyle alakalıdır [26]. Merkezinde bulunan piran halkasının oksidasyonuna göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, antosiyanidinler, flavanoller (kateşinler ve proantosiyanidinler) şeklinde gruplandırılmaktadır [33]. Piran halkasının oksidasyonuna göre ayrılan grupların dışında farklı flavanoid grupları ya da bu grupların türevleri mevcuttur.

Flavonoller, flavonlar ve flavanonlar antoksaninler olarak isimlendirilmektedir [34], [35].

1.4.1.1. *Flavonlar*

Flavonlar; maydanoz, biberiye gibi bitki ve tahıllarda bulunmaktadır. Yaygın olan flavon türleri apigenin ve lutelindir [36]. Flavonların kas-iskelet sistemi üzerinde kas gevşetici özelliği, lösevi tedavisinde etkinliği ve anksiyete de etkisinin olduğu gösterilmiştir [35].

Flavonların kimyasal genel yapısı Şekil 1.4'te gösterilmiştir.

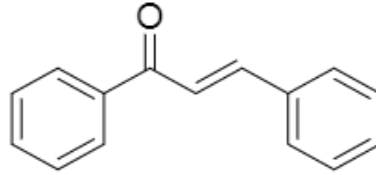


Şekil 1.4. Flavonların kimyasal yapısı.

Propolis içeriğinde bulunan flavonlar;

- Luteolin ($C_{15}H_{10}O_6$)
- Apigenin ($C_{15}H_{10}O_5$)
- 6-Sinnamil krisin ($C_{24}H_{18}O_4$)
- Hekzametoksi flavon ($C_{21}H_{22}O_8$)' dur [36], [37].

Flavonların sentezlenmesiyle ara ürün olarak kalkonlar oluşmaktadır. Kalkonlar, doğal bir bileşik grubudur. Kalkonlar iki benzen halkasının arasında üç karbon atomuyla birbirine bağlanan doymuş veya doymamış karbonil grubuna sahip flavanoid cinsidir [38]. Kalkonların genel yapısı Şekil 1.5'te gösterilmiştir. Flavanoid biyosentezinde öncüdür ve ekolojik rolleri vardır. Bunun yanı sıra, kalkonlar çeşitli konformasyonlarda var olabilen bileşenlerdir [39].



Şekil 1.5. Kalkonların kimyasal yapısı.

Propolis içeriğinde bulunan kalkonlar;

- Alpinetin kalkon ($C_{16}H_{14}O_4$)
- Naringenin kalkon ($C_{15}H_{12}O_5$)
- Pinostrobin kalkon ($C_{16}H_{14}O_4$)
- Pinosembrin kalkon ($C_{15}H_{12}O_4$)
- Sakuranetin kalkon
- Pinobanksin kalkon
- Pinobanksin-3-asetat kalkon

- 2',4',6-trihidroksidihidro kalkon
- 2,6-dihidroksi-4-metoksikalkon
- 2, 4', 6-trihidroksi-4-metoksikalkon
- 3,4,2',3'-tetrahidroksikalkon
- 4,4'-dihidroksi-2'-metoksikalkon kalkonlar [32], [37], [84].

1.4.1.2. Flavonoller

3-hidroksiflavon yapısında olan flavonoller soğan, çay, armut ve baklagil gibi besinlerin çoğunda bulunmaktadır [35], [36]. En yaygın flavonol türleri kuersetin ve kaempferoldür [36]. Flavonollerin antioksidan biyolojik aktivite göstermesiyle deoksiribonükleik asitin (DNA) oksidatif etkisini en aza indirgemede etkin olduğu, özellikle kadınlarda ortaya çıkan kalp hastalığı belirtilerini ve riskini önleme, kanserli hücre oluşumunu ve olgunlaşmasını engellemek gibi pozitif etkilerinin olduğu gösterilmiştir [35].

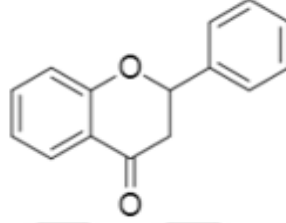
Propolis içeriğinde bulunan bileşenler;

- Kuersetin türevleri
- 2'-Geranil kuarsetin
- Macarangin
- Galangin türevleri
- Pinobanksin türevleri
- (2S) -5,7-Dihidroksi-4'-metoksi-8-fenil flavanon
- 3',4',6-Trihidroksi-7-metoksi flavanon
- Sigmoidin B
- Propolin E
- Propolin A
- Hesperidin-5,7-dimetil eter
- (2R, 3R) -6 [1- (4'-Hidroksi-3'-metoksifenil)
- 7-O-fenil strobopinin
- 7-O-fenil pinosembrin
- Bonannione A
- Solofenol A
- (2S)-7-Hidroksiflavanon
- (2S)-Naringenin

- (2S) -Dihidro Baicalein
- (2S) -Dihidro Oroksilin A. [37].

1.4.1.3. Flavanonlar

Daha çok meyan kökü, baharatlar, turunçgil ve baklagillerde rastlanmaktadır. Diğer flavanon kaynağı ise meyve suları ve narenciyelerdir [36]. Kimyasal yapıları Şekil 1.6' da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Flavanonların kimyasal gösterimi.

Propolis içeriğinde bulunan flavanonlar;

- (2R,3R)-3,7-Dihidroksi-6-metoksflavanone
- Alnustinol
- (2R, 3R)-3,6,7-Trihidroksiflavanon
- Garbanzol (C₁₅H₁₂O₅)
- 5-Metoksi-3-hidroksiflavanon [37].

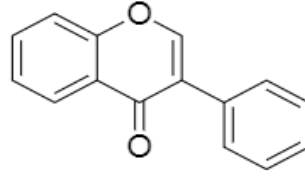
1.4.1.4. İzoflavanoidler

İzoflavanoidler bağlanma şekillerine göre kendi içinde izoflavan, izoflavanonlar, izoflavanoller, izoflavanlar, izoflav-3-enler, pterokarpanoidler, arilkumarinler, kumestanlar, rotenoidler şeklinde ayrılmaktadırlar [41].

İzoflavanlar fitoöstrojenikler olarak anılan bitki sınıfında malonil glikozit, asetil glikozit, aglikon (şeker olmayan) ve glikozit yapı olmak üzere dört temel yapıda bulunurlar [41], [42]. Aglikon yapılar glistein, genistein ve daidzein gibi bağ yapmamış yapılardır [42]. Genistein ve daidzeinin kanserin önlenmesi ve karsinogenezin inhibasyonu ile ilgili önemli etkileri ortaya çıkmıştır [43]. Bu etkilerinden dolayı en çok araştırması konusu olan grup izoflavanlardır [42].

İzoflavanoidlerin etki ve tepkileri, gastrointestinal sistemdeki davranışlarına bağlıdır. Bağırsak mikrobiyatasının bazıları izoflavanoidlere dönüşebilir ve gastrointestinal sistem üzerinde etkileri hem azaltma hem de artırma eğilimindedir [44]. İzoflavanoidlerin

doğrudan ya da dolaylı olarak antioksidan, antitumörjenik, antifungal, anjiyojenize inhibe edici, antiöstrojenik ve antiproliferatif gibi etkileri olduğu görülmüştür [43], [45]. Şekil 1.7’de İzoflavonların kimyasal yapısı gösterilmiştir.



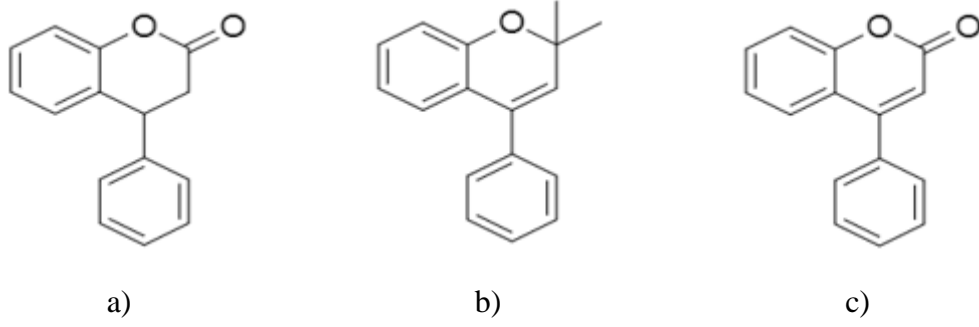
Şekil 1.7. İzoflavonların kimyasal yapısı.

Propolis içeriğinde bulunan izoflavanoidler;

- Odoratin (C₁₇H₁₄O₆)
- Kalikozin (C₁₆H₁₂O₅)
- Medikarpin (C₁₆H₁₄O₄)
- Homopterokarpin (C₁₇H₁₆O₄)
- 4',7-dimetoksi-2'-isoflavonol (C₁₇H₁₄O₄)
- Daidzein (C₁₅H₁₀O₄)
- Formononetin (C₁₆H₁₂O₄)
- Ksenognosin B (C₁₆H₁₂O₅)
- Biochanin A (C₁₆H₁₂O₅)
- Pratensein (C₂₂H₂₂O₁₁)
- 2'-Hidroksibiochanin A (C₁₆H₁₂O₆)
- (3S)-Vestitone (C₁₆H₁₄O₅)
- (3S)-Violanone (C₁₇H₁₆O₆)
- (3S)-Ferreirin (C₁₆H₁₄O₆)
- Biochanin (C₁₆H₁₂O₅) [37], [46].

1.4.1.5. Neoflavanoidler

Neoflavanoidler, 3,4-dehidro-4-arilkumarin, neoflaven 4-arilkumarin olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Hem kimyasal yapılarından dolayı hem de biyogenetik özelliklerinden dolayı izoflavanoidlere ve flavonoidlere benzemektedirler [47]. Şekil 1.8’de neoflavanoidlerin kimyasal yapıları gösterilmiştir.



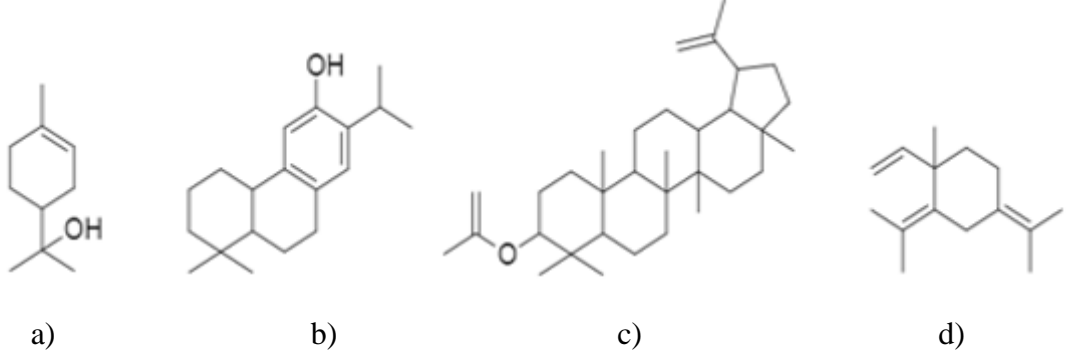
Şekil 1.8. Neoflavanoidlerin kimyasal yapıları a) 3,4-dehidro-4-arilkumarin b) Neoflaven c) 4-arilkumarin.

Propolis içeriğinde bulunan neoflavanoidler;

- 4-metoksidalbergio ($C_{16}H_{14}O_3$)
- 3,8-dihidroksi-9-metoksipteroکارپان ($C_{16}H_{14}O_5$)
- 3,4-dihidroksi-9-metoksipteroکارپان ($C_{16}H_{14}O_5$)
- 3-hidroksi-8,9-dimetoksipteroکارپان ($C_{17}H_{16}O_5$)
- 3,10-dihidroksi-9-metoksipteroکارپان ($C_{16}H_{14}O_5$)
- 6a-Etoksimedikarpın ($C_{18}H_{18}O_5$)
- 4-metoksimedikarpın ($C_{17}H_{16}O_5$) [48]-[51].

1.4.2. Terpenler

Terpen ile terpenoidler, 25.000'den fazla bileşik bulunduran bitki metabolitleridir. Terpen terimi, bir hidrokarbon molekülüne, terpenoid ise değiştirilmiş hidrokarbon molekülüne karşılık gelir. Propolisin en aktif bileşenlerden biri terpenler olup, en bol bulunan uçucu bileşenleridir. Terpenlerden dolayı propolisin kendine has kokusu ve tadı vardır. Terpenler 7 başlık altında toplanmaktadır. Bunlar; hemiterpenler, monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, triterpenler, tetraterpenler ve politerpenlerdir. Bu başlıkların altında seskiterpen grubu ana terpen grubunu oluşturmaktadır. Propolis için önemli diğer terpenler Şekil 1.9'da yapıları gösterilen monoterpenler, triterpenler ve diterpenlerdir [52], [53].



Şekil 1.9. Propolis içeriğinde bulunan terpen grupları a) Monoterpen b) Diterpen c) Triterpen d) Seskiterpen.

Terpenler kendi içinde dörde ayrılmaktadır. Bu gruplar aşağıda gösterilmiştir.

1.4.2.1. Monoterpenler

- Kafur ($C_{10}H_{16}O$)
- trans- β -Terpineol ($C_{10}H_{18}O$)
- Kampen ($C_{10}H_{16}$)
- Borneol ($C_{10}H_{18}O$)
- Linalol ($C_{10}H_{18}O$) [54].

1.4.2.2. Seskiterpenler

- alfa-Cadinol ($C_{15}H_{26}O$)
- alfa-Bisabsolol ($C_{15}H_{26}O$)
- alfa-Eudesmol ($C_{15}H_{26}O$)
- beta-Patchoulene ($C_{15}H_{24}$)
- alfa-Ylangene ($C_{15}H_{24}$)
- gama-Elemen ($C_{15}H_{24}$)
- Valensen ($C_{15}H_{24}$) [54]-[56].

1.4.2.3. Diterpenler

- İmbrikataloik asit ($C_{20}H_{32}O_3$)
- Manoil oksit ($C_{20}H_{34}O$)
- Abietik asit ($C_{20}H_{30}O_2$)
- Ferruginol ($C_{20}H_{30}O$)
- Neoabietik asit ($C_{20}H_{30}O_2$)

- Totarolone (C₂₀H₂₈O₂)
- Sempervirol (C₂₀H₃₀O)
- İmbrikatoloik asit (C₂₀H₃₄O₃)
- Pimarik asit (C₂₀H₃₀O₂)
- 13-Hidroksi-8(17), 14-labdadien-19-oik asit (C₂₀H₂₈O₅)
- Dehidrobietik asit (C₂₀H₂₈O₂)
- Dihidroagatik asit (C₂₀H₃₂O₄) [37], [57].

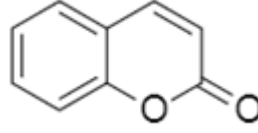
1.4.2.4. Triterpenler

- Germanikol asetat (C₃₂H₅₂O₂)
- alfa-Amirin asetat (C₃₅H₅₂O₂)
- Lupeol asetat (C₃₂H₅₂O₂)
- Lanosterol (C₃₀H₅₀O)
- alfa-Amiron (C₃₀H₄₈O)
- Lupeol (C₃₀H₅₀O)
- beta-Amirin asetat (C₃₂H₅₂O₂)
- beta-Amiron (C₂₉H₄₆O) [58].

1.4.3. Kumarinler

Kumarinler, bitkilerde bulunan, C₆-C₃ yapısına sahip olan fakat sinamik asitlerden C₃ yapısına bağlı heterosiklik oksijen bulundurmasıyla ayrılan, benzo-a-piron türevleri olan yapılardır [28], [59], [60]. Üç ana gruba ayrılırlar. Bunlar; basit kumarinler, furanokumarinler ve piranokoumarinlerdir. Kumarinlerin her bir alt grubu farklı polariteye sahiptir. Fakat her bir grup kendi içinde benzer polariteye ve benzer kimyasal yapıya sahiptir. Modern kimyasal ve farmasötik çalışmalar, propolisin önemli bileşiklerinin esas olarak basit kumarin içeren kumarinler olduğunu ortaya koymuştur. Genel etkilerinin yanında antipiretik ve spazmolitik etkileri de vardır [60].

Kumarinler, bitkilerin hastalıklara ve böcek gibi canlılara karşı direncinin arttırır. Aynı zamanda ultraviyole (UV) toleransında rol oynayan çok sayıda kumarin bulunmaktadır [28]. Şekil 1.10'da kumarinin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.10. Kumarinin kimyasal yapısı.

Propolis içeriğinde bulunan kumarinler;

- Eskülin (C₁₅H₁₆O₉)
- Dafnetin (C₆H₉O₄)
- Fraksetin (C₁₀H₈O₅)
- Umbelliferon (C₉H₆O₃)
- 4-metilumbelliferon (C₁₀H₈O₃)
- 4-hidroksikumarin (C₉H₆O₃)
- Herniarin (C₁₀H₈O₃) [61].

1.4.4. Fenolik Bileşikler

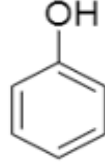
Fenolik bileşikler, meyve ve sebzeler dahil olmak üzere bitki alemindeki en yaygın ve çok sayıda dağılmış madde gruplarından birini oluşturan basit moleküllü fitokimyasallardır [25], [62].

Fenolik bileşiklerin bitkilerde renk, koku ve tattan sorumlu olmasının yanında, bitkilerde çekici renkler oluşturarak, böceklerin bitkilere yönelmesini ve tozlaşmanın olmasını sağlamaktadır [63], [64]. Aynı zamanda bu bileşiklerin bitki yaprağını UV radyasyonundan ve mantar patojenlerinden koruduğuna inanılmaktadır. Bu etkilerinin yanı sıra enerji transferinde, bitki büyüme hormonlarının eylemlerinde, fotosentez ve solunum kontrolünde ve cinsiyet tayininde de etkindirler [64]. Oksidatif stres ile ilgili çoğu hastalığın tedavisi için kilit rol oynarlar. Oksidatif strese karşı vitamin ve enzimlerin fonksiyonlarını tamamlayan ve işlevlerine katkı sağlayan, oksidatif strese karşı savunma görevi gösteren güçlü antioksidanlardır. Bu bileşenlerin antioksidan aktivitesi radikal temizleme etkisine dayandırılmaktadır [63]. Antioksidan aktivitesine dair yapılan çalışmaların çoğu *in vitro* çalışmalara dayanmasına rağmen, devam etmekte olan çalışma ve kanıtlar *in vivo* olarak antioksidan işlevlerinin ötesinde etki edebildiklerini göstermektedir [41].

Bu bileşiklerin antikarsinojenik, antienflamatuar, antitrombotik, bağışıklık düzenleyici ve

analjezik aktiviteler sergilediği ve bu fonksiyonları antioksidanlar olarak gösterdikleri rapor edilmiştir [13].

Fenolik bileşiklerin temelde dayandığı yapı fenoldür [28]. Şekil 1.11'de bu yapı gsterilmiştir. Fenolik bileşikler, yapısında oksijen bulunan aromatik bileşiklerden oluşan, bir veya birden çok hidroksil (OH⁻) grubu taşıyan yapısında en az bir aromatik halka bulunduran organik yapıdaki bileşiklerdir [65].



Şekil 1.11. Fenolik halkanın gsterimi.

Genel olarak, fenolik bileşikler temel yapılarına bağlı olarak en az 10 ture ayrılabilir. Bunlar basit fenoller, fenolik asitler, antrakininler, naftokinonlar, ksantonlar, kumarinler ve izokumarinler, stilbenler, flavanoidler ve ligninlerdir [62]. Çizelge 1.3'te karbon atom sayılarına gbre sınıflandırmaları verilmiştir.

Çizelge 1.3. Bitkilerdeki Fenolik Bileşik Sınıfları [30].

Karbon (C) Atom Sayısı	Temel Yapı	Bulunduğu Sınıf
6	C ₆	Basit Fenoller Benzokinonlar
7	C ₆ -C ₁	Fenolik asitler
8	C ₆ -C ₂	Asetofenonlar Fenilasetik asitler
9	C ₆ -C ₃	Hidroksisinnamik asitler Fenil propenler Kumarinler Izokumarinler
10	C ₆ -C ₄	Naftakinonlar
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantonlar
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenler Antrakininler
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavanoidler İzoflavanoidler

Çizelge 1.3. (devam) Bitkilerdeki Fenolik Bileşik Sınıfları [30].

Karbon (C) Atom Sayısı	Temel Yapı	Bulunduğu Sınıf
18	$(C_6-C_3)_2$	Lignanlar Neolignanlar
30	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoidler

Propolis içeriğinde bulunan fenoller, fenil propanoidler olarak bilinen pumumik asit, sinnamik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bunların türevleri açısından zengindir [58]. Kafeik asit fenil esterinin (CAPE) ve sinnamik asidin antitümör aktivitesi olduğu bilinmektedir. CAPE ayrıca antioksidan özelliğe sahiptir. [66].

1.4.4.1. Benzoik Asit ve Türevleri

Propolis içeriğinde bulunan benzoik asit ve türevleri;

- Benzoik asit ($C_7H_6O_2$)
- Gallik asit ($C_7H_6O_5$)
- Salisilik asit ($C_7H_6O_3$)
- Gentisik asit ($C_7H_6O_4$)
- Benzoik asidin fenilmetil esterini ($C_{16}H_{14}O_2$)
- Trans-koniferil benzoat ($C_{17}H_{16}O_4$)
- Protokatekuik asit ($C_7H_6O_4$) [40].

1.4.4.2. Benzaldehit Türevleri

- Vanilya ($C_8H_8O_3$)
- Kaproik aldehit ($C_6H_{12}O$)
- İzovanilin ($C_8H_8O_3$)
- Protokatekuik aldehid ($C_7H_6O_3$) [40].

1.4.4.3. Sinamil alkol ve sinamik asit türevleri

- Kafeik asit ($C_9H_8O_4$)
- p-kumarik asit ($C_9H_8O_3$)
- Sinamik asit ($C_9H_8O_2$)
- Ferulik asit ($C_{10}H_{10}O_4$)
- Dimetoksi sinnamik asit ($C_{11}H_{12}O_4$)
- İzoferulik asit ($C_{10}H_{10}O_4$)

- Sinamik asit esterleri
- Sinamik alkol (C₉H₁₀O)
- Hidrokafeik asit (C₉H₁₀O₄) [40], [67]-[70].

1.4.5. Yağ Asitleri

Yağ asitleri, propolisin mumsu ve polar olmayan kısımlarından biridir. Propolis içeriğinde serbest yağ asitleri, farklı şekillerde esterler, glikozitler veya bunların türevleri olarak bulunabilirler. Propoliste bu yağ asitlerinden farklı tiplerde bulunmaktadır. Bunlar doymuş, doymamış, omega-3 ve omega-6 yağ asitleridir. Propoliste bulunan doymuş yağ asitleri;

- Palmitik asit (C₁₆H₃₂O₂)
- Stearik asit ve türevleri (C₁₈H₃₆O₂) [71].

Doymamış yağ asitleri ise;

- Nervonik asit (C₂₄H₄₆O₂)
- Araşidonik asit (C₂₀H₃₂O₂)
- Eicosapentanoik asit (C₂₀H₃₀O₂)
- Linolenik asit (C₁₈H₃₀O₂)
- Linoleik asit (C₁₈H₃₂O₂) ve türevleri olarak bulunmaktadır [71].

1.4.6. Diğer Bileşenler

Propolis içeriğinin kalan kısmının %5'ini polen, diğer %5'lik kısmını ise organik madde ve mineraller oluşturmaktadır. Polen içerisinde serbest aminoasitler, proteinler ve vitaminler bulunmaktadır. Organik madde ve minerallerde ise; keton, eser elementler, steroidler, şekerler, kinonlar ve laktonlar bulunmaktadır.

Bitkiler, bal arılarının larva dönemi boyunca polen ve nektar sağlayan protein ve diğer temel besin kaynağıdır. Bal arıları yüksek aminoasit içeriğine sahip bitkileri tercih ederler. Propoliste bulunan aminoasitlerin reçineli maddeye sahip bitkilerden ve arı metabolizmasında salgılanan tükürükten kaynaklandığı düşünülmektedir [72].

Propolis içeriğindeki amid, amin, protein ve aminoasitler azot materyalleridir [73]. Amin türevi olan alkaloidler doğal olarak oluşan kimyasal bileşiklerdir ve çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir [74].

Propolis, aynı zamanda insan metabolizması için önemli kabul edilen vitamin ve

elementleri de içerir [75]. Vitaminler, serbest radikal üretimi sırasında ikincil savunma hattı olarak görev yapar. Serbest radikalleri etkisiz hale getirirler [76]. Eser elementler ise mineral kaynaklarıdır. Propolisin yapısında eser elementlerin yanı sıra toksik elementlerde bulunabilmektedir. Propolis içeriğindeki her bir toksik element için European Medicines Agency (EMA) tarafından yayınlanmış olan International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q3D Elemental Impurities kılavuzundan önerilen limitlere bakılması gerekmektedir [46].

Propolis içeriğinde, propolise özgü ketonlar bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi p-metoksiasetofenondur. Yakın zamanda ise bu bileşenin orto (o-) ve meta (m-) izomerleri de tanımlanmıştır. Fakat bu iki izomerin ayırt edilmesi güçtür [77]. Propolis içeriğinde yüksek konsantrasyona sahip enerji depolarını temsil eden bir grup siklik organik bileşik olan steroidler de bulunmaktadır [74]. Propolisin yapısında bulunan steroidler bölge ve ülkeye göre çeşitlilik göstermektedir.

Propolisin şeker kaynağının bal ve bitkiler olduğu düşünülmektedir. Fakat yapılan çalışmalarla hidrolize flavanoid glikozitlerinden de türetilmediği bulunmuştur [74]. Önceden yapılan araştırmalarda sayısız şeker, şeker alkolü ve asiti içeren zengin bir şeker fraksiyonu bulunduğu görülmektedir [78]. Çizelge 1.4'te diğer bileşenler gösterilmektedir.

Çizelge 1.4. Propolis içeriğindeki diğer bileşenler [22], [40], [46], [74], [79]-[81].

Aminoasitler	Alanin, Beta-alanin, Alfa-amino bütirik asit, D-amino bütirik asit, Arginin, Asparagin, Aspartik asit, Sistin, Sistein, Glutamik asit, Glisin, Histidin, Hidroksiprolin, İzolösin, Valin, Lösin, Lizin, Metiyonin, Ornitin, Fenilalanin, Prolin, Triptofan, Sarkosin, Serin, Tirozin, Treonin
Alkoloidler	Siklopropan benzol, Papaverolin, C-hemeritrin, Neronin
Vitaminler	A vitamini, B1 vitamini, B2 vitamini, B6 vitamini, C vitamini, E vitamini, Niasin, Pantotenik asit, Karoten (provitamin A)
Mineraller	Kobalt (Co), Bakır (Cu), Demir (Fe), Çinko (Zn), Krom (Cr), Baryum (Ba), Kalsiyum (Ca), Potasyum (K), Magnezyum (Mg), Sodyum (Na), Alüminyum (Al), Fosfor (P), Nikel (Ni), Kükürt (S), Bor (B), Stronsiyum (Sr), Mangan (Mn), Vanadyum (V)

Çizelge 1.4. (devam) Propolis içeriğindeki diğer bileşenler [22], [40], [46], [74], [79]-
[81].

Mineraller	<i>Toksik elementler;</i> Kadmiyum (Cd), Arsenik (As), Kurşun (Pb), Cıva (Hg)
Ketonlar	Asetofenon, p-asetofenolasetofenon, Metilasetofenon, Hept-5-en- 2-one, 6-metilketon
Steroidler	Stigmasterol, Beta-dihidro fucosterol, Kolesterol
Şeker ve Şeker Alkolleri	D-glukoz, D-fruktoz, Melibiyoz, Ksilitol, Glukuronik asit, Galaktoz, Ksiloz, Laktoz, Maltoz, Eritritol, İnositol, Mannoz
Alifatik Hidrokarbonlar	Heneikosan, İkozın, İkozan, 1-oktadesen, Trikosan, Pentakosan

1.5. PROPOLİSİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİ

Propolis içeriğindeki bileşenlerden birçok alanda etkindir. Propolisin farmakolojik etkinliği 4 kategori altında gösterilebilir. Bunlar; ağır metal elektronlarına bağlanarak fazla metali şelatlayarak uzaklaştırmak, vücut içinde elektron taşınımının hızlandırılması, antioksidan özelliklerinden dolayı serbest radikalleri tutarak hücre ve doku hasarını önleme, biyolojik polimerlerle birleşme eğilimi göstererek kanserli hücrelerin çoğalmasını engellemek ve bağışıklığı güçlendirmektir [82]. Propolis antifungal, antiinflamatuar, antiülser, antiviral, sitotoksik, antikaryojenik, hepatoprotektif, antibakteriyel, anestezik, antikanser, antioksidan gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu araştırmalarla ortaya konmuştur [14], [34]. Bu biyolojik fonksiyonlarından dolayı doğal popüler bir ilaç maddesi olarak hem geleneksel tıp uygulamalarında hem de kozmetik sanayinde kullanılmaktadır [14].

Türkez ve arkadaşlarının 2010'da sıçanların karaciğerinde alüminyum klorür ($AlCl_3$) ile indüklenen genotoksisite ve hepatotoksisiteyi modüle etmede propolisin etkinliğini belirlemeye çalıştıkları çalışmalarında, propolisin yararlı etkilere sahip olduğu ve $AlCl_3$ toksisitesini antagonize edebildiği sonucuna varmışlardır [21].

Grange ve Davey'in 1990'da propolisin, yaygın olarak karşılaşılan bir dizi kok, gram-

pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu, ancak gram-pozitif bakterilerde bu etkinliğin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Propolisin yüksek flavanoid içeriğine sahip olduğundan dolayı antimikrobiyal özellik sergilediği sonucuna varılmıştır [83].

Wang ve arkadaşları 2016'da Güney Kore'nin 20 farklı bölgesinden toplanarak hazırlanan propolis etanol ekstraktlarının insan bağırsak bakterileri, insan β -amiloid öncü bölünme enzimi (BACE-1), asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörü üzerindeki büyüme inhibitör etkileri, antioksidan, antiproliferatif ve anti-insan rinovirüs aktivitelerini değerlendirmişlerdir ve Kore etanolik propolis örneklerinde BACE-1 inhibisyonu ve AChE inhibisyonu ile toplam polifenol ve toplam flavanoid içeriği arasında doğrudan bir korelasyon bulunmadığını rapor etmişlerdir [84].

Rossi ve arkadaşlarını 2002'de CAPE olan ve olmayan bir propolis etanolik özütünün ve bazı bileşenlerinin siklooksijenaz (COX) aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Ekstraktın CAPE olan ve olmayan inhibisyon eğrilerinin analizi anlamlı ($P < 0.001$) bir fark gösterdiğini bu sonuçlar doğrultusunda hem CAPE hem de galanginin propolisin genel aktivitesine katkıda bulunduğunu, CAPE'nin daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (85).

Xuan ve arkadaşları 2014'de Çin propolisinin antitümör gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu bildirmiştir. Çalışmalarında 25, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ ' lik Çin propolis etanol ekstraktının insanlar hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesini, meme kanseri ER (+) (MCF-7) ve meme kanseri ER (-) (MDA-MB-231) hücre hattındaki sitotoksitesini test ederek araştırmışlardır. Etanolik propolis ekstraktının doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini, etanolik propolis ekstraktının her iki hücre hattında apoptozu indüklediğini, endotel hücreleri (HUVEC'ler) üzerinde çok az veya düşük sitotoksiteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda, etanolik propolis ekstraktının meme kanseri tedavisinde potansiyel bir alternatif ajan olabileceğini belirtmişlerdir [86].

Propolisin bu özelliklerinin yanı sıra toksik ve alerjik etkileri de araştırılmış ve halen de araştırılmaya devam edilmektedir. Propolis kullanan bireylerde zehirlenme vakalarına rastlanmamıştır. Ancak literatüre indirildiğinde bazı alerjik reaksiyon vaka raporları bulunmaktadır [82].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL

Bu araştırma kapsamında propolis ekstraktlarının eldesi, kimyasal aktiviteleri ve anti-tümör etkisi/etkileri Düzce Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Düzce Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜBİT) ve Düzce Üniversitesi Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜGETAM) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan propolis, hammaddeler, yardımcı maddeler ve analizlerde kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

2.1.1. Propolis

Türkiye'nin Düzce ilinin Yığılca ilçesinde arıcılık faaliyeti yapan çiftçilerden ve Efteni Bal'dan temin edilmiştir.

2.1.2. C6 Glial Tümör Hücresi

Çalışmada kullanılan C6 glial tümör hücresi Çankırı Üniversitesi'nden temin edilmiş olup, çalışmalar DÜGETAM'da yapıldı.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Bu çalışmada, kullanılan cihazlar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Deney sırasında kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihaz	Marka
Blender	Isolab 602.21.001
Buzdolabı	Uğur (Dikey tip)
Etüv	Termal
Evaporatör	Heidolph
Hassas Terazi	Radwag AS 220 R.2
Karbondioksit (CO ₂) İnkübatörü	Nuve / EC 160
Manyetik karıştırıcı	Termal N11150M - N11151M
Mikrobiyolojik Emniyet Kabini	Nuve / MN 120

Çizelge 2.1. (devam) Deney sırasında kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihaz	Marka
Mikroskop	Leica
Otomatik pipet	Isolab
pH-metre	WTW Inolab pH 720
Plaka Okuyucu	800 TS / Biotek
Saf Su Cihazı	MDM / Dream Plus
Soğutmalı Santrifüj	Nuve / NF 1200R
Su banyosu	KMSTECH
Ultrasonik Banyo	Protech PMUY 12 L Analog
UV Spektrofometre	Shimadzu
Vorteks	FOUR E'S

Bu cihazların yanı sıra ekstraktların hazırlanmasında, alüminyum folyo, baget, balon joje, beher, damlalık, deney tüpleri, dereceli pipet, erlen, falkon sporu, falkon tüpler, huni, kağıt havlu, manyetik balık, mezür, parafilm, petri kabı, pipetör, pipet uçları, plaka, puar, serolojik pipet, sineklik teli, süzme kağıdı, steril cerrahi eldiven, sekiz kanallı mikropipet, temizlik bezi, tüp sporu kullanılmıştır.

2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Deney sırasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Marka
$AlCl_3$	Merck Millipore
Bitkisel Gliserin (%99.5)	Tito
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck Millipore
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Yüksek Glikoz	Biowest
Etanol	Merck Millipore
Fetal Sığır Serum (FBS)	Biowest
Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR)	Merck Millipore
Gallik Asit	Merck Millipore

Çizelge 2.2. (devam) Deney sırasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Marka
Kuersetin	Merck Millipore
Metanol	Isolab
Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) Çözeltisi	Biological Industries (BI)
Phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS)	Gibco™
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck Millipore
Potasyum Karbonat	Merck Millipore
Potasyum Klorür (KCl)	Merck Millipore
Sitrik Asit	Tekkim
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck Millipore
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck Millipore
Teksol (%96 Etanol) Extra püre	Tekkim
Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) 1x	Biowest
Water Soluble Tetrazolium Salt-81/2-(4- iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4- disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1) kiti	Takara

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Propolis Örneklerinin Toplanması

Çalışmada kullanılan propolis, Düzce ilinin Yığılca ilçesinden arıcılık faaliyetleri gerçekleştirildiği yerden toplandı. Örnekler paketlenerek laboratuvara getirildi ve çalışmaya başlanana kadar buzdolabından saklandı.

2.2.2. Çözünürlük Çalışmaları

Propolisin kimyasal yapısını belirlemek için en çok etanol kullanılmakta ve etanolik ekstrakt elde edilmektedir. Ayrıca metanol, gliserol, su, propilen ve farklı yağlar ile de ekstrakt elde edildiği literatürde görülmektedir [88]. Bu nedenle bu çalışmanın başında referans oluşturmasına adına çözünürlük çalışması yapılmış ve bu ön denemeler sonunda

referans çözücüler seçilerek ekstraktlar eldesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızın başında propolis numunesinin farklı şekillerinde, farklı sıcaklıklar ve çözeltiler kullanılarak çözünürlük çalışması yapıldı.

Bunun için tüp sporuna 10 deney tüpü konuldu. Buzdolabına konulan propolislerden 15 gram çıkarılarak blenderdan geçirilerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen propolis 5 deney tüpüne 1'er gram olacak şekilde tartıldı. Üzerlerine sırasıyla 1:10 oranında distile su (25°C), sıcak su (70°C), bitkisel gliserin, etanol, etanol-distile su karışımı (5:5) konuldu. Sırasıyla deney tüpleri vortekslendi.

Diğer 8 deney tüpüne ise kalan toz haline getirilen propolis numunelerinden 1.1'er gram tartıldı. Üzerlerine sırasıyla Çizelge 2.3'teki oranlarda etanol-su karışımı ve etanol-sıcak su karışımı konuldu. Ardından sırasıyla deney tüpleri vortekslendi. Propolis oranı sabit tutularak ve tek değişken üzerinden ilerlendi. Sırasıyla deney tüpleri vortekslendi.

Çizelge 2.3. Su+etanol/propolis (11:1.1) ve sıcak su+etanol/propolis (11:1.1).

	Distile Su veya Distile Sıcak Su (ml)	Etanol (ml)	Propolis (g)
1.tüp	4	7	1.1
2.tüp	5	6	1.1
3.tüp	6	5	1.1
4.tüp	7	4	1.1

Tüpler buzdolabına ağızları parafilmlelenerek kaldırıldı. 3 gün arayla fiziksel değişim olup olmadığı gözlemlendi.

2.2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

0.25 N Potasyum Karbonat çözeltisi: 34,55 g potasyum karbonat tartılarak 250 ml saf suda çözüldü.

0.25 N Sitrik asit çözeltisi: 52,53 g sitrik asit tartılarak 250 ml saf suda çözüldü.

% 2 'lik AlCl₃ çözeltisi: 1 g AlCl₃ tartılarak 50 ml saf suda çözüldü.

% 10'luk Na₂CO₃ çözeltisi: 1 g Na₂CO₃ tartılarak 10 ml saf suda çözüldü.

Kuersetin stok çözeltisi: 10 mg kuersetin tartıldı ve 10 ml metanolde çözümlenerek 1000 ppm'lik kuersetin stok çözeltisi hazırlandı.

Kuersetin standart çözeltileri: Kuersetin stok çözeltisinden hesaplanan miktarlar alınarak metanol ile son hacim 4 ml olacak şekilde belirlenen hacme seyreltildi.

Gallik asit stok çözeltisi: 10 mg gallik asit tartıldı ve 10 ml metanolde çözülerek 1000 ppm'lik gallik asit stok çözeltisi hazırlandı.

Gallik asit standart çözeltileri: Gallik asit stok çözeltisinden hesaplanan miktarlar alınarak metanol ile son hacim 4 ml olacak şekilde belirlenen hacme seyreltildi.

2.2.4. Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

2.2.4.1. Etanolik Propolis Ekstraksiyonu

Etanolik ekstraksiyon işlemi öncesinde buzdolabından çıkarılan propolis numuneleri blenderdan geçirilerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen propolis numunelerinden 100 g hassas terazi de tartılarak beher içine alındı. Propolisin üzerine 1000 ml % 96'lık etanol konuldu. Propolis:etanol 1:10 oranında çalışılmıştır. Ağzı kapatılarak 48 saat boyunca, oda sıcaklığında 300 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 48 saat sonunda karıştırıcıdan alınarak önceden kurulan düzenekten süzüldü. Propolis-etanol karışımı filtrasyon işlemi sonrasında daha önce darası alınan şilifli balon jojeye alınarak evaporasyon işlemi için hazır hale getirildi [89].

Evaporasyon düzeneği hazırlanarak, kazan sıcaklığı sabitlendikten sonra, şilifli balon takıldı. Basınç ayarlaması yapılarak etanol karışımdan uzaklaştırıldı. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra evaporasyona tabi tutulan ekstraktın tartımı alınarak Denklem 2.1'e göre verim hesabı yapıldı. Analizler öncesinde ekstraktlar buzdolabında muhafaza edildi [89].

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Dolu erlen (g)} - \text{Boş erlen (g)}}{\text{Propolis miktarı (g)}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.2.4.2. Etanol/Su Karışımı ile Propolis Ekstraksiyonu

Etanol/su karışımı ile ekstraksiyon işlemi öncesinde buzdolabından çıkarılan propolis numuneleri blenderdan geçirilerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen propolis numunelerinden 20 g hassas terazi de tartılarak beher içine alındı. Propolisin üzerine 100 ml % 96'lık etanol ve 100 ml distile su konuldu. Propolis:etanol:distile su 1:5:5 oranında çalışıldı. Ağzı kapatılarak 48 saat boyunca, oda sıcaklığında 300 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 48 saat sonunda karıştırıcıdan alınarak önceden kurulan

düzenekten süzöldü. Propolis:etanol:distile su karışımı filtrasyon işlemleri sonrasında daha önce darası alınan şilifli balon jöjeye alınarak evaporasyon işlemleri için hazır hale getirildi. Evaporasyon düzeneği hazırlanarak, kazan sıcaklığı sabitlendikten sonra, şilifli balon takıldı. Basınç ayarlaması (150 mbar) yapılarak etanolün uzaklaşması için beklendi. Daha sonra basınç düşürölerek (60 mbar) su uzaklaştırıldı. Etanol ve su uzaklaştırıldıktan sonra evaporasyona tabi tutulan ekstraktın tartımı alınarak Denklem 2.1'e göre verim hesabı yapıldı. Analizler öncesinde ekstraktlar buzdolabında muhafaza edildi.

2.2.4.3. Su ile Propolis Ekstraksiyonu

Su ile ekstraksiyon işlemleri öncesinde buzdolabından çıkarılan propolis numuneleri blenderdan geçirilerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen propolis numunelerinden 20 g hassas terazi de tartılarak beher içine alındı. Propolisin üzerine 200 ml distile su konuldu. Propolis:distile su 1:10 oranında çalışılmıştır. Ağız kapatılarak 48 saat boyunca, oda sıcaklığında 300 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 48 saat sonunda karıştırıcıdan alınarak önceden kurulan düzenekten süzölmesi sağlandı. Propolis-su karışımı filtrasyon işlemleri sonrasında daha önce darası alınan şilifli balon jöjeye alınarak evaporasyon işlemleri için hazır hale getirildi.

Evaporasyon düzeneği hazırlanarak, kazan sıcaklığı sabitlendikten sonra, şilifli balon takıldı. Basınç ayarlaması yapılarak distile suyun uzaklaşması için beklendi. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra evaporasyona tabi tutulan ekstraktın tartımı alınarak Denklem 2.1'e göre verim hesabı yapıldı. Analizler öncesinde ekstraktlar buzdolabında muhafaza edildi.

2.2.4.4. Bitkisel Gliserin ile Propolis Ekstraksiyonu

Gliserin ile ekstraksiyon işlemleri öncesinde buzdolabından çıkarılan propolis numuneleri blenderdan geçirilerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen propolis numunelerinden 10 g hassas terazi de tartılarak erlen içine alındı. Propolisin üzerine 100 ml bitkisel gliserin konuldu. Propolis:bitkisel gliserin 1:10 oranında çalışılmıştır. Hacim değişikliği yapıldığında ön denemelerden farklı bir karışım elde edilmedi. Bu sebeple evaporasyona tabi tutulamayacağı için için buzdolabına kaldırıldı ve 4 hafta buzdolabında bekletildi. 4 haftalık süreçte karışımında değişiklik olup olmadığı takip edildi.

2.2.4.5. Su ile Propolis Ekstraksiyonu (File Denemesi)

Sulu ekstraksiyon işlemleri öncesinde buzdolabından çıkarılan propolis numuneleri

blenderdan geçirilerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen propolis numunelerinden 125 g hassas terazi de tartıldı. Toz haline getirilen propolis numuneleri 40°C suda ıslatılarak yumuşak bir hale getirildi. Elek çapı 2 mm olan sineklik teli üzerine serildi. Fileye tutunmasını sağlamak amacıyla hazırlanan propolis numuneleri etüvde 50°C'de 10 dakika bekletildi.

Propolis numuneleri istenilen kıvama geldikten sonra file kendi eksenine etrafında döndürülerek rulo haline getirildi. File behere alınarak üzerine 1250 ml distile su konuldu. Propolis:distile su 1:10 oranında çalışıldı. Sıcaklığı sabit tutmak amacıyla evaporasyon kazanı 56°C'ye getirildi. Beher ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarıldı ve 56°C'deki su içerisinde 8-10 saat süreyle bekletildi. Bekleme işlemi süresince propolis mumunun ve waxların propolisten ayrılarak yüzeyde toplanması sağlandı. Ayırma işleminden sonra karışım soğutularak yüzeyde toplanan mumlar uzaklaştırıldı.

Propolis/distile su karışımı 56°C'ye önceden hazırlanan manyetik karıştırıcıda 18 saat karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra propolis/distile su karışımının pH'sı pH-metre kullanılarak ölçüldü. Karışımın pH'sı önceden hazırlanmış potasyum karbonat çözeltisi kullanılarak bazik bölgeye getirildi. pH istenilen değere ayarlandıktan sonra manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırma işlemine 1 saat daha devam edildi. Karıştırma işlemi bittikten sonra karışımın pH'sı başlangıç pH değerine getirildi. Propolis/distile su karışımına filtrasyon işlemi gerçekleştirildi. Süzülen propolis:distile su karışımı önceden darası alınan şilifli balon jöjeye alındı. Evaporasyon işlemine tabi tutuldu. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra evaporasyona tabi tutulan ekstraktın tartımı alınarak Denklem 2.1'e göre verim hesabı yapıldı. Analizler öncesinde ekstraktlar buzdolabında muhafaza edildi.

2.2.5. Toplam Fenolik Tayini

Elde edilen propolis ekstraktlarının toplam fenolik tayini UV spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

Deneyde kullanılmak üzere 1000 ppm konsantrasyonuna sahip gallik asit stok çözeltisi hazırlandı ve seri seyreltme ile 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.625 ppm konsantrasyonlarına sahip Şekil 2.1'deki standart çözeltileri hazırlandı. Tüm standart çözeltilerine saf su, FCR ve renk belirteci olarak % 10'luk Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildi. Ölçüm öncesinde standart çözeltileri 0,45 µm'lik filtreden süzüldü. Hazırlanan standart çözeltileri vortekslendikten sonra 60 dakika karanlıkta bekletildi. Standart çözeltileri UV

spektrofotometresinde 760 nm’de okutularak fenolik standart eğrisi çizildi.



Şekil 2.1. Farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltiler.

Standart ve numune çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan çözücüden kaynaklanabilecek girişimin etkisini ortadan kaldırmak için saf su, FCR ve % 10’luk Na_2CO_3 çözeltisi kullanılarak hazırlanan kör çözelti UV spektrofotometresinde 760 nm’de okutuldu.

Numune çözeltilerini hazırlamak için farklı ekstraksiyon metotları ile hazırlanan her propolis ekstraktından 2 g tartıldı ve tartılan numuneler 10 ml metanolde çözüldü. Numune çözeltilerine saf su, FCR ve renk belirteci olarak % 10’luk Na_2CO_3 çözeltisi ilave edildi. Çizelge 2.4’te ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Ölçüm öncesinde numune çözeltileri 0,45 μm ’lik filtreden süzüldü. Hazırlanan numune çözeltileri vortekslendikten sonra 60 dakika karanlıkta bekletildi. Test çözeltileri UV spektrofotometresinde 760 nm’de okutuldu.

Çizelge 2.4. Toplam fenolik tayini analizinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri.

	Saf su	% 10’luk Na_2CO_3	0.5 N FCR	Stok çözelti	Ekstrakt çözeltisi
Kör Çözelti	1400 μl	800 μl	800 μl	-	-
Standart Çözeltisi	1360 μl	800 μl	800 μl	40 μl	-
Numune Çözeltisi	1360 μl	800 μl	800 μl	-	40 μl

Sonuçlar gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak mg/L olarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler üç kez tekrarlandı ve üç tekrarın ortalaması alınarak sonuçlar hesaplandı.

2.2.6. Toplam Flavanoid Tayini

Elde edilen propolis ekstraktlarının toplam flavanoid tayini UV spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

Deneyde kullanılmak üzere 1000 ppm konsantrasyonuna sahip stok kuersetin çözeltisi hazırlandı ve seri seyreltme ile 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.625 ppm konsantrasyonlarına sahip standart çözeltileri hazırlandı. Tüm standart çözeltilerine saf su ve renk belirteci olarak % 2'lik $AlCl_3$ çözeltisi ilave edildi. Ölçüm öncesinde standart çözeltileri 0,45 μm 'lik filtreden süzüldü. Hazırlanan standart çözeltileri vortekslendikten sonra 60 dakika karanlıkta bekletildi. Standart çözeltileri UV spektrofotometresinde 415 nm'de okutularak flavanoid standart eğrisi çizildi.

Standart ve numune çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan çözücüden kaynaklanabilecek girişimin etkisini ortadan kaldırmak için saf su ve % 2'lik $AlCl_3$ çözeltisi kullanılarak hazırlanan kör çözelti UV spektrofotometresinde 415 nm'de okutuldu.

Numune çözeltilerini hazırlamak için farklı ekstraksiyon metotları ile hazırlanan her propolis ekstraktından 2 g tartıldı ve tartılan numuneler 10 ml metanolde çözüldü. Numune çözeltilerine saf su ve renk belirteci olarak % 2'lik $AlCl_3$ çözeltisi ilave edildi. Çizelge 2.5'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Ölçüm öncesinde numune çözeltileri 0,45 μm 'lik filtreden süzüldü. Hazırlanan numune çözeltileri vortekslendikten sonra 60 dakika karanlık ortamda bekletildi. Numune çözeltileri UV spektrofotometresinde 415 nm'de okutuldu.

Çizelge 2.5. Toplam flavanoid tayini analizinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri.

	Saf su	% 2 $AlCl_3$	Stok çözelti	Ekstrakt çözeltisi
Kör Çözelti	3500 μl	500 μl	-	-
Standart Çözeltisi	3000 μl	500 μl	500 μl	-
Numune Çözeltisi	3000 μl	500 μl	-	500 μl

Sonuçlar kuersetin standart grafiğinden yararlanılarak mg/L olarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n = 3).

2.2.7. Hücre Hattı ile % Canlılık Testi

2.2.7.1. Hücre Kültürü

Tüm hücre kültürü ile ilgili çalışmalar Şekil 2.2’de gösterilen air flow (hücre kültürü) kabininde, steril bir ortamda yapıldı. Çalışmaya başlamadan %70’lik etanol ile hücre kültürü kabini temizlendi. 15 dk boyunca kabin ve kullanılacak deney materyalleri UV ışığa maruz bırakıldı.



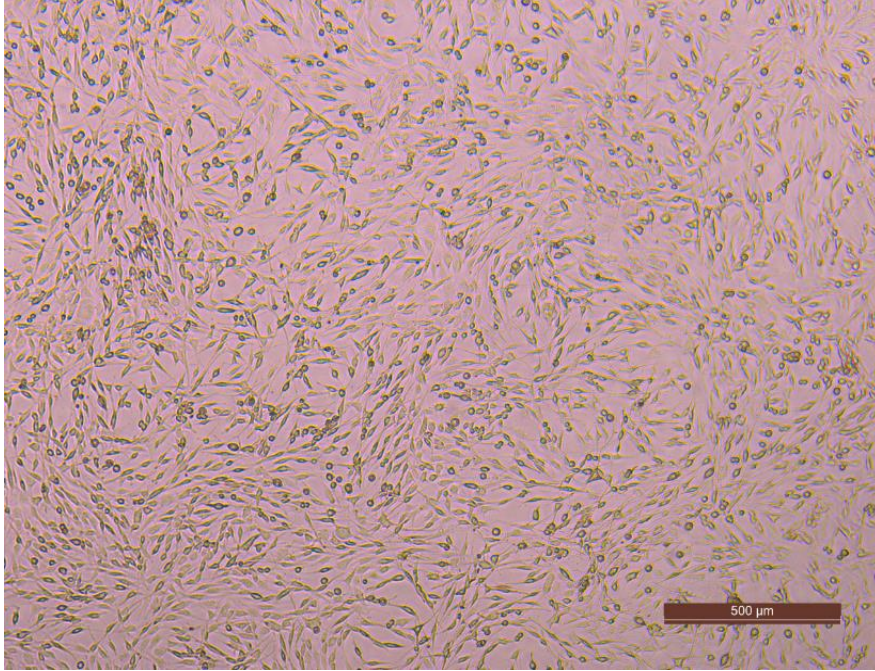
Şekil 2.2. Hücre kültürü kabini.

2.2.7.2. C6 Glial Hücresinin Çoğaltılması ve Sayılması

Bu çalışma için kullanılan C6 Glial hücreleri Çankırı Üniversitesi’nden getirildi ve bu çalışmaya kadar dondurularak saklandı. Azot tankından çıkarılan ve kriyovial içerisinde donmuş halde bulunan C6 glial tümör hücreleri 37°C’ de su banyosunda çözündürülerek 15 ml’lik falkon tüpe aktarıldı ve hacmi DMEM, %10 FBS, %1 Pen-Strep ve yüksek miktarda glukoz içeren DMEM ile 10 ml’ ye tamamlandı. Falkon tüp içerisinde hazırlanan süspansiyon 5 dk boyunca 1500 rpm de santrifüj edildi. Çöken kısmın üstünde kalan sıvı kısmın büyük çoğunluğu uzaklaştırıldı. Kalan kısımda hücreler çözüldükten sonra bu hücrelerin üzerine DMEM (yüksek miktarda glukoz içeren) besiyeri ilave edildi ve T-25 lik flasklarda, 37°C’ de, %5 CO₂ ortamında, inkübatörde çoğaltıldı Hücrelerin çoğalması mikroskop ile incelendi. [90].

T-25 lik flask yüzeyi çoğaltılan hücrelerle kaplandığında hem hücrelerin üzerindeki besiyeri yetersiz hale geldiğinden hem de çoğaldıkları sırada kültür kabına sığamadıklarından dolayı çoğalmaları durur, bu yüzden pasajlama işlemine tabi tutulmaları gerekir. Bu nedenle flask yüzeyi hücreler ile kaplandıktan sonra hücrelerin üzerindeki, besiyeri uzaklaştırıldı ve 5 ml PBS ile hücreler yıkandı. Hücre hatlarına zarar vermeden aktarımını

sağlayabilmek için 3 ml tripsin-EDTA çözeltisi T-25 lik flasklara eklenerek 5-10 dakika inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücreler 9 ml %10 FBS içeren DMEM ile 15ml'lik falkon tüpte toplandı. Falkon tüpten alınan hücrelerin 60 µL si 40 µL tripan blue boyası ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Homojenliğini sağlamak amacıyla tekrar karıştırılarak 10 µL alınarak ışık mikroskobu aracılığıyla Neubauer hemositometre lamına konulan hücrelerin canlı/ölü hücre sayımı yapıldı. Tripan mavisi ile boyanmış hücreler Şekil 2.3'de görüldüğü üzere ölü olanlar mavi, canlı olanlar sarı-yeşil renktedir.



Şekil 2.3. C6 gliyal tümör hücresi mikroskop görüntüsü.

Diğer taraftan falkon tüpte kalan süspansiyon 5 dakika boyunca 1600 rpm de santrifüj edildi. Mililitreki ölü ve canlı hücre sayısı aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre sayısı} \times \text{seyreltme oranı} \times 10^4 \quad (2.2)$$

2.2.7.3. Hücrelerin Canlılık Testi, WST-1 Analizi

Hücrelerin pasajlanması ve sayılmasından sonra 96 kuyucuklu 2 adet plakaya besiyeri içinde 5×10^4 tane hücre ekildi. Ayrıca blank olarak çözücü konuldu. Negatif kontroller için ekilen hücrelere değişen konsantrasyonlarda çözücü ilave edildi. Farklı çözücülerle hazırlanmış propolis örnekleri suda çözülerek değişen konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 200 µg/ml) olacak şekilde ilave edildi. Son hacimleri 100 µl olmuştur [91]. 37°C' de 24 saat inkübe edildi. Her kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu ilave edilerek 4 saat bekletilmiş

ve Elisa reader ile 450 nm absorbans 630 nm referans aralığında ölçüm yapılmıştır. % canlılık değerleri Denklem 2.3'te verildiği şekilde numune absorbansı ve negatif kontrolden blank çıkarılarak hesaplanmıştır ve grafikler Excel programıyla çizilmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Ürün absorbansı} - \text{blank} \times 100}{\text{Negatif kontrol} - \text{blank}} \quad (2.3)$$

Her konsantrasyon için deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çalışma bittiğinde kabin % 70 lik etanol ile silinerek tekrar temizlendi. Kabin kapağı katılarak, kabin ve deney odası 1 saat boyunca UV ışığa maruz bırakıldı.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. ÇÖZÜNÜRLÜK ÇALIŞMASI SONUÇLARI

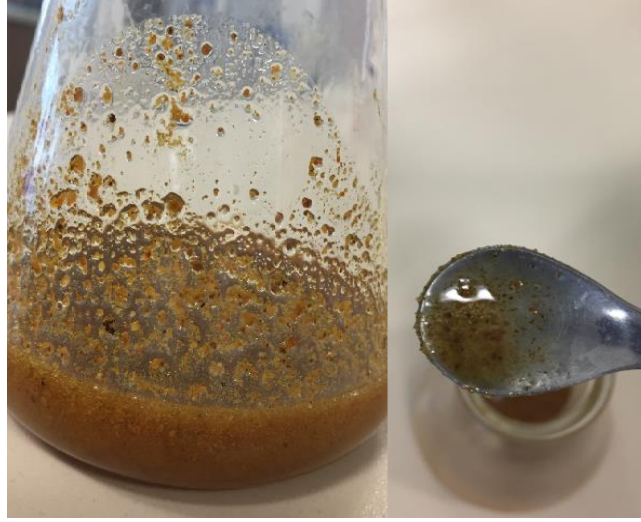
Propolisin çözünürlük çalışması literatürde verilen çözücülerden bazıları ile Yöntem 2.2.2’de belirtildiği şekilde yapıldı.

Şekil 3.1’de görüldüğü üzere yapılan ön çalışmalarda propolis etanol ile çözüldüğünde berrak, turuncu-kahve renkli homojen bir karışım elde edildi.



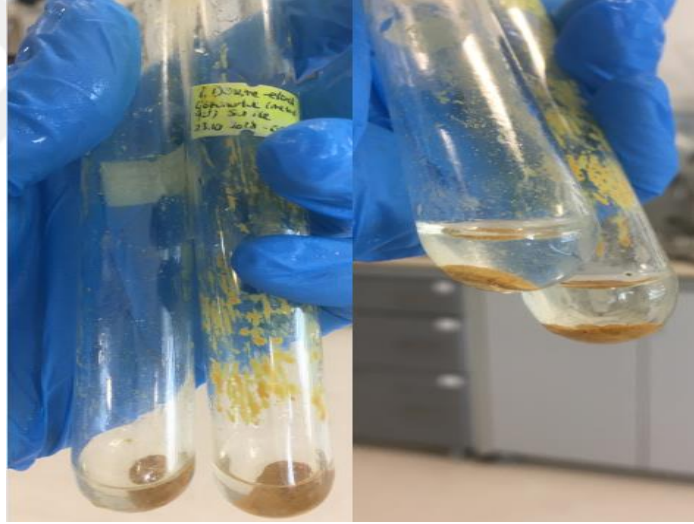
Şekil 3.1. Propolis-etanol karışımı.

Propolis bitkisel gliserin ile çözülmeye çalışıldığında Şekil 3.2’deki heterojen görüntü elde edilmiş olup yoğun bir faz oluştuğu görüldü.



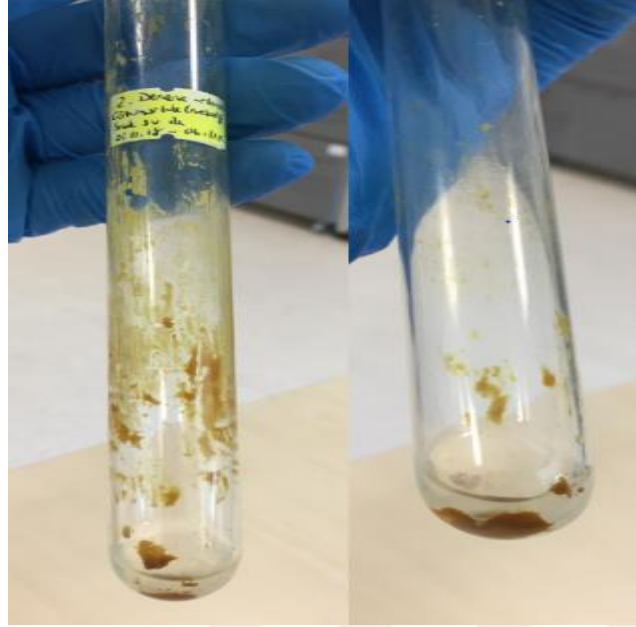
Şekil 3.2. Propolis-gliserin karışımı.

Soğuk distile su (25°C) kullanılarak yapılan çalışmada Şekil 3.3'te gösterildiği üzere propolis numunelerinin birbirine yapışarak tüpün dibine çöktüğü görüldü.



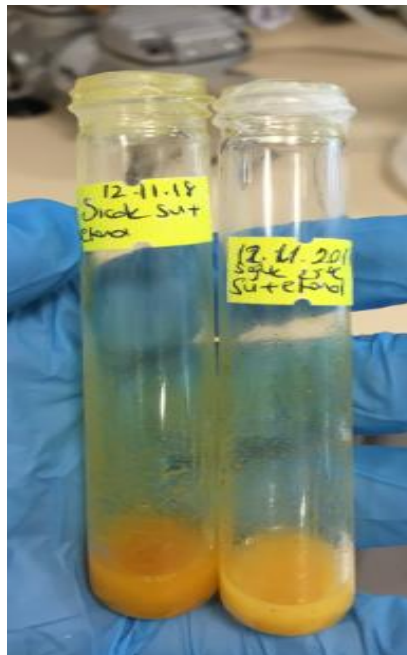
Şekil 3.3. Propolis-distile su karışımı.

Sıcak su ile yapılan çalışmada ise soğuk distile sudan farklı olarak propolisin sıcak distile suyla teması sonucunda numunelerin Şekil 3.4'te gösterildiği üzere sakıza benzer bir yapıya dönüşerek tüpün çeperlerine yapıştığı görüldü.



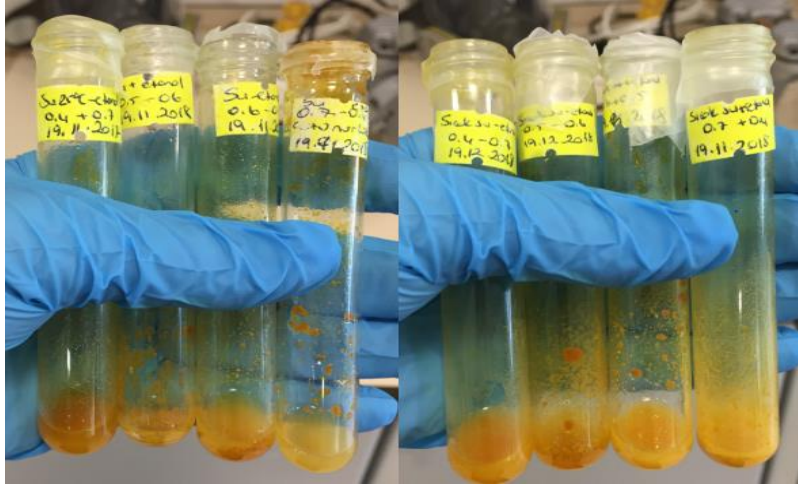
Şekil 3.4. Propolis-sıcak su karışımı.

Propolis:etanol:sıcak distile su karışımı (1:5:5) ile çözüldüğünde turuncu-kahve renkli bir dispersiyon elde edildi. Propolisin etanol:soğuk distile su karışımı (1:5:5) ile çözüldüğünde etanol:sıcak distile su karışımı ile elde edilene benzer şekilde turuncu-kahve renkli bir dispersiyon oluştuğu fakat Şekil 3.5'te gösterildiği üzere etanol:soğuk su karışımı ile kıyaslandığında etanol:sıcak su karışımı ile elde edilen karışımın daha koyu renkte olduğu görüldü.



Şekil 3.5. Propolis/etanol+sıcak su ve propolis/etanol+distile su karışımı.

Etanol oranı ile propolisin çözünürlüğünün değişimini incelemek amacıyla farklı etanol:distile su oranlarıyla çalışmalar yapıldı. Şekil 3.6'da görüldüğü üzere etanol:soğuk distile su ve etanol:sıcak distile su kullanılarak yapılan çalışmalarda etanol oranı arttığında her iki çözücü formunda da propolisin benzer şekilde disperse olduğu görüldü. Fakat etanol:sıcak distile su ile yapılan çalışmalarda etanol oranındaki değişimin propolisin sakız gibi yapışkan bir hal almasını engellemediği görüldü.



Şekil 3.6. Farklı etanol:distile su karışımlarıyla hazırlanan propolis dispersiyonları.

Farklı çözücüler ile yapılan çalışmalar sonucunda, propolisin en iyi etanolde çözündüğü belirlendi. Gliserin ve distile su ile yapılan çalışmalarda propolisin pratik olarak çözünmediği söylenebilir. Etanol-distile su karışımları kullanıldığında ise karışımdaki etanol varlığından dolayı bir miktar propolisin çözündüğü görülürken geriye kalan propolisin ise distile sudaki davranışını sergileyerek dibe çöktüğü veya sakızımsı bir hal aldığı belirlendi.

3.2. PROPOLİS EKSTRAKTLARININ % VERİM SONUÇLARI

Şekil 3.7'de farklı çözücüler kullanılarak elde edilen evaporasyon işlemine tabi tutulmuş ve bu işleme tabi tutulacak propolis ekstraktları görülmektedir.



Şekil 3.7. Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen evaporasyon işlemine tabi tutulmuş ve bu işleme tabi tutulacak propolis ekstraktları.

Farklı çözücüler kullanılarak yapılan propolis ekstraksiyonlarının %verimleri yöntem 2.2.4.1’de verildiği şekilde tüm ekstraktlar için hesaplandı. Elde edilen ekstraksiyon verimlerinin sonuçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Farklı çözücüler ile elde edilen propolis ekstraksiyon verimleri.

Çözücü (Ekstraksiyon Ortamı)	% Verim
Etanol	%50-75
Etanol:distile su	%40-45
Distile su	%5-8
Distile su (File denemesi)	%7-14
Gliserin	Verim hesaplanamadı.

Çizelge 3.1’e göre çözücü olarak etanol kullanıldığında en yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Distile su ile yapılan ekstraksiyonlarda verimin çok düşük olduğu görülmüştür. Gliserinin kullanıldığı çalışmada ise gliserin ve propolis yoğun bir faz oluşturduğundan dolayı karışımdan gliserin uzaklaştırılmadığından dolayı verim hesaplanamamıştır.

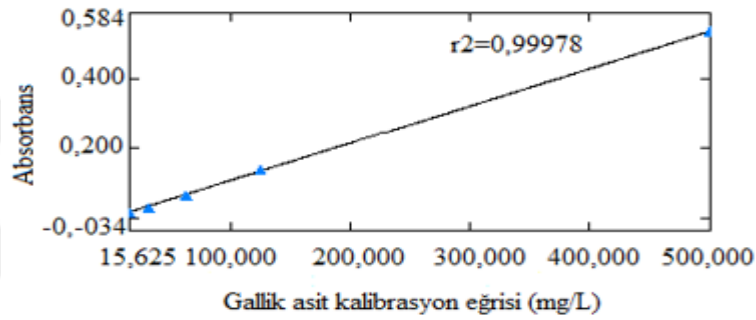
3.3. EKSTRAKTLARDA TOPLAM FENOLİK MADDE TAYİNİ

Propolis ekstraktları fenolik madde miktarı açısından zengindir. Fenolik maddeler antioksidan özelliğe sahip olduklarından dolayı propolis ekstraktlarının içerdiği fenolik madde miktarı önem arz etmektedir.

Fenolik madde tayinleri DÜBİT’te 2019 yılında gerçekleştirildi. Çalışmada Düzce yöresine ait propolislerden propolis etanol ekstraktları, sulu propolis ekstraktları ve etanol/su karışımı ile propolis ekstraktı hazırlanmıştır.

Farklı çözücüler ile hazırlanan propolis ekstraktlarının fenolik madde miktarları Yöntem 2.2.5’de belirtildiği şekilde belirlenmiştir.

Fenolik madde miktarı çalışmalarında ilk olarak 15,625 ila 500 ppm aralığındaki gallik asit konsantrasyonları kullanılarak UV spektrofotometresinde kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Şekil 3.8’de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Gallik asit kalibrasyon eğrisi.

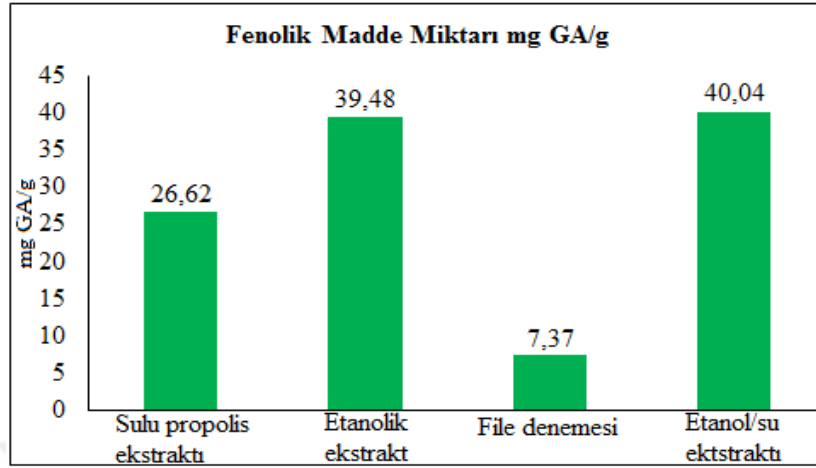
Elde edilen grafiğin anlamlılığı ve doğruluğu R^2 değerine göre test edilmiştir. R^2 değeri: 0.99978 olarak bulunduğu için kalibrasyon eğrisinin lineer olduğuna ve çalışmada kullanılabilmesine karar verilmiştir.

Çizilen kalibrasyon eğrisi baz alınarak propolis örnek konsantrasyonlarının absorbans değerleri bu kalibrasyon eğrisinin ölçüm aralığında olacak şekilde belirlenmiştir ve farklı çözücülerle hazırlanan propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı sonuçları seyreltme faktörleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır. Fenolik madde miktarları Çizelge 3.2’de gallik asit eşdeğeri olarak verilmiştir.

Çizelge 3.2. Propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı.

Propolis Ekstraktı	Miktar (mg GA/g)	Miktar (mg GA/L)
Sulu propolis ekstraktı	26,62	26623,1
Etanolik propolis ekstraktı	39,48	39480,6
File denemesi (sulu propolis)	7,37	7369,5
Etanol/Su Karışımı propolis ekstraktı	40,04	40043,9

Ayrıca propolis örneklerinin toplam fenolik madde miktarları karşılaştırmalı olarak Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 26,62, 39,48, 7,37 ve 40,04 mg GA/g'dır.



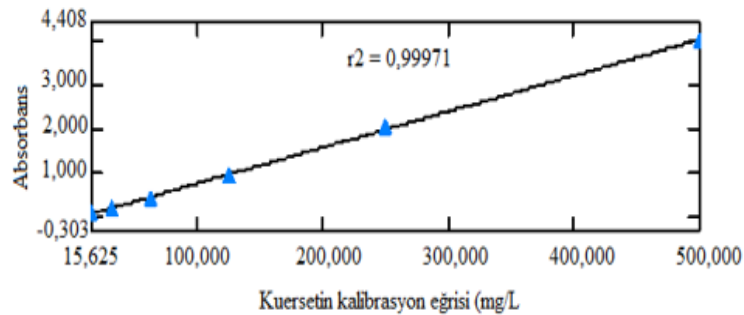
Şekil 3.9. Toplam fenolik madde miktar grafiği.

Elde edilen sonuçlar ışığında en yüksek toplam fenolik madde miktarı etanol/su karışımıyla hazırlanan propolis ekstraktlarında elde edilmiştir (40,04 mg GA/g). Çözücü olarak suyun kullanıldığı file ile yapılan çalışmada ise toplam fenolik madde miktarı en düşük çıkmıştır (7,37 mg GA/g).

3.4. PROPOLİS EKSTRAKTLARINDA TOPLAM FLAVANOİD MADDE ANALİZİ

Farklı çözücüler ile hazırlanan propolis ekstraktlarının flavanoid madde miktarları Yöntem 3.4'te belirtildiği şekilde belirlenmiştir.

Flavanoid madde miktarı çalışmalarında ilk olarak 15,625 ila 500 ppm aralığındaki kuersetin konsantrasyonları kullanılarak UV spektrofotometresinde kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Kuersetin kalibrasyon eğrisi.

Elde edilen grafiğin anlamlılığı ve doğruluğu R^2 değerine göre test edilmiştir. R^2 değeri: 0.99971 olarak bulunduğu için kalibrasyon eğrisinin lineer olduğuna ve çalışmada kullanılabilceğine karar verilmiştir.

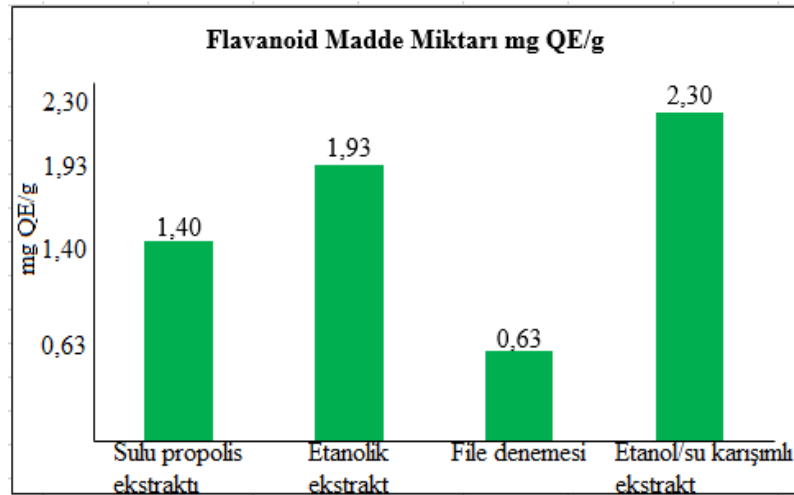
Çizilen kalibrasyon eğrisi baz alınarak propolis örnek konsantrasyonlarının absorbans değerleri bu kalibrasyon eğrisinin ölçüm aralığında olacak şekilde belirlenmiştir ve farklı çözücülerle hazırlanan propolis ekstraktlarının toplam flavanoid madde miktarı sonuçları seyreltme faktörleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır.

Flavanoid madde miktarları Çizelge 3.3'te kuersetin eşdeğeri olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3. Propolis ekstraktlarının toplam flavanoid madde miktarı.

Propolis Ekstraktı	Miktar (mg QE/g)	Miktar (mg QE/L)
Sulu propolis ekstraktı	1,40	1395,9
Etanolik propolis ekstraktı	1,93	1932,8
File denemesi (sulu propolis)	0,63	626,4
Etanol/Su Karışımı propolis ekstraktı	2,30	2302,5

Ayrıca propolis örneklerinin toplam flavanoid madde miktarları karşılaştırmalı olarak Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Propolis ekstraktlarının toplam flavanoid madde miktarları sırasıyla 1,40, 1,93, 0,63 ve 2,30 mg QE/g'dır.



Şekil 3.11. Toplam flavanoid madde miktar grafiği.

Elde edilen sonuçlar ışığında en yüksek toplam flavanoid madde miktarı etanol/su karışımıyla hazırlanan propolis ekstraktlarından elde edilmiştir (2,30 mg QE/g). Çözücü olarak suyun kullanıldığı file ile yapılan çalışmada ise toplam flavanoid madde miktarı

en düşük çıkmıştır (0,63 mg QE/g).

3.5. PROPOLİS EKSTRAKTLARI İLE YAPILAN HÜCRE CANLILIK ÇALIŞMASI (WST-1 ANALİZİ)

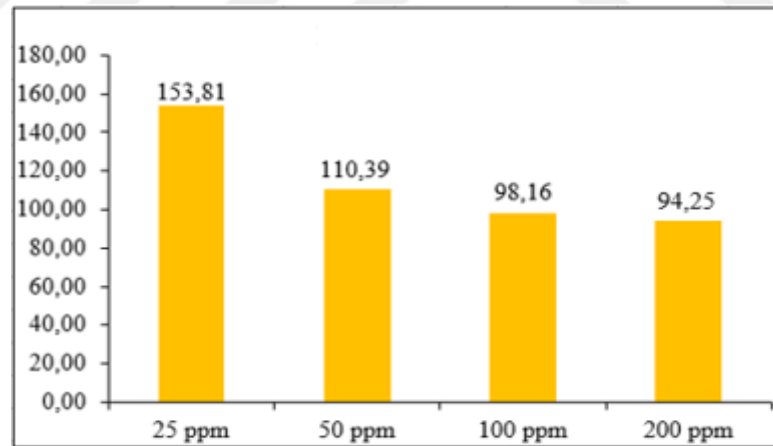
Farklı çözücüler ile hazırlanan propolis ekstraktları ile hücre canlılık çalışması Yöntem 2.2.7’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi için yapılan WST-1 testinin sonuçları aşağıda sırasıyla verilmiştir.

3.5.1. Propolisin Etanol/Su karışımı Ekstraktlarının % Canlılık Sonuçları

Propolisin etanol/su karışımı ekstraktlarının % canlılık sonuçları, Çizelge 3.4’te verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.12’de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Propolisin etanol/su karışımı ekstraktlarının % canlılık sonuçları.

Etanol/su karışımı Ekstrakt (ppm)	25ppm	50ppm	100ppm	200ppm
% Canlılık	153,81	110,93	98,16	94,25



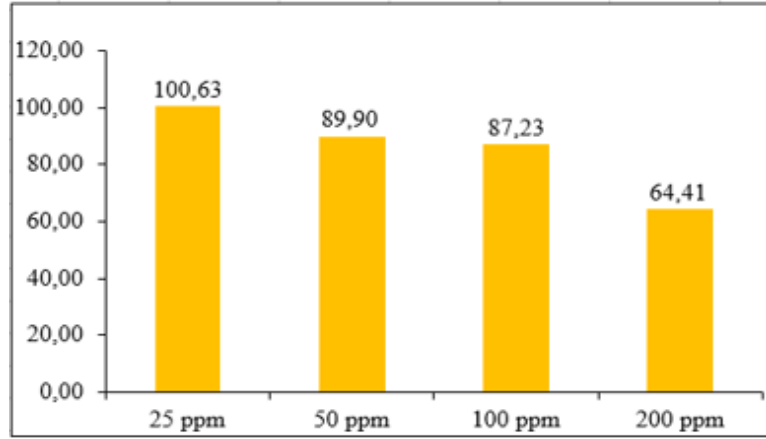
Şekil 3.12. Propolisin etanol/su karışımı ekstraktlarının karşılaştırmalı % canlılık sonuçları.

3.5.2. Propolis Etanolik Ekstraktlarının % Canlılık Sonuçları

Propolisin etanolik ekstraktlarının % canlılık sonuçları, Çizelge 3.4’te verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.13’de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Propolisin etanolik ekstraktlarının % canlılık sonuçları.

Etanolik Ekstrakt (ppm)	25 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm
% Canlılık	100,63	89,90	87,23	64,41



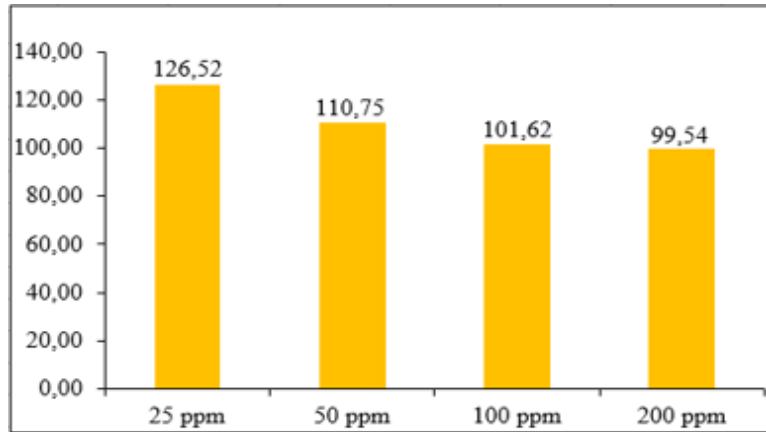
Şekil 3.13. Propolisin etanolik ekstraktlarının karşılaştırmalı % canlılık sonuçları.

3.5.3. Propolisin Sulu Ekstraktlarının % Canlılık Sonuçları

Propolisin sulu ekstraktlarının % canlılık sonuçları, Çizelge 3.6'da verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.14'te karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Propolisin sulu ekstraktlarının % canlılık sonuçları.

Sulu propolis Ekstraktı (ppm)	25ppm	50ppm	100ppm	200ppm
% Canlılık	126,52	110,75	101,62	94,54



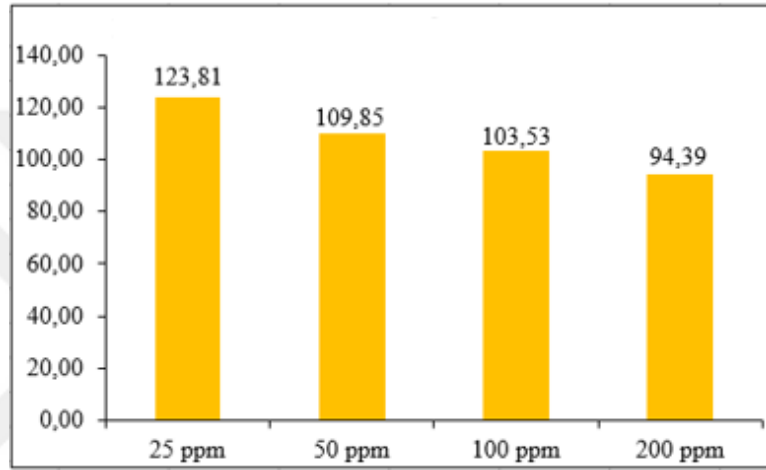
Şekil 3.14. Propolisin sulu ekstraktlarının karşılaştırmalı % canlılık sonuçları.

3.5.4. Propolisin Sulu Ekstraktlarının (File Denemesi) % Canlılık Sonuçları

Propolisin sulu ekstraktlarının (file denemesi) % canlılık sonuçları, Çizelge 3.7’de verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.15’te karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Propolisin sulu ekstraktlarının (file denemesi) % canlılık sonuçları.

Sulu propolis Ekstraktı (ppm)	25ppm	50ppm	100ppm	200ppm
% Canlılık	123,81	109,85	103,53	94,39



Şekil 3.15. Propolisin sulu ekstraktlarının (file denemesi) karşılaştırmalı % canlılık sonuçları.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Propolis geçmişten günümüze süre gelen, doğal yollarla elde edilen bir arı ürünüdür [1]. Propolisin fenolik asitler ve esterleri, polifenoller, yağ asitleri, terpenler, seskiterpeler, kumarinler, steroidler, stilbenler, flavanoidler, alkoller, aminoasitler ve inorganik bileşikler dahil olmak üzere 300'den fazla bileşen içermesi antioksidan ve anestezi özelliklerinin yanı sıra antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuar, antiülseratif, lokal anestezi, hepatoprotektif, antitümöral ve immunostimülatör kanamayı durdurucu, spazmolitik gibi farklı biyolojik özellikler sergilemesine sebep olur [9]-[12], [22]-[24].

Propolis içeriğinde yer alan ve farklı aktivitelerden sorumlu olan bileşenlerin çözünürlük profilleri farklıdır. Daha polar karaktere sahip olanlar suda daha çok çözünürken, flavanoid gibi apolar olan bileşenlerin kimyasal bağ yapmaları ve OH⁻ grup sayıları nedeniyle sudaki çözünürlükleri değişmektedir [92].

Keskin ve Kolaylı 2019'da çalışmalarında; etanol, gliserol, su, zeytinyağı, polietilen glikol ve polipropilen glikol gibi çözücülerin ekstraksiyon işleminde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Çözünen katı kısım arttıkça propolis ekstraktının kalitesinin arttığını bildirmişlerdir [92].

Abdullah ve arkadaşları 2019'da çalışmalarında; sudaki farklı etanol fraksiyonlarını kullanarak hazırladıkları propolis ekstraktlarının fiziksel ve antioksidan özelliklerini belirlemeye çalışmışlardır. Etanole göre suyun toksik olmaması ve daha az biyoaktif bileşen elde edilmesi nedeniyle etanolün sudaki çözeltisini kullanmışlardır. Su-etanol karışımında etanol oranını arttıkça propoliste çözünen madde miktarının da arttığını gözlemlemişlerdir [93].

Bu tez çalışması kapsamında yapılan literatür araştırması sonucunda, propolis ile yapılan çalışmalarda kullanılan farklı çözücüler belirlenmiştir ve bu çözücüler ile propolis için çözünürlük çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda olumlu ve olumsuz sonuç oluşturan çözücüler görülmüştür. Çözünürlük çalışmasında çözücü olarak etanol, bitkisel gliserin, oda sıcaklığında distile su, sıcak distile su, etanol:soğuk distile su ve etanol:sıcak distile su karışımları kullanılmıştır. Etanol ile yapılan çalışmada berrak bir çözelti elde edilirken diğer çözücüler ile propolisin dispersiyon oluşturduğu, dibe çöktüğü ve

sakızimsı bir yapıya dönüştüğü görülmüştür. Farklı sıcaklıklardaki distile su: etanol karışımları ile yapılan çalışmalarda ise etanol konsantrasyonu arttıkça karışımdaki propolis benzer şekilde disperse olduğu görülmüştür fakat etanol:sıcak distile su ile yapılan çalışmalarda etanol oranındaki değişimin propolis sakız gibi yapışkan bir hal almasını engellemediği görülmüştür.

Yapılan araştırmalar sonucunda bulunan çözünürlük çalışmaları ve elde edilen bulgular neticesinde propolis ekstraktı hazırlamak için uygun olan veya olabileceği düşünülen çözücüler belirlenmiştir ve ekstraksiyon işlemleri su, etanol ve su-etanol karışımı ile gerçekleştirilmiştir. Bitkisel gliserin ile yapılan çözünürlük sonucu nitel bir sonuç elde edilemediği için ekstraksiyon ortamı olarak kullanılmamıştır.

Farklı çözücüler ile elde edilen propolis ekstraktlarının evaporasyon sonucu elde edilen ekstrakt verimleri %5 ile %75 arasında değişmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi etanol ile sağlanmıştır (%50-75). Etanol:distile su ile ekstraksiyon verimleri %40-45 aralığında olurken distile su ile ekstraksiyon verimleri en düşük (%5 ila %14) olmuştur. Gliserin ile % verim sonucu elde edilememiştir çünkü kıvamlı bir çözelti olup dekantasyon işlemi için uygun değildir.

Permana ve arkadaşları 2020'de propolis ekstraktının fitozom iletim sistemleri üzerine formülasyonunu göstermişlerdir. Bu çalışma sonucunda propolis oksidatif strese bağlı organ yaralanması ve cilt gençleştirme tedavisi için umut verici olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada etanol-su karışımı ekstraksiyonunda en düşük verimi %2,77 ve en yüksek ekstraksiyon verimini de %49,12 olarak bulmuşlardır [94].

Fachri ve arkadaşları 2020'de ekstraksiyon sırasında proses değişkenlerinin (sıcaklık, basınç ve CO₂ akış hızı) verim üzerindeki etkisini deneysel olarak araştırmışlardır. Pek çok çözücü kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemi sonucunda % verim hesaplanmıştır. Bu çalışmada çözücünün saf etanol olduğu ve farklı oranlarda etanolün kullanıldığı propolis ekstraktlarında verim %38,34-57,65 arasında, çözücünün metanol olduğu propolis ekstraktlarında verim %53,73, çözücünün su olduğu propolis ekstraktlarında verim %14,30-35,32 arasında, çözücünün % 70 etanol olduğu propolis ekstraktlarında verim %18,33, çözücünün zeytinyağı olduğu propolis ekstraktlarında verim %14,16 ve çözücünün propilen glikol olduğu propolis ekstraktlarında verimi %15,88 olarak bulmuşlardır [95].

Chen ve arkadaşlarını 2007'de Brezilya propolisinden 2 farklı yöntem ile ekstrakt eldesi

hazırlamışlardır. Birinci yöntem; çözücü olarak önce etanol, ardından su kullanarak ekstrakt hazırlamışlardır. İkinci yöntem ise; çözücü olarak önce su ardından etanol kullanarak ekstrakt hazırlamışlardır. Bu iki yöntem hazırlanan propolis ekstraktlarında, atmosfer basıncı ve yüksek basınç olmak üzere iki farklı koşul altında ekstraksiyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. Hazırlanan ekstraktların yüzde verimleri % 11,3 ile % 42,8 arasında değişmiştir ve en yüksek verim basınçtan bağımsız olarak önce etanol ile ekstraksiyon yapılan aşamanın sonunda elde edilmiştir (Atmosfer basıncı için %42,3 ve yüksek basınç için %42,8) [96].

Escriche ve Borrás 2019'da propolisin fenol bileşiğinin standartlaştırılması için çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada etanol ile ekstraksiyon metotları deneyerek % verim hesaplamışlardır. En geniş % verim aralığını %42,0-69,6 olarak bulmuşlardır [10].

Keskin ve Kolaylı 2020'de propolis için etanolü çözücü olarak kullandıklarında % verimi 7,13-95,07 arasında bulmuşlardır. Çözücünün su olduğu ekstrakt eldesinde % verimi 0,11-34,80 arasında bulmuşlardır. Çözücünün yağ olduğu ekstrakt eldesinde % verimi sonuçlandıramamışlardır [92].

Literatür kaynaklarını kendi içlerinde karşılaştırdığımızda etanol için verilen en geniş aralık %7,13 ile %95,07, su için %0,11 ile %35,32 ve etanol/su karışımı için %2,77 ile %49,12'dir. Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar ise; etanol için %50 ile %75, su için %5 ile %14 ve etanol/su karışımı için %40 ile %45 aralığında değişmektedir.

Yapılan çalışma sonuçlarını literatür araştırma sonuçları ile karşılaştırıldığımızda ise sonuçların uyumlu olduğu ve verilen aralıklar içerisinde literatür sonuçlarını desteklediği görülmektedir. Bu veriler ışığında yüksek verim elde etmede en etkili parametrelerin ekstraksiyon için kullanılan çözücü ortamı ile kullanılan ekstraksiyon yöntemi olduğu belirlenmiştir.

Propolis ekstraktlarının kalitesi çözünen katı kısmı arttıkça artmaktadır ve fenolik ve flavanoid içeriği de kaliteyi belirleyen iki önemli bileşendir [92].

Bu tez çalışmasında hazırlanan propolis ekstraktlarının fenolik madde miktarı tayinleri UV spektrofotometresi kullanılarak 760 nm'de yapılmıştır. Analizde kullanılmak üzere ilk olarak değişen gallik asit konsantrasyonlarıyla kalibrasyon eğrisi çizilmiştir ve çalışma sonucunda kalibrasyon eğrisinin doğruluk katsayısı 0,99978 olarak bulunmuştur. En yüksek toplam fenolik madde miktarı 40,04 mg GA/g ile etanol/su karışımıyla hazırlanan propolis ekstraktlarında elde edilirken en düşük toplam fenolik madde miktarı 7,37 mg

GA/g ile çözücü olarak suyun kullanıldığı file ile yapılan çalışmada bulunmuştur.

Silva ve arkadaşları 2018'de Brezilya'nın Paraná güneybatı bölgesinden toplanan propolis örnekleri ile etanol/su karışımını kullanarak hazırladıkları propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriklerini 5,3 ila 50,4 mg GA/g aralığında değiştiğini bulmuşlardır [89].

Andrade ve arkadaşları 2017'de Brezilya'nın kuzeydoğu Alagoas ve Sergipe eyaletlerinde yetiştirilen kahverengi, yeşil ve kırmızı propolis türlerini kullandıkları çalışmalarında etanol/su karışımı kullanarak hazırladıkları ekstraktların toplam fenolik madde içeriklerini incelemişlerdir. Kırmızı, yeşil ve kahverengi propolisin fenolik madde miktarlarını sırasıyla 91,3 mg GA/g, 90,55 mg GA/g ve 91,32 mg GA/g olarak bulunmuştur ve bu sonuçlar neticesinde toplam fenolik madde içeriklerinin bölgeye ve türe göre değişebileceğini bildirmişlerdir [97].

Górecka ve arkadaşları 2012'de Polonya'nın Kamianna şehrindeki bir arı kovanından toplanan propolis ile etanolik ekstrakt hazırlamışlardır ve fenolik madde içeriğini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada %75'lik etanol kullanarak hazırladıkları propolis ekstraktının toplam fenolik madde içeriğini 178 mg GA/g olarak bulmuşlardır [98].

Savickas ve arkadaşları 2010'da farklı konsantrasyonlarda (%60, %70, %80 ve %96) etanol kullanarak propolis ekstraktları hazırlamışlardır. %60, %70, %80 ve %96 etanol konsantrasyonlarında elde edilen toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 8,88 mg/ml, 9,17 mg/ml, 9,57 mg/ml ve 9,07 mg/ml olarak bulunmuştur. Yapılan çalışma sonucunda en iyi etanol konsantrasyonun %80 olduğunu bulmuşlardır [99].

Gülçin ve arkadaşları 2010'da çalışmalarında Doğu Anadolu bölgesinden (Erzurum ilinden) toplanan propolisleri kullanmışlardır. Su ile hazırladıkları propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğini 124,3 µg GA/g olarak bulmuşlardır [100].

Yaptığımız çalışmada bulunan sonuçlar literatürde yer alan sonuçlarla karşılaştırıldığında, etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği literatürde yer alan sonuçlarla kısmen uyumlu olduğu söylenebilir. Etanol/su karışımı ve suyun çözücü olarak kullanıldığı bazı çalışmalarda propolis ekstraktlarının toplam fenolik içeriği sonuçları incelendiğinde sonuçların literatür ile uyumlu olmadığı görülmüştür. Bunun nedeninin yukarıda belirtildiği gibi botanik kaynağı, iklim, coğrafik konum, toplanma yeri ve zamanının propolislerin kimyasal içeriklerinde varyasyona sebep olduğu düşünülmektedir. Düzce yöresine ait propolisler ile yapılan bu çalışma ile

de bu sonuç desteklenmektedir ve literatüre Düzce iline dayalı fenolik miktar bilgisi için katkı sağlandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda tüm sonuçlar değerlendirildiğinde farklı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan çözücünün toplam fenolik madde içeriğine etkisi olduğu söylenebilir.

Hazırlanan propolis ekstraktlarının flavanoid madde miktarı tayinleri UV spektrofotometresi kullanılarak 415 nm’de yapılmıştır. Analizde kullanılmak üzere ilk olarak değişen kuersetin konsantrasyonlarıyla kalibrasyon eğrisi çizilmiştir ve çalışma sonucunda kalibrasyon eğrisinin doğruluk katsayısı 0,99971 olarak bulunmuştur. En yüksek toplam flavanoid madde miktarı 2,30 mg QE/g ile etanol/su karışımıyla hazırlanan propolis ekstraktlarında elde edilirken en düşük toplam fenolik madde miktarı 0,63 mg QE/g ile çözücü olarak suyun kullanıldığı file ile yapılan çalışmada bulunmuştur.

Al-Ani ve arkadaşları 2018’de Çek Cumhuriyeti, Almanya ve İrlanda’dan temin edilen propolislerden etanol kullanarak hazırladıkları ekstraktlardan en yüksek toplam flavanoid içeriğine sahip olanın ($2,86 \pm 0,2$ mg QE/g) İrlanda’dan temin edilen propolis olduğunu bulmuşlardır [88].

Górecka ve arkadaşları 2012’de Polonya’nın Kamianna şehrindeki bir arı kovanından toplanan propolis ile etanolik ekstrakt hazırlamışlardır ve flavanoid madde içeriğini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada %75’lik etanol kullanarak hazırladıkları propolis ekstraktının toplam flavanoid madde içeriğini 92 mg QE/g olarak bulmuşlardır [98].

Moreno ve arkadaşları 2000’de Arjantin’in farklı bölgelerinden elde edilen propolislerden etanol kullanarak hazırladıkları ekstraktlarda toplam flavanoid içeriğini 13,3 ve 42,6 mg QE/g olarak bulmuşlardır [101].

Andrade ve arkadaşları 2017’de Brezilya’nın kuzeydoğu Alagoas ve Sergipe eyaletlerinde yetiştirilen kahverengi, yeşil ve kırmızı propolis türlerini kullandıkları çalışmalarında etanol/su karışımı kullanarak hazırladıkları ekstraktların toplam flavanoid madde içeriklerini incelemişlerdir. Kırmızı, yeşil ve kahverengi propolisin flavanoid madde miktarlarını sırasıyla 30,89 mg QE/g, 59,45 mg QE/g ve 31,48 mg QE/g olarak bulunmuştur ve bu sonuçlar neticesinde toplam fenolik madde içerikleri bölgeye ve türe göre değişebileceğini bildirmişlerdir [97].

Gülçin ve arkadaşları 2010’da Doğu Anadolu bölgesinden (Erzurum ilinden) toplanan propolisleri kullanmışlardır. Su ile hazırladıkları propolis ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğini 8,15 mg QE/g olarak bulmuşlardır [100].

Chen ve arkadaşları 2007’de Brezilya propolisinden hazırlanan ekstraktların flavanoid içeriğini oldukça geniş bir aralıkta (12 µg/ml-2008 µg/ml) değiştirmiştir. Yüksek basıncın kullanıldığı etanol ile ekstraksiyon sonucunda en yüksek flavanoid içeriği (2008 µg/ml) elde edilmiştir [96].

Yaptığımız çalışmada bulunan sonuçlar literatürde yer alan sonuçlarla karşılaştırıldığında, fenolik madde miktar tayininde olduğu gibi sonuçların kısmen uyumlu olduğu görülmektedir. Etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarının toplam flavanoid içeriği literatürdeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Etanol/su karışımı ve etanolün çözücü olarak kullanıldığı bazı çalışmalarda ise propolis ekstraktlarının toplam flavanoid içeriği sonuçları incelendiğinde sonuçların literatür ile uyumlu olmadığı görülmüştür. Bunun sebebinin de flavanoid madde içeriğinde olduğu gibi propolislerin kimyasal içeriklerindeki varyasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde farklı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan çözücünün toplam flavanoid madde içeriğine etkisi olduğu söylenebilir.

Propolisin kimyasal bileşenler açısından zengin olması ve bu bileşenler sayesinde farmakolojik etki göstermesi ilaç veya koruyucu/yardımcı madde olarak kullanımına olanak tanımaktadır. Geçmişten günümüze yaygın olarak kullanılan propolisin en önemli etkilerinden birinin de antitümör etki olduğu öne sürülmektedir. Bu nedenle çalışmada hazırlanan propolis ekstraktları ile C6 gliyal tümör hücreleri ile antitümör etkisi incelenmiştir.

C6 gliyal tümör hücrelerinin çözülerek çoğaltılmasının ardından hücreler pasajlanmış ve canlı-ölü hücreler ışın mikroskopu kullanılarak sayılmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi için yapılan üç tekrarlı WST-1 testinin sonuçlarına göre ekstraksiyon yönteminde kullanılan çözücüye ve kullanılan ekstraksiyon metoduna bağlı olarak hücre % canlılıkları arasında fark olduğu görülmüştür. Her bir çözücü ve kullanılan metotta değişen konsantrasyonlarında propolis ekstraktları belirli işlemlerden geçirilerek hücrelere ilave edilmiştir.

Yapılan WST-1 analizinin negatif kontrolü sonucunda hücrelerin canlılığını koruduğu, propolis ekstraktı ilave edilen hücrelerde ekstrakt konsantrasyonu ile hücre canlılığının ters ilişki gösterdiği yani artan konsantrasyon ile C6 gliyal tümör hücrelerinin canlılığının azaldığı görülmektedir.

Elkhenany ve arkadaşları 2019’da yeşil propolis ekstraktının *in vitro* mezenkimal stromal

hücrelerinin (MSC) karakteristik özelliklerini etkileyip etkilemediğini göstermek istemişlerdir. Bunun için etanolik çözücü kullanılarak farklı konsantrasyonlarda propolis ekstraktları hazırlamışlardır. En düşük doz hariç diğer tüm propolis konsantrasyonunun hücre proliferasyonunda önemli azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu veriler ışığında artan hücre proliferasyonu ve doku rejenerasyonu için propolis ekstraktının kullanımını desteklediklerini belirtmişlerdir [102].

Memmedov ve arkadaşları 2018’de farklı çözücülerle hazırladıkları propolis ekstraktlarının 25, 100, 500, 1000 ve 1500 µg/ml konsantrasyonlarında insan kolon epitel hücresi (CCD-841 CoN) ve kolon kanseri hücre hatları (HCT-116) üzerine sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. 24, 48, 72 saatlik inkübasyon uygulamalarının sonunda propolisin etilen glikol, su ve etanol ekstraktlarının kanserli hücre hatlarında sağlıklı epitel hücrelere kıyasla daha çok sitotoksik etki gösterdiğini bulmuşlardır [103].

Kerimoğlu ve arkadaşları 2018’de su, polietilen-su ve etanol ile hazırlanan propolis ekstraktlarını kullanarak C6 glioblastom hücre hattı üzerine canlılık etkilerini araştırmışlardır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında test edilen tüm ekstraktların konsantrasyona bağlı olarak C6 hücre sayısında azalmaya sebep olduğunu bulmuşlardır. Bunun sonucunda ise propolis özlerinin sağlıklı beyin hücrelerini korurken C6 glioblastom hücrelerine karşı seçici bir sitotoksikite gösterdiğini bildirmişlerdir [104].

Touzani ve arkadaşları 2018’de Fas’ın dört farklı bölgesinden toplanan propolislerin antikanser etkisini araştırmışlardır. Propolislerin metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (0-1000 µg/ml) HCT 116 kolon kanseri hücre hattı üzerine sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. Değişen konsantrasyonlarda anlamlı bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Sitostatik etkilerin anti-kanser etkisine aracılık edebileceğini bulmuşlardır [105].

Iqbal ve arkadaşları 2019’da propolis özütünün vasküler hücreler üzerindeki anti-anjyogenik aktivitesini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanılmak üzere propolisi kovanın hem iç yüzeyinden hem de dış yüzeyinden toplamışlardır. Toplanan propolislerden etanol ile elde edilen ekstraktlar farklı konsantrasyonlarda insan göbek damarı endotel hücreleri ve plasentadan türetilen perisitler ve insan meme kanseri (MDA-MB-231) hücre hatlarına uygulanmışlardır. İki propolis ekstraktından kovan iç yüzeyinden toplanan olan daha güçlü sitotoksik veya inhibitör etki sergilediğini bulmuşlardır. Ayrıca kovanın dış yüzeyinden toplanan en yüksek konsantrasyonda

maksimum inhibasyona ulaşmadığını göstermişlerdir [106].

Yılmaz ve arkadaşları 2016'da Aydın'dan elde ettikleri propolisin CCRF-SB lösemi hücre hattında 81 insan mikroRNAlar (miRNA) üzerindeki aktivitesin, değerlendirmeyi hedeflemişlerdir. Bu çalışmada etanol ile elde edilen propolis ekstraktının B-hücresi akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve sağlıklı insan B hücresi lenfosit NCI-BL2171, NCI-BL 2347 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, WST-1 testi kullanılarak araştırılmıştır. Propolisin IC50 dozu için B hücresi ALL (CCFR-SB) hücre hattında propolis uygulanmamış hücre hattına kıyasla apoptozu 1.5 kat indüklediğini bulmuşlardır. Ayrıca propolisin, lösemi hücreleri üzerinde epigenetik etkileri olan miRNA ekspresyonunu değiştirdiğini bulmuşlardır [107].

Chen ve arkadaşları 2007'de Brezilya propolisinden hazırlanan ekstraktlar ile lösemi (HL-60, U937), akciğer kanseri (A549, CH27) ve karaciğer kanseri (Hep G2, Hep 3B) hücre hatları ile *in vitro* sitotoksikite çalışmaları yapmışlardır. Elde edilen sonuçlar suda çözünen ekstraktların hücre çoğalmasını engellediği ve bu etkiyi konsantrasyona bağlı bir şekilde gerçekleştirdiğini göstermiştir [96].

Sonuç olarak; Türkiye'de lokasyonları verilerek, kimyasal kompozisyonları belirlenen çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle bu çalışmada Düzce yöresine ait propolis örneği için elde edilen bulgular öncü niteliği taşımaktadır. Bu çalışmada farklı çözücüler kullanılarak Düzce yöresine ait propolis ekstraktları hazırlanmıştır. Etanol ile hazırlanan propolis ekstraktları için % verim ve fenolik-flavanoid madde miktarı açısından en iyi sonuçlar elde edilmiş olup bu verilerin literatürü desteklediği görülmüştür. Fakat yine de % verimi iyileştirmek yani propolis ekstraktının içerdiği fenolik-flavanoid madde miktarını artırmak için iyileştirme çalışmaları yapılabilir. Ayrıca ekstraksiyon işlemi etanol kullanımı nedeniyle elde edilen ekstraktta kalabilecek olan etanolün toksik etki oluşturma ihtimali bulunduğundan bitmiş üründe artık çözücü miktarının takip edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Çalışmanın son kısmında Düzce yöresine ait propolisten elde edilen ekstraktların *in vitro* şartlarda C6 gliyal tümör hücreleri için olumsuz etki göstererek propolisin artan konsantrasyonlarında tümör hücrelerini azalttığı gösterilmiştir. Bu durumda propolis ekstraktlarının hücreler üzerinde yoğunluğunu arttırdığımızda tümör hücreleri için direkt etkili olacağını söyleyemesek de yardımcı veya koruyucu olarak kullanılabileceğini, alternatif ve destekleyici bir tedavi olarak görebileceğimizi göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlarla hem literatüre katkı sağlanmış olup hem de propolisin alternatif ve tamamlayıcı bir doğal ürün olarak tedavi amaçlı kullanım

olasılığı ortaya konulmuştur.



5. KAYNAKLAR

- [1] S. Demir, "Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H₂O₂ ile uyarılmış dna hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması," Yüksek lisans tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2010.
- [2] V. Bankova, "Recent trends and important developments in propolis research," *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, c. 2, sayı 1, ss. 29-32, 2005.
- [3] E. Şenel ve E. Demir, "Bibliometric analysis of apitherapy in complementary medicine literature between 1980 and 2016," *Complementary Therapies in Clinical Practice*, c. 1, ss. 47-52, 2018.
- [4] E. L. Ghisalberti, "Propolis: a review," *Bee World*, c. 60, sayı 2, ss. 59-84, 1979.
- [5] I. B. S. Cunha, A. C. H. F. Sawaya, F. M. Caetano, M. T. Shimizu, M. C. Marcucci, F. T. Drezza, G. S. Povia ve P.O. Carvalho, "Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, c. 15, sayı 6, ss. 964-970, 2004.
- [6] M. Yüksel, (2017, 26 Eylül). *Propolis toplayan arı* [Online]. Erişim: https://www.youtube.com/watch?v=PG31i_FuX2U.
- [7] G. G. Duran, "In-vitro koşullarda propolis'in antibakteriyel, antifungal ve leyişmanyasidal etkilerinin araştırılması," Yüksek lisans tezi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, Türkiye, 2007.
- [8] M. C. Marcucci, J. Rodriguez, F. Ferreres, V. Bankova, R. Groto ve S. Popov, "Chemical composition of Brazilian propolis from Sao Paulo State," *Zeitschrift für Naturforschung C*, c. 53, sayı 1, ss. 117-119, 1998.
- [9] W. Gargouri, S. M. Osés, M. A. Fernández-Muiño, M. T. Sancho ve N. Kechaou, "Evaluation of bioactive compounds and biological activities of Tunisian propolis," *LWT - Food Science and Technology*, c. 111, ss. 328-336, 2019.
- [10] M. Woźniak, L. Mrówczyńska, A. Waśkiewicz, T. Rogoziński ve I. Ratajczak, "The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, c. 29, sayı 3, ss. 301-308, 2019.
- [11] A. H. Banskota, Y. Tezuka, E. Ishii, K. Midorikawa, K. Matsushige ve S. Kadota, "Hepatoprotective and anti-helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis," *Phytomedicine*, c. 8, sayı 1, ss. 16-23, 2001.
- [12] H. J. Koo, K. R. Lee, H. S. Kim ve B. M. Lee, "Detoxification effects of aloe polysaccharide and propolis on the urinary excretion of metabolites in smokers," *Food and Chemical Toxicology*, c. 130, ss. 99-108, 2019.
- [13] A. M. G. Caravaca, M. G. Romero, D. A. Romàn, A. S. Carretero, A. F. Gutiérrez, "Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees,"

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, c. 41, sayı 4, ss. 1220–1234, 2006.

- [14] E. Karabulut, “Propolisin etanolik ekstresinin *helicobacter pylori* ye karşı antimikrobiyal etkisinin araştırılması,” Yüksek lisans tezi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye, 2011.
- [15] A. S. Arslan, N. Birben, P. T. Seven ve İ. Seven, “Arı ürünleri ve hayvan beslemede kullanımı,” *Uludağ Arıcılık Dergisi*, c. 17, sayı 2, ss. 93-104, 2017.
- [16] C. Yavuz, “Türkiye’nin bazı illerinden toplanan propolislerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve biyoaktif bileşenlerinin tayini,” Yüksek lisans tezi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu Üniversitesi, Ordu, Türkiye, 2011.
- [17] P. Aygün, “Etanollü türk propolis ekstraktının t-bhp ile uyarılmış oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin incelenmesi,” Yüksek lisans tezi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2018.
- [18] S. A. Libério, A. L. A. Pereira, M. J. A. M. Araújo, R. P. Dutra, F. R. F. Nascimento, V. M. Neto, M. N. S. Ribeiro, A. G. Gonçalves ve R. N. M. Guerra, “The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci,” *Journal of Ethnopharmacology*, c. 125, sayı 1, ss. 1–9, 2009.
- [19] S. Karakaş, “Türk propolisinin ticari bitkisel yağlarda çözünürlüğünün incelenmesi,” Yüksek lisans tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2012.
- [20] A. Sorucu, “Marmara bölgesindeki propolislerde biyolojik etkisi olan fenolik madde ve miktarlarının mevsim ve rakım farkına bağlı olarak belirlenmesi,” Doktora tezi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uludağ Üniversitesi, Bursa, Türkiye, 2015.
- [21] H. Türkez, M. I. Yousef ve F. Geyikoglu, “Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver,” *Food and Chemical Toxicology*, c. 48, sayı 10, ss. 2741-2746, 2010.
- [22] A. Cuesta, A. Rodríguez, M. Á. Esteban ve J. Meseguer, “In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses,” *Fish & Shellfish Immunology*, c. 18, sayı 1, ss. 71-80, 2005.
- [23] M. Kanbur, G. Eraslan ve S. Silici, “Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats,” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, c. 72, sayı 3, ss. 909-915, 2009.
- [24] M. Oroian, F. Ursachi ve F. Dranca, “Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis,” *Ultrasonic Sonochemistry*, c. 64, 2020.
- [25] L. Bravo, “Polyphenol chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance,” *Nutrition Reviews*, c. 56, sayı 11, ss. 317-333, 1998.
- [26] N. C. Cook ve S. Samman, “Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources,” *The Journal of Nutritional Biochemistry*, c. 7, sayı 2, ss. 66-76, 1996.

- [27] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro ve D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, c. 13, sayı 10, ss. 572-584, 2002.
- [28] W. Vermeris ve R. Nicholson, Families of Phenolic Compounds and Means of Classification, *Phenolic compound biochemistry*, 1. baskı, Dordrecht, Hollanda: Springer Science & Business Media, 2007, böl. 1, ss. 1-7.
- [29] D. Lairon ve M. J. Amiot, "Flavonoids in food and natural antioxidants in wine," *Current Opinion in Lipidology*, c. 10, sayı 1, ss. 23-28, 1999.
- [30] Ö. Demirkıran, "Hypericum montbretı spach. bitkisindeki fenolik bileşiklerin izolasyonu ve tanımlaması," Doktora tezi, Kimya Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye, 2005.
- [31] T. Coşkun, "Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri," *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, c. 48, sayı 1, ss. 69-84, 2005.
- [32] P. Walker ve E. Crane, "Constituents of propolis," *Apidologie*, c. 18, sayı 4, ss. 327-334, 1987.
- [33] M. Dığrak, Ö. Yılmaz, S. Çelik ve S. Yıldız, "Propolisteki yağ asitleri ve antimikrobiyal etkisi üzerinde in vitro araştırmalar," *Gıda*, c. 20, sayı 4, ss. 249-255, 1995.
- [34] T. N. Çakıroğlu, "Çeşitli çözücülerde türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi," Yüksek lisans tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2010.
- [35] T. Kolaç, P. Gürbüz ve G. Yetiş, "Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri," *İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, c. 5, sayı 1, ss. 26-42, 2017.
- [36] J. Peterson ve J. Dwyer, "Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity," *Nutrition Research*, c. 18, sayı 12, ss. 1995-2018, 1998.
- [37] K. Çelik, *Apitherapy Handbook*, 1. baskı, Ankara, Türkiye: Sonçağ Yayıncılık, 2019, ss. 83-101.
- [38] G. Korkmaz, "Kalkonlardan elde edilen 1,5-diketon türevlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması," Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, Türkiye, 2019.
- [39] B. Cabaş, "Bazı flavon türevlerinin enzim katalizli sentezi ve aktivitelerinin araştırılması," Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, Türkiye, 2017.
- [40] S. I. Anjum, A. Ullah, K. A. Khan, M. Attaullah, H. Khan, H. Ali, M. A. Bashir, M. Tahir, M. J. Ansari, H. A. Ghramh, N. Adgaba ve C. K. Dash, "Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review," *Saudi Journal of Biological Sciences*, c. 26, sayı 7, ss. 1695-1703, 2019.
- [41] R. Tsao, "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols," *Nutrients*, c. 2, sayı 12, ss. 1231-1246, 2010.
- [42] Z. Büyüktuncer, A. A. Başaran, "Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki önemleri," *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, c. 25, sayı 2, ss. 79-94, 2005.

- [43] G. J. Wang, O. Lapcık, R. Hampl, M. Uehara, N. A. Maharik, K. Stumpf, H. Mikola, K. Wähälä ve H. Adlercreutz, "Time-resolved fluoroimmunoassay of plasma daidzein and genistein," *Steroids*, c. 65, sayı 6, ss. 339-348, 2000.
- [44] L. Schoefer, R. Mohan, A. Braune, M. Birringer ve M. Blaut, "Anaerobic c-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*," *FEMS Microbiology Letters*, c. 208, sayı 2, ss. 197-202, 2002.
- [45] O. Yu, W. Jung, J. Shi, R. A. Croes, G. M. Fader, B. McGonigle ve J. T. Odell, "Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues," *Plant Physiology*, c. 124, sayı 2, ss. 781-794, 2000.
- [46] J. Cvek, M. M. Šarić, D. Vitali, I. V. Dragojević, Z. Šmit ve S. Tomić, "The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures," *Journal of Apicultural Research*, c. 47, sayı 1, ss. 35-45, 2008.
- [47] A. Arıbal, "Flavonoid türevi ftalosiyanın bileşiklerinin sentezi ve karakterizasyonu," Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 2014.
- [48] N. Zabaiou, A. Fouache, A. Trousson, S. Baron, A. Zellagui, M. Lahouel ve J. M. A. Lobaccaro, "Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product," *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, ss. 214-222, 2017.
- [49] M. F. Tago, K. Okamoto, R. Izumi, K. Tago, K. Yanagisawa, Y. Narukawa, F. Kiuchi, T. Kasahara ve H. Tamura, "Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway," *International Immunopharmacology*, c. 25, sayı 1, ss. 189-198, 2015.
- [50] I. A. Freires, S. M. de Alencar ve P. L. Rosalen, "A pharmacological perspective on the use of Brazilian red propolis and its isolated compounds against human diseases," *European Journal of Medicinal Chemistry*, c. 110, ss. 267-279, 2016.
- [51] S. Awale, F. Li, H. Onozuka, H. Esumi, Y. Tezuka ve S. Kadota, "Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic panc- 1 cancer cell line in nutrient-deprived condition," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, c. 16, sayı 1, ss. 181-189, 2008.
- [52] L. Šturm ve N. P. Ulrih, "Advances in the propolis chemical composition between 2013 and 2018: a review," *eFood*, c. 1, sayı 1, ss. 24-37, 2020.
- [53] Ö. Özmen, "Terpenlerin enzimatik polimerizasyonu ve reaksiyon kinetiğinin modellenmesi," Yüksek lisans tezi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2010.
- [54] L. S. Olegário, J. K. S. Andrade, G. R. S. Andrade, M. Denedai, R. L. Cavalcanti, M. A. A. P. Silva ve N. Narain, "Chemical characterization of four Brazilian brown propolis: An insight in tracking of its geographical location of production and quality control," *Food Research International*, c. 123, ss. 481-502, 2019.
- [55] I. A. I. Thamnopoulos, G. F. Michailidis, D. J. Fletouris, A. Badeka, M. G. Kontaminas ve A. S. Angelidis, "Inhibitory activity of propolis against *Listeria monocytogenes* in milk stored under refrigeration," *Food Microbiology*, c. 73, ss. 168-176, 2018.
- [56] E. Melliou, E. Stratis ve I. Chinou, "Volatile constituents of propolis from various regions of Greece-antimicrobial activity," *Food Chemistry*, c. 103, sayı 2, ss. 375-380, 2007.

- [57] J. Zhou, G. Xie ve X. Yan, *Encyclopedia Of Traditional Chinese Medicines, Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications*, 1. baskı, Berlin, Almanya: Springer, 2011, böl. 4, ss. 14-636.
- [58] S. Huang, C. P. Zhang, K. Wang, G. Q. Li ve F. L. Hu, "Recent advances in the chemical composition of propolis," *Molecules*, c. 19, sayı 12, ss. 19610-19632, 2014.
- [59] B. Şener ve A. Mutlugil, "Doğal kumarinler, kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri," *FABAD Farmasötik Bilimler Dergisi*, c. 12, sayı 2, ss. 99-114, 1987.
- [60] K. Hroboňová, J. Lehotay, J. Čižmárik ve J. Sádecká, "Comparison hplc and fluorescence spectrometry methods for determination of coumarin derivatives in propolis," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, c. 36, sayı 4, ss. 486-503, 2013.
- [61] A. Machyňáková ve K. Hroboňová, "Simultaneous determination of coumarin derivatives in natural samples by ultra high performance liquid chromatography," *Journal of Food and Nutrition Research*, c. 56, sayı 2, ss. 179-188, 2017.
- [62] V. Cheynier, "Phenolic compounds: from plants to foods," *Phytochemistry Reviews*, c. 11, sayı 2-3, ss. 153-177, 2012.
- [63] S. Mısıır, "Türk propolisinin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının radikal yakalama ve demir şelatlama aktivitesinin incelenmesi," Yüksek lisans tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2013.
- [64] T. Shohaib, M. Shafique, N. Dhanya ve M. Divakar, "Importance of flavonoids in therapeutics," *Hygeia: Journal for Drugs and Medicines*, c. 3, sayı 1, ss. 1-18, 2011.
- [65] M. M. Çalışkol, "Azerbaycan yöresine ait propolis örneklerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi," Yüksek lisans tezi, Kimya Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2013.
- [66] C. Gunduz, C. Biray, B. Kosova, B. Yilmaz, Z. Eroglu, F. Sahin, S. B. Omay ve O. Cogulu, "Evaluation of Manisa propolis effect on leukemia cell line by telomerase activity," *Leukemia Research*, c. 29, sayı 11, ss. 1343-1346, 2005.
- [67] M. Popova, H. Lazarova, B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, J. Mihály, H. Najdenski, I. Tsvetkova ve A. Szegedi, "Nanostructured silver silica materials as potential propolis carriers," *Microporous and Mesoporous Materials*, c. 263, ss. 28-33, 2018.
- [68] F. Pellati, F. P. Prencipe, D. Bertelli ve S. Benvenuti, "An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 81-82, ss. 126-132, 2013.
- [69] O. Koru, F. Toksoy, C. H. Acikel, Y. M. Tunca, M. Baysallar, A. U. Guclu, E. Akca, A. O. Tuylu, K. Sorkun, M. Tanyuksel ve B. Salih, "In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens," *Anaerobe*, c. 13, sayı 3-4, ss. 140-145, 2007.
- [70] V. Bankova, A. S. Galabov, D. Antonova, N. Vilhelmova ve B. Perri, "Chemical composition of propolis extract acf[®] and activity against herpes simplex virus,"

Phytomedicine, c. 21, sayı 11, ss. 1432-1438, 2014.

- [71] A. F. Bozkurt, "Farklı düzeylerde propolis uygulamalarının farelerde lipid peroksidasyonu (mda) ile bazı biyokimyasal parametrelere etkilerinin değerlendirilmesi," Yüksek lisans tezi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye, 2010.
- [72] N. Eroglu, S. Akkus, M. Yaman, B. Asci ve S. Silici, "Amino acid and vitamin content of propolis collected by native caucasian honeybees," *Journal of Apicultural Science*, c. 60, sayı 2, ss. 101-110, 2016.
- [73] Anonim, (2020, 7 Nisan). *Propolisin Kimyasal İçeriği*. [Online]. Erişim: <https://www.kacgun2017.com/genel/propolis-kimyasal-icerigi.html>
- [74] S. Ramnath, S. Venkataramgowda ve C. Singh, "Chemical composition of bee propolis collected from different regions in India by gcms analysis," *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, c. 30, sayı 1, ss. 1319-1328, 2015.
- [75] G. Polat ve D. Koçan, "Propolis ve antimikrobiyel etkisi," *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, Türkiye, 2006, ss. 1003-1006.
- [76] S. Mohammadzadeh, M. Sharriatpanahi, M. Hamed, Y. Amanzadeh, S. E. S. Ebrahimi ve S. N. Ostad, "Antioxidant power of Iranian propolis extract," *Food Chemistry*, c. 103, sayı 3, ss. 729-733, 2007.
- [77] V. Bankova, R. Christov, S. Popov, O. Pureb ve G. Bocari, "Volatile constituents of propolis," *Zeitschrift für Naturforschung C*, c. 49, sayı 1-2, ss. 6-10, 1994.
- [78] M. Popova, B. Trusheva, D. Antonova, S. Cutajar, D. Mifsud, C. Farrugia, I. Tsvetkova, H. Najdenski ve V. Bankova, "The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta," *Food Chemistry*, c. 126, sayı 3, ss. 1431-1435, 2011.
- [79] F. Güney ve M. Yılmaz, "Propolisin kimyasal içeriği ile antibakteriyel, antiviral, antitümör, antifungal ve antioksidan aktivitesi," *Arıcılık Araştırma Dergisi*, sayı 10, ss. 25-28, 2013.
- [80] Ü. Acar, "Effects of diet supplemented with ethanolic extract of propolis on growth performance, hematological and serum biochemical parameters and disease resistance of ozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) against streptococcus iniae," *Aquaculture*, c. 495, ss. 339-344, 2018.
- [81] V. S. Bankova, S. L. Castro ve M. C. Marcucci, "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin," *Apidologie*, c. 31, sayı 1, ss. 3-15, 2000.
- [82] B. Yangı, "Propolis ekstresinin deneysel inflamasyon ve antioksidan sistem üzerine etkisi," Yüksek lisans tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye, 2012.
- [83] J. M. Grange ve R. W. Davey, "Antibacterial properties of propolis (bee glue)," *Journal of the Royal Society of Medicine*, c. 83, sayı 3, ss. 159-160, 1990.
- [84] X. Wang, K. Sankarapandian, Y. Cheng, S. O. Woo, H. W. Kwon, H. Perumalsamy ve Y. J. Ahn, "Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, c. 16, sayı 1, ss. 1-12, 2016.
- [85] A. Rossi, R. Longo, A. Russo, F. Borrelli ve L. Sautebin, "The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lungcyclooxygenase activity

- by propolis,” *Fitoterapia*, c. 73, ek sayı, ss. 30-37, 2002.
- [86] H. Xuan, Z. Li, H. Yan, Q. Sang, K. Wang, Q. He, Y. Wang ve F. Hu, “Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer mcf-7 and mda-mb-231 cells,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, c. 2014, sayı 1, ss. 1-11, 2014.
- [87] N. E. Bayram, “Hakkari bölgesi propolislerinin botanik orijininin ve kimyasal içeriğinin saptanması” Doktora tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 2015.
- [88] I. A. Ani, S. Zimmermann, J. Reichling ve M. Wink, “Antimicrobial activities of european propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics,” *Medicines*, c. 5, sayı 1, ss. 1-17, 2018.
- [89] C. Silva, A. Prasniowski, M. A. Calegari, V. A. Lima ve T. L. C. Oldoni, “Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using atr-ft-ir spectroscopy and chemometrics,” *Food Analytical Methods*, c. 11, sayı 7, ss. 2013-2021, 2018.
- [90] İ. Turan, “Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerine etkisinin dna tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi,” Doktora tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, 2012.
- [91] H. Memmedov, O. Aldemir ve E. Aliyev, “Propolisin antikanser etkisi,” *Arıcılık Araştırma Dergisi*, c. 10, sayı 1, ss. 20-27, 2018.
- [92] M. Keskin ve S. Kolaylı, “Ticari propolis ekstraktlarının kalite parametreleri açısından karşılaştırılması,” *Uludağ Arıcılık Dergisi*, c. 19, sayı 1, ss. 43-49, 2019.
- [93] N. A. Abdullah, F. Ja'afar, H. M. Yasin, H. Taha, M. I. R. Petalcorin, M. H. Mamit, E. Kusri ve A. Usman, “Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam,” *Heliyon*, c. 5, sayı 9, ss. 1-8, 2019.
- [94] A. D. Permana, R. N. Utami, A. J. Courtenay, M. A. Manggau, R. F. Donnelly ve L. Rahman, “Phytosomal nanocarriers as platforms for improved delivery of natural antioxidant and photoprotective compounds in propolis: An approach forenhanced both dissolution behaviour in biorelevant media and skinretention profiles,” *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, c. 205, 2020.
- [95] B. A. Fachri, P. Sari, S. Yuwanti ve E. Subroto, “Experimental study and modeling on supercritical CO₂ extraction of Indonesian raw propolis using response surface method: Influence of pressure, temperature and CO₂ mass flowrate on extraction yield,” *Chemical Engineering Research and Design*, c. 153, ss. 452-462. 2020.
- [96] C. R. Chen, Y. N. Lee, C. M. J. Chang, M. R. Lee ve I. C. Wei, “Hot-pressurized fluid extraction of flavonoids and phenolic acids from Brazilian propolis and their cytotoxic assay in vitro,” *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, c. 38, sayı 3-4, ss. 191-196, 2007.
- [97] J. K. S. Andrade, M. Denadai, C. S. Oliveira, M. L. Nunes ve N. Narain, “Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region,” *Food Research International*, c. 101, ss. 129-138, 2017.
- [98] A. M. K. Górecka, A. Sobczak, A. R. Stojko, M. T. Górecki, M. Wardas ve K. P.

- Góral, “Antioxidant activity of ethanolic fractions of polish propolis,” *Zeitschrift für Naturforschung C*, c. 67, sayı 11-12, ss. 545-550, 2012.
- [99] A. Savickas, K. Ramanauskienė, A. Pukalskas, G. Kasparavičienė, V. Briedis, A. Inkėnienė, M. Žilius ve S. Kasparavičius, “The influence of solvent on the quantity and antioxidant activity of ethanolic extracts of Lithuanian propolis,” *Chemija*, c. 21, sayı 2-4, ss. 118-122, 2010.
- [100] İ. Gülçin, E. Bursal, M. H. Şehitoğlu, M. Bilsel ve A. C. Gören, “Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey,” *Food and Chemical Toxicology*, c. 48, sayı 8-9, ss. 2227-2238, 2010.
- [101] M. I. N. Moreno, M. I. Isla, A. R. Sampietro ve M. A. Vattuone, “Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina,” *Journal of Ethnopharmacology*, c. 71, sayı 1-2, ss. 109-114, 2000.
- [102] H. Elkhenany, N. E. Badri ve M. Dhar, “Green propolis extract promotes in vitro proliferation, differentiation, and migration of bone marrow stromal cells,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, c. 115, 2019.
- [103] H. Memmedov, L. M. Oktay, B. Durmaz, E. DüNDAR, N. S. Günel, H. Kalkan Yıldırım ve E. Yıldırım SöZmen, “Farklı çöZgenlerde hazırlanmış propolisin sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi,” *Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi*, Aydın, Türkiye, 2018, ss. 363-375.
- [104] Z. Balıon, A. Jekabsone, K. Ramanauskienė ve D. Majienė, “Anticancer properties of aqueous and nonaqueous propolis extracts,” *Journal of Apitherapy and Nature Apiterapi ve Doğa Dergisi*, c. 1, sayı 3, ss. 28-28, 2018.
- [105] S. Touzani, S. Kadan, A. Kmail, Ba. Saad ve B. Lyoussi, “In vitro assessments of cytotoxic and cytostatic effects of propolis in cells from the human colon carcinoma cell line (hct 116),” *Journal of Apitherapy and Nature/Apiterapi ve Doğa Dergisi*, c. 1, sayı 3, ss. 51-51, 2018.
- [106] M. Iqbal, T. P. Fan, D. Watson, S. Alenezi, K. Saleh ve M. Sahlan, “Preliminary studies: the potential anti-angiogenic activities of two Sulawesi Island (Indonesia) propolis and their chemical characterization,” *Heliyon*, c. 5, sayı 7, ss. 1-12, 2019.
- [107] U. C. Yilmaz, B. G. Bagca, E. Karaca, A. Durmaz, B. Durmaz, A. Aykut, H. Kayalar, C. B. Avcı, S. Yilmaz Susluer, C. Gunduz ve O. Cogulu, “Evaluation of the miRNA profiling and effectiveness of the propolis on B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, c. 84, ss. 1266-1273, 2016.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hava KAMUK
Doğum Tarihi ve Yeri : 12.05.1994 / Düzce-Merkez
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : havakamuk@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya Bölümü	Düzce Üniversitesi	2020
Lisans	Kimya Bölümü	İstanbul Üniversitesi	2017
Lise	Sayısal	Düzce Lisesi	2012

YAYINLAR

H. Kamuk, E. S. Düvenci, B. Karadeniz, A. F. Ağan, P. A. Yoldaş ve H. İ. Uğraş, “Düzce yöresine ait propolislerden hazırlanan ekstraktların bazı kimyasal ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi,” *İleri Teknoloji Bilimleri Dergisi*, Basımda.