

## PROPOLİS VE ETKEN MADDELERİ OLAN KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE) VE SİNAMİK ASİTİN, İNSAN T HÜCRELİ AKUT LENFBLASTİK LÖSEMİ HÜCRE DİZİSİ (CCRF-CEM)' DE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

THE EVALUATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECT OF PROPOLIS AND ITS EXTRACTS CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER AND CINNAMIC ACID IN HUMAN ACUTE T CELL LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELL LINE (CCRF-CEM)

Çığır BİRAY<sup>1</sup>

Cumhur GÜNDÜZ<sup>1</sup>

Berna YILMAZ<sup>1</sup>

Fahri ŞAHİN<sup>2</sup>

Nejat TOPÇUOĞLU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı-İzmir

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı-İzmir

**Anahtar sözcükler :** Propolis, Kafeik Asit Fenetil Ester, Sinamik Asit, Sitotoksikite, Apoptozis

**Key Words :** Propolis, Caffeic Acid Phenethyl Ester, Cinnamic Acid, Cytotoxicity, Apoptosis

### ÖZET

Propolis bal arıları tarafından kovanda üretilen doğal bir üründür. Çeşitli bitkilerin yaprak, gövde ve tomurcuklarından işçi arılar tarafından toplanıp kovanda biriktirilen propolisin antiseptik, antibakteriyal, antiinflamatuvar, immünmodülatör, antioksidan, antimutajenik ve sitotoksik etkileri bilimsel çalışmalarda kanıtlanmıştır. Ancak, akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi olan CCRF-CEM ile yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada; propolisin CCRF-CEM hücre dizisinde sitotoksik ve apoptotik özellik gösterip göstermediğinin araştırılması hedeflenmiştir. Sitotoksitenin değerlendirilmesi için Tripkan mavisi yöntemi ve XTT yöntemleri kullanılmış, apoptozisin değerlendirilmesi için ise, apoptozis esnasında açığa çıkan oligonükleotidlerin saptanması esasına dayalı Eliza yöntemi ve apoptotik cisimciklerin flüoresan mikroskopta görüntülenmesini sağlayan Akridin Oranj - Etidyum Bromid boyama tekniği kullanılmıştır. Propolisin sitotoksik etkisinin saptandıktan sonra, propolisin etken maddelerinden Sinamik asit ve CAPE (Kafeik asit fenetil ester)' in sitotoksik özellikleri aynı yöntemlerle değerlendirilmiştir. Sinamik asit herhangi bir sitotoksik etki göstermez iken CAPE' nin doz ve zamana bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve IC<sub>50</sub> dozunun 1 µM olduğu tespit edilmiştir. Akridin Oranj - Etidyum Bromid boyama yöntemleri ile CAPE' nin aynı hücre dizisinde apoptozise neden olduğu bulunmuştur.

CAPE, normal hücreler üzerinde düşük toksisiteye sahip, yeni antimetastatik ve antianjiyojenik ajan olarak değer taşıdığından bu sonuçlar akut lenfoblastik lösemi tedavisinde propolis ve özellikle CAPE' nin kullanılabilmesine yönelik yeni bir pencere açmıştır.

### SUMMARY

*Propolis is one of the nature-based products, which is produced by honeybees in hives. It is collected by honey bees from leaves, trunk and bud of several different plants. Propolis has antiseptic, antibacterial, anti-inflammatory, immunomodulatory, antioxidant, antibiotic, antimutagenic and cytotoxic effects which are proven in scientific studies. There has been no study in CCRF-CEM cell line with propolis and its components in the literature. The aim of this study is to investigate the cytotoxic and apoptotic effects of propolis and its components in CCRF-CEM cell line.*

Yazışma adresi: Çığır BİRAY, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İZMİR  
Makalenin geliş tarihi : 15.12.2005; kabul tarihi : 05.04.2006

*Trypan blue dye exclusion test and XTT methods are used to evaluate the cytotoxicity and ELISA based on detection of oligonucleotids which can be seen during apoptosis. Acridine orange / Ethidium Bromide dye technique based on detection of apoptotic bodies with Fluorescent microscope were used to evaluate apoptosis. After detection of cytotoxic effect of propolis, the cytotoxic effect of Cinnamic acid and CAPE which are the effective components of propolis, were evaluated with the same methods. While cinnamic acid didn't have any cytotoxic effect, CAPE had dose and time dependent cytotoxicity and had 1 µM IC<sub>50</sub> in CCRF-CEM cell line. ELISA and Acridine Orange / Ethidium Bromide dye methods revealed that CAPE induced apoptosis in the same cell line.*

*Since CAPE is a new chemotherapeutic and antitumoral agent with very less toxic effects on normal tissues, these results opened a new horizon for use of propolis in the treatment of acute lymphoblastic leukemia.*

## GİRİŞ

Propolis, çeşitli bitki kaynaklarından bal arıları tarafından toplanan reçineli bir maddenin genel adıdır (1). İşlenmemiş propolisin toplandığı kaynağa göre çeşitlilik gösteren bileşiminde, % 30 balmumu, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen ve % 5 organik artıkları da içeren çeşitli diğer maddeler bulunmaktadır (2, 3, 4). Sinamik asit propolisin aktif bir bileşenidir. Doğal kaynaklardan elde edilen ürünlerden biri olup, çok geniş bir gruba sahip olan flavonoidlerin sentezinde rol oynamaktadır. Sinamik asit doğada bulunan bir bileşendir. Bitkiler aleminin bir üyesi olmakla birlikte genellikle tatlı kompozisyonlarda bulunur ve sinamon yağının yapısında bulunur (5). Sinamik asit ve bunun hidroksile olmuş bileşenleri insanlar ve hayvanlar tarafından çeşitli miktarlarda diyetle tüketilmektedir. Sinamik asit ayrıca auksin grubuna dahildir. Auksinler, hücre gelişimini ve farklılaşmasını düzenleyen bitki hormonlarıdır (6).

Sinamik asit ve etken maddelerinin geniş bir terapötik spektrumda görevli oldukları bilinmektedir. Bunlara örnek olarak antimikrobiyal aktivite (7) ve antifungal aktivite (8) verilebilir. Son yıllarda sinamik asidin insan malign tümörlerinde (Prostat ve akciğer melanoma, glioblastoma ve adenokarsinoma) antitümöral aktivite sergilediği de gösterilmiştir (9). Ayrıca sinamik asidin kanser önlenmesi ve tedavisinde kullanılan sıçanlar ve fareler üzerinde düşük toksisite gösterdiği bilinmektedir (5). Bazı sinamik asit türevleri, potansiyel olarak mitokondriyal dehidrogenaz enzimi inhibitörleridir (10).

Kafeik asit fenetil ester; propolis içeriğinde bulunan ve izole edilen çok geniş spektrumlu etkileri bulunan bir maddedir. Fenolik bir bileşik olan CAPE, propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerinden biri olmakla birlikte, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, immun uyarıcı ve karsinostatik, hasar önleyici reperfüzyon, antikanser özellikleri bulunan bir bileşiktir (11, 12). Farklı kaynaklardan elde edilen propolis örneklerinin benzer kalitatif kompozisyonlara sahip olmasının aksine, CAPE örnekleri büyük oranda farklılıklar içermektedir (13). En önemli özelliklerinden biri tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisidir.

Sentetik bir madde olan CAPE ile ilgili çok çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bulunmaktadır. CAPE, düşük glutatyon (GSH) düzeyiyle ilişkili olan korneal neovaskülerizasyonda ve lens epitel hücrelerinin trans

formasyonunun baskılanması koruyucu bir etki sergilemektedir (14). CAPE, insan koroner arter endotel hücrelerinde NF-κB üzerine etki ederek, ox-LDL aracılı degradasyonunu inhibe eder (15) ve iskemiye bağlı hasarı önler (16). Kemoterapide, CAPE' nin intestinal karsinogenezi baskıladığı (17), CAPE türevli bileşiklerin oral kansere karşı potansiyel ajanlar oldukları gösterilmiştir (18). İnsan HeLa, BEAS-2B, HL-60, MCF-7 ve sıçan ME 308 hücre hatları üzerinde çeşitli hücre kültürü çalışmaları çeşitli kimyasal karsinojenler ile yapılmıştır. Bu deneylerde kullanılan CAPE' nin oksidatif stresi azaltarak kanser önleyici bir madde olduğu ortaya konmuştur (19, 20). CAPE, bir insan lösemik hücre hattı olan HL-60 hücreleri üzerinde apoptozise ve bununla ilişkili su atılımı, glutatyon tüketimi, mitokondriyal disfonksiyonu, Bcl-2 "down-regülasyonu", Bax "up-regülasyonu" ve Kaspaz-3 aktivasyonuna neden olmaktadır (21, 22).

Akut lösemiler; hematopoietik sistemin düzensizlikleri olarak kendilerini ifade eden pluripotente kök hücrelerin heterojen gruplarının hastalıkları olarak tanımlanabilmektedirler. Akut miyeloblastik lösemiler (AML) ve akut lenfoblastik lösemiler (ALL) olarak iki gruba ayrılabilirler (23).

Tedavi; lösemik hücrelerin farklılaştırılması yani normal fonksiyonlarının kazandırılması yada "programlı hücre ölümü" (apoptozis) aracılığı ile ortadan kaldırılması ve diğer dokuları korumaya yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Farklılaştırıcı ya da apoptozisi uyarıcı ilaçların nasıl etki ettiğini anlamak için, bunların etkilerini gösterdiği hücre siklusunun değişik aşamalarının ve apoptozisin iyi anlaşılması gerektiği açıktır (24).

Bu çalışmada, anti-oksidan, anti-enflamatuvar, anti-septik, anti-bakteriyel, anti-allerjen, anti-mikrobiyal gibi çok çeşitli etkilerinin yanı sıra, anti-kanser etkisi de ortaya konmuş doğal bir karışım ve farmakolojik değeri olan propolisin ve en önemli iki bileşeni Sinamik asit ve Kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) sitotoksik ve apoptotik etkinliği Akut T - hücreli lenfoblastik lösemi hücre dizisinde (CCRF - CEM) araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, *in vitro* koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak, insan T- hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre hattında, propolis ve etken maddelerinin sitotoksik

ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Sinamik asit ve CAPE Sigma Chemical Co., St Louis Missouri'den sağlanmıştır. CCRF-CEM hücre dizisi (Memorial Sloan Kettering Oncology Center, New York) Dr. E. Göker tarafından sağlanmıştır.

#### Propolis Ekstraktının Hazırlanışı:

Çalışmada; alkol içermeyen, % 30 sıvı, 300 mg/ml suda çözülebilen arı propolisi ekstraktı içeren ticari Avustralya propolisi (Nature's Goodness) kullanılmıştır.

#### Sinamik Asit Hazırlanışı:

1mg Sinamik asit 50 µl DMSO ile sulandırılıp çözelti 950 µl besiyeri ile 1ml'ye tamamlanarak stok solüsyonu (D0) hazırlanmıştır

Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) Hazırlanışı:

CAPE 50 µl DMSO ile sulandırılıp çözelti 950 µl besiyeri ile 1 ml'ye tamamlanarak stok solüsyonu (D0) hazırlanmıştır.

#### Hücre Kültürü:

Bu çalışmada; % 1 L-glutamin, 10000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin ve % 10 inaktif fetal sıgır serum (FBS) eklenen RPMI-1640 besiyeri ortamı kullanılmış ve lösemik hücre dizisi (CCRF-CEM), 37C<sup>0</sup> de ve % 95 nem, % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültüre edilmiştir. İnkübe zamanı 48 saat olarak bulunmuş olup bu sürede pasaj yapılmıştır.

#### Hücre Canlılığının (Viabilite) Değerlendirilmesi:

Hücre canlılığı 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde Tripan mavisi boyası (Biochrom) canlılık testi ile değerlendirilmiştir. Neubauer lamında bir sayma alanında ml' de 2x10<sup>5</sup> hücreye eşit olacak şekilde hücre sayımı yapılmıştır.

#### Sitotoksitenin Değerlendirilmesi:

CCRF-CEM hücrelerinde propolis ve etken maddelerden Sinamik asit ve CAPE' nin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için XTT (2,3-bis [2 - methoxy - 4 - nitro - 5 - sulphophenyl] - 2H - tetrazolium - 5 - carboxanilide inner salt) kiti (Roche) kullanılmış ve kit prosedürü takip edilmiştir. Hücreler kontrol, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde 490 nanometre ve 630 nanometre referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD), spektrofotometre (Eliza okuyucusu) kullanılarak okunmuştur. Kontrole göre OD değerleri oranlanarak sitotoksitenin belirlenmiştir.

#### Apoptozisin Değerlendirilmesi:

CCRF - CEM hücre serisi üzerinde, CAPE 'nin apoptotik etkisinin değerlendirilmesi için iki yöntem kullanılmıştır. Birincisi Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche) kiti kullanılarak Eliza yöntemi ile apoptozis tayinidir ve işlemler kit prosedürüne göre uygulanmıştır. Diğer yöntem ise Akridin Oranj - Etidyum Bromid Boyası yöntemidir. Akridin Oranj (AO) 100 µg/ml ve Etidyum Bromid (EB)

100 µg/ml fosfat tamponunda (PBS) hazırlanmıştır. CCRF-CEM 25 µl hücre süspansiyonuna 2 µl EB/AO ilave edilmiştir. Flüoresan mikroskopta değerlendirilmiştir.

#### İstatistik Analiz:

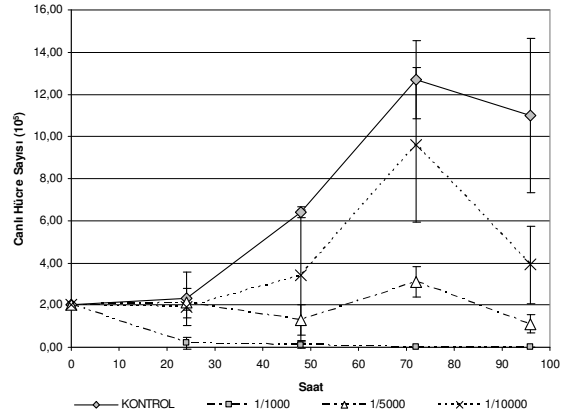
Sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi Student's t testi ve regresyon analizi ile (SPSS v.11 for Windows) gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık derecesi p < 0,05 alınmıştır.

## BULGULAR

### Avustralya Propolisinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

#### Tripan Mavisi Boyası Canlılık Testi:

Avustralya propolisinin 1/1000, 1/5000, 1/10000 dilüsyonlarının 0, 24, 48, 72. ve 96 saatlerdeki hücre sayımları Grafik 1 ve Tablo 1'de verilmiştir. Hücre sayısı 2x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde başlanılmış ve çift kontrollü olarak çalışılmıştır.



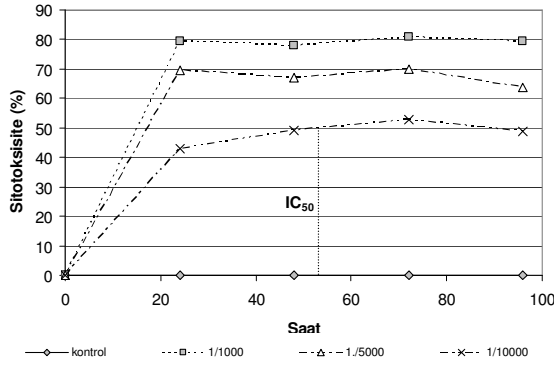
**Grafik 1.** Propolisin değişik dilüsyonlarının Tripan Mavisi boyası ile değerlendirilmesinin (ortalama ± SD) grafikte gösterimi

**Tablo 1.** Propolisin değişik dilüsyonlarının tripan mavisi boyası ile değerlendirilmesi [hücre sayısı x 10<sup>5</sup>, (ortalama ± SD)]

Dilüsyon	Saat				
	0	24	48	72	96
Kontrol	2	2,3±1,27	6,4±0,28	12,7±1,84	11±3,68
1/1000*	2	0,2±0,28	0,1±0,14	0	0
1/5000*	2	2,1±0,71	1,3±0,71	3,1±0,71	1,1±0,42
1/10000*	2	1,9±0,14	3,4±3,11	9,6±3,68	3,9±1,84

\*p < 0,05

Hücre sayımı sonuçlarına göre 1/1000 dilüsyonun oldukça toksik olduğu, bu dilüsyonlardan IC<sub>50</sub> tanımına en yakın 1/10000 dilüsyonun olduğu görülmüştür (Tablo 2, Grafik 2). Üç dilüsyondaki (1/1000, 1/5000, 1/10000) hücre sayılarının ortalamaları kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı azalma saptanmıştır ( $p < 0,05$ ,  $t_{1/1000} = 2,6175$ ,  $t_{1/5000} = 2,2975$  ve  $t_{1/10000} = 2,1440$ )



**Grafik 2.** Propolisin değişik konsantrasyonlarının XTT testi ile elde edilen % sitotoksosite sonuçları

**Tablo 2.** Propolisin değişik dilüsyonlarının XTT testi ile % sitotoksitesinin değerlendirilmesi

Dilüsyon	Saat				
	0	24	48	72	96
kontrol	0	0	0	0	0
1/1000	0	79,6	77,9	81	79,3
1/5000	0	69,6	67	69,9	63,8
1/10000*	0	43,1	49,2	53	48,7

\* $p < 0,05$

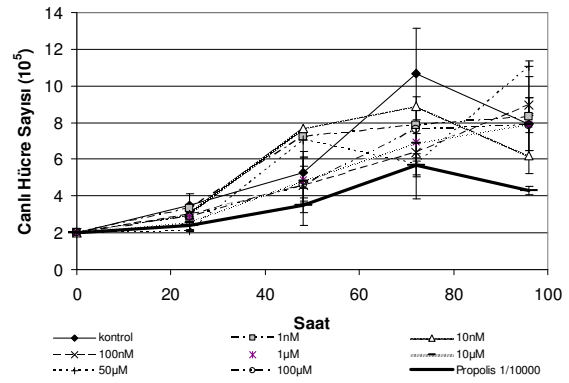
#### XTT Testi:

Propolisin sitotoksik etkisinin değerlendirildiği XTT testi için aynı dilüsyonlar (1/1000, 1/5000, 1/10.000) çalışılmıştır (Grafik 2). Propolisin 1/1000 dilüsyonunun % 80 oranında sitotoksik olduğu ve hücre proliferasyonunda % 50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon yani, IC<sub>50</sub> dozunun 1/10000 olduğu saptanmıştır. Ayrıca, 1/10000 dilüsyonunun zamana bağlı olarak sitotoksosite de anlamlı bir logaritmik artış gösterdiği saptanmıştır ( $R^2 = 0,802$ ,  $p < 0,05$ )

#### Sinamik Asitin Hücre Canlılığı ve Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi:

#### Tripan Mavisi Boyası Canlılık Testi:

Sinamik asit ile ilgili literatürde sitotoksosite verisi olmadığı için 1nM ile 100 µM arasındaki değişik dozlar kullanılmıştır. Propolisin IC<sub>50</sub> dozu bazal sitotoksosite olarak alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre sinamik asitin IC<sub>50</sub> dozunu hesaplamak için optimal konsantrasyonlarla çalışma tekrarlanmıştır. Çalışılan konsantrasyonlarda sinamik asitin zamana bağlı anlamlı korelasyon ifade eden sitotoksitesini saptanmamıştır (Grafik 3).

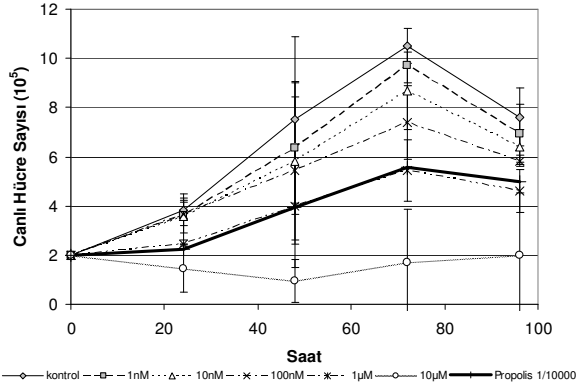


**Grafik 3.** Sinamik asidin değişik konsantrasyonlarının Tripan Mavisi ile değerlendirilmesi (ortalama ± SD)

**Tablo 3.** Sinamik asidin değişik konsantrasyonlarının Tripan Mavisi ile değerlendirilmesi [hücre sayısı x 10<sup>5</sup>, (ortalama ± SD)]

Konsantrasyon	Saat				
	0	24	48	72	96
kontrol	2,00	3,51±0,06	5,28±0,86	10,64±2,48	7,91±0,44
1nM*	2,00	3,33	7,22	7,89	8,33
10nM*	2,00	3,00	7,67	8,89	6,22
100nM	2,00	2,96±1,16	4,61±1,81	6,36±1,07	8,94±2,44
1µM	2,00	2,87±0,66	4,87±1,23	6,97±0,90	7,91±1,45
10µM	2,00	2,58±0,50	4,82±2,42	6,90±1,74	7,91±1,45
50µM*	2,00	2,13	7,07	5,73	11,07
100µM	2,00	2,86±0,11	4,60±1,04	7,64±1,76	7,87±2,64
Propolis 1/10000	2,00	2,42±0,03	3,49±0,41	5,68±0,64	4,29±0,22

\*İkinci çalışmaya alınmamıştır



**Grafik 4.** CAPE' nin değişik konsantrasyonlarının Tripan Mavisi ile değerlendirilmesinin grafikte gösterimi (ortalama  $\pm$  SD)

**Tablo 4.** CAPE' nin değişik konsantrasyonlarının Tripan Mavisi ile değerlendirilmesi [hücre sayısı x 105, (ortalama  $\pm$  SD)]

Konsantrasyon	Saat				
	0	24	48	72	96
<b>Kontrol</b>	2,00	3,83 $\pm$ 0,39	7,50 $\pm$ 3,38	10,50 $\pm$ 0,71	7,61 $\pm$ 1,18
<b>1nM</b>	2,00	3,61 $\pm$ 0,71	6,33 $\pm$ 2,67	9,72 $\pm$ 0,71	6,94 $\pm$ 1,18
<b>10nM</b>	2,00	3,56 $\pm$ 0,94	5,83 $\pm$ 3,22	8,67 $\pm$ 1,57	6,39 $\pm$ 0,71
<b>100nM</b>	2,00	3,67 $\pm$ 0,47	5,44 $\pm$ 2,99	7,39 $\pm$ 1,49	5,83 $\pm$ 0,24
<b>1µM</b>	2,00	2,44 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 2,51	5,44 $\pm$ 1,26	4,61 $\pm$ 0,86
<b>10µM</b>	2,00	1,44 $\pm$ 0,94	0,94 $\pm$ 0,86	1,72 $\pm$ 2,12	2,00 $\pm$ 2,51
<b>Propolis 1/10000</b>	2,00	2,22 $\pm$ 0,00	3,94 $\pm$ 1,81	5,56 $\pm$ 1,73	5,00 $\pm$ 1,10

### CAPE' nin CCRF-CEM Hücre Dizisi Üzerine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

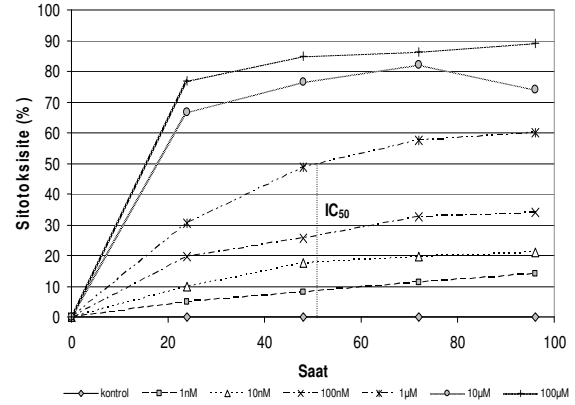
#### Tripan Mavisi Boyası Testi Sonuçları:

CAPE' nin 1 nM ile 10 µM aralığında değişik konsantrasyonlarda canlılık deneyleri yapılmıştır. Propolisin IC<sub>50</sub> dozu bazal sitotoksosite olarak alınmıştır. 24 saat aralıklarla yapılan sayımlar sonucunda CAPE' nin CCRF-CEM hücre dizisinde doza ve zamana bağımlı sitotoksosite gösterdiği ve IC<sub>50</sub> dozunun 1µM olduğu bulunmuştur. CAPE dilüsyonlarının hücre sayısı ortalamaları kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı azalma saptanmıştır

( $p < 0,05$ ,  $t_{1nM} = 2,7417$ ,  $t_{10nM} = 2,7166$ ,  $t_{100nM} = 2,4076$ ,  $t_{1µM} = 2,9671$  ve  $t_{10µM} = 3,0021$ ). İki kez tekrarlanan deney sonuçları Grafik 4' te gösterilmiştir.

#### XTT solüsyonu kullanılarak sitotoksitenin değerlendirilmesi:

CAPE ile 1nM ile 100µM aralığında değişik konsantrasyonlarda sitotoksosite deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda da IC<sub>50</sub> dozu 1 µM olarak bulunmuştur. CAPE' nin 1nM dilüsyonunun zamana bağlı olarak lineer ( $R^2 = 0,999$ ,  $p < 0,05$ ) ve 10 µM dilüsyonu hariç diğer dilüsyonların logaritmik anlamlı bir sitotoksosite gösterdiği saptanmıştır ( $p < 0,05$ ,  $R^2_{(10nM)} = 0,961$ ,  $R^2_{(100nM)} = 0,975$ ,  $R^2_{(10µM)} = 0,978$  ve  $R^2_{(100µM)} = 0,967$ ). İki kez tekrarlanan deney sonuçları Grafik 5'te gösterilmiştir.



**Grafik 5.** CAPE' nin değişik konsantrasyonlarının XTT yöntemi ile elde edilen % sitotoksosite sonuçları.

**Tablo 5.** CAPE' nin değişik konsantrasyonlarının XTT yöntemi ile % sitotoksitesinin değerlendirilmesi

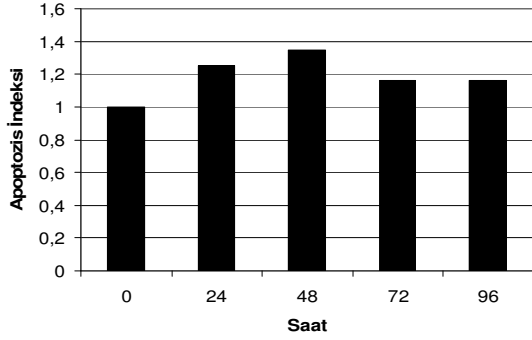
Konsantrasyon	Saat				
	0	24	48	72	96
<b>Kontrol</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>1nM*</b>	0,0	4,8	8,0	11,3	14,2
<b>10nM</b>	0,0	9,9	17,5	19,6	21,0
<b>100nM*</b>	0,0	19,8	25,6	32,5	34,2
<b>1µM*</b>	0,0	30,6	48,6	57,7	60,1
<b>10µM*</b>	0,0	66,6	76,6	82,2	74,0
<b>100µM*</b>	0,0	76,8	84,8	86,3	89,1

\*  $p < 0,05$

#### CAPE' nin Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi

CAPE' nin 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki apoptotik etkisi Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> yöntemiyle değerlendirilmiştir. Çalışmada  $1 \times 10^4$  hücre sayısı ve

CAPE' nin 1 µM (IC<sub>50</sub> dozu ) kullanılmıştır. Elde edilen optik dansite (OD) değerlerine göre kontrol grubu (0. saat) 1 kabul edilerek, 48 saatte apoptozis indeksinin maksimum olduğu (1.35) saptanmıştır. Zamana bağımlı anlamlı bir değişim saptanmamıştır (Tablo 6; Grafik 6).

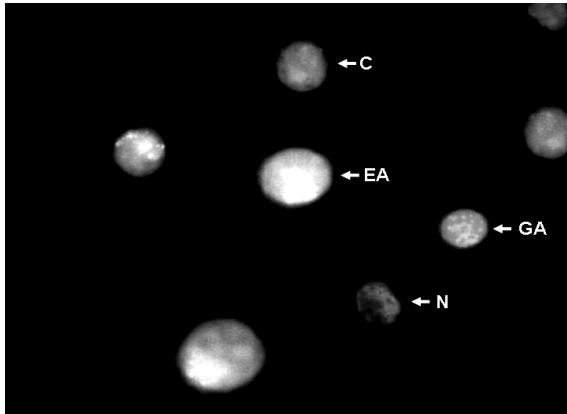


**Grafik 6.** CAPE' nin Apoptozis İndeksi

**Tablo 6.** CAPE' nin Apoptozis İndeksi

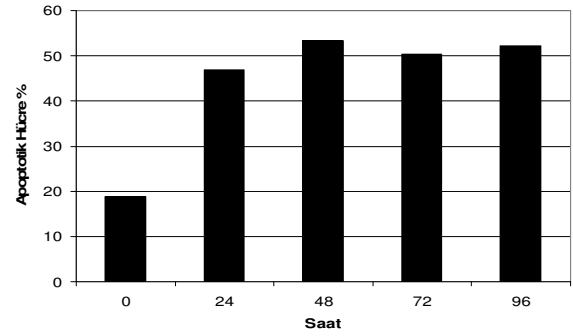
Saat	Apoptozis İndeksi
0	1,00
24	1,25
48	1,35
72	1,16
96	1,16

CAPE' nin apoptotik etkisi akridin oranj etidyum bromid ile de değerlendirilmiştir. Hücre sayısı  $1 \times 10^6$  ve CAPE' nin 1 µM (IC<sub>50</sub> dozu ) alınmıştır. Her bir grup (0, 24, 48, 72 ve 96. saat) için flüoresan mikroskopta en az 450 hücre sayılmıştır. Canlı hücreler homojen yeşil boyanmış kromatin, nekrotik hücreler homojen turuncu boyanmış kromatin, erken apoptotik hücreler kondanse ve fragmente yeşil boyanmış kromatin ve geç apoptotik hücreler kondanse ve fragmente turuncu boyanmış kromatin şeklinde gözlenmiştir (Resim 1).



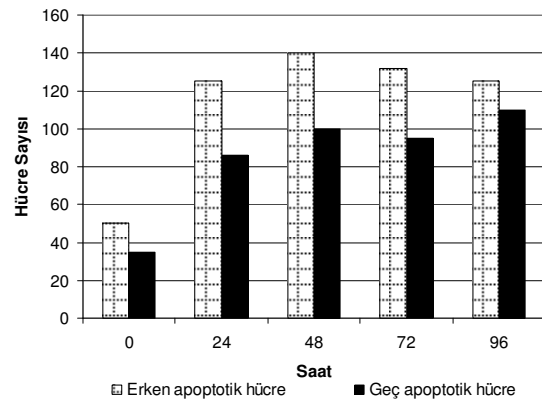
**Resim 1.** Akridin Oranj Etidyum Bromid ile canlı (C), nekrotik (N), erken (EA) ve geç (GA) apoptotik hücreler (40x)

Apoptotik, nekrotik ve normal hücreler ayrı ayrı sayılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 24 saatten itibaren erken ve geç apoptotik hücre sayılarının arttığı, maksimum apoptotik hücre sayısına 48. saatte ulaşıldığı görülmüştür (Grafik 7 , 8). Zamana bağımlı apoptotik hücre sayıları kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı bulunmuştur (t=35,987, p<0,05).



**Grafik 7.** CAPE ile muamele sonrası toplam apoptotik hücre yüzdesinin zamana göre dağılımı

	Saat									
	0		24		48		72		96	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Erken apoptotik hücre	60	11,11	126	27,78	140	31,11	132	29,29	126	27,78
Geç apoptotik hücre	36	7,78	86	19,11	100	22,22	86	21,11	110	24,44
Toplam hücre	96	18,88	211	46,66	240	59,33	227	50,44	236	52,22



**Grafik 8.** CAPE ile muamele sonrası erken ve geç apoptotik hücre sayısının zamana göre dağılımı.

## TARTIŞMA

Propolis; bal arıları tarafından bitki materyallerinden toplanan yapışkan özelliğe sahip bir karışımdır (25, 26). Ayrıca, propolisin enflamasyonda, kalp hastalıklarında, diabetes mellitus ve hatta kanserde terapatik ve koruyucu etki mekanizmasına sahip olduğu düşünülmektedir (27). Gaz kromatografisi kütle spektrofotometrisine göre; flavonoidleri ve sinamik asit türevlerini içeren yaklaşık 150 polifenolik bileşik propolisin içeriğinde bulunmaktadır (28, 29, 30). Propolis ve onun bileşenlerinin antikanser, antioksidan, antienflamatuar ve antibiyotik gibi çeşitli biyolojik aktivitelerini belirten çeşitli raporlar bulunmaktadır (12, 27, 31, 32, 33, 34).

Propolisin en önemli özelliklerinden biri tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisidir (31, 35, 36, 37). Son yıllarda, propolis ve etken maddelerinin anti-tümöral etkileri üzerinde yoğun olarak çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Propolis bileşimini oluşturan maddelerin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi ve fonksiyonlarının mekanizmalarının açıklanması ile yeni ilaç adaylarının geliştirilmesinde önemli ipuçları sağlanmıştır. Propolisin içeriğindeki biyolojik olarak aktif bileşenlerin fitokimyasal çalışmalarının rotasında, propolisin özellikle etanol ekstraktlarının fraksiyonunda, antikanser aktivite gözlenmiştir (31).

Propolisin sitotoksik ve apoptotik etkileri ile ilgili olarak literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Banskota ve arkadaşları, karaciğer-metastatik mürin kolon 26-L5 karsinom hücre serilerinde, metanollü (MeOH) Hollanda propolisi ve etken maddelerinin antiproliferatif etkilerini MTT yöntemiyle incelemişlerdir. Bu hücreler üzerinde, propolisin MeOH ekstraktının, antiproliferatif etki sergilediği ve IC<sub>50</sub> dozunun 3.5 µg / ml olduğunu göstermişlerdir (31).

Aso ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insan histiositik lenfoma U937 hücre dizisi üzerinde Brezilya propolisinin etanollü ekstraktından izole edilen CB propolisin (liyofilize CB propolisi, 100 µl 18.5 mg propolise eş değer) inhibitör etkilerini araştırmışlardır. Bu propolisin doza (0.015, 0.05, 0.15 ve 0.5 µl / ml) ve zamana bağımlı olarak hücrelerin büyümesini ve makromoleküler sentezini inhibe ettiğini, apoptozisi indüklediğini bulmuşlardır (35).

Çalışmamızda, Avustralya propolisinin (300 mg/ml), 1/1000, 1/5000, 1/10000 konsantrasyonlarının 0 - 96 saat inkübasyon süresinde, CCRF-CEM hücre dizisindeki hücre canlılığı, sitotoksitesisi ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Hücre sayısı  $2 \times 10^5$  olarak alınmıştır. CCRF-CEM hücre serisinin ikilenme zamanı 48 saat olarak tespit edilmiştir. Tripan mavisi boyası canlılık testi ile propolisin, 1/1000, 1/5000, 1/10000 konsantrasyonları 0-96 saat inkübasyonlarında doza bağımlı sitotoksitesite gözlenmiştir. Propolisin 1/1000, 1/5000 konsantrasyonları oldukça sitotoksik olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda, XTT testi ile propolisin IC<sub>50</sub> değeri 1/10000

(0.03 µg/ ml) olarak saptanmıştır. Banskota ve arkadaşları (31), IC<sub>50</sub> dozunu 3.5 µg / ml, Aso ve arkadaşları (35) 0.18 µl / ml ve Song ve arkadaşları (37) 9.14 µg / ml olarak bulmuşlardır. IC<sub>50</sub> dozlarındaki bu farklılığın, propolisin orijininin farklı bölgelerden olmasının (Hollanda, Brezilya, Kore ve Avustralya) esas nedeni oluşturduğu, bununla birlikte farklı hücre dizilerinde propolisin, farklı sitotoksitesiteye neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, sinamik asidin CCRF - CEM hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkileri Tripan mavisi boyası canlılık testi incelenmiştir. Çalıştığımız konsantrasyonlarda sinamik asitin zamana bağımlı anlamlı bir korelasyon ifade eden sitotoksitesisi saptanamamıştır. Literatürdeki sinamik asit ile yapılan çalışmalarda, hücre dizilerinde sitotoksik etki sergilediği normal hücrelerde ise sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır (9, 38, 39). Çalışmamızda, CCRF-CEM hücre dizisinde sitotoksitesite saptanmasının nedeni olarak, normal hücrelerdeki gibi sitotoksitesite etkisini azaltacak veya yok edecek enzim veya sinyal ileti mekanizmalarının aktif olabileceğini düşünmekteyiz.

Propolisin antitümöral/antienflamatuar özelliklerinin incelenmesi için yapılan in vitro çalışmalar, propolis bileşenlerinden CAPE' nin bu özelliklerin büyük bir kısmından sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır (11, 12, 18, 36, 40, 41). CAPE' nin tümöral veya viral olarak transforme olmuş hücreler üzerinde sitotoksik olduğu rapor edilmiştir. Fakat, normal hücreler üzerinde herhangi bir etkisi rapor edilmemiştir (36, 40, 42).

Çalışmamızda, CAPE' nin CCRF - CEM hücre serisi üzerinde sitotoksitesitesinin değerlendirilmesi için, tripan mavisi boyası canlılık testi ve XTT yöntemi olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. CAPE' nin 1 nM ile 10 µM aralığındaki konsantrasyonlarda tripan mavisi boyası testi ile sitotoksitesitesi değerlendirilmesinde, propolisin IC<sub>50</sub> dozu bazal sitotoksitesite olarak kullanılmıştır. Yirmi dört saat aralıklarla 4 gün boyunca yapılan sayımlar sonucunda, CAPE' nin CCRF - CEM hücre dizisinde doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve IC<sub>50</sub> dozunun 1 µM olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda, CAPE' nin CCRF-CEM hücre dizisinde, antiproliferatif etkisinin değerlendirilmesi için, XTT metodu kullanılmıştır. CAPE' nin 1 nM ile 100 µM aralığında değişik konsantrasyonlarda sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi sonucu, IC<sub>50</sub> dozu tripan mavisi boyası testi sonuçları ile aynı (1 µM) olarak bulunmuştur.

Lee ve arkadaşları CAPE ile C6 gliom hücrelerinde yaptıkları çalışmada, IC<sub>50</sub> değerinin 50 µM bulmuşlardır (43). Brudzynski K, Carlone R. MCF-7 ve MDA-MB-435 göğüs kanseri hücre dizisinde CAPE' nin IC<sub>50</sub> değerini 5,95 µM ve Rossi ve arkadaşları ise J774 makrofaj hücre dizisinde 1,5 µM olarak saptamışlardır (44, 45). CAPE' nin

normal hücrelerde bir etki göstermemesini ve çeşitli hücre dizilerinde IC<sub>50</sub> oranının farklı olmasını tümöral transformasyondan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

CAPE' nin IC<sub>50</sub> değeri ile yapılan apoptozis değerlendirmesinde Eliza yönteminde maksimum olmak üzere 48 saatte apoptotik hücrelerin yüzdesinde % 35'lik bir artışı ve Akridin-Oranj Etidyum Bromid boyama yöntemleri ise aynı periyotta % 53 bir artış ile CCRF - CEM hücre dizisi üzerine apoptotik etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Chen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, CAPE' nin insan lösemik HL - 60 hücre dizisinde apoptozisi indüklemeye mekanizmasını araştırmışlardır. CAPE' nin 20 µM konsantrasyonunun HL - 60 hücrelerinde 6 saatlik maruz kalmada apoptotik hücrelerde % 25 ve 72 saatlik maruz kalmada ise % 66'lık bir artış saptamışlardır. Apoptozisin indüklenmesinde kaspaz-3'ün hızlı aktivasyonunun, Bcl-2 ekspresyonunun "down-regülasyonu" nun ve Bax ekspresyonunun "up-regülasyonu" nun neden olduğunu gözlemlemişlerdir (21).

Çalışmamızda, propolis ve CAPE' nin CCRF - CEM hücre dizisinde sitotoksik ve apoptotik özellikleri olduğu gösterilmiştir. CAPE' nin bu özelliklerinin moleküler seviyede açıklanabilmesi için, CCRF - CEM hücre dizisinde apoptozis indükleyici etkisinin altında yatan mekanizmaların da araştırılmasının gerekliliğine inanmaktayız. Bu amaçla, CAPE ile muamele edilmiş CCRF-CEM hücre dizisinde, belirli zaman dilimlerinde apoptoziste rolü olduğu bilinen; p53, bcl-2 ve ilişkili proteinlerin (Kaspaz 3 ve 8, STAT gibi) ekspresyonlarındaki değişimi ile ve serin / treonin protein fosfataz aktivitesi ve bu fosfataz grubunun üyelerinin (PP1, PP2A, PP2B gibi) ekspresyonlarına olan etkisi araştırılmalıdır.

Sonuç olarak, klinik uygulamalarda kullanılan az sayıda efektif antimetastatik kemoterapotik ajan bulunduğunu ve bunların çoğunun yaşamı tehdit edici advers etkileri olduğu bilinmektedir. Propolis ve CAPE' nin normal hücreler üzerinde düşük toksisiteye sahip, yeni antimetastatik ajanlar olarak değer taşıdıklarına inanmaktayız.

#### KAYNAKLAR

1. ChemidPlus. Chemical database. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>; National Library of Medicine. Bethesda, MD
2. Cirasino L, Pisati A, Fasani F. Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*. 1987; 16: 110-111
3. Monti M, Berti E, Carminati G, Cusini M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*. 1983; 9: 163
4. Opdyke DLJ. Monographs on fragrance raw materials, *Food Cosmet. Toxicol*. 1975; 13: 687-690
5. Hoskins JA. The occurrence, metabolism and toxicity of cinnamic acid and related compounds, *J. Appl. Toxicol*. 1984; 4 : 283-292
6. Thimann KV. M.B. Wilkins (Ed.), *Physiology of Plant Growth and Development*, McGraw-Hill, London. 1969: 2-45
7. Ramanan PN, Rao MN. Antimicrobial activity of cinnamic acid derivatives, *Ind. J. Exp. Biol*. 1987; 25 :42-43
8. Tawata S, Taira S, Kobamoto N, Zhu J, Ishihara M, Toyama S. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters, *Bio-sci. Biotechnolol. Biochem*. 1996; 60 : 909-910
9. Liu L, Hudgins W.R, Shack S, Yin M.Q., Samid D. Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention, *Int. J. Cancer*. 1995; 62: 345-350
10. Poole RC, Bowden NJ, Halestrap AP. Derivatives of cinnamic acid interact with the nucleotide binding site of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Effects on the dehydrogenase reaction and stimulation of esterase activity by nucleotides. *Biochem Pharmacol*.1993; 45: 1621-30
11. Borelli F, Izzo, AA, Di Carlo G, Etal. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*. 2002; 73, 38-S43
12. Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure- activity relationship. *J. Agric. Food Chem.*, (2002) 50: 468-472
13. Hegazi AG, Abd EL, Hady FK, Abd Allah FA. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z. Naturforsh* 2000; 55: 70-75
14. Totan Y, Aydin, E, Cekic O, Dagloglu C.M, Borazan M, Dagloglu K, Gultek A. Effect of caffeic acid phenethyl ester on corneal neovascularization in rats. *Curr. Eye Res* 2001; 23: 291-297
15. Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: The potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation*. 2000; 102: 1970-1976
16. Özyurt H, Irmak MK, Akyo O, Sogut S. Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischemia-reperfusion injury. *Cell Biochem. Funct* .2001; 19: 259-263



17. Mahmoud NN, Carothers AM, Grunberger D, Etal. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 921-927
18. Lee YJ, Liao PH, Chen WK, Yang CY. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett*. 2000; 153: 51-56
19. Bhimani RS, Troll W, Grunberger D, Frenkel K. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res*. 1993; 53: 4528-33
20. Lee SK, Song L, Mata-Greenwood E, Etal. Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents. *Anticancer Res*. 1999; 19: 35-44
21. Chen YJ, Shiao MS, Hsu ML, Etal. Induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester through activation of caspase-3, downregulation of bcl-2 and upregulation of Bax in human leukemic HL-60 cells. *J. Agri. Food Chem*. 2001; 49: 5615-5619
22. Chen YJ, Shiao MS, Wang SY. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anti-cancer Drug*. 2001; 12: 143-149
23. Mazza JJ. Manual of Clinical Hematology. Third Edition. Lippincott Williams& Williams, USA. 2002
24. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-57
25. Diğrak M, Yılmaz Ö, Çelik S, Yıldız S. Propolisteki yağ asitleri ve antimikrobiyal etkisi üzerinde *in vitro* araştırmalar. *Gıda*. 1995; 20: 249-55
26. Ivanov DF, Tikonov AI, Krivenchuk PE, Liurskaia FV. Propolis and its clinical usage. *Oftolmol Zh*. 1973; 28: 104-7
27. Marcucci MC. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995; 26: 83-99
28. Bankova VS, Dylulgerov A, Popov S, Etal. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: Phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*. 1992; 23: 79-85.
29. Garcia- Viguera C, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. *Z Naturforsch*. 1993; 48: 731-35
30. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR. The analysis of bud exsudate of populus X euramericana, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. *Proc R Soc Lond B*. 1992; 232: 249-72
31. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Etal. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 2002; 80: 67-73
32. Burdock GA, Boca Raton FL. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. Vol. I. 3rd Ed. CRC Press, 1995: 350
33. Dobrowolski JW, Vohoraq SB, Sharma K, Etal. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory, and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol*. 1991; 35: 77-82
34. Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol*. 1994; 41: 9-13
35. Aso K, Kanno S, Tadano T, Satoh S, Ishikawa M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27: 727-30
36. Grunberger D, Banerjee R, Etal. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 1988; 44: 230-2
37. Song YS, Jin C, Jung KJ, Park EH. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 82: 89-95
38. Ekmekcioglu C, Feyertag J, Marktl W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells, *Cancer Letters*. 1998; 128: 137-144
39. Shiraishi T, Owada MK, Tatsuka M, Etal. Specific inhibitors of tyrosine-specific protein kinases: properties of 4-hydroxycinnamide derivatives in vitro, *Cancer Res*. 1989; 49: 2374-2378
40. Chen JH, Shao Y, Huang MT, Etal. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. *Cancer Lett*. 1996; 108: 211-4
41. Scheller S, Wilczok T, Imielski S, Etal. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *Int J Radiat Biol*. 1990; 57 (3): 461-65
42. Su Z, Lin J, Grunberger D, Fischer PB. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res*. 1994; 54: 1865-70
43. Lee JY, Kuo CH, Chu CY, Etal. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical Pharmacology*. 2003; 66: 2281-2289

44. Brudzynski K, Carlone R. Stage-dependent modulation of limb regeneration by caffeic acid phenethyl ester (CAPE)-immunocytochemical evidence of a CAPE - evoked delay in mesenchyme formation and limb regeneration. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2004; 301: 389 - 400.
45. Rossi A, Ligresti A, Longo R, Etal. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine.* 2002;9:530-5