



**TÜRK PROPOLİSİNİN HİSTON DEASETİLAZ (HDAC)
ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Meleknur BAŞAR
1198210104**

**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Türker BİLGİN**

Tez No: 2021/110

2021 – TEKİRDAĞ

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRK PROPOLİSİNİN HİSTON DEASETİLAZ (HDAC) ENZİM
AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Meleknur BAŞAR

1198210104

BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Türker BİLGİN

Bu Tez Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından NKUBAP.23.YL.21.294 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2021/110

2021-TEKİRDAĞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde ve yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve deneyimleri ile daima beni yönlendiren, meslek etiğinin yanı sıra insani ve ahlaki değerlerini örnek aldığım, bana her zaman destek olan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Türker BİLGEN'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bize her zaman ilgi ile yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN' a, Dr. Öğr. Üyesi Çağlar DOĞRUEK' e ve Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BOZKIR' a,

Laboratuvar çalışmalarım süresince hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, değerli bilgilerini benimle paylaşan sayın Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN'e ve doktora öğrencisi Hande AKALAN'a,

Verilerin değerlendirilmesi sürecinde değerli yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Sümeyye BORA'ya,

Yüksek lisans eğitimimde yollarımız kesiştiği için mutluluk duyduğum ve dostluklarının yanı sıra tez sürecimde daima yardımları ile bana destek olan sevgili arkadaşlarım Dyt. Aylin BÜLBÜL ve Arş. Gör. Rümeyya ÖZÇALKAP'a,

Her koşulda yanımda olup desteğiyle beni yalnız bırakmayan Melik DEMİRKOPARAN'a,

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan, eğitim hayatım boyunca daima bana güvenen, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım annem, babam ve abime,

En içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (NKUBAP.23.YL.21.294).

ÖZET

Başar M. Türk Propolisinin Histon Deasetilaz (HDAC) Enzim Aktivitesine Etkisinin Araştırılması, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2021. Bireylerin beslenme ve yaşam tarzı çeşitli epigenetik değişikliklere neden olarak vücudun fizyolojik ve patolojik süreçlerini etkileyebilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli besin ve besin bileşenlerinin histon deasetilaz (HDAC) enzim aktivitesini baskıladığına dair güçlü kanıtlar bulunmuştur. Tez çalışmamız kapsamında çeşitli farmakolojik etkilere sahip Türk propolisinin (TP) HEK293T ve HeLa hücre hatlarında HDAC aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, Türkiye’de piyasadan toplanan ticari formda, saflaştırılmış 2 farklı propolisin suda çözünen formları kullanılmıştır. HEK293T ve HeLa hücrelerinde HDAC aktivitesinin tespiti için öncelikle TP’nin uygulanması planlanan LD50 konsantrasyonları tripan mavisi boyama yöntemi ile belirlenmiştir. NETN lizis yöntemi ile elde edilen hücresel lizatların protein miktar tayininde Bradford yöntemi kullanılmıştır. *In vitro* koşullarda Propolis-1’in, LD50 dozu ile hem 24 saatlik muamelesinin hem de doğrudan hücresel lizatlarla muamelesinin, HEK293T ve HeLa hücrelerindeki HDAC aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Propolis-2’nin doğrudan muamelesi bilgi verici olmamakla birlikte, 24 saatlik uygulaması ise normal hücrede (HEK293T) HDAC aktivitesini düşürürken kanser hücresinde (HeLa) HDAC aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen veriler ışığında TP’nin bir normal hücre hattı olan HEK293T hücrelerinde doğrudan ve dolaylı mekanizmalarla HDACi etkisi olduğu, bir kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde ise HDAC aktivitesi üzerindeki etkisinin çelişkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Türk Propolisi, HDACi, Epigenetik, Fonksiyonel Besin.

ABSTRACT

Basar M. Investigation of the Effect of Turkish Propolis on Histone Deacetylase (HDAC) Enzyme Activity, Tekirdag Namık Kemal University, Institute of Health Science, Department of Nutrition and Dietetic, Master in Science Thesis, Tekirdag, 2021. Nutrition and lifestyle can affect the physiological and pathological processes of the body by causing various epigenetic changes. Strong evidences on various foods and nutritional components suppress histone deacetylase (HDAC) enzyme activity have been found in recent studies. In our thesis study, the effects of Turkish propolis, which has various pharmacological effects, on HDAC activity in HEK293T and HeLa cell lines were investigated. Water-soluble forms of two different purified propolis in commercial form collected from the market in Turkey were used in the study. In order to detect the HDAC activity in HEK293T and HeLa cells, LD50 concentrations, which were planned to be applied for the TP, were determined by trypan blue staining method. Bradford method has been used for protein quantification of cellular lysates prepared by NETN lysis method. It has been determined that both 24-hours treatment and direct treatment of cellular lysates with the Turkish Propolis-1 with the LD50 concentration reduced HDAC activity in HEK293T and HeLa cells in *in vitro* conditions. Although the results of the cellular lysates treated directly with the Propolis-2 is not informative, the of 24-hours treatment has shown decreasing HDAC activity in normal cell (HEK293T) while increasing HDAC activity in cancer cell (HeLa). Our results show that the TP has HDACi effect in HEK293T cells, a normal cell line, by direct and indirect mechanisms, whereas the findings of HDAC activity in HeLa cells, a cancer cell line, are contradictory.

Key words: Turkish Propolis, HDACi, Epigenetic, Functional Food.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Propolisin Tanımı ve Tarihçesi	3
2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	4
2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği.....	4
2.1.3. Propolisin Coğrafik Kökeni	5
2.1.4. Türk Propolisinin Özellikleri	6
2.1.5. Propolisin Farmakolojik ve Biyoaktif Özellikleri.....	7
2.2. Epigenetik ve Kanser	11
2.2.1. Histon Deasetilaz Enzimleri.....	13
2.2.2. Histon Deasetilaz İnhibitörleri ve Etki Mekanizması	14
2.2.3. Doğal HDAC İnhibitörleri	18
2.2.4. Propolisin HDAC İnhibitör Etkisi.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Hücre Kültürü.....	24
3.2. Kullanılan Propolis Ekstrelerinin Özellikleri.....	25
3.3. Hücre Soylarının Eldesi ve Kültürü	27

3.4. Propolis Ekstrelerinin Hazırlanması	27
3.5. Propolislerin LD50 Değerlerinin Belirlenmesi	28
3.5.1. Kullanılan Malzemeler	28
3.5.2. Uygulanan İşlemler	28
3.5.3. Tripan Mavisini Boyama Prosedürü	29
3.6. Hücresel Lizat Eldesi	30
3.6.1. Kullanılan Malzemeler	30
3.6.2. Kullanılan Solüsyonlar ve İçerikleri	31
3.6.3. Deneyin Yapılışı	32
3.7. Protein Miktar Tayini	33
3.7.1. Kullanılan Malzemeler	33
3.7.2. Bradford Protein Test Kiti Uygulama Protokolü	33
3.8. HDAC Aktivitesinin Tayini	34
3.8.1. Kullanılan Malzemeler	34
3.8.2. Kolorimetrik HDAC Aktivite Test Kiti Uygulama Protokolü	34
3.9. İstatistiksel Yöntemler	35
4. BULGULAR	36
4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	36
4.2. Propolisin Hücre Canlılığına Etkisi ve LD50 Dozlarının Belirlenmesi	36
4.3. Hücre Lizatlarında Protein Tayini	39
4.4. TP'nin HDAC Aktivitesine Etkisi	39
4.4.1. HEK293T Hücrelerinde TP'nin HDAC Aktivitesine Etkisi	39
4.4.2. HeLa Hücrelerinde TP'nin HDAC Aktivitesine Etkisi	42
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

AML	Akut Miyeloid Lösemi
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
Bax	Bcl-2 ile İlişkili X Proteini
BPE	Brezilya Propolis Ekstresi
BSA	Sığır Serum Albumin
CAPE	Kafeik Asit Fenetil Ester
CO ₂	Karbondioksit
COX	Siklooksijenaz
CTCL	Kutanöz T Hücreli Lenfoma
DADS	Diallil Disülfür
ddH ₂ O	Distile Su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HAT	Histon Asetiltransferaz
HDAC	Histon Deasetilaz
HDACi	Histon Deasetilaz İnhibitörü

HEK293T	İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı
HeLa	İnsan Serviks Kanseri Hücre Hattı
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IL	İnterlökin
KCl	Potasyum Klorür
kg	Kilogram
LD50	Ortalama Öldürücü Doz
MCF-7	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
Na_2HPO_4	Disodyum Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NAD^+	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NaH_2PO_4	Monosodyum Fosfat
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
nm	Nanometre
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
OD	Optik Dansite
PBS	Fosfat Tamponlu Salin

PGE2	Prostaglandin
PTCL	Periferik T Hücre Lenfoma
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SFN	Sülforofan
sPLA2	Sekretuar Fosfolipaz A2
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TP	Türk Propolisi
TSA	Trikostatin A
VPA	Valproik Asit
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Oksidatif stres durumunda ROS oluşumunu, NF- κ B aktivasyonunu, redoks durumunu ve gen ekspresyonunu gösteren sinyal iletim yolları.....	9
Şekil 2.2. Histon asetilasyonunun HAT'lar ve HDAC'lar tarafından düzenlenmesi. ...	12
Şekil 2.3. Histon deasetilaz inhibitörleri tarafından aktive edilen çoklu antitümör yolları.....	15
Şekil 2.4. Çeşitli histon deasetilaz inhibitörlerinin kimyasal yapısı.	16
Şekil 2.5. Doğal HDAC inhibitörlerinden bazıları ve kaynakları.....	19
Şekil 3.1. Tripan mavisi boyama prosedürü.	29
Şekil 4.1. HeLa ve HEK293T hücrelerinin inverted mikroskopta genel görünümü (100X).	36
Şekil 4.2. Tripan mavisi boyaması sonrası Hemositometre ile yapılan hücre sayımı.	37
Şekil 4.3. HEK293T hücrelerinde Propolis-1 ve Propolis-2'nin LD50 dozlarının hesaplanması.	38
Şekil 4.4. HeLa hücrelerinde Propolis-1 ve Propolis-2'nin LD50 dozlarının hesaplanması.	38
Şekil 4.5. BSA ile Hazırlanan Protein Standart Grafiği.....	39
Şekil 4.6. HEK293T hücrelerindeki HDAC aktivitesinin farklı uygulamalar arasında karşılaştırılması.	40
Şekil 4.7. HeLa hücrelerindeki HDAC aktivitesinin oransal olarak karşılaştırılması.	43

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Propoliste bulunan ana bileşenler.	5
Tablo 2.2. Histon deasetilazların özellikleri.	13
Tablo 3.1. Propolis-1 ekstresinin içeriği.	25
Tablo 3.2. Propolis-2 ekstresinin içeriği.	26
Tablo 3.3. NETN lizis tamponu içeriği.	31
Tablo 3.4. Kullanılan NETN lizis tamponu inhibitörleri.	31
Tablo 3.5. PBS tamponu içeriği.	31
Tablo 4.1. HeLa ve HEK293T Hücrelerde Propolis-1 ve Propolis-2 için belirlenen LD50 konsantrasyonları.	37
Tablo 4.2. HEK-293T hücrelerindeki HDAC aktivitesini yansıtan OD değerleri.	41
Tablo 4.3. HEK293T hücrelerinde propolis müdahalelerinin HDAC aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.	41
Tablo 4.4. HeLa hücrelerindeki HDAC aktivitesini yansıtan OD değerleri.	43
Tablo 4.5. HeLa hücrelerinde propolis müdahalelerinin HDAC aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.	44

1. GİRİŞ

Beslenme, epigenetik değişiklikler aracılığı ile gen ekspresyonlarını düzenlemesinin yanı sıra kanser de dâhil olmak üzere çeşitli hastalıklara olan yatkınlık risklerini etkileyebilmektedir (Andreescu ve diğ. 2018). Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesinin düzenlenmesidir (Khan ve La Thangue 2012). Başlıca epigenetik değişiklikler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve ncRNA aracılı kromatin yeniden yapılanmasıdır. Tersinir bir posttranslasyonel modifikasyon olan histon asetilasyonu, histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri arasındaki denge ile kontrol edilir ve kromatinin yapısında, fonksiyonunda ve ökaryotik gen ekspresyonunu düzenlemede önemli bir role sahiptir (Sanaei ve Kavooosi 2019). HDAC'lar, asetil gruplarını histonlardan ayıran ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir grup enzimden oluşmaktadır (Mottamal ve diğ. 2015). HDAC enzimlerini inhibe edebilen doğal ve sentetik bileşikler ise HDAC inhibitörleri olarak tanımlanmaktadır. HDACi'lerin tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunu değiştirebildiği, apoptozu artırabildiği ve böylece kansere karşı koruyucu bir role sahip olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Sanaei ve Kavooosi 2019). Son yıllarda, meyve ve sebzelerin, diyet liflerinin, bazı yağ asitlerinin ve mikro besin öğelerinin, HDAC aktivitesini baskıladığına dair güçlü kanıtlar bulunmuştur (Bassett & Barnett, 2014).

Propolis, bal arıları tarafından üretilen ve 300'den fazla kimyasal bileşiğe sahip, reçine benzeri yapıda doğal bir üründür (Krell 1996). Yüzyıllar boyunca farklı toplumlar tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan propolis, günümüzde ise kanıtlanan kimyasal özellikleri ve biyolojik aktivitesi sayesinde modern tıpta yerini almaktadır. Propolisin antimikrobiyal (Uzel ve diğ. 2005), antifungal (Silici ve diğ. 2005), antibakteriyel (Temiz ve diğ. 2011), antiprotozoal (Salomao ve diğ. 2011), antitümör (Burdock ve diğ. 1998), immünomodülatör (Sforcin 2007), hepatoprotektif (Banskota ve diğ. 2001) ve kardiyoprotektif (Daleprane ve diğ. 2012) etkileri çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir.

Propolisin farmakolojik olarak etkili olmasının temel nedeni birçok ilacın aktif maddesi olan; flavonoidler, fenolik asitler ve esterler, terpenoidler, b-steroidler,

lignanlar, aromatik aldehitler gibi biyoaktif fitokimyasal bileşenleri içeriğinde bulundurmasıdır (Banskota ve diğ. 2001).

Yapılan klinik öncesi çalışmalar ile propolisin antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitesi sayesinde kalp hastalıkları, diyabet, hipertansiyon ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar dâhil olmak üzere çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde destekleyici olduğu gösterilmiştir (Braakhuis 2019). Ayrıca propolisin en fazla araştırılan bileşiklerinden CAPE ve krisinin, hücre bölünmesi ve hücre büyümesini inhibe ederek veya apoptozu indükleyerek kanser hücrelerine karşı sitotoksik özelliklere sahip olabileceği çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (Sawicka ve diğ. 2012). Antikanser etkinin altında yatan mekanizmalar incelendiğinde propolisin çeşitli kanser hücre hatlarında uygulanmasının HDAC inhibisyonu aracılığı ile etki gösterdiği tespit edilmiştir (Sun ve diğ. 2012; Ishiai ve diğ. 2014; Pal-Bhadra ve diğ. 2012; Omene ve diğ. 2013; Huang ve diğ. 2011).

Yapılan kapsamlı literatür taraması sonucunda Türk propolisinin HDAC inhibitör etkisinin daha önce hiç araştırılmamış olduğu ve literatürde doldurulması gereken boşluklardan biri olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması, farklı kanser hücre hatlarında antikanser özelliği kanıtlanmış fonksiyonel bir gıda olan Türk propolisinin, normal insan embriyonik böbrek (HEK293T) hücre hattı ve insan serviks kanseri (HeLa) hücre hattında HDAC aktivitesine etkisinin tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Böylelikle besin kaynaklı HDAC inhibitörleri portföyüne yeni bir gıda maddesi eklenmesini sağlamanın yanı sıra Türk propolisinin biyolojik bir özelliğinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Propolisin Tanımı ve Tarihçesi

Propolis, bal arılarının (*Apis mellifera* L.) ağaçların kozalak ve kabuklarından, bitki tomurcuklarından ve filizlerinden topladığı çeşitli polenlerin, özel reçine ve mumsu maddelerin ve yağların karışımından oluşan güçlü antiviral, antibakteriyel ve antioksidan etkiye sahip doğal bir arı ürünüdür. Arılar tarafından kovana yapıştırılan propolis balmumu ile karıştırılır, kovan yüzeyi propolis ile kaplanır (Chen ve diğ. 2018). Propolis, kovanda bulunan delik ve çatlaklarının kapatılmasında ve ısı yalıtımını sağlamada kullanılır, böylece kovan içi sıcaklık ve nem sabit tutulur. Ayrıca peteklerin tamirinde, birleştirilmesinde ve kovan girişinin daraltılmasında görev alır (Banskota ve diğ. 2001). Bu sayede kovanda bulunan arı kolonisini diğer böceklere ve bakteri, mantar ve virüs gibi mikroorganizmalara karşı koruma işlevi görmektedir (Rufatto ve diğ. 2017). Propolis temel olarak kovanın korunmasında görev alması nedeniyle Antik Yunan'da ön veya giriş anlamındaki "pro" ve topluluk veya şehir anlamındaki "polis" kelimelerinden meydana gelmektedir (Bankova ve diğ. 2000).

Ham propolis bileşimi yaklaşık olarak %50-55 bitkisel reçine, %30 balmumu, %5-10 uçucu yağlar, %5 polen ve diğer organik bileşiklerden oluşmaktadır (Marcucci 1995). Yüzyıllar boyunca farklı toplumlar tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Propolis, Yunanlılar ve Romalılar tarafından enfeksiyon hastalıklarında ve yaraları iyileştirmede kullanılmıştır. Mısırlılar tarafından ölüleri mumyalamada kullanılırken, İnkalar tarafından ateş düşürücü olarak kullanılmıştır. 17. ve 20. yüzyıllar arasında antibakteriyel özellikleri nedeniyle propolisin Avrupa'da kullanımı yaygınlaşmıştır. 17. yüzyılda Londra farmakopesi tarafından propolis resmi ilaç listelerine dâhil etmiştir (Fokt ve diğ. 2010). İkinci Dünya Savaşı döneminde propolis antimikrobiyal ve antienflamatuar bir ajan olarak kullanılmıştır (Ghisalberti 1979; Castaldo ve Capasso 2002; Franchin ve diğ. 2018).

Günümüzde ise yapılan çalışmalar ile kimyasal özellikleri ve biyolojik aktivitesi kanıtlanan propolisin modern tıpta kullanımı yaygınlaşmıştır. Birçok

hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde propolis kullanımının etkileri günümüz çalışmalarına konu olmaktadır.

2.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolisin kendine özgü keskin bir kokusu vardır ve oda sıcaklığında esnek, yapışkan ve yumuşak bir yapıdadır. 15°C'nin altındaki sıcaklıklarda sert, kırılabilir ve kısmen donuk halde bulunur. 45 °C üzerindeki sıcaklıklarda ise yapışkan özelliği artar ve 60°C üzerindeki sıcaklıklarda sıvı halde bulunur (Doğan ve Hayoğlu 2012).

Propolis reçineli ve sert bir yapıya sahip olduğundan kovandan çıkarıldığı ham hali çoğu zaman kullanıma uygun değildir. Genellikle herhangi bir çözücü içerisinde (su, etanol, aseton, metanol, eter vb.) ekstrakte edilerek kullanıma uygun hale gelir. Propolis özütünün etanol veya su gibi farklı çözücüler ile hazırlanması durumlarında bile besin bileşen profili değişmektedir (Braakhuis 2019).

2.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Propolisin içeriğine bakıldığında, 300'den fazla kimyasal bileşik, 20' den fazla mineral madde, balmumu, reçine ve polen bulunmaktadır. Propolis yaklaşık olarak %45-55 bitkisel reçine, %25-30 balmumu, %5-10 esansiyel (uçucu) yağlar, %5 polen ve diğer organik bileşiklerden oluşmaktadır (Krell 1996).

Propolisin içeriğinde; fenolik asitler, flavonoidler, esterler, diterpenler, lignanlar, aromatik aldehytlar, alkoller, amino asitler, yağ asitleri, şekerler, şeker alkolleri, vitaminler ve mineraller bulunur (Batista ve diğ. 2012). Propoliste bulunan ana bileşenler Tablo 2.1'de ayrıntılı olarak gösterilmektedir. Bugüne kadar propolisin biyolojik aktivitesi binlerce bilimsel makalede kapsamlı bir şekilde ele alınmıştır.

Propolisin farmakolojik olarak etkili olmasının temel nedeni birçok ilacın aktif maddesi olan; flavonoidler, fenolik asitler ve esterler, terpenoidler, b-steroidler, lignanlar, aromatik aldehytlar gibi biyoaktif fitokimyasal bileşenleri içeriğinde bulundurmasıdır (Banskota ve diğ. 2001).

Propolisin kimyasal özellikleri ve içeriğindeki bileşenler, botanik kökeninin bulunduğu bölgeye, arıların bitki tercihlerine ve toplama mevsimine göre

değişebilmektedir (Braakhuis 2019). Bu nedenle yapılan çalışmalarda kullanılan propolisin türüne göre çalışma sonuçlarında farklılıklar gözlemlenebilmektedir (Bankova ve diğ. 2005).

Tablo 2.1. Propoliste bulunan ana bileşenler. De Groot (2013)'den alınmıştır.

Ana bileşenler

Flavonoidler, flavanonlar, flavonlar ve flavonoller

Apigenin, luteolin, krisin, kuersetin, kaempferol, galangin, naringin, pinosembrin, hesperedin, pinobanksin, rutin

Fenolik Asitler ve Esterleri

Sinnamik asit, ferulik asit, p-kumarik asit, artepillin c, kafeik asit, kafeik asit fenetil ester (CAPE), benzoik asit, salisilik asit, gentisik asit, gallik asit.

Vitaminler

B1, B2, B6, C, E

Mineraller

Al, Si, Mn, C, Na, Mg, Cu, Ca, Zn, Fe, K

Terpen, Sekuterpen ve Türevler

Aminoasitler

Şekerler ve türevleri

Alkoller, ketonlar ve fenoller

Steroller ve steroid hidrokarbonlar

Yağ Asitleri

2.1.3. Propolisin Coğrafik Kökeni

Propolis, farklı coğrafik özelliklere sahip Arjantin, Brezilya, Çin, Yeni Zelanda, Güney Afrika, Tayvan, Ukrayna, Amerika Birleşik Devletleri ve Özbekistan gibi çeşitli ülkelerde yaygın bulunmaktadır. Rengi yeşil, kırmızı, sarı ya da koyu kahverengi olmakla birlikte toplandığı bölgeye, bitki kaynaklarına ve iklime göre değişmektedir (Anjum ve diğ. 2018).

Bal arıları (*Apis mellifera* L.) propolisinin yapımında kaynak olarak; kavak, çam, söğüt, ökaliptus, köknar, meşe, erik, akçaağaç, kızılbaş, huş, at kestanesi, dişbudak ve ıhlamur gibi bitkileri kullanmaktadır (Yücel ve diğ. 2014). Propolislerin bitki kaynaklarını tespit etmek için, bölgeye ait propolis kaynağı olabilecek bitki salgıları gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi kromatografik yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir.

Avrupa, Güney Amerika, Kuzey Amerika ve Batı Asya bölgelerinden toplanan propolisinin bitkisel kaynağı kavak ağacı (*Populus nigra*) olarak tespit edilmiştir (König 1985). Rusya'dan toplanan huş ağacı propolisinin bitki kaynağı *Betula verrucosa*'dır ve kavak propolisinden farklı türde flavonoller ve flavonlar içermektedir. Brezilya propolisinin ana kaynağı ise *Baccharis dracunculifolia* yaprak reçinesidir; içeriğinde kavak propolisinden farklı flavonoidler, diterpenler, lignanlar ve p-kumarik asit türevleri gibi bileşenler bulunmaktadır. Brezilya propolisi, CAPE'ye (kafeik asit fenetil ester) kıyasla yüksek oranda artepillin C içermektedir (Chan ve diğ. 2013; Ferreira ve diğ. 2017). Küba propolisinin ana kaynağı *Clusia rosea*'dır ve hem Avrupa hem de Brezilya propolisinden farklı olan poliizoprenile benzofenon içermektedir (Awale ve diğ. 2008; Bankova ve diğ. 2000).

2.1.4. Türk Propolisinin Özellikleri

Türk propolisinin (TP) kimyasal bileşimi, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan örneklerle birçok farklı çalışmada incelenmiştir. Türk propolisinde en çok bulunan flavonoidler; kuersetin, rutin, krisin, pinosembrin, pinostrobin kalkon, pinobanksin ve türevleridir (Çelemler ve diğ. 2013; Mercan ve diğ. 2006; Uzel ve diğ. 2005). Yapılan farklı çalışmalarla Türk propolisinin yaygın olarak kavak propolisi özelliği gösterdiği tespit edilmiştir (Popova ve diğ. 2005; Silici ve diğ. 2007; Velikova ve diğ. 2000).

Erdoğan ve diğ. (2011) tarafından Anadolu propolisinin analiz edildiği çalışmada, gallokateşin, epigallokateşin ve mirisetin gibi farklı flavonoidler de tespit edilmiştir. Propolisinin kimyasal bileşimini belirlemek amacıyla farklı analiz yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, Türk propolisinin fenolik asitler

bakımından (özellikle p-kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit ve kafeik asit) zengin içeriğe sahip olduğu bildirilmiştir (El-Guendouz ve diğ. 2019). Türk propolisinde bulunan terpenlerin miktarı %0,15 ile %27,47 arasında değişebilmektedir (Çelemlı ve diğ. 2013; Popova ve diğ. 2005; Sorkun ve diğ. 2001). Ege Bölgesi'ndeki propolisin nispeten yüksek miktarlarda diterpen içerdiği Çelemlı ve ark. (2013) tarafından bildirilmiştir. Çetin ve diğ. (2010) Kayseri bölgesinden toplanan propoliste sinnamik asit ve esterlerinin yüksek miktarda bulunduğunu bildirmişlerdir. Bayram ve diğ. (2018) tarafından yürütülen çalışmada Hakkâri ve civarından toplanan propoliste 26 farklı kumarin tespit edilmiştir.

2.1.5. Propolisin Farmakolojik ve Biyoaktif Özellikleri

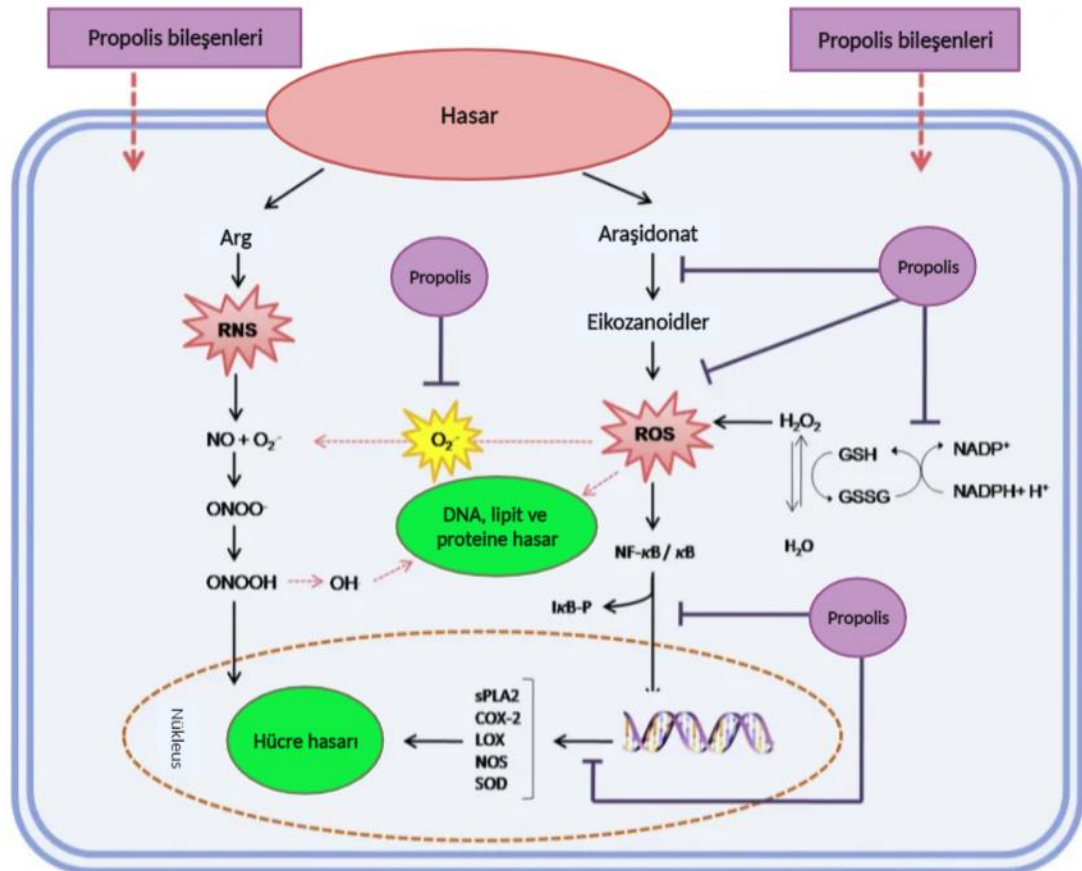
Günümüzde kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, Tip 2 diyabet ve kanser gibi birçok hastalığın oluşumunda oksidatif stres rol oynamaktadır. Son yıllarda bu hastalıkların tedavisinde ilaçların yanı sıra antioksidan etkiye sahip doğal ürünler araştırılmaktadır. Propolisin içeriğinde bulunan polifenollerin ve flavonoidlerin serbest radikalleri ortadan kaldırarak antioksidan etki gösterdiği pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır (Cao ve diğ. 2017; Nakanishi ve diğ. 2003).

Merkezi sinir sisteminin en önemli organı olan beyinde oksidatif stres ciddi hasarlara neden olur ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Propolis ve bileşeni kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) radyasyona maruz bırakılan sıçanların beyin dokusu üzerindeki antioksidan etkilerini inceleyen bir çalışmanın sonuçlarına göre; propolis, lipid peroksidasyon oluşumunu azaltır, süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesini artırır ve serbest radikal oluşumunu baskılayarak beyindeki oksidatif stresi önlemektedir (Alkis ve diğ. 2015).

Propolisin antienflamatuar aktivitesinin temel mekanizmalarına bakıldığında;

- Siklooksijenazın (COX) inhibisyonu ve bunun sonucunda prostaglandin (PGE2) biyosentezinin inhibisyonu,
- Serbest radikalleri ortadan kaldırılması,
- Nitrik oksit sentezinin engellenmesi,
- Enflamatuar sitokinlerin konsantrasyonunda azalma,
- İmmünoşpresif aktivitesidir (Araujo ve diğ. 2012).

Doğrudan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi bağışıklık hücrelerine zarar verebilir, hücresel bileşenlere saldırabilir ve DNA'da hasara neden olabilir. ROS, çekirdekte nükleer faktör- κ B (NF- κ B) translokasyonunu uyarır ve sekretuar fosfolipaz A2 (sPLA2), siklooksijenaz-2 (COX-2), nitrik oksit sentaz (NOS), ve sitokinlerin (TNF- α ve IL-1 β) transkripsiyonuna neden olur. Sonuçta artan enflamasyon ile doku hasarının iyileşme süreçleri uzar (Farooqui 2010). Propolis, serbest radikalleri dokulardan uzaklaştırabilen polifenoller ve flavonoidler içerir (Ramos ve Miranda 2007). Propoliste flavonoidlerin özellikle galangin ve kuersetin varlığı COX ve lipooksijenaz enzim sentezini engeller ve PGE2 ve COX-2 ekspresyonunu azaltır. Propolis NF- κ B aktivasyonunu baskılayarak, antiinflamatuvar etki göstermektedir (Farooqui 2010). Oksidatif stres sırasında propolis aracılı koruyucu etkinin moleküler mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmektedir (Oryan ve diğ. 2018).



Şekil 2.1. Oksidatif stres durumunda ROS oluşumunu, NF-κB aktivasyonunu, redoks durumunu ve gen ekspresyonunu gösteren sinyal iletim yolları. Oryan ve diğ. (2018)'den uyarlanmıştır. Nitrik oksit sentaz (NOS); nitrik oksit (NO); peroksinitrit (OONO-); sitokinler, TNF-a ve IL-1B; indirgenmiş glutatyon (GSH); oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve hidrojen peroksit (H₂O₂), Nükleer faktör-κB (NF-κB).

Propolisin en kapsamlı çalışılan biyoaktif bileşenlerinden biri olan CAPE, lipid peroksidasyonunun son aşamalarında serbest radikal oluşumunun bir göstergesi olan plazmadaki Malondialdehit (MDA) seviyelerini düşürmektedir (Hoşnuter ve diğ. 2004). Ayrıca CAPE, yanık hastalarında plazma MDA, NO ve ksantin oksidaz aktivitesini azaltabildiğinden, propolisin yanık hastalarının tedavisinde de faydalı olabileceği düşünülmektedir (Oryan ve diğ. 2018).

Alzheimer riski taşıyan transgenik farelerde, propolisin biyoaktif bileşenlerinden pinokembrinin üç aylık tedavisinde bazı inflamatuvar belirteçlerde (TNF-α, IL-1 ve IL-6) anlamlı derecede azalmalar gösterilmiştir (Liu ve diğ. 2014).

Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı geliştirilen sıçan modelinde yapılan bir çalışmada, 200 mg/gün propolis uygulaması, TNF-α ve IL-6'yı azaltarak antienflamatuvar etki göstermiştir (Kismet ve diğ. 2017).

Ayrıca propolisin antimikrobiyal (Uzel ve diğ. 2005), antifungal (Silici ve diğ. 2005), antibakteriyel (Temiz ve diğ. 2011), antiprotozoal (Salomao ve diğ. 2011), antitümör (Burdock ve diğ. 1998), immünomodülatör (Sforcin 2007), hepatoprotektif (Banskota ve diğ. 2001) ve kardiyoprotektif (Daleprane ve diğ. 2012) etkileri çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Son yıllarda propolise olan ilginin artması ile daha farklı alanlarda da çalışmalar yapılmış ve propolisin deri hastalıkları, KBB enfeksiyonları, diş ve diş eti hastalıkları (Mahal ve diğ. 2013; Parolia ve diğ. 2010), mide ülseri ve reflü gibi sindirim sistemi rahatsızlıkları (Baltas ve diğ. 2016), bronşit gibi solunum sistemi enfeksiyonları ve kadın hastalıklarında (İmhof ve diğ. 2005) etkili olduğu gösterilmiştir (Yücel ve diğ. 2014). Propolisin sitotoksik, apoptotik, antiproliferatif ve antikanser aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalar özellikle son yıllarda artış göstermektedir (Aru ve diğ. 2019).

Yapılan klinik öncesi çalışmalar, propolisin antioksidan ve antienflamatuar aktivitesi sayesinde kalp hastalıkları, diyabet, hipertansiyon ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar dâhil olmak üzere çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde destekleyici olduğunu göstermiştir. Propolis, akut ve kronik inflamasyonda doğal bir antienflamatuar ajan olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Ancak propolisin sağlık üzerine etkileri konusunda daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Braakhuis 2019).

Propolisin Antikanser Aktivitesi

Propolisin en fazla araştırılan bileşiklerinden, CAPE ve krisinin, hücre bölünmesi ve hücre büyümesini inhibe ederek veya apoptozu indükleyerek kanser hücrelerine karşı sitotoksik özelliklere sahip olabileceği çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Sawicka ve diğ. 2012).

Türk propolisinin antikanser aktivitesini farklı kanser hücre hatları kullanarak değerlendiren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda insan prostat kanser hücre hattı (Barlak ve diğ. 2011), insan meme kanseri hücre hattı (Tartik ve diğ. 2016; Vatansver ve diğ. 2010) ve insan akciğer kanseri hücre hattı (Demir ve diğ. 2016) kullanarak Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan propolislerin antikanserojenik etkileri tespit edilmiştir.

Ozdal ve diğ. (2018) çalışmasında, Türk propolisi ekstraktlarının antiproliferatif ve proliferatif etkileri, iki farklı meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231, UACC-31999) ve iki normal hücre hattı (fibroblastlar ve fare mezenkimal kök hücre hatları) ile çalışılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, Türk propolisi, MDA-MB-231 ve UACC-31999 meme kanseri hücre hatlarında anlamlı derecede antiproliferatif etki göstermiştir. Ayrıca Türk propolisinin hem fibroblastlar hem de fare mezenkimal kök hücreleri üzerinde proliferatif etkisi bulunmuştur (Ozdal ve diğ. 2018).

Kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen ve normal hücrelere karşı toksik olmayan, doğal bir antikanser ajan olan TRAIL ile propolisin etanolik ekstraktı (EEP), HeLa kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin incelendiği çalışmada, 50 µg/mL EEP ve 100 ng/mL TRAIL'e maruziyetin ardından apoptotik hücre yüzdesi %71,10 ±1,16'ya yükselmiştir. Çalışma sonuçları propolisin kanser

hücrelerinde TRAIL'e bağlı sinyalleşme yoluyla apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir (Szlizka ve diğ. 2009).

Radyoterapi alan meme kanseri hastalarında propolis takviyesinin koruyucu etkisini değerlendirmek için yapılan bir klinik çalışmada bir grup kadın hastaya (n=45) sadece radyasyon tedavisi uygulanırken diğer gruba (n=45) radyasyon tedavisiyle birlikte propolis takviyesi verilmiştir (Ebeid ve diğ. 2016). Propolis takviyesi radyoterapiden önceki 10 gün, radyoterapi sırasında ve radyoterapiden sonraki 10 gün, günde 3 defa, 400 mg dozunda uygulanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre propolis, radyasyon tedavisi alan meme kanseri hastalarının periferik beyaz kan hücrelerinde radyasyona bağlı DNA hasarını önemli ölçüde azaltmıştır. Çalışma sonuçları, propolisin radyasyon kaynaklı hasara karşı olası koruyucu rolünü göstermektedir (Ebeid ve diğ. 2016).

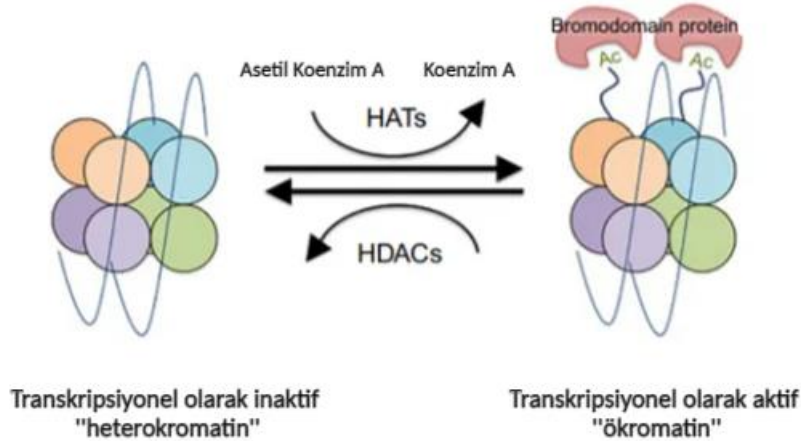
2.2. Epigenetik ve Kanser

Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın, DNA ile bağlantılı protein komplekslerinin posttranslasyonel modifikasyonları ile gen ifadesinin düzenlenmesidir (Khan ve La Thangue 2012). Bu değişiklikler hücreyi ya da organizmayı doğrudan etkilerken, DNA dizisinde hiçbir değişim gözlemlenmemektedir (Di Renzo ve diğ. 2019). İnsan vücudundaki biyolojik fonksiyonların düzenli olarak işleyebilmesi, genetik ve epigenetik mekanizmaların birbirleriyle etkileşimine bağlıdır. Bu iki sistem arasındaki dengenin bozulması pek çok hastalığın oluşumuna neden olabilmektedir. Histon asetilasyonu ve DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlar, tümör oluşumunda ve kanserin ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (Sanaei ve Kavooosi 2019).

Başlıca epigenetik değişiklikler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve ncRNA aracılı kromatin yeniden yapılanmasıdır. Histonlarda meydana gelen yaygın posttranslasyonel modifikasyonlar ise asetilasyon, fosforilasyon ve metilasyondur (Tercan Avcı 2010). Histon modifikasyonu, histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri arasındaki denge ile kontrol edilmektedir (Singh ve diğ. 2018).

Tersinir bir posttranslasyonel modifikasyon olan histon asetilasyonu, kromatinin yapısında, fonksiyonunda ve ökaryotik gen ekspresyonunu düzenlemede önemli bir role sahiptir (Sanaei ve Kavooosi 2019). Histon asetilasyonu HAT'lar ile gerçekleştirilirken, histon deasetilasyonu HDAC'lar ile gerçekleştirilmektedir.

HAT'lar, kofaktör asetil koenzim A'dan bir asetil parçasını transfer ederek histonlar içindeki spesifik lizin aminoasitlerinin asetilasyonunu katalize etmektedir (Lee ve Grant 2019). Histon proteinlerinin N terminalinde lizin rezidülerinin asetilasyonu pozitif yükleri ortadan kaldırır, böylece histonlar ve DNA arasındaki etkileşim azalır, transkripsiyonel açıdan aktif bir kromatin yapısı (ökromatin) oluşur. Asetilasyon sayesinde RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörlerinin promotör bölgeye erişimi kolaylaşır. Ancak HDAC'lar tarafından katalize edilen deasetilasyonda, kromatin yapı sıkışıp yoğunlaşır, transkripsiyonel açıdan inaktif bir kromatin yapısı (heterokromatin) oluşur. HDAC'lar gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olurlar (Suganuma ve Workman 2011). Histon asetilasyonunun HAT'lar ve HDAC'lar tarafından düzenlenmesi Şekil 2.2'de gösterilmektedir (Lee ve Grant 2019).



Şekil 2.2. Histon asetilasyonunun HAT'lar ve HDAC'lar tarafından düzenlenmesi. Lee ve Grant (2019)'dan uyarlanmıştır.

Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu, kromatin katlama, DNA hasarı onarımı ve transkripsiyon dâhil olmak üzere çeşitli hücrel işlemler için kritiktir. HAT ve HDAC enzimlerinin aktiviteleri arasındaki dengesizlik, çeşitli kanser türleri ile ilişkili bulunmuştur (Kumar ve diğ. 2015).

2.2.1. Histon Deasetilaz Enzimleri

Histon deasetilazlar (HDAC'lar), asetil gruplarını histonlardan ayıran ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir grup enzimden oluşmaktadır (Mottamal ve diğ. 2015).

HDAC ailesi insanda, 18 enzimin bulunduğu Zn^{+2} bağımlı (sınıf I, II ve IV) ve NAD^+ bağımlı (sınıf III) enzimlerden oluşmaktadır. Sınıf I, II ve IV, kofaktör olarak bir çinko molekülü gerektirirken, Sınıf III HDAC'lar Zn^{+2} bağımsızdır ve çinko yerine kofaktör olarak NAD^+ gerektirirler. Histon deasetilazların sınıflandırılması ve özellikleri Tablo 2.2'de verilmiştir (Peserico ve Simone 2010).

Tablo 2.2. Histon deasetilazların özellikleri. Peserico ve Simone (2010)'dan alınmıştır.

HDAC Sınıfı	Homo-loji (Maya)	Alt sınıf	Enzim (İnsan)	Kataliz mekanizması	Lokalizasyonu	
Sınıf I	Rpd3		HDAC1	Zn^{+2} iyon bağımlı	Nükleus	
			HDAC2			
			HDAC3			
			HDAC8			
Sınıf II	Hda1	Sınıf IIa	HDAC4	Zn^{+2} iyon bağımlı	Nükleus/	
			HDAC5			sitoplazma
			HDAC7			
			HDAC9			
		Sınıf IIb	HDAC6			
			HDAC10			
Sınıf III	Sir2, Hst1	I	SIRT1	NAD^+ bağımlı	Nükleus	
			SIRT2		Sitoplazma	

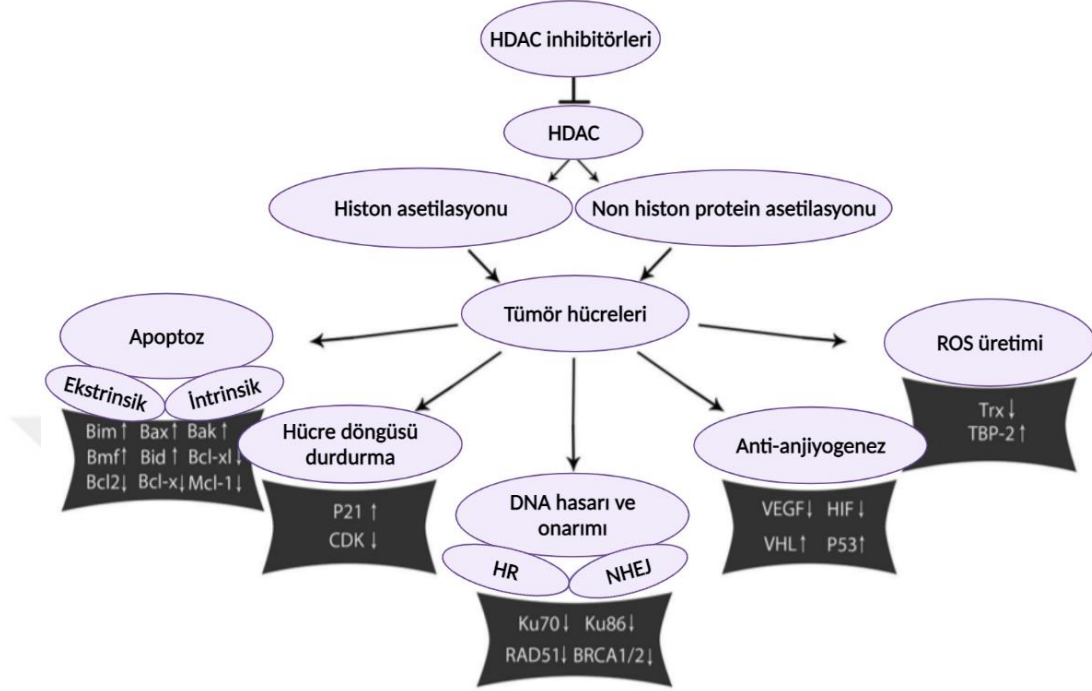
		SIRT3		Mitokondri
	II	SIRT4		Mitokondri
Hst2,	III	SIRT5		Mitokondri
Hst3	IV	SIRT6		Nükleus
Hst4		SIRT7		Nükleus
Sınıf IV	HOS3	HDAC11	Zn ⁺² iyon bağımlı	Nükleus

Yapılan son araştırmalarda, HDAC enzim disfonksiyonları ve değişen asetilasyon seviyeleri birçok kanser türüyle ilişkili bulunmuştur (Senese ve diğ. 2007). Hem hematolojik hem de solid kanserlerde HDAC ifadesinin arttığı bildirilmiştir. HDAC'lar karsinogenez ile ilişkili anormal epigenetik durumları tersine çevirme potansiyelleri nedeniyle terapötik hedefler haline gelmiştir (Sanaei ve Kavooosi 2019). HDAC enzimlerini inhibe edebilen doğal ve sentetik bileşikler tanımlanmıştır.

2.2.2. Histon Deasetilaz İnhibitörleri ve Etki Mekanizması

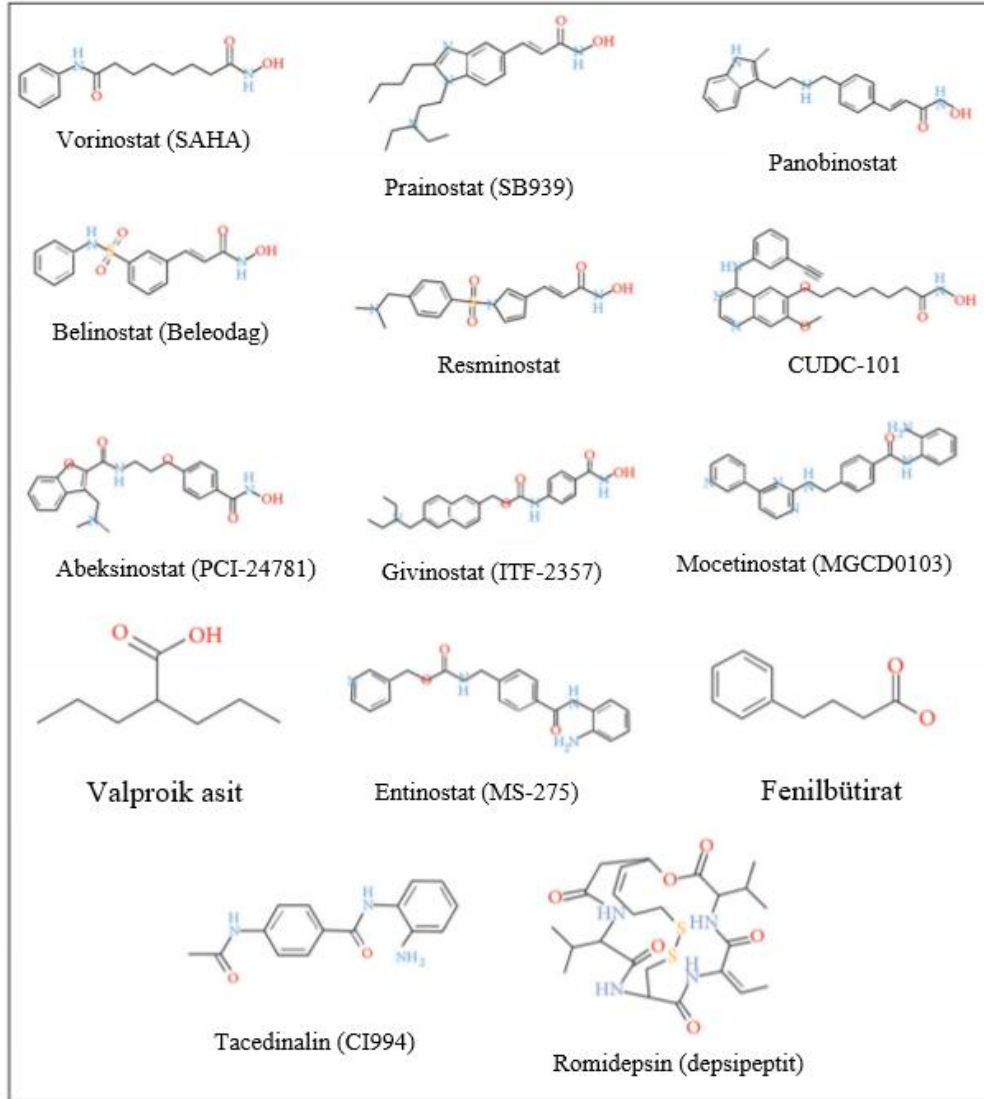
HDAC inhibitörleri (HDACi), hem doğal hem de sentetik bileşiklerden oluşmaktadır ve yapılarına göre kısa zincirli yağ asitleri, hidrokсамik asitler, benzamidler ve siklik peptidler olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (Brosch ve diğ. 2008). HDAC inhibitörlerinden ilk olarak n-bütirat, ardından trapoksin A ve trikostatın A (TSA) karakterize edilmiştir (Sanaei ve Kavooosi 2019).

Yapılan alışmalarda HDACi'lerin, kanser hücrelerinde hücre döngüsü durmasını aktive ederek, hücre farklılaşması, apoptoz ve otofajiyi indükleyerek antitümör etki gösterebildiği kanıtlanmıştır (Singh ve diğ. 2018). Ayrıca histon deasetilaz inhibitörleri, çekirdekte asetillenmiş histon seviyelerini arttırarak kanserli hücrede susturulan düzenleyici genlerin ekspresyonunu yeniden başlatır (Bassett ve Barnett 2014). HDACi'lerin kanser hücresi üzerinde çoklu etki mekanizmaları şekil 2.3'te gösterilmektedir (Sanaei ve Kavooosi 2019). HDACi'lerin antikanser etki mekanizması kanserin tipine, evresine, bireye ve diğer bazı faktörlere göre değişmektedir (Kretsovali ve diğ. 2012).



Şekil 2.3. Histon deasetilaz inhibitörleri tarafından aktive edilen çoklu antitümör yolları. Sanaei ve Kavooosi (2019)'dan uyarlanmıştır. Kanser hücrelerinde hücre döngüsünün durması, otofaji ve apoptoz indüksiyonu, DNA hasarı onarımı, ROS üretimi, anti-anjiyogenez etki ve mitotik hücre ölümü, kanser hücrelerinde HDACi'lerin etkisiyle aktive edilir.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından HDACi olarak vorinostat (SAHA), romidepsin, belinostat ve panobinostat bileşikleri sırasıyla 2006, 2009, 2014 ve 2015 yıllarında onaylanmıştır. FDA onaylı HDACi'ler, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Birden fazla doğal ve sentetik kökenli bileşiğin HDACi etkinliğinin ve yan etkilerinin değerlendirilmesi için de klinik araştırmalar sürdürülmektedir (Singh ve diğ. 2018). Çeşitli HDACi'lerin kimyasal yapısı Şekil 2.4'te yer almaktadır (Sanaei ve Kavooosi 2019).



Şekil 2.4. Çeşitli histon deasetilaz inhibitörlerinin kimyasal yapısı. Sanaei ve Kavosi (2019)'dan uyarlanmıştır.

Bütirik Asit

Bütirik asit 1978'de HDAC inhibitörü olarak keşfedilen ilk bileşiktir. Kalın bağırsakta diyet liflerinin fermentasyonu sırasında oluşan kısa zincirli bir yağ asidi olan bütirik asidin sınıf I ve sınıf IIa HDAC'ları inhibe ettiği tespit edilmiştir (Gallinari ve diğ. 2007).

Valproik Asit

Antikonvülsan ilaç olarak kullanılan valproik asit (VPA), bütirik aside benzer şekilde sınıf I ve sınıf IIa HDAC'ları yarışmalı olarak inhibe edebilmektedir. Her iki bileşiğin de HDAC inhibitör etkileri nispeten zayıf bulunmuştur (Folmer ve diğ. 2010).

Vorinostat (SAHA)

Vorinostat (SAHA), 2006'da FDA tarafından onaylanan ilk pan-HDAC inhibitörüdür. SAHA, tek başına veya paklitaksel ile kombine halde, kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL) da dâhil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Gallinari ve diğ. 2007). Vorinostatın düşük mikromolar konsantrasyonlarda çok çeşitli hücre hatlarında farklılaşmayı sağladığı, hücre büyümesini durdurduğu ve/veya apoptozu indüklediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Vorinostat, nanomolar konsantrasyonlarda hem sınıf I HDAC hem de sınıf II HDAC'ları inhibe edebilmektedir (Kelly ve Marks 2005).

Romidepsin

Siklik tetrapeptid türevi romidepsin, periferik T hücre lenfoma (PTCL) tedavisi için 2009 yılında, kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL) tedavisi için 2011 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Basset ve Barnett 2014). *Chromobacterium violaceum* bakterisinden elde edilen romidepsin (depsipeptit) yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonları (IC50) sırasıyla HDAC1 (IC50 = 36 nM), HDAC2 (IC50 = 47 nM) ve HDAC4 (IC50 = 510 nM) olan sınıf I HDAC'ların güçlü ve seçici inhibitörüdür (Furumai ve diğ. 2001). Romidepsinin hücre döngüsü ve kromatin yapısı üzerinde etkiye sahip olduğu ve asetillenmiş histonların birikimine neden olduğu gösterilmiştir (Whittaker ve diğ. 2006).

Belinostat

Hidroksamat türevi belinostat, 2014 yılında periferik T hücre lenfoma (PTCL) tedavisi için FDA onayı almıştır. Sınıf I ve II HDAC'ların aktivitesini inhibe edici etkiye sahiptir. Günümüzde belinostatın, kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL), multipl miyelom ve fallop tüpü kanseri dâhil solid tümörlerin tedavisinde etkinliği 15'ten fazla klinik çalışmada araştırılmaktadır (Losson ve diğ. 2016).

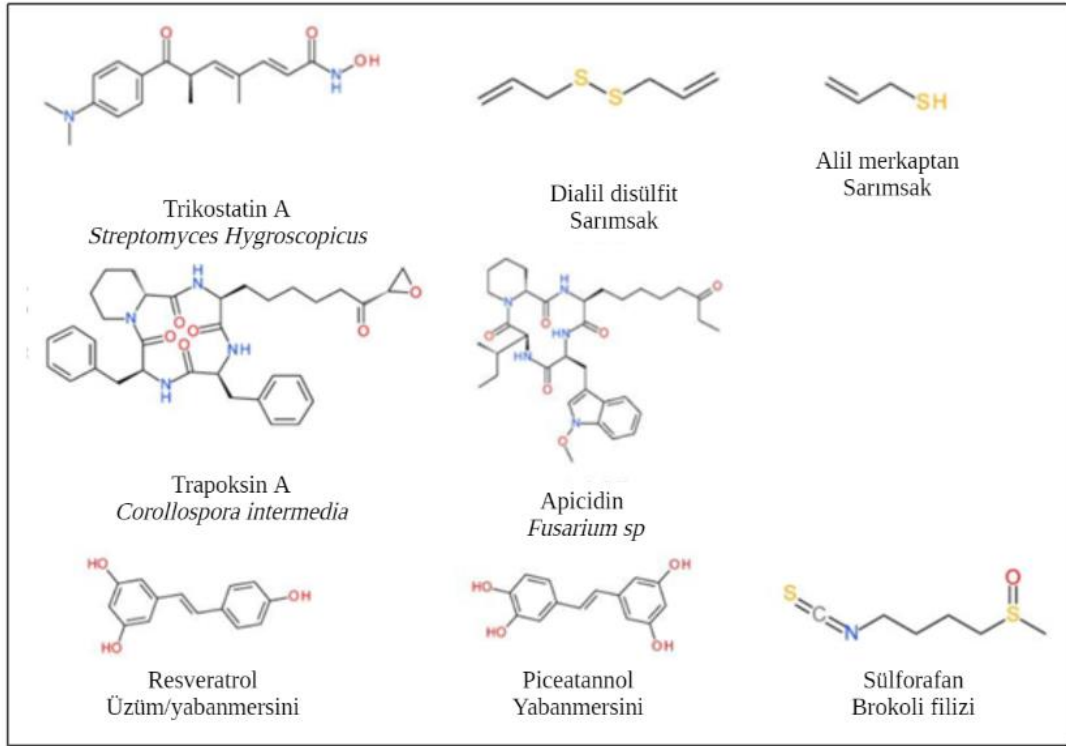
Panobinostat

Panobinostat, sınıf I, II ve IV HDAC'lar için inhibitör etkiye sahip bir hidroksamat türevidir. 2015 yılında multipl miyelomların tedavisi için FDA tarafından onay almıştır (Singh ve diğ. 2018). Panobinostat, kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL), akut miyeloid lösemi (AML), tiroid karsinomu, Hodgkin lenfoma, kolorektal ve prostat kanserleri gibi çeşitli kanser türlerini tedavisinde kullanılmaktadır (Losson ve diğ. 2016).

2.2.3. Doğal HDAC İnhibitörleri

Epidemiyolojik çalışmalar tam tahılların, sebze ve meyvelerin, mikroorganizmaların türettiği biyoaktif bileşenlerin ve yağ asitlerinin bazı kanser türlerine ve diğer hastalıklara karşı koruma sağlayabileceğini öne sürmektedir (Miller ve Snyder 2012; Ivey ve diğ. 2017). Besinlerde bulunan biyoaktif gıda bileşenlerinin epigenetik mekanizmalar yoluyla gen ekspresyonlarını etkileyebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Di Renzo ve diğ. 2019). Bu bileşenlerin koruyucu etkisinin ise HDAC aktivitesini baskılayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Bassett ve Barnett 2014).

Fenolikler, tetrapeptidler, terpenoidler, alkaloidler ve hidroksamik asit gibi bitki ve mantar kökenli veya aktinomisetlerin oluşturduğu doğal bileşiklerin HDAC inhibe edici potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Diyetimizde bulunan HDACi'lerden bazıları; üzüm, yeşil çay, domates, patates ve soğanda yüksek miktarda bulunan kaempferol, üzüm, kırmızı şarap, yaban mersini ve yer fıstığında bulunan resveratrol, sarımsakta bulunan dialil disülfür, brokoli ve brokoli filizlerinden elde edilen sülforafan, zencefilde bulunan zerumbone ve şarap ve sirkede bulunan sinapinik asittir (Singh ve diğ. 2018). Doğal olarak bulunan HDACi'lerden bazılarının kimyasal yapısı ve kaynakları Şekil 2.5'te yer almaktadır (Mottamal ve diğ. 2015).



Şekil 2.5. Doğal HDAC inhibitörlerinden bazıları ve kaynakları. Mottamal ve diğ. (2015)'ten uyarlanmıştır.

Trikostatin A (TSA)

Streptomyces hygroscopicus'tan izole edilen bir hidroksamat türevi olan trikostatin A, ilk doğal HDAC inhibitörüdür. Başlangıçta antifungal bir bileşik olarak tanımlanan TSA'nın, 1990'ların başlarında HDAC inhibitör aktivitesi keşfedilmiştir (Witt ve Lindemann 2009). TSA, diğer HDAC inhibitörleriyle karşılaştırıldığında sıklıkla pozitif kontrol ve referans olarak kullanılmaktadır ve günümüzde en güçlü HDAC inhibitörlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Ying ve diğ. 2008).

Sülforafan (SFN)

İzotiyosiyanat sülforafan (SFN), brokoli filizi, brokoli ve diğer turpgillerde bulunmaktadır. Kendisi inaktif olan sülforafan (4-metilsülfinilbütül izotiyosiyanat), önce sülfürofan-glutatyona (SFNGSH) ve ardından sınıf I HDAC'leri güçlü bir şekilde inhibe edebilen sülforofan-sisteine (SFN-Cys) metabolize edilir. Sülforafanların, *in vivo* çalışmalarla prostat kanserinde antikanser aktiviteye sahip

olduğu bildirilmiştir (Akone ve diğ. 2020). Myzak ve arkadaşları (2004) tarafından, sülforafanın, HDAC aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca sülforafanın, HCT116 insan kolorektal kanser hücrelerinde histon asetilasyonunu artırarak antikanser aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Myzak ve diğ. 2004). Son yapılan çalışmalarda, sülforafanın HDAC2 (IC₅₀=36 µM) ve HDAC9'u (IC₅₀=0,6 µM) seçici olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (Choi ve diğ. 2018).

Dialil Disülfür (DADS)

Dialil disülfür (DADS), soğan, sarımsak, yeşil soğan ve pırasa gibi *Allium* cinsi bitkilerden salgılanan organosülfür bileşikleridir (Bae ve diğ. 2019). DADS'nin, çeşitli kanser hücresi hatlarında, hücre döngüsünün durdurulmasını, hücre farklılaşmasını ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Herman Antosiewicz ve Singh 2004). Alil merkaptan ise alil sistein sülfoksit, dialil disülfür gibi organosülfür bileşiklerin son metabolitidir. Alil merkaptanın 25-200 mM arasında değişen konsantrasyonlarda sınıf I histon deasetilaz enzimi olan HDAC8'i yarışmalı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Folmer ve diğ. 2010). DADS'nin insan lösemi, akciğer kanseri ve meme kanserinde H4'ün histon asetilasyonunda aşırı artışa neden olarak, kaspaz-3'ün aktivasyonunu ve Bcl2, BAX ve Bcl-xL gibi antiapoptotik proteinlerin modülasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Herman Antosiewicz ve Singh 2004). Ayrıca, insan akut miyeloid lösemi HL-60 hücrelerinde ve kolon kanseri hücrelerinde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda dialil disülfürün tümör baskılayıcı p21WAF1 ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (Akone ve diğ. 2020).

Apicidin

Fusarium pallidorozeum'dan izole edilen apicidin, geniş spektrumlu antiprotozoal aktiviteye sahiptir. Yapılan çalışmalarda apicidin güçlü HDAC inhibitör etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Darkin-Rattray ve diğ. 1996). Apicidin A ve D1, nanomolar konsantrasyonlarda sınıf I HDAC 2, 3 ve 8'in seçici inhibitörüdür. Ayrıca apicidin insan endometriyal ve yumurtalık kanserinin proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve sınıf IIa HDAC 4 ve 7'de inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Folmer ve diğ. 2010; Akone ve diğ. 2020).

2.2.4. Propolisin HDAC İnhibitör Etkisi

Yapılan çalışmalar ile propolisin çeşitli kanser hücre hatlarında uygulamasının HDAC inhibisyonu yaparak antikanser etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Sun ve diğ. 2012; Ishiai ve diğ. 2014; Pal-Bhadra ve diğ. 2012; Omene ve diğ. 2013; Huang ve diğ. 2011).

Ishiai ve diğ. (2014) tarafından yürütülen çalışmada Brezilya propolisinin HDAC inhibe edici etkisi ve fare nöroblastoma (Neuro2a) hücrelerinde antitümör etkisi ile ilişkisi araştırılmıştır. Brezilya propolisinin (BPE) etanolik özütünün HDAC enzim aktivitesine etkisi *in vitro* olarak değerlendirilmiş ve BPE'nin sınıf I HDAC enzim aktivitesini doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir. Ardından, BPE tedavisinin, fare nöroblastoma (Neuro2a) hücrelerinde hücre içi histon asetilasyonuna etkisini incelemek için hücreler, 6 saat boyunca 100 ve 200 µg/mL dozlarında BPE ile muamele edilmiştir. Hücre içi histon asetilasyon seviyesi ölçüldüğünde, 200 µg/mL dozunda BPE muamelesi, kontrole kıyasla rölatif asetilasyonu önemli ölçüde arttırmıştır. Sonuç olarak, BPE, Sınıf I HDAC enzim aktivitesini inhibe etmiştir ve Neuro2a hücrelerinde hücrel histon asetilasyonunu arttırmıştır (Ishiai ve diğ. 2014).

Yapılan çalışmalarda propolisin yanı sıra propolisin içeriğinde bulunan biyoaktif bileşenlerinden krisin ve CAPE'nin de HDACi etkileri araştırılmıştır.

Krisinin HDACi etkilerinin araştırıldığı Sun ve diğ. (2012) çalışmasında Çin propolisinin içeriğinde bulunan aktif antikanser bileşenlerin tespit edilmesi için 9 farklı bölgeden propolis örnekleri toplanarak kimyasal bileşenleri analiz edilmiştir. Propolisin kanser hücre hattı olan insan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine uygulandığı çalışmada, güçlü antikanser bileşiği krisin yüksek miktarda tespit edilmiştir. Enzimatik aktivite analizlerinden elde edilen sonuçlar, krisinin maksimum etkisinin %50'sini oluşturması için gereken konsantrasyonda (EC50= 40.2 uM) uygulandığında, HDAC8 enzimatik aktivitesini belirgin şekilde inhibe eden bir histon deasetilaz inhibitörü olduğunu göstermiştir. Bir ksenograft hayvan modelinde, günlük 90 mg/kg oral krisin uygulamasının tümör büyümesinin önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlenmiştir. *In vitro* analizler krisinin hücre büyümesini

önemli ölçüde baskıladığını ve kanser hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinde farklılaşmayı uyardığını gösterirken, *in vivo* çalışmalarla, krisinin tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe edebilen bir HDAC8 inhibitörü olduğunu kanıtlanmıştır (Sun ve diğ. 2012).

Pal-Bhadra ve diğ. (2012) çalışmasında krisinin HDACi etkisini tespit etmek için kanser hücre hattı olan insan malign melanoma (A375) hücrelerinin krisin (40 μ M) ve TSA (4 μ M) ile *in vitro* koşullarda 24 saat muamelesinin ardından A375 hücre hattından elde edilen hücresel lizatlar ile bir dizi western blot analizi gerçekleştirilmiştir. HDAC2 ve HDAC8 protein seviyesinde ve enzim aktivitesinde azalma saptanarak krisinin HDAC2 ve HDAC8 inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca krisin ile muamele edilen A375 hücrelerinin, H3 ve H4 histonlarında asetilasyonun arttığı saptanmıştır. Özellikle p21 promotör bölgesinde asetilasyon ve metilasyon gibi histon modifikasyonlarına neden olarak tümör baskılayıcı p21WAF1 ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Ayrıca krisinin, kaspaz-3 protein seviyelerinde artışa ve Bcl-xL, survivin gibi NF-kB bağımlı genlerin protein seviyelerinde azalmaya neden olarak apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Pal-Bhadra ve diğ. 2012).

Propolis ve en çok araştırılan aktif bileşenlerinden CAPE'nin kullanıldığı bir çalışmada insan meme kanseri (MDA-MB-231, MCF-7 ve SKBR3) hücre hatlarında hem propolisin hem de CAPE'nin onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin aktivitelerini düzenleyen bir histon deasetilaz inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. CAPE veya propolis ile *in vitro* koşullarda 24 saat muamele edilen MCF-7 ve MDA-231 hücrelerinden elde edilen lizatlarda histon proteinlerinin asetilasyonunda aşırı artış gösterilmiştir. Sağlıklı gönüllülerde CAPE içeriği standardize edilen propolis ile 3 haftalık oral müdahalenin ardından alınan periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) elde edilen protein lizatlarında da benzer şekilde H3 histon proteinlerinin asetilasyonunda aşırı artış saptanmıştır. Çalışma sonuçları CAPE'nin bileşik olarak etkilerinden ziyade CAPE miktarı standardize edilen propolisin HDACi etkisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu sonucun propolisin CAPE'nin epigenetik etkilerini tamamlayabilen çeşitli bileşenlere sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Omene ve diğ. 2013).

Huang ve diğ. (2011) çalışmasında, Tayvan yeşil propolisinden (TGP) izole edilen ve HDACi etkiye sahip olduğu kanıtlanan propolin G'nin yarı sentez yoluyla elde ettikleri NBM-HD-1 bileşimini, yeni bir HDAC inhibitörü olarak tanımlamıştır. NBM-HD-1, insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve sıçan glioma hücrelerinde (C6) kanser hücrelerinin büyümesini baskılayan güçlü bir HDAC inhibitörüdür. NBM-HD-1 ayrıca histon asetilasyonunu arttırmış, HDAC enzim aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsünü kontrol eden gen ekspresyonlarında değişikliklere neden olmuştur (Huang ve diğ. 2011).

Ohashi ve diğ. (2017) çalışmasında ise propolisin biyoaktif bileşeni CAPE'nin normal insan hücre hattında HDACi etkisi araştırılmıştır. Çalışmada CAPE'nin normal hücre hattı olan insan retina endotel hücrelerinde (HREC) hücre dışı süperoksit dismutaz (SOD3) promotör bölgesindeki histon asetilasyonunu arttırarak HDACi etki gösterdiği tespit edilmiştir (Ohashi ve diğ. 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması finansal olarak Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından (Proje no: NKUBAP.23.YL.21.294) lisansüstü tez projelerini destekleme programı kapsamında desteklenmiştir.

Hücre kültürünü içeren deneysel uygulamalar Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Protein miktar tayini ve HDAC aktivite tayini ise Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (NABİLTEM) gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında insan normal embriyonik böbrek (HEK 293T) hücre soyu ve insan serviks kanseri (HeLa) hücre soyunda propolis müdahalesinin HDAC aktivitesi tayini için öncelikle hücreler çoğaltılmıştır. Ticari formdaki propolis ekstraktları filtre edildikten sonra hassas tartı ile ölçümleri yapılarak, saf propolis miktarları mg/mL cinsinden hesaplanmıştır. Hücrelerin ortalama %50'sinin ölümüne neden olan dozların (LD50) belirlenmesi için tripan mavisi boyama yöntemi kullanılmıştır. Propolislerin LD50 dozları ile 24 saat muamele edilen hücrelerden protein lizatları NETN lizis yöntemi ile elde edilmiştir. Hücre kültüründen elde edilen hücre lizatlarının protein miktar tayini için ise Bradford Protein Test Kiti (Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit Catalog no: 23200) kullanılmıştır. Protein miktarları belirlenen hücre lizatlarının histon deasetilaz (HDAC) enzim aktivitesini belirlemek için kolorimetrik HDAC Aktivite Test Kiti (BioVision, HDAC Activity Colorimetric Assay Kit, Catalog no: K331) kullanılmıştır.

3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları TNKÜ Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında biyogüvenlik kabini kullanılarak, çalışma öncesinde ve sonrasında kabin %70'lik etanol ile temizlenmiştir. Ayrıca kabin her çalışma sonunda UV ışık ile sterilize edilmiştir.

Çalışmada önceki deneylerde kullanılmak üzere ATCC (American Type Culture Collection) firmasından temin edilen ve çoğaltılıp -80° C'de muhafaza edilen

embriyonik böbrek (HEK293T) hücre hattı ve insan serviks kanser (HeLa) hücre hattı kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Propolis Ekstrelerinin Özellikleri

Çalışmada kullanılan propolisler, Türkiye’de piyasadan toplanan iki farklı firmanın suda çözünen ticari formdaki ürünleridir.

Propolis-1: Türkiye’den toplanan propolislerden elde edilen, su bazlı, %10 saf propolis içeriğine sahip propolis ekstresidir. Tablo 3.1’de verilen Propolis-1 ekstresinin içerik analiz sonuçları ürünün web sitesinden alınmıştır.

Tablo 3.1. Propolis-1 ekstresinin içeriği.

Parametre	Analiz Metodu	Sonuç	Birim
Toplam Fenolik İçeriği	KK-P01/T17, Folin ciocalteu	40	mg GAE/mL
Toplam Flavanooid İçeriği	KK-P01/T18, Alüminyum Klorür	38	mg KE/mL
Antioksidan Kapasite	KK-P01/T16, CUPRAC	122,2	mg TE/mL
p- Hidroksibenzoik asit	LC-MSMS	89,4	mg/L
Epikateşin	LC-MSMS	176,2	mg/L
Kafeik asit	LC-MSMS	603,9	mg/L
p-Kumarik asit	LC-MSMS	226,0	mg/L
Ferulik asit	LC-MSMS	640,9	mg/L
Resveratrol	LC-MSMS	20,3	mg/L
Luteolin	LC-MSMS	25	mg/L
Kuersetin	LC-MSMS	103,4	mg/L
t-Sinamik asit	LC-MSMS	49,6	mg/L
Apigenin	LC-MSMS	298,2	mg/L
Hesperetin	LC-MSMS	249,3	mg/L
Ramnetin	LC-MSMS	225,3	mg/L

Krisin	LC-MSMS	3215,6	mg/L
Pinosembrin	LC-MSMS	641,3	mg/L
Kafeik asit fenil ester (CAPE)	LC-MSMS	7081,9	mg/L

Propolis-2: Türkiye'den toplanan propolislerden elde edilen, su bazlı, %6,67 saf propolis içeriğine sahip propolis ekstresidir. Tablo 3.2'de verilen Propolis-2 ekstresinin içerik analiz sonuçları ürünün web sitesinden alınmıştır.

Tablo 3.2. Propolis-2 ekstresinin içeriği.

Parametre	Analiz Metodu	Sonuç	Birim
Toplam Fenolik Madde	Spektrofotometrik	17.063	mg GAE/kg
Kafeik asit	LC-MSMS	602,2	mg/kg
p-Kumarik asit	LC-MSMS	343,6	mg/kg
Ferulik asit	LC-MSMS	300,5	mg/kg
3,4-Dimetoksi Sınnamik asit	LC-MSMS	814,6	mg/kg
t-Sınnamik asit	LC-MSMS	324,3	mg/kg
Pinobanksin	LC-MSMS	1879,1	mg/kg
Mirisetin	LC-MSMS	29,70	mg/kg
Naringenin	LC-MSMS	262,5	mg/kg
Luteolin	LC-MSMS	34,5	mg/kg
Kaempferol	LC-MSMS	33,00	mg/kg
Apigenin	LC-MSMS	206,7	mg/kg
Pinosembrin	LC-MSMS	1501,5	mg/kg
Kafeik asit fenil ester (CAPE)	LC-MSMS	1052,6	mg/kg
Krisin	LC-MSMS	1051,7	mg/kg
Galangin	LC-MSMS	1226,1	mg/kg

3.3. Hücre Soylarının Eldesi ve Kültürü

1. -80°C stoklarda kriyovial içinde donmuş olarak muhafaza edilen HeLa ve HEK293T hücrelerinin 37 °C su banyosunda 5 dakika bekletilerek tamamen çözünmesi sağlanmıştır.
2. Hücreler (1 mL) steril 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılarak üzerine L-Glutamin içeren DMEM besiyeri, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin + streptomisin antibiyotik çözeltisi ilave edilmiştir ve toplam hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır.
3. Hücre süspansiyonları 4 °C'de 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak tüplere 1'er mL taze besiyeri ilave edilmiştir. Hafif pipetaj ile hücre pelletleri çözündürülerek T25 hücre kültürü kaplarına ekimi yapılmıştır. Hücreler %5 CO₂, 37 °C'de hücre inkübatöründe büyümeye bırakılmıştır.
5. Hücre kültürlerinin canlılıkları ve çoğalmaları düzenli olarak takip edilerek 2-3 günde bir besiyeri değişimleri yapılmıştır. Hücreler flask yüzeyinin %80-90'ını kapladığında pasajlanarak kültürlerin devamlılığı sağlanmıştır.

3.4. Propolis Ekstrelerinin Hazırlanması

Çalışmada eczanelerden temin edilen ticari formdaki su bazlı Propolis-1 ve Propolis-2 ekstreleri kullanılmıştır. İlk olarak Propolis-1 ve Propolis-2 su bazlı ekstreleri steril koşullarda 0,22 mikron filtre ile filtrelenmiştir. Propolisler filtre edildikten sonra hassas tartı ile ölçümleri yapılarak, saf propolis miktarları mg/mL cinsinden hesaplanmıştır. Propolis-1'in saf propolis miktarı 117 mg/mL, Propolis-2'nin saf propolis miktarı ise 30 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Hücre kültürüne propolis uygulamalarını rahat yapabilmek için Propolis-1 ekstresi 40 kat, Propolis-2 ekstresi 10 kat ddH₂O ile seyreltilmiştir.

HEK293T ve HeLa hücrelerinde propolislerin LD₅₀ dozunun belirlenmesi için kullanılacak propolis hacimleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$C_1 (\mu\text{g/mL}) \times V_1 (\mu\text{L}) = C_2 (\mu\text{g/mL}) \times V_2 (\mu\text{L})$$

3.5. Propolislerin LD50 Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada TP için HeLa ve HEK293T hücrelerinin %50'sinin ölümüne neden olan dozların belirlenmesinde tripan mavi boyaması yöntemi kullanılmıştır.

3.5.1. Kullanılan Malzemeler

- 96 kuyucuklu hücre kültür kabı
- DMEM besiyeri
- Tripan mavisi çözeltisi (%0,4)
- Hemositometre (Neubauer lamı)
- İnvert mikroskop
- Tripsin-EDTA çözeltisi
- PBS
- Plastik santrifüj tüpü (1,5 mL)

3.5.2. Uygulanan İşlemler

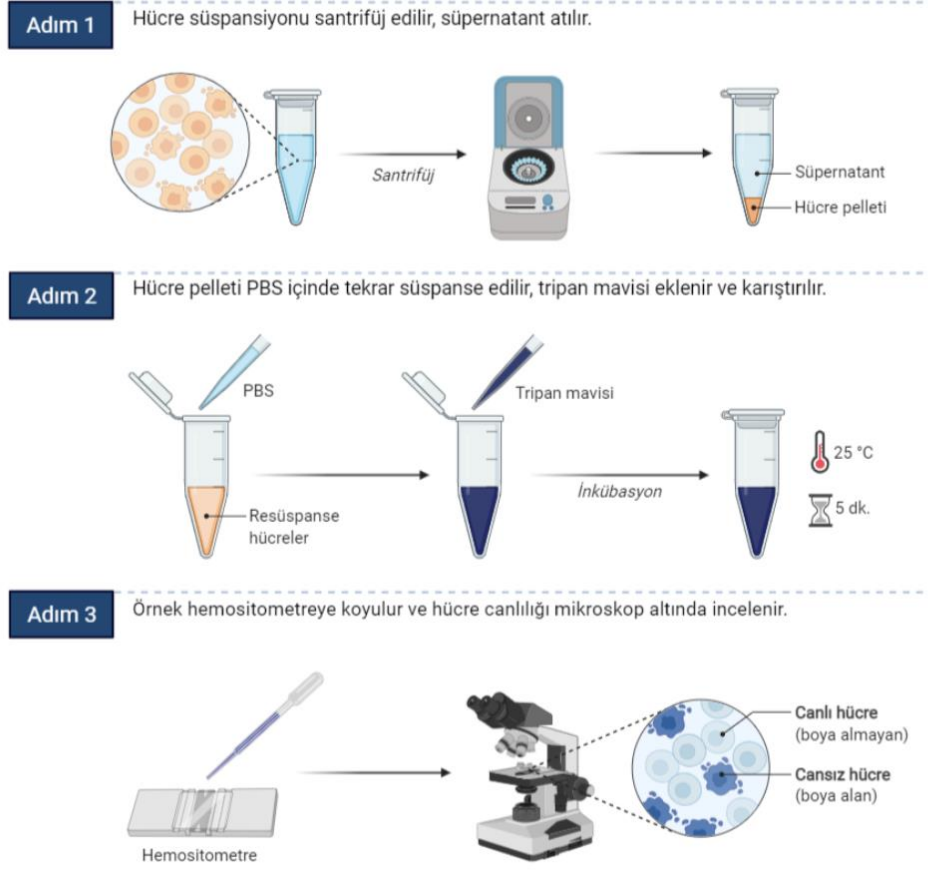
HeLa ve HEK293T hücreleri 96 kuyucuklu kültür kabına, her bir kuyuda 200 µL besiyeri içerisinde 20.000 hücre olacak şekilde duplike ekimi yapılarak hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda kültür kabı inkübatörden alınarak besi ortamı uzaklaştırılmış ve 200 µL taze besiyeri her bir kuyuya ilave edilmiştir.

- HEK293T hücre hattına uygulanacak her iki propolis ekstresi için de final konsantrasyonları 25, 50, 100, 200, 500 µg/mL olacak şekilde uygun hacimde propolis müdahaleleri yapılmıştır. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- HeLa hücre hattına uygulanacak her iki propolis ekstresi için de final konsantrasyonları 25, 50, 100, 200, 500 µg/mL olacak şekilde uygun hacimde propolis müdahaleleri yapılmıştır. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

24 saatin sonunda propolisler ile muamele edilen HeLa ve HEK293T hücrelerine tripan mavi boyaması yapılmıştır. Tripan mavisi uygulama prosedürü Şekil 3.1'de yer almaktadır.

3.5.3. Tripan Mavisi Boyama Prosedürü

1. Öncelikle kültür kabındaki besi ortamı uzaklaştırılarak hücreler 20 μ L tripsin-EDTA ile toplanmıştır ve plastik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
2. Hücre süspansiyona 50 μ L PBS ve 4 μ L tripan mavisi çözeltisi (%0,4) eklenmiş, pipetaj yapılarak karıştırılmıştır ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. Hücre süspansiyonu Neubauer lamına (hemositometre) yerleştirilmiştir.
4. Hücre sayımı, invert mikroskop ile boya almamış, parlak ve renksiz canlı hücreler ve toplam hücre sayısı tespit edilerek gerçekleştirilmiştir.
5. Canlı hücrelerin yüzdesi (%); boya almamış hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünerek, 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır (Freshney, 2015).



Şekil 3.1. Tripan mavisi boyama prosedürü.

LD50 değeri aralıkları tahmini olarak belirlendikten sonra yeni konsantrasyonlar belirlenerek deney tekrarlanmıştır.

- HEK293T hücre hattına uygulanacak Propolis-1 ekstresi için konsantrasyonlar 10, 25, 50, 75, 100, 150 µg/mL olacak şekilde uygun hacimde propolis müdahaleleri yapılmıştır.
- HEK293T hücre hattına uygulanacak Propolis-2 ekstresi için konsantrasyonlar 10, 25, 50, 75, 100, 150 µg/mL olacak şekilde uygun hacimde propolis müdahaleleri yapılmıştır.
- HeLa hücre hattına uygulanacak Propolis-1 ekstresi için konsantrasyonlar 25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL olacak şekilde uygun hacimde propolis müdahaleleri yapılmıştır.
- HeLa hücre hattına uygulanacak Propolis-2 ekstresi için konsantrasyonlar 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL olacak şekilde uygun hacimde propolis müdahaleleri yapılmıştır.

Propolis müdahaleleri ardından hücreler 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

24 saatin sonunda HeLa ve HEK293T hücrelerine tripan mavi boyaması yapılarak Propolis-1 ve Propolis-2 ekstraktlarının tespit edilen LD50 değerleri Tablo 4.1'de yer almaktadır.

3.6. Hücresel Lizat Eldesi

3.6.1. Kullanılan Malzemeler

- NETN lizis tamponu
- 100X Halt Proteaz Fosfataz İnhibitörü
- PBS
- Hücre kültür kabı (100 mm)
- DMEM besiyeri
- Plastik santrifüj tüpleri (15 mL)
- Plastik santrifüj tüpleri (1,5 mL)
- Soğutmalı santrifüj

- Buz
- Tripsin- EDTA çözeltisi
- Ayarlanabilir otomatik pipet
- Steril pipet uçları

3.6.2. Kullanılan Solüsyonlar ve İçerikleri

Tablo 3.3. NETN lizis tamponu içeriği.

Stok	Kullanılan Miktar	Final Konsantrasyon
5 M NaCl	5 mL	250 mM
0.5 M EDTA, pH 8.0	1 mL	5 mM
1 M Tris-HCl, pH 8.0	5 mL	50 mM
NP-40 (IGEPAL CA-630)	0.5 mL	0.5%
ddH ₂ O	88.5 mL	

Tablo 3.4. Kullanılan NETN lizis tamponu inhibitörleri.

Stok	Hacim	Final Konsantrasyon
NETN Lizis Tamponu	10 mL	-
100X Halt Proteaz Fosfataz İnhibitörü	0.1 mL	1X

Tablo 3.5. PBS tamponu içeriği.

İçerikler	Kullanılan Miktar	Final Konsantrasyon
NaCl	8.0 g	137 mM
KCl	0.20 g	2.7 mM
NaH ₂ PO ₄	0.23 g	1.9 mM
Na ₂ HPO ₄	0.12 g	0.8 mM
ddH ₂ O	1L	

3.6.3. Deneyin Yapılışı

Deney grupları; kontrol grubu, Propolis-1 ile müdahale grubu, Propolis-2 ile müdahale grubu ve VPA ile müdahale grubu (pozitif kontrol) olarak planlanmıştır.

HEK293T hücreleri (1 mL) 100 mm'lik hücre kültür kabına ekilerek 5 mL zenginleştirilmiş DMEM besiyeri ilave edilmiş ve toplam hacim 6 mL'ye tamamlanmıştır. Her deney grubu için HEK293T hücrelerinin 100 mm'lik hücre kültürü kaplarına duplike ekimi gerçekleştirilerek toplam 8 adet kültür kabı elde edilmiştir.

HeLa hücreleri (1 mL) 100 mm'lik hücre kültür kabı kabına ekilerek 5 mL zenginleştirilmiş DMEM besiyeri ilave edilmiş ve toplam hacim 6 mL'ye tamamlanmıştır. Her deney grubu için HeLa hücrelerinin 100 mm'lik hücre kültürü kaplarına duplike ekimi gerçekleştirilerek toplam 8 adet kültür kabı elde edilmiştir.

1. Hücrelerin kültür kaplarının yüzeyini %80-90 kapladığına deneye başlanmıştır. Kültür kaplarının içerikleri aspire edilerek her birine 6 mL zenginleştirilmiş DMEM besiyeri ilave edilmiştir.
2. Deney gruplarına uygulanacak dozlar, propolisler için LD50 değerleri göz önüne alınarak hesaplanmıştır. VPA dozu için yapılan literatür taraması sonucunda toksik olmayan ve HDAC inhibitör etkisinin en yüksek olduğu 0,5 mM konsantrasyonda kullanımına karar verilmiştir.
3. Hücrelerin belirlenen konsantrasyonlarda Propolis-1, Propolis-2 ve VPA ile 24 saat muamelesi sonunda protein tayini için, hücreler 100 mm kültür kaplarından 15 mL steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
4. Hücre süspansiyonları +4°C'de 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Her bir kültür kabına 1 mL soğuk PBS ilave edilmiştir ve hücre yüzeyleri hafifçe yıkanmıştır. PBS aspire edilerek hücrelerin yüzeyden tamamen ayrılması için 1 mL tripsin-EDTA ilave edilmiştir ve hücreler 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 5 dakika inkübe edilmiştir.
6. Her bir kültür kabı inverted mikroskop altında incelenerek hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilmiştir. Kültür kaplarına hafifçe vurarak yüzeyde tutunan hücrelerin kalkması sağlanmıştır.

7. Kültür kaplarına 2 mL soğuk PBS ilave edilerek hücreler 15 mL'lik santrifüj tüplerine toplanmıştır.
8. Hücre süspansiyonları, 15 mL santrifüj tüplerinden 1,5 mL plastik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Süspansiyona 300 µL NETN lizis tamponu ilave edilmiştir. Hücre pelleti hafif pipetaj ile homojen hale getirilmiştir.
9. Hücre lizatları karanlıkta, buzun üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Süre bitiminde solüsyonlar +4 °C' de 13.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Süpernatantlar steril 1,5 mL'lik plastik santrifüj tüplerine toplanarak protein miktar tayini yapılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Tüm deney aşamaları buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.7. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (NABİLTEM) gerçekleştirilmiştir. Protein miktar tayini yapılırken Bradford yöntemi tercih edilmiştir. Ticari Bradford Protein Test Kiti (Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit, Catalog no: 23200) üretici talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

3.7.1. Kullanılan Malzemeler

- Bradford Protein Test Kiti (Pierce)
- 96 kuyucuklu hücre kültür kabı
- ELİSA mikrolaka okuyucu (Thermo Scientific)
- Plastik santrifüj tüpleri (1,5 mL)

3.7.2. Bradford Protein Test Kiti Uygulama Protokolü

1. 1000 µL Coomassie solüsyonu ile 1 µL hücre lizatı 1,5 mL'lik plastik santrifüj tüpünde hafif pipetaj ile homojen hale getirilerek 5 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir.
2. Her bir örnekten 100 µL alınarak 96 kuyucuklu kültür kabına duplike şekilde aktarılmıştır.
3. Örnekler, ELİSA mikrolaka okuyucuda 595 nm dalga boyunda okutularak optik yoğunluk (OD) değerleri belirlenmiştir.

4. Protein tayini için standart eğrisi BSA kullanılarak, Sigma Plot 10.0 programı yardımıyla oluşturulmuştur. BSA ile yapılan ölçümlerden oluşturulan standarda göre, her bir örnekte bulunan protein miktarları saptanmıştır.

3.8. HDAC Aktivitesinin Tayini

HDAC aktivitesini belirlemek için hücre kültürlerinden elde edilen hücre lizatlarına, kolorimetrik HDAC Aktivite Test Kiti (BioVision, HDAC Activity Colorimetric Assay Kit, Catalog no: K331) üretici talimatları doğrultusunda uygulanmıştır.

3.8.1. Kullanılan Malzemeler

- Kolorimetrik HDAC Aktivite Test Kiti (BioVision)
- 96 kuyucuklu hücre kültür kabı
- ddH₂O
- ELİSA mikrolaka okuyucu (Thermo Scientific)
- Plastik santrifüj tüpleri (1,5 mL)

3.8.2. Kolorimetrik HDAC Aktivite Test Kiti Uygulama Protokolü

1. Hücre lizatlarının protein miktarları belirlendikten sonra, örnek başına ne kadar hücre lizatı uygulanacağı hesaplanmıştır. Hücre lizatlarına toplam hacim 85 µL olacak şekilde ddH₂O ilavesi yapılmıştır.
2. Her bir örneğe 10 µL 10X HDAC test tamponu eklenmiştir.
3. Üzerine 5 µL HDAC kolorimetrik substrattan ilave edilerek 2 saat 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir.
4. Sürenin sonunda reaksiyonu durdurmak için her bir örneğe 10 µL lysine developer eklenmiştir ve 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.
5. 30 dakika bekleme süresinin ardından örnekler ELİSA mikrolaka okuyucuda 405 nm dalga boyunda okutulurken optik yoğunluk (OD) değerleri belirlenmiştir. Her bir örneğin HDAC aktivitesi kontrole kıyasla değerlendirilmiştir.

3.9. İstatistiksel Yöntemler

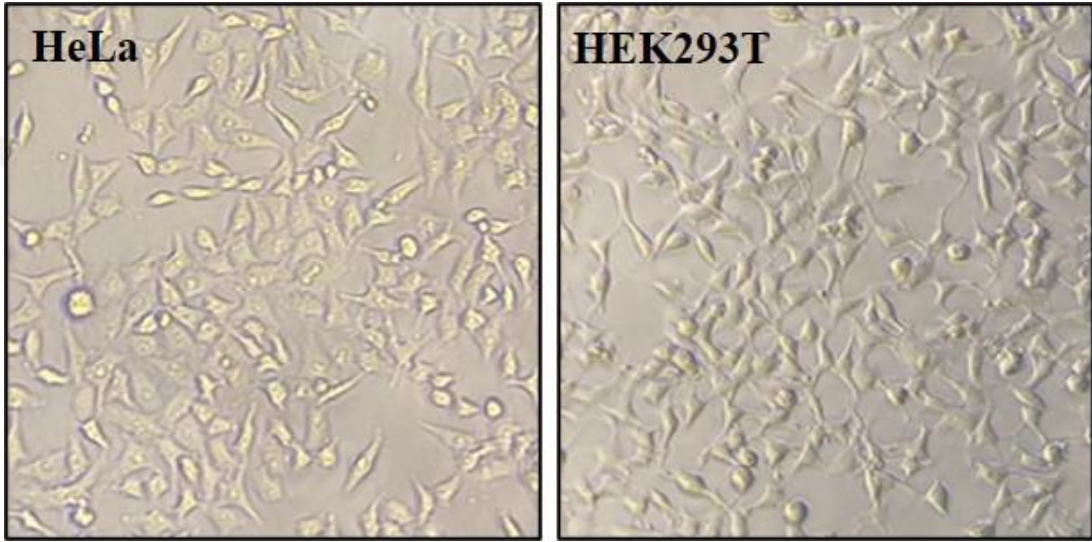
Çalışmada elde edilen veriler SPSS 20.0 istatistik programı ile %95 güven aralığında değerlendirilmiştir. Deney grupları arasında istatistiksel farklılığın tespiti için tek yönlü varyans analizi ANOVA kullanılmıştır. Deney grupları arasında anlamlı bir farklılığın saptanması durumunda, gruplar arası değerlendirmelerde post-hoc Dunnett' s testi kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada kullanılan insan normal embriyonik böbrek (HEK293T) ve insan serviks kanseri (HeLa) hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 4.1'de yer almaktadır.



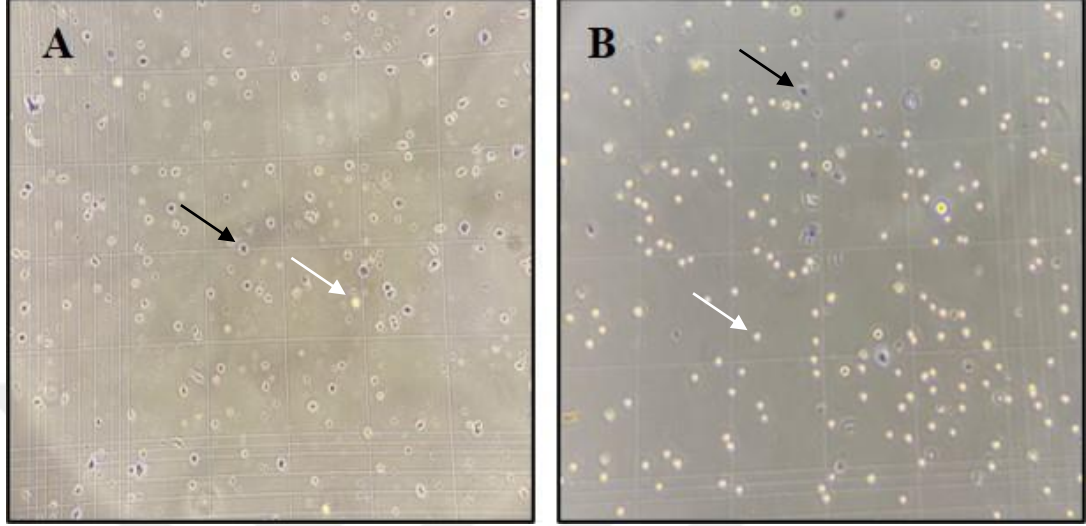
Şekil 4.1. HeLa ve HEK293T hücrelerinin inverted mikroskopta genel görünümü (100X).

4.2. Propolisin Hücre Canlılığına Etkisi ve LD50 Dozlarının Belirlenmesi

Propolisin HEK293T ve HeLa hücre soylarının canlılığına etkisi tripan mavisi boyaması yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 4.2).

HEK293T ve HeLa hücre hattına uygulanacak her iki propolis ekstresi için de final konsantrasyonları 25, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde uygun hacimde propolis müdahaleleri 24 saat boyunca uygulanmıştır. Tahmini LD50 dozları HEK293T ve HeLa hücreleri için ayrı ayrı belirlendikten sonra yöntem ve gereçlerde belirtilen konsantrasyonlarda daha dar bir aralıkta ikinci kez propolis müdahaleleri

ile HEK293T ve HeLa hücrelerinde Propolis-1 ve Propolis-2 için LD50 değerleri tespit edilmiştir.

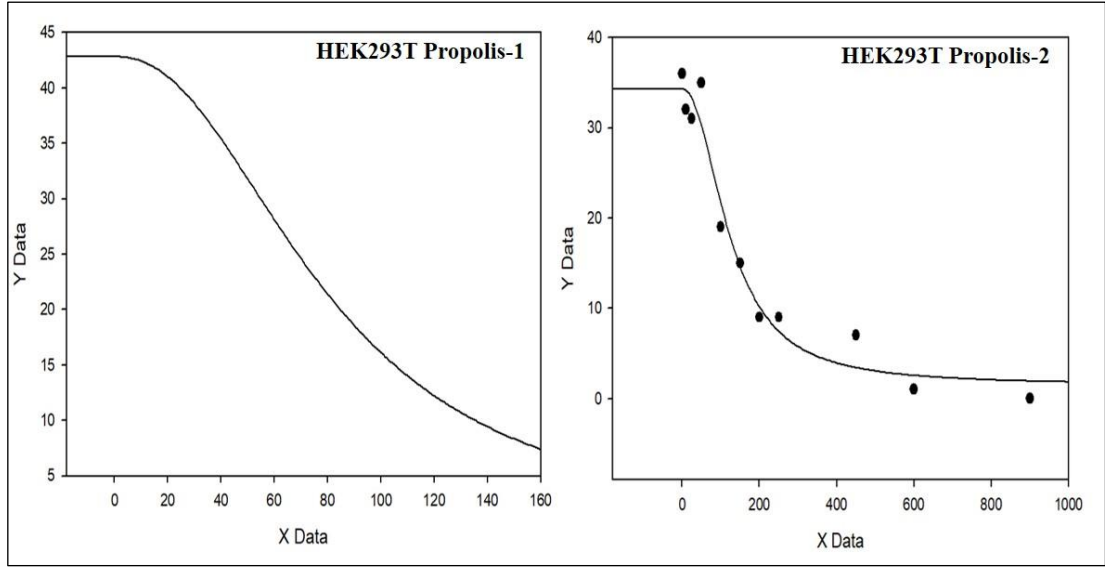


Şekil 4.2. Tripan mavisi boyaması sonrası Hemositometre ile yapılan hücre sayımı. Koyu renkte ok ile gösterilen koyu boyanan hücreler ölü hücreleri, açık renkte ok ile gösterilen açık renkte ve parlak hücreler canlı hücreleri temsil etmektedir. A) Canlı hücre sayısının çok düşük olduğu, B) Canlı hücre sayısının yüksek olduğu örnekleri temsil etmektedir (inverted mikroskop, 40X).

HEK293T hücrelerinde Propolis-1 için LD50 değeri 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve Propolis-2 için LD50 değeri ise 129 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3) (Tablo 4.1).

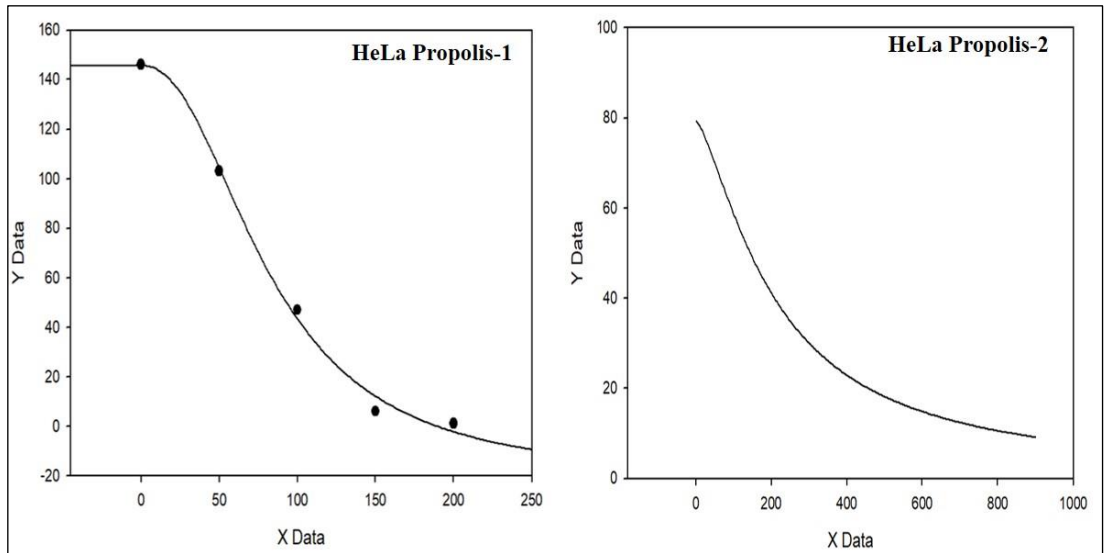
Tablo 4.1. HeLa ve HEK293T Hücrelerde Propolis-1 ve Propolis-2 için belirlenen LD50 konsantrasyonları.

Deney Grupları	LD50 Değeri ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
HEK293T Propolis-1	80
HeLa Propolis-1	72,5
HEK293T Propolis-2	129
HeLa Propolis-2	210



Şekil 4.3. HEK293T hücrelerinde Propolis-1 ve Propolis-2'nin LD50 dozlarının hesaplanması. X; Propolis konsantrasyonu. Y; Canlı hücre sayısı.

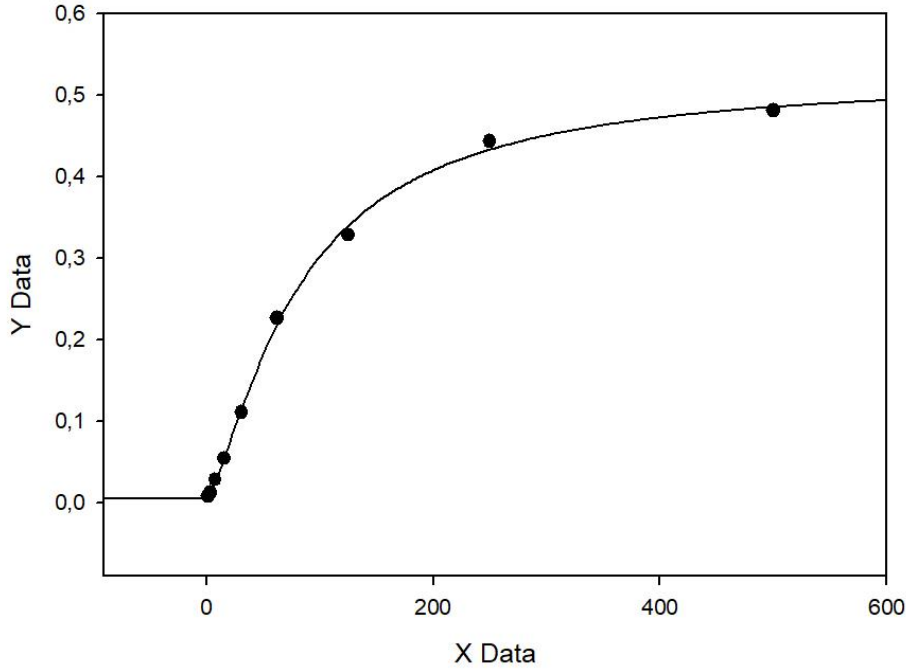
HeLa hücrelerinde Propolis-1 için LD50 değeri 72,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve Propolis-2 için LD50 değeri ise 210 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4) (Tablo4.1).



Şekil 4.4. HeLa hücrelerinde Propolis-1 ve Propolis-2'nin LD50 dozlarının hesaplanması. X; Propolis konsantrasyonu. Y; Canlı hücre sayısı.

4.3. Hücre Lizatlarında Protein Tayini

24 saatlik propolis uygulamaları sonucunda elde edilen hücresel lizatlardaki protein miktarları protein standart grafiği (Şekil 4.5) yardımı ile her uygulama için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

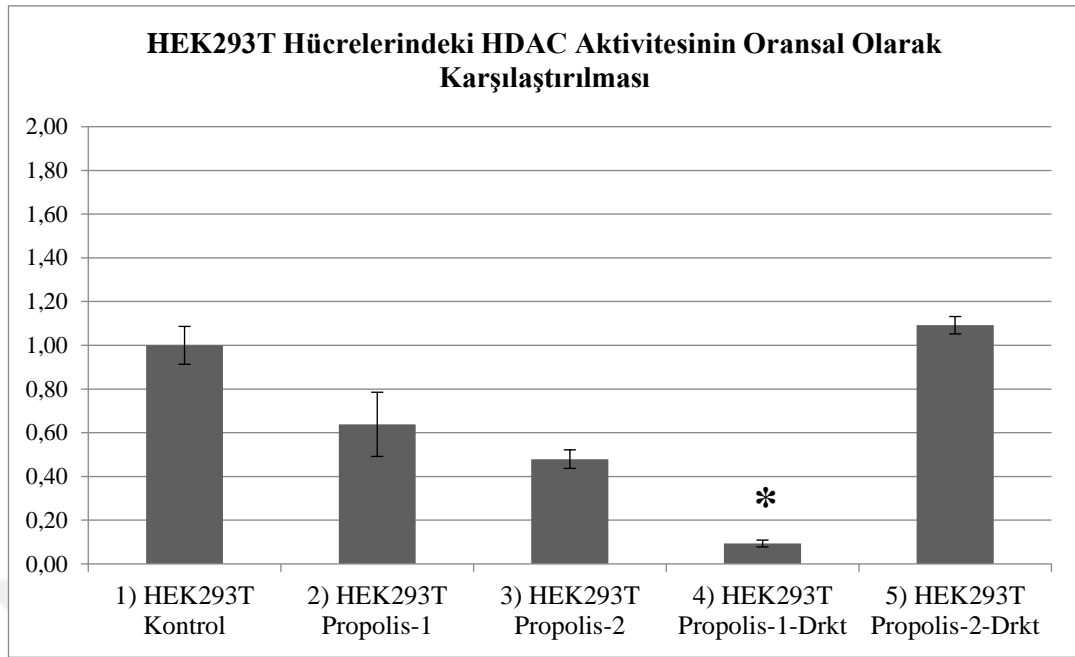


Şekil 4.5. BSA ile Hazırlanan Protein Standart Grafiği. X eksenini=BSA konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$), Y eksenini=OD değerleri.

4.4. TP'nin HDAC Aktivitesine Etkisi

4.4.1. HEK293T Hücrelerinde TP'nin HDAC Aktivitesine Etkisi

HEK293T hücrelerinin propolis ile müdahalesinde; Kontrol grubu (Grup 1), Propolis-1'in LD50 dozu ile ($80 \mu\text{g/mL}$) 24 saat muamele grubu (Grup 2), Propolis-2'nin LD50 dozu ile ($129 \mu\text{g/mL}$) 24 saat muamele grubu (Grup 3), Propolis-1'in LD50 dozu ile ($80 \mu\text{g/mL}$) direkt muamele grubu (Grup 4), Propolis-2'nin LD50 dozu ile ($129 \mu\text{g/mL}$) direkt muamele grubunun (Grup 5) HDAC Aktivite Test Kiti ile ölçülen OD'lerin karşılaştırmaları Tablo 4.2 ve Şekil 4.6'da yer almaktadır.



Şekil 4.6. HEK293T hücrelerindeki HDAC aktivitesinin farklı uygulamalar arasında karşılaştırılması. (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 ve Grup 1, Grup 4 ve Grup 5 farklı deney düzenekleri olup kendi aralarında değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla, Grup 4'ün HDAC aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma gösterilmiştir (p=0,043).)

Ortalama OD değerleri yüzde (%) değişimi olarak karşılaştırıldığında ise Propolis-1'in LD50 dozlarında 24 saatlik müdahalesinin (Grup 2), kontrole (Grup 1) kıyasla %36 oranında HDAC aktivitesinde azalmaya neden olduğu, benzer şekilde Propolis-2'in LD50 dozlarında 24 saatlik müdahalesinin (Grup 3), kontrole (Grup 1) kıyasla %52 oranında HDAC aktivitesinde azalmaya neden olduğu saptansa da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir.

Yapılan tek yönlü varyans analizi sonuçlarına göre HEK293T hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Propolis-1 ve Propolis-2'nin LD50 dozlarında 24 saatlik müdahalesinin (Grup 2 ve Grup 3) kontrole (Grup 1) kıyasla HDAC aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gösterilmemiştir (p=0,396).

Diğer yandan Propolis-1 ve Propolis-2'nin LD50 dozları ile direkt muamele edilen HEK293T hücrelerindeki (Grup 4 ve Grup 5) HDAC aktivitesi

kontrole (Grup 1) kıyaslandığında tek yönlü varyans analizi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p= 0,04$). Farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için uygulanan post-hoc Dunnett's test sonuçları Tablo 4.3'te yer almaktadır. Dunnett's test sonucuna göre kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla Propolis-1'in direkt uygulandığı grupta (Grup 4) HDAC aktivitesinde %81 oranında istatistiksel açıdan da anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p= 0,043$).

Tablo 4.2. HEK293T hücrelerindeki HDAC aktivitesini yansıtan OD değerleri.

Grup No	Uygulama Grupları	Ortalama OD Değerleri	SS
1	HEK293T-Kontrol	0,5165	0,08651
2	HEK293T- Propolis-1	0,4339	0,14690
3	HEK293T- Propolis- 2	0,3976	0,04244
4	HEK293T- Propolis-1-Drkt	0,3094	0,01577
5	HEK293T- Propolis-2-Drkt	0,5376	0,03981

SS; standart sapma.

Tablo 4.3. HEK293T hücrelerinde propolis müdahalelerinin HDAC aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Karşılaştırılan gruplar		p değeri
HEK293T-Propolis-1 (Grup 2 ile Grup 1)	HEK293T-Kontrol	0,539
HEK293T-Propolis-2 (Grup 3 ile Grup 1)	HEK293T-Kontrol	0,323
HEK293T-Propolis-1 -Drkt (Grup 4 ile Grup 1)	HEK293T-Kontrol	0,043*
HEK293T-Propolis-2 -Drkt (Grup 5 ile Grup 1)	HEK293T-Kontrol	0,918

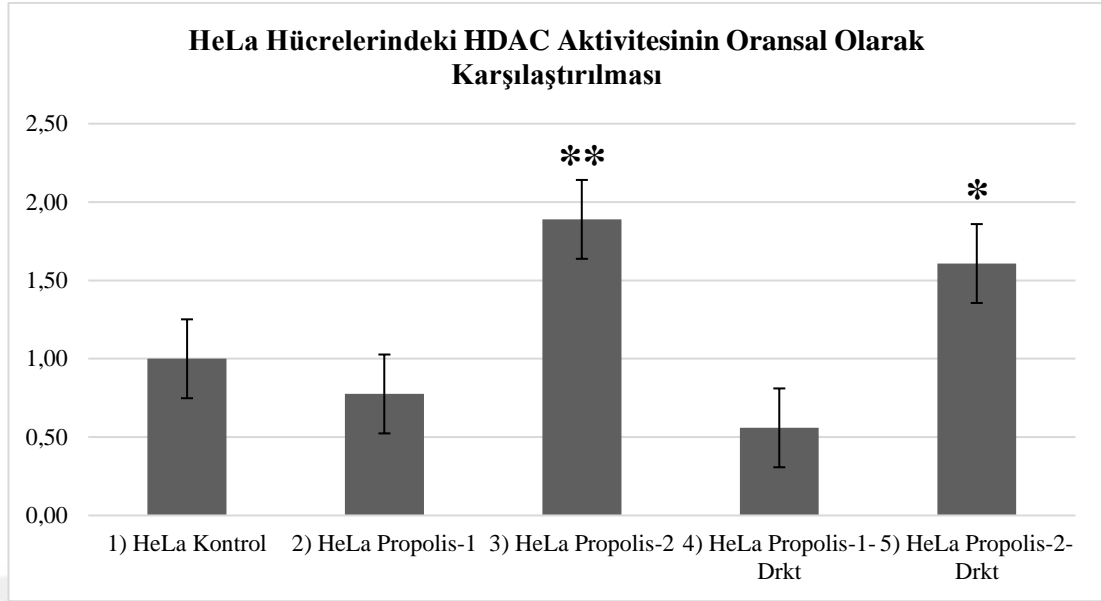
İstatistiksel anlamlılık $*<0,05$ şeklinde ifade edilmiştir.

4.4.2. HeLa Hücrelerinde TP'nin HDAC Aktivitesine Etkisi

HeLa hücrelerinin propolis ile müdahalesinde; Kontrol grubu (Grup 1), Propolis-1'in LD50 dozu ile (72,5 µg/mL) 24 saat muamele grubu (Grup 2), Propolis-2'in LD50 dozu ile (210 µg/mL) 24 saat muamele grubu (Grup 3), Propolis-1'in LD50 dozu ile (72,5 µg/mL) direkt muamele grubu (Grup 4), Propolis-2'in LD50 dozu ile (210 µg/mL) direkt muamele grubunun (Grup 5) HDAC Aktivite Test Kiti ile ölçülen OD'lerin karşılaştırmaları Tablo 4.4 ve Şekil 4.7'de yer almaktadır.

Propolis-1 ve Propolis-2'nin (Grup 2 ve Grup 3) LD50 dozlarının 24 saatlik müdahalesi sonrası HeLa hücrelerindeki HDAC aktivite düzeyleri kontrol grubu (Grup 1) ile karşılaştırıldığında tek yönlü varyans analizi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterilmiştir ($p < 0,001$). Farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için yapılan post-hoc Dunnett's test sonuçları Tablo 4.5'te yer almaktadır. Dunnett's testi sonucuna göre kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla Propolis-2'nin LD50 dozunda 24 saatlik müdahalesinin (Grup 3) HDAC aktivitesinde %89 oranında ve istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir ($p = 0,002$).

Diğer yandan Propolis-1 ve Propolis-2'nin LD50 dozları ile direkt muamele edilen HeLa hücreli lizatlarındaki (Grup 4 ve Grup 5) HDAC aktivitesi kontrole (Grup 1) kıyaslandığında tek yönlü varyans analizi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p = 0,0224$). Farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için yapılan post-hoc Dunnett's test sonucuna göre kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla Propolis-2'nin direkt uygulandığı grupta (Grup 5) HDAC aktivitesinde %61 oranında ve istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p = 0,017$).



Şekil 4.7. HeLa hücrelerindeki HDAC aktivitesinin oransal olarak karşılaştırılması. (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 ve Grup 1, Grup 4 ve Grup 5 farklı deney düzenekleri olup kendi aralarında değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla, Grup 3'ün ($p=0,002$) ve Grup 5'in ($p=0,017$) HDAC aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gösterilmektedir.)

Tablo 4.4. HeLa hücrelerindeki HDAC aktivitesini yansıtan OD değerleri.

Grup No	Uygulama Grupları	Ortalama OD Değerleri	SS
1	HeLa-Kontrol	0,3637	0,01139
2	HeLa- Propolis-1	0,3467	0,01147
3	HeLa- Propolis- 2	0,4310	0,01695
4	HeLa- Propolis-1-Drkt	0,4107	0,07142
5	HeLa- Propolis-2-Drkt	0,6408	0,10918

SS; standart sapma.

Tablo 4.5. HeLa hücrelerinde propolis müdahalelerinin HDAC aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Karşılaştırılan gruplar		p değeri
HeLa-Propolis-1 (Grup 2 ile Grup 1)	HeLa-Kontrol	0,284
HeLa-Propolis-2 (Grup 3 ile Grup 1)	HeLa-Kontrol	0,002**
HeLa-Propolis-1 -Drkt (Grup 4 ile Grup 1)	HeLa-Kontrol	0,687
HeLa-Propolis-2 -Drkt (Grup 5 ile Grup 1)	HeLa-Kontrol	0,017*

İstatistiksel anlamlılık * $<0,05$, ** $<0,01$ şeklinde ifade edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda Türk propolisinin insan normal embriyonik böbrek (HEK 293T) hücre hattı ve insan serviks kanseri (HeLa) hücre hattında HDAC aktivitesine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, ticari formdaki iki farklı Türk propolisinin LD50 dozlarının 24 saat boyunca *in vitro* hücre kültürü ortamında HEK293T ve HeLa hücre soylarına uygulanması ve ayrıca HEK293T ve HeLa hücrelerinden elde edilen hücresel lizatlarla TP'lerin doğrudan muamelesinin hücresel HDAC aktivitesi üzerindeki etkileri deneysel çalışmalar ile araştırılmıştır. Türk propolisinin HDAC aktivitesi üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir.

Propolis-1'in LD50 konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen HEK293T hücrelerinden elde edilen hücresel lizatların HDAC aktivitesinde, kontrole kıyasla %36 oranında azalma ($p=0,539$), benzer şekilde Propolis-2'nin LD50 dozu ile 24 saat muamele edilen HEK293T hücrelerinden elde edilen hücresel lizatların HDAC aktivitesinde, kontrole kıyasla %52 oranında azalma ($p=0,323$) tespit edilmiş olsa da her iki bulgu da istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Öte yandan, HEK293T hücre lizatlarının Propolis-1'in LD50 dozu ile doğrudan muamelesinde, kontrole kıyasla HDAC aktivitesinde %81 oranında istatistiksel açıdan da anlamlı olan bir azalma tespit edilmiştir ($p=0,043$). Propolis-1'nin LD50 konsantrasyonunun hem HEK293T hücresel lizatlarına doğrudan uygulanması ile hem de Propolis-1 ve Propolis-2'nin *in vitro* koşullarda 24 saat uygulanması ile HDAC aktivitesinde azalmanın saptanması, TP'nin normal hücreler üzerinde doğrudan ve dolaylı etkileşimler aracılığı ile HDAC inhibisyonuna sebep olabileceği ve TP'nin doğal bir HDAC inhibitörü olabileceği görüşünü desteklemektedir. HEK293T hücresel lizatlarına doğrudan uygulanan Propolis-2'in LD50 konsantrasyonunun HDAC aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan %9'luk bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun Propolis-2'nin doğal olarak renginin sarı-kahverengi tonlarında olması, HDAC aktivitesinin tespit edilmesinde renk değişimine dayalı bir yöntemin kullanılmış olması ve Propolis-2'nin doğal rengi ile HDAC aktivitesi sonrası oluşan renklerin çakışmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Propolis-2'nin doğrudan etkileşimlerle HDAC enzim aktivitesi üzerine olan etkisinin,

temelinde renk değişiminin olmadığı farklı tipte bir HDAC aktivitesi tayin yöntemi ile test edilmesi gerekmektedir.

Propolis-1'in LD50 konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen HeLa hücrelerinden elde edilen hücresel lizatların HDAC aktivitesinde, kontrole kıyasla %22 oranında azalmaya ($p=0,284$) neden olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Propolis-2'nin LD50 dozu ile 24 saat muamele edilen HeLa hücrelerinden elde edilen hücresel lizatların HDAC aktivitesinde, kontrole kıyasla %89 oranında ve istatistiksel olarak da anlamlı bir artışa neden olduğu gösterilmiştir ($p= 0,002$). Öte yandan, HeLa hücresel lizatlarının Propolis-1'in LD50 dozu ile doğrudan muamelesinde, kontrole kıyasla HDAC aktivitesinde %44 oranında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir ($p=0,687$). HeLa hücresel lizatlarının Propolis-2'nin LD50 dozu ile doğrudan muamelesinde, kontrole kıyasla HDAC aktivitesinde %61 oranında anlamlı bir artış gösterilmiştir ($p= 0,017$). Bu artışın HEK293T hücrelerindeki artışa benzer bir şekilde, Propolis-2'nin doğal rengi ile HDAC aktivitesi sonrası oluşan renklerin çakışmasından, test yönteminin HDAC aktivitesini renk değişimine bağlı olarak tespit etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer yandan Propolis-2'nin LD50 dozları ile 24 saat muamele edilen HeLa hücrelerinden elde edilen hücresel lizatların HDAC aktivitesinde artışa neden olduğu ve hücresel lizatlar elde edilirken yapılan yıkama işlemlerinden dolayı Propolis-2 ortamdan uzaklaştırıldığı için bu artışın Propolis-2'nin doğal renginden kaynaklanmadığı düşünülmektedir. Ancak bu bulgunun farklı deneysel yaklaşımların benimsendiği ilave çalışmalarla teyit edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Literatürde propolis ve propolisten izole edilen bileşenlerin HDAC aktivitesine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, çalışmamızla benzer şekilde propolis ve bileşenlerinin HDACi etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Ishiai ve diğ. 2014; Huang ve diğ. 2011; Ohashi ve diğ. 2017; Pal-Bhadra ve diğ. 2012; Sun ve diğ. 2012; Omene ve diğ. 2013). Yapılan çalışmalarda propolisin HDACi etkisi çeşitli kanser hücre hatlarının yanı sıra normal insan hücre hatlarında da araştırılmıştır. Bu çalışmalarda Brezilya, Çin, Kuzey Amerika ve Tayvan propolisi gibi farklı botanik kökene sahip propolisler kullanılmıştır. Propolisin kimyasal özelliklerinin ve içeriğindeki bileşenlerin, botanik kökeninin bulunduğu bölgeye göre değiştii bilinmektedir (Braakhuis 2019). Bu nedenle yapılan çalışmalarda kullanılan

propolisin türüne göre çalışma sonuçlarında farklılıklar gözlemlenebilmektedir (Bankova ve diğ. 2005). Çalışmamızın tüm bu çalışmalardan ayrılan özgün yönü Türk propolisinin HDAC aktivitesine etkisinin araştırılmasıdır. Çalışmaların tümünde HDAC aktivite tayininde metodolojik olarak benzerlik gösteren florometrik ve kolorimetrik yöntemler kullanılmıştır.

Ishiai ve diğ. (2014) tarafından yürütülen çalışmada Brezilya propolisinin HDAC inhibe edici etkisi ve fare nöroblastoma (Neuro2a) hücrelerinde antitümör etkisi araştırılmıştır. Brezilya propolisinin etanolik özütünün HDAC enzim aktivitesine etkisi *in vitro* olarak değerlendirilmiş ve BPE'nin sınıf I HDAC enzim aktivitesini doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir. Ardından, BPE tedavisinin, fare nöroblastoma (Neuro2a) hücrelerinde hücre içi histon asetilasyonuna etkisini incelemek için hücreler, 6 saat boyunca 100 ve 200 µg/mL dozlarında BPE ile muamele edilmiştir. Hücre içi histon asetilasyon seviyesi ölçüldüğünde, 200 µg/mL dozunda BPE muamelesinin, kontrole kıyasla rölatif asetilasyonu önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Ishiai ve diğ. 2014). Çalışmamızda uygulanan dozlar propolislerin LD50 konsantrasyonları olarak belirlenmiştir. LD50 dozları, HEK293T hücrelerinde Propolis-1 için 80 µg/mL ve Propolis-2 için 129 µg/mL, HeLa hücrelerinde Propolis-1 için 72,5 µg/mL ve Propolis-2 için ise 210 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Ishiai ve diğ. (2014) çalışmasında uygulanan konsantrasyonlar ile çalışmamızdaki konsantrasyonların farklı çıkmasının nedeni, propolislerin coğrafik kökeninin farklı olması, uygulanan propolis formlarının farklı olması ve uygulama yapılan hücre hatlarının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Pal-Bhadra ve diğ. (2012) tarafından propolisin en kapsamlı çalışılan biyoaktif bileşenlerinden biri olan krisinin, HDACi etkisini tespit etmek için kanser hücre hattı olan insan malign melanoma (A375) hücrelerinin krisin (40µM) ve TSA (4 µM) ile *in vitro* koşullarda 24 saat muamelesinin ardından A375 hücrelerinden elde edilen hücresel lizatlar ile bir dizi western blot analizi gerçekleştirilmiştir. HDAC2 ve HDAC8 protein seviyesinde ve enzim aktivitesinde azalma saptanarak krisinin HDAC2 ve HDAC8 inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca krisin ile muamele edilen A375 hücrelerinin, H3 ve H4 histonlarında asetilasyonun arttığı saptanmıştır.

Propolisin etken bileşeni krisinin kullanıldığı bir diğer çalışmada, Sun ve diğ. (2012) insan meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerinde propolisin HDAC aktivitesine etkisini araştırmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinin krisin ile muamelesinde ($EC_{50} = 40.2 \mu M$), enzimatik aktivite analizlerinden elde edilen sonuçlar, krisinin HDAC8 enzimatik aktivitesini belirgin şekilde inhibe eden bir histon deasetilaz inhibitörü olduğunu göstermiştir. Ayrıca bir ksenograft hayvan modelinde, günlük 90 mg/kg oral krisin uygulamasının tümör büyümesinin önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlenmiştir. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarla, krisinin tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe edebilen bir HDAC8 inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Sun ve diğ. 2012).

Propolis ve aktif bileşenlerinden CAPE'nin kullanıldığı bir çalışmada, insan meme kanseri (MDA-MB-231, MCF-7 ve SKBR3) hücre hatlarında hem propolisin hem de CAPE'nin onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin aktivitelerini düzenleyen bir histon deasetilaz inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. CAPE veya propolis ile *in vitro* koşullarda 24 saat muamele edilen MCF-7 ve MDA-231 hücrelerinden elde edilen lizatlarda histon proteinlerinin asetilasyonunda aşırı artış gösterilmiştir. Sağlıklı gönüllülerde CAPE içeriği standardize edilen propolis ile 3 haftalık oral müdahalenin ardından alınan periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) elde edilen protein lizatlarında da benzer şekilde H3 histon proteinlerinin asetilasyonunda aşırı artış saptanmıştır. Çalışma sonuçları CAPE'nin bileşik olarak etkilerinden ziyade CAPE miktarı standardize edilen propolisin HDACi etkisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Propolisin içeriğinde CAPE'nin yanı sıra krisin, propolin-G gibi HDACi etkileri farklı çalışmalarla kanıtlanmış olan bileşenleri birlikte bulundurması nedeniyle epigenetik etkilerinin arttığı ve HDACi etkisinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Omene ve diğ. 2013).

Çalışmamızla benzer şekilde kanser hücre hatlarının dışında normal insan hücre hatlarında da propolis ve bileşenlerinin HDACi etkiye sahip olabileceği Ohashi ve diğ. (2017) tarafından gösterilmiştir. Yapılan çalışmada, normal bir hücre hattı olan insan retina endotel hücrelerine (HREC) uygulanan CAPE'nin süperoksit dismutaz (SOD3) promotör bölgesindeki histon asetilasyonunu arttırarak HDACi etki gösterdiği tespit edilmiştir. SOD3, serbest radikal oluşumunu baskılayarak vücuttaki oksidatif stresi önlediği bilinmektedir (Ohashi ve diğ. 2017). Propolis ve

bileşeni CAPE'nin antioksidan etkilerini inceleyen bir çalışmada propolisin, süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesini arttırdığı ve serbest radikal oluşumunu baskılayarak oksidatif stresi önlediği gösterilmiştir (Alkis ve diğ. 2015). Çalışma sonuçlarındaki benzerlik CAPE'nin antioksidan etkisinin SOD3 promotör bölgesindeki histon asetilasyonunu arttırarak HDACi etki göstermesi ile ilişkili olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız Propolis-1'in içeriğinde bulunan CAPE ve krisin miktarları Propolis-2'ye göre çok daha yüksektir (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2). HDACi etkisi daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan bu iki bileşenin yüksek miktarları Türk Propolis-1'in HDACi etkisini desteklemektedir.

Huang ve diğ. (2011) çalışmasında, Tayvan yeşil propolisinden (TGP) izole edilen ve HDACi etkiye sahip olduğu kanıtlanan propolin G'nin yarı sentez yoluyla elde ettikleri NBM-HD-1 bileşiğini, yeni bir HDAC inhibitörü olarak tanımlamıştır. NBM-HD-1, insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve sıçan glioma hücrelerinde (C6) kanser hücrelerinin büyümesini baskılayan güçlü bir HDAC inhibitörüdür. NBM-HD-1 ayrıca histon asetilasyonunu artırmış, HDAC enzim aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsünü kontrol eden gen ekspresyonlarında değişikliklere neden olmuştur. Bu çalışma ile propolisten izole edilen ve HDACi özelliğine sahip bileşenlerin yarı sentetik HDAC inhibitörlerinin üretimi için potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Huang ve diğ. 2011).

Yapılan çalışmalarda farklı coğrafik bölgelerden elde edilmiş olan propolis ve bileşenlerinin çeşitli normal ve kanser hücre hatlarında HDACi özellikleri gösterilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler ışığında TP'nin bir normal hücre hattı olan HEK293T hücrelerinde 24 saatlik ve doğrudan uygulamalarının HDACi etkiye sahip olduğu, bir kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde ise 24 saatlik ve doğrudan uygulamalarının HDAC aktivitesinde çelişkili sonuçlar verdiği saptanmıştır. Yapılan kapsamlı literatür taraması ve güncel veriler göz önüne alındığında, çeşitli hastalıkların tedavisinde yüzyıllardır kullanılan Türk propolisinin, normal ve kanser hücre soylarında LD50 dozları referans alınarak ve kolorimetrik HDAC aktivite test kiti kullanılarak hücresel HDAC aktivitesi üzerine etkisi ilk kez çalışmamız kapsamında araştırılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Türk propolisinin insan normal embriyonik böbrek (HEK 293T) hücre hattı ve insan serviks kanseri (HeLa) hücre hattında HDAC aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya ilişkin sonuçlar ve öneriler aşağıda yer almaktadır.

Propolis-1'in 24 saatlik LD50 konsantrasyonlarının hem HEK293T (80 µg/mL) hem de HeLa (72,5 µg/mL) hücrelerinde Propolis-2'nin 24 saatlik LD50 konsantrasyonlarından (HEK293T 129 µg/mL ve HeLa 210 µg/mL) daha düşük olması, bu hücreler üzerinde toksik etkiler gösteren bileşenler bakımından Propolis-1'in daha zengin olduğunu göstermekte, dolayısıyla tüketimlerinde bu duruma dikkat edilmesi önerilmektedir.

Propolis-1'in, hem 24 saatlik LD50 konsantrasyonları uygulamasının hemde doğrudan hücresel lizatlarla muamelesinin, HEK293T ve HeLa hücrelerindeki HDAC aktivitesini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu nedenle Propolis-1'in HDACi etkisinden bahsetmek mümkündür.

Propolis-2'in doğrudan muamelesi bilgi verici olmamakla birlikte, 24 saatlik LD50 konsantrasyonlarının uygulaması ise normal hücrede HDAC aktivitesini düşürürken kanser hücresinde HDAC aktivitesini artırması çelişkili ve detaylı araştırılması gereken bir durumdur.

Birçok yararlı sağlık etkileri olduğu düşünüldüğünden gıda takviyesi olarak yaygın kullanılan propolisin HDAC aktivitesi üzerine etkileri olduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgu *in vivo* ve klinik çalışmalarla desteklendiği takdirde, propolisin gıda takviyesi olarak kullanım önerilerinde HDAC aktivitesi üzerine olan etkilerinin de değerlendirilmesi bir zorunluluk olarak karşımıza çıkabilir. Bu nedenle propolisin HDACi etkisinin araştırıldığı *in vivo* ve klinik çalışmaların planlanmasına gereksinim vardır.

Ayrıca HDAC inhibitörlerinin kanser tedavisinde antitümör ajan olarak kullanıldığı düşünülürse gerek Türk propolisinin gerekse propoliste bulunan bileşiklerin farklı kanser hücre soylarında HDAC aktivitesinde etkisinin *in vivo* ve *in*

vitro çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Bu çalışmalardan elde edilecek veriler ışığında; hastalıklarının tedavisinde kullanılan sentetik HDAC inhibitörlerinin yanı sıra besin kaynaklı HDAC inhibitörleri portföyünün genişletilmesi hedeflenmelidir.



KAYNAKLAR

- AKONE, S. H., NTIE-KANG, F., STUHLREIER, F., EWONKEM, M. B., NOAH, A. M., MOUELLE, S. E. M., & MÜLLER, R. (2020). Natural products impacting DNA methyltransferases and histone deacetylases. *Frontiers in Pharmacology*, *11*.
- ALKIS, H. E., KUZHAN, A., DIRIER, A., TARAKCIOGLU, M., DEMIR, E., SARICICEK, E., CINAR K., DEMIR T., AHLATCI A., & TAYSI, S. (2015). Neuroprotective effects of propolis and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the radiation-injured brain tissue (Neuroprotective effects of propolis and CAPE).
- ANDREESCU, N., PUIU, M., & NICULESCU, M. (2018). Effects of dietary nutrients on epigenetic changes in cancer. *Cancer Epigenetics for Precision Medicine*, 121-139.
- ANJUM, S. I., ULLAH, A., KHAN, K. A., ATTAULLAH, M., KHAN, H., ALI, H., BASHIR, M. A., TAHIR, M., ANSARI, M. J., GHAMH H. A., ADGABA, N., & DASH, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(7), 1695-1703.
- ARAUJO, M. A., LIBÉRIO, S. A., GUERRA, R. N., RIBEIRO, M. N. S., & NASCIMENTO, F. R. (2012). Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *22*(1), 208-219.
- ARU, B., GÜZELMERIC, E., AKGÜL, A., DEMIREL, G. Y., & KIRMIZIBEKMEZ, H. (2019). Antiproliferative activity of chemically characterized propolis from Turkey and its mechanisms of action. *Chemistry & biodiversity*, *16*(7), e1900189.
- AWALE, S., LI, F., ONOZUKA, H., ESUMI, H., TEZUKA, Y., & KADOTA, S. (2008). 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*, *16*(1), 181-189.
- BAE, J., KUMAZOE, M., FUJIMURA, Y., & TACHIBANA, H. (2019). Diallyl disulfide potentiates anti-obesity effect of green tea in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, *64*, 152-161.
- BALTAS, N., KARAOGLU, S. A., TARAKCI, C., & KOLAYLI, S. (2016). Effect of propolis in gastric disorders: inhibition studies on the growth of *Helicobacter pylori* and production of its urease. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *31*(sup2), 46-50.
- BANKOVA, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, *100*(1-2), 114-117.

- BANKOVA, V. S., DE CASTRO, S. L., & MARCUCCI, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- BANSKOTA, A. H., Y. TEZUKA, & S. KADOTA. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.* 15:561–571
- BARLAK, Y., DEĞER, O., ÇOLAK, M., KARATAYLI, S. C., BOZDAYI, A. M., & YÜCESAN, F. (2011). Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome science*, 9(1), 1-11.
- BASSETT, S. A., & BARNETT, M. P. (2014). The role of dietary histone deacetylases (HDACs) inhibitors in health and disease. *Nutrients*, 6(10), 4273-4301.
- BATISTA, L.L.V., CAMPESATTO, E.A., ASSIS, M.L.B.D., BARBOSA, A.P.F., GRILLO, L.A.M., DORNELAS, C.B. (2012) Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 39, 515–520.
- BAYRAM, N. E., SORKUN, K., OZ, G. C., SALIH, B., & TOPCU, G. (2018). Chemical characterization of 64 propolis samples from Hakkari, Turkey.
- BRAAKHUIS, A. (2019). Evidence on the health benefits of supplemental propolis. *Nutrients*, 11(11), 2705.
- BROSCH, G., LOIDL, P., & GRAESSLE, S. (2008). Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 32(3), 409-439.
- BURDOCK, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36:347–363.
- CAO, X. P., CHEN, Y. F., ZHANG, J. L., YOU, M. M., WANG, K., & HU, F. L. (2017). Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. *Phytomedicine*, 34, 76-84.
- CASTALDO, S. & CAPASSO, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 73:S1–S6.
- CHAN, G. C. F., CHEUNG, K. W., & SZE, D. M. Y. (2013). The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 44(3), 262-273.
- CHEN, Y. W., YE, S. R., TING, C., & YU, Y. H. (2018). Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. *journal of food and drug analysis*, 26(2), 761-768.
- CHOI, S. Y., KEE, H. J., JIN, L., RYU, Y., SUN, S., KIM, G. R., & JEONG, M. H. (2018). Inhibition of class IIa histone deacetylase activity by gallic acid, sulforaphane, TMP269, and panobinostat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 145-154.

- ÇELEMLİ, Ö. G., HATJINA, F., CHARISTOS, L., SCHIESSER, A., & ÖZKIRIM, A. (2013). More insight into the chemical composition of Greek propolis; differences and similarities with Turkish propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(11-12), 429-438.
- ÇETİN, E., KANBUR, M., SILICI, S., & ERASLAN, G. (2010). Propetamphos-induced changes in haematological and biochemical parameters of female rats: protective role of propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1806-1810.
- DALEPRANE, J. B., DA SILVA FREITAS, V., PACHECO, A., RUDNICKI, M., FAINE, L. A., DÖRR, F. A., IKEGAKI, M., SALAZAR, L.A., & ABDALLA, D. S. P. (2012). Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(6), 557-566.
- DARKIN-RATTRAY, S. J., GURNETT, A. M., MYERS, R. W., DULSKI, P. M., CRUMLEY, T. M., ALLOCCO, J. J., CANNOVA, C., MEINKE, P. T., COLLETTI, S. L., BEDNAREK, M. A., SINGH, S. B., GOETZ, M. A., DOMBROWSKI, A. W., POLISHOOK, J. D., & SCHMATZ, D. M. (1996). Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23), 13143-13147.
- DE GROOT AC. (2013) Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, 24, 263-282.
- DEMİR, S., ALIYAZICIOĞLU, Y., TURAN, I., MISİR, S., MENTESE, A., YAMAN, S. O., AKBULUT K., KILINC K., & DEGER, O. (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutrition and cancer*, 68(1), 165-172.
- DI RENZO, L., GUALTIERI, P., ROMANO, L., MARRONE, G., NOCE, A., PUJIA, A., & DE LORENZO, A. (2019). Role of personalized nutrition in chronic-degenerative diseases. *Nutrients*, 11(8), 1707.
- DOĞAN, N., & HAYOĞLU, I. (2012). Propolis ve Kullanım Alanları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 16(3), 39-48.
- EBEID, S. A., ABD EL MONEIM, N. A., EL-BENHAWY, S. A., HUSSAIN, N. G., & HUSSAIN, M. I. (2016). Assessment of the radioprotective effect of propolis in breast cancer patients undergoing radiotherapy. New perspective for an old honey bee product. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(4), 431-440.
- EL-GUENDOZ, S., LYOUSSI, B., & MIGUEL, M. G. (2019). Insight on propolis from mediterranean countries: chemical composition, biological activities and application fields. *Chemistry & biodiversity*, 16(7), e1900094.
- ERDOĞAN, S., ATEŞ, B., DURMAZ, G., YILMAZ, I., & SECKİN, T. (2011). Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1592-1597.

- FAROOQUI, T., & FAROOQUI, A. (2010). Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Current Nutrition & Food Science*, 6(3), 186-199.
- FERREIRA, J. M., FERNANDES-SILVA, C. C., SALATINO, A., NEGRI, G., & MESSAGE, D. (2017). New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3552-3558.
- FOKT, H., PEREIRA, A., FERREIRA, A. M., CUNHA, A., & AGUIAR, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481-493.
- FOLMER, F., ORLIKOVA, B., SCHNEKENBURGER, M., DICATO, M., & DIEDERICH, M. (2010). Naturally occurring regulators of histone acetylation/deacetylation. *Current Nutrition & Food Science*, 6(1), 78-99.
- FRANCHIN, M., FREIRES, I. A., LAZARINI, J. G., NANI, B. D., DA CUNHA, M. G., COLÓN, D. F., DE ALENCAR S. M., & ROSALEN, P. L. (2018). The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *European journal of medicinal chemistry*, 153, 49-55.
- FRESHNEY, R. I. (2015). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.
- FURUMAI, R., KOMATSU, Y., NISHINO, N., KHOCHBIN, S., YOSHIDA, M., & HORINOUCI, S. (2001). Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 87-92.
- GALLINARI, P., DI MARCO, S., JONES, P., PALLAORO, M., & STEINKÜHLER, C. (2007). HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell research*, 17(3), 195-211.
- GHISALBERTI, E. L. (1979) Propolis: A review. *Bee World* 60 (2): 59-84.
- HERMAN-ANTOSIEWICZ, A., & SINGH, S. V. (2004). Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by *Allium* vegetable-derived organosulfur compounds: a review. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555(1-2), 121-131.
- HOŞNUTER, M., GÜREL, A., BABUÇÇU, O., ARMUTCU, F., KARGI, E., & İŞIKDEMİR, A. (2004). The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns*, 30(2), 121-125.
- HUANG, S., ZHANG, C. P., WANG, K., LI, G. Q., & HU, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.

- HUANG, W. J., LIN, C. W., LEE, C. Y., CHI, L. L., CHAO, Y. C., WANG, H. N., CHIOU, B. L., CHEN, T. J., HUANG, C. Y., & CHEN, C. N. (2011). NBM-HD-3, a novel histone deacetylase inhibitor with anticancer activity through modulation of PTEN and AKT in brain cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(1), 156-167.
- IMHOF, M., LIPOVAC, M., KURZ, C. H., BARTA, J., VERHOEVEN, H. C., & HUBER, J. C. (2005). Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *International journal of gynecology & obstetrics*, 89(2), 127-132.
- ISHIAI, S., TAHARA, W., YAMAMOTO, E., YAMAMOTO, R., & NAGAI, K. (2014). Histone deacetylase inhibitory effect of B razilian propolis and its association with the antitumor effect in Neuro2a cells. *Food science & nutrition*, 2(5), 565-570.
- IVEY, K. L., JENSEN, M. K., HODGSON, J. M., ELIASSEN, A. H., CASSIDY, A., & RIMM, E. B. (2017). Association of flavonoid-rich foods and flavonoids with risk of all-cause mortality. *British Journal of Nutrition*, 117(10), 1470-1477.
- KAZANTSEV, A. G., & THOMPSON, L. M. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature reviews Drug discovery*, 7(10), 854-868.
- KELLY, W. K., & MARKS, P. A. (2005). Drug insight: histone deacetylase inhibitors—development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2(3), 150-157.
- KHAN, O., & LA THANGUE, N. B. (2012). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology and cell biology*, 90(1), 85-94.
- KISMET, K., OZCAN, C., KURU, S., CELEMLI, O. G., CELEPLI, P., SENES, M., GUCLU, T., SORKUN, K., HUCUMENOGLU, S., & BESLER, T. (2017). Does propolis have any effect on non-alcoholic fatty liver disease?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 863-871.
- KÖNIG, B. (1985). Plant sources of propolis. *Bee world*, 66(4), 136-139.
- KRELL, R. (1996). *Value-added products from beekeeping* (No. 124). Food & Agriculture Org.
- KRETISOVALI, A., HADJIMICHAEL, C., & CHARMPILAS, N. (2012). Histone deacetylase inhibitors in cell pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Stem cells international*, 2012.
- KUMAR, S., AHMAD, M. K., WASEEM, M., & PANDEY, A. K. (2015). Drug targets for cancer treatment: an overview. *Med chem*, 5(11523), 2161-0444.
- LEE, C. Y., & GRANT, P. A. (2019). Role of histone acetylation and acetyltransferases in gene regulation. In *Toxicoepigenetics* (pp. 3-30). Academic Press.

- LIU, R., LI, J. Z., SONG, J. K., SUN, J. L., LI, Y. J., ZHOU, S. B., ZHANG, T.T, & DU, G. H. (2014). Pinocembrin Protects Human Brain Microvascular Endothelial Cells against Fibrillar Amyloid- β 1–40 Injury by Suppressing the MAPK/NF- κ B Inflammatory Pathways. *BioMed Research International*, 2014.
- LOSSON, H., SCHNEKENBURGER, M., DICATO, M., & DIEDERICH, M. (2016). Natural compound histone deacetylase inhibitors (HDACi): synergy with inflammatory signaling pathway modulators and clinical applications in cancer. *Molecules*, 21(11), 1608.
- MAHAL, N. K., SINGH, N., THOMAS, A. M., & KAKKAR, N. (2013). Effect of three different storage media on survival of periodontal ligament cells using collagenase–dispase assay. *International endodontic journal*, 46(4), 365-370.
- MARCUCCI, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26:83–99.
- MARCUCCI, M. C., FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C., BANKOVA, V. S., DE CASTRO, S. L., DANTAS, A. P., VALENTE P. H. M., & PAULINO, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of ethnopharmacology*, 74(2), 105-112.
- MERCAN, N., KIVRAK, I., DURU, M. E., KATIRCIOGLU, H., GULCAN, S., MALCI, S., ACAR G., SALIH, B. (2006). Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. *Annals of microbiology*, 56(4), 373-378.
- MICHALUART, P., MASFERRER, J. L., CAROTHERS, A. M., SUBBARAMAIAH, K., ZWEIFEL, B. S., KOBOLDT, C., MESTRE, J.R., GRUNBERGER, D., SACKS, P.G., & DANNENBERG, A. J. (1999). Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer research*, 59(10), 2347-2352.
- MILLER, P. E., & SNYDER, D. C. (2012). Phytochemicals and cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition in Clinical Practice*, 27(5), 599-612.
- MILLER, T. A., WITTER, D. J., & BELVEDERE, S. (2003). Histone deacetylase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 46(24), 5097-5116.
- MOTTAMAL, M., ZHENG, S., HUANG, T. L., & WANG, G. (2015). Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules*, 20(3), 3898-3941.
- MYZAK, M. C., KARPLUS, P. A., CHUNG, F. L., & DASHWOOD, R. H. (2004). A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. *Cancer research*, 64(16), 5767-5774.
- NAKANISHI, I., UTO, Y., OHKUBO, K., MIYAZAKI, K., YAKUMARU, H., URANO, S., FUKUZUMI, S. (2003). Efficient radical scavenging ability of

- artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. *Organic & biomolecular chemistry*, 1(9), 1452-1454.
- OHASHI, A., YASUDA, H., KAMIYA, T., HARA, H., & ADACHI, T. (2017). CAPE increases the expression of SOD3 through epigenetics in human retinal endothelial cells. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 16-109.
- OMENE, C., KALAC, M., WU, J., MARCHI, E., FRENKEL, K., & O'CONNOR, O. A. (2013). Propolis and its active component, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), modulate breast cancer therapeutic targets via an epigenetically mediated mechanism of action. *Journal of cancer science & therapy*, 5(10), 334.
- ORYAN, A., ALEMZADEH, E., & MOSHIRI, A. (2018). Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 469-483.
- OZDAL, T., SARI-KAPLAN, G., MUTLU-ALTUNDAG, E., BOYACIOGLU, D., & CAPANOGLU, E. (2018). Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 627-638.
- PAL-BHADRA, M., RAMAIAH, M. J., REDDY, T. L., KRISHNAN, A., PUSHPAVALLI, S. N. C. V. L., BABU, K. S., TIWARI, A. K., RAO, J. M., YADAV, J. S., & BHADRA, U. (2012). Plant HDAC inhibitor chrysin arrest cell growth and induce p21 WAF1 by altering chromatin of STAT response element in A375 cells. *BMC cancer*, 12(1), 1-17.
- PAROLIA, A., THOMAS, M. S., KUNDABALA, M., & MOHAN, M. (2010). Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Science*, 2(7), 210-215.
- PAULINO, N., TEIXEIRA, C., MARTINS, R., SCREMIN, A., DIRSCH, V. M., VOLLMAR, A. M., MARCUCCI, M. C. (2006). Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis.
- PESERICO, A., & SIMONE, C. (2010). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- POPOVA, M., SILICI, S., KAFTANOGLU, O., & BANKOVA, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12(3), 221-228.
- RAMOS, A. F. N., & MIRANDA, J. D. (2007). Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(4), 697-710.
- RUFATTO, L. C., DOS SANTOS, D. A., MARINHO, F., HENRIQUES, J. A. P., ELY, M. R., & MOURA, S. (2017). Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), 591-598.

- SALOMAO, K., DE SOUZA, E. M., HENRIQUES-PONS, A., BARBOSA, H. S., & DE CASTRO, S. L. (2011). Brazilian green propolis: effects in vitro and in vivo on *Trypanosoma cruzi*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- SANAEI, M., & KAVOOSI, F. (2019). Histone deacetylases and histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action in various cancers. *Advanced biomedical research*, 8.
- SAWICKA, D., H. CAR, M. H. BORAWSKA, & J. NIKLINSKI. (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochem. Cytobiol.* 50:25–37.
- SENESE, S., ZARAGOZA, K., MINARDI, S., MURADORE, I., RONZONI, S., PASSAFARO, A. & CHIOCCA, S. (2007). Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation. *Molecular and cellular biology*, 27(13), 4784-4795.
- SFORCIN, J. M. (2007) Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 113 (1): 1-14
- SILICI, S., KOÇ, N. A., AYANGIL, D., & ÇANKAYA, S. (2005). Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Journal of pharmacological sciences*, 99(1), 39-44.
- SILICI. S., UNLU. M., VARDAR-UNLU. G. (2007). Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *Eorld J Microbiol Biotechnol.* 23(12): 1797-1803.
- SINGH, A. K., BISHAYEE, A., & PANDEY, A. K. (2018). Targeting histone deacetylases with natural and synthetic agents: an emerging anticancer strategy. *Nutrients*, 10(6), 731.
- SORKUN, K., SÜER, B., & SALIH, B. (2001). Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(7-8), 666-668.
- SUGANUMA, T., & WORKMAN, J. L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annual review of biochemistry*, 80, 473-499.
- SUN, L. P., CHEN, A. L., HUNG, H. C., CHIEN, Y. H., HUANG, J. S., HUANG, C. Y., CHEN, Y. V., & CHEN, C. N. (2012). Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(47), 11748-11758.
- SZLISZKA, E., CZUBA, Z. P., DOMINO, M., MAZUR, B., ZYDOWICZ, G., & KROL, W. (2009). Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules*, 14(2), 738-754.

- TARTIK, M., DARENDELIOGLU, E., AYKUTOGLU, G., & BAYDAS, G. (2016). Turkish propolis supresses MCF-7 cell death induced by homocysteine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 704-712.
- TEMİZ, A., ŞENER, A., ÖZKÖK TÜYLÜ, A., SORKUN, K., SALIH, B. (2011). Antibacterial Activity of Bee Propolis Samples from Different Geographical Regions of Turkey Against Two Foodborne Pathogens, Salmonella Enteritidis and Listeria Monocytogenes Turk J Biol, TÜBITAK, 35/503-511.
- TERCAN AVCI, S. (2010). *Histon modifikasyonlarının hücre proliferasyonu üzerine etkileri* (Doctoral dissertation, DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- UZEL, A., ÖNÇAĞ, Ö., ÇOĞULU, D., & GENÇAY, Ö. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research*, 160(2), 189-195.
- VATANSEVER, H. S., SORKUN, K., GURHAN, S. I. D., OZDAL-KURT, F., TURKOZ, E., GENÇAY, O., & SALIH, B. (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta histochemica*, 112(6), 546-556.
- VELIKOVA, M., BANKOVA, V., SORKUN, K., POPOV, S., & KUJUMGIEV, A. (2001). Chemical composition and biological activity of propolis from Turkish and Bulgarian origin. *Mellifera*, 1(1): 57-59
- WHITTAKER, S., MCCULLOCH, W., ROBAK, T., & BARAN, E. (2006). International multicenter Phase II study of the HDAC inhibitor (HDACi) depsipeptide (FK228) in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): interim report. *Journal of Clinical Oncology*, 24(18_suppl), 3063-3063.
- WITT, O., & LINDEMANN, R. (2009). HDAC inhibitors: magic bullets, dirty drugs or just another targeted therapy. *Cancer letters*, 280(2), 123-124.
- YING, Y., TAORI, K., KIM, H., HONG, J., & LUESCH, H. (2008). Total synthesis and molecular target of largazole, a histone deacetylase inhibitor. *Journal of the American Chemical Society*, 130(26), 8455-8459.
- YÜCEL, B., TOPAL, E., AKÇIÇEK, E., & KÖSOĞLU, M. (2014). Propolisin insan sağlığına etkileri. *ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24(2), 41-49.