

Artvin Şavşat Yöresi Propolisinin Farklı Sıcaklıklarda Hazırlanan PBS'li Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin ve Eritrosit Hemoliz İnhibisyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması

Deniz CANBOLAT¹, İbrahim TURAN², Yunus Emre KÜPELİ³, Sedanur KILINÇ⁴, Sevim PİLİÇ⁵

¹Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Gümüşhane, ^{2,3,4,5}Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Gümüşhane

¹<https://orcid.org/0000-0003-1328-4762>, ²<https://orcid.org/0000-0003-3400-5494>, ³<https://orcid.org/0000-0002-3114-941X>

⁴<https://orcid.org/0000-0002-9093-9550>, ⁵<https://orcid.org/0000-0003-1217-6188>

✉: ibrahimtrn@gmail.com

ÖZET

Geleneksel tıpta yüzyıllardır tüm dünyada kullanılan propolis, bal arılarının bitkilerin tomurcuklarını ve polen tanelerini salgıladıkları enzimlerle karıştırıp elde ettikleri kompleks içeriğe sahip reçinemsî doğal bir üründür. Toplanma bölgesi, bitki kaynağı, arı çeşitliliği ve toplandığı yerin ikliminin farklı olması sebepleriyle propolis farklı içeriklere sahip olabilmektedir. Farklı bölgelerle ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen, Artvin ilinin Şavşat bölgesine ait propolis ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın amacı Artvin Şavşat yöresine ait propolisin farklı sıcaklıklarda (45 ve 60 °C) fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS) ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin (demir indirgeyici güç tayini, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi, toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarı) tespit edilmesi ve ekstraktların eritrosit hemoliz inhibisyon özelliklerinin belirlenmesidir. PBS'li ekstraktların toplam fenolik (g propoliste 11.91±0.5-24.14±1.38 mg gallik asit eşdeğeri) ve toplam flavonoid (g propoliste 1.79±0.03-2.13±0.07 mg kuersetin eşdeğeri) madde miktarı, demir indirgeyici güç tayini (g propoliste 12.80±0.36-27.15±0.12 mg askorbik asit eşdeğeri), DPPH (%22.86±0.5-31.24±1.33) ve eritrosit hemoliz inhibisyonu (%55.58±0.57-96.37±0.02) spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlendi. Deneylerin sonucunda 60 °C sıcaklıkta elde edilen PBS'li ekstraktın, antioksidan özellikleri ve eritrosit hemolizini inhibe etme oranının 45 °C de elde edilen ekstrakta göre yüksek olduğu tespit edildi. Ekstraktların eritrosit hemolizini inhibe edici ve yüksek antioksidan özellik gösteren moleküllerinin belirlenmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 07.07.2020

Kabul Tarihi : 23.12.2020

Anahtar Kelimeler

Antioksidan Aktivite

Hemoliz İnhibisyonu

Propolis

Investigation the Different Extraction Temperature Effect of Artvin Şavşat Region Propolis PBS Extracts on Antioxidant Properties and Erythrocyte Hemolysis Inhibition

ABSTRACT

Propolis, which has been used in traditional medicine for hundreds of years all over the world, is a resinous natural product with a complex content obtained by honey bees by mixing the buds of plants and pollen grains with enzymes they secrete. Propolis may have different contents due to the gathering region, plant source, bee variety and climate of the place where it is collected. Although there are many studies related to different regions, so far the propolis of the Şavşat region in Artvin have not been studied yet. The aim of this study is to determine the antioxidant properties (determination of iron reducing power, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, total phenolic and total flavonoid content) of propolis extracts of Artvin Şavşat region prepared with phosphate buffer salt solution (PBS) prepared at different temperatures (45 and 60 °C) and to determine the erythrocyte hemolysis inhibition properties of the extracts. Total phenolic (11.91±0.5-24.14±1.38 mg gallic acid equivalent to g propolis) and total flavonoid (1.79±0.03-2.13±0.07 mg

Research Article

Article History

Received : 07.07.2020

Accepted : 23.12.2020

Keywords

Antioxidant Activity

Hemolysis Inhibition

Propolis

quercetin equivalent to g propolis) content of PBS extracts, iron power determination (12.80±0.36-27.15±0.12 mg ascorbic acid equivalent to g propolis), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity (%22.86±0.5-31.24±1.33) and erythrocyte hemolysis inhibition (%55.58±0.57-96.37±0.02) were determined using spectrophotometric methods. As a result of the experiments, it was determined that the extract with PBS obtained at a temperature of 60 °C was higher than the extract obtained at 45 °C, in terms of antioxidant properties and erythrocyte hemolysis inhibition ratio. Further studies are required to identify molecules that inhibit erythrocyte hemolysis in extracts and have antioxidant properties.

Atf İçin: Canbolat D, Turan İ, Küpeli YE, Kılınc S, Piliç S 2021. Artvin Şavşat Yöresi Propolisinin Farklı Sıcaklıklarda Hazırlanan PBS'li Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin ve Eritrosit Hemoliz İnhibisyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (3): 464-472. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.765838.

To Cite : Canbolat D, Turan İ, Küpeli YE, Kılınc S, Piliç S 2021. Investigation of the Different Extraction Temperature Effect of Artvin Şavşat Region Propolis PBS Extracts on Antioxidant Properties and Erythrocyte Hemolysis Inhibition. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (3): 464-472. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.765838.

GİRİŞ

Son zamanlarda sentetik ilaçların hastalıklarda kullanımının belirli yan etkilerle sonuçlanmasının ardından insanlar ilaç olarak doğal ürünleri tüketmeye başlamıştır. Doğal ürünler, farmakolojik keşiflerin gelecek vadeden kaynaklarından olup arı ürünleri de bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır. Arı ürünlerinin hastalıkların tedavisi için kullanılmasına apiterapi denir (Scorfin ve Bankova 2011; Frozza ve ark., 2013; Onbaşılı ve ark., 2019). Apiterapide en sık kullanılan ürünlerden biri de propolistir. Geleneksel tıpta yüzlerce yıldır tüm dünyada kullanılan propolis, bal arılarının topladıkları tomurcuk ve polen tanelerini salgıladıkları enzimler ile karıştırıp elde ettikleri kompleks içeriğe sahip reçinemi doğal bir üründür (Da-silva ve ark., 2013; Turan ve ark., 2015). Arılar propolisi kovanda bulunan çatlakların kapatılmasında ve kovana gelen davetsiz misafirleri öldürmek için kimyasal bir silah olarak kullanmaktadır (Demir ve ark., 2016). Zengin bir içeriğe sahip olan ve içeriği toplanma yerine, zamanına, arı çeşitliliğine ve bitki kaynağına bağlı olarak değişiklikler gösteren propolisin yapısında genel olarak %5 polen, %5 organik maddeler, %10 aromatik ve uçucu yağlar, %50 reçine ve bitkisel balmum, %30 ise balmumu gibi çeşitli maddeler bulunmaktadır (Burdock, 1998; Rufatto ve ark., 2017). Farklı propolis örneklerinden günümüze kadar 300 farklı bileşik tanımlanmıştır ve bunların içinde çeşitli flavonoidler ve fenolik asitlerin (hem benzoik asit hemde sinnamik asit türevleri) bulunduğu bildirilmiştir (Aliyazıcıoğlu ve ark., 2013; Da-silva ve ark., 2013; Turan ve ark., 2015). Çok çeşitli aktif bileşenler (flavonoidler ve fenolik asit) içeren propolisin flavonoid içeriğindeki değişiklikler, esas olarak bal arılarının ziyaret ettiği bitkilerin bölgesel farklılığına atfedilmektedir (Ertürk ve ark., 2016). İçerdiği bileşikler ile propolis antibakteriyel, radyoprotektif, antienflamatuvar, antiviral, antimutajenik, antikanser ve antioksidan özelliklere

sahiptir (Aliyazıcıoğlu ve ark., 2005; Pereira ve ark., 2008; Demir ve ark., 2016; Yalçın ve ark., 2016; Mısır ve ark., 2018).

Sağlık açısından bu kadar yararlı özelliklere sahip olan propolis ham haliyle endüstride direk olarak kullanılmadığından tüketilebilmesi için ilk olarak ekstrakte edilmelidir. Propolisin ekstraksiyonunda özellikle gıda ve sağlık sektöründe kullanılacak bir ürün geliştirilecekse su ve gliserol gibi toksik olmayan çözücülerin kullanımı uygun görülmektedir (Thamnopoulo ve ark., 2018; Bakkaloğlu ve Arıcı, 2019). Fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS) birçok *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmada tampon çözelti ya da kontrol grubu olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda PBS'nin hücrelere ve enzimlere zarar vermediği gözlemlenmiş olup PBS'nin kullanımının canlı vücudunda herhangi bir toksisiteye neden olduğunu gösteren bir çalışmaya da rastlanılmamıştır (Meeking ve ark., 2019; Sajid ve ark., 2020; Kozima ve ark., 2020). Ekstraksiyon işleminde çözücünün yanı sıra uygulanan sıcaklığında önemi vardır. Uygulanan sıcaklığın ekstraktlarda bulunan fenolik bileşikleri serbest hale dönüştürebileceği ve sonucunda antioksidan aktiviteyi arttırabileceği bildirilmektedir (Meral, 2017).

Antioksidanlar, serbest radikallerin canlı vücudunda meydana getirdiği hasarları ortadan kaldırmak için bir tür savunma sistemidir. Bu sistem doğrudan veya dolaylı olarak karsinojenlerin, ilaçların ve aynı zamanda birçok toksik radikal reaksiyonların zararlı etkilerine karşı hücreleri korumaktadır (Mercan, 2004; Süleyman ve ark., 2018). Serbest radikaller (ROS) eşlenmemiş elektronlara, elektron verebilen ya da eşlenmemiş elektronlara saldırıp onlardan elektron alabilen moleküllerdir. Bu moleküller negatif, pozitif ya da nötr yüke sahip olabilmektedir. ROS'ların farklı konsantrasyonları biyolojik sistemler üzerinde yararlı ya da zararlı etki gösterebilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda ROS'lar, hücre fonksiyonlarını,

bağışıklık tepkilerini, vasküler tonusu, inflamasyon sürecini ve hücrel sinyalizasyonu sağlayan önemli fizyolojik rollere sahip olmakla birlikte aynı zamanda çok sayıda biyolojik tepkimelere de etki ederek yükseltgenme ve indirgenme sinyallerini kontrol edebilirler. Biyolojik sistemlerde ROS'ların yüksek konsantrasyonları ise hasar verici eylemleri teşvik ederek hastalıklara neden olmaktadır (Brieger ve ark.,2012; Sezer ve Keskin, 2014). Hücrel metabolizmada oluşan süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi ROS'ların artışı ile antioksidan enzimlerin, bu ROS'ları detoksifiye edememesi sonucu oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stresin artışından kaynaklanan ROS'lar, DNA'da bulunan bazlardan, hücre içi lipit ve protein yapılarının çift bağ içeren gruplarından bir hidrojen atomu kopararak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatabilme yeteneğine sahiptirler. Bu zincirleme reaksiyonların sonucunda ise DNA, hücre içi protein ve lipit gibi makro moleküller hasar görek hücre ölümü ya da hasarına neden olmaktadır. (Özcan ve ark., 2015; Ighodaro ve Akinloye, 2017). ROS'lardan ilk etkilenen hücreler arasında kırmızı kan hücresi olarak bilinen eritrositlerin olduğu bildirilmektedir (Balkan, 2017). Solunum sırasında eritrositler sürekli olarak oksidatif hasara neden olabilecek yüksek oksijen gerilimine maruz kalmaktadır. Bunun yanında eritrositlerin toksik maddelere maruz kalması, membranlarında hasara neden olan serbest radikallerin oluşumuna yol açar (Shinde ve ark., 2017). Eritrositlerin membran yapılarında yüksek oranda çoklu doymamış yağ asidi ve içindeki hemoglobinin yapısında oksidasyonu katalizleyen ferro demiri (Fe³⁺) bulunmaktadır. Bu yapılar eritrositleri ROS'ların açık hedefi haline getirmektedir (Balkan, 2017). Eritrosit zarına serbest radikal saldırısı, hemolize yol açan lipid peroksidasyonuna neden olur (Ramchoun ve ark., 2015). Eritrositler, ROS'lardan yoğun etkilenmesi ve elde edilmesinin de kolay olması sebebiyle *in vitro* çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Carl ve ark., 2016; Balkan, 2017).

Yapılan literatür taramalarında propolisin farklı sıcaklıklarda hazırlanan PBS'li ekstraktlarının antioksidan özelliklerini ve eritrosit hemoliz inhibisyonunu değerlendiren *in vitro* çalışmaya rastlanılmamıştır. Buradan hareketle hazırlanan bu çalışmanın amacı; Artvin Şavşat yöresine ait propolisin farklı sıcaklıklarda (45 ve 60 °C) hazırlanan PBS'li ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin tespit edilmesi ve ekstraktların eritrosit hemoliz inhibisyon özelliklerinin incelenmesidir.

MATERYAL ve METOD

Propolisin Temini

Çalışmada kullanılan propolis, Artvin ilinin Şavşat yöresinden temin edilmiştir.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Antioksidan aktivite analizi ve eritrosit hemoliz inhibisyonu için kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck ve Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından satın alındı.

Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Bu çalışmada mikroplyt okuyucu (Thermo scientific, Multiskan GO, Finlandiya), hassas terazi (Kern, ABJ-NM/ABS-N, Almanya), etüv (Daihan Scientific, ThermoStable IG-105, Güney Kore), çalkalayıcı inkübatör (Shel lab, SI4, Amerika), spektrofotometre (Shimadzu, Japonya), pH-metre (Hanna, Almanya) ve santrifüj (Beckman Coulter-AllegraX-30R, Almanya) cihazları kullanıldı.

Propolisin Ekstraksiyonu

Propolis rende yardımıyla toz haline getirildi. Toz halindeki örneklerden 0,5'er gram tartılıp iki ayrı 50 mL'lik tüpe aktarıldı. Bu tüplere 20' şer mL PBS ilave edilerek vortekslenildi ve çalkalayıcı inkübatörde iki farklı sıcaklıkta (45 ve 60°C) 150 rpm'de 24 saat sürekli çalkalanarak inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası 2000xg de 10 dakika santrifüj edildi ve propolis ekstraktları süzgeç kâğıdı yardımıyla süzüldü. Elde edilen PBS'li ekstraktlar antioksidan deneylerinde ve eritrosit hemoliz inhibisyonu deneyinde kullanılmak üzere alikotlanarak - 20 °C' de, karanlıkta saklandı (Turan ve ark., 2017).

Toplam Fenolik Madde Tayini

Folin-Ciocalteu metodu fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik olarak *in vitro* analizi için kullanılmaktadır. Propolis ekstraktlarındaki toplam fenolik madde içeriği standart olarak kullanılan mg gallik asit(GA) eşdeğeri/ 1 g propolis olarak belirtildi. Kısaca modifiye edilmiş olan Folin-Ciocalteu metoduna göre 12.5 µL ekstrakt, 1:10 seyreltilmiş Folin reaktifi (62.5 µL) ve %20'lik sodyum karbonat çözeltisinden (125 µL) eklendikten sonra oda sıcaklığında, 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından absorban ölçümü 760 nm'de mikroplyt okuyucuda gerçekleştirildi. Tüm analizler, üç kez tekrarlandı (Slinkard ve Singleton, 1977).

Toplam Flavonoid Madde Tayini

Propolis ekstraktlarının toplam flavonoid içeriği, standart olarak kullanılan mg kuersetine eşdeğer/1 g propolis olarak belirtildi. Alüminyum klorür kolorimetrik metoduna göre propolis ekstraktlarından 20 µL, %80'lik etanolden 172 µL, %10'luk alüminyum klorürden 4 µL ve 1 M potasyum asetat çözeltisinden 4 µL ilave edilip karıştırıldı ve 40 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonun

ardından absorbans ölçümü 415 nm'de mikropleyt okuyucuda gerçekleştirildi. Tüm analizler, üç kez tekrarlandı (Moreno ve ark., 2000).

Demir İndirgeyici Gücün Belirlenmesi

Propolis ekstraktlarının demir indirgeyici gücü mg askorbik asite eşdeğer/g propolis olarak belirtildi. Oyaizu tarafından geliştirilmiş yöntem modifiye edilerek; 40 µL propolis ekstraktı, 100 µL 0.2 M fosfat tamponu (pH:6.6) ve 100 µL potasyum ferrisiyanatla karıştırılıp 50°C'de karanlık bir yerde 20 dakika inkübe edildi ve inkübasyon sonrası su altında tutularak soğuması beklendi. Karışıma %10'luk TCA (trikloroasetik asit)'dan 100 µL ilave edildi ve karışım 10 dakika 2000×g'de santrifüjlendi. Santrifüjlenen örneklerin üst fazlarından 96 kuyucuklu mikropleyte 100'er µL alındı ve üzerlerine 100'er µL distile su ve 20'er µL demir (III) klorür eklendi. Son karışım karanlıkta, oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun ardından absorbans ölçümü 700 nm'de mikropleyt okuyucuda gerçekleştirildi. Tüm analizler, üç kez tekrarlandı (Oyaizu, 1986).

DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

Propolis ekstraktlarının DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi Yu ve arkadaşları tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanıldı (Yu ve ark., 2002). 125 µL propolis ekstraktı üzerine 0.1 mM'lık 125 µL DPPH radikali eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dk'lık inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası 517 nm'de mikropleyt okuyucuda absorbans değerleri okundu. Sonuçları % inhibisyon olarak belirtildi. Yüzde inhibisyon değeri Eşitlik 1'deki formülden hesaplandı.

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek})}{Abs_{kontrol}} \times 100$$
 (Eşitlik 1.)

Eritrosit Hemoliz İnhibisyonu

Çalışma için KTÜ Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulundan 2019-13 sayılı Etik Kurul onayı alındı. Onam formu eşliğinde 10 farklı gönüllüden (alkol, ilaç, sigara kullanmayan, kronik rahatsızlığı olmayan ve ağır egzersiz yapmayan) EDTA'lı tüplere kan örneği alınarak eritrositlerin ayrılması için tüpler 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklaştırılarak 0.2 M pH'ı 7.4 olan PBS (fosfat tamponu) ile yıkama yapıldı. Yıkama işlemine eritrosit paketleri elde edilinceye kadar devam edildi. Elde edilen eritrosit paketlerinden 200 µL alındı, üzerine 200 µL propolis ekstraktı eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon işlemi sonrasında örnekler 0.4 M'lık 100 µL tersiyer bütül hidroperoksit (t-BHP) ilave edilerek 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. Inkübasyonun ardından tüplere 5 mL PBS ilave edildi ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Elde edilen süpernatantdan 750

µL alınarak spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü (Okoko ve Ere, 2012). Negatif kontrol olarak PBS, pozitif kontrol olarak t-BHP'li örnek kullanıldı. Deney sonuçları % hemoliz inhibisyonu olarak verildi. t-BHP'nin neden olduğu hemoliz %100, % hemoliz inhibisyonu ise % 0 olarak alındı. Yüzde inhibisyon değerleri ise Eşitlik 2'deki formülden hesaplandı.

$$\% \text{hemoliz inhibisyonu} = \frac{(Abs_{t-BHP} - Abs_{örnek})}{Abs_{t-BHP}} \times 100$$
 (Eşitlik 2.)

İstatistik Analizler

Deney sonuçları üç bağımsız deneyin ortalaması ve standart sapması alınarak (aritmetik ortalama±standart sapma) hesaplandı. Sonuçların normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ile kontrol edilip normal dağılıma uygunlukları görüldükten sonra antioksidan analizleri için Independent-Sample T Testi ile eritrosit hemoliz inhibisyonu analizinde ise Oneway ANOVA testi kullanıldı. (P<0.001) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Oksidatif stres antioksidan-oksidan dengenin oksidan lehine doğru bozulması sonucu ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Oksidatif stres kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün bozukluklar ve kanser gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Turan ve ark., 2017). ROS'ların hastalıklar üzerindeki rolleri ile ilgili bilgilerin artması insanlar arasında doğal antioksidanları daha popüler hale getirmiştir (Demir ve ark., 2017). Doğal ürünler önemli antioksidan kaynaklardan olup bunlardan biri de propolistir. Propolisin sağlığı korumaya ve çeşitli hastalıklara karşı savaşmaya hizmet edebilecek iyi bir antioksidan kaynağı olduğunu belirtilmiştir (Aliyazıcıoğlu ve ark., 2013). Antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin özellikleri ve yapıları birbirinden farklı olduğu için tek bir ölçüm metodu bu özelliklerin tespiti için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle birden fazla ölçüm metodu ile antioksidan aktivitenin tespit edilmesi gerekmektedir (MacDonald-Wicks ve ark., 2006). Bu çalışmada da antioksidan özelliklerin belirlenmesinde toplam fenolik madde tayini, demir indirgeyici güç analizi ve toplam flavonoid madde tayini kullanılmış olup sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Propolisin biyolojik aktivitesinden esas olarak sorumlu olan yapılar fenolik bileşiklerden olan flavonoidlerdir. Flavonoidler, antioksidan aktiviteden de sorumludur ve antioksidan aktiviteleri özellikle radikal süpürme etkisine dayanmaktadır (Kanbur ve ark., 2009). Can ve ark. (2015) Azerbaycan'ın 15 farklı bölgesinden temin ettikleri propolis örneklerinin etanollü ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğinin 10.94–79.23 mg GAE/g arasında olduğunu bildirmişlerdir (Can ve ark., 2015). Aliyazıcıoğlu ve

ark. (2013) Türk propolisinin metanolik ekstraktının toplam polifenol seviyelerini 155-210 mg GAE/g propolis aralığında olduğunu belirtmişlerdir (Aliyazıcıoğlu ve ark., 2013). Çakıroğlu (2010) farklı çözücüler (DMSO, etanol, gliserol, su ve aseton) ile elde edilen Türk propolisinin toplam polifenol içeriğinin

19.67±0.29-141.17±9.99 mg GA/g propolis, toplam flavonoid içeriğinin 1.30±0.12-55.25±6.63 mg KE/g propolis ve demir indirgeyici gücünün ise 26.22±8.57-273±11.62 mg T/g propolis arasında olduğunu bildirmiştir (Çakıroğlu, 2010).

Çizelge 1. Artvin Şavşat propolisinin PBS'li ekstraktlarının antioksidan analiz sonuçları (n=3)

Table 1. The antioxidant analysis results of PBS extracts of Artvin Şavşat propolis (n=3)

	Gruplar	
	45 °C	60 °C
Toplam polifenol içerik (mg GAE/g)	11.91±0.5 ^a	24.14±1.38 ^a
Toplam flavonoid içerik (mg KE/g)	1.79±0.03 ^a	2.13±0.07 ^a
Demir indirgeyici güç tayini (mg AAE/g)	12.80±0.36 ^a	27.16±0.12 ^a
DPPH (% inhibisyon)	22.86±0.5 ^a	31.24±1.33 ^a

Değerler aritmetik ortalama±standart sapma olarak verildi. Antioksidan testlerinin her biri kendi grupları içinde karşılaştırılarak sıcaklıklar arası fark anlamlı bulundu. (a=p<0.001)

GAE: Gallik asit eşdeğeri, **QE**: Kuersetin eşdeğeri, **AAE**: Askorbik asit eşdeğeri

Ahn ve ark. (2007) Çin'in çeşitli bölgelerinden temin ettikleri propolislerin etanollü ekstraktlarını hazırlayarak toplam polifenol ve toplam flavonoid içeriğini incelemişlerdir. Toplam polifenol içeriğinin 42.9±0.8-302±4.3 mg GAE/g propolis etanol ekstraktı, toplam flavonoid içeriğinin ise 8.3±3.7-188±6.6 mg QE/g propolis etanol ekstraktı arasında değiştiğini belirtmişlerdir (Ahn ve ark., 2007). Literatürde propolis ekstraksiyonlarının aynı anda farklı sıcaklıklarda yapıldığı ve biyoaktif özelliklerinin karşılaştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yine literatürde propolis ekstraktlarının PBS ile seyreltilerek kullanıldığı çok sayıda çalışma olmasına rağmen çözücü olarak PBS kullanarak propolis ekstraksiyonu yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat başka doğal ürünler için tarama yapıldığında Pala ve arkadaşları geleneksel meyan kökü şerbeti hazırlama sürecinde farklı sıcaklık uygulamalarının şerbetin biyoaktif bileşenleri üzerindeki etkisini incelemiş üç farklı sıcaklıkta (oda sıcaklığı(25 °C), 40 ve 75 °C) meyan kökü ekstraktlarını hazırlayarak toplam polifenol içeriğini 521.2±23.2-623.3±36.8 mg GAE/L meyan kökü şerbeti, toplam flavonoid içeriğini ise 31.2±1.5-37.43±2.4 mg QE/L meyan kökü şerbeti değerleri arasında belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuca göre oda sıcaklığında en düşük toplam polifenol ve flavonoid madde miktarının olduğu ve en yüksek değerlerin ise 75 °C'de olduğu belirtilmiş olup artan sıcaklık ile ekstrakt içerisindeki biyoaktif bileşenlerinde arttığı gözlemlenmiştir (Pala ve ark. 2017). Bucic- Kojic ve arkadaşları ise üzüm çekirdeklerinden 25-80 °C arasında elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik madde içeriğini artan sıcaklık etkisi ile en yüksek 80 °C'de hazırlanan ekstraktta olduğunu belirtmişlerdir (Bucic- Kojic ve ark. 2007). Bu çalışmada ise Artvin Şavşat bölgesinden temin edilen propolisin iki farklı sıcaklıkta hazırlanan PBS'li ekstraktlarının toplam polifenol miktarı 11.91±0.5-24.14±1.38 mg GAE/g

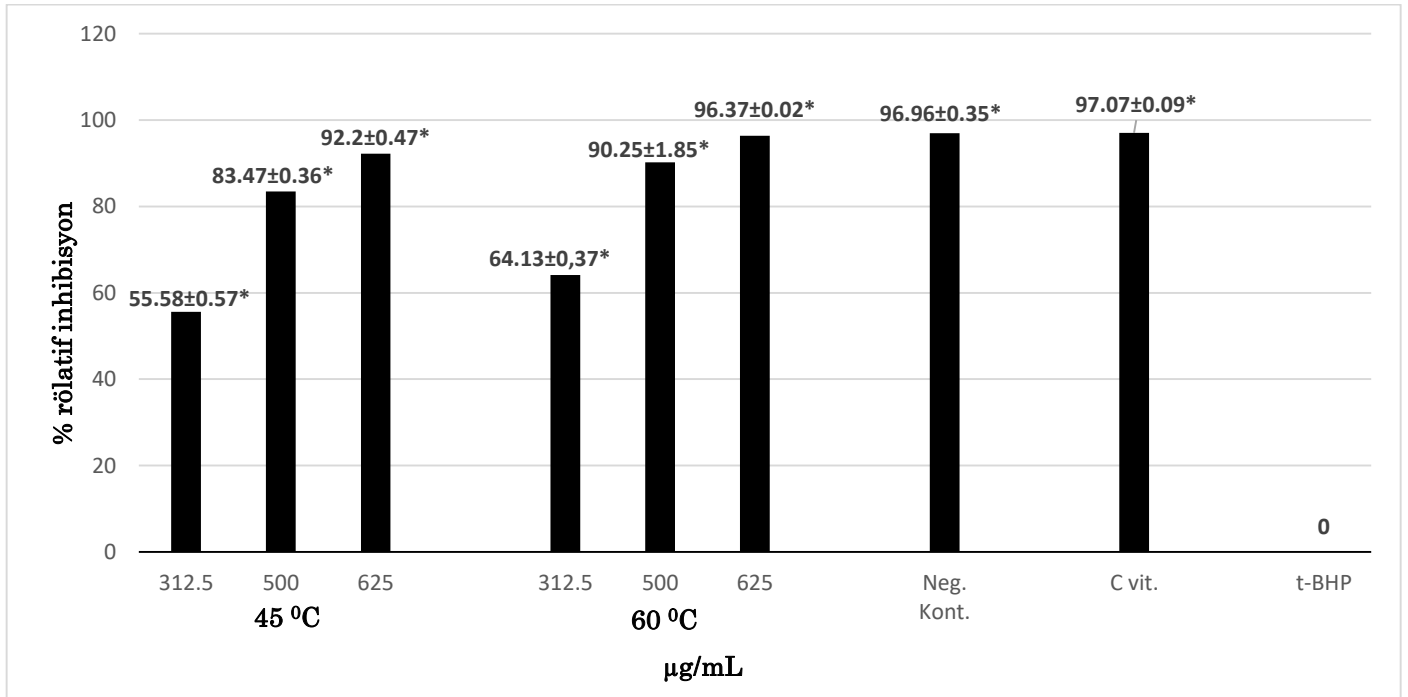
propolis, toplam flavonoid madde miktarı 1.79±0.03-2.13±0.07 QE/g propolis ve demir indirgeyici güç ise 12.80±0.36-27.16±0.12 mg AAE/g propolis olduğu tespit edilmiştir. Buna göre ekstraksiyon sıcaklıkları karşılaştırıldığında artan ekstraksiyon sıcaklığının antioksidan değerlerini de arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu durumun sıcaklık artışı ile ekstraksiyon sırasında propoliste bağlı halde bulunan bileşiklerin serbest hale geçiş hızını artırarak antioksidan aktiviteyi de arttırdığı düşünülmektedir. Antioksidan madde içeriği bakımından Artvin Şavşat propolisi diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında ise sonuçlar arasındaki farklılıkların, propolisin toplandığı bölgelerin flora farklılığından, kovanın bulunduğu konumdan, arıların propolisi biriktirme zamanından ve ekstrakt elde etmek için kullanılan çözücülerin farklı olmasından kaynaklandığı öngörülmektedir.

Doğal antioksidanların ROS'ları yakalama aktivitesini değerlendirmek için DPPH radikali kullanılmaktadır. DPPH çözeltisi antioksidan bir madde ile karşılaştığında yapısı değiştiğinden var olan mor rengini sarı renkli bir bileşiğe dönüştürür. Oluşan sarı renk ile antioksidan konsantrasyonu arasında doğru bir orantı vardır. Mısır (2013) Türk propolisinin farklı çözücülerdeki (etanol, metanol ve DMSO) ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü etkisini inceleyerek en yüksek aktivitenin 0,5 mg/mL'de %72±1.4-95±0.3 olduğunu bildirmiştir (Mısır, 2013). Siripatrawan ve arkadaşları (2012) Tayland'tan temin ettikleri propolisi 4 farklı yüzde konsantrasyona sahip etanol (%30,40,50 ve 70) çözeltileri ile ekstrakte etmişler ve sonucunda DPPH serbest radikal süpürme aktivitesinin %65.52±1.18-94.21±2.06 arasında olduğunu bildirmişlerdir (Siripatrawan ve ark., 2012). Miguel ve arkadaşları (2014) kış ve ilk bahar boyunca Algarve bölgesindeki on üç farklı alanda toplanan propolis örneklerinin su ve etanollü ekstraktlarını elde etmişler ve sulu propolis ekstraktlarının DPPH serbest radikal süpürme aktivitesinin %35.76±6.45-

91.55±0.58 arasında olduğunu bildirmişlerdir (Miguel ve ark., 2014). Bu çalışmada ise Artvin Şavşat propolisinin farklı sıcaklıklardaki PBS'li ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktiviteleri Çizelge 1'de gösterildiği gibi 200 µg/mL için % inhibisyon oranları 45 °C ve 60 °C'de sırasıyla %22.86±0.5-31.24±1.33 olarak bulunmuştur. Çalışmadaki farklı sıcaklıklar karşılaştırıldığında 60 °C'de elde edilen ekstraktın DPPH radikal süpürme aktivitesinin daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar ve elde edilen veriler karşılaştırıldığında ise PBS'li ekstraktın, etanol, metanol ve DMSO ekstraktlarına göre daha düşük değerlerde, su ekstraktına göre benzer DPPH radikal süpürme aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmektedir. Propolis çalışmalarında çözücü seçimi elde edilecek son ürüne göre yapılmalıdır. Gıda veya sağlık sektöründe geliştirilecek ürünlerin toksik özellik göstermeyen su ve gliserol gibi çözücülerin yanında PBS'nin de çözücü olarak kullanımının uygun olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca hücre kültürü çalışmalarında da PBS ile hazırlanan ekstraktın direk hücrelere verilebilir formda olması da avantaj olarak düşünülmektedir.

Eritrositler doğal olarak çoklu doymamış yağ asitleri içerikleri ve yapılarında buldukları hemoglobin nedeni ile oksidasyona daha yakın hücreler olarak bilinir. Bu nedenle oksidatif stres çalışmalarında çok fazla kullanılmaktadır. Shinde ve ark. (2017) tarafından *Buchanania lanzan spreng*'in yaprakları metanol çözücüsü ile ekstrakte edilmiş ve bu

ekstrakttan farklı fraksiyonlar elde edilerek hidrojen peroksidin (H₂O₂) neden olduğu eritrosit hasarını engellemesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışmada eritrosit hemoliz inhibisyonu IC90 değerleri 68,41-79,56 mg/mL arasında bulunmuştur. Bu değerler ile *Buchanania lanzan spreng*'in ekstraktının anti-hemolitik aktivite sergilediği gözlemlenmiştir (Shine ve ark., 2017). Bu çalışmada ise eritrositlerde hasar oluşturması amacıyla t-BHP kullanılmıştır. t-BHP organik bir bileşik olup oksidatif hücre hasarı mekanizmaları ile ilgili yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmada farklı sıcaklıklarda hazırlanan propolis ekstraktlarının 3 farklı konsantrasyonu (625, 500, 312.5 µg/mL) çalışılarak eritrosit % hemoliz inhibisyonuna bakılmış ve hemoliz inhibisyon sonuçları şekil 1'de verilmiştir. 45 ve 60 °C'de elde edilen propolis ekstraktlarının artan konsantrasyonlardaki yüzde inhibisyon değerleri sırasıyla 55.58±0.57-92.2±0,47 ve 64.13±0,37-96.37±0.02 arasında olduğu bulunmuştur. Propolis ekstraktını hazırlamada kullanılan PBS çözeltisi negatif kontrol olarak kullanılmış ve eritrosit örneklerini hasara uğratmadığı gözlemlenmiştir. Oluşan hemolizi en iyi inhibe eden ekstraktın 60 °C'de hazırlanan olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu ekstraktın konsantrasyonu yükseldikçe hemolizi inhibe etme oranının da arttığı tespit edilmiştir. 60 °C de hazırlanan ekstraktın 45 °C de hazırlanan ekstrakta göre daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olması, hemoliz inhibisyonunu da benzer oranda arttırmaktadır.



Şekil 1. Artvin propolis ekstraktlarının % hemoliz inhibisyonu

Figure 1. % hemolysis inhibition of Artvin propolis extracts

(Değerler aritmetik ortalama±standart sapma olarak verildi. t-BHP grubu ile karşılaştırılarak fark anlamlı bulundu (* p<0.001))

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırma Artvin Şavşat yöresine ait propolisin farklı sıcaklıklarda (45 ve 60 °C) hazırlanan PBS'li ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin ve eritrosit hemoliz inhibisyonu üzerine etkisinin incelendiği ilk çalışma olup veriler karşılaştırıldığında 60 °C de hazırlanan ekstraktın 45 °C de hazırlanan ekstrakta göre daha yüksek antioksidan kapasiteye ve hemoliz inhibisyonuna sahip olduğu bulunmuştur.

Bu sonuçlardan elde edilen verilere göre, PBS'li ekstraktın içerik analizi yapıldıktan sonra hastaya direk olarak verilebilecek toksik olmayan bir ürünün geliştirilebilmesi için PBS'nin iyi bir propolis ekstraksiyon çözücüsü olabileceği, bunun yanında antioksidan özelliklerin yüksek bulunması sebebiyle de propolis ekstraktlarının 60°C'de hazırlanmasının uygun olabileceği değerlendirilmektedir. Yapılacak ileri çalışmalar sonrasında eritrosit hemolizine sebep olan etkenlerin yaptığı hasarın azaltılmasında PBS'li propolis ekstraktının in-vivo çalışmalarla desteklenerek kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

Ahn MR, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T 2007. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China. *Food Chemistry* 101(4): 1383-1392.

Aliyazıcıoğlu R, Şahin H, Ertürk O, Ulusoy E, Kolaylı S 2013. Properties of Phenolic Composition and Biological Activity of Propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties* 16(2):277–287.

Aliyazıcıoğlu Y, Deger O, Ovalı E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioğlu Y, Karahan SC 2005. Effects of Turkish Pollen and Propolis Extracts on Respiratory Burst for K-562 Cell Lines. *International Immunopharmacology* 5(11): 1652–1657.

Bakkaloğlu Z, Arıcı M 2019. Farklı Çözücülerle Propolis Ekstraksiyonunun Toplam Fenolik İçeriği, Antioksidan Kapasite ve Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri. *Akademik Gıda* 17(4):538-545.

Balkan S 2017. Eritrositlerde İn Vitro Oksidatif Strese Karşı Antioksidan Olarak Değerlendirilen Çeşitli Bitki Ekstraktları. *Trakya University Journal of Natural Sciences* 18(2): 185-191.

Brieger K, Schiavone S, Miller FJJ, Krause KH 2012. Reactive Oxygen Species: From Health To Disease. *Swiss Medical Weekly* 142:1-14.

Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Bilic M, Velic D., 2007. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81: 236–242.

Burdock GA 1998. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food and Chemical Toxicology* 36:347-363.

Can Z, Yıldız O, Şahin H, Asadov A, Kolaylı S 2015. Phenolic Profile and Antioxidant Potential Of Propolis From Azerbaijan. *Mellifera* 15(1):16-28.

Çakıroğlu TN 2010. Çeşitli Çözücülerde Türk Propolisinin Çözünürlüğünün İncelenmesi. *KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, 63 sy.

Carl H, Soumya R, Srinivas P, Vani R, 2016. Oxidative stress in erythrocytes of banked ABO blood. *Hematology* 21(10): 630-634.

Da-Silva Frozza CO, Celi Garcia CS, Gambato G, Oliveira de Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JAP, Roesch-Ely M 2013. Chemical Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Brazilian Red Propolis. *Food Chem Toxicol* 52:137-142.

Demir F, Aliyazıcıoğlu Y, Demir D 2017. Asidifikasyon İşleminin *Laurocerasus officinalis* Ekstraktlarının Antioksidan Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi. *El-Cezeri Journal of Science and Engineering* 4(3):365-373.

Demir S, Aliyazıcıoğlu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Yaman SO, 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.

Ertürk Ö, Çil E, Yoloğlu N, Yavuz C 2016. An In vitro Study on Antimicrobial and Antioxidant Activity of Propolis from Rize Province of Turkey. *Mellifera* 16(1): 4-18.

Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JA, Roesch M 2013. Chemical Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Brazilian Red Propolis. *Food Chem Toxicol* 52: 137-142.

Ighodaro OM, Akinloye OA 2018. First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54: 287–293.

Kanbur M, Eraslan G, Silici S 2009. Antioxidant Effect of Propolis Against Exposure to Propetamphos in Rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(3):909–915.

Kozima ET, Souza ABF, Castro TF, Matos NA, Philips NE, Costa GP, Talvani A, Cangussú SD, Bezerra FS 2020. Aluminum Hydroxide Nebulization-

- Induced Redox İmbalance and Acute Lung İnflammation in Mice. *Experimental Lung Research* 21: 1-11.
- MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML 2006. Methodology for the Determination of Biological Antioxidant Capacity in Vitro: a Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(13):2046-2056.
- Meeking MM, MacFabe DF, Mephram JR, Foley KA, Tichenoff LJ, Boon FH, Kavaliers M, Ossenkopp KP 2020. Propionic Acid İnduced Behavioural Effects of Relevance to Autism Spectrum Disorder Evaluated in the Hole Board Test With Rats. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 97:1-13.
- Meral R 2017. Farklı Sıcaklık Derecelerinin Uşkun Bitkisinin Antioksidan Aktivitesi ve Fenolik Profili Üzerine Etkisi. *YYÜ Tar Bil Dergisi* 27(1): 88-94.
- Mercan U 2004. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15(1-2): 91-96.
- Mısır S 2013. Türk Propolisinin Farklı Çözücülerdeki Ekstraktlarının Radikal Yakalama Ve Demir Şelatlama Aktivitesinin İncelenmesi. *Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, 60 sy.
- Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, Antunes MD 2014. Phenols, Flavonoids and Antioxidant Activity of Aqueous and Methanolic Extracts of Propolis (*Apis Mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Sci. Technol, Campinas* 34(1): 16-23.
- Misir S, Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Ozer Yaman S, Deger O 2018. Antioxidant Properties and Protective Effect of Turkish Propolis on t-BHP-İnduced Oxidative Stress in Foreskin Fibroblast Cells. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 52:94-100.
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA 2000. Comparison of the Free Radical-Scavenging Activity of Propolis from Several Regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 71(1-2): 109-114.
- Okoko T, Ere D 2012. Reduction of Hydrogen Peroxide-İnduced Erythrocyte Damage by *Carica papaya* Leaf Extract. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(6): 449-453.
- Onbaşılı D, Yuvalı Çelik G, Kahraman S, Kanbur M 2019. Apiterapi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 16(1): 55-62.
- Oyaizu M 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z 2015. Oxidative Stress and Its İmpacts On İntracellular Lipids, Proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 6 (3): 331-336.
- Pala UÇ, Ekşi CN, Özçelik E, Çam AB 2017. Geleneksel Meyan Kökü Şerbeti Hazırlama Sürecinde Farklı Sıcaklık Uygulamalarının Şerbetin Mikrobiyolojik Kalitesi ve Biyoaktif Bileşenleri Üzerine Etkisi. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies* 2:276-286.
- Pereira AD, De-Andrade SF, De-Oliveira SMS, Maistro EL 2008. First İn Vivo Evaluation of the Mutagenic Effect of Brazilian Green Propolis by Comet Assay and Micronucleus Test. *Food and Chemical Toxicology* 46(7): 2580-2584.
- Postacı I, Coskun O, Senol N, Aslankoc R, Comlekci S 2018. The Physiopathological Effects of Quercetin on Oxidative Stress in Radiation of 4.5 g Mobile Phone Exposed Liver Tissue of Rat. *Bratisl Lek Listy* 119(8):481-489.
- Ramchoun M, Sellam K, Harnafi H, Alem C, Benlyas M, Khallouki F, Amrani S 2015. Investigation of Antioxidant and Antihemolytic Properties of Thymus Satureioides Collected From Tafilalet Region, South-East of Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5(2): 93-100.
- Rufatto LC, Dos Santos DA, Marinho F, Henriques, JAP, Ely MR, Moura S 2017. Red Propolis: Chemical Composition and Pharmacological Activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed* 7(7): 591-598.
- Sajid M, Khan MR, Ismail H, Latif S, Rahim AA, Mehboob R, Shah SA 2020. Antidiabetic and Antioxidant Potential of *Alnus Nitida* Leaves in Alloxan İnduced Diabetic Rats. *Journal of Ethnopharmacology* 1-33
- Sezer K, Keskin M 2014. Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Dergisi*, 28(1): 49-56.
- Sforcin JM, Bankova V 2011. Propolis: is There a Potential for the Development of New Drugs?. *J Ethnopharmacol* 133: 253-260.
- Shinde G, Patil AS, Sheikh R 2017. Reduction of Hydrogen Peroxide-İnduced Erythrocyte Damage by Leaf Extracts of *Buchanania Lanza Spreng* as a Potential Natural Antioxidant. *Austin J Biotechnol Bioeng* 4(2): 1-7.
- Siripatrawan U, Vitchayakitti W, Sanguandeeikul R 2012. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Thai Propolis Extracted Using Ethanol Aqueous Solution. *Int J Food Sci Tech* 48(1):22-7.
- Slinkard K, Singleton VL 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28: 49- 55.
- Süleyman H, Gül V, Erhan E 2018. Oksidatif Stres ve Doku Hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi* 1(1):1-4
- Thamnopoulo IAI, Michailidis GF, Fletouris DJ, Badeka A, Kontominas MG, Angelidis AS 2018. Inhibitory Activity of Propolis Against *Listeria Monocytogenes* in Milk Stored Under Refrigeration. *Food Microbiology* 73:168-176.
- Turan I, Demir S, Misir, S., Kilinc K, Mentese A,

- Aliyazicioglu Y, Deger O 2015. Cytotoxic Effect of Turkish Propolis on Liver, Colon, Breast, Cervix and Prostate Cancer Cell Lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 14(5): 777-782.
- Turan İ, Demir S, Aliyazıcıoğlu R, Aliyazıcıoğlu Y 2017. Primula vulgaris Yaprak Ekstraktının Antioksidan ve Sitotoksik Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *KSÜ Doğa Bil. Derg* 20(4):361-367.
- Yalçın CO, Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Bahat Z, Misir S, Deger O 2016. Evaluation of Radioprotective Effect of Turkish Propolis on Foreskin Fibroblast Cells. *J Can Res Ther* 12(2): 990-994.
- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M 2002. Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 50:1619-1624.