



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ASİDOFİLUS SÜTÜ VE PROPOLİSİN *in vivo*  
OLARAK KANSER TEDAVİSİNDE KULLANIM  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Elif ONUR**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Duygu KIŞLA**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 29.01.2018**

**Bornova-İZMİR**

**2018**

**EÜ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**ASİDOFİLUS SÜTÜ VE PROPOLİSİN *IN VIVO*  
OLARAK KANSER TEDAVİSİNDE KULLANIM  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Elif ONUR**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Duygu KIŞLA**

**İkinci Danışmanı : Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 29.01.2018**

Bornova-İZMİR

2018



Elif ONUR tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Asidofilus Sütü ve Propolisin *In Vivo* Olarak Kanser Tedavisinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29.01.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**Jüri Başkanı: Prof. Dr. Duygu KIŞLA**

**Raportör Üye: Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY**

**Üye: Doç. Dr. Gülten GÜNDÜZ**

**Üye: Doç. Dr. İlkin ŞENGÜN**

**Üye: Yrd. Doç. Şükrü GÜLEÇ**

**İmza**  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Asidofilus Sütü ve Propolisin *In Vivo* Olarak Kanser Tedavisinde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

28/12 / 2017

  
ELİF ONUR



**ÖZET****ASİDOFİLUS SÜTÜ VE PROPOLİSİN *IN VIVO* OLARAK KANSER TEDAVİSİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

ONUR, Elif

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Bilimleri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Duygu KIŞLA

İkinci Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Ocak 2018, 78 sayfa

Bu tezde asidofilus sütünün ve propolisin fare meme kanseri modelinde *in vivo* olarak anti-tümör etkisi incelenmiştir.

Kanser hastalığı çağımızın en tehlikeli ve ölümcül hastalıklarındandır. Kanser tedavileri radyoterapi, kemoterapi gibi tedavi yöntemlerini içermekte iken son yıllarda bu yöntemlere immünoterapi de eklenmiştir. İmmünoterapi sayesinde konağın immün sistemi modüle edilerek tümör oluşumlarının baskılanması mümkün olduğu bilinmektedir. Bu kapsamda çeşitli immünomodülatör bileşenler araştırılmaktadır.

Tez çalışmasında asidofilus sütünün ve su bazlı propolisin anti-tümör etkilerin belirlenmesi amacıyla öncelikle *in vitro* denemeler yapılmış olup, su bazlı propolisin 4T1 hücre hattı için IC<sub>50</sub> değeri 129 µg/mL olarak saptanmıştır. *In vivo* denemeler kapsamında ise 2x10<sup>4</sup> hücre/fare olacak şekilde 4T1 hücreleri enjekte edilen Balb/c fareler, 14 gün boyunca gavaj yoluyla propolis (66 mg/kg) ve/veya asidofilus sütü (10<sup>8</sup> kob/mL) ile beslenmiştir. Çalışma süresince farelerin ağırlıkları tartılmıştır. Çalışma sonunda ise oluşan tümör boyutları kumpas ile ölçülmüştür. Farelerden toplanan spenositlerin proliferasyonu ölçülmüştür. Dalak hücre kültürü ve 4T1 hücreleri ko-kültür hazırlanarak sitotoksik etki mikroskop ile incelenmiştir. CD8+ T hücre yanıtı akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar kontrol grubuna göre belirlenmiştir. Splenosit proliferasyonu ve CD8+ T hücre analizi bu sonuçları doğrulamıştır. En iyi anti-tümör etkinin asidofilus sütünün ve propolisin birlikte kullanımını ile elde edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Asidofilus sütü, propolis, meme kanseri, immünoterapi.



**ABSTRACT*****IN VIVO* INVESTIGATION OF POTENTIAL USE OF  
ASIDOPHILUS MILK AND PROPOLIS IN CANCER  
TREATMENT**

ONUR, Elif

MSc in Food Eng.

Supervisor: Prof. Dr. Duygu KIŞLA

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

January 2018, 78 pages

In this thesis, the antitumor effect of acidophilus milk and propolis in the mouse breast cancer model was investigated *in vivo*.

Cancer is the most dangerous and deadly disease of our time. While cancer treatments include treatment methods such as radiotherapy and chemotherapy, immunotherapy has been added to these methods in recent years. Immunotherapy is known to suppress tumor formation by modulating the immune system of the host. Various immunomodulatory components are being investigated in this context.

In the thesis, in order to determine the antitumor effects acidophilus milk and propolis, firstly *in vitro* experiments were carried out and the IC<sub>50</sub> value for propolis on 4T1 cell line was determined as 129 µg / mL. For *in vivo* experiments Balb /c mice injected with 4T1 cells (2x10<sup>5</sup> cells / mouse) were fed with gavage propolis (66 mg / kg) and / or acidophilus milk (10<sup>8</sup> cfu / ml) for 14 days. During the study the weights of the mice were weighed. At the end of the study, the tumor sizes were measured with caliper. The proliferation of sphenocytes which collected from mice was measured. Spleen cell culture and 4T1 cells were prepared by co-culture and cytotoxic effect was examined with microscope. CD8+ T cell response was analyzed by flow cytometry. The results were determined according to the control group. Splenocyte proliferation and CD8+ T cell analysis confirm these results. The best anti-tumor effect was obtained by the combined use of acidophilus and propolis.

**Keywords:** Acidophilus milk, propolis, breast cancer, immunotherapy



## TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aőamasında ihtiyaç duyduğum her türlü bilgiyi sağlayan ve tecrübesini benimle paylaşıp yardım eden saygıdeğer hocam ve danıőmanım Sayın Prof. Dr. Duygu KIŞLA'ya, tez çalıőmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve yorumlanmasında bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a, laboratuvar çalıőmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Ar. Gör. Hatice Pınar YÜKSEL, Cenk Serhan ÖZVEREL'e, Meltem DOĞAN'a, Tekn. Tülay ÜZEL ve Tekn. Figen BECERİK'e, bu projenin gerçekleştirilmesinde destek sağlayan E.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü ve Prof. Dr. őebnem TAVMAN'a ve son olarak araőtırmam boyunca her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan sevgili aileme teőekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	4
2.1 Kanser ve Meme Kanseri.....	4
2.2 İmmünoloji ve Kanser İmmünoterapisi .....	5
2.3 Probiyotikler ve Asidofilus Sütü.....	11
2.4 Propolis .....	13
3. MATERYAL .....	18
3.1 Çalışmada kullanılan kültürler .....	18
3.2 Süt Tozu, Süt, Propolis .....	18
3.3 Besiyeri, Kitler ve Kimyasallar.....	18
3.4 <i>In vivo</i> Çalışmada Kullanılan Fareler.....	19
4. METOT.....	20
4.1 <i>L.acidophilus</i> LA-5 Üreme Eğrisi.....	20
4.2 Asidofilus Sütü Üretimi .....	20
4.2.1. Asidofilus sütündeki <i>L.acidophilus</i> LA-5'in sayımı .....	21
4.3 PSE'nin <i>L.acidophilus</i> LA-5 Üzerine Antibakteriyal Etkisi.....	22
4.4 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	23
4.4.1. PSE'nin 4T1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi.....	24
4.4.2 PSE'nin 4T1 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin analizi .....	26
4.5 <i>In vivo</i> Çalışmalar .....	27
4.5.1 4T1 <i>in vivo</i> tümör modeli oluşturulması.....	28
4.5.2 Gavaj uygulamaları.....	28
4.5.3 Farelerin Tartımı .....	29

4.5.4 Tumor boyutlarının ölçümü.....	30
4.6 Splenosit Proliferasyon Analizi.....	30
4.7 Farelerden İzole Edilen Splenositlerin 4T1 Hücre Hattı ile Ko-Kültüre Edilmesi.....	32
4.8 CD8+ Sitotoksik T Hücre Yanıtının Ölçümü.....	33
4.9 İstatistiksel Analizler.....	35
5. BULGULAR.....	36
5.1 Asidofilus Sütündeki <i>L.acidophilus</i> LA-5'in Sayımı.....	36
5.2 <i>L.acidophilus</i> LA-5 MRS Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrisi.....	36
5.3 PSE'nin <i>L.acidophilus</i> LA-5 Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisi.....	37
5.4 PSE'nin 4T1 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	37
5.5 PSE'nin 4T1 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisi.....	38
5.6 <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	42
5.6.1 Farelerin Ağırlıkları.....	42
5.6.2 Tumor boyutlarının ölçüm sonuçları.....	43
5.6.3 Splenosit proliferasyon analiz sonuçları.....	44
5.6.4. Farelerden İzole Edilen Splenositlerin 4T1 Hücre Hattı ile Ko-Kültüre Edilmesi.....	45
5.6.5. CD8+ sitotoksik T hücre yanıtı.....	48
6. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	52
7. KAYNAKLAR.....	64
8. ÖZGEÇMİŞ.....	74

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.2.: IL-2'nin T, B ve NK hücreleri üzerindeki etkisi .....	8
2.2.1: Tümör hücresinin kontrolsüz çoğalması .....	9
2.2.2: Sitotoksik T hücrelerinin hücrel immün yanıtın sonucunda tümör hücresini apoptoza sürüklemesi.....	10
2.3. Asidofilus sütü üretim şeması.....	13
4.2. Denemelerde kullanılmak üzere üretilen asidofilus sütü.....	21
4.3. MİK testinde kullanılan steril plastik hücre büyüme kabı şablonu .....	22
4.4.1. Neu Bauer lamının şematik görüntüsü .....	24
4.5.1. Fareye 4T1 enjeksiyonu.....	28
4.5.2. Farenin gavaj yoluyla beslenmesi.....	29
4.5.3. Farelerin tartımı .....	29
4.5.4. Tümör boyutlarının kumpas ile ölçümü .....	30
4.6. Farelerden alınan dalak örneklerinin hazırlanışı.....	31
5.2. <i>L.acidophilus</i> LA-5'in Üreme Eğrisi .....	37
5.4. PSE'nin 4T1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi .....	38
5.5.1. Herhangi bir madde ile muamele edilmeyen 4T1 hücrelerinin akış sitometrisindeki görüntüsü.....	39
5.5.2. PSE'nin 129,25±1.90 µg/mL (IC <sub>50</sub> ) konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin akış sitometrisindeki görüntüsü .....	39
5.5.3. PSE'nin 64,6 µg/mL (0,5x IC <sub>50</sub> ) konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin akış sitometrisindeki görüntüsü.....	40
5.5. PSE'nin 4T1 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi.....	40
5.5.4. PSE ile muamele edilmemiş 4T1 hücrelerinin (Kontrol) inverted mikroskoptaki görüntüsü (10X).....	41

5.5.5. PSE'nin $IC_{50}$ konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin görüntüsü (1); PSE'nin $0,5xIC_{50}$ konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü (2), (10X).....	42
5.6.1. Deneme boyunca farelerin ağırlık ortalamaları .....	43
5.6.2. Deneme gruplarının ortalama tümör hacimleri.....	44
(a) K1 grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve canlılığını koruyan 4T1 hücreleri.....	45
(b) K2 grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve apoptoza uğramış 4T1 hücrelerinin görüntüsü.....	46
(c) PSE grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve apoptoza uğramış 4T1 hücrelerinin görüntüsü.....	46
(d) AS grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve apoptoza uğramış 4T1 hücrelerinin görüntüsü.....	47
(e) PSE+AS grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve apoptoza uğramış 4T1 hücrelerinin görüntüsü .....	47
(f) K1 grubunun herhangi bir uyarıcı ile stimüle edilmeyen splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve canlılığını koruyan 4T1 hücreleri.....	48
5.6.5.1. CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerin akış sitometrisindeki görüntüsü .....	49
5.6.5.2. IFN- $\gamma$ salgılayan CD8+ T lenfositlerin akış sitometrisindeki görüntüleri	50
5.6.5.1: CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerin yüzdeleri.....	50
5.6.5.2.: CD8 + T lenfositlerinin yüzdeleri .....	51

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.2: Bazı sitokinleri üreten hücreler ve bu sitokinlerin etkileri. ....	8
2.4: Ham propolisteki bazı önemli bileşenlerin miktarları .....	14
2.5: Propoliste bulunan bileşik grupları.....	15
4.3. MİK ve MBK testinde kullanılan kuyucuklardaki ekstrakt konsantrasyonları 23	
4.4.1. Sitotoksosite analizinde test edilen PSE'nin konsantrasyonları .....	25
4.5.: İncelenen deney grupları. ....	27
5.1. Asidofilus sütünün mikrobiyolojik sayım sonuçları ve pH değerleri.....	36
5.6.1. Farelerin Tartımlarının Ortalamaları. ....	43
5.6.5: Dalak hücreleri içindeki toplam T ve CD8+ T hücrelerinin yüzdeleri.....	51



## 1. GİRİŞ

Kanser hastalığı, kontrolden çıkan hücrelerin sürekli olarak çoğalması sonucu oluşmaktadır. Kanser oluşumunda X ışınları, ultraviyole ışınlar gibi fiziksel ve 3-metilkolantren, benz-alfa-piren gibi kimyasal faktörlerin dışında onkojenik virüslerin de rolü vardır. Dünya’da en çok tanı konulan kanserler akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) iken kanser kaynaklı ölümlerin en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mide (%8,8) kanserlerinden gerçekleştiği belirtilmiştir (Anon, 2017). Gelişmiş ülkelerde, ölüm nedenlerine göre bir sıralama yapıldığında kanser ikinci sırada yer almaktadır. Popülasyon yaşlarının artışı, fiziksel aktivite oranının azalması, sigara gibi zararlı alışkanlar ve beslenme tarzlarının da değişmesi gibi birçok nedenle yüksek olan kanser oranı giderek daha da yükselmektedir (Jemal et al., 2011). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığının 2014 yılında yayınladığı Dünya Kanser Raporu’nda, toplanan verilerden yola çıkarak, 20 yıl sonrasında tespit edilecek kanser vakaların sayısının 22 milyon olacağı ve bu süreçte kanser kaynaklı ölümlerin sayısının ise 13 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Anon, 2013).

İnsan vücudunda saniyede milyarlarca hücre çoğalmakta ve bu hücrelerin yüzlercesi hücre aşamasına gelmeden elimine edilmektedir. Bu farklı hücrelerin elimine edilmesinde hücrel immün yanıt mekanizması rol almaktadır (Özbal, 2000). İmmün yanıtın bazı bileşenler ile modüle edilerek çeşitli hastalıkların tedavi edilmesi immünoterapi olarak adlandırılmaktadır. Daha kapsamlı olarak immünoterapi, bir hastalığın immün yanıtları artıran veya azaltan terapötik ajanlarla tedavisidir. Örneğin aşılara ilave edilen adjuvant maddeler uyarıcı etkiye sahip iken, doku transplantasyonları sırasında uygulanan bazı immünosupressif ilaçlar immün sistemin tüm antijenlerine karşı bir süre tepki göstermemesini sağlamaktadır (Arda vd., 1998). Bu prensip ile kanser immünoterapisine yönelik çalışılmakta olan pek çok yeni strateji, konağın kendi immün yanıtının tümör hücrelerine karşı güçlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Buna göre kanser immünoterapisi; tümör antijenlerine karşı aktif immün yanıtların artırılması veya anti-tümör antikörlerin veya T hücrelerinin pasif bağışıklık oluşturmak amacıyla uygulanmasını içermektedir. İmmün yanıtların son derece spesifik olması nedeniyle, tümöre özel bağışıklığın, hastaya zarar vermeden seçici olarak tümörü

yok etmede kullanılabileceği uzun zamandır ümit edilmektedir. İmmünoterapi hala tümör immünologlarının ana hedefidir ve bu tedaviye yönelik pek çok yaklaşım, deney hayvanlarında ve insanlar üzerinde denenmektedir (Abbas vd., 2015). Günümüzde çeşitli bileşenler ve/veya mikroorganizmalar kullanılarak kanser tedavisinde immünolojik yaklaşımlar üzerinde dikkat çekici çalışmalar yapılmaktadır. Devam eden yıllarda, yüksek miktarlarda biyolojik ajanın üretimini sağlamayı mümkün kılan, rekombinant DNA teknolojisi gibi biyoteknoloji üzerine yapılan keşifler ise, immünoterapinin de bir kanser tedavisi olarak kullanımını mümkün kılmıştır (Muehlbauer vd., 2006).

Tüketicilerin sağlıklı beslenme arayışının artması ile probiyotik ürünlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Artan bu ilgi ve ihtiyacın etkisi ile probiyotik ürünlerin çeşitliliği zenginleşmektedir. Probiyotiklerin konağın sağlığına direkt etki göstermesinin yanı sıra, çeşitli çalışmalar immünomodülatör etkisi, intestinal mikrobiyotayı düzenleme, anti-enflamatuar ve anti-patojenik aktiviteleri gibi fonksiyonları sayesinde tümör oluşumunu azaltma ve böylece kanser önleme ve/veya tedavisinde potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Yu and Li, 2016). Araştırmacılar probiyotiklerin kolon kanserine sebep olabilecek mutajenlerin kolonda emilimini azalttığı, aktif karsinojen oluşumuna sebep olan bazı enzimlerin (glikosidaz,  $\beta$ -glükuronidaz, azoredüktaz, nitroredüktaz) fekal konsantrasyonlarını azalttığını bulmuşlardır. *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* destekli beslenme ile konağın bu etkiden korunabildiği ifade edilmiştir (Brown and Valiere, 2004). Ayrıca laktik asit bakterileri immün sistemde görev alan hücrelerin ve onların ürünlerinin olgunlaşmasını etkileyerek tümör oluşumunun inhibe edilmesini sağlamaktadır (Yu and Li, 2016). Prokarsinojenleri karsinojenlere dönüştüren bakterilere karşı gösterdikleri antagonistik etki mekanizmasının, probiyotiklerin anti-tümör etkisinin temel yapısını oluşturduğu düşünülmektedir (Kailasapathy and Chin, 2000). Literatürdeki çalışmalarda probiyotiklerin antikanser etkilerinin deneysel olarak modellerinin incelenmesi ve mekanizmalarının detaylandırılabilmesi adına *in vivo* ortamda fare ve sıçanlar kullanılmıştır. Çoğu çalışmanın çıktıları teşvik edici olmuş ve klinik uygulamalara potansiyel olarak kullanılabilirliği uygun görülmüştür (Yu and Li, 2016). Probiyotik süt ürünlerden biri olan asidofilus

sütünün, farklı kanser modellemeleri ile yapılan çalışmalarda umut vadeci etkileri olduğu tespit edilmiştir.

Günümüzde tüketicilerin daha çok doğal gıda ve gıda takviyelerine olan yönelimi bilimsel araştırmalara farklı yönlerde ivme kazandırmış ve yöresel, doğal ürünlerin immünoterapide kullanım potansiyelleri araştırılmaya başlanmıştır. Bu bağlamda antik çağlardan itibaren farklı amaçlarla kullanılan bir arı ürünü olan propolis birçok araştırmanın odak noktası olmuştur. Propolis arılar tarafından bitki tomurcuklarından toplanan ve arıların enzimleri ile değişime uğrayan reçineli doğal bir materyaldir. Rengi yeşilden kırmızıya hatta koyu kahverengiye kadar değişim gösterebilmektedir. Propolisin kendine özgü bir kokusu vardır ve yapışkan bir dokuya sahiptir. İklim ve bölgelere göre büyük farklılıklar gösterebilen propolisin yapısı genellikle %30 mum, %50 reçine ve sebze balsamı, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve diğer bileşenlerden oluşmaktadır (Burdock, 1998).

Bu tez çalışmasında Karadeniz bölgesinde üretilen su bazlı propolis ekstraktının ve *L.acidophilus* LA-5 suşu ile üretilen asidofilus sütünün fare meme kanseri (4T1) modeli kullanılarak meme kanseri tedavisindeki kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1 Kanser ve Meme Kanseri

Gelişmiş ülkelerde, ölüm nedenlerine göre bir sıralama yapıldığında kanser ikinci sırada yer almaktadır. Özellikle gelişmiş ülkelerde, popülasyon yaşlarının artışı, fiziksel aktivite oranının azalması, sigara gibi zararlı alışkanlar ve beslenme tarzlarının da değişmesi gibi birçok nedenle yüksek olan kanser oranı giderek daha da yükselmektedir (Jemal et al., 2011). Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kanser vakalarının yaklaşık %20'sinin obezite, yetersiz beslenme, alkollü içeceklerin fazla tüketimi, yetersiz fiziksel aktivite gibi etmenlerden kaynaklanmaktadır (Sauer et al., 2017). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığının 2014 yılında yayınladığı Dünya Kanser Raporu'nda, toplanan verilerden yola çıkarak, 20 yıl sonrasında tespit edilecek kanser vakaların sayısının 22 milyon olacağı ve bu süreçte kanser kaynaklı ölümlerin sayısının ise 13 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Uluslararası Kanser Ajansı özellikle teşhis edilen meme kanseri vakalarının artışına dikkat çekmiştir ve meme kanser insidansının kadınlarda bir önceki tahminlere göre %20 arttığını, meme kanserinden kaynaklanan ölümlerin ise %14 arttığını belirtmiştir. Meme kanseri kadınlarda tanısı konulan ve en fazla ölüme neden olan kanserdir. Dünyada kanser olan her 4 kadından birinin meme kanserine yakalandığı bilinmektedir (Anon, 2017).

Kanser taramaları kanser sebebiyle gerçekleşen ölümlerin azalmasını sağlamaktadır. Kanseri taramaların yaygınlaşması ve artırılması ile oluşmakta olan kanser erken teşhis edilebilmekte veya kanser öncesinde oluşan dokuların hastadan erkenden alınması ile kanserin önlenmesi mümkün olmaktadır. Bu kapsamda ABD'de düzenli olarak mamografi uygulaması yaptıran kadınların oranı 1987'den 2000'li yıllara dek %70 oranında artmıştır (Sauer, 2017). Kanseri tedavileri öncelikli olarak ilaç, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler ile sağlanmaktadır. Hastalığın seviyesi ve hastanın durumuna göre kanserli doku cerrahi operasyonlarla alınabilmektedir. Ancak bu tedavi yöntemlerine ek olarak

spesifik olarak hastanın kendi immün sistem hücrelerinin hastada gelişen tümör hücrelerini yok edecek şekilde stimüle edilmesini sağlayan yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Bu tedaviler kapsamında hastanın vücudundaki immün sistem hücreleri stimüle edilebilmekte veya hastanın kanından alınıp laboratuvar ortamında gerekli yapısal değişiklikler sağlanıp hastaya tekrar verilebilmektedir (Abbas et al., 2015).

Transplantasyonu yapılabilen 4T1 fare meme kanseri hücre hattı Fred Miller ve çalışma arkadaşları tarafından izole edilmiştir (Dexter et al., 1978; Aslakson and Miller, 1992). Balb/c farelere enjekte edildiğinde 4T1 hücreleri kendiliğinden oldukça metastatik tümörler oluşturabilmektedir. Asıl tümör oluşumu enjeksiyonun yapıldığı yerde gerçekleşirken metastaz; akciğer, karaciğer, lenf düğümleri ve beyinde gerçekleşmektedir (Anon, 2016a).

## 2.2 İmmünoloji ve Kanser İmmünoterapisi

İmmünite doğal ve adaptif olarak iki ana başlıkta incelenmektedir. Yapısal ve genetik özelliklerine göre canlılarda doğal olarak çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Doğal immünitelerde deri ve mukozaların anatomik yapısı, mukozaların mukus salgısı, solunum sistemindeki silli epitel hücrelerinin dışarıya yönelik hareketi, bağırsağın peristaltik hareketi gibi birçok savunma mekanizması mevcuttur. Bu mekanik savunma mekanizmalarının yanı sıra doğal immünitinin hücresel boyutu da mevcuttur. Doğal immünitinin immün hücreleri nötrofiller, dendritik hücreler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücrelerdir (NK). Mikroorganizma ve ürünlerinin konakla direkt ilişki kurmasıyla veya yapay yollarla patojenlere ait antijenlerin konağa verilmesi ile kazanılan immünite ise adaptif immünitedir. Adaptif immünitinin immün hücreleri ise T ve B lenfositlerdir (Arda vd., 1998; Özbal, 2000; Abbas vd., 2015). T lenfositler, hücresel tip immün cevapta etkili olan timüs kontrolünde farklılaşmaktadır. B lenfositlerin olgunlaşmasını sağlayan lenfoid organlar ise memelilerde doğumdan önce dalak ve karaciğer, doğumdan sonra ise mide-bağırsak sistemi mukoza altı lenfoid dokular (tonsiller, appendiks, peyer plakları) ile kemik iliğidir (Arda vd., 1998; Özbal, 2000).

İmmün sistem ise lenfoid organların ve immün cevabın oluşturulmasında görev alan hücrelerin tümünü ifade etmektedir. İmmün sistem yanıt mekanizmasına göre humoral (sıvısal) ve hücrel olarak ikiye ayrılmaktadır. Antijeni spesifik olarak tanıyan ve ortadan kaldırılmasını sağlayan, B lenfositlerin plazma hücrelerine farklılaşarak salgıladıkları antikolar sayesinde ortaya çıkan immün yanıt humoral immünite; antijeni spesifik olarak tanıyan T lenfositler sayesinde oluşan immün yanıt ise hücrel immünitedir (Muehlbauer vd., 2006; Mayer and Nyland, 2016).

Doğal immüntenin hücrel komponentlerinden olan nötrofiller akut inflamatuvar etkilerin çoğunda inflamasyon bölgesine ilk ulaşan ve vücuda giren patojen mikroorganizmalarla ilk karşılaşan hücrelerdir. Yüzeyindeki çeşitli reseptörlerle yabancı mikroorganizmalara bağlanıp fagosite ederler. Fagositoz mekanizmasında büyük molekül yapıllı maddeler, ölü hücreler ve yabancı mikroorganizmalar bir miktar hücre zarı ile birlikte hücre içine alınmaktadır. Doğal immüntenin diğeri bir hücrel bileşeni olan dendritik hücreler ise immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynayan ve beyin, testis ve göz haricinde tüm dokularda bulunan antijen eksprese eden hücrelerdir. İmmatür karakterdeyken antijeni yakalama ve işleme tabi tutma özelliği olan dendritik hücrelerin uyarılar sayesinde olgunlaşma süreci ilerledikçe, T hücre uyarımı yapabilmektedir. Dendritik hücreler bu görevlerine ek olarak B hücrelerinin fonksiyonlarının oluşumunda etkili oldukları için humoral immüntenin gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar. Bir diğeri doğal immünite hücrel komponenti ise makrofajlardır. Makrofajlar bağ dokuda, karaciğerde, akciğerde, sinir sisteminde, seröz boşluklarda, lenfoid organlarda, kemik ve eklemlerde bulunmaktadır. Makrofajlar 1 µm'den büyük molekülleri fagositoz yoluyla hücre içine alarak sindirebilmektedir ve bu özellikleri sayesinde makrofajlar çöpü hücreler olarak da adlandırılmıştır. NK hücreleri ve K hücreleri de doğal immünetinin bir parçası olarak görev yapmaktadırlar ve uyarıldıklarında hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan protein ve peptidlerin bir grubu olan sitokinleri salgılayarak veya yabancı mikroorganizmalara karşı sitotoksik etki göstererek hızlı bir immün yanıt oluşturmaktadırlar. NK hücreleri enfeksiyonlara karşı doğal immün yanıt oluşturmaya ek olarak, dendritik hücrelerle birlikte patojenlere karşı oluşan adaptif

immün yanıtı oluşturabilmektedirler (Özbal, 2000; Muehlbauer vd., 2006; Abbas vd., 2015).

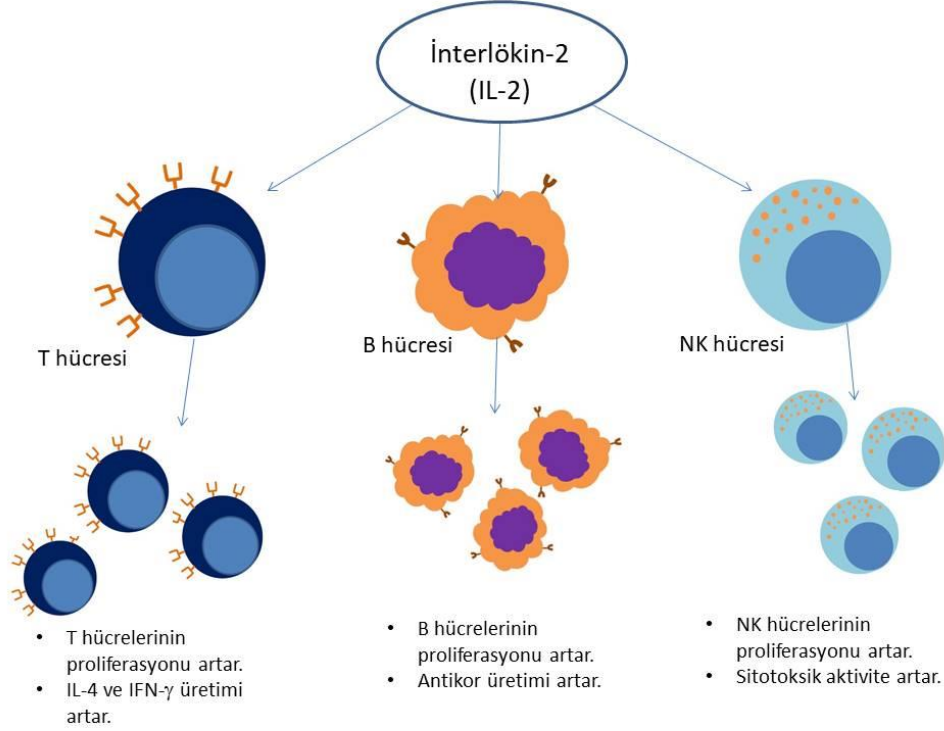
Doğal immünitinin hücresel komponentleri olduğu gibi adaptif immünitede de B ve T lenfositleri mevcuttur. B lenfositleri yabancı antijenleri tanıyarak çeşitli antikoları salgılayıp patojen mikroorganizmaları etkisiz hale getirebilmekte veya fagositik hücreleri aktive edebilmektedir. Kandaki toplam B lenfosit sayısı  $3 \times 10^8/L$ 'dir. B lenfositlerinin diğer lenfositlerden en önemli farkı membranında immünooglobulin reseptörleri taşımalarıdır ve bu reseptörlerin çok sayıda olması nedeniyle yüzey görünümüleri T lenfositlerin aksine pütürlüdür (Arda vd., 1998; Özbal, 2000). Diğer bir lenfosit grubu olan T lenfositler ise fonksiyonlarına göre indükleyici, aktivatör, baskılayıcı ve sitotoksik olarak dörde ayrılmaktadır. Kan dolaşımındaki lenfositlerin %70-80'i T lenfositlerdir. T lenfositlerinin yüzeylerindeki reseptörler sayesinde gruplandırılmaları ve adlandırılmaları mümkün olmaktadır. Bu adlandırma çeşitli CD (farklılaşma yığılım molekülleri) antikoları taşımaları ile yapılmaktadır. CD4 T hücreleri (yardımcı) ve CD8 T hücreleri (sitotoksik) T lenfositlerin ana alt gruplarını oluşturmaktadırlar (Şengül, 2008). CD4 reseptörlü yardımcı T lenfositlerin kandaki sayısının  $0,5-1,6 \times 10^9/L$ , CD8 reseptörlü sitotoksik T lenfositlerin sayısının  $0,3-0,9 \times 10^9/L$  olduğu bilinmektedir (Arda vd., 1998; Özbal, 2000).

Enflamasyon ve immünolojik olaylar sırasında bazı immün sistem hücreleri tarafından sitokin adı verilen hormon benzeri polipeptid moleküller sentezlenmektedir. Sitokinler immün sistem hücrelerinin aktivitelerine yön veren ve hücreler arasında iletişimi sağlayan küçük protein yapıdaki birimlerdir. İnterferon gama ( $IFN-\gamma$ ), interlökin 2 ( $IL-2$ ), tümör nekroz faktörü alfa ( $TNF-\alpha$ ) ve tümör gelişme faktörü beta ( $TGF-\beta$ ) gibi sitokinler konağın antijenlere karşı reaksiyonlarını, lökosit ve bazı hücrelerin gelişmesini, hareketini, farklılaşmasını sağlayan immünomodülatör moleküllerdir. Çizelge 2.2'de bazı sitokinlerin kaynağı ve aktivitesi gösterilmiştir.

Çizelge 2.2: Bazı sitokinleri üreten hücreler ve bu sitokinlerin etkileri.

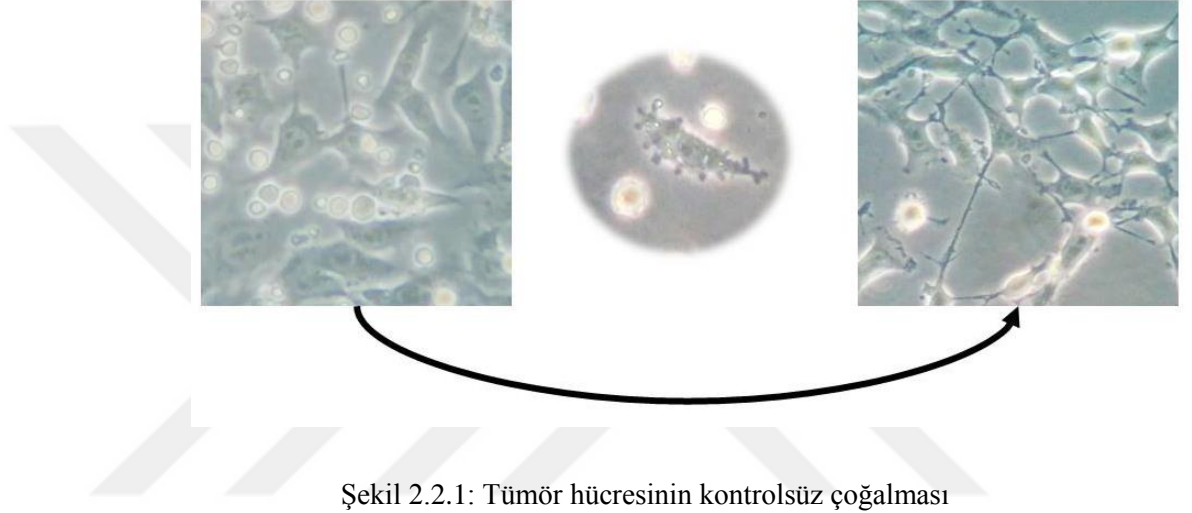
Sitokin	Kaynak hücre/hücreler	Etki	Kaynak
IL-1 $\alpha$ , $\beta$	Makrofaj, T ve B lenfositleri	İmmünette artış, T lenfositlerinde farklılaşma	Özbal, 2000
IL-2	T lenfositleri	T, B ve NK hücrelerinde farklılaşma	
IL-4	T lenfositleri	T ve B lenfosit farklılaşma	Abbas vd., 2015
IL-9	T lenfositleri	T lenfositlerinde proliferasyon	
IFN- $\gamma$	T lenfositleri, NK hücreleri	İmmünomodülatör etki	Özbal, 2000
TNF- $\alpha$	T lenfositleri	Enflamasyon, tümörisidal etki	
TNF- $\beta$	T lenfositleri	Tümörisidal etki	
TGF- $\beta$	T lenfositleri, makrofajlar	İmmünosüpresyon	

İmmün sistem hücrelerinin aktivitesini artıran sitokinlerden biri IL-2'dir. IL-2'nin T, B ve NK hücrelerini uyararak bu hücrelerin proliferasyonlarında artış sağlamaktadır. Şekil 2.2'de IL-2'nin T, B ve NK hücreleri üzerindeki etkisi şematik olarak gösterilmiştir.

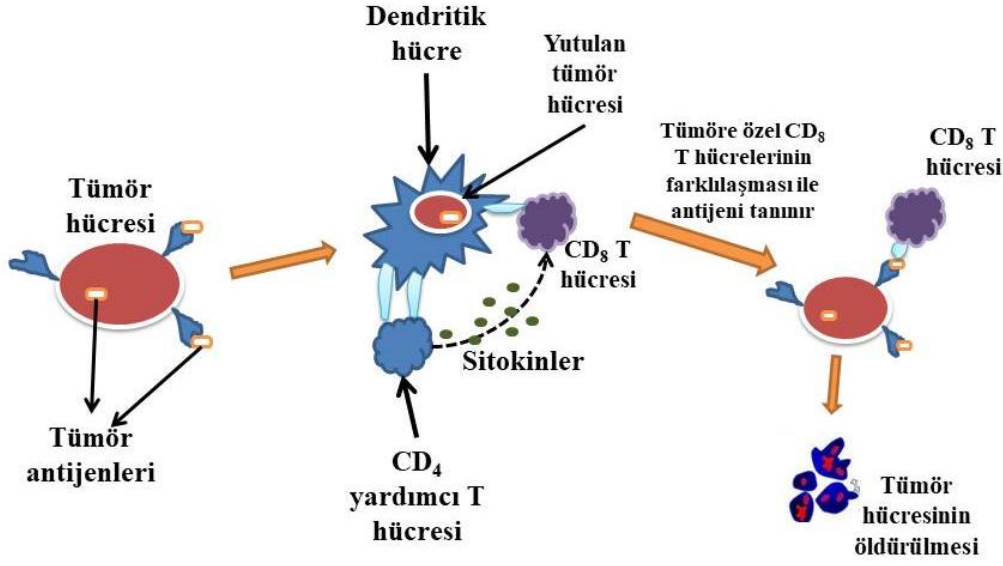


Şekil 2.2.: IL-2'nin T, B ve NK hücreleri üzerindeki etkisi

Kanser hastalığı, kontrolden çıkan hücrelerin sürekli olarak çoğalması sonucu oluşur. Kanser oluşumunda X ışınları, ultraviyole ışınları gibi fiziksel faktörler ile 3-metilkolantren, benz-alfa-piren gibi kimyasal faktörlerin dışında onkojenik virüslerin de rolü vardır. Bir sağlıklı hücrenin herhangi bir dış etken sonucu kontrolden çıkarak hızla büyümesiyle oluşan kanserli hücrede, normal hücrede bulunmayan doku antijenleri eksprese edilmektedir (Özbal, 2000; Abbas vd., 2015). Örnek bir kanser hücresi Şekil 2.2.1’de gösterildiği gibi apoptoza uğramadan çoğalmaya devam etmektedir.



Konağın immün sistemi yabancı doku antijenlerini kolayca tanınmasına rağmen tümör dokusunu organizmadan kolayca atamamaktadır. İnsanda saniyede milyarlarca hücre çoğalmakta ve bu hücrelerin yüzlercesi mutasyonla farklı hücre oluşturmaktadır. Bu farklı hücrelerin temizlenmesinde hücre immün yanıt mekanizması rol almaktadır. Tümör hücrelerinin gelişmesinin baskılanmasında yardımcı ve sitotoksik T hücreleri, NK ve K hücreleri sorumludur. Tümör antijenleri tarafından uyarılan T lenfositler çeşitli sitokinler salgılayarak sitotoksik T hücrelerini, makrofajları, B lenfositlerini, K ve NK hücrelerini aktive etmektedir. Uyarılan bu hücrelerin sentezlediği TNF- $\alpha$  tümör hücreleri için sitotoksik etki göstermektedir. Ayrıca T lenfositlerinin salgıladıkları INF- $\gamma$  ile uyarılan K ve NK hücreleri tümör hücrelerini öldürmektedir (Özbal, 2000). Tümör hücrelerine karşı immün yanıt şematik olarak Şekil 2.2.2’de gösterilmektedir.



Şekil 2.2.2: Sitotoksik T hücrelerinin hücreSEL immün yanıtın sonucunda tümör hücresini apoptoza sürüklemesi

Kemoterapi ve radyoterapinin, kanser tedavisinde oldukça etkili silahlar olduğu kanıtlanmıştır. Fakat günümüzde bu yöntemlerin kullanımı akut toksisiteler ve tümörlerin ilaç dirençli fenotipler oluşturma kabiliyeti veya radyasyon sonucu oluşan DNA hasarlarına karşı duyarlılıklarını yitirmesi gibi nedenlerle sınırlanmaktadır. Bunlara ek olarak, kanserle mücadelede en büyük sorunlardan biri olan geç teşhis konulması durumunda da başarı oranları oldukça düşüktür (Wang et al., 2014). Bu nedenle de her geçen gün, tedavi başarı oranlarını artıracak, immünoterapi gibi farklı tedavi yöntemlerinin önemi de daha çok ortaya çıkmaktadır (DeSantes et al., 2009). Kanser immünoterapisine yönelik çalışılmakta olan pek çok yeni stratejinin prensibi konağın kendi immün yanıtının tümör hücrelerine karşı güçlendirilmesine dayanmaktadır. Bu kapsamda farklı bitkisel, kimyasal ve biyokimyasal bileşenler üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Schenk, 2002; Abbas vd., 2015). Çeşitli hastalıkların tedavi edilmesi amacıyla kullanılan kimyasal immünomodülatör bileşenlere alternatifler geliştirmek amacıyla araştırmacılar bitkisel, mikrobiyal ve hayvansal bileşenler üzerinde yenilikçi çalışmalar yürütmektedir. Bu kapsamda birçok bitkisel kaynaklı bileşiğin *in vivo* ve *in vitro* olarak immünomodülatör etkileri araştırılmıştır (Jantan

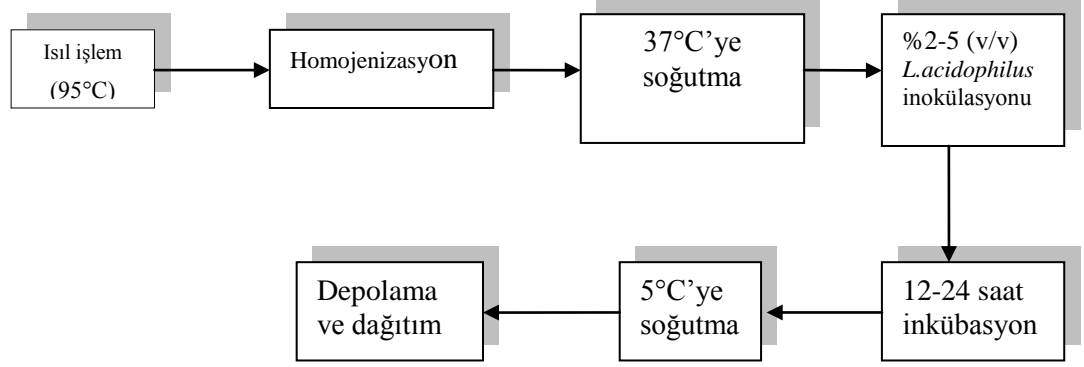
vd., 2015). İmmünoterapinin, kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemlerinin aksine, doğrudan kanser hücrelerini hedef alıyor olması, diğer sağlıklı vücut hücrelerine zarar vermemesi immünoterapinin bu alanda oldukça güçlü bir alternatif olmasını sağlamıştır (Barbaros ve Dikmen, 2015). Kanser immünoterapisine yönelik çalışılmakta olan pek çok yeni stratejinin prensibi konağın kendi immün yanıtının tümör hücrelerine karşı güçlendirilmesine dayanmaktadır (Abbas vd., 2015).

### 2.3 Probiyotikler ve Asidofilus Sütü

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından yapılan tanıma göre probiyotikler yeterli miktarda alındığında konakçı üzerinde sağlığa yararlı etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin gıdaların sindirimi, besin maddelerinin emilimi, immün sistemi düzenlemeleri gibi birçok bakımdan insan sağlığına olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Tannis, 2008). Doğal ve adaptif immün yanıtı güçlendirerek enfeksiyonlarla mücadeleye katkıda bulunmaktadır (Özden, 2013). Probiyotiklerin konağın sağlığına direkt etki göstermesinin yanı sıra, çeşitli çalışmalar immünomodülatör etkisi, intestinal mikrobiyotayı düzenleme, antienflamatuar ve antipatojenik aktivite gibi fonksiyonları sayesinde tümör oluşumunu azaltma ve böylece kanser önleme ve/veya tedavisinde potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Yu and Li, 2016). Probiyotiklerin sağlık etkileri bağırsak mikroflorasını modüle, antimikrobiyal bileşenler üreterek patojenlere karşı antagonistik etki göstermek, besinler ve büyüme faktörleri için patojenler ile rekabet etmek, immün sistem hücrelerini stimüle etmek gibi fonksiyonlar ile ilgilidir (Marteau et al., 2001). Prokarsinojenleri karsinojenlere dönüştüren bakterilere karşı gösterdikleri antagonistik etki mekanizmasının, probiyotiklerin antitümör etkisinin temel yapısını oluşturduğu düşünülmektedir (Kailasapathy ve Chin, 2000). Prebiyotikler, insanlarda sindirim enzimleri tarafından sindirilemeyen ve probiyotik bakterilerin aktivitesini seçici olarak zenginleştiren kısa zincirli karbonhidratlardır. Bağırsaklarda, prebiyotikler, kısa zincirli yağ asidi üretmek probiyotik bakteriler tarafından fermente edilirler. Prebiyotikler kanser riskinin azaltılması ve kalsiyum ve magnezyum absorpsiyonunun artırılması gibi kalın bağırsaklarda diğer birçok sağlık üzerine faydalı etkilere sahiptir (Özyurt ve

Ötleş, 2014). Probiyotik bakteriler gastrik sıvılara karşı dirençli olmalı, safra varlığında üreyip gelişebilmeli, gıda ürünü olarak tüketildiğinde mide ve safradan etkilenmeden hayatta kalarak bağırsakta tutunabilmelidir. Genellikle gram pozitif bakterilerdir ve *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine aittirler (Holzapel et al., 1998; Klein et al., 1998; FAO/WHO, 2006). Probiyotik gıda takviyeleri hayvan veya insan tüketimine uygun olacak şekilde halihazırda toz, tablet, kapsül veya sprey olarak piyasaya sunulmuştur (Parvez et al., 2006).

Asidofilus sütü, *Lactobacillaceae* familyasının *Lactobacillus* cinsine dahil olan *Lactobacillus acidophilus* türü starter kültürü kullanılarak üretilen bir çeşit fermente süt ürünüdür. Probiyotik ve termofilik bir starter kültür olan *L.acidophilus*, asidofilus sütü, biyo-yoğurt ve benzeri diğer fermente süt ürünleri üretiminde tek başına ya da diğer laktik kültürlerle birlikte kullanılmaktadır (Kılıç, 2001). *L.acidophilus* sütte yavaş gelişmekte ve asetat, nikotinic asit ve riboflavin gibi maddelere gereksinim duymaktadır (Akın, 2006). Yaygın (1999), olumlu sağlık etkilerinin görülebilmesi için asidofilus sütünün günde 0,5 ile 1 litre kadar içilmesi gerektiğini belirtmiştir. Günümüzdeki tüketim alışkanlıkları ve tüketici isteklerine uygun olarak üretilen asidofilus sütleri fermente edilen ve fermente edilmeyen (Sweet) ürünler olarak ikiye ayrılmıştır. Fermente edilmeden üretilen asidofilus sütleri yapımında saf kültür, sütün sıcaklığı 5°C'ye düşürüldükten sonra süte eklenmekte ve bu şekilde depolanmaktadır. Fermente asidofilus sütü üretiminde ise öncelikle çiğ süt 95°C'de ısıl işleminden geçirilip, homojenize edilmektedir. Starter kültür inokülasyonuna hazırlamak amacıyla sütün sıcaklığı 37°C'ye düşürülür ve %2-5 (v/v) oranında starter kültür eklenmesinin ardından süt 12-24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmektedir. Ürün oluştuktan sonra 4-5°C'de depolanmaktadır. Örnek bir fermente asidofilus sütü üretim şeması Şekil 2.3'te gösterildiği gibidir. Asidofilus sütlerinin tüketici tarafından beğenilirliğinin artırılması amacıyla çeşitli aromalandırma çalışmaları yapılmaya devam etmektedir (Akpınar, 2008).



Şekil 2.3. Asidofilus sütü üretim şeması

## 2.4 Propolis

Propolis Türk Standartları Enstitüsü tarafından İşçi arıların, kovan içerisindeki besinleri, yavru arıları ve kendilerini çeşitli patojen mikroorganizmalardan (virüs, bakteri, fungus) korumak amacıyla bitkilerin yaprak, gövde, tomurcuk vb. kısımlarından topladığı reçinemsi maddeleri ve bitki nektarlarını, başlarında yer alan salgı bezlerinden salgılanan enzimler ile biyokimyasal değişikliğe uğratarak oluşturdukları, ‘arı tutkalı’ olarak da adlandırılan ürün olarak tanımlanmıştır (TSE, 2003).

Bal arıları topladıkları propolisi ağızlarında nemlendirip yumuşatarak ve aynı zamanda bazı enzimler ekleyerek propolisi pelet haline getirir ve peleti ön bacaklarını kullanarak arka bacaklarındaki polen sepetine aktarırlar (Doğan ve Hayoğlu, 2012). Polen sepeti propolis ile doldurulduğunda kovana taşınmaktadır. Propolis genç işçi arılar tarafından 25-30 dakikada boşaltılmaktadır (Pehlivan vd., 2012). Ortalama propolis üretimi her yıl, her koloni için 10 gramdan 300 grama kadar değişebilmektedir. Fakat yine de bu miktar arılara, iklime, bitki çeşitliliğine ve tuzaklama mekanizmalarına bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir (Doğan ve Hayoğlu, 2012).

Çoğunlukla flavonoidleri içeren fenolikler, toplam propolis ağırlığının %50’sinden fazlasını oluşturmaktadır (Kasote vd., 2014). Propoliste B1, B2, B6, A, C, E ve niasin gibi vitaminler bulunmaktadır. Vitaminlerden farklı olarak süksinik dehidrogenaz, glukoz-6-fosfataz, adenzin trifosfotaz ve asit fosfotaz

gibi enzimler de içermektedir (Castaldo and Capasso, 2012; Doğan ve Hayoğlu, 2012).

Farklı ekstraksiyon metotları propolisin çeşitli biyolojik etkilerinin aktivitesinde farklılıklara neden olmaktadır. Her bir farklı solvent, belirli bileşenlerin çözünmesini ve ekstraksiyonunu sağlamaktadır (Sforcin, 2007). Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile propolisin 300'den fazla bileşeni tanımlanmıştır ancak propolisin kimyasal kompozisyonu oldukça karmaşıktır. Üstelik bu kompozisyon propolisin toplandığı bitki kaynağına, mevsime, yerel floraya göre farklılıklar göstermektedir. Değişken kimyasal yapısı propolisin medikal kullanım için standardizasyonunda sorun teşkil etmektedir (Ghisalberti 1979; De Castro, 2001). Propolis farklı ülkelerde farklı statülere sahiptir. Almanya, İsviçre gibi bazı Avrupa ülkelerinde ilaç olarak kabul edilirken diğer birçok ülkede gıda takviyesi olarak adlandırılmaktadır (Atayoğlu, 2012).

Propolisin en çok kullanılan formu olan etanol ekstraktının (EEP) kuru ağırlığının %50'sinden fazlasını fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Bu %50'lik paya en az 4 çeşit kafeik asit esteri (kafeik asit benzil ester, salisilik asit benzil ester, sinnamik asit benzil ester ve kafeik asit fenetil ester [CAPE]) dahildir (Hepşen vd., 1996). Sinnamik alkol, sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kaffeik asit ve ferulik asit propoliste bulunan bazı önemli fenolik maddelerdir (Yılmaz vd., 2004). 1995 yılında yapılan bir çalışmada ham propolis örneklerinde bazı önemli bileşenlerin miktarları Çizelge 2.4'te gösterilmiştir (Markham et al., 1995).

Çizelge 2.4: Ham propolisteki bazı önemli bileşenlerin miktarları (Markham et al., 1995).

<b>İçerik</b>	<b>Propolisteki Miktarı (mg/g)</b>
3-1-dimetiloksisinamik asit	3,84
Kuersetin	0,25
Kafeik asit	2,34

Propolisin rengi, reçinenin kaynağına bağlı olarak açık sarıdan koyu kahverengiye kadar değişebilir. Propolis, 25-45°C sıcaklıklarda yumuşak, esnek ve oldukça yapışkan bir maddedir. 15°C'den az sıcaklıklarda kısmen donmuş veya donmaya yakın halde olup, sert ve kırılğan haldedir. 45°C'nin üzerinde ise yapışkanlığı artar ve 60-70°C'sıvı hale geçmektedir. Fakat bazı örneklerde erime noktası 100°C'yi bulabilmektedir (Krell, 1996). Kumova vd. (2002), propolis içerisinde bulunan bileşik gruplarını belirtmiştir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5: Propoliste bulunan bileşik grupları (Kumova vd., 2002)

Bileşenler			
1	Flavonoidler	10	Alkoller, ketonlar ve fenoller
2	Hidroksiflavonlar	11	Heteroaromatik bileşikler
3	Hidroksiflavononlar	12	Terpen ve sekuterpenler ve türevleri
4	Kalkonlar	13	Alifatik hidrokarbonlar
5	Benzoik asit ve türevleri	14	Sekuterpen ve triterpen hidrokarbonlar
6	Asitler	15	Steroller ve steroid hidrokarbonlar
7	Esterler	16	Mineraller
8	Benzaldehit türevleri	17	Şeker
9	Sinnamil ve sinnamik asit ile türevleri	18	Amino asitler

Gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve ince tabaka kromatografisi (TLC) analizleri ile Brezilya'dan toplanan propolis örneklerinin içerikleri belirlendiğinde, ana bileşenlerinin fenolik bileşikler (flavonoidler, aromatik asitler ve benzo[*a*]pirenler), diterpenler ve triterpenler, esansiyel yağlar olduğu belirlenmiştir. Flavonoidlerin (kaemferol, 5,6,7-trihidroksi-3,4'-dimetoksi flavon, aromadendrin-4'-metil eter) bu propolis örneğinde az miktarda belirtilmiştir (Boudourova-Krasteva et al., 1997). Çeşitli kaynaklara sahip propolislerin farklı kimyasal yapıda olması, bu propolis örneklerinin biyolojik özelliklerinin benzersiz olabileceği öngörüsünü yaratmaktadır (Bankova, 2005). Avrupa'ya özgü propolislerde antibakteriyal ve fungal aktivitenin flavononlar, flavonlar, fenolik asitler ve onların esterlerinden ileri gelirken, Brezilya'ya özgü propolislerde ise bu aktiviteler prenilenmiş p-

kumarik asitler ve diterpenler sayesinde görülmektedir. Dolayısıyla propolisin genel bir kimyasal standardizasyonu mümkün olamamaktadır (Sforcin, 2007).

Propolisin akut ve kronik toksisitesiyle ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. İki yüz ve 5000 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozlarındaki propolis uygulaması deney hayvanlarında toksik ölümlere sebep olmamıştır ve gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra insanlar için toksik etki yaratmayan güvenli dozun 1,4 mg/kg vücut ağırlığı olduğu bildirilmiştir. Burdock (1998), propolisin farelerdeki LD<sub>50</sub> değerinin 2-7,3 g/kg arasında değiştiğini belirtmiştir ve 90 fare ile yapılan denemeler ile propolisin NOAEL değerini (Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz) 1400 mg/kg vücut ağırlığı/gün olduğunu bildirmiştir. Propolisin insanlar üzerindeki bazı etkilerini incelemek amacıyla yapılan bir araştırmada 30 gün boyunca sağlıklı gönüllülere propolisin etanol ekstraktı içirilmiş ve vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği süperoksidaz dismutaz enzimi aktivitesi, toplam kolesterol, yüksek ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol, trigliseritler, glukoz, ürik asit, ferritin ve transferrin, plazmadaki malondialdehit konsantrasyonu gibi bazı kan parametreleri değerlendirilmiştir. Günlük propolis alınımının etkilerinin cinsiyete göre farklılık gösterdiği görülmüştür. İlk 15 günde erkeklerin %23,2'sinde malondialdehit konsantrasyonunun düştüğü ve 30. günde kadınların %20,9'unda süperoksidaz dismutaz enzimi aktivitesinin arttığı görülmüştür. Ancak propolis uygulamasının deneme kapsamında ölçülen kan değerlerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı belirtilmiştir (Jasprica et al., 2007).

Tüm olumlu özellikleri yanı sıra propolisin bazı bireylerde alerjik tepki oluşturabildiği bilinmektedir. Hausen'in araştırmasında propolis ile temas sonucu oluşan alerjinin sebebinin 4 çeşit kafeat olduğunu bildirmiştir. Bunlar fenil etil kafeat, benzil kafeat, 3-metil-2-bütenil kafeat ve geranil kafeattır (Hausen, 2005). Propolisin alerjik etkilerinin azaltılması amacıyla 2012 yılında İtalya'da yapılan bir çalışmada ham propoliste ve etanol bazlı propoliste bulunan, bazı kişilerde alerjik etkilere sebep olan kafeat esterlerinin laktik asit bakterilerinin kullanıldığı biyotransformasyon yöntemi ile giderilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemin prensibi ise propolisin *Lactobacillus helveticus*'un 'sinnamol esterase' aktivitesinden yararlanılarak alerjenik moleküllerin biyotransformasyon yolu ile azaltılmasına

dayanmaktadır. Propolise uygulanan bu işlemin propolisin flavonoid içeriğini ve antimikrobiyal aktivitesini etkilemediği bildirilmiştir (Gardana et al., 2012).

Ham propolisin çeşitli solventler ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen aktif bileşenlerin konsantrasyonları farklı olmaktadır. Etanol ile yapılan ekstraksiyon işlemleri sonucunda ham propolisin içeriğindeki flavonoidlerin çoğunluğu elde edilebilmektedir. Alerjik tepkimelere sebep olabildiği bilinen bu flavonoidlerin su ile yapılan ekstraksiyonlarda daha az ekstrakte edildiği bilinmektedir. Bunun yanında propolisin anti kanser etkilerinin incelendiği çalışmalarda, propolisin alkol ekstraktlarının kanser hücrelerinin gelişimi engelleyebildiği gibi, sağlıklı hücreleri de olumsuz yönde etkileyebildiği görülmüştür. Propolisin su bazlı ekstraktının ana bileşenleri kafeoilkinik asit ve sinnamik asit türevleridir. Su bazlı ekstrakt formunda hazırlanan propolisin flavonoid içeriğince etanol ekstraktından daha zayıf olduğu bildirilmiştir (Nakajima ve ark., 2007).

Bu tez çalışmasında Karadeniz bölgesinde üretilen su bazlı propolis ekstraktının ve *L.acidophilus* LA-5 suşu ile üretilen asidofilus sütünün fare meme kanseri (4T1) modeli kullanılarak meme kanseri tedavisindeki kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL

#### 3.1 Çalışmada kullanılan kültürler

Araştırmada kullanılan *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Christian Hansen, Danimarka) kültürü Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Kültür çalışma öncesinde De Man, Rogosa Sharpe (MRS, Merck 110661, Almanya, pH: 5,7 ± 0,2) sıvı besiyerinde %25 gliserol çözeltisinde -20°C'de saklanmıştır. Bakterilerin alt kültürleri De Man, Rogosa Sharpe (MRS, Merck 110661, Almanya, pH: 5,7 ± 0,2) sıvı besiyerinde hazırlanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 4T1 fare meme kanseri hücre hattı Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Stok hücre hattı çalışma öncesinde sıvı azot tankında %5 DMSO (Dimethyl sulfoxide, Merck 102952, Almanya) % 95 serum karışımı içerisinde saklanmıştır. Hücrelerin pasaj işlemleri Dulbeco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture [DMEM/F-12 (Gibco, 31330-038, ABD)] ortamı ile yapılmıştır.

#### 3.2 Süt Tozu, Süt, Propolis

Araştırmada Asidofilus sütü için starter kültür hazırlanmasında kullanılan yağsız süt tozu (Pınar Süt Mamulleri Sanayi A.Ş., İzmir) ile asidofilus sütü yapımında kullanılan yarım yağlı UHT süt (Arkadaşım Süt, Kipa, İzmir) marketlerden satın alınmıştır. Çalışmada organik propolisin su bazlı ekstraktı (PSE, Neptune İlaç San.ve Tic.Ltd.Şti., İzmir) kullanılmıştır.

#### 3.3 Besiyeri, Kitler ve Kimyasallar

*L. acidophilus* LA-5 alt kültürlerinin hazırlanmasında ve büyüme grafiği oluşturulmasında MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. *L. acidophilus* LA-5 sayımlarında MRSA kullanılmıştır. Mikrobiyolojik sayımlarda seri dilüsyonlar %0,1'lik peptonlu su (PS, Merck 107214, pH: 6,9) ile hazırlanmıştır. MRS sıvı

besiyerinin *L. acidophilus* LA-5'ten ayrılmasında fizyolojik su [% 0,85 NaCl (Merck 106404, Almanya)] kullanılmıştır.

4T1 hücrelerinin alt kültürlerinin hazırlanmasında DMEM/F-12 ortamı kullanılmıştır. Splenositlerin alt kültürlerinin hazırlanmasında Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI Medium 1640, Gibco, 21875-34, ABD) ortamı kullanılmıştır. Sitotoksikite denemelerinde MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Thermo Fisher, M6494, ABD] solüsyonu ve DMSO kullanılmıştır. Splenositlerin uyarılması için Concavalin A (Sigma-Aldrich, Almanya), Lipopolysaccharides (LPS, Sigma-Aldrich, Almanya) ve Phytohemagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. CD8+ sitotoksik T hücrelerinin yanıtının incelenmesi için Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences Cytofic/ Cytoperm Plus) kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında hücre sayımı ve hücre seyreltilmesi işlemlerinde PBS [Phosphate-Buffered Saline (Gibco, 10010023, ABD)], tripsinizasyon işleminde Trypsin EDTA (Gibco, 25200-056, ABD) kullanılmıştır.

Anestezik madde olarak Ketamin 50 mg/kg (Alfamine, Hollanda) dozunda kullanılmıştır.

#### 3.4 *In vivo* Çalışmada Kullanılan Fareler

*In vivo* çalışmada tümör fare modelinde kullanılmak üzere Balb/c ırkı 25 dişi fare Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden satın alınmıştır. Farelerin bakımı tez çalışması boyunca Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından yapılmıştır. Çalışma için 2016-067 onay numarası ile Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

## 4. METOT

### 4.1 *L.acidophilus* LA-5 Üreme Eğrisi

10 mL MRS sıvı besiyerine *L.acidophilus* LA-5 kültürü stok kültürden %2 oranında inokülasyon yapıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben geliştirilen kültürden 10 mL MRS sıvı besiyerine %2 oranında inokülasyon yapıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir ve ikinci alt kültür elde edilmiştir. İnkübasyon sonunda 10'ar mL MRS sıvı besiyeri içeren tüplere ikinci alt kültürden %2 oranında inokülasyon yapılmıştır. Mikrobiyolojik sayımlar 0., 6., 9., 12., 15., 24., 30., 48. ve 72. saatlerde yapılmıştır. Mikrobiyolojik sayımı yapılacak MRS sıvı besiyerindeki kültürlerden aseptik koşullarda 1'er mL örnek alınıp 9 mL peptonlu suya ilave edilerek ilk dilüsyon hazırlanmıştır. İlk dilüsyondan sonra seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan son dilüsyonlardan dökme plak yöntemine göre ekim yapılmıştır ve petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Muramalle and Aryana, 2011).

### 4.2 *Asidofilus* Sütü Üretimi

Tez çalışmasında kullanılacak olan *L.acidophilus* LA-5 kültürü stok kültürden 10 mL MRS sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edilmiştir. Gelişen kültürden 7 mL MRS sıvı besiyerine %2 inokülasyon yapıp 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Aktifleşen kültürler 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek (Hettich Rotofix II, Almanya) steril fizyolojik su ile yıkanmıştır. İki kez yıkama işlemi uygulanan kültüre son hacmine eşit olacak şekilde steril fizyolojik su eklenerek  $10^8$  kob/mL içeren hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan ön denemelerde kültürlerin süt tozuna inokülasyonunda %5 oranı uygulandığında, 24 saatlik inkübasyonda en verimli pH düşüşü ve bakteri gelişimi sağlanmıştır. Bu sebeple çalışma kültürü elde etmek amacıyla 10 dakika boyunca 115 °C'de steril edilmiş, 50 mL % 10' luk yağsız süt tozlarına elde edilen hücre süspansiyonundan %5 olacak şekilde inokülasyon yapıp 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Steril erlene aseptik olarak 600 mL yarım yağlı UHT süt eklenmiştir. Yarım yağlı süte %5 olacak şekilde çalışma kültürü inoküle edilip steril kavanozlara yaklaşık 100'er mL aseptik olarak bölünmüştür.

Örnekler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üretilen asidofilus sütü Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Asidofilus sütünün pH’sı fermentasyondan önce ve fermentasyon sonunda pH metre (NEL model:821) ile ölçülmüştür. İnkübasyonu takiben örnekler hayvan denemelerinde kullanılmak üzere +4 °C’de 14 gün muhafaza edilmiştir.



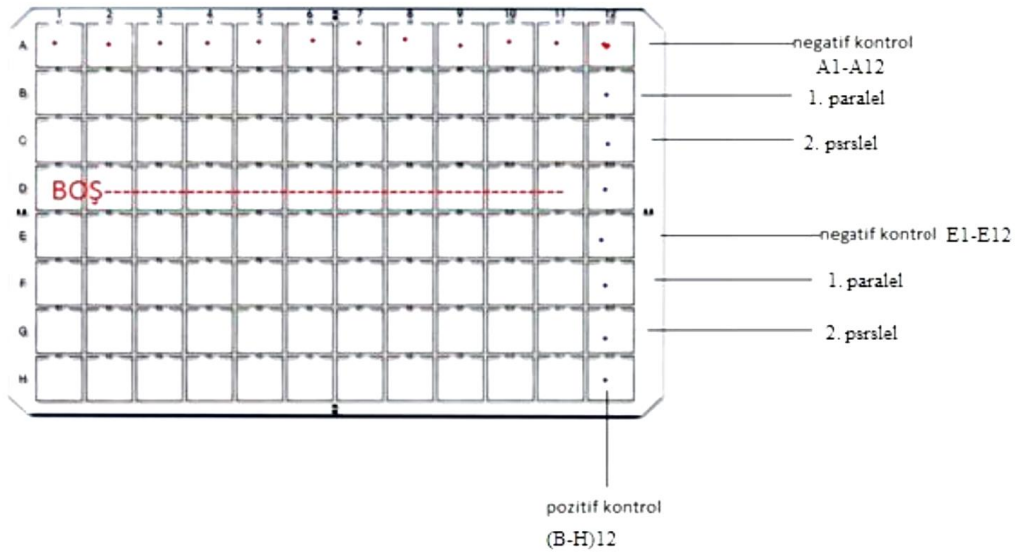
Şekil 4.2. Denemelerde kullanılmak üzere üretilen asidofilus sütü

#### 4.2.1. Asidofilus sütündeki *L.acidophilus* LA-5’in sayımı

Mikrobiyolojik sayımlar inokülasyondan hemen sonra (0. Saat), inkübasyon sonunda (24. saat), depolamanın 7. ve 14. günlerinde yapılmıştır. Mikrobiyolojik analiz yapılacak asidofilus sütü örneklerinden aseptik koşullarda 1’er mL örnek alınıp 9 mL PS’ye ilave edilerek ilk dilüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan seri dilüsyonlardan dökme plak yöntemine göre ekim yapıp petriyeler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Yazdi, 2010).

#### 4.3 PSE'nin *L.acidophilus* LA-5 Üzerine Antibakteriyal Etkisi

PSE'nin *L.acidophilus* LA-5 üzerine antibakteriyal etkisini incelemek amacıyla minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) testleri yapılmıştır. 7mL MRS sıvı besiyerine %2 oranında ekim yapılmış olup 37 °C'de 12 saat inkübe edilmiştir. Ekim işlemi ikinci defa aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen kültürler 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda süpernatant uzaklaştırılıp, peletin üzeri steril serum fizyolojik su ile aynı hacme tamamlanmıştır. Hücre süspansiyonunun Mcfarland değeri steril fizyolojik su kullanılarak 5,8'e ( $10^8$  kob/mL) ayarlanmıştır. PSE'nin MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerilerine uyularak (Anon, 2012) belirlenmiştir. Deneylede U tabanlı 96 kuyucuklu mikrodilüsyon plakları kullanılmıştır. MİK plakasına ait şablon Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. MİK testinde kullanılan steril plastik hücre büyüme kabı şablonu

Negatif kontrol satırının 2. kuyucuğundan başlayarak tüm kuyucuklara 100 µL MRS sıvı besiyeri eklenmiştir. Negatif kontrol için plakanın ilk satırının birinci kuyucuğuna 200 µL PSE eklenmiştir. Bu ekstraktan 100 µl alınıp 2. kuyucuğa aktararak ekstrakt 2 kat seyreltilmiştir (Çizelge 4.3). Bu işlem 12. kuyucuğa kadar gerçekleştirilerek 2 katlı seri dilüsyonlar elde edilmiştir. Daha sonra negatif kontrol satırındaki tüm kuyucuklara 100 µL fizyolojik su ilave

edilerek kuyucukların hacimleri 200 µL' ye tamamlanmıştır. Birinci paralel satırının ilk kuyucuğuna 200 µL su bazlı propolis ekstraktı eklendikten sonra 2. kuyucuktan başlanarak tüm kuyucuklara 100 µL MRS sıvı besiyeri eklenmiştir. 7. kuyucuk dahil olacak şekilde 2 katlı seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. 7. kuyucuktan alınan 100 µL karışım dışarı atılmıştır. 8. kuyucuğa ekstrakt eklenmeyerek pozitif kontrol kuyucuğu oluşturulmuştur. Birinci paralel satırındaki tüm kuyucuklara 100 µL bakteri kültürü ( $10^8$  kob/ml) ilave edilerek kuyucukların hacimleri 200 µL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan mikrodilüsyon plakları 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda üremeye bağlı bulanıklığın gözlenmediği son kuyucuk MİK değeri olarak belirlenmiştir (Akça vd., 2006).

Çizelge 4.3. MİK ve MBK testinde kullanılan kuyucuklardaki ekstrakt konsantrasyonları

Kuyucuk	Konsantrasyon (ppm)
1	5000
2	2500
3	1250
4	625
5	312,5
6	156,25
7	78,13

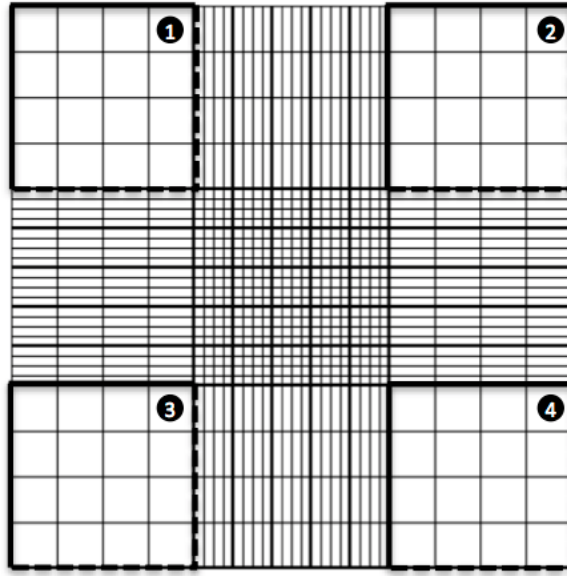
MBK değerini belirlemek için ise, her kuyucuktan MRS katı besiyeri içeren petrilere çizme plak yöntemine göre ekim yapıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda üremenin gözlenmediği son petrideki konsantrasyon MBK değeri olarak belirlenmiştir (Akça vd., 2006).

#### 4.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Sıvı azot tankında muhafaza edilen 4T1 hücreleri 37 °C'lik su banyosunda hızlıca çözündürülmüştür. 5 mL ortam (DMEM/F-12) ile stoktaki hücreler 15 mL'lik steril tüpe aktarılmıştır. Karıştırılıp 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant aspire edilip, hücreler 5 mL DMEM/F-12 ile süspansiyon edilerek 25'lik flaska alınıp 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler flaskın yüzeyini kapladığında pasajlanmıştır. Aktif olarak logaritmik fazda üreyen hücreler testlerde kullanılmıştır.

#### 4.4.1. PSE'nin 4T1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi

*In vivo* çalışmada kullanılacak PSE dozunun belirlenmesi için PSE'nin 4T1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi *in vitro* olarak MTT testi ile belirlenmiştir. Flasklarda çoğaltılan 4T1 hücrelerinin üzerindeki ortam aspire edilmiştir. Hücrelerin üzerine 0,5 mL Tripsin EDTA eklenip flaskın yüzeyi hafifçe yıkanıp eklenen Tripsin EDTA aspire edilmiştir. İkinci tripsinizasyon işlemi için hücrelerin üzerine 0,5 mL Tripsin EDTA eklenip 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler, üzerlerine 5 mL DMEM/F-12 eklenip pipetleme yapılarak 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Homojenize edilen hücre süspansiyonundan 100 µL alınıp içerisinde 900 µL PBS bulunan Eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Seyreltilmiş olan hücre süspansiyonundan 100 µL hemositometreye eklenip ışık mikroskobu ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımının yapıldığı numaralandırılmış alanların gösterildiği örnek bir şema Şekil 4.4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.4.1. Neu Bauer lamının şematik görüntüsü

Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda süpernatant aspire edilip peletin üzerine 5 mL DMEM/F-12 eklenmiştir. 96'lı steril plastik hücre büyüme kabına  $5 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde hücreler

ekilmiştir (Awale et al., 2008). Hücreler homojenize edilip 90'ar  $\mu\text{L}$  96'lı steril plastik hücre büyüme kabına eklenmiştir ve 24 saat 37 °C'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sitotoksiteleri test edilecek konsantrasyonlar DMEM/F-12 kullanılarak PSE'nin seyreltmeleri yapılarak elde edilmiş ve 96'lı steril plastik hücre büyüme kabına eklenmiştir. Bu konsantrasyonlar PSE'nin geniş konstantrasyon aralığındaki sitotoksik etkisinin görülebilmesi amacıyla hazırlanmıştır. Test edilen PSE'nin konsantrasyonları Çizelge 4.4.1'de gösterilmiştir. 96'lı steril plastik hücre büyüme kapları 48 saat 37 °C'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edilmiştir (Awale et al., 2008).

Çizelge 4.4.1. Sitotoksitite analizinde test edilen PSE'nin konsantrasyonları

Kuyucuk	Konsantrasyon ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	1000
2	520
3	500
4	260
5	100
6	50

İnkübasyon sonunda kuyucuklara 25  $\mu\text{L}$  MTT solüsyonu (2mg/mL) eklenip 5 saat daha inkübasyon (37 °C'de, %5  $\text{CO}_2$ ) yapılmıştır. Bu işlem sonunda solüsyon boşaltılmıştır ve her kuyucuğa 150  $\mu\text{L}$  DMSO eklenmiştir. Hafifçe karıştırılan steril plastik hücre büyüme kapları spektrometrede (Versamax Microplate Reader, ABD) 570-620 nm'de analiz edilmiştir (Mosmann, 1983). Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki formül ile 4T1 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır. 4T1 hücrelerinin yüzde canlılık verileri kullanılarak Graphpad Prism 7 programı ile PSE'nin 4T1 hücreleri için  $\text{IC}_{50}$  değeri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Absorbans değeri} \times 100}{\text{Kontrol absorbans değeri}}$$

Formüldeki absorbans değeri farklı konsantrasyonlarda PSE ile muamele edilen 4T1 hücrelerinin bulunduğu kuyucuklardan elde edilen absorbans değeridir. Kontrol absorbans değeri ise PSE ile muamele edilmemiş 4T1 hücrelerinin bulunduğu kuyucuklardan elde edilen absorbans değeridir.

#### 4.4.2 PSE'nin 4T1 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin akış sitometrisi ile analizi

Denemede kullanılan 4T1 Hücre süspansiyonu, hücre konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde 4.4.1 bölümünde belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Hücreler steril 6 bölmeli plastik hücre büyüme kabının kuyucuklarına 1'er mL ekilmiştir ve 24 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. 1 mL ortam içerisinde belirlenen konsantrasyonlarda [ $\text{IC}_{50}$  (129  $\mu\text{g/mL}$ ) ve  $0,5 \times \text{IC}_{50}$  (64,6  $\mu\text{g/mL}$ )] PSE, kontrol grubuna ise 1 mL ortam eklenmiştir.  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde 48 saat inkübe edilmiştir (Novak et al., 2014).

İnkübasyon sonunda steril plastik hücre büyüme kaplarındaki dolu kuyucuklardaki ortamlar aspire edilip her 5 kuyucuğa yıkama amacıyla 400  $\mu\text{L}$  Tripsin EDTA eklenmiştir. Bir dakika oda sıcaklığında bekletilip steril plastik hücre büyüme kabındaki ortam tekrar aspire edilmiştir. Ardından her 5 kuyucuğa tekrar 400  $\mu\text{L}$  Tripsin EDTA eklenip bu kez  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir. İşlem sonunda kuyucuklardaki ortamlar ayrı ayrı eppendorf tüplerinde toplanıp 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant aspire edilip peletin üzerine 0,5 mL soğuk PBS eklenmiştir. Yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

Eppendorf tüplerine alınan hücelere 100  $\mu\text{L}$  Binding Buffer çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra kontrol (untreated) grubu dışındaki tüm tüplere 5  $\mu\text{L}$  PE Annexin ve 5  $\mu\text{L}$  PI eklenerek karanlık ortamda 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda her örnek tüpüne 400  $\mu\text{L}$  Binding Buffer çözeltisinden eklenip akış sitometrisi cihazında (BD Accuri C6 Plus, ABD) analiz edilmiştir.

#### 4.5 *In vivo* Çalışmalar

Çalışmada 25 adet Balb/c ırkı fare kullanılmıştır. Her grupta 5 fare olacak şekilde 5 grup oluşturulmuştur. Gruplar Çizelge 4.5'teki şekilde belirlenmiştir. Her gruptaki farenin kuyruğuna sıra numarasını belirtecek işaretlemeler yapılmıştır. Fareler 12 saat ışık, 12 saat karanlık periyodunda ad libitum olarak beslenmiştir.

Çizelge 4.5.: İncelenen deney grupları.

1. grup	Tümör hücresi enjekte edilmeyen 1. kontrol (K1)
2. grup	Tümör hücresi enjekte edilen ancak tedavi uygulanmayan 2. kontrol (K2)
3. grup	Tümör hücresi enjekte edilen ve su bazlı propolis ile beslenen (PSE)
4. grup	Tümör hücresi enjekte edilen ve asidofilus sütü ile beslenen (AS)
5. grup	Tümör hücresi enjekte edilen ve asidofilus sütü ve su bazlı propolis ile beslenen (PSE+AS)

#### 4.5.1 4T1 *in vivo* tümör modeli oluşturulması

Enjeksiyonda kullanılan 4T1 hücre süspansiyonunun konsantrasyonu  $2 \times 10^4$  hücre/fare olacak şekilde 4.4.1 bölümünde belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Hücreler 1:1 oranında matrijel ile karıştırılıp her farenin sol alt meme dokusunun altına Şekil 4.5.1’de gösterilen şekilde, 100  $\mu$ L intraperitoneal (IP) olarak enjekte edilmiştir (Maroof and Hasan, 2012).



Şekil 4.5.1. Fareye 4T1 enjeksiyonu

#### 4.5.2 Gavaj uygulamaları

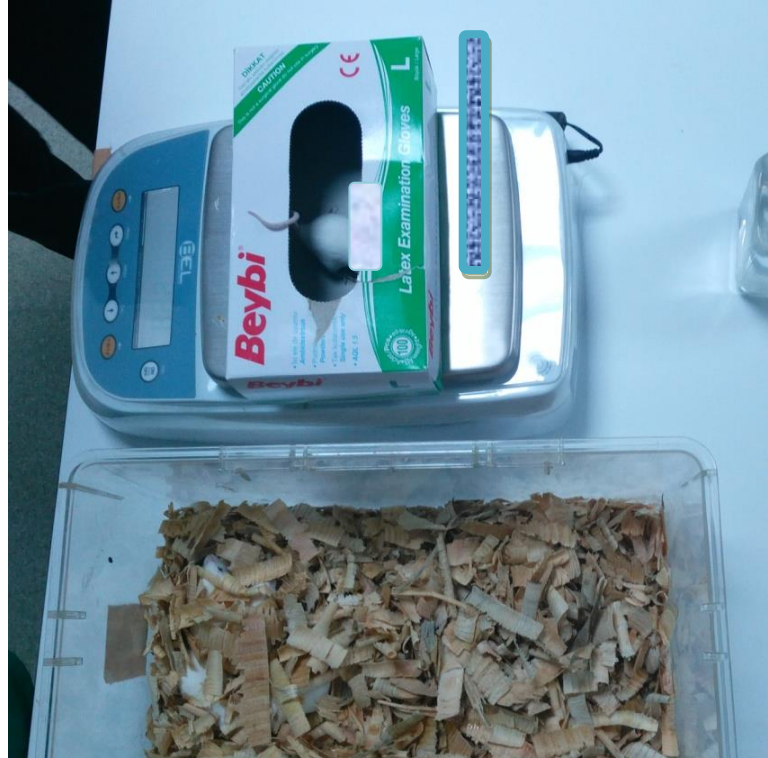
Ardışık 14 gün boyunca PSE grubundaki fareler 200  $\mu$ L propolis ile, AS grubundaki fareler 100  $\mu$ L asidofilus sütü ile, PSE+AS grubundakiler ise 200  $\mu$ L propolis ve 100  $\mu$ L asidofilus sütü ile gavaj yoluyla beslenmiştir (Orsolice and Basic, 2003; Orsolice et al., 2004). Su bazlı propolisin uygulanma dozu *in vitro* sitotoksik analizler sonrasında 66 mg/kg olacak şekilde belirlenmiştir. Gavaj yoluyla besleme Şekil 4.5.2’de gösterildiği şekilde uygulanmıştır.



Şekil 4.5.2. Farenin gavaj yoluyla beslenmesi

#### 4.5.3 Farelerin Tartımı

Denemenin başında, denemelerin başlamasından 5 gün ve 15 gün sonra fareler anestezi altında iken sakrifiye edilmeden hemen önce farelerin teker teker tartımları alınmıştır (Orsollic et al., 2005). Şekil 4.5.3.'te yapılan işlem görülmektedir.



Şekil 4.5.3. Farelerin tartımı

#### 4.5.4 Tümör boyutlarının ölümü

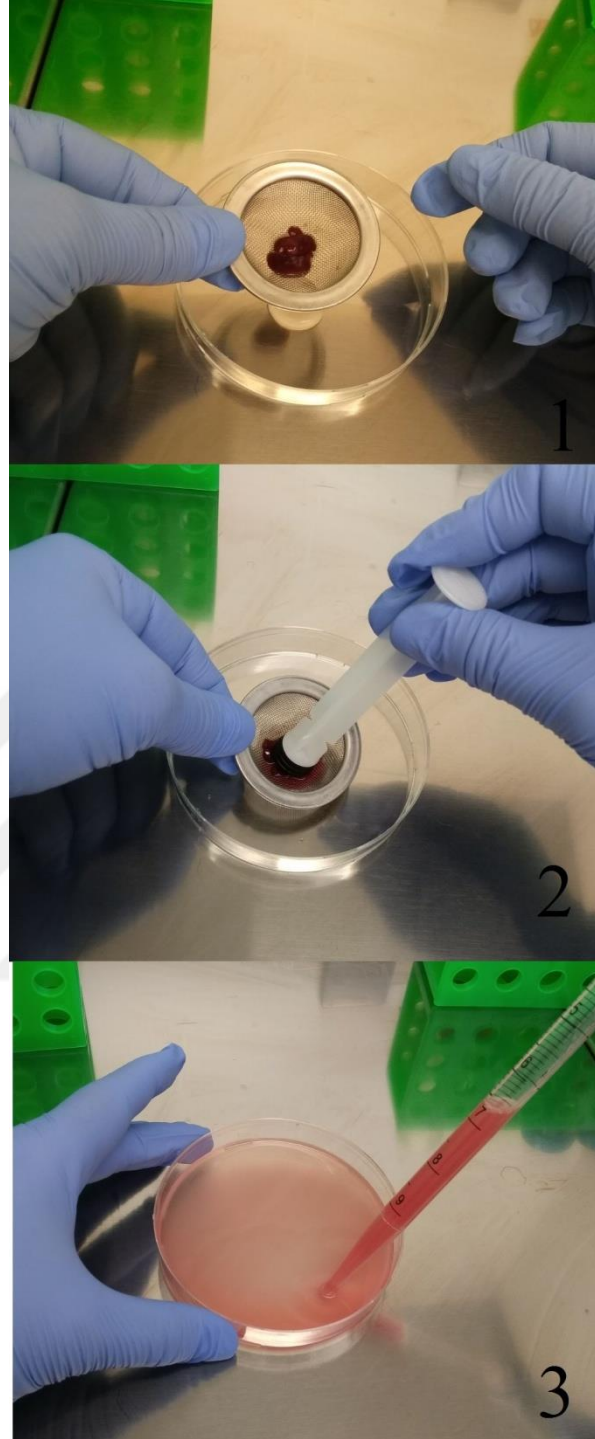
Fareler anestezi altında sakrifiye edilmeden hemen önce meme dokusu yakınlarındaki tümörlerinin boyutları (a mm x b mm) kumpas ile lmmstr (Carlsson et al., 1983). Yapılan işlem Şekil 4.5.4'te görülmektedir.



Şekil 4.5.4. Tümör boyutlarının kumpas ile lm

#### 4.6 Splenosit Proliferasyon Analizi

Fareler anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir. Farelerin dalakları steril pens ve makasla, her grup için ayrı ayrı hazırlanmıŐ olan 50 mL PBS içine alınmıŐtir ve her grup için hücre havuzu oluşturulmuştur. Dalak rnekleri Şekil 4.6.'da gösterilen Şekilde steril elekler içinde ezilip parçalanarak 10 mL RPMI 1640 ile santrifüj tüpüne aktarılmıŐtir (Nalbantsoy et al., 2011).



Şekil 4.6. Farelerden alınan dalak örneklerinin hazırlanışı

Her grup için hazırlanan örnekler 700 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatantlar dökülüp peletin üzerine 5 mL RPMI 1640 ilave edilmiştir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Son yıkama işleminden sonra peletin üzerine 5 mL RPMI 1640 eklenip hücre sayımı için her örnekten 100  $\mu$ L alınıp içerisinde 900  $\mu$ L bulunan eppendorf tüplerine aktarılmıştır.

Hücre sayısı  $5 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 100'er  $\mu\text{L}$  96'lı steril plastik hücre büyüme kabının kuyucuklarına eklenmiştir. Kuyucuklara her örnek için 4 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılmıştır. Splenositlerin uyarılması amacıyla kuyucuklara 100  $\mu\text{L}$  inaktif *L.acidophilus* LA-5 hücre süspansiyonu, LPS, ConA ve PHA eklenmiştir. Bu işlemde kullanılacak olan inaktif *L.acidophilus* LA-5 hücrelerini içeren süspansiyonun hazırlanması için yıkama işlemi 4.1 bölümünde belirtildiği şekilde yapılmıştır. Yıkama işlemi yapılan  $10^7$  kob/mL içeren hücre süspansiyonu 7 mL RPMI 1640 ortamı eklenip steril petri kabına aktararak (petri kabı ile UV lamba arasındaki mesafe: 3,5 cm) 2 kez 30'ar dakika boyunca UV-C (15 W, Philips, Hollanda) uygulanmıştır. Bu uygulama sonunda canlı *L.acidophilus* LA-5 kalmadığı MRS katı besiyerine ekim yapılarak doğrulanmıştır. Kontrol grubuna ortam eklenmiştir. Splenosit hücrelerinin ve mitojenlerin eklendiği steril plastik hücre büyüme kapları  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir (Nalbantsoy et al., 2011).

İnkübasyon sonunda kuyucuklara 25  $\mu\text{L}$  MTT solüsyonu (2,5 mg/mL) eklenip 4 saat daha inkübe ( $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ ) edilmiştir. Bu işlem sonunda solüsyon boşaltılmıştır ve her kuyucuğa 150  $\mu\text{L}$  Dimethyl Sulfoxide (DMSO) eklenmiştir. Hafifçe karıştırılan steril plastik hücre büyüme kapları spektrometrede (Versamax Microplate Reader, ABD) 570-620 nm'de okutulmuştur (Nalbantsoy et al., 2011). Splenositlerin uyarılma seviyeleri aşağıdaki formül kullanılarak tespit edilen stimülasyon indeksi ile ifade edilmiştir.

$$\text{Stimülasyon indeksi (SI)} = \frac{\text{Absorbans değeri} \times 100}{\text{Kontrol absorbans değeri}}$$

#### 4.7 Farelerden İzole Edilen Splenositlerin 4T1 Hücre Hattı ile Ko-Kültüre Edilmesi

Steril 6 bölmeli plastik hücre büyüme kabının kuyucuklarına 1 mL 4T1 hücreleri ( $1 \times 10^5$  hücre/mL) ve 1 mL splenosit kültürü ( $5 \times 10^5$  hücre/mL) ekilmiştir. Kontrol grubu dışındakilere son konsantrasyon 5  $\mu\text{g/mL}$  olacak

şekilde Concanavalin A eklenmiştir. Kontrol grubuna ise sadece ortam eklenmiştir. Steril 6 bölmeli plastik hücre büyüme kabı 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir (Kano, 2015). İnkübasyon sonunda hücreler inverted mikroskopta (Leice) incelenmiştir.

#### 4.8 CD8+ Sitotoksik T Hücre Yanıtının Ölçümü

Her gruptan toplanan dalak hücre konsantrasyonu 5x10<sup>5</sup> hücre/mL olacak şekilde 4.6. bölümünde belirtildiği gibi steril 6 bölmeli plastik hücre büyüme kabında hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonundan ikişer mL steril 6 bölmeli plastik hücre büyüme kabına eklenmiştir. Splenositlerin uyarılması amacıyla kuyucuklara 100 µL inaktif *L.acidophilus* LA-5 hücre süspansiyonu eklenmiştir. Kontrol grubuna ise yalnızca ortam eklenmiştir. 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir.

CD8+ sitotoksik T hücre yanıtının ölçümü amacıyla örnekler aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır:

- İnkübasyonu takiben steril plastik hücre büyüme kabındaki örnekler tek tek toplanıp Eppendorf tüplerine aktarılmıştır.
- Örnekler 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda süpernatant atılmıştır.
- T hücrelerinin işaretlenmesi için tüplere 50 µL FIT-C (Anti-fare CD3 antikoru) eklenmiştir.
- Örnekler 4°C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonu takiben tüm örneklerle 250 µL PBS (%3 FBS'li) eklenip tekrar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant atılıp 250 µL PBS (%3 FBS'li) eklenip tekrar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. Ardından süpernatant atılmıştır.
- CD8+ T hücrelerinin işaretlenmesi için tüplere 50 µL Per CP (Anti-fare CD8 antikoru) eklenmiştir.
- Örnekler 4°C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.

- İnkübasyonu takiben tüm örneklere 250 µL PBS (%3 FBS'li) eklenip tekrar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant atılıp 250 µL PBS (%3 FBS'li) eklenip tekrar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. Ardından süpernatant atılmıştır.
- Örnek tüplerindeki hücreler 100 µL fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonunda (BD Cytotfix/Cytoperm Plus, A.B.D.) süspanse edilmiş ve 4 °C'de, 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonu takiben tüm örneklere 250 µL PBS (%3 FBS'li) eklenip tekrar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant atılıp 250 µL PBS (%3 FBS'li) eklenip tekrar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır. Ardından süpernatant atılmıştır.
- IFN-γ işaretlenmesi için tüplere 50 µL PE (Anti-fare IFN-γ monoklonal antikoru) eklenmiştir.
- Örnekler 4°C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.
- PBS (%3 FBS'li) ile 10 X'ten 1 X'e seyreltilmiş 250 µL Perm/Wash tamponu ilave edilmiş ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Yıkama işlemi iki kez daha tekrar edilmiştir.
- Son yıkama sonrasında süpernatant atılmış, hücreler 200 µL PBS (%3 FBS'li) ile süspanse edilmiş ve akış sitometrisine (BD Accuri C6 Plus, ABD) geçilmiştir.
- CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerin oranı ve IFN-γ salgılayan CD8+ T hücrelerinin oranları yüzdesel olarak akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Akış sitometri cihazının floresan ışın algılayan kanallarından  $6 \times 10^4$  dalak hücre kültürü geçirilmiştir. Elde edilen veriler BD Accuri C6 Software programı (BD Biosciences, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir.
- CD8+ T hücrelerinin oranları akış sitometrisinden elden edilen görüntülerdeki sağ alt bölgedeki (LR) hücre oranıdır.
- CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerin oranları akış sitometrisinden elden edilen görüntülerdeki sağ yarımda görülen yüzdelik değerlerdir.

#### 4.9 İstatistiksel Analizler

Tez kapsamında analiz sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi IBM SPSS Statistics.20 Windows paket programı (SPSS 20 for Windows) ve Graphpad Prism 7 ile yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılık ANOVA (Analyses of Variance) ve Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir.



## 5. BULGULAR

### 5.1 Asidofilus Sütündeki *L.acidophilus* LA-5'in Sayımı

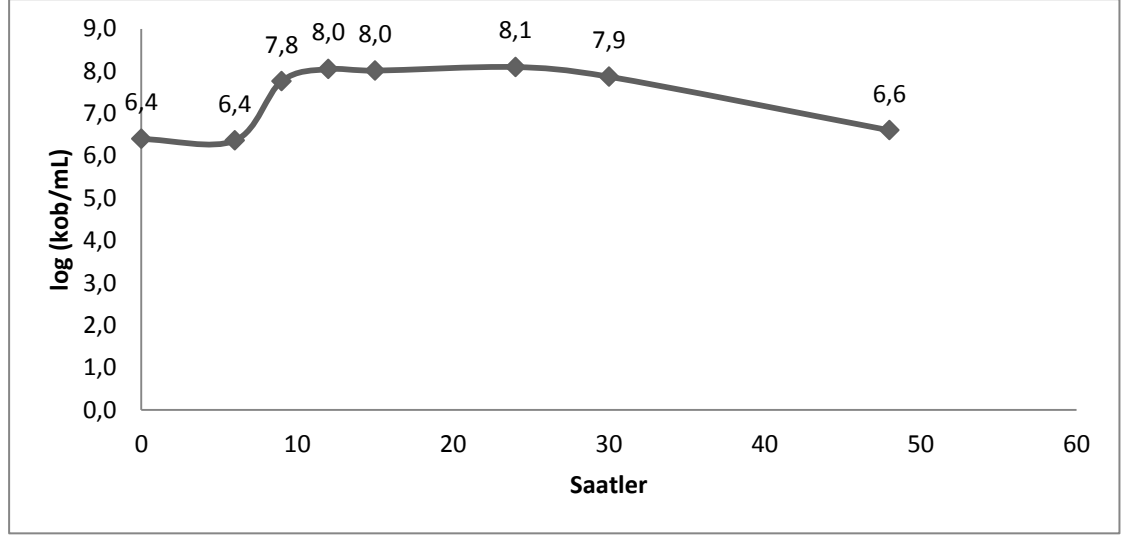
Asidofilus sütü üretimi sonunda *L.acidophilus* LA-5 sayısı  $4,2 \times 10^8$  kob/mL olarak tespit edilmiştir. Asidofilus sütünün fermentasyondan önce (0. saat) ve fermentasyondan sonra (24. saat) ölçülen pH değerleri ve mikrobiyolojik sayım sonuçları Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Asidofilus sütünün mikrobiyolojik sayım sonuçları ve pH değerleri.

Analiz	Fermentasyondan önce	Fermentasyondan sonra
<i>L.acidophilus</i> LA-5 sayısı (kob/mL)	$1,66 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$
pH	6,54	4,85

### 5.2 *L.acidophilus* LA-5 MRS Sıvı Besiyerinde Üreme Eğrisi

*L.acidophilus* LA-5 üreme eğrisi Şekil 5.2.'de görülmektedir. 0-6 saat arası lag faz olarak belirlenmiştir. Bu aşamada bakterileri metabolik olarak üremeye hazırlık yapmaktadır. 6-11 saat arası logaritmik faz olarak belirlenmiştir. Bu fazda bakteriler sabit bir oranda çoğalmaktadır ve üreme oranı ölüm oranından fazladır. 11-30 saat arası ise durağan olarak belirlenmiştir. Durağan fazda ölüm oranı çoğalma oranına eşittir. Toplam bakteri sayısı değişmemektedir. 30-48 saat arası ise ölüm fazı olarak belirlenmiştir. Bakterilerin ölüm oranı üreme oranından fazladır ve toplam hücre sayısı azalmaktadır.



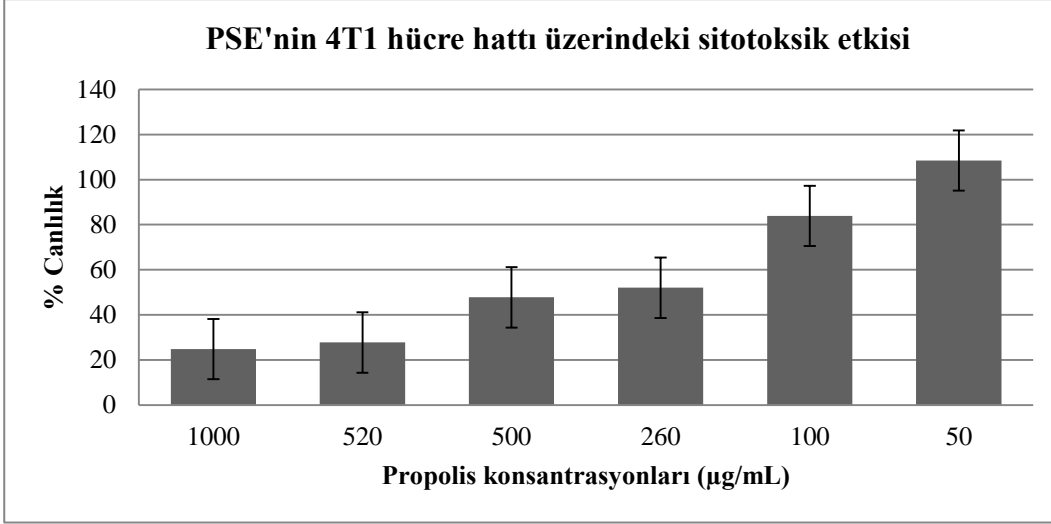
Şekil 5.2. *L.acidophilus* LA-5'in Üreme Eğrisi

### 5.3 PSE'nin *L.acidophilus* LA-5 Üzerindeki Antimikrobiyal Etkisi

PSE'nin *L.acidophilus* LA-5 üzerindeki bakteriyostatik etkisini belirlemek için MİK testi, bakterisidal etkisini belirlemek için ise MBK testi yapılmıştır. MİK ve MBK testlerinde kullanılan orijinal ürün olan PSE'nin konsantrasyonu 10.000 ppm'dir. MİK testinde başlangıç çözeltisi 5000 ppm'e ayarlanmıştır. PSE'nin MİK değeri *L.acidophilus* LA-5 için 5000 ppm, MBK değeri 5000 ppm olarak belirlenmiştir.

### 5.4 PSE'nin 4T1 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

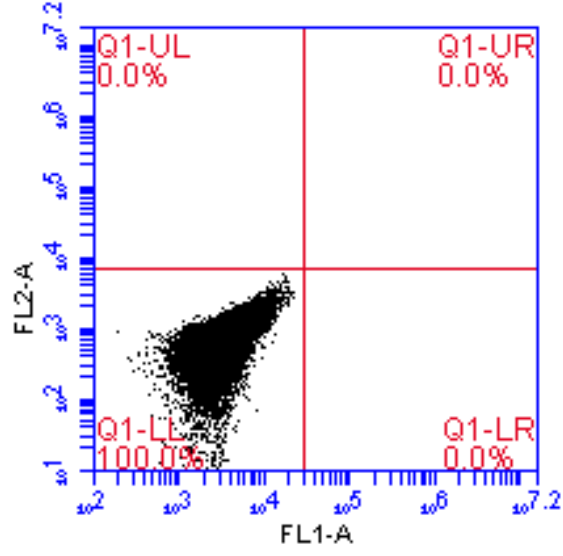
PSE'nin 4T1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT testi ile 4T1 hücrelerinin yüzde canlılıkları hesaplanmıştır. Farklı PSE konsantrasyonlarındaki canlılık yüzdeleri Şekil 5.4'te belirtilmiştir. 4T1 hücrelerinin % canlılık değerleri kullanılarak IC<sub>50</sub> değeri 129,25±1,90 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



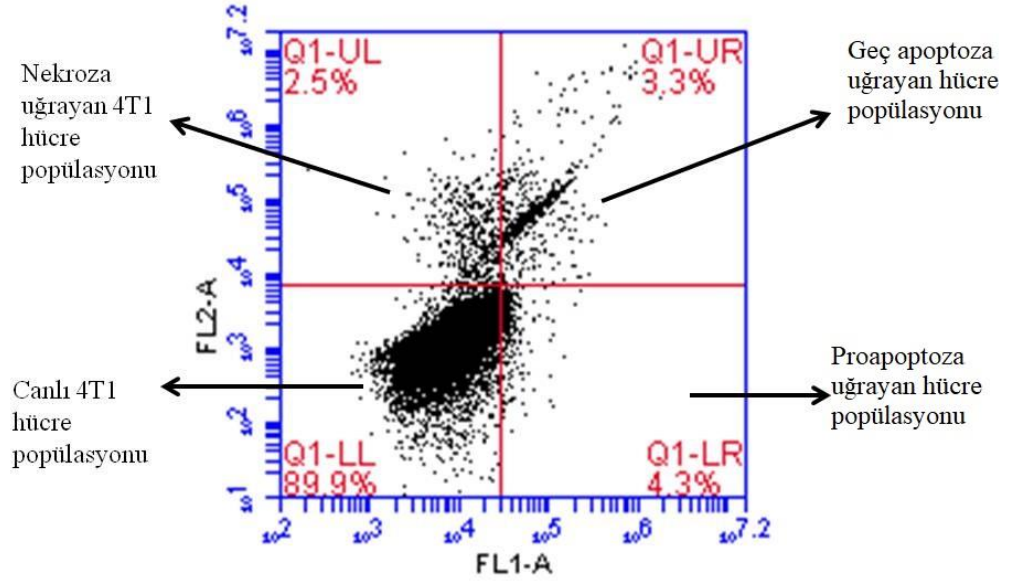
Şekil 5.4. PSE'nin 4T1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

### 5.5 PSE'nin 4T1 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisi

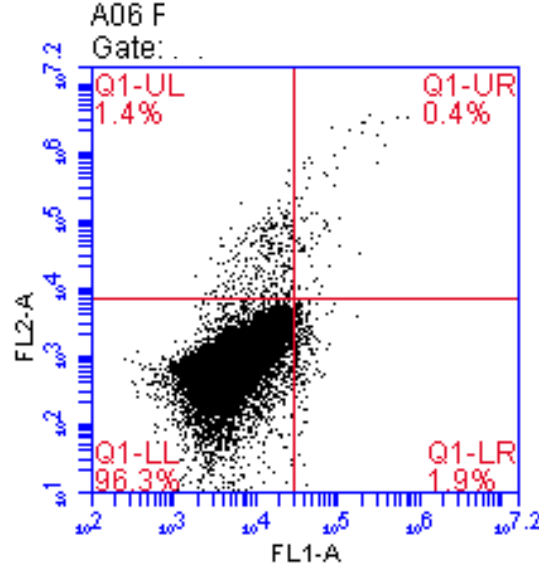
PSE'nin 4T1 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisini tespit etmek amacıyla sitotoksisite testinde belirlenen  $IC_{50}$  değeri ( $129,25 \pm 1,90 \mu\text{g/mL}$ ) ve bu değerin yarı konsantrasyonundaki  $0,5 \times IC_{50}$  ( $64,6 \mu\text{g/mL}$ ) değeri konsantrasyonları ile muamele edilen 4T1 hücreleri akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Geç apoptotik, proapoptotik ve nekrotik 4T1 hücrelerinin yüzdeleri Şekil 5.5'te belirtilmiştir. Herhangi bir madde ile muamele edilmeyen 4T1 hücrelerinin akış sitometrisindeki görüntüsü Şekil 5.5.1'de gösterilmiştir. Şekil 5.5.2'de  $129,25 \pm 1,90 \mu\text{g/mL}$  ( $IC_{50}$ ) konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin apoptotik görüntüsü ve örnek olarak akış sitometrisi sonuçlarının yorumu gösterilmiştir. Şekil 5.5.3'te ise  $64,6 \mu\text{g/mL}$  ( $0,5 \times IC_{50}$ ) konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin apoptotik görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 5.5.1. Herhangi bir madde ile muamele edilmeyen 4T1 hücrelerinin akış sitometrisindeki görüntüsü

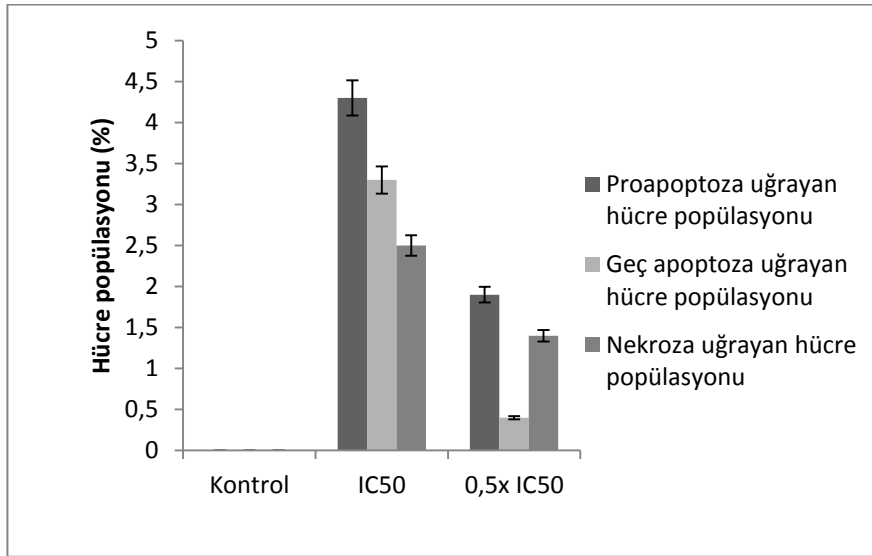


Şekil 5.5.2. PSE'nin  $129,25 \pm 1.90 \mu\text{g/mL}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin akış sitometrisindeki görüntüsü



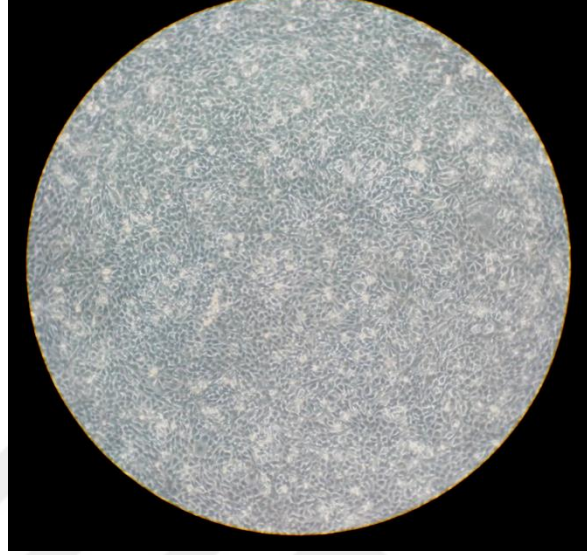
Şekil 5.5.3. PSE'nin 64,6 µg/mL (0,5x IC<sub>50</sub>) konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin akış sitometrisindeki görüntüsü

IC<sub>50</sub> konsantrasyonu (129,25±1,90 µg/mL) 4T1 hücrelerinin %4,3'ünü proapoptoza, %3,3'ünü geç apoptoza ve %2,5'ini nekroza sürüklemiştir. 0,5xIC<sub>50</sub> konsantrasyonu (64,6 µg/mL) 4T1 hücrelerinin %1,9'unu proapoptoza, %0,4'ünü geç apoptoza ve %1,4'ünü nekroza sürüklemiştir.

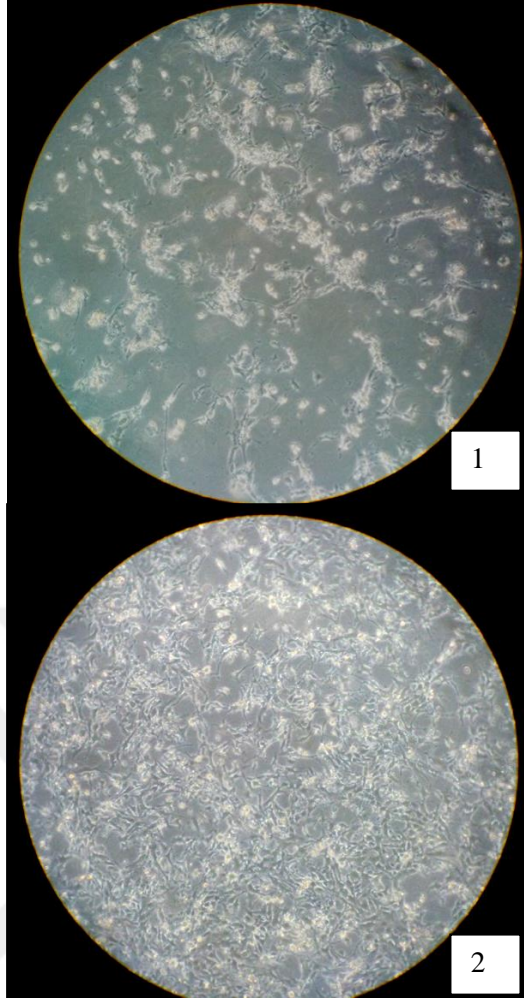


Şekil 5.5. PSE'nin 4T1 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi

Akış sitometrisinde analiz edilmek üzere hazırlanan steril 6 bölmeli plastik hücre büyüme kabında inverted mikroskop ile elde edilmiş görüntüleri ile Şekil 5.5.4 ve 5.5.5'te görülebilmektedir.



Şekil 5.5.4. PSE ile muamele edilmemiş 4T1 hücrelerinin (Kontrol) inverted mikroskoptaki görüntüsü (10X)



Şekil 5.5.5. PSE'nin  $IC_{50}$  konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin görüntüsü (1); PSE'nin  $0,5xIC_{50}$  konsantrasyonu ile muamele edilmiş 4T1 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü (2), (10X)

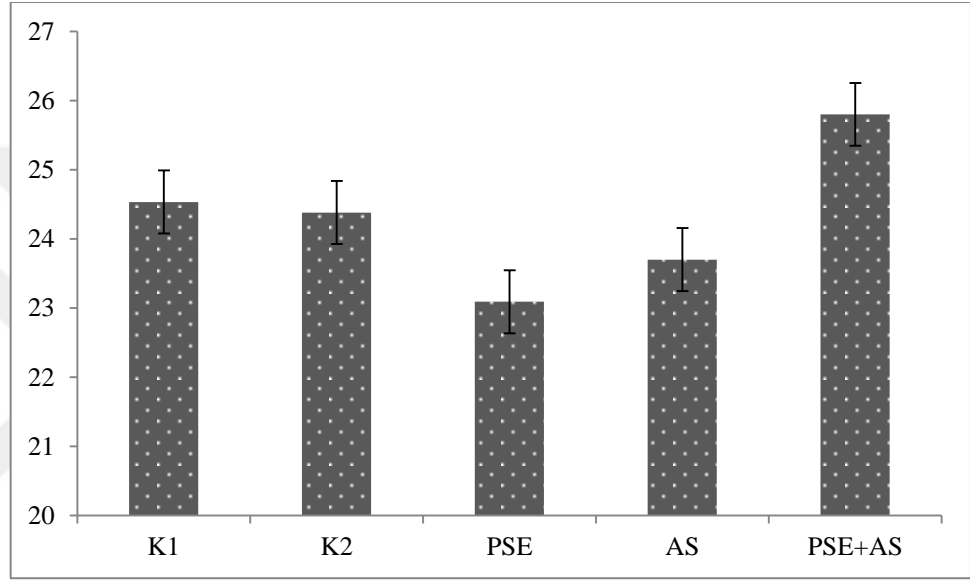
## 5.6 *In Vivo* Çalışmalar

### 5.6.1 Farelerin Ağırlıkları

Hayvan denemeleri boyunca fareler periyodik olarak tek tek tartılmıştır. Toksik etki sebebiyle herhangi bir ölüm gerçekleşmemiştir. Farelerin tartımlarının ortalamaları Çizelge 5.6.1'de ve Şekil 5.6.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.6.1. Farelerin Tartımlarının Ortalamaları.

Grup	Ortalama ağırlıklar (gram)			Toksik etki sebebiyle ölüm sayısı
	0. gün	5. gün	15. gün	
K1	24,6	25,6	23,4	0
K2	25,06	24,54	23,54	0
P	23,98	23,54	21,75	0
AS	23,57	24,13	23,4	0
P+AS	25,03	27,2	25,17	0



Şekil 5.6.1. Deneme boyunca farelerin ağırlık ortalamaları (n=5)

### 5.6.2 Tümör boyutlarının ölçüm sonuçları

Tümör hacimleri her grup için ortalama olarak ifade edilmiştir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Carlsson et al., 1983);

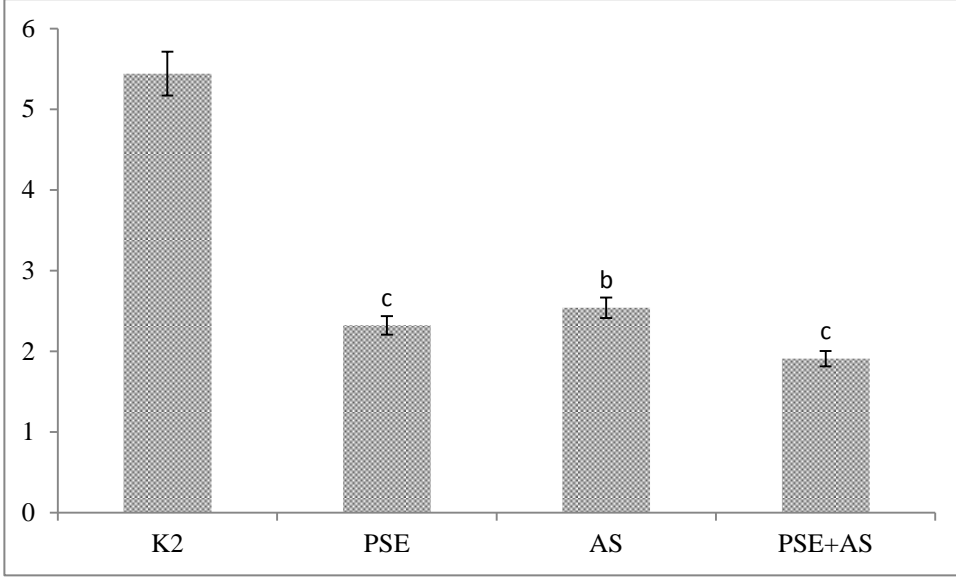
$$V = a * \frac{b^2}{2}$$

V: tümör hacmi (mm<sup>3</sup>)

a: genişlik (mm)

b: uzunluk (mm)

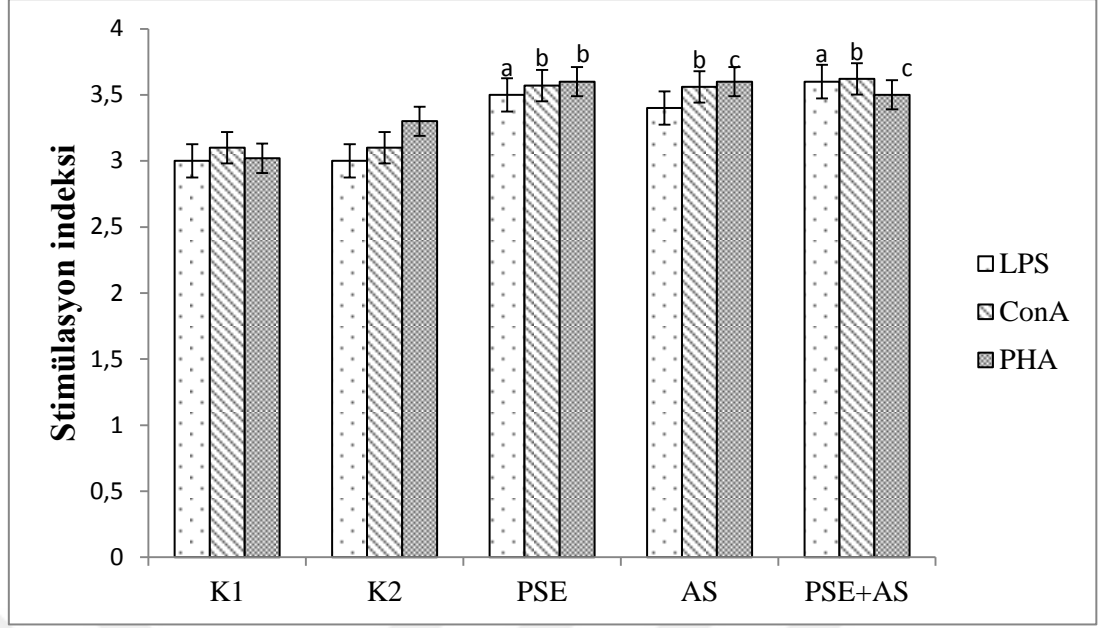
Deneme gruplarının ortalama tümör hacimlerinin ortalama vücut ağırlıklarına oranları Şekil 5.6.2'de gösterilmiştir.



Şekil 5.6.2. Deneme gruplarının ortalama tümör hacimlerinin ortalama vücut ağırlıklarına oranları K2 grubunun verileri ile karşılaştırılmıştır (n=5), (b:  $P \leq 0,01$ , c:  $P \leq 0,001$ )

### 5.6.3 Splenosit proliferasyon analiz sonuçları

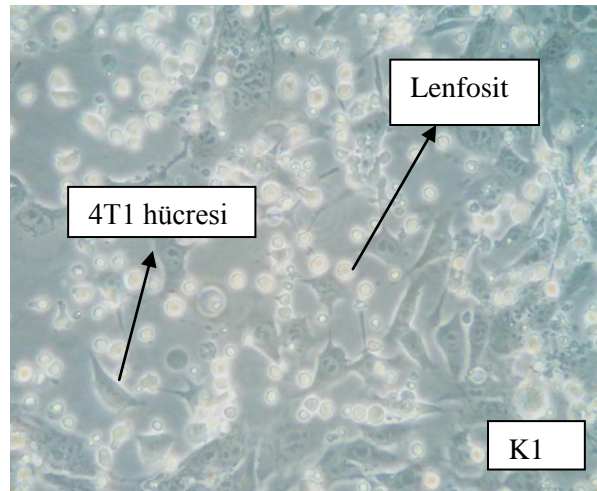
Asidofilus sütü ve PSE'nin *in vivo* olarak BALB/c farelerinin splenosit proliferasyonuna olan etkisi incelenmiştir. Splenosit proliferasyonunu analiz etmek amacıyla splenositler LPS (Lipopolisakkarit), ConA, PHA (Phytohaemagglutinin) mitojenleri ve inaktif *L.acidophilus* LA-5 ile indüklenmiştir. Splenosit proliferasyonu, MTT testi ile ölçülüp stimülasyon derecesi stimülasyon indeksi olarak ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.6.3'te detaylandırılmıştır.



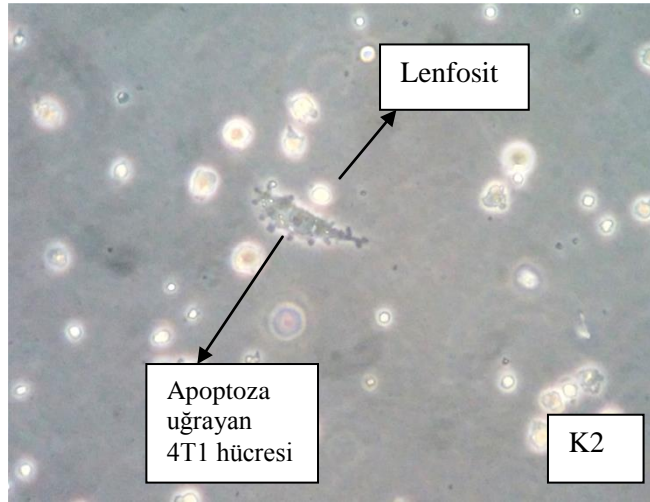
Şekil 5.6.3. Asidofilus sütü ve PSE'nin *in vivo* olarak BALB/c farelerinin splenosit proliferasyonuna olan etkisi (n=5), her bir mitojen için elde edilen veriler K1 grubunun verileri ile karşılaştırılmıştır (a:  $P \leq 0,05$ , b:  $P \leq 0,01$ , c:  $P \leq 0,001$ )

#### 5.6.4. Farelerden İzole Edilen Splenositlerin 4T1 Hücre Hattı ile Ko-Kültüre Edilmesi

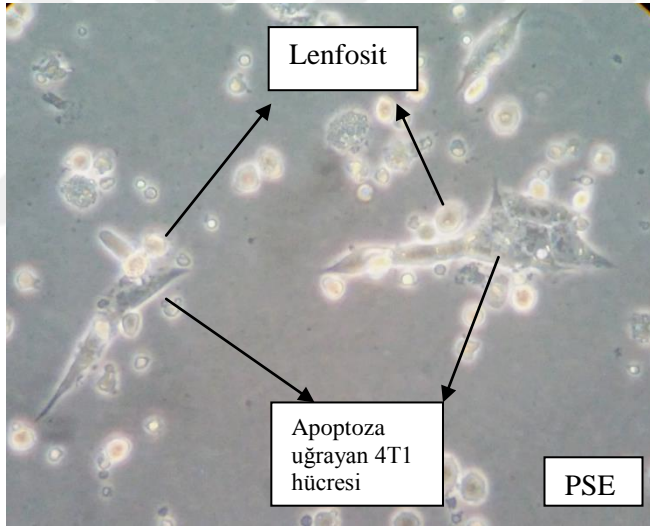
Farelerden izole edilen dalak hücreleri steril 6 bölmeli plastik hücre büyüme kabına ekilip ConA ile uyarılmıştır ve inkübasyonu takiben her grubu temsil eden örneklerin inverted mikroskobundaki görüntüleri Şekil 5.6.4.1 (a,b,c,d,e,f)'de gösterilmiştir.



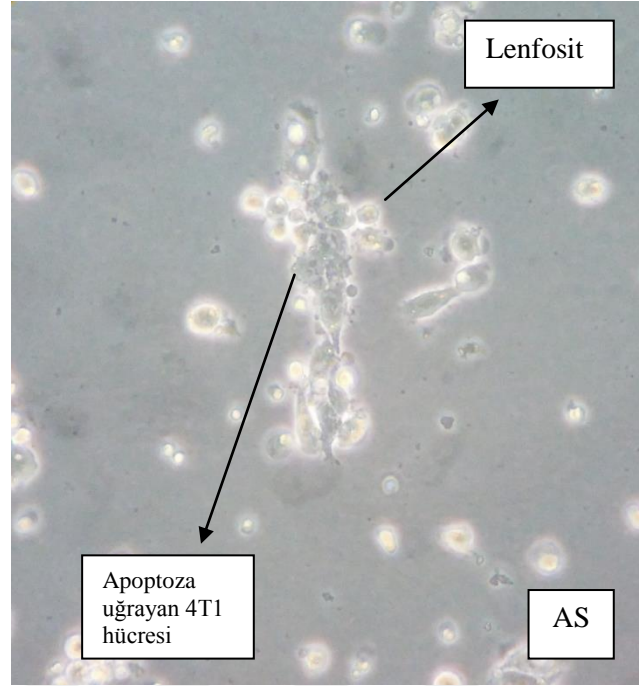
(a) K1 grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve canlılığını koruyan 4T1 hücreleri



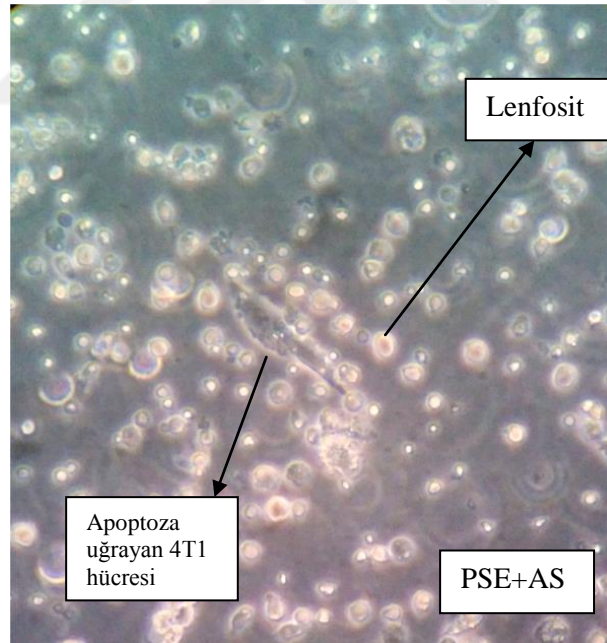
(b) K2 grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve apoptoza uğramış 4T1 hücrelerinin görüntüsü



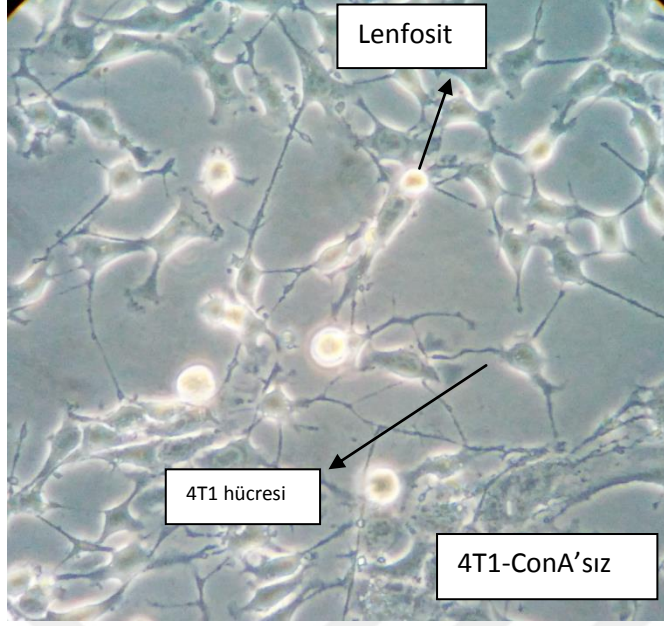
(c) PSE grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve apoptoza uğramış 4T1 hücrelerinin görüntüsü



(d) AS grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve apoptoza uğramış 4T1 hücrelerinin görüntüsü



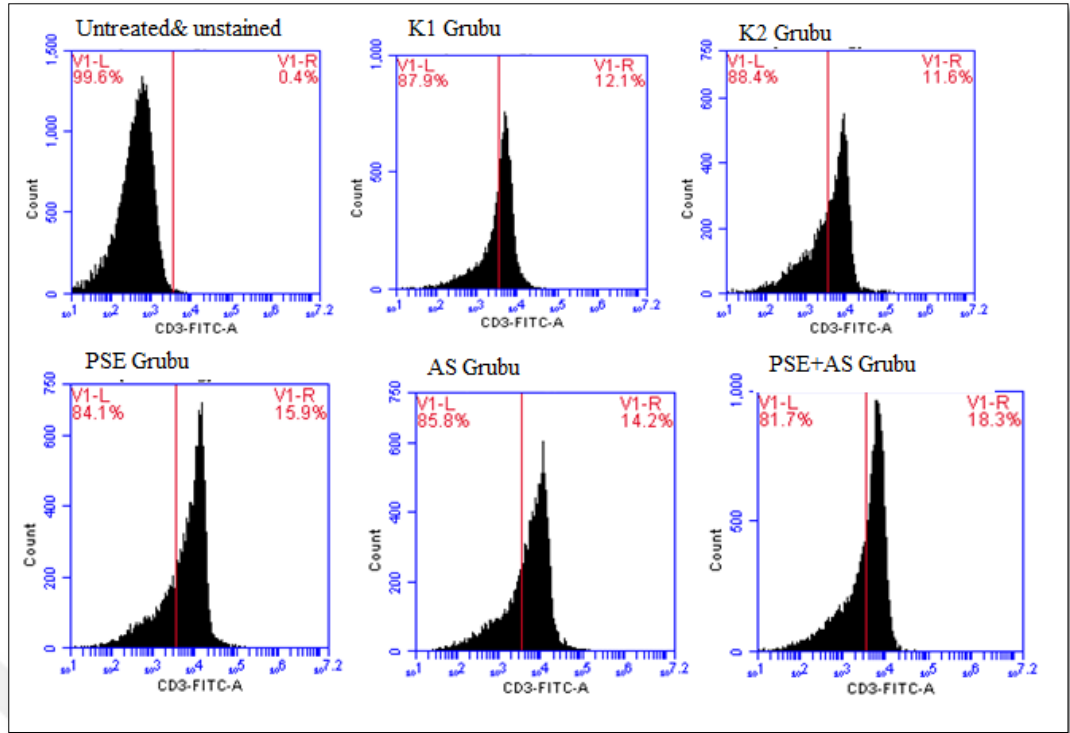
(e) PSE+AS grubunun ConA ile uyarılmış splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve apoptoza uğramış 4T1 hücrelerinin görüntüsü



(f) K1 grubunun herhangi bir uyarıcı ile stimüle edilmeyen splenositlerinin 4T1 hücreleri ile etkileşimi ve canlılığını koruyan 4T1 hücreleri

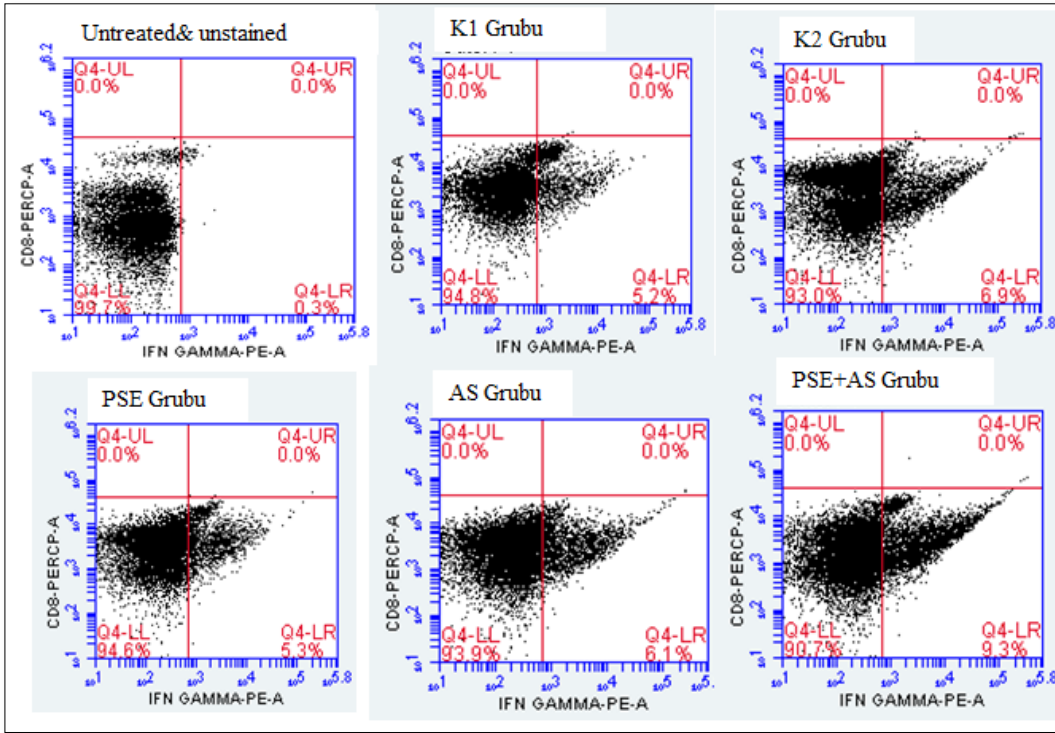
#### 5.6.5. CD8+ sitotoksik T hücre yanıtı

Öncelikle farelerden toplanan dalak hücrelerindeki CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerin yüzdesel oranı tespit edilmiştir. Bu hücrelerin inaktif *L.acidophilus* LA-5 ile indüklenmeleri sonrasında akış sitometrisi ile elde edilen görüntüleri Şekil 5.6.5.1'de gösterilmiştir.



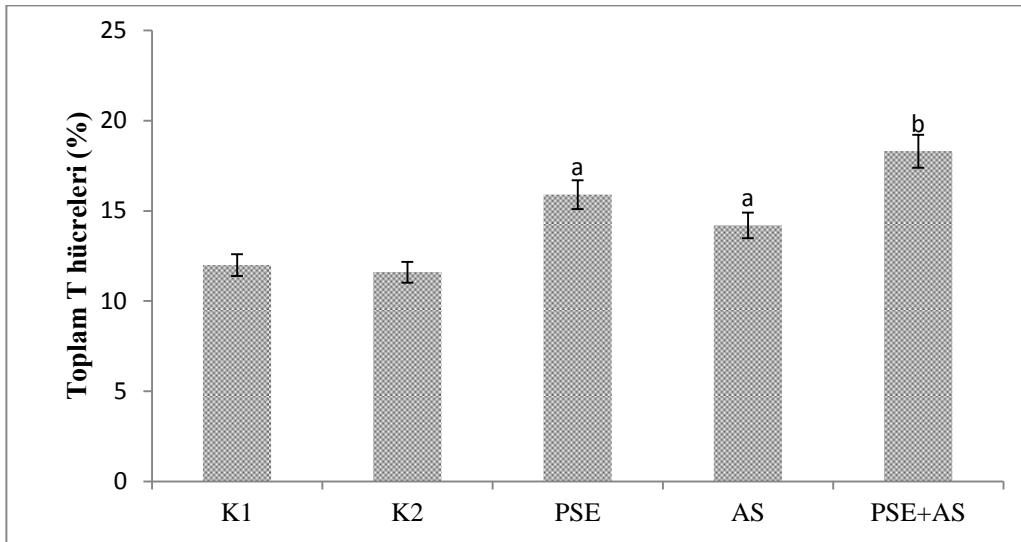
Şekil 5.6.5.1. CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerin akış sitometrisindeki görüntüsü

Farelerden toplanan dalak hücrelerinden IFN- $\gamma$  salgılayan CD8 T lenfositlerin yüzdesel oranı tespit edilmiştir. Bu hücrelerin inaktif *L.acidophilus* LA-5 ile indüklenmeleri sonrasında akış sitometrisi ile elde edilen görüntüleri Şekil 5.6.5.2’de gösterilmiştir.



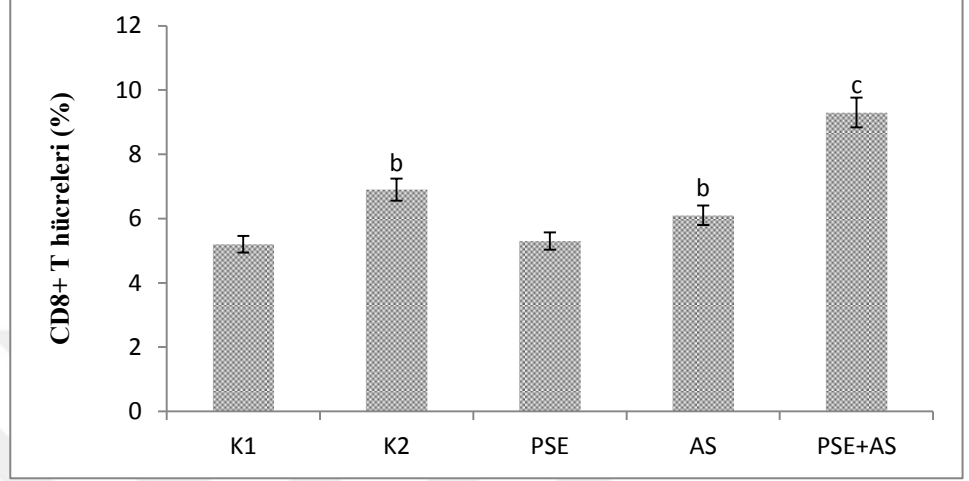
Şekil 5.6.5.2. IFN- $\gamma$  salgılayan CD8+ T lenfositlerin akış sitometrisindeki görüntüleri

Farelerden toplanan dalak hücre kültüründeki CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerin yüzdeleri Şekil 5.6.5.1'de detaylandırılmıştır



Şekil 5.6.5.1: CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerin yüzdeleri (n=5), veriler K1 grubunun verileri ile karşılaştırılmıştır (a:  $P \leq 0,05$ , b:  $P \leq 0,01$ )

Farelerden toplanan dalak hücre kültüründeki IFN- $\gamma$  salgılayan CD8+ T hücrelerinin yüzdeleri Şekil 5.6.5.2’de detaylandırılmıştır.



Şekil 5.6.5.2.: CD8 + T lenfositlerinin yüzdeleri (n=5), veriler K1 grubunun verileri ile karşılaştırılmıştır (b:  $P \leq 0,01$ , c:  $P \leq 0,001$ )

Bu analizler sonucunda farelerden toplanan dalak hücreleri içindeki CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerinin ve CD8+ T hücrelerinin yüzdeleri Çizelge 5.6.5’te karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 5.6.5: Dalak hücreleri içindeki toplam T ve CD8+ T hücrelerinin yüzdeleri

	K1	K2	PSE	AS	PSE+AS
<b>CD3 boyama yapılarak akış sitometrisinde analiz edilen toplam T hücrelerinin (%)</b>	12	11,6	15,9	14,2	18,3
<b>CD8+ T hücreleri (%)</b>	5,2	6,9	5,3	6,1	9,3

## 6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında ilk adım olarak asidofilus sütü üretilmiştir. Fermente süt ürünlerinin karakteristik aroması ve tekstürel özelliklerinin oluşumu, üretimde kullanılan bakterilerin metabolik aktivitelerinin sonucunda oluşmaktadır. Bu ürünlerin üretiminde kullanılan starter kültürler tarafından düzenlenen fermentasyon sırasında laktik asit ile asetaldehit başta olmak üzere aromatik bileşenler oluşmaktadır (Özer, 2006; Üçüncü, 2013). Tez kapsamında yarım yağlı UHT süte *L.acidophilus* LA5 %5 oranında inokülasyonu yapıldıktan hemen sonra sütteki canlı *L.acidophilus* LA5 sayısı  $1,66 \times 10^7$  kob/mL olarak tespit edilmiştir. 24 saatlik fermentasyon sonunda ise oluşan asidofilus sütündeki canlı *L.acidophilus* LA5 sayısı  $4,2 \times 10^8$  kob/mL'ye ulaşmıştır. Lee ve Wong (1998), pH değeri 4 olan bir asidofilus sütünün içerdiği *L.acidophilus* LA5 bakterisinin sayısını  $1 \times 10^8$ - $3 \times 10^8$  kob/mL olarak tespit etmiştir. Schaafsma et al. (1990), yaptıkları çalışmada *L.acidophilus* bakterisi ile fermente edilmiş ürünlerdeki *L.acidophilus* sayısının yaklaşık olarak  $10^7$ - $10^8$  kob/mL arasında olduğunu bildirmişlerdir. Savaiano et al. (1984), pastörize süt ve *L.acidophilus* starter kültürü kullanarak fermente ettikleri asidofilus sütlerindeki *L.acidophilus* sayısını  $1 \times 10^7$  cfu/ml olarak belirlemişlerdir. Tez çalışması kapsamında üretilen asidofilus sütünün canlı probiyotik bakteri sayısı, literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'nde Asidofilus sütünün içermesi gereken minimum canlı bakteri sayısı 106 kob/g olarak belirtilmiştir (Anon,2009). Tamime ve Robinson (1990), marketlerde satılan ürünlerin tüketime kadar  $5 \times 10^8$  kob/mL *L.acidophilus* içermesi gerektiğini ve 21 güne kadar ürünlerdeki bu bakteri sayısının korunması, ürünün dağıtımında ve satışında 5°C'nin altında muhafaza edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Yaygın (1999), asidofilus sütü üretiminde son ürünün gramında  $10^7$ - $10^8$  canlı bakteri bulunması gerektiğini bildirmiştir. Araştırmacılar asidofilus sütü gibi probiyotik ürünlerden beklenen sağlık yararlarının sağlanması için bu ürünlerin içerdiği canlı probiyotik bakteri sayısının  $10^5$  kob/mL'nin üzerinde olması gerektiğini belirtmektedirler (Kailasapathy and Chin, 2000; Itsaranuwat et al., 2003). Bu çalışmada üretilen

asidofilus sütünün 14 günlük muhafaza süresi boyunca  $10^8$  kob/mL *L.acidophilus* içerdiği tespit edilmiş olup, literatürdeki bilgiler ile uyum sağlamaktadır.

pH değeri süt ve süt ürünlerinin kalite kriterleri açısından oldukça önemli bir ölçüdür. Ürün içerisindeki hidrojen iyonlarının konsantrasyonunun bir ölçüsü olan pH değeri, özellikle fermente ürünlerin kalitesi ve randımanı açısından oldukça önemlidir. Bu tez kapsamında yapılan denemelerde, yarım yağlı UHT süte starter kültür inokülasyonundan hemen sonra ölçülen pH değeri 6,54 iken, 24 saatlik fermentasyon sonunda oluşan asidofilus sütünün pH değeri 4,85 olarak ölçülmüştür. Fermentasyon işlemi ürün pH'sı 4,85 olana dek devam ettirilmiş ve istenilen pH değerine ulaşıldığında işlem sonlandırılmıştır. Akpınar (2008), çalışma kapsamında üretilen asidofilus sütünün son pH değerinin 4,16 olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılara göre asidofilus sütü üretiminde ulaşılabilecek son pH değeri 5,5 ile 6,0 arasındadır ve bu değere ulaşmak için gereken fermentasyon süresi 18-24 saattir (Kosikowski and Mistry 2004; Chandan,2006). Hui et al. (2004), ise asidofilus sütünün üretilmesi için gerekli fermentasyon süresinin 24 saat olduğunu ve son üründe ulaşılması gereken pH değerinin 4,5-4,6 arasında olduğunu belirtmişlerdir.

Tez çalışmasında PSE'nin *L.acidophilus* LA5 üzerindeki antibakteriyal etkisinin incelenmesi amacıyla MİK ve MBK testleri yapılmıştır. Bu testlerde bakterilerin içinde buldukları gelişme fazlarının bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Sonuçların doğru yorumlanabilmesi amacıyla MİK ve MBK testleri uygulanmadan önce *L.acidophilus* LA5'in MRS sıvı besiyerine yapılan inokülasyonundan sonraki, logaritmik fazda bulunduğu saat aralığı tespit edilmiştir. *L.acidophilus* 6-11 saatler arasında logaritmik fazda olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar *L.acidophilus* LA-K'nin en az 10 saat boyunca logaritmik fazda kaldığını belirtmiştir (Muramalle and Aryana, 2011). Liong ve Shah (2005), *L.acidophilus*'un çeşitli suşlarının 9-15 saatler arasında hızlı gelişme gösterdiğini ve logaritmik fazda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bir diğer araştırmacı ise *L.acidophilus*'un 0-2 saatler arasında lag fazda, 2-16 saatler arasında logaritmik fazda, 16-20 saatler arasında durağan fazda ve 20-25 saatler arasında ölüm fazında olduğunu bildirmiştir (Rieny, 2013). *L.acidophilus*'un

farklı suşları gelişim evrelerinin benzer saatlerde bulunduğu literatür çalışmalarında tespit edilmiş olup, tez çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Tez çalışmasında yapılan MİK ve MBK testleri sonucunda PSE'nin *L.acidophilus* LA-5 için bakteriyostatik ve bakterisidal konsantrasyonları belirlenmiştir. PSE'nin *L.acidophilus* LA-5 için MİK ve MBK değeri 5000 ppm (mg/L) olarak bulunmuştur. Akça vd. (2006), propolisin etanol ekstraktının *L.acidophilus* üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemiş ve çalışma sonunda propolisin etanol ekstraktının *L.acidophilus* için MİK ve MBK değerlerinin 512 µg/mL olduğunu bildirmişlerdir. Özen vd. (2010), Türkiye'nin farklı şehirlerinden toplanan propolis örneklerinin etanol ekstraktlarının *L.acidophilus* üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemiştir. Bartın, Erzincan, Artvin, Tekirdağ, Zonguldak ve Bursa'dan toplanan propolis örneklerinin etanol ekstraktlarının *L.acidophilus* için MİK değerlerinin 1,4 µg/mL ile 6,1 µg/mL arasında değişmekte iken MBK değerlerinin ise 1,4 µg/mL ile 12,1 µg/mL arasında değişmekte olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalar doğrultusunda *L.acidophilus*'un üzerinde antimikrobiyal etki gösteren maddelerin etkin konsantrasyonlarının oldukça değişken olduğu ancak propolis ekstraktlarının test edilen diğer antibiyotik maddelerden daha az antimikrobiyal etkiye sahip olduğu sonucuna varılabilmektedir. Propolisin bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkilerinin test edildiği çalışmalar mevcuttur. Kacaniova (2012), propolisin etanol ekstraktının MİK değerlerini *Bacillus cereus* için 64 µg/mL, *Staphylococcus epidermis* için 128 µg/mL, *Escherichia coli* için 512 µg/mL olarak bildirmiştir. Literatürde propolisin su bazlı ekstraktlarının *L.acidophilus* LA-5 üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin incelendiği çalışmaların eksikliği görülmüştür. Çalışmalar genellikle propolisin etanol ekstraktları ile yapılmıştır.

Bu tez kapsamında PSE'nin 4T1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri *in vitro* olarak MTT testi ile incelenmiştir. Bu amaçla propolisin su bazlı ekstraktının 1000, 520, 500, 260, 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonları test edilmiştir. MTT analizinin sonuçları kullanılarak IC<sub>50</sub> değeri 129,25±1,90 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Literatürde propolisin 4T1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmaların eksikliği görülmüştür. Ancak propolisin etanol ekstraktlarının ve bazı aktif bileşenlerinin çeşitli kanser hücreleri üzerindeki *in*

*vitro* anti-tümör etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. Awale et al. (2008), MeOH ekstraktının insan pankreas kanser hücreleri (PANC-1) üzerindeki sitotoksik etkisini incelemiş ve 10 µg/mL konsantrasyonundaki propolis ekstraktının PANC-1 hücrelerinde %100 oranında nekroz tipteki morfolojik değişimler sonucu ölüm gözlemlendiği belirtmişlerdir. Carvalho et al. (2011), kanola yağı ile ekstrakte edilen propolisin 3 farklı kanser hücresi üzerindeki sitotoksik etkileri incelediklerinde IC<sub>50</sub> değerlerini; insan promiyelositik lösemi hücrelerinde (HL-60) 28,87 µg/mL, insan kolon kanser hücrelerinde (HTC-8) 40 µg/mL ve insan meme kanseri hücrelerinde (MDA/MB-435) 22,19 µg/mL olarak tespit etmişlerdir. Chen et al. (2004), ise benzer bir çalışmada Tayvan'a özgü 8 tip propolisten elde edilen etanol ekstraktlarının insan melanom hücrelerinde IC<sub>50</sub> değerlerinin 2-20 µg/mL konsantrasyonları arasında olduğunu belirtmiştir.

Propolisin farklı ekstraktlarının *in vitro* olarak anti-tümör etkiler göstermesinin yanı sıra propolisten izole edilen bazı bileşenlerin de benzer etkileri gösterdiği bilinmektedir. Grunberger et al. (1988), propolisin aktif bir bileşeni olan CAPE'nin insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) için IC<sub>50</sub> değerinin 5 µg/mL olarak tespit etmiş ve 10 µg/mL konsantrasyondaki CAPE'nin insan cilt melanom hücrelerinde (SK-MEL-28) %100 oranında inhibisyon sağladığını belirtmiştir. Bu tez çalışmasında görüldüğü üzere PSE'nin farklı konsantrasyonları 4T1 hücrelerinde sitotoksik etki sağlayabilmektedir. Popovic et al., (2012) immün sistem stimüle edici ve anti-tümör etkileri olduğu bilinen bir gıda destekleyicisinin (Korbazol) 4T1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemiş ve 250 gram korbazolun 595,24 mg propolis ve 1,07 gram polen içerdiği bildirilmiştir. Korbazolun 1:8, 1:16, 1:32 oranlarında seyreltilerek 4T1 hücrelerine direkt olarak uygulandığında 4T1 hücrelerinde sırasıyla %73, %40 ve %28 oranlarında ölüm gözlemlendiği belirtilmiştir. Ayrıca bu ürünün lösemik hücrelerde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Popovic et al., 2012). Literatürde propolisin içeriğinde bulunan CAPE gibi önemli bileşiklerin normal hücrelere zarar vermeden, mutasyona uğramış hücrelerin gelişimini inhibe edebildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Guarini et al., 1992; Rao et al., 1993). Tez çalışmasında kullanılan PSE'nin literatürdeki diğer sitotoksikite çalışmalarında elde edilen sonuçlardan daha yüksek konsantrasyonlarda IC<sub>50</sub> değeri oluşturması, su ekstraktı olmasından ileri gelmektedir. Su ekstraktları daha

az miktarda flavonoid içermektedir ve etken madde konsantrasyonu propolisin alkol ekstraktlarından daha düşüktür.

Tez çalışmasında PSE'nin 4T1 hücreleri için apoptotik etkilerinin incelenmesi amacıyla öncelikle PSE'nin 4T1 hücreleri için belirlenen  $IC_{50}$  değeri ve  $0,5 \times IC_{50}$  değeri tespit edilmiştir.  $IC_{50}$  değeri ve  $0,5 \times IC_{50}$  değeri propolisin su bazlı ekstraktının 4T1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini incelemek amacıyla yapılan akış sitometrisi analizinde test konsantrasyonları olarak seçilmişlerdir.  $IC_{50}$  değerinin ( $129,25 \pm 1,90 \mu\text{g/mL}$ ) 4T1 hücrelerinin %4,3'ünde proapoptoza, %3,3'ünde geç apoptoza ve %2,5'inde nekroza sebep olduğu görülmüştür.  $0,5 \times IC_{50}$  değeri ise 4T1 hücrelerinin %1,9'unda proapoptoza, %0,4'ünde geç apoptoza ve %0,4'ünde nekroza sebep olmuştur. Novak et al. (2014), Brezilya tipi propolisin etanol ekstraktının fare cilt melanomu (B16F10) üzerindeki apoptotik etkisini incelemiştir;  $10 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonundaki propolis ekstraktının hücrelerin %18,4'ünü apoptoza sürüklediğini ve  $50 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonundaki propolis ekstraktının hücrelerin %34,5'ini apoptoza, %68,5'ini ise nekroza sürüklediğini belirtmiştir. Choudhari et al. (2013), sitotoksosite analizinde elde ettikleri  $IC_{50}$  değerini ( $250 \mu\text{g/mL}$ ) kullanarak propolisin etanol ekstraktının Caco-2, HT-29 ve B16F1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini tespit etmiştir. Propolis ekstraktının Caco-2 hücrelerinin %99,3'ünü, HT-29 hücrelerinin %98'ini, B16F1 hücrelerinin ise %87,2'sini apoptoza sürüklediğini bildirmiştir. Ayrıca araştırmacılar çalışmalarında, nekroz tipte hücre ölümü görülmediğini de eklemiştir. Baliga et al., (2005) 4T1 hücrelerinin bir yeşil çay polifenolü olan epigallokateşin-3-gallatın (EPCGC) 4T1 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri olduğunu bildirmiş ve  $80 \mu\text{g/mL}$  EPCGC'nin 4T1 hücrelerinin %40,9'unu proapoptoza, %49,1'ini ise apoptoza sürüklediğini tespit etmişlerdir. Literatürdeki çalışmalarda düşük konsantrasyonlarda yüksek apoptotik etkilerin görünmesine rağmen bu tez çalışmasında test edilen PSE'nin 4T1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi oldukça düşük olarak tespit edilmiştir. PSE'nin etanol ekstraktlarından daha düşük apoptotik etkileri olmasının sebebi ürünün su bazlı ekstrakt olmasından ileri geldiği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında tüm deneme gruplarının ortalama vücut ağırlıkları incelendiğinde, deneme sonunda tüm grupların ağırlık kaybı yaşadığı tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ). En fazla ortalama ağırlık kaybı (3,13 gram) PSE+AS grubunda görülmüştür. En az ortalama ağırlık kaybı (0,17 gram) ise AS grubunda görülmüştür. Ağırlık kayıplarına oluşan tümörlerin sebep olduğu ve kanser hastalığının yıpratıcı özelliğinden ileri geldiği tahmin edilmektedir. Deneklerde önemli bir ağırlık kaybı görülmemiştir. Tedavi uygulamalarından ileri gelen olası toksik etkiler sebebiyle hiçbir fare ölümü olmamıştır. Orsolice et al. (2005), fare meme kanseri hücresi [MCA ( $1 \times 10^5$  hücre/mL)] enjekte edilen farelere 50 ve 150 mg/kg dozlarında enjeksiyon ile CAPE, kafeik asit ve suda çözünebilen propolis ekstraktı uygulamışlardır. Uygulamaya tabi tutulan farelerin hayatta kalma sürelerinin artırıldığını, tümör gelişimlerinin yavaşlatıldığını ve farelerin vücut ağırlıklarında azalma olmadığını bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada antikanser bir ilaç olan Irinotecan'ın (IRI) suda çözünebilen propolis ekstraktı veya propolisin etanol ekstraktı arasındaki sinerjistik etkisi incelenmiştir. Denemede Swiss ırkı erkek albino fareler kullanılmış ve Ehrlich tümör hücreleri  $1 \times 10^6$  hücre/fare olacak şekilde kas içine enjekte edilmiştir. Ardışık 3 gün boyunca farelere propolis ekstraktları (100 mg/kg) ve denemenin 1., 13., 19. günlerinde IRI (50 mg/kg) enjekte edilmiştir. Araştırmacılar toplam vücut ağırlığındaki artışın indirekt olarak tümör proliferasyonunu ifade ettiğini belirtmiş ve deneme sonunda yalnızca IRI uygulanan farelerdeki ortalama ağırlık artışı 12 gram iken, suda çözünebilen propolis ekstraktı uygulanan farelerde 3 gram, propolisin etanol ekstraktı uygulanan farelerde ise 4 gram olduğu bildirmiştir (Lisicic, 2014). Filho ve ark. (2014), tarafından fareler üzerinde yapılan çalışmada 9,10-dimetil-1,2-benzantrasin (DMBA) ile indüklenen cilt kanseri oluşturulmuştur. 16 hafta boyunca propolisin hidroalkolik ekstraktının (50 ve 100 mg/kg) gavaj olarak verilmesi ile tümör gelişiminin kısmen inhibe edilebildiği belirtilmiştir. Denemelerinin ilk 4 haftasında tüm deneme gruplarında ağırlık kaybı görülmüş ancak 16. haftada tüm gruplarda ağırlık artışı görülmüş olduğu ve deneme grupları arasında ağırlık farkı olmadığı bildirilmiştir. Gill et al. (2000), ise yaptıkları çalışmada bazı probiyotik bakteriler ile beslenen farelerdeki vücut ağırlıklarını incelemişlerdir. Fareler 28 gün boyunca  $10^8$  kob/mL içeren *L.acidophilus*, *L.rhamnosus* ve *Bifidobacterium lactis* süspansiyonları ile gavaj yoluyla beslenmiştir. Deneme gruplarında ağırlık artışının veya azalışının görülmediği

bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen vücut ağırlığı verileri, literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

Tez çalışmasında asidofilus sütünün ve PSE'nin kombine olarak ve ayrı ayrı *in vivo* olarak anti-tümör etkilerini incelemek amacıyla dişi Balb/c farelere  $2 \times 10^6$  hücre/fare olacak şekilde 4T1 hücreleri enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu takiben ardışık 14 gün boyunca farelere gavaj yoluyla PSE ve asidofilus sütü verilmiştir. Çalışma sonunda farelerdeki tümör boyutları ölçülüp, deneme gruplarının ortalama tümör hacimleri hesaplanmıştır. Çalışma boyunca metastaz gözlenmemiştir, tümör oluşumları yalnızca 4T1 hücrelerinin enjekte edildiği bölgede görülmüştür. K2 grubunun ortalama tümör hacmi  $131,75 \text{ mm}^3$  iken, PSE grubunun ortalama tümör hacmi  $53,81 \text{ mm}^3$ , AS grubunun ortalama tümör hacmi  $94,48 \text{ mm}^3$ , PSE+AS grubunun ortalama tümör hacmi  $48,23 \text{ mm}^3$  olarak hesaplanmıştır. Tümör hacimleri farelerin ortalama vücut ağırlıkları arasındaki oranların karşılaştırılması ile uygulamaların etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler K2 grubunun verileri ile karşılaştırılmıştır. Bu oranlar karşılaştırıldığında tümör gelişiminin en iyi baskılandığı grupların PSE+AS ve PSE grupları olduğu görülmüştür ( $P < 0,05$ ). Bu grupları takiben AS grubu tümör gelişimini baskılayıcı etki göstermiştir ( $P < 0,05$ ). Sonuçlar, hem PSE hem de AS ile beslenen gruptaki tümör gelişimini baskılayıcı etkinin PSE uygulamasından ileri geldiği tahmin edilmektedir.

Maroof ve Hasan (2012), 4T1 enjekte edilen Balb/c fareleri 15 gün boyunca gavaj yoluyla *L.acidophilus* vermiş ve *L.acidophilus* uygulanan grupta 15. günde görülecek şekilde tümör gelişiminin baskılandığı belirtilmiştir. Baliga et al. (2005), ise 4T1 hücreleri enjekte edilen farelere oral yol ile %0,2 ve %0,5 oranlarında seyreltilmiş EPCGC uygulanması sonucunda, 30 gün sonra tümör hacimlerinin %32-42 arasında azaldığını bildirmişlerdir. Novak et al. (2014), ise B16F10 hücreleri enjekte edilen farelere günde 10 mg/kg dozda propolis enjekte etmiş ve kontrol grubunda  $85,7 \text{ mm}^3$  olan ortalama tümör hacminin propolis uygulanan grupta  $57,2 \text{ mm}^3$ 'e düşürüldüğünü bildirmiştir. Inoue et al. (2008), fare kanser hücreleri ( $4 \times 10^6$  hücre/mL) enjekte edilen deneklere enjeksiyondan 24 saat sonra gavaj yolu ile 320 mg/kg ve 960 mg/kg dozlarında suda çözünebilen

propolis ekstraktını, 10 gün boyunca günde 5 defa olacak şekilde uygulamıştır. Deneme sonunda kontrol grubunun ortalama tümör ağırlığının 700 mg iken 320 mg/kg propolis uygulanan grupta 70 ve 960 mg/kg propolis uygulanan grupta 50 mg olduğu bildirmiştir. Yazdi et al. (2010), ise *L.acidophilus*'un kanserden koruyucu etkisini incelemek amacıyla Balb/c farelere 14 gün boyunca gavaj yoluyla *L.acidophilus* süspansiyonu uygulamış ve 14. günün sonunda fare meme kanseri hücreleri enjekte etmişlerdir. Enjeksiyondan sonraki 7 gün boyunca *L.acidophilus* süspansiyonu uygulamasına devam etmiş ve sonuç olarak kontrol grubunun ortalama tümör hacminin 5,47 cm<sup>3</sup> iken *L.acidophilus* alan grupta 3,6 cm<sup>3</sup> olduğu belirtilmiştir. Baliga et al. (2005), ise 7 gün boyunca farelerin içme sularına %0,2 ve 0,5 (w/v) oranlarında yeşil çay polifenolü eklemiştir. 7. gün sonunda farelerin sırt bölgesine 10<sup>4</sup> ve 10<sup>6</sup> hücre/fare olacak şekilde 4T1 hücreleri enjekte edip fareleri yüksek risk grubu ve alçak risk grubu olarak 2 gruba ayırmışlardır. Polifenol uygulaması deneme sonunda kadar devam etmiştir ve deneme sonucunda oluşan tümör hacimlerinin %0,2'lik polifenol uygulamasında %32, %0,5'lik polifenol uygulamasında %42 oranında azaldığını belirtmişlerdir. Literatürde PSE ve asidofilus sütünün birlikte kullanıldığı bir çalışmanın bulunmadığı tespit edilmiştir ancak bu iki bileşenin uygulama dozları ve süreleri bakımından sonuçların literatürdeki farklı çalışmalar ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında yapılan *in vivo* denemelerin sonunda, farelerin anestezi altında sakrifiye edilmesinin ardından dalakları toplanmıştır ve farklı mitojenler (LPS, ConA, PHA, inaktif *L.acidophilus* LA5) ile indüklenen splenositlerin proliferasyonları MTT testi ile belirlenmiştir. Proliferasyon derecesi stimülasyon indeksi (SI) ile ifade edilmiştir. LPS ile indüklenen hücrelerin proliferasyon dereceleri karşılaştırıldığında en yüksek SI değeri PSE ve PSE+AS gruplarında elde edilmiştir (P<0,05). K2 ve AS gruplarının SI değerleri ile K1 grubunun SI değeri arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (P<0,05). ConA ile indüklenen hücrelerin proliferasyon dereceleri karşılaştırıldığında en yüksek SI değerleri PSE, AS ve PSE+AS gruplarında elde edilmiştir (P<0,05). K2 grubunun SI değeri ile K1 grubunun SI değeri arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (P<0,05). PHA ile indüklenen hücrelerin proliferasyon dereceleri karşılaştırıldığında en yüksek SI değerleri AS ve PSE+AS gruplarında elde

edilmiştir, bu iki grubu takiben PSE grubunun SI endeksi sıralanmaktadır (P<0,05). K2 grubunun SI değeri ile K1 grubunun SI değeri arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (P<0,05). İnaktif *L.acidophilus* LA-5 hücreleri ile indüklenen hücrelerin proliferasyon dereceleri karşılaştırıldığında en yüksek SI değeri PSE grubunda elde edilmiştir (P<0,05). PSE grubunu takiben PSE+AS grubunun SI değeri sıralanmaktadır. K2 ve AS gruplarının SI değerleri ile K1 grubunun SI değeri arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (P<0,05).

Maroof ve Hasan (2012), 4T1 enjekte edilen Balb/c farelere 15 gün boyunca gavaj yoluyla  $2 \times 10^8$  kob/mL *L.acidophilus* uygulamışlardır. Deneme sonunda grupların dalak hücrelerinin proliferasyonlarını MTT analiziyle belirlemiş ve kontrol grubunun stimülasyon indeksinin 0,8 iken *L.acidophilus* uygulanan grubun stimülasyon indeksinin 2,1 olduğunu belirtmiştir. Aynı kanser hücre hattı kullanılmış olan bu çalışmada splenositlerin stimülasyon indeksleri *L.acidophilus* kullanımı ile ancak 2,1 iken bu tez çalışmasında *L.acidophilus*, su bazlı propolis ekstraktı ile desteklenmiş ve stimülasyon indeksinin 3,6'ya ulaşabildiği tespit edilmiştir. Takahashi et al. (1993), 6 hafta boyunca farelere gavaj yolu ile uygulanan *B.longum* ve *L.acidophilus*' un splenosit proliferasyonuna olan etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonunda *B.longum* ile beslenen grubun splenositlerinde proliferatif bir yanıt gözlenmediği ancak *L.acidophilus* ile beslenen grubun splenositlerinin stimülasyon indeksinin kontrol grubundan yüksek olduğu belirtilmiştir. Yazdi et al. (2010), *L.acidophilus*'un kanserden koruyucu etkisini incelemek amacıyla Balb/c farelere 14 gün boyunca gavaj yoluyla *L.acidophilus* süspansiyonu uygulamış ve 14. günün sonunda fare meme kanseri hücresi enjekte etmişlerdir. Enjeksiyondan sonraki 7 gün boyunca *L.acidophilus* süspansiyonu uygulamasına devam etmiş ve sonuç olarak *L.acidophilus* uygulanan gruptaki splenositlerin stimülasyon indeksinin 1,3, PBS uygulanan kontrol grubunda bu değer 1,05 olduğunu belirtmişlerdir. Gill et al. (2000), ise yaptıkları çalışmada bazı probiyotik bakteriler ile beslenmenin farelerin splenositlerinde oluşturduğu proliferatif etkiyi incelemişlerdir. Fareler 28 gün boyunca  $10^8$  kob/mL içeren *L.acidophilus*, *L.rhamnosus* ve *Bifidobacterium lactis* süspansiyonları ile gavaj yoluyla beslenmiştir. 10. ve 28. günlerde *B.lactis* alan grubun ConA ile uyarılan dalak hücrelerinin proliferatif yanıtının kontrolden daha yüksek olduğu ancak 10. günde *L.acidophilus* veya *L.rhamnosus* alan grubun ConA ile uyarılan dalak

hücrelerinin proliferatif yanıtının kontrolden farkının olmadığı bildirilmiştir. Denemenin 28. gününde yapılan analizde ise *L.acidophilus* veya *L.rhamnosus* alan grupların dalak hücrelerinin yüksek proliferatif yanıt gösterdiği belirtilmiştir. Literatürdeki mevcut çalışmalar incelendiğinde probiyotik bakterilerin immün sistem modülasyonu gibi beklenen yararlı sağlık etkilerini göstermeleri amacıyla oral alınımın sürelerinin etkili olduğu ve uzun vadede bu etkileri sağlayabildiği görülmektedir. Nunes et al. (2003), propolis ekstraktının (100 µg/mL) ConA ile uyarılan fare splenositleri ile direkt olarak etkileşimi sonucunda splenosit proliferasyonunda %35 oranında inhibisyon tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar propolis uygulaması ile aktive olabilen makrofajların, lenfosit proliferasyonunda antiproliferatif etki gösteren nitrik oksit salgılamış olabileceklerini ve bu mekanizma ile tespit edilen sonucun görüldüğünü belirtmişlerdir. Literatürdeki çalışmalar ile tez çalışmasında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, probiyotiklerin splenosit proliferasyonunu benzer seviyelerde stimüle ettiği ancak bu uygulamanın PSE ile desteklendiğinde çok daha fazla proliferatif etki görülebildiği tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında tüm deneme gruplarının dalakları toplanmıştır ve dalak hücre kültürü inaktif *L.acidophilus* LA-5 ile indüklenmiştir. Toplam T hücrelerinin dalak hücre kültüründeki yüzdesi ve IFN- $\gamma$  salgılayan CD8+ T hücrelerinin yüzdesel oranları akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Toplam T hücrelerinin en yüksek yüzde oranı PSE+AS grubunda tespit edilmiştir (P<0,05). PSE+AS grubunu takiben PSE ve AS grubu sıralanmıştır (P<0,05). K2 ve K1 grubundaki veriler arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (P<0,05). IFN- $\gamma$  salgılayan CD8+ T hücrelerinin en yüksek yüzde oranı PSE+AS grubunda tespit edilmiştir (P<0,05). P+AS grubunu takiben sırasıyla K2 grubu ile AS grubu sıralanmıştır (P<0,05). İndüklenen toplam T hücreleri yalnızca CD8+ T hücrelerinden oluşmamaktadır. Bu hücre popülasyonu içerisinde indüklenen CD4+ T hücreleri de bulunabilmektedir. Tümör hacimleri ve CD8+ T hücrelerinin yanıtı karşılaştırıldığında, tümör gelişiminin baskılanmasında uygulama sonunda CD8+ T hücrelerinin haricinde NK hücreleri gibi diğer hücrel mekanizmaların da indüklendiği sonucuna varılabilmektedir.

Park et al. (2004), CAPE'nin immün sistem üzerindeki immünomodulatör etkisini incelemek amacıyla 14 gün boyunca Balb/c farelere oral olarak 5, 10 ve 20 mg/kg dozlarda CAPE uygulamıştır. CAPE'nin 20 mg/kg doz uygulanan grubun LPS ile uyarılan B lenfositlerin proliferasyonunda etkisi olmadığı ancak T lenfositlerin proliferasyonunda artış sağladığı ve 20 mg/kg dozda uygulanan CAPE'nin IFN- $\gamma$  salgılanmasını indüklediği belirtilmiştir. Aynı çalışma kapsamında 20 mg/kg dozda CAPE uygulaması ile CD8 T lenfositlerinde uyarılma sağlanmadığı ancak CD4 T lenfositlerinde uyarılmanın %3 oranda artırıldığı belirtilmiştir. Maroof ve Hasan (2012), 4T1 enjekte edilen Balb/c farelere 15 gün boyunca gavaj yoluyla  $2 \times 10^8$  kob/mL *L.acidophilus* uygulamışlardır. *L.acidophilus* uygulanan grubun splenositlerinden IL-4 salgılanmasının azaldığını ve IFN- $\gamma$  salgılanmasının artırıldığını bildirmişlerdir. Gill et al. (2000), 28 gün boyunca  $10^8$  kob/mL içeren *L.acidophilus*, *L.rhamnosus* ve *Bifidobacterium lactis* süspansiyonları ile gavaj yoluyla beslenen farelerin splenositlerindeki değişimleri incelemiştir. Uygulamalarının ilk 10 gününde CD4 ve CD8 T lenfositlerinin proliferasyonunda anlamlı bir değişim sağlanmadığı ancak 28. günde CD4 T lenfositlerinin oranının %40-43 arasında, CD8 T lenfositlerinin oranının ise %14-15,82 arasında artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar *L.acidophilus* ve *L.rhamnosus* alan farelerin dalak hücrelerinde IFN- $\gamma$  salgılanmasının artırıldığını ancak *Bifidobacterium lactis* alan farelerin dalak hücrelerinde IFN- $\gamma$  salgılanmasında artış görülmediğini belirtmişlerdir. Nunes et al. (2003), 3 gün boyunca 2,5, 5, 10 mg/kg dozlarında hidroalkolik propolis ekstraktını enjeksiyon yolu ile Balb/c farelere uygulamışlardır. Farelerin dalak hücrelerinden salgılanan IFN- $\gamma$  miktarı ELISA ile ölçülmüş olup, propolis uygulamasının IFN- $\gamma$  salgılanmasını artırdığını tespit etmişlerdir. Tez çalışmasında bu kapsamda elde edilen sonuçlar, literatürdeki çalışmalardan daha düşük olarak belirlenmiştir. Benzer sonuçlar tez çalışmasında kullanılan PSE'nin su bazlı ekstrakt olmasından, alkol içermemesinden ve dolayısıyla alkol ekstraktlarından daha az flavonoid içermesinden ileri gelmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler propolis ve asidofilus sütü uygulamasının fare meme kanseri modelinde tümör gelişimini baskılayıcı etkileri

olduğunu göstermiştir. Bu çalışma yalnızca fare meme kanseri modeli üzerinde yapılmıştır ancak gelecek yıllarda çalışma farklı deney hayvanları hatta insanları kapsayacak şekilde geliştirilmeye açıktır. Tez çalışmasında *in vivo* denemeler; tümör kesitlerinin alınması ve biyokimyasal olarak incelenmesi, deneklerin kan örneklerinden ELISA ile sitokin ölçümlerinin yapılması gibi ek analizler ile ileride yapılabilecek çalışmalar ile daha kapsamlı olarak geliştirebilir.

Gelişen teknoloji ve yapılan çalışmalar sayesinde immünoterapi kanser tedavi yöntemlerine alternatif oluşturma potansiyeline sahiptir. Kanser tedavisinde her hastaya özel bir tedavi yaklaşımının daha etkin sonuçlar vermesi göz önüne alındığında, konağın kendi immün sistemini modüle ederek hastalıkların tedavi edilmesini sağlayan immünoterapinin gelecek yıllarda sıklıkla kullanılacağı düşünülmektedir. Bu kapsamda immünoterapötik etkileri olduğu kanıtlanan propolis ve asidofilus sütünün medikal kullanımının yaygınlaşabileceği düşünülmektedir. Antimikrobiyal, antifungal, antiviral, anti-tümör etkileri gibi yararları olduğu kanıtlanan arı ürünü propolis, farklı ülkelerde gıda takviyesi veya ilaç olarak adlandırılmaktadır. Türkiye’de bal, arı poleni, arı sütü gibi çeşitli arı ürünleri kullanılmaktadır buna rağmen propolis bu ürünlerden daha az bilinmekte veya tüketiciler tarafından diğer arı ürünleri ile karıştırılmaktadır. Ülkemizde zengin bir bitki örtüsü vardır ve arıcılık oldukça yaygındır. Oldukça yararlı bir arı ürünü olan propolisin daha çok tanıtılması gerekmektedir. Dünyada ve ülkemizde gerek geleneksel gerekse endüstriyel anlamda üretilen pek çok fermente süt içeceği vardır. Bu gıdaların insan sağlığına olumlu birçok özelliği kanıtlanmıştır. Tüketici bilincinin artması ve dolayısıyla probiyotik gıdalara eğilimin artması fermente ürünlere ilginin de artmasını sağlamıştır. Artan bu ürün talebinin karşılanabilmesi için ülkemizdeki probiyotik ve prebiyotik ürün yelpazesinin artırılması gerektiği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S.,** 2015, Temel İmmünoloji, İmmün Sistemin İşlevleri ve Bozuklukları, (Çev. G. Deniz ve Y. Camcıoğlu), Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 190-194.
- Akca, A.E., Akca, G., Topçu, F.T., Macit, E., Pıkdöken, L., Özgen, I.F.,** 2016, The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An *In Vitro* Study, *BioMed Research International* Volume 2016, 1-8.
- Akın, N.,** 2006, Modern Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Konya.
- Akpınar, A.,** 2008, Değişik Aroma Maddeleri Eklenecek Üretilen Asidofiluslu Sütün Özellikleri, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Bornova, İzmir.
- Anonim,** 2009, TÜRK GIDA KODEKSİ FERMENTE SÜT ÜRÜNLERİ TEBLİĞİ YÖNETMELİĞİ, yayımlandığı resmi gazete: 16 Şubat 2009-27143.
- Anonim,** 2013, Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/49-meme-kanseri.html>, (Erişim tarihi: 20.06.2017)
- Anonim,** 2016a, 4T1 cell line, [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx?geo\\_country=tr#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx?geo_country=tr#characteristics) (Erişim tarihi: 28.06.2017)
- Anonim,** 2016b, Propolis, <http://www.adanaaricilarbirliigi.org/propolis/> (Erişim tarihi: 7.08.2017)
- Anonim,** 2017, Kanser, <http://kanser.gov.tr/> (Erişim tarihi: 29.06.2017)
- Anonymous,** 2012, CLSI and Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard M7-A9, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Fort Wayne, Ind, USA, 6th edition.
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, S.,** 1998. İmmunoloji, Medisan Yayınevi, Ulus, Ankara.

- Aslakson, C.J. and Miller, F.R.** 1992, Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 52:1399-1405.
- Atayoğlu, T.,** 2012. Apiterapi Açısından Arı Ürünlerinin Kalite Kriterleri ve Standardizasyonu. *Standard Ekonomik ve Teknik Dergi* (601): 68-73.
- Awale, S., Li, F., Onozuku, H., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S.,** 2008. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (2008) 181–189.
- Baliga, M.S., Meleth, S., Katiyar, S.K.,** 2005, Growth Inhibitory and Antimetastatic Effect of Green Tea Polyphenols on Metastasis-Specific Mouse Mammary Carcinoma 4T1 Cells *In vitro* and *In vivo* Systems, *American Association for Cancer Research*, Vol. 11, 1918–1927.
- Bankova, V.,** 2005, Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (2): 29–32.
- Barbaros, B., Dikmen, M.,** 2015. Kanser İmmünoterapisi, Erciyes Üni. Fen Bilimleri Ens. Dergisi 31(4): 177-181.
- Brown, A., Valiere, A.,** 2004. Probiotics and Medical Nutrition Therapy, *Nutr Clin Care.* 7(2): 56–68.
- Boudourova-Krasteva, G., Bankova, V., Sforcin, J.M., Nikolova, N., Popov, S.,** 1997, Phenolics from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung* (52): 676–679.
- Burdock, G.A.,** 1998, Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* (36): 347–363.
- Carlsson, G., Gullberg, B., Hafström, L.,** 1983, Estimation of Liver Tumor Volume Using Different Formulas, An Experimental Study in Rats, *Journal of Cancer Research Clinical Oncology* (105): 20-23.
- Carvalho, A.A., Finger, D., Machado, C.S., Schmidt, E.M., Costa, P.M., Alves, A.P.N.N., Morais, T.M.F., Queiroz, M.G.R., Quináia, S.P., Rosa, M.R., Santos, J.M.T., Pessoa, C., Moraes, M.O., Lotufo, L.V.C., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Torres, Y.R.,** 2011, *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis, *Food Chemistry* 126: 1239–1245.

- Castaldo, S., Capasso, F.,** 2002, Propolis, an old remedy used in modern medicine.
- Chandan, R.C.,** 2006., Manufacturing Yogurt and Fermented Milks. ISBN 0813823048. Sf:304 Blackwell Publishing.
- Chen, C.N., Weng, M.S., Wu, C.L., Lin, J.K.,** 2014, Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1(2)175–185.
- Choudhari, M.K., Haghniaz, R., Rajwade, J.M., Paknikar, K.,** 2013, Anticancer Activity of Indian Stingless Bee Propolis: An *In Vitro* Study, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2013, 1-10.
- Cuesta, A., Rodriguez, A., Angeles, M.,** 2005, *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses, *Fish & Shellfish Immun.* 18(1): 71-80.
- Danielsen, M., Wind, A.,** 2013, Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents, *International Journal of Food Microbiology* 82 (2003) 1– 11.
- De Castro, S.L.,** 2001, Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical Science* (3): 49–83.
- DeSantes, K. B., Sondel P. M., Orkin, S. H., Fisher, D. E., Look, A. T., Lux, S. E., Ginsburg, D., Nathan, D. G.,** 2009, Immunotherapy of Cancer, *Oncology of Infancy and Childhood*, 209-241.
- Dexter, D.L., Kowalski, H.M., Blazar, B.A., Fligel, Z., Vogel, R., and Heppner, G.H.,** 1978, Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 38:3174-3181.
- Doğan, N., Hayoğlu, İ.,** 2012, Propolis ve kullanım alanları, *HR.Ü.Z.F. Dergisi*, 16(3); 39-48.
- Food and Agriculture Organization (FAO), World Health Organization (WHO),** 2006, Probiotics in Food, Food and Nutrition Paper, Roma.
- Filho, R.N.P., Batista, F.S., Rieiro, D.R., Melo, G.C., Reis, F.P., Melo, A.U.C., Gomes, M.Z., Cardoso, J.C., Albuquerque Junior, R.L.C.,** 2014,

- Chemopreventive Effect of Brazilian Green Propolis on Experimental Dermal Carcinogenesis in Murine Model, *Int. J. Morphol.*, 32(2):522-530.
- Gardana, C., Barbieri, A., Simonetti, P., Guglielmetti, S.,** 2012, Biotransformation strategy to reduce allergens in propolis. *Applied and Environmental Microbiology* (78;13): 4654-4658.
- Gedik, Y.,** 2013, *Toxoplasma Gondu* Bradizoit Ve Takizoit Formlarına Özgü Adjuvante Multivalan Rekombinant Protein Aşısının Oluşturduğu İmmun Yanıt ve Korunmanın Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ghisalberti, E.L.,** 1979, Propolis: a review. *Bee World* (60): 59–84.
- Gill, H.S., K., Rutherford, J., Prasad, J., Gopal, P. K.,** 2000, Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019), *British Journal of Nutrition*, **83**, 167–176.
- Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E.M., Eφος, L., Caldwell, M., Estevez, V., Nakanishi, K.,** 1988, Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis, *Experientia* 44, 230-232.
- Guarini, L., Su, Z.Z., Zucker, S., Lin, J., Grunberger, D., Fisher, P.B.,** 1992, Growth inhibition and modulation of antigenic phenotype in human melanoma and glioblastoma multiforme cells by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Cell Mol Biol* 38:513–527.
- Hausen, B. M.,** 2005, Evaluation of the main contact allergens in propolis. *Dermatitis* 16(3): 127-9.
- Hepşen, İ.F., Tilgen, F., Er, H.,** 1996, Propolis: Tıbbi ve Oftalmolojik Kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 3(4): 386-391.
- Holzapel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld, J.H.J.,** 1998, *Overview of gut flora and probiotics*, *Intl J Food Microbiol*, 41: 85-101.
- Hui, Y.H.,** 2004, Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology books. ISBN 0824747801. Sf: 66-88
- Inoue, K., Saito, M., Kanai, T., Kawata, T., Shigematsu, N., Uno, T., Isobe, K., Liu, C.H., Ito, H.,** 2008, Anti-Tumor Effects of Water-Soluble Propolis on a Mouse Sarcoma Cell Line *In Vivo* and *In Vitro*, *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 36, No. 3, 625–634.

- Itsaranuwat, P., Hal-Haddad, K., Robinson, R.K.,** 2003, The Potential Therapeutic Benefits of Consuming ‘health-promoting’ Fermented Dairy Products: A Brief Update. *International J. Of Dairy Tech.* Vol. 56 No:4: 203-208.)
- Jasprica, I., Mornar, A. Debeljak, Z., Bubalo, A.A., Sarić, M., Mayerc, L., Romić, Z., Bucan, K., Balog, T., Sobocanec, S., Sverko, V.,** 2007, *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells, *Journal of Ethnopharmacology* (110): 548–554.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D.,** 2011, Global Cancer Statistic, CA: *A Cancer Journal for Clinicians*(61):69-90.
- Kacaniova, M., Rovna, K., Arpasova, H., Cubon, J., Hleba, L., Pochop, J., Kunova, S., Hascik, P.,** 2012, *In vitro* and *In vivo* antimicrobial activity of propolis on the microbiota from gastrointestinal tract of chickens, *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 47, 1665–1671.
- Kailasapathy, K., Chin, J.** 2000, Survival and Therapeutic Potential of Probiotic Organisms with Reference to *Lactobacillus Acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology* 78(1): 80-88.
- Kano, A.,** 2015, Tumor cell secretion of soluble factor(s) for specific immunosuppression, *SCIENTIFIC REPORTS* (5) : 8913, 1-8.
- Kasote, D., Suleman, T., Chen, W., Sandasi, M., Vijoan, A., Vuuren, S.V.,** 2014, Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis, *Biochemical Systematics and Ecology* (55): 156-163.
- Kılıç, S.,** 2001, Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:542.
- Klein, G., Pack, A., Bonnaparte, C., Reuter, G.,**1998, Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria, *Int J Food Microbiol*, 41: 103-125.
- Kosikowski, F.V., Mistry, V.V.,** 1997, Cheese and Fermented Milk Foods-Origins and Principles, Vol.1, Published By E.Y. Kosikowski – L.L.E., Westport, Connecticut, U.S.A. 87-108.
- Krell, R.,** 1996, Value-added products from beekeeping, Chapter 5, [www.fao.org](http://www.fao.org) (Erişim tarihi: 28.07.2017)
- Kumova, U., Korkmaz, A., Avcı, B.C., Ceyran, G.,** 2002, Önemli bir arı ürünü: Propolis, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, Mayıs.

- Kun Lee, Y., Fai Wong, S.** 1998, Stability of Lactic Acid Bacteria of Fermented Milk. *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. Second Edition., 103-113.
- Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Gansler, T., Courneya, K.,** 2012, American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity, *Cancer journal for clinicians*, 62:1, 30-67.
- Liong, M.T., Shah, N.P.,** 2005, Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains, *J Dairy Sci* 88: 55-66.
- Lisicic, D., Benkovic, V., Dikic, D., Blazevic, A.S., Mihaljevic, N.O., Knezevic, A.H.,** 2014, Addition of Propolis to Irinotecan Therapy Prolongs Survival in Ehrlich Ascites Tumor-Bearing Mice, *CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICALS* Volume 29, Number 2: 62-69.
- Marcucci, M.C.,** 1995, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* (26): 83–99.
- Markham, K.R., Mitchel, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A., Lu, Y.,** 1995, HPLC and GS-MS Identification of the Major Organic Constituents in New Zealand Propolis. *Phytochemistry* (42;1): 205-211.
- Maroof, H., Hassan, Z.M.,** 2012, *Lactobacillus acidophilus* Could Modulate the Immune Response Against Breast Cancer in Murine Model, *Journal of Clinical Immunology*, June 2012.
- Marteau, P., de Vrese, M., Cellier, C.J., Schrezenmeir, J.,** 2001, Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 73, 430S–436.
- Mayer, G., Nyland, J.,** 2016, Spesifik immün yanıtta hücre – hücre etkileşimleri, <http://www.microbiologybook.org/Turkish-immunol/immunolchapter12turk.htm> (Erişim tarihi: 20.07.2017)
- Mosmann, T.,** 1983, Rapid colourimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Muehlbauer, P., Burke, M., Wilkes, G.,** 2006, Biologic Therapy for Cancer Treatments, *Cancer Therapies*: 117-180.

- Muramalle, T., Aryana, K.J.**, 2011, Some low homogenization pressures improve certain probiotic characteristics of yogurt culture bacteria and *Lactobacillus acidophilus* LA-K. *J Dairy Sci* 94: 3725-3738.
- Nalbantsoy, A., Nesil, T., Erden, S., Çalış, İ., Bedir, E.**, 2011, Adjuvant effects of Astragalus saponins Macrophyllosaponin B and Astragaloside VII, *Journal of Ethnopharmacology* (134): 897–903.
- Novak, E.M., Silva, M.S.C., Marcucci, M.C., Sawaya, A.C.H.F., López, B.G.C., Fortes, M.A.H.Z., Giorgi, R.R., Marumo, K.T., Rodrigues, R.F., Maria, D.A.**, 2014, Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An *in vitro* and *in vivo* study, *Journal of Functional Foods* (11):91–102.
- Nunes, A.S., Faccioli, L.H., Sforcin, J.M.**, 2003, Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- $\gamma$  production, *Journal of Ethnopharmacology* 87: 93–97.
- Orsolic, N., Terzic, S., Mihaljevic, Z., Sver, Z., Basic, I.**, 2005, Effects of Local Administration of Propolis and Its Polyphenolic Compounds on Tumor Formation and Growth, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28(10): 1928—1933.
- Orsolic, N., Knezevic, A. H., Sver, L., Terzic, S., Basic, I.** (2004). Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 307–315.
- Özbal, Y.**, 2000, Temel İmmünoloji. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nobel Tıp Kitabevleri, Çapa, İstanbul.
- Özden, A.**, 2013, Probiyotik, “Sağlıklı Yaşam İçin Yararlı Dost Bakteriler”, *Güncel Gastroenteroloji* 22-17/1, s: 22-38.
- Özen, T., Kılıç, A., Bedir, O., Koru, Ö., Sorkun, K., Tanyuksel, M., Kılıç, S., Gençay, Ö., Yıldız, O., Baysallar, M.**, 2010, *In Vitro* Activity of Turkish Propolis Samples Against Anaerobic Bacteria Causing Oral Cavity Infections, *Kafkas Univ Vet Fak Derg RESEARCH ARTICLE* 16 (2): 293-298.
- Özer, B.**, 2006, Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği. Toprak Ofset.

- Özyurt, H., Ötleş, S.,** 2014, Prebiyotikler: Metabolizma İçin Önemli Bir Gıda Bileşeni, *Akademik Gıda* 12(1), 115-123.
- Park, J.H., Leea, J.K., Kima, H.S., Chunga, S.T., Eoma, J.H., Kima, K.A., Chunga, S.J., Paikb, S.Y., Oha, H.Y.,** 2004, Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice, *International Immunopharmacology* 4 : 429–436.
- Parvez, S.,Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y.,** 2006, Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *Journal of Applied Microbiology* (100 ):1171–1185.
- Pehlivan, T., Şahinler, N., Gül, A.,** 2012, Doğal bir ürün propolis; yapısı ve kullanım alanları, *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 4(7): 9-13.
- Popovic, S., Baskic, D., Zelen, I., Djurdjevic, P., Zaric, M., Avramovic, D., Arsenijevic, N.,** 2012, THE CYTOTOXICITY OF KORBAZOL AGAINST MURINE CANCER CELL LINES, *Ser J Exp Clin Res*; 13 (2): 62-67.
- Rao, C.V., Desai, D., Simi, B., Kulkarni, N., Amin, S., Reddy, B.S.,** 1993, Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res* 53:4182–4188.
- Rieny, S.S.,** 2013, The Influence of Culture Age and Soaking Time Range with Filtrate *Lactobacillus Acidophilus* toward the Number of Coliform Bacteria in Swordfish (*auxis rochei*) Stew, *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* Vol.3, No.4: 77-84.
- Robinson, R.K., Tamime, A.Y.,** 1990, In Dairy Microbiology-The Microbiology of Milk Products. Vol2,2nd Editian, Ed. By Robinson R.K.,Elsevier Applied Science Publishers, London, 291- 343.
- Sauer, A. G., Siegel, R. L., Jemal, A., Fedewa, S.,** 2017, Updated review of prevalence of major risk factors and use of screening tests for cancer in the United States, *American Association for Cancer Research*, 1-9.
- Savaiano, D., Abouelanouar, A., Smith, E.D., Levitt, D.M.,** 1984, Lactose Malabsorption from Yogurt, Pasteurized Yogurt, Sweet *Acidophilus* Milk and Cultered Milk in Lactase Deficent Individuals. *Am.J.Clin.Nutr.* 40: 1219-1223.

- Schaafsma, G., Meuling, W.J.A., Dokkum, W., Bouley, C.,** 1998, Effects of a Milk Product, Fermented by *Lactobacillus acidophilus* and Fructooligosaccharides Added, on Blood Lipids in Male Volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition* (1998)52, 436-440.
- Sforcin, J.M.,** 2007, Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* (113): 1–14.
- Sforcin, J.M., Funari, S.R.C., Novelli, E.L.B.,** 1995, Serum biochemical determinations of propolis-treated rats, *J Venom Anim Toxins*.(1): 31-37.
- Şengül, A.,** 2008, Hücresel İmmün Yanıt, *Türkiye Klinikleri Enfeksiyon Hastalıkları Özel Dergisi*, 1(2): 19-22.
- Takahashi, T., Oka, T., İwana, H., Kuwata, T., Yamamoto, Y.,** 1993, Immune Response of Mice to Orally Administered Lactic Acid Bacteria, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (9), 1557-1560.
- Tannis, A.,** 2008, Probiotic rescue: how you can use probiotics to fight cholesterol, cancer, superbugs, digestive complaints and more, Friesens, Canada.
- TSE;** ICS 65.140 Türk Standardı; TS 12910/Ocak 2003.
- Üçüncü, M.,** 2013, Süt ve Mamülleri Teknolojisi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Meta Basım, İzmir.
- Walgrave, S.E., Warshaw, E.M., Glesne, L.A.,** 2005. Allergic contact dermatitis from propolis, *Dermatitis* (16): 209-215.
- Wang, M., Yin, B., Wang, H. Y., Wang, R.,** 2014, Current Advances in T-Cell Based Cancer Immunotherapy, Future Medicine, *Immunotherapy* 6(12):1265-1278.
- Yaygın, H.** 1999, Yoğurt Teknolojisi. Akdeniz Üniversitesi Basımevi Antalya.
- Yaygın, H., Kılıç, S.,** 1993, Süt Endüstrisinde Saf Kültür. Altındağ Matbaacılık.
- Yazdi, M.H., Dallal1, M.M.S., Hassan, Z.M., Holakuyee, M., Amiri, S.A., Abolhassani, M., Mahdavi, M.,** 2010, Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* induces IL-12 production in spleen cell culture of BALB/c mice bearing transplanted breast tumour, *British Journal of Nutrition* (104): 227–232.
- Yılmaz, L., Yılsay, T.Ö., Bayizit, A.A.,** 2004, Propolisin Kimyasal Bileşimi, Biyolojik Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi* (6).

**Yu, A.Q., Li, L.,** 2016, The Potential Role of Probiotics in Cancer Prevention and Treatment, *Cancer Prevention and Treatment, Nutrition and Cancer*, 68:4, 535-544.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Elif ONUR, Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olup 31 Ocak 1993 tarihinde Köln'de doğmuştur. İlköğretim ve lise eğitimini İstanbul'da tamamlamıştır. 2011 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimine başlamıştır. 2015 yılında lisans eğitimini tamamlamış ve aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mikrobiyolojisi Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Bu tez çalışması kapsamında Ekim 2017'de 4. Ulusal Bağırsak Mikrobiyotası ve Probiyotik Kongresi'nde ve Aralık 2017'de 1. Ulusal Apiterapi Kongresi Türkiye Ukrayna Apiterapi Zirvesi'nde poster sunumu yapılmıştır.

