

**MESANE KANSERLİ DOKU KÜLTÜRLERİNDEKİ MİKRONÜKLEUS  
ÜZERİNE PROPOLİS VE MİTOMİSİN-C'NİN ETKİLERİ**  
**Effects of Propolis and Mitomycin-C on Micronucleus  
in Tissue Cultures of Bladder Cancer**

**Halil Erhan EROĞLU<sup>1</sup>, Atilla TATLIŞEN<sup>2</sup>, Yusuf ÖZKUL<sup>3</sup>**

**Özet :** Bu çalışmada yüzeysel mesane kanserli hastaların transüretal rezeksiyon (TUR) doku örneklerinden hazırlanan tranzisyonel karsinom hücre kültürlerinde mitomisin-C (MMC) ve propolisin mutagenik etkilerine bakıldı. Çalışmamızda mesane kanserli doku kültürlerine 0.1 ml propolis (8 g propolis + %8'lik 15 ml L-Lizin), 1.6 µl mitomisin-C (0.1 mg/ml) ve 0.1 ml L-Lizin (80 mg L-Lizin + 1 ml distile su) ilave edilerek, mikronükleus üzerine etkileri değerlendirildi. Sonuçlarımız propolis ve mitomisin-C'nin kontrol grubuna hücrelerdeki mikronükleus (MN) oranını artırdığını göstermektedir ( $p<0.05$ ). Hem propolis hem de mitomisin-C mikronükleus oranını artırıcı etkilerinden dolayı mutagen maddelerdir.

**Anahtar kelimeler:** Mesane kanseri, mikronükleus, mitomisin-C, propolis

Propolis, balarıları (*Apis mellifera* L.) tarafından bitkilerden toplanan ve mumla karıştırılarak kovan içerisinde bir çok amaca yönelik olarak kullanılan doğal bir üründür (1). Propolis genel olarak; %45-55 reçine, %23-35 mumlar ve yağ asitleri, %10 esansiyel yağlar, %5 polen ve %5 diğer organik maddeler ve mineraller içerir (2). Flavonoidler propolisin biyolojik aktivitesinin önemli bir kısmından sorumludur (3). Propolis; antibakteriyel, antiviral, antifungal, antioksidan, antiinflammatör, yara iyileştirici ve doku yenileyici ve anestetik etkilerinin yanında pek çok yararlı biyolojik aktivitenin gerçekleşmesine neden olur (4-9).

<sup>1</sup> Bilim Uzm, Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

<sup>2</sup> Prof.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.Üroloji AD, Kayseri

<sup>3</sup> Prof.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fak.Tıbbi Genetik AD,Kayseri

**Summary :** In this study, we have tested the mutagenic effects of mitomycin-C (MMC) and propolis on transitional carcinoma cell cultures. Tissue samples were obtained from transurethral resection (TUR) tissue of patients with superficial bladder cancer. In this study, 0.1 ml propolis (8 g propolis + 8% 15 ml L-Lysin), 1.6 µl mitomycin-C (0.1 mg/ml) and 0.1 ml L-Lysin (80 mg L-Lysin + 1 ml distilled water) were added to cancer tissue cultures and the effects of these solutions on the micronucleus (MN) rate were evaluated. Propolis and mitomycin-C increased the micronucleus rate of the cell when compared to untreated control ( $p<0.05$ ). Our results showed that both propolis and mitomycin-C are mutagenic materials, because of their micronucleus increasing effects.

**Key words:** Bladder cancer, micronucleus, mitomycin-C, propolis

Yüzeysel mesane kanserleri tüm kanserlerin %80'ini oluşturur. Tekrar oranı %40-80 arasında değişmektedir (10). İntravesikal mitomisin-C (MMC) bu oranı azaltmak için kemoterapötik olarak kullanılan bir ajan olup antikarsinojen ve antitümör aktivitesi göstermektedir (11).

Mikronükleus (MN) testi, mutagenler ve karsinogenler tarafından indüklenen DNA hasarını belirlemede hem in vivo hem de in vitro olarak kullanılan sitogenetik bir testtir. MN analiz yöntemi, kimyasal maddelerin mutagenik etkilerini belirlemek için kullanılır (12-15).

Sunulan çalışmada bir çok çalışmaya kaynak oluşturan ve çok çeşitli etkileri bulunan (4-9) propolis ile MMC'nin mesane kanserli hastaların doku kültürlerinde MN üzerine etkisi araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Propolisin Toplanması ve Saklanması

Propolis örnekleri Eylül 2002'de Bursa'dan toplandı. Propolisin suda çözünebilir türevlerinin (WSDP) elde edilmesinde Nikolov ve ark. (1987) metodu kullanıldı (16). Propolis %96'lık alkolde çözüldü, mikrofiltreden geçirildi ve vakum evaporatörde kurutuldu. Elde edilen reçineli ürün %8'lik L-Lizin (Sigma Chemie) solüsyonuna ilave edildi. WSDP dondurucuda kurutuldu. WSDP kullanıma kadar +4°C'de saklandı.

### Mesane Kanserli Materyalden Doku Kültürü

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalında mesane kanserli 22 hastadan alınan doku örnekleri transport medyum (Biological Endustries) içerisinde Genetik Anabilim Dalı'na ulaştırıldı. Steril kabinde steril petri kabına alınan materyal, steril makas ile küçük parçalara ayrıldı. Materyal etüvde 37°C'de 1 gece bekletildi. Petri kabından steril kültür tüpüne alınan materyal, 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi. 1 ml kollajenaz + 1 ml ön hazırlık medyum (Biological Endustries) ilave edildi. 2 saat etüvde 37°C'de bekletildi. 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi. 1 ml ön hazırlık medyum ilave edildi. 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi. 9 ml 37°C'de ısıtılmış doku kültür medyum (chang medyum-IRVINE<sup>0</sup>) eklendi. Hücreler 2 adet kültür flaskına paylaştırılarak etiketlendi. Flasklar CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırıldı. 7-8 gün hareket ettirilmeden hücrelerin flaskın tabanına yapışması beklendi.

Kanserli doku kültürlerine, 0.1 ml propolis (8 g propolis + 8% 15 ml L-Lizin), 1.6 µl MMC (Sigma) (0.1 mg/ml) ve 0.1 ml L-Lizin (80 mg L-Lizin + 1 ml distile su) ilave edildi.

Çıkarım yapılacak her bir flaska 100 ml kolşisin (Sigma) eklenerek, 1 saat etüvde 37°C'de bekletildi. Flask içerisindeki medyum enjektöre çekildi. Flask içerisine 2 ml Tripsin EDTA (IRVINE<sup>0</sup>) ilave edildi ve 5-10 saniye

beklendikten sonra enjektöre çekildi. Flask içerisine 2 ml Tripsin EDTA ilave edildi ve 4 dakika 37°C'de inkübe edildi. Bu süre içerisinde hücrelerin kalkıp kalkmadığına invert mikroskopta bakıldı. Hücre kalkması tamamlandığı zaman, enjektör içerisindeki medyum ve Tripsin EDTA karışımı tekrar flaska aktarıldı. Flask içerisinden de pastör pipetiyle santrifüj tüpüne alındı ve flask üzerindeki etiket tüpe yapıştırıldı. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi. 10 ml 37°C'de ısıtılmış hipotonik solüsyonu ilave edildi. Hemen 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi. 10 ml 37°C'de ısıtılmış hipotonik solüsyonu (%0.0625'lik sodyum sitrat) ilave edildi ve 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Santrifüjden önce 1 ml soğuk fiksatif (3 hacim metanol : 1 hacim asetik asit) ilave edildi. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet resüspanse edildi. 10 ml soğuk fiksatif damla damla, vorteks üzerinde karıştırılarak ilave edildi. Elde edilen hücreler preparat hazırlamadan önce -20°C'de en az 30 dakika bekletildi. Preparat hazırlanacağı zaman rezervler derin dondurucudan çıkarılarak 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre süspansiyonundan ıslak soğuk lam üzerine 2-3 damla damlatıldı. 2-3 saniye beklendi ve üzeri soğuk fiksatif ile yıkandı (12).

### Mikronükleusun Boyama ve Değerlendirilmesi

Preparatlar 5 N HCl içerisinde 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Preparatlar musluk suyundan geçirildi. Preparatlar karanlıkta Shift (Merck) ayırıcında 240 dakika bekletilerek boyandı. Preparatlar 3 şale sodyum bisülfid çözeltilerinin her birinde 2 dakika bekletilerek yıkandı. Preparatlar musluk suyunda en az 30 dakika bekletildi. Preparatlar % 5'lik Fast green (Merck) solüsyonunda 30 dakika boyandı. Preparatlar saf sudan geçirilerek boyanın fazlası alındı. MN değerlendirmesinde, 1000 hücre değerlendirilerek MN sayıları belirlendi. Sonuçlar %MN şeklinde kaydedildi (13).

### İstatistiksel Analiz

MN değerlendirmesinde tekrarlı ölçümlerde ANOVA testi kullanıldı.

**BULGULAR**

Mesane kanserli 22 hastanın doku kültürlerinin MN sonuçları Tablo I ve Tablo II'de gösterilmektedir. Tablo II'ye göre en büyük MN oranı MMC'ye aittir. Propolis, MMC ve L-Lizinin MN oranları

sırasıyla  $1.318 \pm 0.861$ ,  $2.186 \pm 0.825$  ve  $0.959 \pm 0.520$  olarak bulundu. Sonuçlar, propolis ve MMC'nin kontrol grubuna göre MN oranını yükselttiğini göstermiştir. MN oranları bakımından propolis, MMC ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

**Tablo I.** Mesane kanserli doku kültürlerinde Propolis, MMC ve L-Lizinin % MN oranları

Denek (n)	Propolis (0.1 ml)	Maddeler	
		MMC (1.6 mL)	L-Lizin (Kontrol) (0.1 ml)
1	0.2	1.1	0
2	1.2	1.7	0.8
3	0.9	0.6	0.3
4	1.2	2.9	1.6
5	2.8	2.5	1.7
6	2.7	3.2	1.4
7	0.8	1.8	1.0
8	1.3	2.4	1.1
9	1.1	2.1	0.8
10	3.1	3.4	1.9
11	0.7	2.7	0.3
12	0.4	2.6	0.2
13	2.0	2.1	1.2
14	2.1	3.6	1.5
15	2.2	2.8	1.5
16	1.0	2.2	1.0
17	0.6	2.1	0.8
18	0.9	1.6	0.8
19	0.7	0.6	0.4
20	0.5	1.9	0.8
21	0.4	1.3	0.7
22	2.2	2.9	1.3

**Tablo II.** Propolis, MMC ve L-Lizinin % MN ortalamaları

Maddeler	n	MN Oranları ( + SS)
Propolis (0.1 ml)	22	1.318 ± 0.861
MMC (1.6 µl)	22	2.186 ± 0.825
L-Lizin (0.1 ml)	22	0.959 ± 0.520

*X*: Aritmetik Ortalama      *F*= 39.289      *p*<0.05  
*SS*: Standart Sapma

## TARTIŞMA

İnsanlar günlük yaşamlarında veya çalışma ortamlarında genotoksik ajanların mutajenik ve karsinojenik etkileri ile karşılaşmaktadırlar. Bu nedenle mutajenik ve karsinojenik, maddelerin etkilerinin araştırılması önem kazanmıştır. Doğal ürünlerin de mutajenik etki gösterdikleri bildirilmektedir (12, 17-18).

Propolis ve MMC'nin MN üzerindeki arttırıcı etkileri bir çok çalışmada gösterilmiştir. Özkul ve ark. (19) sağlıklı kişilerin periferik kan lenfosit kültürlerinde propolisin artan dozlarına bağlı olarak, MN oranını arttırdığını bildirmektedirler. Krishnaja ve ark. (14), MMC'nin periferik kan lenfosit kültürlerinde MN oranını arttırdığını, Grisolia (15) da MMC uygulanan fare ve balıkların eritrositlerinde MN oranında artış olduğunu belirtmektedirler. Fauth ve ark. (20) yaptıkları çalışmada, insan kan lenfosit kültürlerinde MMC'nin MN üzerine arttırıcı etkisini göstermişlerdir. Jie ve Jia (21), MMC uygulanan farelerin NIH 3T3 hücrelerinde MN oranlarının arttığını rapor etmişlerdir. Ortiz ve ark. (22) çalışmalarında, MMC'nin ratların periferik kan retikülosit hücrelerinde, Prasad ve ark. (23) ise MMC uygulanan farelerin kemik iliği hücrelerinde MN oranında artış olduğunu bildirmektedirler.

Propolis ve MMC'nin mutajenik aktivitesinin araştırıldığı bu çalışmada propolis ve mitomisin-C'nin hücrelerdeki mikronükleus oranını arttırdığı saptanmıştır.

Mikronükleus, hücrelerde spontan olarak da oluşabilir. Spontan MN sayısı hücre bölünmesinin sayısına bağlıdır (25). Propolisin mesane kanserli doku kültürleri ile yapılan başka bir çalışmada hücre bölünmelerini azaltıcı etkisinin bulunduğu söz edilmektedir (26). DNA'da oluşan çapraz bağların, MN oluşumundan sorumlu oldukları belirtilmektedir (24). Literatür bilgilerinin ışığında, propolisin DNA'da çapraz bağlar oluşturarak MN sayısında artışına neden olabileceği kanısına varılmıştır.

Sonuç olarak propolis ve MMC, MN oranını arttırıcı etkilerinden dolayı mutajen maddeler olarak yorumlanabilir. Bu nedenle propolis ve MMC'nin yüksek dozlarda kullanımı zararlı sonuçlar doğurabilir. Diğer taraftan bölgelere göre değişen bitki örtüsüne bağlı olarak propolis içeriğinde de farklılığın olabileceği aşıkardır. Propolisin yapısındaki maddelerden hangilerinin MN oranı üzerinde etkili olduğunu ve sinerjistik etki gösterdiğini ortaya koyacak diğer çalışmalara gereksinim vardır.

## KAYNAKLAR

1. Ghisalberti EL. Propolis a review. *Bee World* 1979, 60:59-84.
2. Ghisalberti EL, Jefferies PR, Lanteri R, Matisons J. Constituents of propolis. *Experientia* 1978, 34:157-158.
3. Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J Royal Soc Med* 1990, 83:159-160.
4. Greenaway W, May J, Scaysbrook T, Watley FR. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Z Naturforsch* 1991, 46:111-121.
5. Krol W, Czuba Z, Scheller S, Paradowski Z, Shani F. Structure-activity relationship in the ability of flavonoids to inhibit chemiluminescence. *Journal of Ethnopharmacology* 1993, 41:121-126.
6. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva YU, et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999, 64:235-240.
7. Basnet P, Matsushige K, Hase K, Kadota S. Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoylquinic acids from propolis. *Biol Pharm Bull* 1996, 19:1479-1484.
8. Amoros M, Savuager F, Girre L, Cormier M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* 1992, 23:1732-1740.
9. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukotr Essent Fatty Acids* 1996, 55:441-449.
10. Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N. *Temel Üroloji. Güneş Kitabevi, Ankara* 1998, pp 708-713.
11. Goldin A, Serpick AA, Mantel N. Experimental screening procedures and clinical predictability value. *Cancer Chemotherapy Report* 1966, 50:173-218.
12. Eroğlu HE. Mesane Kanseri Hastalarının Doku Örneklerinde Propolis ve Mitomisin-C'nin Mikronükleus, Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Analizi ve Mitotik İndeks Parametrelerine Etkisinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Ün. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2004, ss 89.
13. Sarto F, Tomanin R, Giacomelli L, Canova A, Raimondi F. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antitubercular therapy. *Mutation Research* 1990, 228:157-169.
14. Krishnaja AP, Sharma NK. Ascorbic acid potentiates mitomycin C-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Teratog Carcinog Mutagen* 2003, 1:99-112.
15. Grisolia CK. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin-C and various pesticides. *Mutation Research* 2002, 518:145-150.
16. Nikolov N, Marekov N, Bankova V, et al. Method for the preparation of water-soluble derivative of propolis. *Veterinary and Comparative Oncology* 1987, 1:216-220.
17. Matsuno T, Jung SK, Matsumoto Y, Saito M, Morikawa J. Preferential Cytotoxicity to Tumor Cells of 3,5-Diprenyl-4-Hydroxycinnamic Acid (Artepillin C) Isolated from Propolis. *Anticancer Research* 1997, 17:3565-3568.

18. Özkul Y, Silici S, Eroğlu HE. Periferal Kan Lenfositlerinde Türk Propolisinin Mitotik İndeks ve Mikronükleus Üzerine Etkisi, VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Bildiri Kitabı, Antalya 21-24/Nisan 2004, ss 127.
19. Özkul Y, Silici S, Eroğlu HE. The Anti-Carcinogenic Effect of Propolis in Human Lymphocytes Culture. *Phytomedicine* 2004, In Press.
20. Fauth E, Scherthan H, Zankl H. Chromosome painting reveals specific patterns of chromosome occurrence in mitomycin C- and diethylstilboestrol-induced micronuclei. *Mutagenesis* 2000, 15:459-467.
21. Jie YM, Jia C. Chromosomal composition of micronuclei in mouse NIH 3T3 cells treated with acrylamide, extract of *Tripterygium hypoglaucom* (level) hutch, mitomycin C and colchicine, detected by multicolor FISH with centromeric and telomeric DNA probes. *Mutagenesis* 2001, 16:145-149.
22. Ortiz R, Medina H, Rodriguez L, Gonzalez-Marquez H, Cortes E. Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. *Environ Mol Mutagen* 2004, 43:179-185.
23. Prasad S, Naik P, Vijayalaxmi KK. Efficiency of *Coleus aromaticus* extract in modifying cyclophosphamide and mitomycin-C induced clastogenicity in mouse bone marrow cells. *Indian J Exp Biol* 2002, 40:1020-1025.
24. Möller M, Stopper H, Haring M, Schleger Y, Epe B, Adam W, Saha-Möller CR. Genotoxicity induced by furocoumarin hydroperoxides in mammalian cells upon UVA irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 216:693-701.
25. Heddle AJ, Stuart E, Salomone MF. *The Bone-marrow Micronucleus Test: Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. BJ Kilbey Elsevier Science Publ BV Second Edition 1984, 20:441-457.
26. Eroğlu HE, Tatlşen A, Özkul Y. Mesane Kanserinde Türk Propolisi ve Mitomisin-C'nin Mitotik İndeks ve Mikronükleus Parametrelerinin Karşılaştırılması, VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Bildiri Kitabı, Antalya 21-24/Nisan 2004, ss 131.

