



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAFRA ASİDİNİN NEDEN OLDUĞU
HEPATOTOKSİSİTEYE KARŞI C3A HÜCRE HATTINDA
PROPOLİS EKSTRAKTININ OLASI KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ümmügülsüm BENEK

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2015
BOLU



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAFRA ASİDİNİN NEDEN OLDUĞU
HEPATOTOKSİSİTEYE KARŞI C3A HÜCRE HATTINDA
PROPOLİS EKSTRAKTININ OLASI KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ümmügülsüm BENEK

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Kenan GÜMÜŞTEKİN

HAZİRAN 2015

BOLU

Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Fizyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Ümmügülsüm BENEK tarafından hazırlanan ve 30/06/2015 tarihinde savunulan “Safra Asidinin Neden Olduğu Hepatotoksisiteye Karşı C3A Hücre Hattında Propolis Ekstraktının Olası Koruyucu Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kenan GÜMÜŞTEKİN (imza)

(Fizyoloji AD., AİBÜ)

Yrd. Doç. Dr. Recep BAYRAM (imza)

(Tıbbi Farmakoloji AD., AİBÜ)

Yrd. Doç. Dr. Murat DIRAMALI (imza)

(Anatomi AD., AİBÜ)

Tarih : 30/06/2015

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Ümmügülsüm BENEK'in Yüksek Lisans / Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYAZ (imza)

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

* Jüri Başkanının adı yazılmalıdır.

** Tez danışmanın adı yazılmalıdır.

*** Savunma tarihi yazılmalıdır.

****Öğrencinin adı, soyadı yazılmalıdır.

ÖZET

Kolestaz, duodenuma safra akımının azalması veya yokluğu olarak tanımlanabilir. Safra akımının safra taşı ya da tümörü gibi bir sebeple bozulması sonucu oluşan kolestazda karaciğer hasarı oluşur. Kolestazda safra komponentlerinin artışına inflamasyon ve hepatosit ölümü eşlik eder ve safranin toksik etkileri ve dilate safra kanallarında oluşan mekanik basıncın kolestaza sebep olduğuna inanılmaktadır.

Son yıllarda alternatif tedavi seçenekleri tıbbi tedaviye ilave olarak özellikle beşeri hekimlik alanında giderek önem kazanmaktadır. Alternatif tedavide kullanılan propolis, biyolojik yönden aktif olan birçok bileşiği içeriğinde bulunduran doğal bir üründür. Propolisin, farklı toksik maddelerin neden olduğu karaciğer hasarına karşı etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda safra asitleri ile indüklenen toksisiteye karşı propolisin etkilerine yönelik literatürdeki eksikliğin gidermeyi amaçladık.

Bu çalışmada C3A insan hepatosellüler karsinoma hücre hattı kullanılmıştır. Safra asidi olarak Glikokenodeoksikolik asit kullanılarak toksisite oluşturulmuştur. Düzce Üniversitesi Arıcılık Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezinden (DAGEM) temin edilen propolis su ve alkol ekstraktlarının safra toksisitesine karşı etkinliği araştırılmıştır. Hücre canlılığı MTT testi kullanılarak ve hücre morfolojileri de ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir.

Safra toksisitesinden önce uygulanan propolisin su ekstraktının denenen bütün dozlarının hücre canlılığını anlamlı derecede olumlu etkilediği, ancak toksisite oluşturulduktan sonra uygulanmasında ise yüksek dozların hücre canlılığını olumlu etkilediği görülmüştür. Safra toksisitesinden önce ve sonra uygulanan alkol ekstraktının ise en düşük dozunun hücreleri koruduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın sonuçları ve literatür propolisin karaciğeri koruduğunu ortaya koymuş ancak hücresel mekanizmaları açığa çıkarmamıştır. Sonuç olarak çalışmamız, propolis ekstraktlarındaki bileşenlerin ayrıştırılarak saf hale getirilip safra toksisitesine karşı araştırılmasının değerli olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Kolestaz, Safra Asidi, Glikokenodeoksikolik asit, MTT, Akridin turuncusu, C3A Hücre Hattı, Hücre Kültürü

ABSTRACT

Cholestasis is defined that the reduction or absence of bile acid secretion. Liver damage is performed by cholestasis that induced obstruction via gallstone or tumor. Inflammation and death of hepatocyte is accompanied with increasing of bile acid components in cholestasis. It is believed that toxic effects of bile acid and mechanical pressure cause cholestasis.

The propolis, is an increasingly important alternative product for treatment of human medicine during recent years, includes many active components. Many studies have shown that propolis is effective against liver damage caused by various toxic substances. There are few studies about the efficacy of propolis against toxicity in literature.

C3A human hepatocellular carcinoma cell line were used in this study. Toxicity was created using Glycochenodeoxycholic acid as a bile acid. Against bile acid toxicity, we investigated effect of aqueous and alcholic extract of propolis was supplied by Düzce University Beekeeping Research, Development and Application Center. Cell viability and morphology was assessed with MTT test and the light microscope, respectively.

Significantly positive effects on cell viability was shown by high dose of aqueous of propolis after the bile acid toxicity. All dose of aques of propolis have positive effects on cell viability before the bile acid toxicity. Low dose alcoholic extract has positive effects on cell viability before and after the bile acid toxicity.

The results of this study and the literature revealed that propolis protects the liver. However the cellular mechanism of protection is not clearly. The results of study suggest that seperated active component is valuable to study for bile acid toxicity

Keywords: Propolis, Cholestasis, Bile acid, Glycochenodeoxycholic acid, Acridin Orange, C3A cell line, Cell culture.

TEŞEKKÜR

Fizyoloji Anabilim Dalında Lisans Üstü eğitim yaptığım süre boyunca hem akademisyenlik mesleğine hem de hayata yaklaşımıyla bizlere örnek olan, bilgisini ve deneyimlerini bizlerle paylaşan, Hocam Prof. Dr. Kenan GÜMÜŞTEKİN'e; eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Hocam Prof. Dr. Fatma TÖRE'ye ve çalışmalarım süresince laboratuvar ortamını sunan ve yardımcı olan Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Recep BAYRAM'a, tez çalışmalarımda yakın desteğini ve emeğini gördüğüm eşim Öğr. Gör. Bedri Selim BENEK'e, ayrıca tüm bu çalışmalarım boyunca uğurum olan kızım Esra BENEK'e teşekkür ederim.

Ümmügülsüm BENEK

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi	2
2.2. Karaciğer Fizyolojisi	7
2.3. Safranın Yapısı ve Fizyolojisi	8
2.4. Kolestaz	13
2.5. Propolis.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Kimyasallar	18
3.2. Hücre Kültürü.....	19
3.2.1. Hücre Ekimi	19
3.2.2. Tripsinizasyon	19
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	20
3.3. Deney Dizaynı	20
3.3.1. Safra Asit Toksisitesinin Oluşturulması.....	20
3.3.2. Propolis Koruyuculuğunun Araştırılması.....	21
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	22

4. BULGULAR	23
4.1. Glikokenodeoksikolik Asit Toksik Dozlarının Belirlenmesi	23
4.2. Propolis Ekstraktlarının Toksik Etkilerinin Belirlenmesi	24
4.3. Propolisin GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	25
4.3.1. Propolisin Alkol Ekstraktının (PAE) 1 mM GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	25
4.3.2. Propolisin Alkol Ekstraktının (PAE) 1,5 mM GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	26
4.3.3. Propolisin Su Ekstraktının (PSE) 1 mM GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	28
4.3.4. Propolisin Su Ekstraktının (PSE) 1,5 mM GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	30
4.4. Propolis Ekstraktlarının GCDCA Toksisitesine Karşı Etkinliğinin Akridin-Oranj Boyama ile Gözlemsel Değerlendirilmesi.....	32
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
7. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ.....	44

ÇİZELGELER

Grafik 1. GCDCA toksik dozlarının MTT testi ile belirlenmesi.	24
Grafik 2. Propolis ekstraktlarının C3A hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi.	24
Grafik 3. 1 mM GCDCA toksisitesinden sonra uygulanan propolis alkol ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.	25
Grafik 4. 1 mM GCDCA toksisitesinden önce uygulanan propolis alkol ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.	26
Grafik 5. 1.5 mM GCDCA toksisitesinden sonra uygulanan propolis alkol ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.	27
Grafik 6. 1.5 mM GCDCA toksisitesinden önce uygulanan propolis alkol ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.	27
Grafik 7. 1 mM GCDCA toksisitesinden sonra uygulanan propolis su ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.	28
Grafik 8. 1 mM GCDCA toksisitesinden önce uygulanan propolis su ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.	29
Grafik 9. 1.5 mM GCDCA toksisitesinden önce uygulanan propolis su ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.	30
Grafik 10. 1.5 mM GCDCA toksisitesinden sonra uygulanan propolis su ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.	31

ŞEKİLLER

Şekil 1. Karaciğer lobüllerinin şematik görünümü.	6
Şekil 2. Karaciğer lobülünün yapısı.	6
Şekil 3. Safra asiti sentez yolağı.	9
Şekil 4. Safra kesesi anatomik yerleşimi.	10
Şekil 5. Safra salgılanması.	11
Şekil 6. Safra asit dolaşımı ve emilimi.	12
Şekil 7. Propolis.	16
Şekil 8. Propolis ekstraktları etkin dozlarının GCDCA toksisitesine karşı florasana boyama ile gözlemsel değerlendirilmesi.	32

SİMGELER VE KISALTMALAR

GCDCA	Glikokenodeoksikolik asit
C3A	İnsan hepatosellüler karsinoma hücre hattı
CA	Kolik asit
CDCA	Kenodeoksikolik asit
GCA	Glikokolik asit
TDCA	Taurodeoksikolik asit
DCA	Deoksikolik asit
LCA	Litokolik asit
TCA	Taurokolik asit
FXR	Farnesoid X reseptörü
vki	Vena kava inferior
H ₂ O	Su
PSE	Propolis su ekstraktı
PAE	Propolis alkol ekstraktı
CCK	Kolesistokinin
TGR5	Safra asitleri için G proteini bağlı reseptör 5

1. GİRİŞ

Karaciğer organizmadaki konumu nedeniyle birçok yabancı maddenin metabolizmasından sorumludur. Birçok ilaç metabolizması fonksiyonundan dolayı, ilaç toksisitesi açısından savunmasız ve hedef organdır. Karaciğer parankiminde meydana gelen hasarlanma, etkin bir rejenerasyon ve onarımla cevaplanmazsa normal karaciğer yapısı bozulur. Bundan dolayı siroza kadar gidebilecek karaciğer hasarlarının daha başlangıç döneminde engellenmesi önem kazanmaktadır. Kronikleşen karaciğer hasarı ve siroz özellikle Batı ülkelerinde ilk sıralarda gelen ölüm sebeplerindendir.

Hepatotoksisite çeşidi olan kolestaz, ekstrahepatik ya da intrahepatik bilier basıncın artması, safra kanalının tıkanması ve safra tuzlarının karaciğer içinde birikimi ile karakterize olan patofizyolojik bir durumdur. Akut safra yolu tıkanıklıkları; kanaliküler kolestaz, safra duktus hücreleri proliferasyonu, portal traktüs değişiklikleri, kronik süreçte periduktal bağ dokusu artışı ve fibroz tabakaların gelişimi ile sonuçlanır.

Giderek önemi artan propolis doğal bir üründür. Pro- (savunma için) ve –polis (şehir ya da topluluk) kelimelerinden türetilmiştir. “Şehrin savunulmasındaki madde” anlamına gelmektedir. Bal arıları tarafından bitki ve ağaçların yaprak ve sürgünlerinden toplanan reçineli bir karışımdır.

Safra tıkanıklığı ameliyatları öncesi bekleme süresinde karaciğerin korunmasına yönelik henüz yeterli bir tedavi yaklaşımının bulunmaması bu konudaki çalışmalara ihtiyaç doğurmaktadır. Çalışmamızda Propolis ekstraktının safra asit kaynaklı hepatotoksisiteye karşı hepatosit canlılığı üzerine olası koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmalarımız sonucunda Propolis ekstraktının in vitro hücre kültürü ortamında etkinliğinin varlığı çalışmanın deney hayvanlarında da uygulanmasını gerekli kılmaktadır. Böylelikle safra tıkanıklığı ameliyatları öncesindeki bekleme süresinde karaciğerin korunmasına yönelik propolis ekstraktının yardımcı tedavi olarak kullanılmasının önü açılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Anatomisi ve Histolojisi

Vücudun en büyük karın içi organı ve bezi karaciğerdir. Elastik ve kollajen lif içeren hilumda kalınlaşan ince bir bağ dokusu kapsülü ile sarılı olarak sağ 7.-11. kaburgaların arkasına yerleşmiştir (1-3). Normal uzunluğu 20-25 cm, yüksekliği 14-17 cm, önden arkaya doğru genişliği 10-14 cm'dir (4). Ağırlığı 1,5 kg'dır. Kızıl kahve renkte olan karaciğerin gevrek ve jöle kıvamında, dokununca bükülebilen bir yapısı vardır (5). Karaciğerin anterior, superior, posterior yönlerdeki konveks üst yüzüne diyaframatik yüz; inferior yönünde ise iç organlar ile komşu konkav alt yüzüne visseral yüz denir (3, 5). Karaciğer intraperitoneal bir organ olup diaframaya komşu olan area nuda kısmı hariç neredeyse tamamı periton ile kaplıdır (6). Diaframa aracılığı ile akciğer, plevra, fibröz perikardiyum ve kalbin ventriküler bölümünden ayrılır (2,3).

Karaciğer ön yüzünde bulunan ligamentum falciforme hepatis ile sağ ve sol loblara ayrılır. Sağ lob büyük ve tek parça olup, sol lob lobus quadratus ile lobus caudatusun büyük kısmını kapsar (3, 7). Sağ ve sol loblar kanlanma ve safra drenajı yönünden bağımsızdır, buna göre karaciğer sekiz segmente ayrılmıştır; ayrıca lobus caudatus %80 olguda her iki loblada bağlantılıdır (6, 7). Segmentasyon, sağ ve sol a. hepatica propria, v. portae hepatis ve ductus hepaticus communis'in ana dalları göz önüne alınarak yapılır (7).

Karaciğere akan kan, kalp debisinin yaklaşık %25'i kadardır. Ayrıca karaciğer vücudun toplam kanının %15'ini bulundurur. Kanamalarda hepatik kan akımının yaklaşık yarısı kapasitans damarların kasılması ile hızlıca dışarı verilir (8). Karaciğer, a. hepatica propria (%20 - %30) ve v. portae hepatis (%70 - %80) olmak üzere iki kaynaktan beslenir. Venöz drenajı hepatika venüller ile sağlanır. Santral venüllerin birleşmesi ile oluşan hepatik venler genelde üç tane olup diyaframın hemen aşağısında vena cava inferior'a (VCI) açılırlar. Hepatik venler intrahepatiktir. Karaciğeri VCI'a asan bu venler karaciğerin pozisyonunda kalmasına yardımcı olur (2, 6, 7).

Karaciğer, ductus thoracicus'a gelen lenf sıvısının %25-%50'sini üretir. Karaciğerin lenf damarları yüzeysel ve derin olmak üzere iki grupta toplanır. Yüzeysel olanları Glisson kapsülünde, derin olanları ise karaciğer damarları etrafındaki bağ

dokusu içerisinde bulunur (7). Yüzeyel lenf damarları; VCI'un terminal kısmında bulunan lenf nodüllerinden, hepatik ve çölyak noda açılır. Derin grup lenf damarları ise VCI'un terminal kısmında bulunan lenf nodüllerine ve hepatik nodüle açılır (5). Karaciğerin lenfatik drenajı esas olarak; hepatik nod → çölyak nod → cisterna chyli → ductus thoracicus şeklindedir (6).

Karaciğerin innervasyonu plexus hepaticus ile sağlanır. Plexus hepaticus, plexus coeliacus'tan köken alan en büyük sekonder otonom pleksustur. Sempatik lifler vazokonstriktördür. Diğer liflerin karaciğerdeki fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (2, 6, 7). Hepatik arterin vazokonstriktör sinirleri, sempatik pleksusundan geldiği bilinmektedir. Karaciğere vazodilatatör liflerin geldiğine dair bir bilgi yoktur (9).

Safra kesesi (vesica biliaris); karaciğerin visseral yüzündeki fossa vesika biliarise yerleşmiş, 7-10 cm uzunluğunda, armut şekline benzeyen ve safranin konsantre hale getirilip depolandığı bir organdır. Fundus, collum ve corpus olmak üzere üç kısma ayrılır (7). Fundus, kesenin genişlemiş alt bölümüdür ve karaciğerin alt kenarını aşar. Corpus, karaciğerin visseral yüzüne temas eder. Collum ise iç yana ve aşağıya dönerek porta hepatis'e doğru ductus cysticus ile uzanır. Safra kesesi ve salgı kanallarının duyusunu sağ nervus frenikus alır. Bu sinir lifleri çölyak pleksus vasıtasıyla organa ulaşır. Buna bağlı olarak kese patolojilerinde yansıyan ağrı sağ omuzda hissedilir. Parasempatik uyarı, safra kesesinde kasılma, Oddi sfinkterinde gevşemeye yol açar. Sempatik lifler ise sfinkterlerin kasılmasını sağlar.

Safra kesesinin boşalma mekanizması sinirsel kontrolden çok hormonalıdır. Ağıza yiyecek alındığında ve yağ içeren besinlerin duodenuma teması ile salgılanan kolesistokinin ve safra kesesinde biriken safranin basıncı 100 mm H₂O'yu aştığı zaman safra kesesindeki düz kasların kasılmasına neden olur, Oddi sfinkteri gevşer ve safra duodenuma akar (6, 9-11). Safra kesesi duvarındaki düz kas lifleri kasıldıkları zaman keseyi tamamen boşaltacak güçte değildir. Musculus sphincter ductus choledochi'nin ritmik kasılmaları sonucu oluşan vakum ve kesenin konumu sayesinde kese boşalması kolaylaşır (10).

Safra hepatositler tarafından üretilir ve hepatositlerin aralarına yerleşmiş duvar yapıları olmayan, dar aralıklı hücrelerarası boşluk olan safra kanalcıklarına geçerler. Bu kanalcıklar lobüllerin periferinde birleşerek intralobüler kanalcıkları (Hering kanalları) oluşturur. Bunlarda birleşerek fonksiyonel olarak karaciğerin sağ ve sol loblarını drene eden sağ ve sol hepatik kanalları oluşturur. Bu iki kanal, porta hepatis'te birleşerek yaklaşık 3 cm uzunluğundaki ductus hepaticus communis'i yapar. Sistik kanal safra kesesini boşaltır. Hepatik kanal sistik kanalla birleşerek ortak safra kanalını (ductus choledochus, ductus biliaris) oluştururlar ve bu kanal duodenuma, duodenal papilladan girer. Bu giriş etrafında Oddi sfinkteri ile çevrili olup genellikle ortak safra kanalı duodenuma girmeden ana pankreatik kanalla birleşir. Ductus choledochus yaklaşık 8 cm uzunluğunda ve 6 mm çapında olup ligamentum hepatoduodenale içindedir. Ductus choledochus'un distal ucundaki kaslar kalınlaşarak m. sphincter ductus choledochi'yi oluşturur. Bu sfinkter kasıldığında safra ampullaya ve duodenuma geçemeyeceği için seviye yaparak safra kesesinde depolanır. Safra kesesinin maksimum hacmi 30-60 ml'dir. Ductus choledochus ve pankreatik kanal (Wirsung kanalı) birleşerek etrafında m. sphincter ampullae'nın (Oddi sfinkteri) bulunduğu ampulla hepatopancreatica'yı oluşturur ve duodenum'un ikinci parçasındaki papilla duodeni majorun (Vater tuberkülü) tepesine açılır. Ampullanın distal ucu, safra kanallarının en dar yeri olup, safra taşı tıkanıklarının en sık olduğu bölgedir. Bununla beraber ductus cysticus veya duktus hepaticus'a da yerleşebilir ve epigastrik bölgede safra koliğine neden olur (1, 2, 5-9).

Karaciğerde beş tip hücre bulunmaktadır. Bunlar; hepatositler, kupffer hücreleri, endotel hücreleri, stellat hücreleri ve safra kanalı epitelyum hücreleridir (12).

Hepatositler: Karaciğerdeki hücrelerin yaklaşık %80'ini oluştururlar. Karaciğerin, endokrin ve ekzokrin görev yapan fonksiyonel hücreleridir. Fonksiyonu safra salgılamasıdır. Bunun yanında, albümin, globülin, fibrinojen, lipoprotein, protrombin gibi proteinlerin ve glikozun sentezlenip salgılanmasıdır. 20-30 mikrometre çapındadırlar. Histolojik yapıları bakımından ışık mikroskopunda poligonal veya kübik şekilli olup, nükleusları merkezde ve yuvarlaktır. Asidofilik sitoplazmaya sahiptir. Organel bakımından zengindirler. En yoğun olarak endoplazmik retikulum içerirler. Bununla birlikte oldukça fazla metabolik

aktivitelerinden dolayı, peroksizom, lizozom, mitokondri gibi organellerde çok sayıda bulunur.

Hepatositlerin iki yüzü bulunmaktadır. Bazolateral yüz, hepatositlerin sinüzoidlere ve disse aralığına bakan yüzünü oluşturur. Bu yüzünde çok sayıda mikrovillus bulunur. Apikal yüz ise; safranin salgılandığı kısmı oluşturur. Hücreler arasındaki zonula okludens tipi sıkı bağlantılar ile safranin kanalikül dışına sızması engellenmiş olur. Bu bölge safranin geri kaçışını önleyerek bir tür kan-safra bariyeri oluşturur (12, 14, 15).

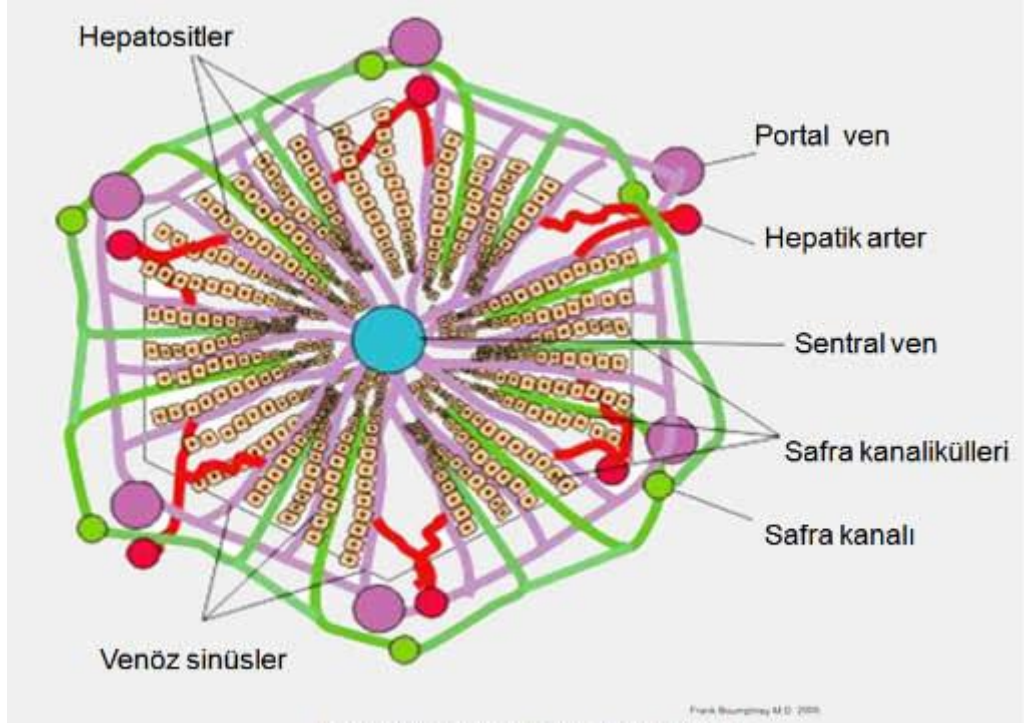
Endotel Hücreleri: Sinüzoidlerin duvarlarında yer alan madde geçişine izin veren hücrelerdir. Karaciğerin vasküler bir organ olması nedeniyle endotel hücreler bol bulunmaktadır. Barsaklardan gelen büyük moleküllerin hepatositlere geçişine olanak sağlar (12, 14).

Kupffer Hücreleri: Lokal makrofajlardır ve perisinüzoidal alanda yer alırlar (16). Mononükleer fagositer sistemin elemanıdır (17). Hücrel bağışıklığın aktive edilmesinde rol oynar (12, 18). İmmünolojik olaylarla ilgili proteinlerin salgılanması, yaşlı eritrositlerin metabolize edilmesi, hemoglobinin sindirilmesi ve kalın bağırsaktan portal kana geçen bakterilerin ortadan kaldırılması gibi görevleri bulunmaktadır (13).

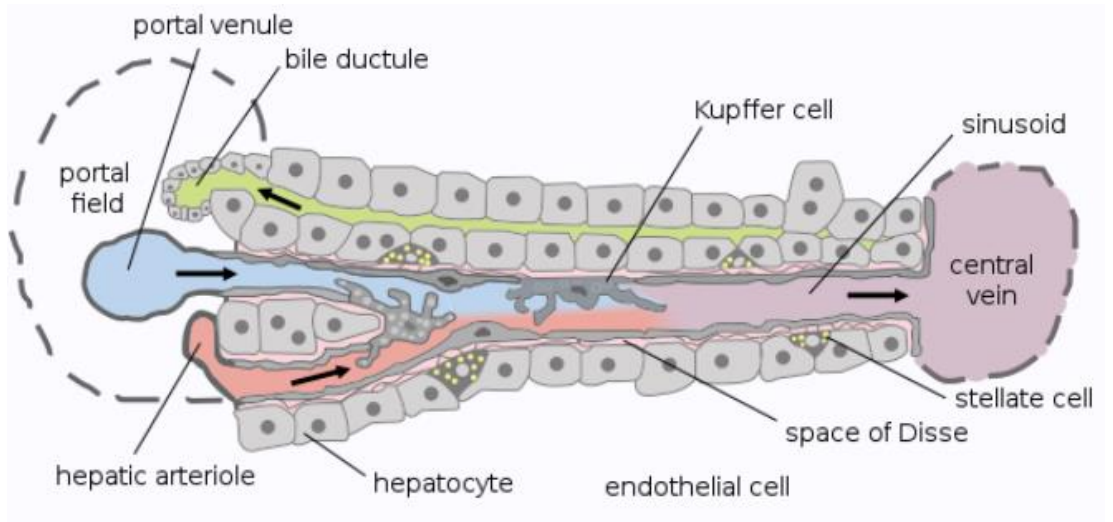
Stellat Hücreler: Perisinüzoidal aralıkta yerleşmiş olan, A vitamininin metabolizmasında ve depolanmasında rol alan yıldız şekilli hücrelerdir. İto hücreleri ya da adiposit olarak da adlandırılmaktadırlar. Patolojilerde stellat hücreler miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşürler (17, 19). Sitokin sekresyonu ve kan akımının düzenlenmesi gibi fonksiyonlar gösterirler.

Safra Kanalikülleri: Karaciğerin ekzokrin salgısı olan safranin hepatositler arası iletildiği kanalcıklardır. Karaciğer lobülünün plakları boyunca birleşerek kompleks bir ağ oluşturur ve portal alanda sonlanır. Bu nedenle safra, kan akışının tersi yönünde, yani lobül merkezinden periferine doğru akar. Safra kanalcıkları karaciğer içi safra kanallarında birleşirler. Hepatositler tarafından çevrili olan safra kanalcıklarını, safra kanalı epitelyum hücreleri ile çevrili kanallara birleştiren yapılara Herring kanalı denilmektedir ve bu bölgede hepatosit kök hücrelerine ev sahipliği

yaptığı için bu kanal stratejik bir öneme sahiptir. Hering kanalı tek katlı yassı epitelden tek katlı kübik epitele değişen bir epitel ile döşelidir (12, 17, 19) (Şekil 1, 2).



Şekil 1. Karaciğer lobüllerinin şematik görünümü.



Şekil 2. Karaciğer lobülünün yapısı.

2.2. Karaciğer Fizyolojisi

Karaciğer hayati birçok fonksiyonu yerine getirir. Metabolizmanın düzenlenmesinde, plazma proteinleri, büyüme faktörü, hormon ve vitamin üretimi, A, D, B₁₂ gibi vitaminlerin ve demirin depolanmasında; hormonların, ilaçların ve toksik maddelerin parçalanarak inaktif metabolitlere dönüştürülmesinde görev alır (8).

Karaciğer karbonhidrat metabolizmasında anahtar rol oynar. Kanda normal glukoz konsantrasyonunun devamlılığını sağlar. Glikojenin depo edilmesi ve glikojenoliz, glukoneogenez, glukozun pentoz fosfat yolunda yıkımı, galaktoz ve fruktozun glukozla dönüştürülmesi, glukozun diğer monosakkaritlere ve yağla dönüştürülmesi gibi görevleri vardır (8).

Karaciğerin, protein metabolizmasıyla ilgili olarak aminoasitlerin deaminasyonu, üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılması, endojen aminoasitlerin ve albumin, protrombin, fibrinojen, lipoproteinler gibi plazma proteinlerinin sentezi, vücuttaki metabolik olaylar için önemli aminoasitlerin ve öteki maddelerin birbirine dönüşümleri gibi fonksiyonları vardır (8, 20).

Diğer vücut fonksiyonları için enerji sağlayacak yağ asitlerinin sentezi ve oksidasyonu, lipoprotein, fosfolipit, keton cisimleri ve kolesterol sentezi, yağ asitlerinden trigliserit oluşumu, safra asitleri ve tuzlarının oluşturulması karaciğerde gerçekleşir (8).

İlaçların, dışarıdan alınan veya endokrin sistemde üretilen östrojen, kolesterol, aldosteron, tiroksin gibi hormonların veya kalsiyum gibi minerallerin fazlasının detoksifikasyonunu veya safra ile atılımını sağlar. Karaciğer harabiyetinde, çok defa bu hormonlardan birinin ya da birçoğunun vücutta birikmesi, hormonların aşırı etkisine yol açar. Çoğu ilaçlar karaciğerde p-450 enzim sistemi tarafından metabolize ve inaktive edilirler. Karaciğer, vücutta çeşitli metabolitlerin zararsız hale getirilmesinden de sorumludur. Protein yıkımından ortaya çıkan ve hücreler için toksik bir madde olan amonyağı, üreye dönüştürerek idrarla atılmasını sağlar. Hemoglobinin yıkım ürünü olan bilirubin de karaciğerde glukronik asitle konjuge edilerek suda erir hale getirildikten sonra safra yolu ile vücut dışına atılır (8, 20).

Bağırsak kapillerlerinden akan kan bağırsaklardan birçok bakteriyi de beraberinde getirir. Bağırsaklardan portal kana girerek karaciğere gelen mikroorganizmalar hepatik venöz sinüslerde bulunan büyük fagositik makrofajlar (Kupffer hücreleri) aracılığı ile temizlenir. Kanda koagülasyon işleminde kullanılan fibrinojen, protrombin, faktör V, VII, IX ve X gibi maddeler karaciğerde yapılır. Karaciğerde A vitamini, D vitamini, B12 vitamini depo edilir. Hepatik venlerdeki ve hepatik sinuslardaki kan ile birlikte karaciğerin normal kan volümü 450 ml yani yaklaşık olarak vücudun toplam kan hacminin yüzde 10'u kadardır. Sağ atriumda basınç yükseldiği zaman karaciğerde de basınç artar ve karaciğer genişleyerek 0,5-1 lt ekstra kan hepatik venler ve sinuslarda depo edilir (8).

Karaciğerin en önemli fonksiyonlarından biri de safranin üretilmesidir. Safra; yağların sindiriminde, emiliminde ve kandan özellikle hemoglobinin parçalama ürünü olan bilirubin ve karaciğer hücrelerinde sentezlenen kolesterol gibi önemli yıkım ürünlerinin atılmasında rol oynamaktadır (9).

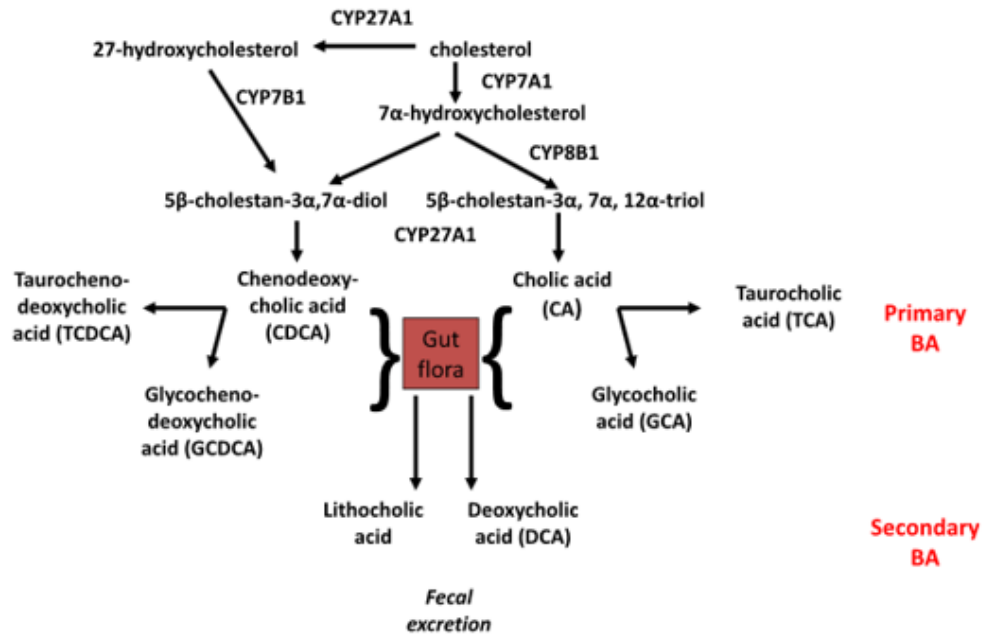
2.3. Safranin Yapısı ve Fizyolojisi

Safra, safra yolları aracılığı ile karaciğerden duodenuma salgılanan inorganik ve organik bileşik karışımından oluşan bir salgıdır. Safra pH'sı 7.8, plazmayla izotonik, sarımsı yeşil renkte bir sıvıdır. Oluşan safra 200-1500 ml/gün olup yemek harici zamanlarda safra kesesinde depolanır ve salgı yaklaşık %20 daha yoğun hale getirilir. Karaciğerde safranin su içeriği %97, safra kesesinde %89 dur (21, 23). Safra tuzları ve lesitin safranin miktar olarak en önemli bileşenleridir. Safra tuzları, safranin yaklaşık %60'ını oluştururlar (24).

Safra asitleri 20-24 karbonlu steroid yapıda moleküllerdir. %90 itibarı ile 24 karbonludurlar. Asli görevleri yağ ve yağda çözünen vitaminlerin emilimine yardımcı olmaktır (25). Primer safra asitleri olan kolik asit (CA) ve kenodeoksikolik asit (CDCA) kolesterolden hepatositlerde sentezlenen safra asitleridir. Bu safra asitlerinin taurin ve glisin ile konjugasyonu sonucu primer safra tuzları olan glikolik asit (GCA) ve taurodeoksikolik asit (TDCA) oluşur. Bu konjugasyon safra asitlerinin hidrofilik özelliklerini artırır. Primer safra asitlerinin %75'i glisin ve %25'i taurin ile konjuge halde bulunur. Primer safra asitlerinin barsak bakterileri tarafından 7α

dehidroksilasyonu ile sekonder safra asitleri olan deoksikolik asit (DCA) ve litokolik asit (LCA) meydana gelir. Bunların konjugasyonu ile sekonder safra tuzları oluşur (24-26).

Safra asit sentezi klasik (nötral) ve alternatif (asidik) yol olarak iki şekilde gerçekleşir. Klasik yolda ara metabolitler nötral sterollerdir. Primer safra asitleri olan CA ve CDCA oluşur. Klasik yolda kolesterolün oksidasyonu, yan zincirlerin modifikasyonundan önce gelir ve bir mikrozomal enzim olan kolesterol 7 α -hidroksilaz tarafından 7. karbonun hidroksilasyonu ile başlar. Alternatif yolda ise yan zincir sterol halka modifikasyonu, oksidasyondan önce gelir. Böylece asidik ara ürünler oluşur. Sterol-27-hidroksilaz tarafından katalize edilen kolesterolün 27- hidroksikolesterole dönüştürülmesidir (Şekil 3). Safra asidi sentezinde rol alan sitokrom p-450 enzimleri, özellikle nükleer safra asidi reseptörü farnesoid X reseptör (FXR)'ün aracılık ettiği, safra asitlerinin negatif feedback'i ile regüle edilirler (24, 25).



Şekil 3. Safra asiti sentez yolağı.

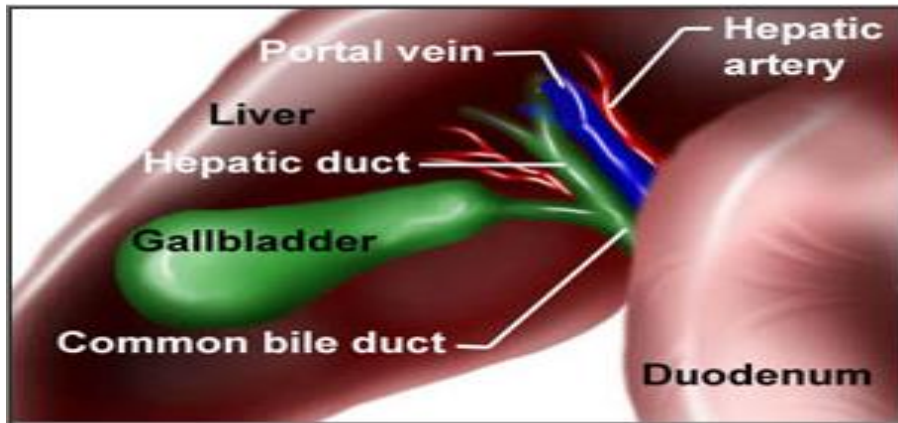
Safra asidinin hidrofobik ya da hidrofilik özellikte olmasını kolesterolün farklı pozisyonlarda ve hidroksil grubunun farklı sayılarda bağlanması belirler (27). Hidroksil grup sayısının artması ile safra asitlerinin çözünürlüğü artar (30, 31).

Toksisiteden hidrofobisite sorumludur. Hidrofobisite özelliği sırası ile litokolik asit, deoksikolik asit, kenodeoksikolik asit, kolik asit ve ursodeoksikolik asitte azalarak bulunur (27).

Karaciğer tarafından sürekli olarak salgılanan safra, normalde safra kesesinde depo edilerek gerektiğinde duodenuma akar. Safra kesesinin boşalması için iki temel koşul gereklidir:

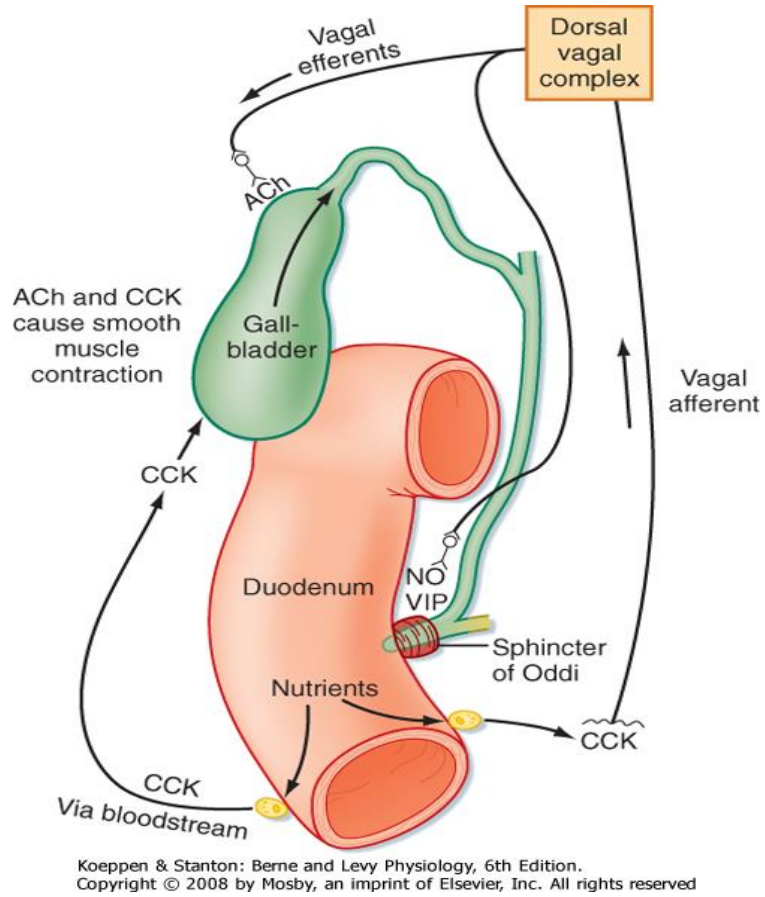
- 1- Safranın koledok kanalından duodenuma akması için Oddi sfinkterinin gevşemesi,
- 2- Safra kesesinin kasılarak safranın koledok kanalına itilmesidir.

Hepatositlerden salgılanan safra, safra kanalikülleri ile safra kanalına devam eder. Safra kanallarının birleşmesi ile sağ ve sol ana hepatik kanallar oluşur. Bu iki hepatik kanalın birleşmesi ile ortak hepatik kanal oluşturulur. Bu kanal, safra kesesinden gelen sistik kanal ile birleşir ve koledok kanalı meydana gelir. Koledok Oddi sfinkterine yakın bir noktada pankreatik kanal ile birleşir ve buradan duodenuma açılır (24). Safranın normal salınma basıncı 120-250 mmH₂O arasındadır. Bu basınç safra akımının hareketini sağlar. Safra yollarında akımın olması için ekstrahepatik safra yolları basıncının intrahepatik safra yolları basıncından düşük olması gereklidir ve bu basınç normalde 100-150 mmH₂O'dur (28, 29) (Şekil 4).



Şekil 4. Safra kesesi anatomik yerleşimi.

Duodenuma günlük 500-1500 ml kadar safra ulaşır. Sinirsel ve hormonal mekanizmalar tarafından safranin salgılanması düzenlenir. Açlık halinde oddi sfinkteri tonik kasılır ve bunun sonucunda safranin yoğunlaştırılması ve depolanması için safra kesesine aktarımı sağlanır. Gıda alımından sonra yağ asitleri tarafından uyarılan ince barsaktan kolesistokinin (CCK) salgılanır. CCK, safra kesesinin kasılmasını ve oddi sfinkterinin gevşemesini sağlayarak safranin duodenuma akışını sağlar. CCK'nın yanında sekretin, bikarbonat salınımını artırarak safra miktarını artırır. Parasempatik deşarj (vagal deşarj), safra salgılanmasını artırırken, sempatik uyarı safra salgılanmasını azaltır (8, 9) (Şekil 5).



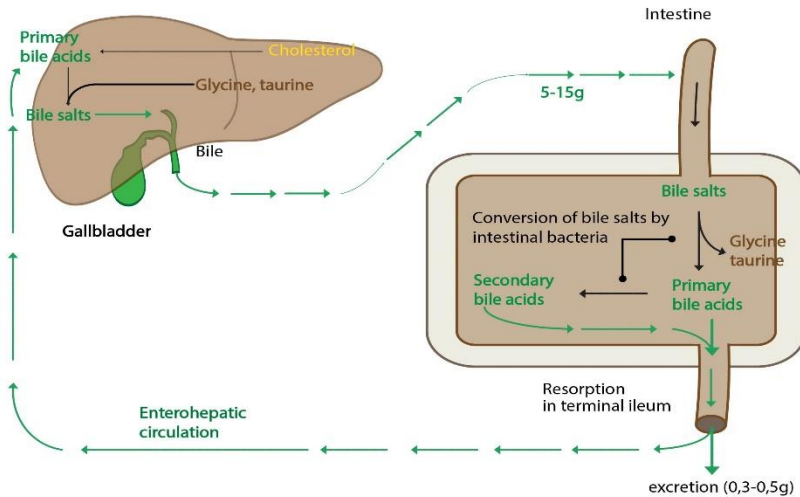
Şekil 5. Safra salgılanması.

Safra tuzlarının emilimi barsaklarda etkin olarak sağlanır ve tekrar kullanılırlar. Bu döngü enterohepatik dolaşım olarak adlandırılır. Beslenme tarzına bağlı olarak günlük enterohepatik dolaşım değişim gösterir (24).

Safra asitlerinin %95'i ince barsaklardan emilir ve enterohepatik dolaşıma geçer. Asıl önemli emilimin gerçekleştiği yer distal ileumda Na^+ bağımlı safra asiti taşıyıcı protein tarafından gerçekleştirilir. Kalın barsağa safra asitlerinin yaklaşık %5'i geçmektedir. Burada bakteriler tarafından sekonder safra asitlerine (DCA ve LCA) dönüştürülür. Bu dönüşüm sonucunda hidrofobik özellikleri artan safra asitlerinin difüzyonla emilimlerini sağlar. Jejunum ve kolonda basit difüzyonla emilim olurken distal ileumdan aktif taşıma ile emilimleri gerçekleşir (24-26).

Çoğu safra asidi albumine bağlanarak, bir kısmı da lipoproteinlerle beraber taşınırlar ve karaciğerlerde parankim hücreleri tarafından dolaşımdan çekilirler. Karaciğere alınan safra asitleri taurin ve glisin ile konjuge edilerek safra yollarına sekrete edilirler (24, 32).

Günlük hepatositlerde 0,2-0,6 gram safra asidi sentezi gerçekleşmektedir. Safra kaybı durumlarında sentez miktarı artırılmaktadır. Günde toplam 3 gram safra asidi bilier sistemden sekrete edilir. Yaklaşık 0,2 gram safra asidi dışkı ile kaybedilir (33) (Şekil 6).



Şekil 6. Safra asit dolaşımı ve emilimi.

Hepatositler safra asidi sentezinin yanı sıra, portal kandan safra asitlerinin temizlenmesi ve safra asitlerinin kanaliküllere salgılanması ile safra salgılanmasından sorumludurlar. Karaciğerde, deterjan özellikte, toksik potansiyele sahip safra asitlerinin birikmesi, hücresel hasara ve karaciğer disfonksiyonuna yol açacaktır (34).

Karaciğere portal sistem yoluyla dönen safra asitleri negatif feedback mekanizmasıyla yeni safra asidi sentezini engellerler. Sekretin, kolesistokinin ve gastrin hormonları biliyer fizyolojinin düzenlenmesinde önemlidir. Sekretin, safra kanallarındaki hücrelerden su ve bikarbonat salgılanmasını uyarır. Kolesistokinin ve gastrin safranin salgılanmasında önemli etkileri bulunmamaktadır. Ancak kolesistokinin safra kesesinin kasılmasını ve Oddi sfinkterinin gevşemesini sağlar. Bunun yanında, sinirsel uyarıların safra sentezinde çok az yeri vardır. Beslenme sonrası vagal aktivite safra kesesinin kasılmasını destekler ve oddi sfinkterinin açılıp kapanmasını düzenler (31).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, safra asitlerinin en iyi bilinen rolü yağ asitlerinin sindirim ve emilimine katılım olmasının yanında, diğer birçok fonksiyonda da rol oynadığı ortaya konmuştur. FXR ve TGR5 (safra asitleri için G proteini bağlı membran reseptörü) reseptörlerinin bulunmasıyla safra asitlerinin parakrin ve endokrin rolleri dikkat çeker hale gelmiştir. Epitelyal hemostazda, transportta ve bağırsak bariyer fonksiyonunda önemli bir sinyal molekülü oldukları gösterilmiştir. Mitogenezi uyarmalarına rağmen apoptozisi de indükledikleri ortaya konmuştur. Son olarak da genel enerji metabolizmasındaki karaciğerde glukoz işlemedeki rolleri bildirilmiştir (25, 26).

2.4. Kolestaz

Kolestaz, duodenuma safra akımının azalması veya durması olarak tanımlanabilir (35).

Hepatositlerden safra asitlerinin salınımı; safra asitlerinin alımı, hücre içi transportu ve kanaliküler sekresyonu safhalarını içerir. Bilirubinler taşıyıcılarla hepatosit içine alınıp, endoplazmik retikulumda UDP-glukronil transferaz enzimi aracılığıyla glukronik asit ile konjuge edildikten sonra kanaliküler lümene salınır.

Bunun yanında safra yolları epitel hücreleri (kolanjiosit) de sekretinin stimülasyonu ile bikarbonattan zengin sıvı sekrete ederler (35).

Kolestaz iki şekilde ortaya çıkabilmektedir: İntrahepatik ve ekstrahepatik kolestaz.

İntrahepatik kolestazda safra yollarının obstrüksiyonu ve hepatositlerin safra sekrete edememesi şeklinde görülebilmektedir. Ekstrahepatik kolestaz nedenleri arasında; safra yolunun taş veya striktür ile tıkanması veya dıştan bası ile safra akımının engellenmesi sayılabilir. Porta hepatisi tutan lenfatik tümörler, pankreas tümörleri ve pankreatit olguları dıştan bası yaparak kolestaza sebep olabilirler (36). Ekstrahepatik kolestaz safra kanaliküllerinde dilatasyon ve sonuçta mikrovillus kaybı, hücrelerarası bileşkede değişiklikler, kanaliküler geçirgenlik artışı ve safra içeriğinin hepatik lenflere geri gelmesi ile oluşur (35).

Kolestaz Nedenleri (37, 38)	
<i>İntrahepatik Kolestaz</i>	<i>Ekstrahepatik Kolestaz</i>
• İlaçlar • Hormonlar • Kolestatik hepatit • Septisemi • Benign rekürren intrahepatik kolestaz • Karaciğerin infiltratif ve depo hastalıkları (Hodgkin hastalığı, amiloidoz) • Gebelik Kolestazı • Progresif familiyal intrahepatik kolestaz • Kistik fibrozis • İnfantil kolestatik sendromlar • Herediter metabolik defektler	• Benign lezyonlar • Koledokolitiazis • Sklerozan kolanjit (primer/sekonder) • Pankreas hastalıkları, neoplazmları • Mirizzi sendromu • Penetran abdominal travma • Postoperatif (Karaciğer toksisitesi, kolesistektomi) • Konjenital koledok kisti • İnfeksiyonlar, Parazitler (E. Granulozis, Clonorchis sinensis, F. Hepatika) • Rekürren kolanjit • Malign biliyer striktürler, kolanjiyokarsinom, kese tümörü

Klinik görünüm açısından biliyer obstrüksiyonun derecesi, süresi, yeri önemlidir. Ağrısız sarılık sıklıkla malignensi sonucu oluşur. Ani başlangıçlı şiddetli karın ağrısı genellikle kolelitiyazise bağlı tam obstrüksiyon nedeniyle oluşur. 2-3 gün süren obstrüksiyon kolanjitle sonuçlanabilir. Bu durumda biliyer kolik, ateş ve sarılık görülür (Charcot triadı) (39).

Kolestaz; kolanjit, sepsis, çoklu organ yetmezliği, koagülopati ve böbrek yetmezliğine neden olabilir (39). Safra yolunun daralmaları ve tıkanmaları, karaciğerin bakteriyel enfeksiyonlarına neden olabileceği gibi, safra akımının uzun süre engellendiği durumlarda siroz da meydana gelebilir. Tam biliyer obstrüksiyon hepatosellüler nekroz ve apopitozis, safra kanal epitel hücre proliferasyonu, stellat hücre aktivasyonu ve sonuçta karaciğer fibrozisine götüren kolestatik karaciğer hasarlanmasına neden olur (40).

Safra asitleri bakteri hücre duvarına deterjan etkisi gösterir, ayrıca endotoksinleri inaktive eder. Böylece bağırsaktaki bakteri kolonizasyonunu azaltır. Biliyer obstrüksiyon varlığında bakteriyel kolonizasyon sonucu sekonder infektif kolanjit ve bağırsakta bakteri translokasyonu sonucu septik şok gelişebilir. Karaciğer ve biliyer sistem hastalıklarında hepatositlerin apopitozisi görülür. Safra akımının safra taşı ya da tümörü gibi bir sebeple akımının bozulması sonucu oluşan kolestazda karaciğer hasarı oluşur (40).

2.5. Propolis

Giderek önemi artan propolis doğal bir üründür. Pro- (savunma için) ve –polis (şehir ya da topluluk) kelimelerinden türetilmiştir. “Şehrin savunulmasındaki madde” anlamına gelmektedir (41-43). Bal arıları tarafından bitki ve ağaçların yaprak ve sürgünlerinden toplanan reçineli bir karışımdır. Arılar özellikle bitkilerin yapraklarındaki lipofilik materyaller ile reçine, bal mumu, müsilaaj, zamk gibi maddeler ile de propolis üretebilmektedirler. Bu salgıya çeşitli enzimler ve polen kaynaklı maddeler ilave edilmektedir (42).



Şekil 7. Propolis.

Bal arıları propolis üretirken kaynak bitki olarak; kavak (*Populus spp.*), kayın (*Fagus sylvatica*), huş (*Betulla alba*), kestane (*Castanea sativa*), at kestanesi (*Aesculus hippocastanum*), akçaağaç (*Alnus glutinosa*) ve çeşitli koniferleri tercih eder (44). Kavak türü propolis hem kimyasal hem de tıbbi açıdan en iyi bilinen ve en yoğun şekilde incelenmiş olan arı reçinesidir (45).

Propolis arılar tarafından kovanlardaki hasarlanmış bölgeleri kapatmak, kovanın iç duvarlarını sıvamak, kovan girişini düşmanlara karşı korumak ve kovan içinde ölmüş istilacıların cesetlerini mumyalamak için kullanırlar (41-43, 46). Aynı zamanda propolis, kovan içi sıcaklığın korunmasında ve mikrobiyal kontaminasyona karşı en iyi savunma materyalidir (47). Antiseptik etkileri ile propolis koloniyi hastalıklardan korumaktadır (43).

Propolis toplanma zamanına ve toplandığı alanın coğrafik yapısına, iklimi ve botanik kaynağına bağlı olarak koyu sarı, yeşil ve koyu kahverengi gibi değişik renklerde olabilir (48, 49). Ortalama 65°C’de erime noktasına sahiptir (50). Su, hidrokarbon ve alkolde çözünebilmektedir (51). Ham propolisin bileşimi toplandığı alana ve toplanma sezonuna göre değişmekle beraber, genellikle %45-50 reçine, %30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (41, 52, 53).

Dünya genelinde toplanan propolis örneklerinde 200'den fazla bileşik tanımlanmıştır (54). Propolis; polifenoller (flavonoit aglikonlar, fenolik asitler ve onların esterleri, fenolik aldehytler, alkoller ve ketonlar), seskuiterpen kinonlar, kumarinler, steroidler, aminoasitler ve inorganik bileşikler gibi çeşitli kimyasal bileşikler içermektedir. Propolisin yapısında pinosembirin, akasetin, krisin, rutin, katesin, naringenin, galangin, luteolin, kamferol, apigenin, mirisetin, kuarsetin gibi flavonoitlerin yanı sıra kafeik asit ve sinamik asit gibi fenolik asitler de saptanmıştır (52, 54). Ayrıca propoliste magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), iyot (I), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu), çinko (Zn), manganez (Mn) ve demir (Fe) gibi mineraller, A, B₁, B₂, B₆, C ve E vitaminleri ile çok sayıda yağ asidi tanımlanmıştır (54). Propolis örneklerinden izole edilen bileşiklerden en önemlisi flavonoit pigmentleridir (41, 55). Bu pigmentler, bitkisel orjinli, düşük molekül ağırlıklı, genellikle flavon çekirdeğine sahip bileşiklerdir. Propolisin renginden, kokusundan ve aromalarından büyük oranda flavonoidler sorumludur (56). Bu bileşikler insanlarda sentezlenememekte ve insan beslenmesi için önemlidir (56).

Çeşitli çalışmalarda propolisin antikarsinojenik, antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuar, lokal anestetik ve immünostimülatör özellikler gösterdiği bildirilmiştir (41).

Araştırmalarda propolisin; gram pozitif bakterilere daha belirgin olan antibakteriyel (57-60), en fazla *Candida albicans*'a olmakla birlikte *Candida* türleri ve dermatofitlere karşı antifungal (58, 61-66), influenza (58), Herpes simpleks ve virüs üzerine antiviral (67), antiinflamatuar (68, 69), antioksidan (55, 58, 70-72), nöroprotektif (71), radyoprotektif (73), kardioprotektif (74), hepatoprotektif (75), immünostimülatör (76, 77), sitotoksik (78), yara iyileşmesi (68, 79) ve gastrik ülser üzerine olumlu etki gösterdiği (80) rapor edilmiştir.

Tek bir propolis bileşeni, total ekstraktından daha büyük bir aktiviteye sahip değildir. Bu nedenle propolisin genel biyolojik özelliklerinin kendi bileşenlerinin doğal karışımından dolayı olduğu ileri sürülmektedir (43).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan insan hepatosellüler karsinoma hücre hattı (C3A) Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarından temin edilmiştir. Propolis ekstraktları Düzce Üniversitesi Arıcılık Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezinden (DAGEM) temin edilmiştir. Uygulama sırasında safra asit kaynaklı toksisite oluşturulmadan önce ve oluşturulduktan sonra hücre hattında denenmek üzere propolisin alkol ve su ekstraktlarının ardışık dozları hazırlandı. Çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D. hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kimyasallar

- 1) DMEM/F12, Gibco
- 2) Fetal Sığır Serum (FSS), Gibco
- 3) Tripsin/EDTA, %0.05, Gibco
- 4) DMSO, Sigma
- 5) Antibiyotik-Antimikotik, Gibco 100X
- 6) MTT, Roche
- 7) Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS), Santa Cruz 10X liquid
- 8) Propolis, DAGEM
- 9) Akridin oranj, Invitrogen
- 10) Glikokenodeoksikolik asit (GCDCA), Santa Cruz

3.2. Hücre Kültürü

3.2.1. Hücre Ekimi

Dondurulmuş halde sıvı azot tankında bulunan kriyotüplerdeki C3A hücreleri 37°C'lik su banyosunda hızla çözündürülmüş olup (hücrelerin bulunduğu kriyo tüpünün kapak hizasının suya batırılmamasına dikkat edilmiştir) hücreler çözöldükten sonra kriyotüp ve kapağı %70'lik alkol ile silinmiştir. 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 5 ml medyum (%10 FSS, %1 antibiyotik, DMEM) yavaşça eklenmiştir. Tüp 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip, tüpün dibindeki hücre pelleti kalacak şekilde süpernatant dökölmüştür. Ardından hücre pelleti üzerine 10 ml yeni medyum eklenip ve hücreler iyice süspanse edildikten sonra, hücreler 75 cm²'lik flasklara aktarılmıştır. Ardından mikroskop altında incelenmiştir. Hücrelerin yapışması için CO₂'li inkübatöre konularak bir gün beklemeye alınmıştır. Bir gün sonrasında mikroskop altında hücrelerin canlılığı incelenip, medyumları değıştirilmiştir.

3.2.2. Tripsinizasyon

Hücreler 24 saatlik inkübasyondan sonra inkübatörden alınıp, steril laminar kabin içerisinde hücre flasksındaki medyum dökölmüştür. Flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 2 ml steril PBS ile yıkandıktan sonra PBS dökölmüş ve hücrelerin üzerine flask içine 2 ml %0,05'lik tripsin-EDTA dökölmüştür. Sonrasında hücrelerin zeminden ayrılması için bir müddet inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin flask yüzeyinden tek tek ayrılıp ayrılmadıkları mikroskop altında kontrol edilmiştir. Hücreler, yüzeyden ayrıldıktan sonra pastör pipeti yardımıyla steril 15 ml'lik deney tüpüne aktarılmıştır. Tripsin/EDTA'nın etkisini sonlandırmak için hücre süspanسیونunun üzerine 6 ml medyum eklenmiş ve süspanسیون 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılıp, ardından tüpün dibinde kalan hücre pelleti 4 ml medyum içinde süspanse edilmiştir. Hücreler Thoma lamında sayılarak 300000 hücre/ml yoğunlukta flaska ekim yapılmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması, hücrelerin çoğalma kapasitesine göre üç-dört günde bir olacak şekilde yapılmıştır ve bir önceki kültürdeki hücreler tripsin/EDTA ile kaldırılıp, 1300 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra toplam hücre miktarının en fazla 1/3’ü kadar hücre taze besiyerine alınıp 75 cm²’lik flasklara aktarılması şeklinde yapılmıştır. Çalışmadan bir önceki pasajın semi-konflens hücreler kullanılarak yapılmasına ve pasajdan sonra hücrelerin zemine tutunabilmeleri için 24 saat beklenmesine dikkat edilmiştir.

3.3. Deney Dizaynı

Deney iki aşamalı olacak şekilde oluşturulmuştur. Bu çalışmada C3A hücre serisinde toksik madde olarak kullanılacak glikokenodeoksikolik asit için literatürde çok farklı doz aralıkları ve uygulama şekilleri bulunmaktadır. Aynı şekilde koruyucu ve tedavi edici etkisi araştırılacak olan propolisinde alkol ve su ekstraktında doz aralığı belirlendi. Bu doz farklılıklarının sebebi; ilaç çözücülerinin, hücre tipinin, hücre yoğunluğunun, hücreler için kullanılan medyumların ve laboratuvar farklılıkları gibi etkenlerden dolayı olabilir. Bundan dolayı deneylere öncelikle bu maddeler için toksik doz belirlemekle başlanılmıştır.

3.3.1. Safra Asit Toksisitesinin Oluşturulması

Hücre hattında glikokenodeoksikolik asidin 4 farklı dozu hazırlanmıştır (**GCDCA**; 0,75 – 1 – 1,5 – 2 mM).

Bir gün öncesinden 24 kuyulu plakanın her bir kuyusuna sırasıyla 300000 hücre/ml konsantrasyonunda ekilmiş C3A hücrelerinin üzerine farklı dozlarda hazırlanmış GCDCA 1/10 oranında olacak şekilde hücre serisi üzerine eklenmiştir. 24 saat sonunda GCDCA’nın etkileri mikroskop altında incelenerek, görüntüleri kaydedilmiştir. Yapılan deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

300000 hücre/ml konsantrasyonda C3A hücreleri ekilmiş 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna GCDCA’nın belirlenen dozları 1/10 oranında eklenmiştir. 24 saat

sonunda MTT testi yapılarak doz-cevap sonuçları elde edilmiştir. Yapılan deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

MTT Testi: Kolorimetrik metod olarak ilk kez Mossmann (1983) tarafından tanımlanan bu testte, sarı tetrazolium tuzu canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile tetrazolium halkasının kırılması sonucu formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Oluşan formazan kristalleri izopropanol veya DMSO gibi çözücülerde çözülmesi sonucu ortamda oluşan renk, spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve ölçülen değer canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır.

MTT solüsyonunu eklemeyen önce hücrelerin üzerindeki medyum tazelenmiş ve MTT solüsyonu son konsantrasyon 1/10 olacak şekilde bütün örneklerle eklenmiştir. 4 saat 37°C'deki etüvde inkübe edildikten sonra oluşan formazan son ürününün çözünmesi için örneklerin üzerine 1'e 1 hacim olarak DMSO eklenmiş ve çözünmesi için 1 gece boyunca 37°C'deki etüvde bekletilmiştir. Örneklerdeki çözünmüş formazan miktarı ELİSA okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.3.2. Propolis Koruyuculuğunun Araştırılması

Bu aşamada ilk olarak propolisin belirlenen 4 farklı dozunun (1-5-10-50 µg/ml) GCDCA'nın toksik dozuna karşı koruyuculuk etkisinin olup olmadığı MTT testi ile ve morfolojik değişiklikleri floresan akridin oranj boyama yöntemi ile değerlendirilerek bakılmıştır. Propolis ekstraktları GCDCA toksisitesinden 3 saat önce ve sonra ayrı ayrı uygulanmıştır.

Akridin Oranj ile Floresan Boyama: Akridin oranj plazma membranından girmekte ve hücre içi nükleik asitlere tutunarak, onları boyamaktadır. Çift zincirli nükleik asite tutunduğunda yeşil ve tek zincirli nükleik asite tutunduğunda çoğunlukla turuncu floresan ışık oluşturmaktadır.

C3A hücreleri 600.000 sayıda 6 kuyulu kültür kaplarına ekilmiştir. Ekilen hücreler 1 gün inkübasyondan sonra 1 gün de ilaç uygulamasına bırakılmıştır. Propolis'li medyum, ayrı ayrı gruplarda GCDCA uygulamasından 3 saat önce ve sonra

hücrelerin bulunduğu medyuma 1/10 oranında eklenmiştir. Daha önceden fosfat tampon solüsyonu (PBS) içinde 0,3 mg/ml konsantrasyonda 100 kat olarak hazırlanmış stok akridin oranj boyası, yine PBS içinde 2 kat olacak şekilde seyreltilmiştir. Hücrelerin içinde bulunduğu medyuma 1'e 1 oranında eklenmiştir. 10 dakika beklendikten sonra floresan görüntüleme sistemiyle gruplar incelenerek, görüntüleri alınmıştır. Gruplardaki hücrelerin morfolojik yapıları kontrol grubuna göre kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi, SPSS istatistik programını kullanarak yapıldı. Gruplar arasındaki fark önce ANOVA testi ile, sonrasında Post-Hoc testlerinden Tukey testi kullanarak saptanmıştır ve $p < 0,05$ anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Glikokenodeoksikolik Asit Toksik Dozlarının Belirlenmesi

Faz kontrast invert mikroskop altında yapılan gözlem deneyin ileriki aşamaları için önem arz etmektedir. Buradan alınacak sonuçlar doğrultusunda diğer aşamalara geçilmiştir. Bu aşama da diğer aşamalar gibi 3 kez tekrarlanmıştır. GCDCA'nın farklı dozlarının hücre morfolojileri ve sayıları üzerindeki etkileri görsel olarak incelenerek toksik etkiyi başlatan doz aralığı belirlenmiştir.

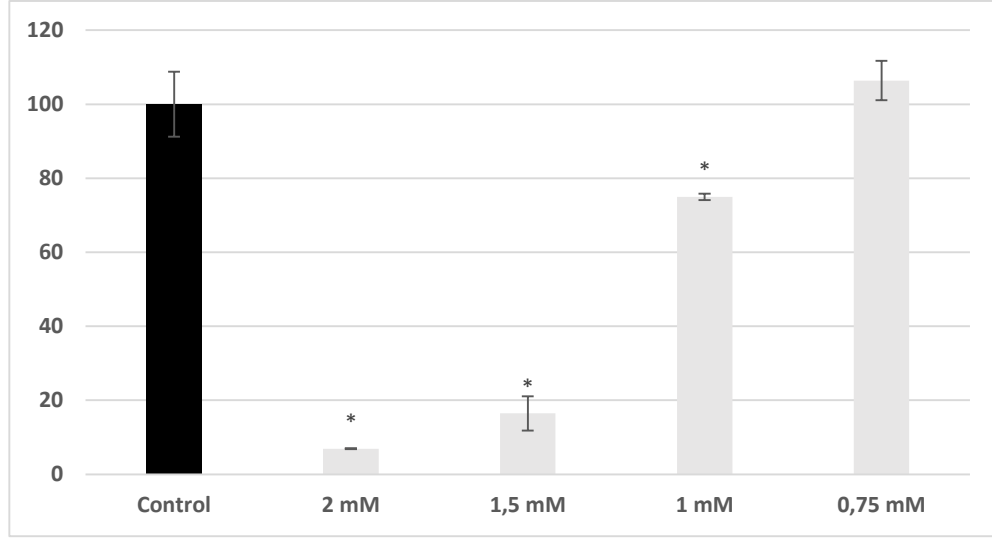
C3A hücre hattına uygulanan GCDCA'nın 0,75–1–1,5–2 mM dozları içinde, hücresel morfolojiyi bozmasının yanında hücresel tutunmayı da etkileyip hücrelerin tutundukları yerden kalkmasını ve hücre morfolojilerinin değişmesini sağlayan dozun 1 mM'dan itibaren başladığı, artan dozlarda toksik etkinin daha da arttığı görülmüştür. 1,5 mM dozunda kontrole göre morfolojinin bozulduğu ve sayılarının ciddi oranda azaldığı görülmüştür.

Bu gözlemsel çalışmanın sonucunu doğrulamak için yapılacak olan MTT testi için GCDCA'nın 0,75–1–1,5–2 mM'lık dozlarının C3A hücre tipinde uygulanmasına karar verilmiştir.

MTT Test Sonuçları: GCDCA toksik doz sınırlarının gözlemsel inceleme ile belirlenmesi sonucunda, bu dozların hücre yaşayabilirliği üzerindeki etkilerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla MTT testi yapıldı. Çıkan sonuçlar kontrol grubuna göre kıyaslanarak yüzde değerleri hesaplanmıştır.

1 mM'dan sonra yükselen GCDCA dozlarının hücre yaşayabilirliğini azalttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 1).

MTT testi sonuçları gözlemsel inceleme sonuçları ile uyum göstermiştir.

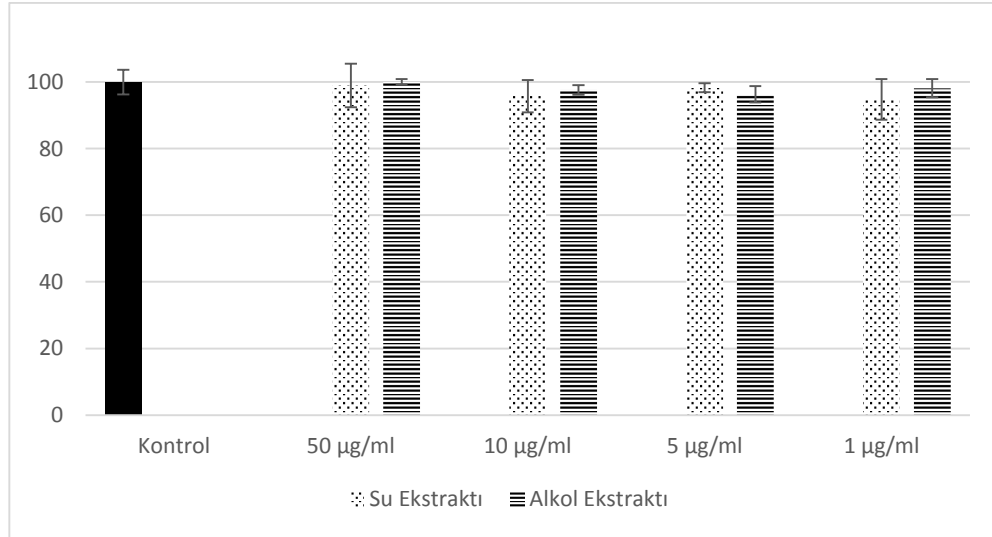


Grafik 1. GCDCA toksik dozlarının MTT testi ile belirlenmesi.

*Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0.05$.*

4.2. Propolis Ekstraktlarının Toksik Etkilerinin Belirlenmesi

Propolis ekstraktlarının hücreler üzerinde uygulanması kontrol grubuna göre kıyaslandığında toksik bir etki oluşturmadığı görüldü ($p > 0.05$, Grafik 2).



Grafik 2. Propolis ekstraktlarının C3A hücreleri üzerindeki etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi.

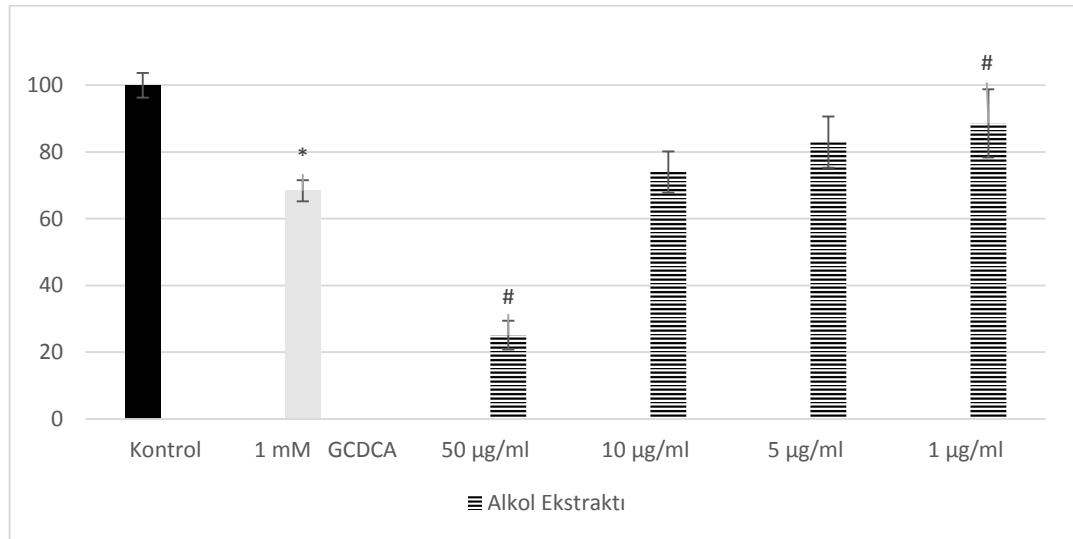
4.3. Propolisin GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Bu çalışmada propolisin alkol ve su ekstraktlarının 4 farklı dozu GCDCA'nın belirlenen dozları ile oluşturulan toksisiteden önce ve sonra uygulanmış ve bu dozların koruyucu bazılarında koruyucu etkinlik görülmüştür.

4.3.1. Propolisin Alkol Ekstraktının (PAE) 1 mM GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

C3A hücreleri üzerinde 1 mM GCDCA ile indüklenmiş toksisiteden 3 saat sonra PAE'nin 4 farklı dozu (1-5-10-50 µg/ml) uygulanmıştır.

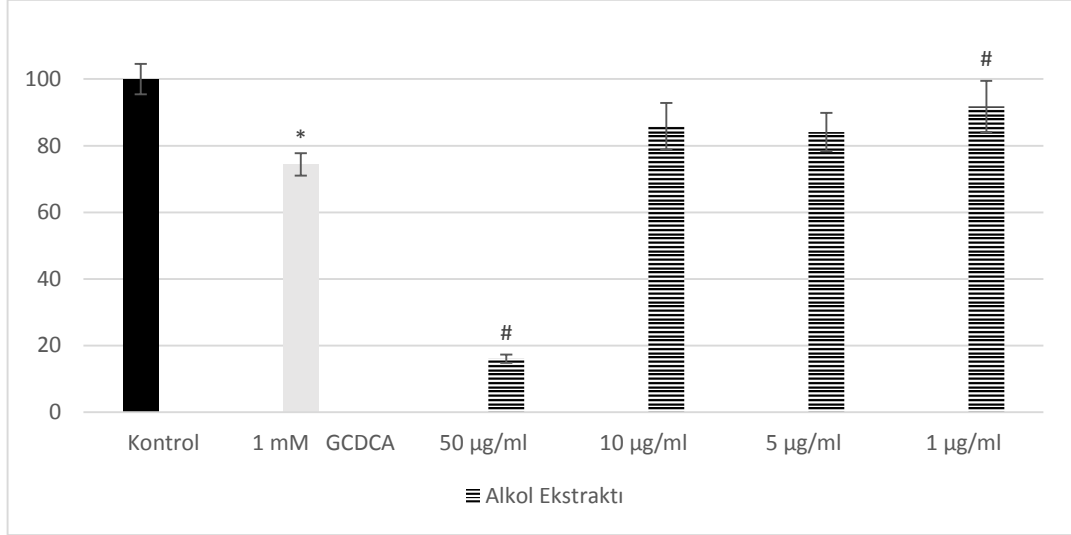
PAE'nin en yüksek dozu olan 50 µg/ml'de kontrole ve 1 mM GCDCA ile oluşturulmuş toksisiteye karşı istatistiksel olarak anlamlı derecede toksisiteyi daha da artırdığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). PAE'nin 1 µg/ml dozunun, indüklenmiş toksisiteye karşı olumlu etkinliğinin olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak 10 ve 5 µg/ml dozlarının toksisiteye karşı istatistiksel olarak etkinliği tespit edilememiştir ($p>0.05$) (Grafik 3).



Grafik 3. 1 mM GCDCA toksisitesinden sonra uygulanan propolis alkol ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.

*GCDCA toksisitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p<0.05$,
Propolis alkol ekstraktları GCDCA toksisitesi ile karşılaştırıldı. #; $p<0.05$.*

1 mM GCDCA ile toksisite indüklenmeden 3 saat önce uygulanan 50 µg/ml PAE dozu toksisiteyi artırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). PAE'nın sadece 1 µg/ml dozunun, toksisiteden önce uygulanması ile olumlu etkinliğinin olduğu bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 4).



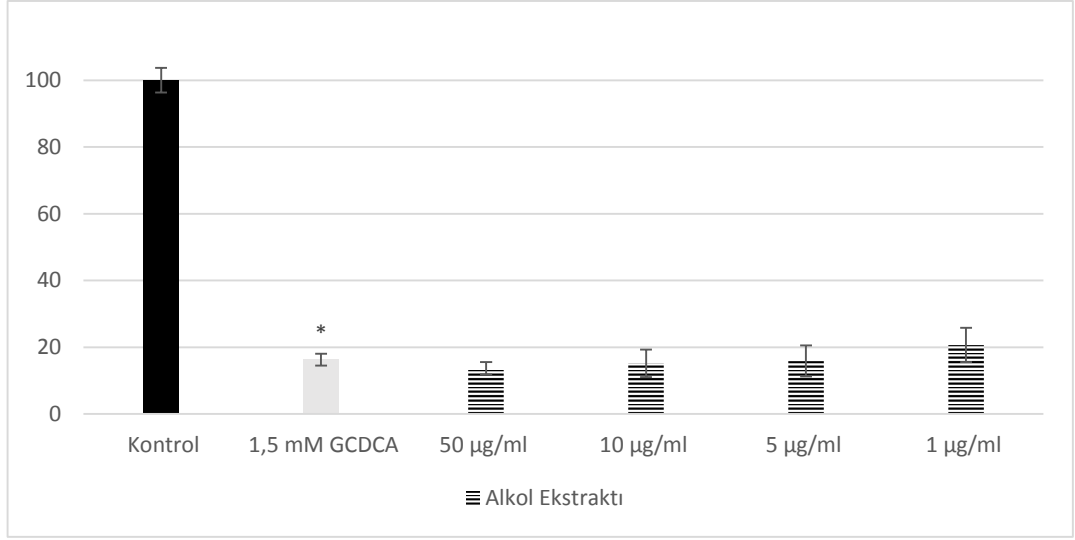
Grafik 4. 1 mM GCDCA toksisitesinden önce uygulanan propolis alkol ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.

*GCDCA toksisitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p<0.05$,*

Propolis alkol ekstraktları GCDCA toksisitesi ile karşılaştırıldı. #; $p<0.05$.

4.3.2. Propolisin Alkol Ekstraktının (PAE) 1,5 mM GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

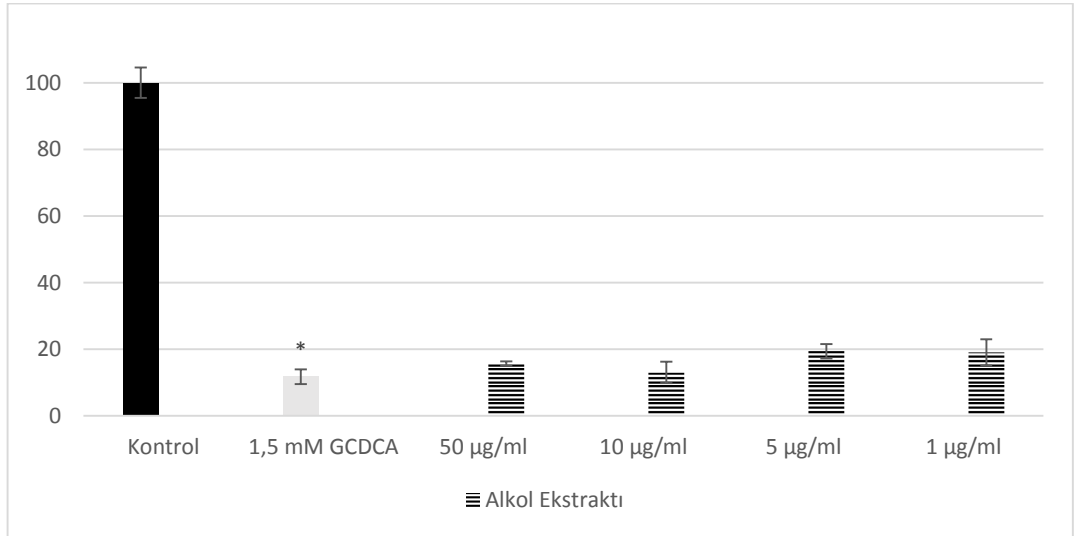
1.5 mM GCDCA ile indüklenmiş toksisiteden önce ve sonra uygulanan PAE'nın hiçbir dozunun olası tedavi edici ya da koruyucu etkinliği görülmemiştir ($p>0.05$) (Grafik 5, 6).



Grafik 5. 1.5 mM GCDCA toksisitesinden sonra uygulanan propolis alkol ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.

*GCDCA toksisitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0.05$,*

Propolis alkol ekstraktları GCDCA toksisitesi ile karşılaştırıldı ($p > 0.05$).



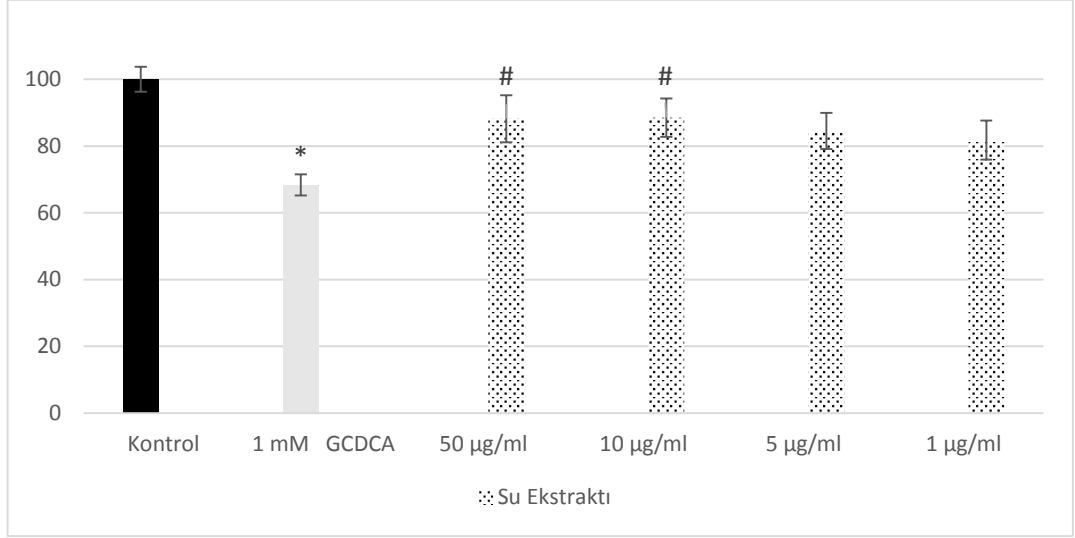
Grafik 6. 1.5 mM GCDCA toksisitesinden önce uygulanan propolis alkol ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.

*GCDCA toksisitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p < 0.05$,*

Propolis alkol ekstraktları GCDCA toksisitesi ile karşılaştırıldı ($p > 0.05$).

4.3.3. Propolis Su Ekstraktının (PSE) 1 mM GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

C3A hücreleri üzerinde 1 mM GCDCA ile indüklenmiş toksisiteden 3 saat sonra PSE'nin 4 farklı dozu (1-5-10-50 µg/ml) uygulanmıştır. PSE'nin 50 ve 10 µg/ml dozlarının toksisiteden sonra uygulanmasının koruyucu etkinliği bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 7).

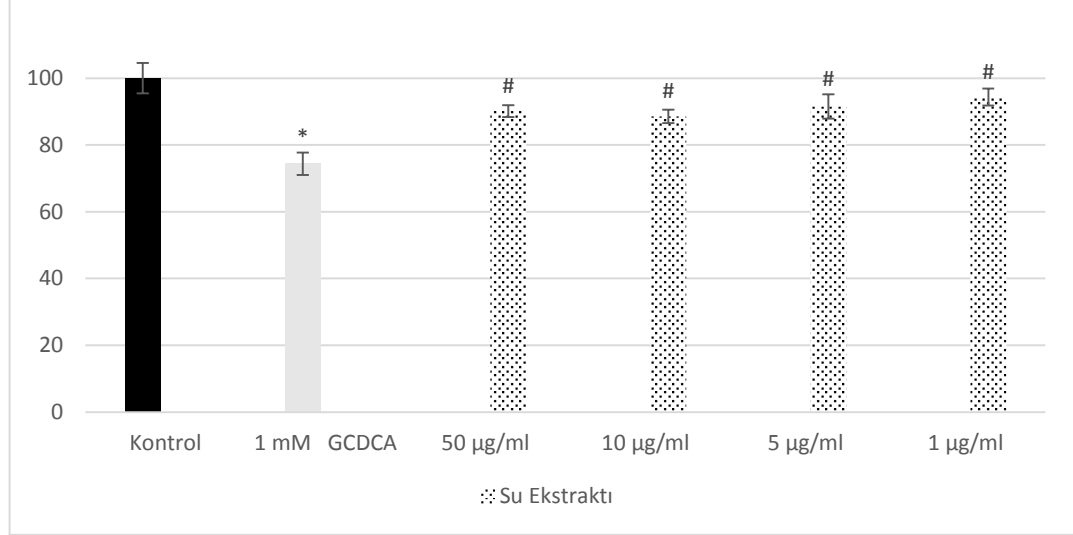


Grafik 7. 1 mM GCDCA toksisitesinden sonra uygulanan propolis su ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.

*GCDCA toksisitesi kontrol kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p<0.05$,*

Propolis su ekstraktları GCDCA toksisitesi ile karşılaştırıldı. #; $p<0.05$.

1 mM GCDCA ile toksisite indüklenmeden 3 saat önce uygulanan PSE bütün dozlarının toksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Grafik 8).



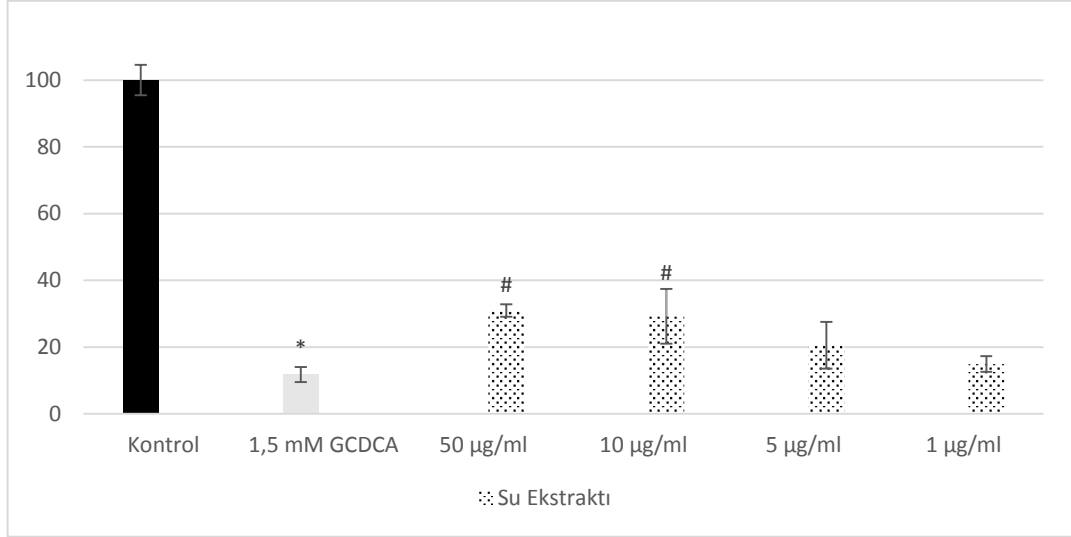
Grafik 8. 1 mM GCDCA toksisitesinden önce uygulanan propolis su ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.

*GCDCA toksisitesi kontrol kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p<0.05$,*

Propolis su ekstraktları GCDCA toksisitesi ile karşılaştırıldı. #; $p<0.05$.

4.3.4. Propolisin Su Ekstraktının (PSE) 1,5 mM GCDCA Toksisitesine Karşı Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

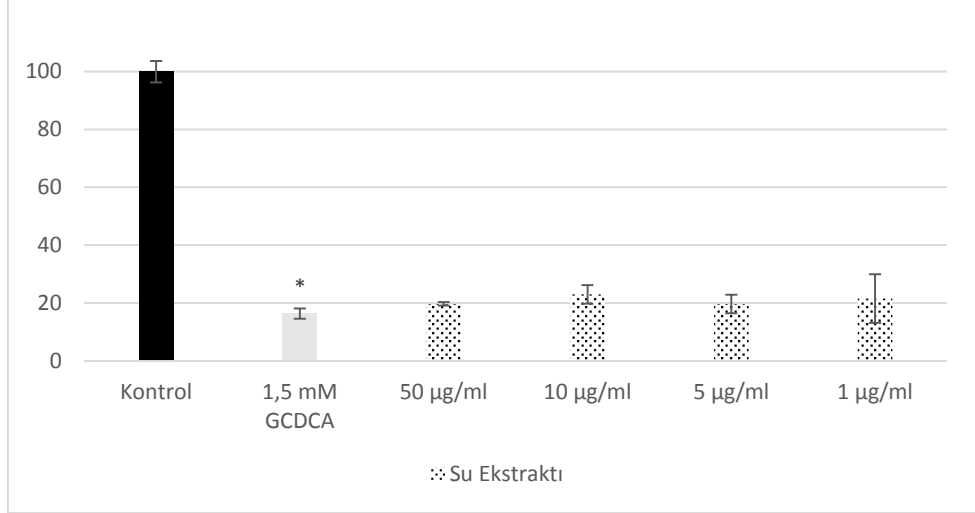
1.5 mM GCDCA ile toksisite indüklenmeden 3 saat önce uygulanan PSE'nin 50 ve 10 µg/ml dozlarının toksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Grafik 9).



Grafik 9. 1.5 mM GCDCA toksisitesinden önce uygulanan propolis su ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.

*GCDCA toksisitesi kontrol kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p<0.05$, Propolis su ekstraktları GCDCA toksisitesi ile karşılaştırıldı. #; $p<0.05$.*

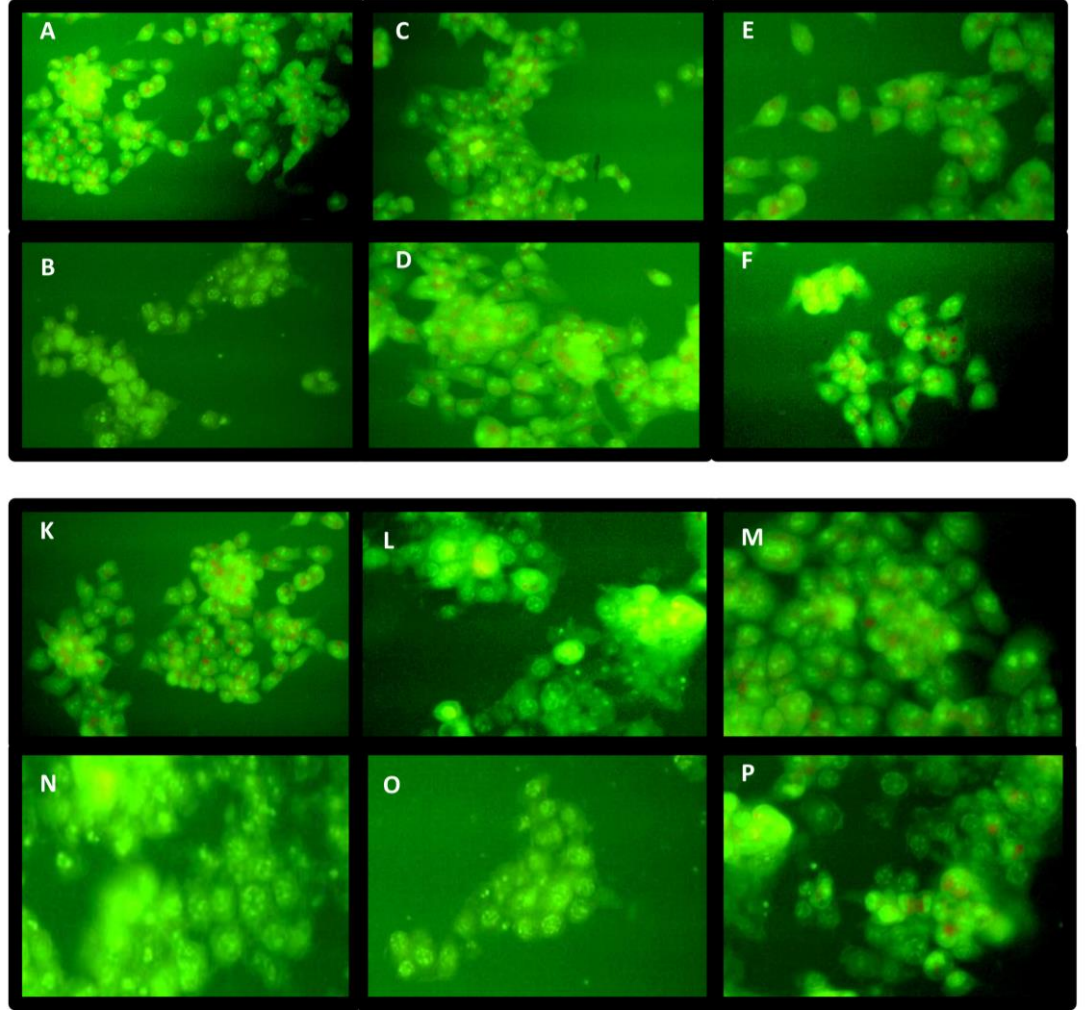
1.5 mM GCDCA ile indüklenmiş toksisiteden 3 saat sonra uygulanan PSE'nin hiçbir dozunun olası tedavi edici ya da koruyucu etkinliği görülmemiştir ($p>0.05$) (Grafik 10).



Grafik 10. 1.5 mM GCDCA toksisitesinden sonra uygulanan propolis su ekstraktının hücre canlılığı üzerine etkisi.

*GCDCA toksisitesi kontrol kontrol grubu ile karşılaştırıldı. *; $p<0.05$*

4.4. Propolis Ekstraktlarının GCDCA Toksisitesine Karşı Etkinliğinin Akridin-Oranj Boyama ile Gözlemsel Değerlendirilmesi



Şekil 8. Propolis ekstraktları etkin dozlarının GCDCA toksisitesine karşı florasın boyama ile gözlemsel değerlendirilmesi.

A- Kontrol, **B-** 1 mM GCDCA toksisitesi, **C-** Propolis Alkol Ekstraktı (1 µg/ml) Önce Uygulaması, **D-** Propolis Alkol Ekstraktı (1 µg/ml) Sonra Uygulaması, **E-** Propolis Su Ekstraktı (10 µg/ml) Önce Uygulaması, **F-** Propolis Su Ekstraktı (10 µg/ml) Sonra Uygulaması.

K- Kontrol, **N-** 1.5 mM GCDCA Toksisitesi, **L-** Propolis Alkol Ekstraktı (1 µg/ml) Önce Uygulaması, **O-** Propolis Alkol Ekstraktı (1 µg/ml) Sonra Uygulaması, **M-** Propolis Su Ekstraktı (10 µg/ml) Önce Uygulaması, **P-** Propolis Su Ekstraktı (10 µg/ml) Sonra Uygulaması.

5. TARTIŞMA

Karaciğer, metabolik ve anabolik reaksiyonların çoğunun gerçekleştiği organ olup bu reaksiyonlar sırasında hasara maruz kalabilmektedir. Önemli bir karaciğer patolojisi olan kolestaz, duodenuma safra akımının azalması veya durması olarak tanımlanabilir. Kanaliküler safra akımı; hepatositlerden salınan solütlere cevap olarak su ve elektrolitlerin ve plazmanın akımıdır (35). Hepatositlerden safra asitlerinin salınımı; safra asitlerinin alımı, hücre içi transportu ve kanaliküler sekresyonu safhalarını içerir. Bilirubinler taşıyıcılarla hepatosit içine alınıp, endoplazmik retikulumda UDP-glukronil transferaz enzimi aracılığıyla glukronik asit ile konjuge edildikten sonra kanaliküler lümene salınır (35).

Tedavi yöntemlerinin pek çok alanda gelişme göstermesine rağmen kolestaza bağlı karaciğer hasarlarının tedavisinde doğrudan kullanılan ilaç bulunmamaktadır.

Son yıllarda alternatif tedavi seçeneklerinin, tıbbi tedaviye ilave olarak özellikle beşeri hekimlik alanında giderek artan bir önem kazandığı görülmektedir. Propolis de bu doğal ürünlerin başında gelen ve biyolojik yönden aktif birçok bileşiği içeriğinde bulunduran, çeşitli bitkilerden bal arıları tarafından toplanan reçineli bir üründür. Materyal toplandıktan sonra arıların tükürük salgısı ve enzimatik sekresyonlar ile zenginleştirilir (52, 81). Propolisin ekstraktlarıyla yapılan çok sayıda çalışmada antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antitümoral, immünomodülatör ve diğer faydalı biyolojik etkileri ispatlanmıştır (82). Aynı zamanda, propolisin çok önemli farmakolojik aktif bileşenleri olan flavonoidler ve kaffeik asit/kaffeik asit fenetil ester (KA/KAFE) gibi çeşitli fenoliklerin, antioksidan özelliklerine bağlı olarak nöroprotektif (83), radyoprotektif (84), kardiyoprotektif (85), gastroprotektif (86), hepatoprotektif (87) ve nefroprotektif (88) etkileri tespit edilmiştir. Propolisin antioksidan etkinliği, özellikle onun yüksek flavonoid içeriğiyle alakalıdır ve propolis ekstraktının kuru ağırlığının % 25-30'unu flavonoidler oluşturmaktadır. Pinosebrin, akasetin, krisin, rutin, katesin, naringenin, galangin, luteolin, kamferol, apigenin, mirisetin ve kuarsetin önemli flavonoid bileşikler olarak bilinmektedir (52, 54).

Yapılan çalışmada kullanılan propolisin en önemli flavonoid bileşiği olan chrysinin antioksidan etkinliği tespit edilmiştir (89). Propolis ile yapılmış çeşitli deneysel çalışmalarda; selenitin neden olduğu katarak formasyonu ve oksidatif stres

üzerine koruyucu etki gösterdiği (90), oksidatif stresin neden olduğu retinal hasara karşı lipid peroksidasyonunu inhibe ederek nöroprotektif etki gösterdiği (83), karbon tetraklorürün neden olduğu oksidatif stresi ve oluşan karaciğer hasarını önlediği (91), *Escherichia coli*'nin neden olduğu pyelonefritte oluşan oksidatif stresi azalttığı (88), alkolün neden olduğu oksidatif stresle oluşan lipid değişiklikleri ve karaciğer hasarı (92) ile deneysel obstrüktif sarılık modelinde oksidatif stres üzerinden oluşan karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu (93), doksorubisin ve vinblastinin yol açtığı mitokondriyal stres ile ortaya çıkan karaciğer ve kalp toksisitesine karşı olumlu etki gösterdiği (85) bildirilmiştir. Sağlıklı insanlarda yapılan in vivo bir çalışmada, oral propolis verilmesiyle kan antioksidan aktivitesinde artış tespit edilmiştir (90). Propolis ile ilgili yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, antioksidan etkinliğinin doz bağımlı ve yüksek polifenolik içerikleriyle ilgili olduğu gösterilmiştir (83, 94-96). Son yıllarda propolisin önemli biyolojik etkilerinden birinin de karsinostatik etki olduğu fark edilmiştir. Propolis bileşiminde bulunan organik maddelerden flavonoidler, serbest radikal temizleyici, metabolik enzim düzenleyici, detoksifiye edici ve immümodülasyonu sağlayıcı etkileri ile ileri aşamalarda antikanserojenik etki göstermektedirler (97).

Bu çalışmada etkinliklerine dair çok sayıda araştırmaya konu olan propolis'in insan hepatosellüler karsinomu C3A hücre hattında glikokenodeoksikolik asit ile indüklenmiş toksisiteye (98) karşı etkinliğini araştırmak amaçlanmıştır. Kolestaz durumunu taklit eden in vitro çalışma düzeni planlanmıştır

El-Khatib ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada karbon tetraklorit ile indükledikleri hepatotoksistide propolisin su ekstraktının lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişlerdir (99). Seo ve arkadaşları asetaminofen ile indükledikleri toksisiteye karşı propolisin beş farklı dozunu (1-10-100-200-400 µg/ml) sıçan karaciğer hücre kültürüne, sıçanlara (50 ve 100 mg/kg p.o. propolis), farelere (10 ve 25 mg/kg p.o. propolis) uygulamışlardır. Hem hücre kültüründe hem farelerde hem de sıçanda toksisitenin azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak propolisin hepatik hasarlanmaya karşı koruyucu etkinliğinin olduğunu bildirmişlerdir (100). Shukla ve arkadaşlarının karbon tetraklorit ile indükledikleri hepatotoksistide propolis ekstraktının (200 mg/kg, p.o.) histopatolojik değişimleri restore ettiği gösterilmiştir (101).

Propolisin önemli bir komponenti olan KAFE'nin tert-butil hidroperoksitle indüklenmiş hepatotoksisiteyi önemli ölçüde azalttığını Lee ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada göstermişlerdir (102). Sathiavelu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada bal ve propolisin diğer önemli bir bileşiği olan chrysin'in etanol ile indüklenmiş hepatotoksisiteye karşı oksidatif stres üzerinden etkisini göstererek olumlu sonuçlar doğurduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında ortaya koydukları histolojik değişimlerin biyokimyasal bulgularla korele olduğunu da bildirmişlerdir (103). Bhadauria ve arkadaşları propolisin ilaç metabolizma yolağındaki enzim olan ve karbon tetraklorid ile hasara uğratılan CYP2E1 üzerinde koruyucu etkinliğinin olduğunu yapmış oldukları çalışmada göstermişlerdir (104). Türkez ve arkadaşları alüminyum ile indükledikleri hepatik hasarlanmayı propolisin önleyebileceğini göstermişlerdir (105). Yine Türkez ve arkadaşlarının 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) ile indükledikleri karaciğer hasarlanmasında propolisin antioksidan etkinliği ile histolojik değişimleri, oksidatif stresi ve DNA hasarını azalttığını bildirmişlerdir (106).

Amberdekar ve arkadaşları çok bileşenli propolisin karaciğer koruyucu etkinliğinin lipozom üretimini artırmasıyla gerçekleştirilebileceğini ortaya koymuşlardır (107). Andritoiu ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada karbon tetraklorit ile sıçanlarda indükledikleri hepatotoksisitede apiterapinin etkinliğinin olabileceğini bildirmişlerdir (108). Kanseri kemoterapisinde kullanılan bir ilaç olan doksorubisin ile indüklenen karaciğer toksisitesi üzerine propolisin sıçan karaciğerinde koruyucu etkinliğinin olduğu bildirilmiştir (109). Cezayir propolisi polifenolik fraksiyonunun yine doksorubisin ile indüklenmiş karaciğer hücrelerindeki oksidatif strese karşı koruyucu etkisi, Wided ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (110). Bizim çalışmamızda da paralel olarak özellikle propolisin safra asidi ile indüklenmiş C3A hücre hattında koruyucu etkinliğinin olduğu gösterilmiştir. Propolis farklı ajanlarla oluşturulmuş hepatik toksisitede etkili bir koruyucu ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızın verileri, kolestazda ve benzeri karaciğer hastalıklarında propolis verilmesinin, koruyucu etkinliğinin reaktif oksijen radikallerinin temizlenmesi sonucu antioksidan tüketiminin engellenmesi ve metabolik enzim düzenleyici etkisi ile oluşabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada insan hepatosellüler karsinom hücre hattı olan C3A üzerine glikokenodeoksikolik asit ile oluşturulan hepatotoksisiteye karşı propolisin etkinliği spektrofotometrik ölçüm (MTT testi) ve histokimyasal boyama (akridin oranj) ile incelenmiştir.

Sonuçta;

1. 1 ve 1,5 mM GCDCA ile indüklenen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde hücre morfolojisi ve sayısında azalma ortaya çıkmıştır.
2. Propolisin su ve alkol ekstraktları safra asidi ile indüklenen toksisitede koruyucu etkinliği görülmüştür.
3. Bu çalışmanın sonuçları propolis ekstraktlarındaki bileşenlerin ayrıştırılarak saf hale getirilip safra toksisitesinde araştırılmasının değerli olduğunu ortaya koymuştur.

7. KAYNAKLAR

1. **Abraham L. Kierszenbaum.** Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Prof. Dr. Ramazan Demir (Çeviri Editörü) Palme, Ankara: 2006; 17: 467.
2. **Williams P, Warwick R, Dyson M, Bannister LH:** Gray's Anatomy. 37th, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992;1384-1396.
3. **Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM:** Gray's Anatomy for Student. Yıldırım M (çeviri editörü), Ankara: Güneş Kitapevi, 2007; 4: 285-306.
4. **Süzen LB.** İnsan Anatomisine Giriş, AkademiYayın 2006, 314-319.
5. **Cumhur M.** Temel Anatomi, Ankara: ODTÜ Yayıncılık-METU basım, 2001; 241-247.
6. **Yıldırım M.** Topografik Anatomi, baskı, İstanbul: Nobel, 2000; 5:251-255.
7. **Moore KL, Agur AMR.** Temel Klinik Anatomi, Elban A (çeviri editörü), 2. Baskı, Ankara: Güneş, 2006; 3:168-180.
8. **Guyton AJ,** Fizyoloji, Çeviri Ed. Berrak Çağlayan Yeğen. 12. Baskı, İstanbul: Nobel, 2013; 837-842.
9. **Ganong WF,** Tıbbi Fizyoloji, Çeviri Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 23.baskı, İstanbul: Nobel, 2012; 29: 479-489.
10. **Sancak B,** Cumhur M, Fonksiyonel Anatomi; Ankara: METU basım, 1999: 253-262.
11. **Çimen A,** Anatomi, Bursa: Uludağ Üniversitesi basım evi 1997; 365-375.
12. **Şentürk H.** Serbest radikal hasarının hepato-biliyer sistem hastalıklarındaki rolü. Kocatepe Tıp Dergisi 2004;5:1-8.
13. **Junqueira LC, Carneiro J** (Çeviri: Y. Aytekin, S. Solakoğlu). Temel Histoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006:332-44.
14. **Bortolotti F, Guido M.** Reversal of liver cirrhosis: a desirable clinical outcome and its pathogenic background. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007;44(4):401-6.
15. **Lidosfsky SD.** Jaundice. In: Baccon BR, O'Grady JG, Di Bisceglie AM, Lake JR (Eds), Comprehensive clinical hepatology 2006:83-99.
16. **Poli G.** Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. Mol Aspects of Med 2000;21:49-98.
17. **Bataller R, Brenner DA.** Liver fibrosis. J Clin Invest 2005;115:209-31.
18. **William A, Sodeman JR, Thomas M** (Çeviri: Hekimler Birliği Vakfı). Sodeman's Fizyopatoloji, 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikler Yayınevi; 1992;2:954-56.
19. **Williams P, Warwick R, Dyson M, Bannister LH.** Gray's Anatomy. 40th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2009. p.1384-96.
20. **Karaöz E.** Sindirim Sistemi Histolojisi, In: Karaöz E. (ed) Özel Histoloji, SDÜ Basımevi, Isparta, 2002.
21. **Gitnick G.** Hepatitis 1990 (review). Scand J Gastroenterol Suppl 175:113-7, 1990.

22. **Lambou-Gianoukos S, Heler SJ.** Lithogenesis and metabolism. Surg Clin North Am 88(6):1175-94 2008.
23. **Tygstrup N.** Assessment of liver function: principles and practice. J Gastroenterol Hepatol 5(4):468-82, 1990.
24. **Önür ND, Beyler AR.** Safra asidi metabolizması. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi mecmuası . 2001;54:65-72.
25. **Monte MJ, morin JJ, Antelo A.** Bile asids chemistry pysiology and patofizyoloji. World j gastroenterology. 2009;15(7):804-16.
26. **Keating N, Keely SJ.** Bile asids in regulation of intestinal physiology. Curr gastroenterol rep. 2009 oct; 11(5)375-82.
27. **Sözen M, Türkay C.** Ursodeoksikolik Asit İçin Tıbbi Endikasyonlar ve Etki Mekanizmaları. Güncel gastroenteroloji. 2011; 15/4: 245-52.
28. **Aran Ö.** Safra yolları hastalıkları. Sayek İ.(ed)Temel cerrahi 1996;cilt 2:1299.
29. **Batman F, Arslan S.** Karaciğer fizyolojisi. Sayek İ.(ed). Temel cerrahi 1996;cilt 2:1205.
30. **Haubrich WS, Kalser MH, Roth JL, Schaffner F.** Bockus Gastroenterology. 5. Saunders; W B, 1985:2666-96.
31. **Johnson LR.** Essential Medical Physiology Lippincott. 1. Philadelphia: NY, 1998: 468-72.
32. **Lau YJ, Chen YH, Huang CT, Lee WS, Liu CY, Liu JW et al.** Role of moxifloxacin for the treatment of community-acquired complicated intra-abdominal infections in Taiwan. Journal of microbiology, immunology and infection . 2012; 45: 1-6.
33. **John YLC.** Bile acids: regulation of synthesis. J Lipid Res. 2009 October; 50(10): 1955–1966.
34. **Bouscarel B, Kroll SD, Fromm H.** Signal Transduction and Hepatocellular Bile Transport: Cross Talk Between Bile Acids and Second Messengers1. Gastroenterology. 1999;11: 433-452.
35. **Schiff, E.R., Sorrell, M.F., Maddrey, W.C.** (1999). The Cholestasis Disorders. Disease of the Liver, 8th edition on CD-ROM, (Eds.) Erlinger, S., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
36. **Yamada, T., Alpers, D.H., Laine, L., Owyang, C., Powell, D.W..** Approach to the Patient with Jaundice. Textbook of Gastroenterology, 3rd edition., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999; 939-943.
37. **Efe, D.** Karaciğer kitlelerinin ayırıcı tanısında manyetik rezonans görüntüleme. Tıp Araştırmaları Dergisi, 2003, 1; 17-21.
38. **Zhong, Z., Froh, M., Smutney, O., Lehmann, T.G., Thurman, R.G.** Viral gene delivery of superoxide dismutase attenuates experimental cholestasis-induced liver fibrosis in the rat. Gene Therapy, 2002, 9; 183-191.
39. **Akhan, O.** Biliyer sepsiste girişimsel radyolojinin rolü. ANKEM Derg, 2005, 19, 48-49.
40. **Gujral, J.S., Farhood, A., Bajt, M.L., Jaeschke, H.** (2003). Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct ligated mice. Hepatology, 38, 355-363.
41. **Burdock, G.A.** Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and Chemical Toxicology, 1998; 36: 347-363.

42. **Castaldoa, S. and Capasso, F.** Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 2002; 73: S1-S6.
43. **Sforcin, J.M.** Propolis and the immune system a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007; 113: 1-14.
44. **Silici S, Kutluca S.** Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 69-73.
45. **Bankova V.** Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J of Ethnopharm.* 2005; 100: 114-117.
46. **Santos, F.A., Bastos, E. M. A. F., Maia¹, A. B. R. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R. Farias, L. M., Moreira, E. S. A.** Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy research*, 2003; 17: 285–289.
47. **Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D.G., Fearnley, J.:** Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytotherapy research*, 2008; 22: 1256–1263.
48. **Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A. G., kadota, S.:** Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and Chine. *Journal of Etnopharmacology*, 2000; 72: 239-246.
49. **Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S.:** Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002; 80: 67- 73.
50. **Woo, K. S., Park, J. S.:** **Eucalyptus propolis beverages with their compesition and effects.** In **Mizrahi, A., Lensky, Y.** (Eds), *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. Plenum Press, New York, 1997; 125-128.
51. **Campos, M.G., Cunha, A., Markham, K.R.:** **Bee Products Chemical Composition and Application in Mizrahi, A., Lensky, Y.**(Eds), *Bee-Pollen Composition, Properties, and Applications*, Plenum Press, New York, 1997; 93-100.
52. **Marcucci MC.** propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie* 1995; 25: 83.
53. **Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S.** Seasonal variations in essential oil from brazilian propolis, *journal of essential oil. Research (J Essent Oil Res)*, 1998; 10: 693–96.
54. **Walker P, Crane E.** Constituents of propolis, *Apidologie* 1987; 18: 327–34.
55. **Ivona Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z., Smolic-Bubalo, A., Medic-Saric, M., Mayer, L., Romic, Z., Bucan, K., Balog, T., Sobocanec, S., Sverko, V.:** In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007; 110: 548–554.
56. **Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J of Nutr Biochem.* 2002; 13: 572-584.

57. **Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, et al.** Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal Of Ethnopharmacology* 1999; 64: 235-40.
58. **Moreno MIN, Isla MI, Cudmani NG, et al.** Screening of antibacterial activity of amaiche del valle (tucuman, argentina) propolis. *Journal Of Ethnopharmacology* 1999; 68: 97-102.
59. **Sforcin JM, Fernandes JA, Lopes CAM, et al.** Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 73: 243–49.
60. **Koo H, Rosalen PL, Cury JA, et al.** Effects of compounds found in propolis on streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1302–09.
61. **Cafarchia C, De Laurentis N, Millilo MA, et al.** Antifungal activity of apulia region propolis. *Parassitologia* 1999; 4: 587–90.
62. **Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, et al.** Antifungal activity of propolis on different species of candida. *Mycoses* 2001; 44: 375–78.
63. **Sawaya ACHF, Palma AM, Caetano FM, et al.** Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of candida. *Letters Dn Applied Microbiology* 2002; 35: 203–07.
64. **D'auria FD, Tecca M, Scazzocchio F, et al.** Effect of propolis on virulence factors of candida albicans. *Journal of Chemotherapy* 2003; 15: 454–60.
65. **Murad JM, Calvi Sa, Soares AM, Bankova V, Sforcin JM.** Effects of propolis from Brazil ve Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 331-334.
66. **Koç AN, Silici S, Ayangil D, Ferahbas A, Cankaya S.** Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton* and *T.mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses* 2005; 48: 205-210.
67. **Hady FK, Hegazi AG.** Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east nile delta propolis. *Z Naturforsch* 2002; 57: 386–94.
68. **Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, et al.** Evaluation of propolis. I. Evaluation of brazilian and chinese propolis by enzymatic and physicochemical methods. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1997; 20: 496-501.
69. **Naito Y, Yasumuro M, Kondou K, et al.** Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Pytother Res* 2007; 21: 452- 56.
70. **Orhan H, Marol S, Hepsen IF, Sahin G.** Effects of some probable antioxidants on selenite induced cataract formation and oxidative stress related parameters in rats. *Toxicology* 1999; 139: 219-232.
71. **Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, et al.** Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sciences* 2007; 80: 370–77.

72. **Russo AA, Troncoso B, Sanchez F, et al.** Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life Sciences* 2006; 78: 1401 – 06.
73. **Benkovi V, Orsolì N, Knezevic A, et al.** Evaluation of the Radioprotective Effects of Propolis and Flavonoids in Gamma-Irradiated Mice: The Alkaline Comet Assay Study. *Biol. Pharm, Bull* 2008; 31: 167-72.
74. **Benguedouar L, Boussenane HN, Wided K, et al.** Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in Rats. *Indian J Exp Biol* 2008; 46: 112-19.
75. **Kilicoglu SS, Kismet K, Sabuncuoglu MZ, et al.** Effect of Propolis on Oxidative Stress and Histomorphology of Liver Tissue in Experimental Obstructive Jaundice. *Eur Surg Res* 2008; 41: 231-37.
76. **Fischer G, Leite FP, Conceicao FR, et al.** Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with suhv-1. *Vaccine* 2007; 25: 1250-56.
77. **Fischer G, Cleff MB, Dummer LA, et al.** Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116: 79-84.
78. **Trusehva B, Popova M, Bankova V, et al.** Bioactive constituents of brazilian red propolis, evid based complementary. *Alternative Medicine* 2006; 3: 249-54.
79. **Gregory SR, Piccolo N, Piccolo MT, et al.** Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *J Altern Complement* 2002; 8: 77-83.
80. **Falcioni G, Gabbianelli R, et al.** Antioxidative and gastroprotective activities of antiinflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. *Nutrition Research* 2006; 26: 130– 37.
81. **Ghisalberti E.** Propolis: a rewiev, *Bee World* 1979; 60: 59-84.
82. **Cuesta, A., Rodri´guez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J.:** In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005; 18: 71-80.
83. **Mishima S, Makajima Y, Shimazawa M, et al.** Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sciences* 2007; 80: 370–77.
84. **Benkovi V, Orsolì N, Knezevic A, et al.** Evaluation of the Radioprotective Effects of Propolis and Flavonoids in Gamma-Irradiated Mice: The Alkaline Comet Assay Study. *Biol. Pharm, Bull* 2008; 31: 167-72.
85. **Boussenane HN, Benguedouar L, Wided K, et al.** Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian J Exp Biol* 2008; 46: 112-19.

86. **Gabbianelli R, Falcioni G, et al.** Antioxidative and gastroprotective activities of antiinflammatory formulations derived from chestnut honey in rats. *Nutrition Research* 2006; 26: 130– 37.
87. **Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, et al.** Hepatoprotective and antihelicobacter pylori activities of constituents from brazilian propolis. *Phytomedicine* 2001; 8: 16-23.
88. **Celik S, Gorur S, Aslantas O.** Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in escherichia coli-induced pyelonephritis in rats. *Mol cell Biochem* 2007; 297: 131-38.
89. **Villar IC, Jiménez R, Galisteo M.** Effects of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats. *Plant Med* 2002; 68: 847-50.
90. **Marol S, Orhan H, Hepsen IF, Sahin G.** Effects of some probable antioxidants on selenite induced cataract formation and oxidative stress related parameters in rats. *Toxicology* 1999; 139: 219-232.
91. **Shukla S, Nirala SK, Bhadauria M.** Propolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride. *Mol cell Biochem* 2007; 302: 215-224.
92. **Kolankaya D, Selmanoglu G, Sorkun K, et al.** Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry* 2002;78: 213-17.
93. **Kismet K, Sabuncuoglu MZ, Kilicoglu SS, et al.** Effect of Propolis on Oxidative Stress and Histomorphology of Liver Tissue in Experimental Obstructive Jaundice. *Eur Surg Res* 2008; 41: 231-37.
94. **De Barros MP, Sousa JP, Bastos JK.** Effect Of Brazilian Green Propolis On Experimental Gastric Ulcers Dn Rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 567-71.
95. **A. Russoa R, Longo A. V.** Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73: 21–29.
96. **Isla MI, Nieva Moreno MI, Sampietro AR, et al.** Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76: 165– 70.
97. **Benkovic V, Knezevic HA, Brozovic G, Knezevic F, Dikici D, Bevanda M, Basic I, Orsolc N.** Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on ehrlich ascites tumor in mice. *Biomed&Pharmacotherapy*. 2007; 61: 292-297.
98. **Perez MJ, Briz O.** Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol*. 2009 Apr 14;15(14):1677-89.
99. **El-Khatib AS, Agha AM, Mahran LG, Khayyal MT.** Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity in vivo. *Z Naturforsch C*. 2002 Mar-Apr;57(3-4):379-85.
100. **Seo KW, Park M, Song YJ, Kim SJ, Yoon KR.** The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism. *Phytother Res*. 2003 Mar;17(3):250-3.
101. **Shukla S, Bhadauria M, Jadon A.** Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Indian J Exp Biol*. 2004 Oct;42(10):993-7.
102. **Lee KJ, Choi JH, Hwang YP, Chung YC, Jeong HG.** Protective effect of caffeic acid phenethyl ester on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity and DNA damage. *Food Chem Toxicol*. 2008 Jul;46(7):2445-50.

103. **Sathiavelu J, Senapathy GJ, Devaraj R, Namasivayam N.** Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *J Pharm Pharmacol.* 2009 Jun;61(6):809-17.
104. **Bhadauria M, Nirala SK, Shukla S.** Propolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride. *Mol Cell Biochem.* 2007 Aug;302(1-2):215-24.
105. **Türkez H, Yousef MI, Geyikoglu F.** Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food Chem Toxicol.* 2010 Oct;48(10):2741-6.
106. **Türkez H, Geyikoğlu F, Yousef MI, Toğar B, Vançelik S.** Propolis alleviates 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced histological changes, oxidative stress and DNA damage in rat liver. *Toxicol Ind Health.* 2013 Sep;29(8):677-85.
107. **Ambardekar RV, Mahadik KR, Paradkar AR, Harsulkar AM.** Enhancement of hepatoprotective efficacy of propolis by fabrication of liposomes, as a platform nano- formulation for multi-component natural medicine. *Curr Drug Deliv.* 2012 Sep;9(5):477-86.
108. **Andritoiu CV, Ochiuz L, Andritoiu V, Popa M.** Effect of apitherapy formulations against carbon tetrachloride-induced toxicity in Wistar rats after three weeks of treatment. *Molecules.* 2014 Aug 29;19(9):13374-91.
109. **Singla S, Kumar NR, Kaur J.** In vivo Studies on the Protective Effect of Propolis on Doxorubicin-Induced Toxicity in Liver of Male Rats. *Toxicol Int.* 2014 May;21(2):191-5.
110. **Wided K, Hassiba R, Mesbah L.** Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pak J Pharm Sci.* 2014 Nov;27(6):1891-7.

ÖZGEÇMİŞ

Ümmügülsüm BENEK 25.10.1986 tarihinde Sivas'ta doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Sivas'ta tamamladı. 2005 yılında girdiği Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden Haziran 2009'da mezun oldu. 2013 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.