

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PROPOLİS ALT FRAKSİYONLARININ ANTİBİYOFİLM VE
ANTİKANSER ETKİLERİNİN AYDINLATILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARID NASIRLI

DENİZLİ, HAZİRAN 2020

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**PROPOLİS ALT FRAKSİYONLARININ ANTİBİYOFİLM VE
ANTİKANSER ETKİLERİNİN AYDINLATILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

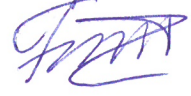
FARID NASIRLI

DENİZLİ, HAZİRAN 2020

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2019FEBE017 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

FARID NASIRLI



ÖZET

**PROPOLİS ALT FRAKSİYONLARININ ANTİBİYOFİLM VE
ANTİKANSER ETKİLERİNİN AYDINLATILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARID NASIRLI
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)**

DENİZLİ, HAZİRAN - 2020

Bu çalışmada Cezayir'in Mila ve Skikda bölgesine ait iki propolisin alt fraksiyonlarının (petrol eter, kloroform, etil asetat ve metanol) antibiyofilm ve antikanser etkileri araştırılmıştır. Antibiyofilm aktivite kristal viyole yöntemine göre belirlenmiştir. Sonuçlara göre, Mila propolisi Skikda propolisinden daha güçlü antibiyofilm aktiviteye sahiptir. En yüksek antibiyofilm aktiviteye 200 µg/ml metanol fraksiyonuyla (%92) ulaşılmıştır. Skikda propolisinin etil asetat fraksiyonunun denenen konsantrasyonlarda herhangi bir antibiyofilm aktivitesi görülmemiştir. Antibiyofilm aktivite sonuçları floresan mikroskop görüntüleri ile de doğrulanmıştır. Floresan mikroskop analizine göre propolis ile muamele edilmiş bakteriyel biyofilm yapısının bozulduğu ve kontrol biyofilm yapısında görülen su kanallarının da olmadığı görülmüştür. Ayrıca floresan boyama ile biyofilm içindeki ölü hücre sayısında artış olduğu da tespit edilmiştir. FTIR analizine göre, propolisin hücre yüzeyindeki makromoleküllerde bazı değişikliklere yol açtığı bulunmuştur. Propolisin sitotoksik aktivitesi MTT testi ile saptanmıştır. Mila kaynaklı propolisin EC₅₀ değeri 97-117 µg/ml iken Skikda propolisininki 67-108 µg/ml arasındadır. Cezayir propolisi, MDA-MB-231 hücre hattında tümör supresyonu ile ilişkili proteinlerin mRNA düzeylerinde belirgin derecede artışa neden olmuş ve apoptozu indüklemiştir. Bu sonuç Western blot ile de doğrulanmıştır. Sonuç olarak Cezayir propolisinin antikanser ve antibiyofilm etkili bileşiklere sahip olduğu söylenebilir.

ANAHTAR KELİMELEER: Antibiyofilm, antikanser, Cezayir propolisi, MDA-MB-231 hücre hattı, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIBIOFILM AND ANTICANCER EFFECTS OF PROPOLIS SUBFRACTIONS

MSc THESIS

FARID NASIRLI

**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY**

(SUPERVISOR: PROF. DR. NAZIME MERCAN DOGAN)

DENİZLİ, JUNE 2020

In this study, the antibiofilm and anticancer effects of propolis subfractions (petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and methanol) collected from the Mila and Skikda region of Algeria were investigated. The antibiofilm activity was determined by the crystal violet assay test. The results of antibiofilm activity showed that Mila propolis had stronger antibiofilm activity than Skikda propolis. The highest antibiofilm activity was obtained at 200 µg/ml methanol fraction (92%). It was not observed any antibiofilm activity in all assayed the concentrations of ethyl acetate fraction of Skikda propolis. Results were confirmed by fluorescent microscope images. According to the fluorescent microscope images, it was observed that the bacterial biofilm structure treated with propolis was disrupted and there were no water channels in the control biofilm structure. Moreover, an increase in number of dead cells in the biofilm was detected with fluorescent staining. According to FTIR analysis, it was found that propolis caused some changes in the macromolecules on cell surface. The cytotoxic activity of propolis was determined by the MTT test. While the EC50 values of propolis subfractions from Mila were in between 97 and 117 µg / ml, that of Skikda propolis was found in between 67 and 108 µg / ml. Algerian propolis caused a significant increase in mRNA levels of tumor suppressor genes and induced apoptosis in cell line. These results were confirmed by Western blot. All of these results showed that Algerian propolis contain effective compounds that has anticancer and antibiofilm activities.

KEYWORDS: Antibiofilm, anticancer, Algerian propolis, MDA-MB-231, *Staphylococcus aureus*.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Biyofilm Tanımı.....	2
1.2 Biyofilm Yapısı.....	2
1.2.1 Ekzopolisakkarit	3
1.3 Biyofilm Oluşum Basamakları	4
1.4 Biyofilm Oluşum Nedenleri ve Yarattığı Sorunlar	6
1.4.1 Biyofilm`in Sağlık Alanında Yarattığı Sorunlar	7
1.5 <i>Staphylococcus</i> Cinsi Bakterilerinin Patojenitesi ve Biyofilm Mekanizması	9
1.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> Bakterisinin Patojenitesi ve Biofilm Mekanizması.....	11
1.6 Kanser	13
1.7 Apoptoz.....	15
1.7.1 Bcl-2 Protein Ailesi	16
1.7.2 Kazpaz Ailesi	17
1.7.3 Apoptoz Mekanizmaları	18
1.8 Hücre Döngüsünü Düzenleyen Proteinler	20
1.9 P53 Geni.....	20
1.10 Meme Kanseri.....	21
1.10.1 Meme Yapısı ve Anatomisi	21
1.10.2 Meme Kanserinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	22
1.10.3 Meme Kanseri Evreleri	23
1.10.4 Meme Kanseri Tipleri	24
1.11 Propolis Oluşumu ve Tanımı	25
1.11.1 Propolis`in Kimyasal İçeriği	27
2. MATERYAL ve METOD.....	29
2.1 Malzemeler	29
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	29
2.1.2 Kullanılan Cihazlar	29
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Propolis Örnekleri ve Temin Edildikleri Kaynaklar.....	30
2.1.4 Çalışmada Kullanılan Bakteriler.....	31
2.1.5 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı	31
2.1.6 Çalışmada Kullanılan Primerler.....	31
2.1.7 Çalışmada Kullanılan Antikorlar	32
2.2 Metod.....	33
2.2.1 Antibiyofilm Aktivite Tayini	33

2.2.2	Hücre Hareketliliği Swimming (yüzme hareketi) ve Swarming (kayma hareketi) İnhibisyonu	33
2.2.3	Floresan Mikroskop Analizi	34
2.2.4	FITR Analizi	34
2.2.5	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	34
2.2.6	Tripan Mavisini ile Hücre Sayımı.....	35
2.2.7	Sitotoksikite Analizi.....	35
2.2.8	MDA-MB-231 Hücre Hattından Total RNA İzolasyonu	36
2.2.9	Total RNA'nın Agaroz Jel Elektrophorezi ile Görüntülenmesi.....	37
2.2.10	RNA'nın Spektrofotometrik Analizi	37
2.2.11	cDNA Sentezi	38
2.2.12	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonları	38
2.2.13	MDA-MB-231 Hücre Hattında Apoptoz Tayini	40
2.2.14	Propolis Alt Fraksiyonların MDA-MB-231 Hücre Hattında Protein Ekspresyon Seviyesinin Tayini	40
2.2.14.1	RIPA Tamponu ile Protein İzolasyonu	40
2.2.14.2	Bikinkoninik Asit ile Protein Tayini	41
2.2.14.3	SDS-PAGE Elektrophorezi	42
2.2.14.4	Western Blot Analizi.....	42
3.	BULGULAR ve TARTIŞMA	45
3.1	Propolis Alt Fraksiyonlarının <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 Üzerine Antibiyofil Etkisi.....	45
3.2	Propolis Fraksiyonlarının Anti-kayma ve Anti-yüzme Aktivitesine Etkisi	51
3.3	Floresan Mikroskop ile Biyofilm Yapısının İncelenmesi.....	55
3.4	FTIR Analizi Sonuçları.....	58
3.5	Sitotoksikite Analizi.....	65
3.6	Propolis Fraksiyonların MDA-MB-231 Hücre Hattında Apoptoz Tayini	66
3.7	mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	68
3.7.1	Hücre Döngüsünü Düzenleyici Genler	69
3.7.2	Apoptoz Yolağı İle İlişkili Genler	71
3.7.3	P53 Geni	72
3.8	Western Blot Analizi.....	73
4.	SONUÇ ve ÖNERİ	81
5.	KAYNAKLAR.....	82
6.	ÖZGEÇMİŞ	96

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1: Taramalı Elektron Mikroskopuyla görüntülenen EPS yapısı.....	4
Şekil 1. 2: Staphylococcus aureus bakterisinin SEM görüntüsü	11
Şekil 1. 3: SarA düzenleyici ağı ve SarA promotor bölgesi	13
Şekil 1. 4: Şematik olarak hücrenin kanserleşmesinde 6 temel kural.....	15
Şekil 1. 5: Bcl-2 protein ailesinin yapısal domainleri.....	17
Şekil 1. 6: İç ve dış apaotoz yolları.....	19
Şekil 1. 7: Orta yaşlı kadının meme yapısı	22
Şekil 2. 1: MTT- nin Formazona dönüşümü	36
Şekil 2. 2: MDA-MB-231 hücre hattından toplam RNA izolasyonu.	37
Şekil 3. 1: Petrol eter (Mila, Cezayir; P1–P) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi	46
Şekil 3. 2: Kloroform (Mila, Cezayir; P1–K) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi	47
Şekil 3. 3: Etil asetat (Mila, Cezayir; P1–E) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi	47
Şekil 3. 4: Metanol (Mila, Cezayir; P1–M) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi	48
Şekil 3. 5: Petrol eter (Skikda, Cezayir; P2–P) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi	48
Şekil 3. 6: Kloroform (Skikda, Cezayir; P2–K) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi	49
Şekil 3. 7: Metanol (Skikda, Cezayir; P2–M) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi	49
Şekil 3. 8: Petrol eter (Mila, Cezayir) fraksiyonunun anti-kayma aktivitesi	52
Şekil 3. 9: Kloroform (Mila, Cezayir) fraksiyonunun anti-kayma ve anti-yüzme aktivitesi	53
Şekil 3. 10: Petrol eter (Skikda, Cezayir) fraksiyonunun anti-yüzme aktivitesi	54
Şekil 3. 11: Metanol (Skikda, Cezayir) fraksiyonunun anti-kayma aktivitesi	54
Şekil 3. 12: Staphylococcus aureus ATCC 29213 bakterisinin floresan mikroskobunda biyofilm yapısı.....	55
Şekil 3. 13: Propolis (Mila, Cezayir) ile muamele edilmiş S. aureus ATCC 29213'ün floresan mikroskopta biyofilm görüntüsü	56
Şekil 3. 14: Propolis (Skikda, Cezayir) ile muamele edilmiş S. aureus ATCC 29213'ün floresan mikroskopta biyofilm görüntüsü	57
Şekil 3. 15: Petrol eter (P1-P) ile muamele edilen S. aureus ATCC 29213'ün FTIR analizi.....	59
Şekil 3. 16: Kloroform (P1-K) ile muamele edilen S. aureus ATCC 29213'ün FTIR analizi.....	60
Şekil 3. 17: Etil asetat (P1-E) ile muamele edilen S. aureus ATCC 29213'ün FTIR analizi.....	61
Şekil 3. 18: Metanol (P1-M) ile muamele edilen S. aureus ATCC 29213'ün FTIR analizi.....	61

Şekil 3. 19: Petrol eter (P2-P) ile muamele edilen <i>S. aureus</i> ATCC 29213'ün FTIR analizi.....	62
Şekil 3. 20: Kloroform (P2-K) ile muamele edilen <i>S. aureus</i> ATCC 29213'ün FTIR analizi.....	63
Şekil 3. 21: Etil asetat (P2-E) ile muamele edilen <i>S. aureus</i> ATCC 29213'ün FTIR analizi.....	64
Şekil 3. 22: Metanol (P2-M) ile muamele edilen <i>S. aureus</i> ATCC 29213'ün FTIR analizi.....	64
Şekil 3. 23: P1-E, P1-M, P2-E ve P2-M propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında canlı, ölü, apoptotik yüzdesel (%) etki grafiği	67
Şekil 3. 24: P1-P, P1-K, P2-P ve P2-K propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında canlı, ölü, apoptotik yüzdesel (%) etki grafiği	67
Şekil 3. 25: Propolis fraksiyonları uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforozu	68
Şekil 3. 26: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) CyclinD'nin mRNA seviyesine olan etkisi	69
Şekil 3. 27: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) CDK4'ün mRNA seviyesine olan etkisi	70
Şekil 3. 28: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) hattında CDKN1A'nın mRNA seviyesine olan etkisi.....	70
Şekil 3. 29: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) hattında apoptoz yolağında ilişkili BCL-2 ve BAX genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi.....	71
Şekil 3. 30: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) Casp-3'ün mRNA seviyesine olan etkisi	72
Şekil 3. 31: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) P53'ün mRNA seviyesine olan etkisi.....	72
Şekil 3. 32: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden Casp-3'e protein seviyesinde olan etkisi.....	73
Şekil 3. 33: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden BAX'a protein seviyesinde olan etkisi.....	74
Şekil 3. 34: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden BCL-2'e protein seviyesinde olan etkisi.....	75
Şekil 3. 35: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden CDK-4'e protein seviyesinde olan etkisi.....	76
Şekil 3. 36: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden P53'e protein seviyesinde olan etkisi.....	77

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. 1: Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar ve yapışılan yüzeyler	9
Tablo 1. 2: Propolisin kimyasal içeriği	28
Tablo 2. 1: Propolis alt fraksiyonları ve kodları.....	30
Tablo 2. 2: Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.....	32
Tablo 2. 3: Kullanılan antikor listesi.....	32
Tablo 2. 4: Kuyulara yüklenen RNA ve marker konsantrasyonları.....	37
Tablo 2. 5: cDNA karışımı ve prosedürü	38
Tablo 2. 6: Gerçek zamanlı-PZR reaksiyon ortamı.....	39
Tablo 2. 7: Polimeraz zincir reaksiyon koşulları.....	40
Tablo 2. 8: Protein izolasyonunda kullanılan RIPA tampon içeriği.	41
Tablo 2. 9: Ayrıştırma ve yükleme jelinin hazırlanması	42
Tablo 2. 10: Yükleme tamponu 4X SDB	44
Tablo 3. 1: Propolis fraksiyonlarının sitotoksik dozu	66

SEMBOL LİSTESİ

⁰C : Celcius derecesi

M : Molaritre

mg : Miligram

ml : Mililitre

mm : Milimetre

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

OD : Optik dansite

dH₂O : Distile su

rpm : Dakikadaki devir sayısı

TSB : Tryptic soy broth

TSA : Tryptic soy agar

SDS : Sodyum dodesil sülfat

BSA : Bovine serum albumin

BCIP : 5-bromo-4-kloro-indol-fosfat

ATCC : Amerika tipi kültür koleksiyonu

RIPA : Radyo-immünopresipitasyon deneyi

PBS : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi

ALP : Alkalen Fosfataz

TEMED : Tetrametilendiamin

DMSO : Dimetilsulfoksit

MRSA : Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*

MSSA : Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus*

QS : Quorum sensing

FBS : Fetal sığır serumu

RPMI : Roswell Park Memorial Enstitü

NADPH : Nicotinamideadenine dinükleotid fosfat, indirgenmiş form

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında elde edilen her sonucun ve bilimsel bilginin yalnızca benim çabam ile değil, değerli hocalarımın ve laboratuvar arkadaşlarımdan destekleri sayesinde gerçekleştiğini belirtmek isterim.

Yüksek lisans eğitim dönemimin ilk gününden tezimin son aşamasına kadar yardımlarını esirgemeyen, engin bilgilerini en iyi şekilde aktaran değerli danışman hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN`a;

Çalışmalarım süresince, zaman ayırarak gerekli bilimsel bilgilerin edinilmesinde önemli katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Şevki ARSLAN`a;

Deneyler esnasında ve sonrasında arkadaşlığımızı sürdürdüğümüz, her zaman destek ve yardımlarını karşılıksız sunan değerli laboratuvar arkadaşlarım Naime Nur BOZBEYOĞLU`na, Doğukan MUTLU`ya, Buket KABALAY YILDIRIM`a, Nevin KAYA DİKİCİ`ye,

Tezimi yazma sürecimde beni sürekli destekleyerek, cesaretlendiren değerli arkadaşım Ceren ÖZTÜRK`e;

Ve son olarak her zaman arkamda olan annem Ulduz MAHARRAMOVA`ya ve babam İlgar MAHARRAMOV`a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

1. GİRİŞ

Bakterilerin ilaçlara geliştirdiği direnç enfeksiyon hastalıklarının ve salgınların ciddi boyutlara ulaşmasına neden olmuştur. Özellikle kimyasal antimikrobik maddelerin biyofilm özelliğine sahip bakteriler üzerinde etkisinin zor olması bir engeli daha ortaya çıkarmaktadır. *Staphylococcus aureus* gibi yüksek prevelansa sahip mikroorganizmalar, antimikrobik ajanlara karşı yüksek direnç geliştirme özelliğine sahiptirler. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından da öncelikli olarak araştırılması gereken bakteri grubunda yer alan *S. aureus*, insan vücudunda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu nedenle bakteriyel biyofilme nüfuz edebilen ve bakterinin etki mekanizmasını bozucu yönde doğal ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır (Dembogurski ve diğ. 2018). Aynı zamanda endüstrinin hızlı gelişmesiyle doğaya yüksek miktarda kimyasal atıklar atılmaktadır. Kirlenen hava, doğal gıda tüketimin azalması ve bunun gibi bazı ajanlar sayesinde en büyük hastalıklardan biri olan kansere yol açmaktadır. Kanser, çağımızın en büyük hastalıklarından biridir. Günümüzde kanserle mücadelede doğal ürünlerin etki mekanizmaları önemli araştırma konuları arasında yerini hızla almıştır. Doğal ürünler dediğimizde hem bitkilerin hem de bitki ürünlerini kullanan canlıların, çeşitli kimyasal içerikli maddeleri üretmesi sağlık araştırmalarında avantaj sağlamaktadır. Kullanılan doğal ürünlerin belli bir kısmını bal arısı propolisi gibi yüksek flavanoid özellikli maddeler oluşturmaktadır. Kimyasal yapısı birçok araştırma konusunda yer alan propolisin her geçen gün kanser hastalığına etki mekanizmasının aydınlatılması gittikçe artmıştır. Propolisin anti-kanser, antiviral, antibakteriyel, antifungal, aktiviteleri olmak üzere birçok aktivitesi vardır. Eski zamanlardan beri sağlık için kullanılan propolis farmakolojik özelliklerinden dolayı çok sayıda bilimsel araştırma konusunda yer almıştır (Sforcin ve Banknova 2011; Salem ve diğ. 2019).

Bu çalışmanın amacı Cezayir (Mila ve Sikikta)'den temin edilen iki farklı propolisin petrol eter, kloroform, etil asetat ve metanol alt fraksiyonlarının bazı biyolojik (antibiyofilm, antikayma ve sitotoksik aktivitesi) etkileri araştırılmasıdır. Biyofilm yapısı Floresan mikroskopta incelenerek FTIR ile analiz edilmiştir. Propolis alt fraksiyonlarının antikanser ve apoptoz etkisi de gen ekspresyon seviyesinde doğrulanmıştır.

1.1 Biyofilm Tanımı

Biyofilm, bakterilerin doğal veya doğal olmayan yapılara yapışan, hücre dışı matriks (ECM) içinde sıkıca gömülü halde bulunan karmaşık mikrop topluluklarına verilen isimdir (Roy ve diğ. 2018). Biofilmi *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* cinsinde bulunan patojen bakterilerin, *Candida albicans* gibi tehlikeli mantarların ve patojen olmayan bazı bakterilerin oluşturduğu bilinmektedir (Kumar ve diğ. 2011; Villa ve diğ. 2011).

Antoine Von Leeuwenhoek 17. yüzyılda ilk kez kendi dişlerinde basit mikroskop kullanarak kaygan yapılı bir varlık gözlemlemiştir. Fakat bunun bir tür biyofilm olduğunun farkına varmamıştır. Sonrasında 1940'lı yıllardan sonra yeniden merak edilen biyofilm git gide teknolojinin ilerlemesiyle kendi keşfini beklemiştir. Devam eden bilimsel çalışmalar ve ileri boyutlarda büyütme, floresan özellikli kimyasallar yardımıyla görüntülemelere sahip olan mikroskopların (SEM, TEM, CLSM vb.) keşfiyle, biyofilmin yapısı hakkında daha fazla bilgi elde edilmeye başlanmıştır (Jamal ve diğ. 2018).

1.2 Biyofilm Yapısı

Mikroorganizmanın bulunduğu alanı işgal eden biyofilm, viskozumsu yapıda olan, su oranı yüksek bir kitledir. Kalınlığı farklılık gösteren biyofilmin yapısı oldukça karmaşık ve birbirlerine kanallarla bağlıdır. Ve bu kanallar biyofilmin en derin kısımlarına kadar besin ve madde erişilebilirliğini sağlar (Archer ve diğ. 2011).

Yapısında besin maddeleri, oksijen ve elektron algılayıcı gradyanlar aynı olmadığı için bir biyofilm boyunca heterojen şekilde gen ekspresyonu gerçekleşmektedir. Bu hem içerik hem de bakterilerin kendi metabolik durumlarıyla ilişkilidir. Örneğin, *in vitro* bir stafilokok biyofilm modelinde 4 farklı metabolik durum gözlemlenmiştir. Bunlar aerobik olarak üreyen hücreler, metabolik faaliyetleri devam eden (fermantatif) hücreler, uykuda olan (çok yavaş büyüyenler) hücreler ve ölü halde olan hücreler olarak bulunmuştur. Genellikle biyofilmin üst kısmında oksijen açısından zengin ve metabolik açıdan aktif hücrelere rastlanmıştır (Rani ve diğ. 2007)

Biyofilm üç boyutlu bir yapıya sahiptir. Ve bu yapının oluşturulması heterojen şekilde yayılmış bakteri topluluklarının dinamik sürecine dayanmaktadır. Biyofilmin yapısına benzeyen bazı planktonik topluluklar da mevcuttur. Bakteriyel biyofilm toplulukları gen ekspresyonu, transkripsiyon, translasyon ve büyüme hızı gibi özellikleri planktonik topluluklardan farklıdır. Çünkü biyofilm toplulukları daha yüksek ozmolariteye, besin kıtlığına ve heterojen bakterilerden oluşan daha yüksek hücre yoğunluğuna sahip mikro ortamlarda yaşayabilirler. Biyofilmde hücreler arası iletişim mükemmeldir. Hücreler spesifik gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle ortaya çıkan Quorum Sensing (QS) moleküllerini sentezlerler. Ve bu moleküller sayesinde iletişim daha da artar (Sharma ve diğ. 2019).

1.2.1 Ekzopolisakkarit

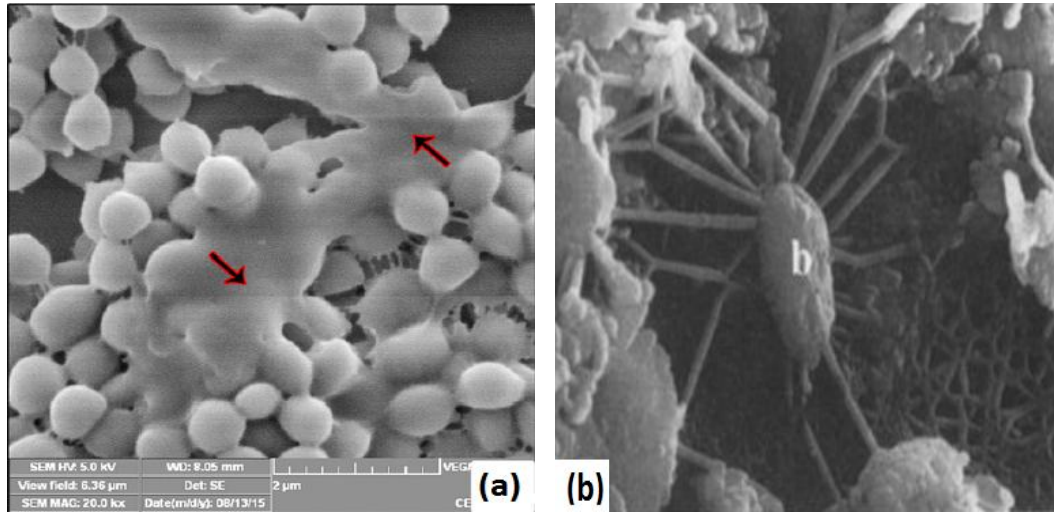
Biyofilm yüzeye bağlanırken Ekzopolisakkarit (EPS) adı verilen hücre dışı polisakkarit madde oluştururlar. EPS matriksinin oluşumu biyofilm oluşturan bakteriler için çok önemlidir. Biyofilmde mikroorganizmaların bulunduğu konumlarına göre yapısal polisakkaritler, intraselüler (depo) polisakkaritler ve ekstraselüler polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı polisakkarit sentezlenir. Sıvı besi ortamlarda viskoz bir görünümdeyken katı besi ortamlarında oldukça mukoid kolonimsi bir görünüme sahiptir.

Genellikle EPS matriksinin kalınlığı 0.2-1.0 mm, %5 ila % 35'i mikroorganizma ve geri kalan kısım EPS matriksidir. Yapısında çok miktarda protein bulunur. Gerekli diğer besin maddeleri ve mineraller EPS'nin süpürme sistemi sayesinde çevredeki ortamdan alınarak hapsedilir. Hücre dışı matriksin yapısı yüzdesel olarak protein (>%2), polisakkarit (%1-2), RNA (<%1), DNA molekülleri (<%1), iyonlar (serbest ve bağlı) ve büyük çoğunlukla sudur (%97) (Jamal ve diğ. 2018; Roy ve diğ. 2018).

EPS yapısının ölçüsü bakteriden bakteriye değişmekle beraber, bu yapı arasında bağlantı mükemmeldir. Bu bağlantılar iletişimi güçlendirerek, yapıyı daha dayanıklı hale getirmektedir (Rezanka ve diğ. 2012). Biyofilmin oluşmuş polisakkarit yapısı antibiyotiklere, dış çevre şartlarına, başka mikroorganizma istilasına karşı koruyucu özellik katmaktadır. Bu yapının bozulması için çeşitli

ajanlar mevcuttur. Bunlar ekzopolisakkaritleri parçalayabilen polisakkarit liyazları ve Dnaz gibi bazı enzimlerdir. Antibiyofilm ajanları olarak işlev gören başlıca enzimler DNase I ve Dispersin B'dir. DNase I, biyofilm yapısı içinde mevcut hücre dışı DNA'yı (eDNA) parçalar. Bir glikozit hidroliz olan Dispersin B ise hücre dışı polisakkarit maddesi olan β 1-6 N-asetilglukozamin (PNAG) polimerinin parçalanmasını kolaylaştırmaktadır. Bu biyofilm dağıtıcı enzimlerin EPS'de gömülü halde bulunan bakterileri öldürmesinde daha etkili olması için antimikrobiyal ajanların kombinasyon halinde uygulanması gerekmektedir (Roy ve diğ. 2018).

Görüntüleme teknolojisini kullanan bazı araştırmacıların EPS yapısını görsel olarak rapor etmeyi başarmışlardır. Şekil 1. 1'e bakacak olursak, (a) kısmındaki resimde kırmızı oklarla gösterilen *S. epidermidis* hücreleriyle içli-dışlı yapışmış olan çok katmanlı EPS matriksi görünmektedir (Gowrishankar ve diğ. 2017). (b) kısımdaki arka planda ve sağ alt kısımda görülen, bir bakteri arasına gerilen ağ benzeri EPS'nin iplikli yapısı görülmektedir (Westall ve diğ. 2000).



Şekil 1. 1: Taramalı Elektron Mikroskopuyla görüntülenen EPS yapısı (a: Gowrishankar ve diğ. 2017; b: Westall ve diğ. 2000).

1.3 Biyofilm Oluşum Basamakları

Biyofilm oluşumu oldukça karmaşık bir prosestir. Yapının oluşarak olgun hale gelmesi ortam şartlarına, erişilebilir çevreye, besin maddelerine ve bakteri

türüne göre değişiklik göstermektedir. Biyofilm oluşum basamakları sırayla aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmektedir;

Tutunma: Bu aşama dinamik bir olay olup, moleküllerin (mikro ve makro moleküller) adsorpsiyonunu gerektirmektedir. Mikroorganizmalar bir yüzeye tutunduklarında, o yüzeyde pozitif yönde biyofilm oluşturulmasını başlatması gerekmektedir. Bunu sentezledikleri Quorum sensing molekülleri sayesinde yapmaktadırlar. Bu düşük molekül ağırlıklı moleküllerle haberleşen bakteriler bir dizi biyofilm oluşumunu başlatmaktadır. Tutunan veya tutunmaya çalışan bakterilerin sayısı arttıkça sentezlenen molekül miktarı da artmaktadır (Shrout ve diğ. 2011).

Quorum sensing moleküllerinden olan N-açıl homoserin laktonlar (AHL) önemli sinyal molekülleri olarak bilinmektedir. Biyofilm yapısında populasyon yoğunluğunu kontrol etmekle beraber kayma (swarming) hareketliliğini kolaylaştırmak için birçok gram negatif bakteri QS molekülü olarak AHL'leri kullanmaktadır (Roy ve diğ. 2018). Bu sistemler AHL'lerin sentezinden sorumlu luxI homolog genini ve AHL'ye bağımlı bir transkripsiyonel regülatör (düzenleyici) olan luxR homolog genini de içermektedir (Hao ve diğ. 2010). Gram pozitif bakteriler tarafından ise üretilen, otomatik indükleyici peptitler (otomatik indüktör 2 [AI-2]) olarak bilinen QS molekülleri vardır (Algburi ve diğ. 2017).

Birçok patojen tarafından biyofilm oluşumunun inhibisyonun kısıtlanmasında QS söndürücüleri (QSQ) veya inhibitörleri (QSI) rol oynayabilir. QSQ'lar ayrıca, QS genlerinin patojenlerdeki ekspresyonunu bloke ederek veya kapatarak QS'yi zayıflatabilir. Bu da planktonik hücreleri öldürmeden veya normal büyümeyi etkilemeden biyofilm inhibisyonuna yol açar (Chen ve diğ 2013).

Yapışma: Kuvvetli bir şekilde tutunan bakteriler bu aşamada yapışarak salınım gerçekleştirirler. Hücre dışı matriks (EPS) ortamda sentezlenerek mikroorganizmaların hem yüzeylere tutunmasını hem de yayılmasını kolaylaştırır. Yavaş-yavaş mikrokolonileşme işlemi başlar.

Olgun Biyofilm: Bu aşamada bakteriler mikrokoloniler halinde kümeleşmiş haldedir ve yapı tamamen oluşmuştur. Düz veya dağ benzeri yapılardan oluşan

biyofilmde su kanal sistemleri ve madde alış verişi için bağlantılar mevcuttur (Sharma ve diğ. 2019).

Kopma veya ayrılma: Bu işlem dış etkenlerin etkisiyle veya biyofilmin doğal oluşum sürecinin bir parçası olabilir. Birkaç hücrenin veya hücrelerden oluşmuş kümelerin kopmasına dayanmaktadır. Ve bu tarz kopmalar tıbbi cihazlarda enfeksiyonun yayılması için bir önkoşuldur (Otto 2008).

1.4 Biyofilm Oluşum Nedenleri ve Yarattığı Sorunlar

Mikroorganizmaların bulunduğu ortamlarda tehdit edici faktörlere karşı biyofilm oluşturma adaptasyon olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber bakterinin beslenme ihtiyacı da biyofilm oluşturmaya tetikleyen faktörlerdendir (Wu ve diğ. 2014). Korunma amaçlı biyofilm oluşturma özelliğine bakacak olursak, bulunduğu bölge istilasıyla beraber antimikrobik maddelere ve toksinlere karşı savunmadan bahsedilmektedir. Biyofilm tek bir hücreden oluşturulabilir. Aynı zamanda ortamdaki farklı popülasyonların gelişimini iyi ve kötü yönde değiştirebilir. Biyofilm oluştuğunda ortamda en önemli faktörlerden biri olan pH faktörünü değiştirmektedir. Bunun sayesinde hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda ortam popülasyonunda değişimler gözlemlenmiştir. Ve bu gibi faktörleri göz önüne alırsak, bakterin kendisi için yaşanabilir bir çevre yaratmasını söyleyebiliriz (Archer ve diğ. 2011).

Biyofilm oluşumu birçok alanda problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Endüstriyel olarak en çok gıda endüstrisinde ve su içeren doğal ortamlarda ve onları taşıma yollarında (borularda, biriktirilmeye kaplarında vs.) birikmiş biyofilmin çeşitli sorunlar ortaya çıkarttığı bilinmektedir. Ayrıca biyofilm, endüstriyel boyutta soğutma su sistemlerinde bir engel teşkil etmektedir. Soğutma su sistemleri çelik fabrikaları, petrokimya, kimya, enerji santralleri ve gıda endüstrisinde prosesler sırasında ortaya çıkan ısıyı engellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemler 25°C ile 35°C arasında sıcaklık, nötre yakın pH, güneş ışığına maruz kalma gibi durumlarda planktonik ve bentonik gelişmelere mükemmel bir ortam sağlamaktadır. Oluşmuş biyofilm matriksinin (EPS) yapısında bulundurduğu yüksek

miktarda su ve minerallerle çoğu endüstri sistemlerde korozyona neden olmaktadır (Pippo ve diğ. 2018).

1.4.1 Biyofilm'in Sağlık Alanında Yarattığı Sorunlar

İnsan sağlığı açısından biyofilmin ortaya çıkarttığı problemler ve zararları geniş boyutlara ulaşmıştır. Tıp biliminin son yıllarda hızlı şekilde ilerlemesi ile insan hastalıklarının tedavisinde giderek artan tıbbi cihaz veya yapay organ nakilleri uygulanmaktadır. Aynı zamanda sağlık sektöründe ne kadar tek kullanımlık malzeme kullanımı geniş olsa da yine de bazı malzemelerin kullanımı birden fazladır. Ve bu bahsettiğimiz unsurlar sayesinde bakteriyel biyofilm enfeksiyonları yayılması söz konusudur. Farklı hastalarda kullanımı veya ilk defa kullanımda taşınmış biyofilm enfeksiyonlarını; üriner katater, kalp pili, protez, safra yolu stentleri, kontakt lens, protez kalp kapağı, periton diyalizi kateteri, ortopedik fiksasyon cihazları, vücuda yerleştirilen silikonlar gibi malzemelerle taşınması bazı durumlarda kaçınılmaz haldedir. Aynı zamanda biyofilmin insan vücudunda en çok dental çürüklerde, kistik fibrozis hastalarında ve ya kronik akciğer hastalıklarında, kronik sinüzit ve yara enfeksiyonlarında olduğu bilinmektedir (Wu ve diğ. 2014).

Bağışıklık yetersizliği olan hastalarda biyofilm, kalıcı nozokomiyal enfeksiyonların ana nedeni olarak bilinmektedir. Ve tedavi için biyofilm enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotik seçimi çok önemlidir. Ayrıca biyofilm, kanda bulunan fagositlerin ve kompleman sistemin bozulmuş aktivasyonu yoluyla bakteriyi konakçının bağışıklık sisteminden korur ve sıradan antibiyotiklere karşı direnci yaklaşık 1000 kat artırır. Birçok durumda imipenem, kolistin ve daha fazla antibiyotiklerin kullanımı sadece biyofilmi azaltır, ancak tamamen ortadan kaldırmaz. Tedavide kullanılan antibiyotiklerin yan etkileri ve toksik durum nedenleriyle *in vivo* koşullarda MIC konsantrasyonuna ulaşmak mümkün olmamaktadır. Ve biyofilm kaynaklı hastalıklarda antibiyotik kullanımı daha yüksek MİK ve MBK değerlerine ulaştığı için daha az yeterli hale gelmiştir (Hengzhuang ve diğ. 2012).

Son yıllarda bakteriyel tedavilerde antibiyotik direnci gelişimi çok büyük bir sorun haline gelmiştir. Her canlı gibi bakteriler de karşılaştığı tehlikeye karşı doğal

seçilim gerçekleştirmektedirler. Bakterilerin bu doğal seilimlerinden biri de antibiyotik direncidir. Bakteriyel tedavilerde doğru antibiyotik seçimi, seçilmiş antibiyotiğin konsantrasyonu veya kombine antibiyotik grupları önemlidir. Yanlış seçilmiş antimikrobik ajan bakteriyi yok etmeden, direnç oluşturmasını sağlamaktadır. Biyofilm yapısı da yukarıda anlatıldığı gibi antimikrobik ajanlara karşı daha yüksek direnç geliştirmede en önemli engellerdendir (Hiby ve diğ. 2010).

Bazı alışmalar biyofilmin doğasını, yapısını oksijen kullanabilirliğini, içsel ve edinilmiş direnci içeren çeşitli nedenler ortaya koymaktadır. Bir çalışmada biyofilmin direnç sağlamadaki etkisi, biyofilmin mukoid yapısının tobramisine karşı yüksek direnç gösterdiği *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde yapılan çalışmada bulunmuştur (Ciofu ve diğ. 2012). Antibiyotik direncinin potansiyel nedenlerinden biri biyofilm`in yapısındaki bakterilerin metabolik durumudur (Roy ve diğ. 2018).

Bakteriyel biyofilm insanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bakterilerin tutunarak biyofilm oluşturduğu bölgeler farklıdır. İnsan vcdunda çeşitli bölgelerde biyofilm oluşturma bakterinin istediği ortam veya başka faktörlerden kaynaklanabilir. Sharma ve diğerlerinin (2019) derlemiş olduğu bir makalede bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonlar ve insan vcdunda yapışarak biyofilm oluşturduğu organ veya yüzeyler belirtilmiştir (Tablo 1. 1).

Tablo 1. 1: Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar ve yapışılan yüzeyler (Sharma ve diğ. 2019).

Bakteri türü	Enfeksiyon / Hastalık	Yüzey
<i>Staphylococcus</i> sp (<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i>)	Hastane enfeksiyonları Kronik yaralar Endokardit Kas-iskelet sistemi enfeksiyonları Orta kulak iltihabı	Dikişler Santral venöz kateterler Arteriyovenöz şantlar Protezler Yüzeyler / deri, cilt Protezler, Kalp kapakçıkları Kemikler, Orta kulak
<i>Streptococcus mutans</i>	Diş çürüğü Endokardit	Diş yüzeyi Vasküler greftler
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hastane enfeksiyonu Orta kulak iltihabı Kistik fibroz	Santral venöz kateterler Orta kulak Protezler Akciğer Kontak lens
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Zatürre Solunum yolu enfeksiyonu İdrar yolu enfeksiyonu Piyojenik karaciğer absesi	Akciğer Karaciğer
<i>Escherichia coli</i>	Bakteriyel prostatit İdrar yolu enfeksiyonu Orta kulak iltihabı	Protezler İdrar yolu Üriner kateterler Orta kulak
<i>Enterococcus faecalis</i>	Endokardit Kök kanal enfeksiyonu	Kalp kapakçıkları Üriner kateterler Diş Santral venöz kateterler
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tüberküloz	Akciğer
<i>Burkholderia cepacia</i>	Kistik fibroz	Akciğer
<i>Haemophilus influenza</i>	Orta kulak iltihabı	Orta kulak

1.5 *Staphylococcus* Cinsi Bakterilerinin Patojenitesi ve Biyofilm Mekanizması

Staphylococcus’lar birçok enfeksiyona neden olan patojen bakterilerdir. Çapları 1 µm olup gram-pozitif ve kok yapısındadırlar (David ve diğ. 2015). *Staphylococcus* cinsinin koagülaz pozitif ve negatif türleri ve suşları vardır. Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonun en sık nedeni olmalarının yanı sıra, ameliyat sırasında ve muayene zamanı tıbbi cihazları enfekte etme olasılığı en yüksek patojen bakterilerin bu cinse sahip türler olduğu bilinmektedir. Yoğun bakım ünitelerinden en sık izole

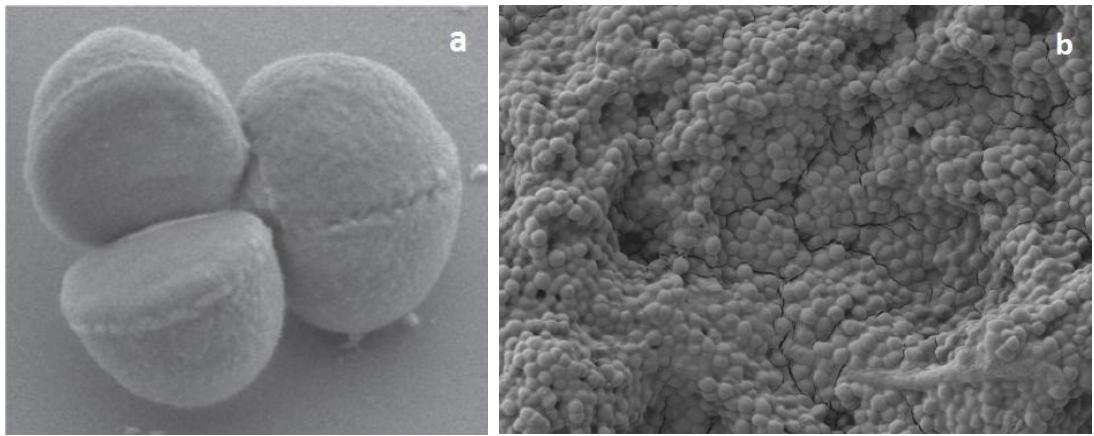
edilen nozokomiyal patojenler genelde *S. aureus* ve *S. epidermidis* bakterileridir. Ve bu izolatların çoğusu metisiline dirençlidir (*S. aureus* - %89; *S. epidermidis* - 59%) (Otto 2008).

Genellikle penisiline dirençli fakat β -laktamlarla tedavi edilebilirler. Ama hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak bilinen suşlar antibiyotiklere dirençlidirler ve sadece vankomisinle tedavi edilmektedirler. Stafilokoklar dünya çapında çok tehlikeli hastalıklara neden olurlar. Bunlar yenidoğan enfeksiyonları, zatürre, bakteriyemi, endokardit, osteomyelit ve ameliyat sonrası enfeksiyonlara neden olan önemli bir morbidite ve mortalite (hastalık ve ölüm) nedeni olarak bilinirler. Örneğin *Staphylococcus epidermidis* bir zamanlar zararsız olarak kabul edilirken, günümüzde hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biridir. *Staphylococcus saprophiticus* özellikle kızlarda idrar yolu enfeksiyonlarına neden olur. İdrar yolu, cilt ve yara enfeksiyon etkeni olan *Staphylococcus lugdunensis* doğal kapak endokarditinin de en önemli etiyolojik ajanıdır (Speziale ve diğ. 2008).

Biyofilm yapısında polisakkarit, DNA ve proteinler mevcuttur. DNA bileşenlerinin biyofilm içerisindeki etki mekanizmasını bozan antimikrobik maddeler bu tür enfeksiyonlarla mücadele sürecinde aktif olarak kullanılmaktadır. Stafilokoklarda hücre lizisinde rol oynayan *cidR*, *cidA*, *lrgA* ve *lrgB* genlerinin antimikrobik maddelere karşı toleransı artırıp-azalttığı bilinmektedir. Stafilokoklar yüzeylere tutunurken Polisakkarit İnterselüler Antijen (PIA) adı verilen spesifik polisakkarit sentezler ve bu PIA molekülü biyofilm oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Poli-b (1,6)-N-asetil-D-glukozaminden (PNAG) ve teikoik asitten oluşan PIA sentezi, aynı zamanda polisakkarit sentezinden sorumlu olan enzimleri kodlayan *icaA*, *icaB*, *icaC* ve *icaD* operon gen bölgelerinden olur ve bu genler sigma(σ) faktörü tarafından düzenlenmektedir (*sigB*) (Asai ve diğ. 2015).

1.5.1 *Staphylococcus aureus* Bakterisinin Patojenitesi ve Biofilm Mekanizması

Staphylococcus aureus, kok yapısında, gram pozitif ve koagülaz pozitifdir (Boudjemaa ve diğ. 2019, David ve Elliott 2015). Şekil 1. 2 (a)'da 1µm çapında *Staphylococcus aureus* bakterisinin glutaraldehit ile sabitlenerek, taramalı elektron mikroskopu (SEM) sayesinde fotoğrafı kaydedilmiştir (Monteiro ve diğ. 2015). Şekil 1. 2 (b)'de taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) MRSA252'nin inmeli-çıkmalı yapılar oluşturan yoğun biyofilm yapısı görülmektedir (Guo ve diğ. 2017).



Şekil 1. 2: *Staphylococcus aureus* bakterisinin SEM görüntüsü. a - Sol tarafda bölünmüş olan iki yeni hücre, sağ tarafa ise olgun halde kok halinde *S. aureus* hücresi görünmektedir (Monteiro ve diğ. 2015). b - tedavi edilemeyen MRSA252 suşunun yoğun şekilde oluşturmuş biyofilm yapısı (Guo ve diğ. 2017).

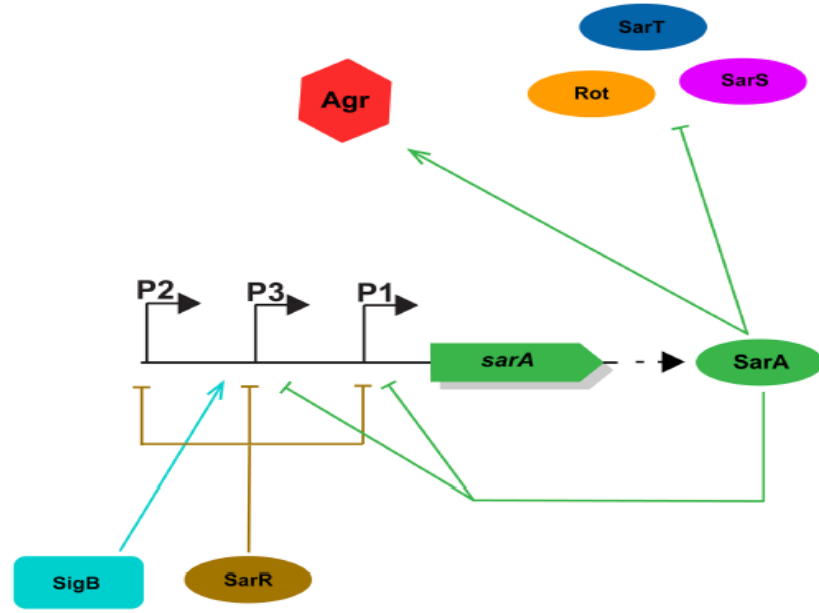
S. aureus, dünya çapında hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olmakla beraber toplum ile ilişkili bakteriyel enfeksiyonların da başında gelen nedenlerdendir (Bitrus ve diğ. 2018). Yumuşak doku, cilt, deri, yara, kan dolaşımı, kemik ve eklem enfeksiyonlarına neden olan en yaygın patojenlerdendir (Lowy 1998). Bazı durumlarda fırsatçı patojen olarak bilinen, hayvanların ve insan nüfusunun yaklaşık % 20'nin burun boşluklarında *S. aureus*'a rastlanmaktadır (Cole ve diğ. 2001; Mehraj ve diğ 2016). Aynı zamanda gıda zehirlenmelerinin dünya çapında en önemli nedenlerinden biri olan *S. aureus*, işlenmiş et ürünlerini, işlenmeye hazır sebzeleri, çeşitli gıdaları kontamine edebilir ve bazı enterotoksinler üretebilmektedir (El-Hadedy ve El-Nour 2012).

Genelde hastane kaynaklı olmayan *Staphylococcus aureus* tespit edilen vakalar gentamisine duyarlıdır. Fakat Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ve Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) günümüzün en önemli toplum sağlığı sorunudur. MRSA'lar neredeyse tüm β -laktam antibiyotiklerine dirençlidirler (Acree ve diğ. 2017). Dünyada MRSA'lar, antibiyotiklere dirençli en sık saptanan patojendir (Leone ve diğ. 2015). Son raporlara göre MRSA suşları hem yetişkin hem de pediatrik popülasyonlarda pnömونيye neden olmaktadır (Wardenburg ve diğ. 2007). Hastane veya toplumsal kaynaklı bazı *S. aureus* enfeksiyonları ile yapılan çalışmalarla, hücre dışı matriksin oluşumundan sorumlu düzenleyici gen bölgelerinin olduğu gösterilmiştir. Biyofilm oluşumunda *agr*, *sarA*, *sigB*, *ica*, *rbf*, *tcaR*, *arlRS* ve *alsSD* gibi genlerin düzenleyici olduğu bilinmektedir (Rice ve diğ. 2007).

Bu bakterinin biyofilm oluşumu, accessory gene regulator (Agr) tarafından düzenlenmektedir. Quorum sensing (QS) sistemindeki sinyal moleküllerini düzenleyici olmakla beraber, bakterinin patojenitesinden ve biyofilm gelişiminin baskın bir düzenleyicisi olarak bilinmektedir. Bakteri yüzeye tutunurken üretilen bir oto-indükleyici peptidin (AIP) sinyali olarak bilinen QS molekülü sentezler. AIP sinyalinin hücre dışı seviyeni algılamasını Agr gen bölgesi kodlar. AIP sinyallerin kimyasal yapısı türden-türe veya tür içinde değişebilmektedir (Paharik ve Horswill 2016).

Staphylococcal accessory regulator olarak bilinen *SarA* lokusu da biyofilm oluşumunu etkileyen çeşitli genlerle doğrudan ilişkilidir. Birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, *SarA*'nın biyofilm oluşumunda önemi bir rolü olduğunu göstermiştir. *SarA*'nın kısmen de olsa regülatör faaliyeti *agr* üzerindeki etkilerle ilişkilidir. Saflaştırılmış *SarA*, *agr* lokusunun P1, P2 ve P3 promötörlerini kapsayan bir bölgedeki 3 kısma doğrudan bağlandığı bulunmuştur (Bai ve diğ 2019; Paharik ve Horswill 2016). *SarA* ailesininden olan *Rot*, P3 promotörünün transkripsiyonun bastırarak ekspresyonun azalmasına yol açmaktadır. Bu arada *Rot* “repressor of toxins” olarak bilinir ve 15.6 kD olan regülatör proteindir. Aynı zamanda *SarA*'nın 13.6 kD olan homoloğu *SarR* mevcuttur. *SarR* negatif bir regülatördür ve bunu 3 promotöre (P1, P2 ve P3) bağlanarak gerçekleştirilir. Ve her bir sistemde olduğu gibi bir regülatör sigma faktörleri mevcuttur. Sigma faktörleri RNA polimeraz

holoenzim'lere promotor özelliği sağlar ve transkripsiyonun başlaması için gereklidir. *S. aureus* için bu sistem sigma faktörü (*sigB*) tarafından regülasyonu gerçekleştirilir. *SigB* farklı streslere tepki vererek buna bağlı olan proteinleri regüle eder. Ve agr sisteminin ekspresyon dengesini sağlar, yönlendirir ve dolaylı olarak agr regülatörü ile işlev gösterir. Ek olarak *S. aureus*, *SigB*'nin yanı sıra *SigH* olarak bilinen ikincil bir alternatif sigma faktörünü barındırmaktadır. *SarA* regülatörünü daha iyi anlamak için şematik olarak Şekil 1. 3` e bakınız (Jenul ve Horswill 2018).



Şekil 1. 3: SarA düzenleyici ağı ve SarA promotor bölgesi: Şekilde gösterildiği gibi 3 farklı promotor (P1,P2 ve P3), SarA gen ekspresyonu için uyarılır. Uyarılma gerçekleşikten sonra alternatif sigma faktörü σ B (SigB) devreye girer. SigB, P3 promotoruna bağlanarak SarA'nın ekspresyonunu yönlendirir. Bu arada SarR üç promotorün hepsine bağlanarak ekspresyonu inhibe ettiği için SarA tarafından otoregülasyonu engellenir. Ve nihayetinde SarA (ailesinden) SarH1, SarT, Rot proteinlerinin negatif regülasyonu olarak işlev görür ve agr sisteminin aktivasyonuna olanak sağlanmaktadır (Jenul ve Horswill 2018).

1.6 Kanser

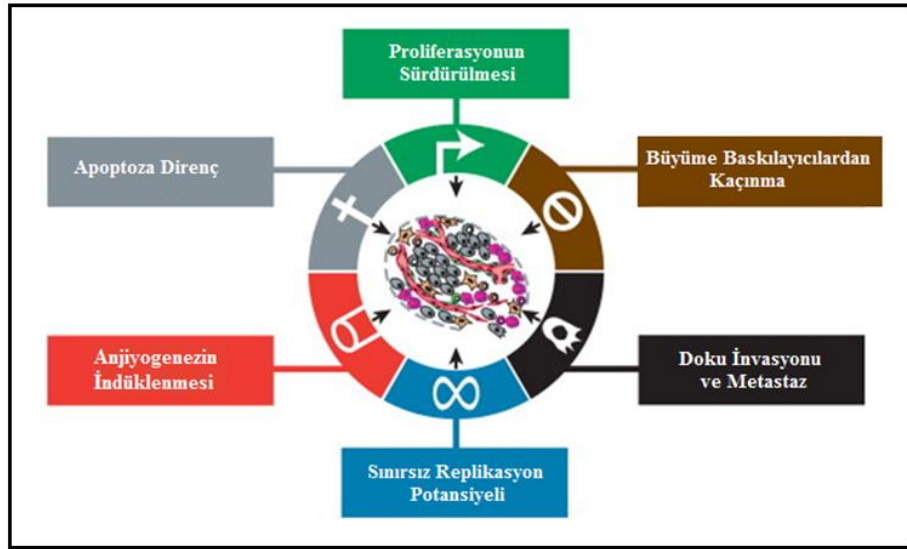
Kanser, hücrelerin anormal ve kontrolsüz şekilde büyüyerek yayılmasıyla gelişen bir hastalıktır ve kontrol edilmezse çoğu zaman ölümle sonuçlanır. Ölüm ölüm nedenleri arasında, kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer

almaktadır. İnsanların kanser olma nedenleri tam anlaşılamamış olmasına rağmen kalıtsal farklılık, genetik hatalar ve bağışıklık koşulları gibi değiştirilemeyen faktörlerin etkisinin yanısıra sigara, alkol ve aşırı kilo gibi değiştirilebilen faktörlerin de kansere yakalanmada önemli rolü vardır.

Hepatit C virüsü (HCV), Hepatit B virüsü (HBV), İnsan papiloma virüsü (HPV) ve *Helicobacter pylori* gibi bazı bakteri veya virüsler de kansere neden olabilmektedir. Bakteriyel ve viral kaynaklı bazı kanserler, aşı ya da enfeksiyon tedavisi gibi müdahalelerle önlenmektedir (WHO Cancer 2018; American Cancer Society 2019).

Doğada, quantum enerjili sayısız etken mevcuttur ve bunlar makromoleküllerden elektron kopararak onların yapılarını bozarlar. DNA`da çift veya tek zincir kırıklarına ve yapı taşlarındaki şekerlerin modifikasyonuna neden olurlar. Örneğin, radyasyon, kimyasal madde kirliliği, UV, X ve gama ışınları gibi dış etkilere maruziyet hücrede mutasyon gibi istenmeyen değişikliklere neden olmakta bu da kansere yatkınlığı arttırmaktadır. Normal bir hücrede DNA`da oluşan herhangi bir hasar, tamir mekanizması ile hemen onarılır veya hücre döngüsü tamir edilene kadar durdurulur. Hatta hasarlı hücre apoptoz ile yok edilmektedir. Eğer tamir mekanizmasındaki sorunlar ya da hücre döngüsündeki kontrol edilemeyen durumlar hücreyi apoptoza sürüklemeseyse için hücre hasarlı şekilde çoğalır. (Yokuş ve Çakır 2012; Bartek ve diğ. 1999).

Genetik değişikliklerle hücrenin, kanserleşme sürecine etki eden 6 farklı yol bilinmektedir. Bunlar; 1) Bağımsız şekilde poliferasyon gerçekleşmesi (büyüme faktörü sinyallerinde), 2) Büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçınma, 3) Programlı şekilde gerçekleşen hücre ölümünden yani apoptozdan kaçınma, 4) Limitsiz olarak çoğalma potansiyeli, 5) Anjiyogenez ve 6) Metastaz (yayılma) ve invazyon (istila)`dur (Hanahan ve Weinberg 2011) (Şekil 1. 4).



Şekil 1. 4: Şematik olarak hücrenin kanserleşmesinde 6 temel kural (Hanahan ve Weinberg 2011).

1.7 Apoptoz

Gen seviyesinde hassas şekilde düzenlenen bir sistem olan Apoptoz, DNA hasarından sonra veya gelişim esnasında hasarlı hücrelerin programlı şekilde ortadan kaldırılmasıdır (Riccardi ve Nicoletti 2006). Ökaryotlarda embriyogenez sırasında, tümör regresyonu, doku bütünlüğü ve bağışıklık yanıtı gelişiminin hemostatik kontrolünde ortaya çıkan sorunlar için başvurulmuş en yaygın hücre ölümü biçimidir.

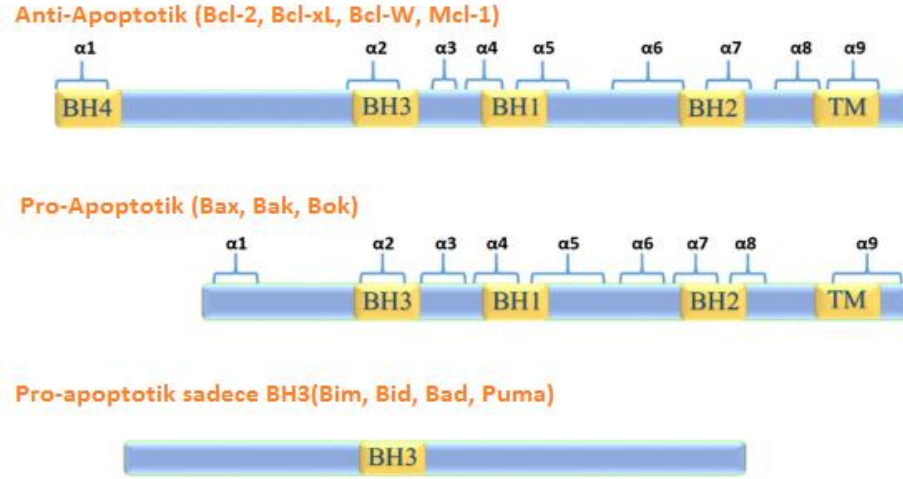
Mekanizması karmaşık olan apoptoz birçok sinyal yolağını (pathway) içermektedir. Bu sinyaller hücre içi ve hücre dışı sinyaller olup Apoptozu uyarabilmektedir. Bazı hormonal uyarıcılar, iyonize radyasyon, oksidatif hasar, viral enfeksiyonlar ve bazı toksinler DNA hasarını meydana getirdikleri için tümör baskılayıcı genlerden olan P53'ü aktive eder ve bu yoldan hücreyi apoptotik ölüme götürür. Kanser tedavisinde kemoterapi, ışınlama ve bazı kullanılan ilaçların da bu yönde etkisi vardır. Ayrıca hormonal uyarıcılardan olan kortikosteroidler bazı hücrelerde apoptotik ölüme yol açabilmektedir (Pistritto ve diğ. 2016; Elmore 2007; Kaczanowski 2016).

Apoptotik süreçte bazı düzenlemeler yapan protein aileleri mevcuttur. Bunlardan en önemlileri Bcl-2 ve kaspaz proteinleridir.

1.7.1 Bcl-2 Protein Ailesi

B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesi mitokondrial dış membranın geçirgenliğine (MOMP) aracılık ettikleri için “apoptotik anahtar” görevi görmektedirler (Adams ve Cory 2007). Bu protein ailesi mitokondri membran bütünlüğünü kontrol eden pro-apoptotik ve anti-apoptotik intinik yolları regüle etmektedir (Suhaili ve diğ. 2017). Bcl-2 proteinleri, BH1, BH2, BH3, BH4 ile bilinen en az bir Bcl-2 hemoloji alanı içermektedir. Bu BH alanı bir grup anti-apoptotik ve iki grup pro-apoptotik fonksiyonlu üç alt gruba ayrılmaktadır. Pro-apoptotik proteinlerde dimerizasyon için Bcl-2'nin BH1 ve BH2 alanları gerekli olmakla birlikte, BH3 alanı anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin birbirleriyle etkileşiminde çok önemlidir. Bu yüzden tüm aile üyelerinde bulunmaktadır. BH4 domeni ise esas ölüm bastırıcı aktiviteye sahip bazı pro-apoptotik bcl-2 ailesi proteinlerinde bulunmaktadır. Şekil 1. 5`de pro-apoptotik ve anti-apoptotik olan bcl-2 ailesinden bazı proteinler verilmektedir. (Pistritto ve diğ. 2016). Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriyal salımını regüle ederek apoptozu bloke eder, proapoptotik proteinler ise bu salımı artı yönde ilerleterek apoptozu teşvik ederek hareket eder (Chipuk ve diğ. 2010).

Bax proteini, mitokondride translokasyon sırasında apoptozu indükleyen sitolitik bir proteindir. Aynı zamanda Bcl-ailesi üyeleri içinde en yüksek apoptotik değere sahip olan proteindir. Örneğin Bcl-2 proteinin miktarı fazla olduğunda hücre yaşamına devam ederken, Bax proteini miktarındaki artış hücreyi apoptoza götürür (Elmore 2007). Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik çok alanlı (H1-H4) üyeleri, doğrudan inhibitör etkileşimine girerek Bax`ın mitokondriyel membranda gözenek oluşturma aktivitesine karşı koymaktadır. Aynı zamanda endoplazmik retikulum`un Ca^{+2} depolama kapasitesini indirerek Ca^{+2} iyonlarının sitoplazmaya salınımını önlemektedirler (Distelhorst ve Bootman 2011). Bax proteinini benzersiz yapan yapısında mitokondriyel membran ile geçici etkileşime girebilen 6A7 N-terminal epitopunun olmasıdır (Suhaili ve diğ. 2017).



Şekil 1. 5: Bcl-2 protein ailesinin yapısal domainleri. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler, 9 α -helisinden oluşan benzer bir protein yapısındadırlar (Suhaili ve diğ. 2017).

1.7.2 Kaspaz Ailesi

Apoptozda gerçekleştirilen bazı olayları bir sistein (aspartik proteazlar) olarak bilinen Kaspaz'lar yapmaktadır. Proteolitik enzim olarak bilinen kaspazların hücre ölümü ve inflamasyonun kontrolündeki rolleri çok büyüktür (Shalini ve diğ. 2015). Üç grup kaspaz vardır;

* Başlatıcı kaspazlar: kaspaz -2, kaspaz -8, kaspaz -9, kaspaz -10

* Efektör kaspazlar: kaspaz -3, kaspaz -6, kaspaz -7

* İnflamatuar kaspazlar: kaspaz -1, kaspaz -4 .kaspaz -5, kaspaz -11, kaspaz -12, kaspaz -12, kaspaz -14.

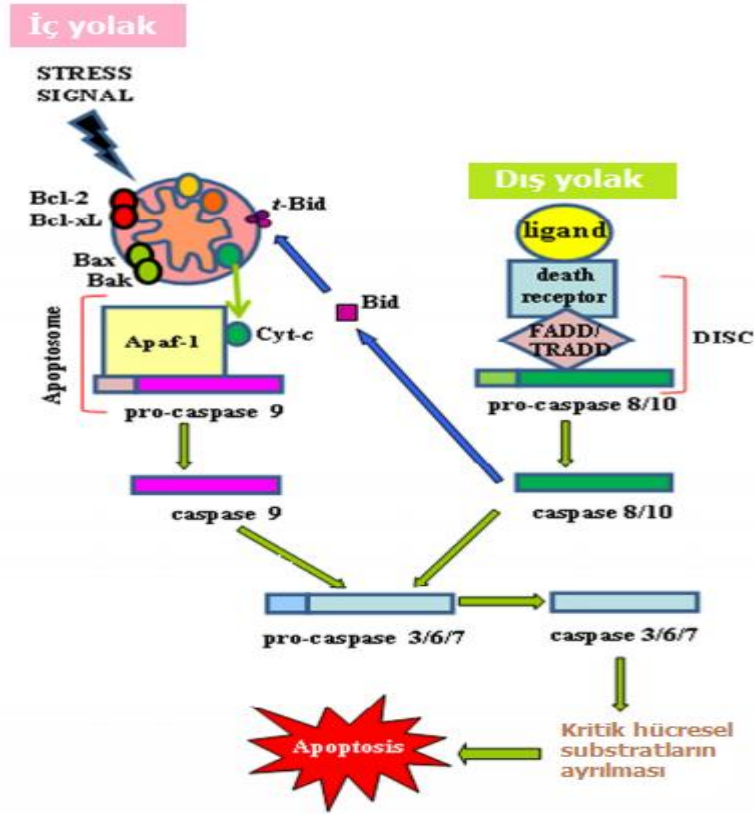
Kaspazların apoptotik olmayan görevlerinde, hücre farklılaşması, poliferasyon, tümör supresyonu, nöral gelişim, akson rehberliği ve yaşlanma vardır (Shalini ve diğ. 2015).

1.7.3 Apoptoz Mekanizmaları

Memeli hücrelerinde apoptoz Ekstresek (dış) ve İntresek (iç) olmak üzere 2 yolakla indüklenir (Şekil1. 6).

Dış apoptotik yolakta hedeflenmiş hücre membranındaki bazı reseptörlere bağlanmak için sinyal molekülleri uyarıcı işlem başlatır. Bu sinyal molekülleri TNF (tümör nekroz faktörü) ailesi proteinleri (TNF- α , TNFR1) ve Fas ligantlarıdır (FasL, FasR). Membranda bulunan reseptörler ligantların bağlanması için alan yaratırlar. Bu alan ölüm domaini (DD) olarak bilinmektedir. Uygun gelen ligant hücre membranına bağlandıktan sonra, o alanda konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Bu reseptör-ligant etkileşimi FADD ve TRADD gibi adaptör proteinler yardımıyla gerçekleşir. Etkileşim sonucunda prokaspaz -8 /-10 aktive olunur. Aktifleşmiş olan prokaspaz -8 /-10, prokaspaz -3/ -6/ -7 `yi aktiveleştirerek hücreyi ölüme uğratan kaspaz kaskadı oluşturur (Pistritto ve diğ. 2016; Suhaili ve diğ. 2017).

Bazı hücreler dış apoptotik yolla ölmezler. Bu durumda kaspaz-8 tarafından amplifikasyon adımı gerçekleştirilir. Bu adım sadece BH3 alanı olan Bid proteini tarafından gerçekleştirilir. Bid proteini, t-Bid fragmanını üretir ve mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP) indüklemek için hücreyi iç apoptoz yolağına sürükler (Plati ve diğ. 2008).



Şekil 1. 6: İç ve dış apoptoz yolları (Pistritto ve diğ. 2016).

İç yolakta ise farklı stres koşullarına (ışın, kemotropik ajan tedavisi vb.) yanıt olarak mitokondriye bağımlı ölümden bahsedilmektedir. Bu yolak, tümör supresör P53 geninin, Bax ve Bak gibi proteinleri aktive etmesiyle başlar (Shalini ve diğ. 2015). Bax ve Bak'ın aktive edilmesi, antiapoptotik proteinler olan Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'in nötröle edilerek dış membran geçirgenliğini artırır. Bu geçirgenliğin sayesinde sitozol içerisine sitokrom-c gibi aktivatör salınımı gerçekleşir. Sitokrom-c sitozolik Apaf-1'e (apoptoz proteaz aktivite edici faktör-1) bağlanır. Ve başlatıcı pro-kaspaz 9'u proteolizine izin veren apoptozom adlı bir kompleksi oluşturur. Bu kompleks ilk olarak kaspaz -9'u sonra efektör kaspazlardan olan kaspaz -3, kaspaz -7, kaspaz -6'yı aktive eder ve hücreyi apoptoza götürür (Pistritto ve diğ. 2016). Mitokondride membran geçirgenliğindeki artış ile sitokrom-c, Omi / HtrA2 ve Smac / DIABLO gibi mitokondriyel proteinler sitozole salınır. Bu proteinler apoptoz inhibitör proteinleri (IAPs)'nin işlevini baskılayarak kaspaz-9'un aktivasyonunu engeller. Ancak sitokrom-c apoptozu geri dönülemez bir yola sürükler ve apoptoz tamamlanır (Mace ve diğ. 2010).

1.8 Hücre Döngüsünü Düzenleyen Proteinler

Hücre döngüsü, G1, S, G2 ve M evrelerinden oluşur. Bu evreler arası geçiş ve kontrol, CDK-siklin bağımlı kinazlar ve CDKI- siklin bağımlı kinaz inhibitör proteinleri tarafından yapılmaktadır. İnhibitör proteinlerin bağlanarak oluşturduğu siklin-CDK kompleksleri, hüce döngüsünün devamlılığını sağlar. G1-S fazına geçiş çok önemlidir. Çünkü S fazı DNA replikasyonun meydana geldiği evre olarak da bilinir. S fazına geçişi CDKI proteinleri kontrol eder. Sağlam hücrelerde devam eden hücre döngüsünde fazlar arası farklı CDK ve kinaz proteinleri görev alarak döngü tamamlanır ($G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$). Fakat kanserli hücrelerde S fazında CDK ile birlikte Siklin/Cdk kompleksi oluşur ve DNA replikasyonu inhibe olur. İnhibisyon mekanizması, iki farklı CDKI ailesi protenleri tarafından gerçekleştirilir. P21, P27, P57 proteinlerinden oluşan Cip/Kim ailesi bilinen tüm CDK'ları inhibe eder. INK4/ARF ailesinin üyeleri olan P15, P18 ve P19 proteinleri ise CDK4 ve CDK6'yı inhibe eder (Chulu ve Liu 2009; Cabadak 2008).

1.9 P53 Geni

Hücrede birçok olayları regüle eden anti-onkogen veya tümör baskılayıcı genler vardır. Bu baskılayıcı genlerin en önemlisi olan P53, 11 eksondan oluşur ve 17. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunur. P53 geni, kontrolsuz hücre poliferasyonunu engeller ve hücre döngüsündeki bazı protein ve bölgeleri regüle eder. P53'de gerçekleşen bir mutasyon ve buna bağlı fonksiyon kaybı tümörleşmiş hücrelerin gelişimine olanak sağlar (Vousden ve Lane 2007; Machado-Silva ve diğ. 2010).

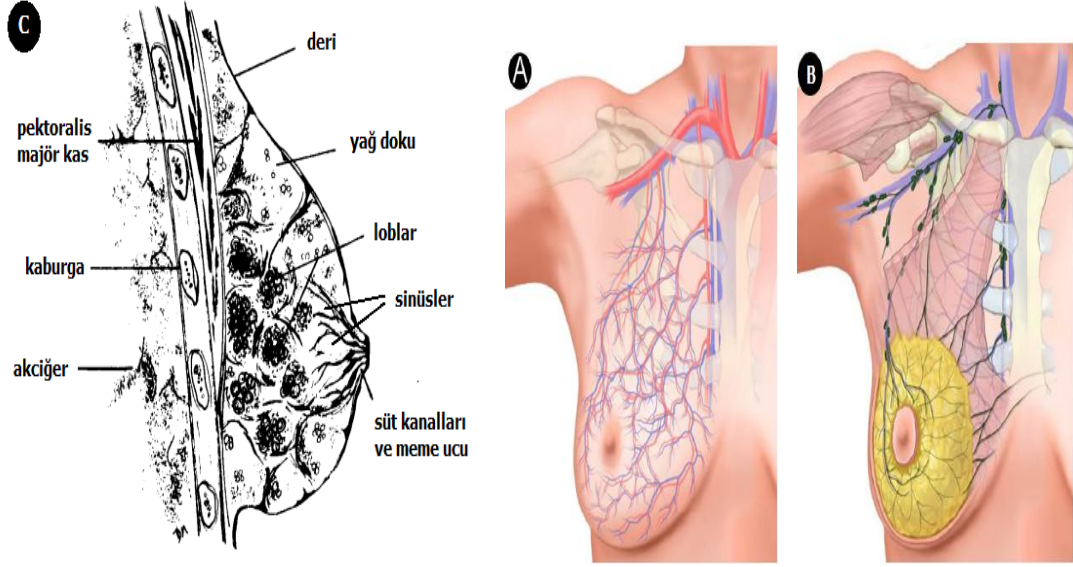
DNA'da hasar varsa hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişte P53 geninin ekspresyonunda artış olur ve P21 proteini sentezlenir. DNA'daki hasar tamir edilene dek hücre döngüsü durur. CDKI ailesinin inhibisyon proteini olan P21'in CDK2 ile beraber oluşturduğu kompleks, döngünün devam etmesi için siklin/CDK kompleksini inhibe eder ve hücre diğer faza geçemez. Oluşan stres, DNA tamirinde görev alan yardımcı proteinlerin ekspresyonunda artışa neden olur ve P53, hücreyi apoptoza sürükler. Mitoza girmeye hazırlanan bir hücrede, P53'ün sikline bağımlı kinaz olan Cdc2'yi (CDKI olarak bilinen CDK protipi) inhibe ederek hücrenin G2

fazında bloke edildiği de bulunmuştur. Cdc2, siklin B1 geniyle kompleks oluşturmakta ve hücre M fazına geçmektedir. Ancak P53, siklin B1'i inhibe ederek hücrenin mitozaya girişini engellemektedir (Rother ve diğ. 2007; Chulu ve Liu 2009). P53 hücre poliferasyondaki rolü ile birlikte iç ve dış apoptotik yolda yer alan molekülleri de düzenler. İç apoptotik yolda pro-apoptotik Bcl-2 (Bax, Noxa, PUMA ve Bid) ailesi üyelerini modüle ettiği için bu iz yolunda önemli bir rol oynar (Pistritto ve diğ. 2016).

1.10 Meme Kanseri

1.10.1 Meme Yapısı ve Anatomisi

Kadınlarda ve erkeklerde bulunan meme yapısı farklı şekilde gelişmiştir. Her iki cinsten, ergenlikten önce neredeyse aynı boyuttayken, kadınlarda ergenlik zamanında yumurtalıklarda östrojen hormonunun salınımının başlamasıyla memelerde artan şekilde gelişim yaşandığı bilinir. Bilateral organ olan meme, sinirler, kan damarları, lenf damarları, lenf düğümlerinin ağından ibarettir. Yapısal olarak da yağ doku ve pullu bağ dokusundan oluşmuştur (Şekil 1. 7 - A, B) (Jesinger 2014). Kadın vücudunda meme hormonal değişikliklere karşı aşırı derecede hassas olan glandüler organlardır. Adet dönemlerindeki farklılaşmalarla yapısında oluşmuş farklılaşmalar senkronizedir. Kadın memeleri 12-20 lobdan ve bunların daha küçük lobüllerden oluştuğu bilinmektedir. Loblar ve lobüller süt kanallarıyla birbirine bağlıdır. 15-25 kadar süt kanalları da süt sinüslerini oluşturarak meme ucu tabanına birleşir. Meme parankiminin büyük bir kısmı, 2. veya 3. kaburga noktasından, göğüs kemiği sınırından ön koltukaltına çapraz geçiş yapan 6. veya 7. kaburga noktasına kadar genişler (Şekil 1. 7 - C) (Akram ve diğ. 2017).



Şekil 1. 7: Orta yaşlı kadının meme yapısı (A, B - Jesinger 2014; C - Thomsen ve Tatman 1998).

1.10.2 Meme Kanserinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

2012 yılında kanser teşhisleri içerisinde en fazla teşhis konulan meme kanseridir. Vaka sayısı bildirilmiş kanser vakalarından meme kanseri, tüm kadın kanserlerinin %18'ni oluşturmaktadır. Bazı tahmin edilebilen sonuçlara göre 2021 yılına kadar 100.000 kadın başına 85 meme kanserine yakalanma riski beklenmektedir (Han ve diğ. 2013). Meme kanseri, orta yaş ve üstü kadınlarda daha çok görülmektedir. Genç kadınlarda meme kanseri görülümü çok nadirdir. Genç yaşta meme kanserinin özellikleri olgun veya yaşlı kadınlardan farklı ve beklenmedik davranışlar sergiler. Aynı zaman da kanserin teşhis edilme evresi ileri seviyelerde olmaktadır (Lee ve Han 2014).

Dünyada en yaygın kanser çeşiti olan meme kanseri dünyadaki kadınların kansere bağlı ölüm nedenlerinin başında yer alır. Meme kanseri vakalarının az gelişmiş ülkelerde daha fazla görüldüğü bilinir (Akram ve diğ. 2017).

Türkiye'de kadınların yakalandığı kanser vakalarının en çoğu meme kanseridir. 2015 yılındaki verilere göre Türkiye'deki kadınların tüm yaş gruplarında görülen meme kanseri oranı %24.7'dir. Türkiyede kadınların yaş gruplarına göre; 0-14 yaş grubu kadınlarda en fazla görülen kanser lösemi (%31.2),

15-24 yaş gruplarındaki kadınlarda tiroid kanseri, 25-49 yaş gruplarındaki (%34.6), 50-69 yaş gruplarındaki (%24.7) ve 70 yaş üzeri (%15.1) kadınlarda ise meme kanseridir (Türkyılmaz ve diğ. 2015).

Erkeklerde dünya genelinde meme kanseri çok nadir görülür ve her iki cinsin meme kanserlerinin % 0.5-1'ni oluşturur. Bu oran 2012 yılında Türkiye'deki erkeklerde tüm kanser vakaları arasında %0.37'dir. Erkeklerde meme kanserinin bu kadar düşük insidans göstermesinin nedeni düşük meme dokusunun bulunması ve hormonal farklılaşmadır. Bununla birlikte çoğu kanser gibi meme kanserinin seyri de her geçen yıl artmaktadır (Yalaza ve diğ. 2016).

Meme kanserinde etkili birçok risk faktörü vardır. Bazı faktörler birbirleriyle ilişkili veya etkilenebilir. Risk faktörlerine üreme, yaş, genetiksel yatkınlık, çevresel ve ailesel meme hastalığı tarihçesi gibi olgular dahil edilir. Yaş faktörünün meme kanseri üzerinde farklı bir seyri mevcuttur. Amerika'da ve Türkiye'de yapılan istatistik çalışmalar, meme kanserinin artan yaşla birlikte riskinin arttığını da göstermiştir (Shah ve diğ. 2014). Meme kanserli ve sağlam insanlarda birbiriyle ilişkili iki gen (BRCA1 ve BRCA2) mevcuttur. Her iki gen de DNA tamir mekanizmasında ve farklı bölgelerde karışık bir aktiviteye sahiptir. Bu genlerdeki bir mutasyon, yumurtalık ve meme kanseri tehlikesini arttırmakla birlikte genetiksel etkinin yanı sıra çevresel faktörlerin etkisi olduğu da bilinir (Nkondjock ve Ghadirian 2004).

1.10.3 Meme Kanseri Evreleri

Meme kanseri, dört evreden oluşur.

0. evre: Büyümeye başlayan tümörün süt kanallarındaki veya loplardaki kısımlarda yayılmaya başladığı görülmektedir. Tümör doku istilasına daha geçmemiştir.

1. evre: Bu evrenin 1A ve 1B olarak iki aşaması tanımlanmıştır. 1A'da lenf düğümlerine ulaşmayan tümör 2 cm kadar boyutlardadır. 1B'de artık lenf

düğümelerde yaklaşık 0.2 mm boylarına kadar kanserli hücreler vardır. İnvaziv meme karsinomu olarak da tanımlanır (Akram ve diğ. 2017).

2. evre: Tümör, sentinel lenf düğümlerinde veya aksiller lenf düğümlerinde 2 cm`den büyüktür. Ancak daha meme dokusuna ulaşmamıştır (Moran ve diğ. 2014)

3. evre: Biraz büyük ölçülere ulaşabilen tümörün meme derisinde şişme veya ülser neden olduğu görülür. Lenf düğümüne ulaşan tümör memenin kırmızı ve şişmesine neden olur ki bu durum enflamatuvar meme kanseridir. Bu aşamanın sonunda tümör 10 veya daha fazla aksiller lenf düğümüne kadar yayılır. Köprücük kemiği üzerinde bulunan tümörün etrafında artık lenf düğümleri vardır (Akram ve diğ. 2017).

4. evre: İleri seviyede ve metastaz aşamasındaki kanser akciğer, karaciğer, beyin, kemikler vb. organlara yayılır (Neuman ve diğ. 2010).

1.10.4 Meme Kanseri Tipleri

Meme kanseri başlıca iki doku tipi olan glandüler dokulardan ve stromal (destekleyici) dokulardan oluşur. Destekleyici dokular memenin anatomik yapısında başlıca yer alan yağ dokusu ve lifli bağ dokularını içerir. Glandüler dokular ise süt üretimi için gerekli bezleri yani lobüllerden ve sütün meme ucuna taşınımı için olan süt kanallarıdır. Bölgesel olarak farklı alanlarda da meme kanserleri meydana gelebilir. Bunların bazıları iyi huylu tümörlerdir. Bunlara fibroistik kistler, yumrulaşmış bölgeler, deri veya iç kısımdaki kalınlaşmalar örnek gösterilebilir (Khuwaja ve Abu-Rezq 2004).

Memede bulunan kanserleşmiş alanlara göre meme kanseri 2 ye ayrılır.

1.İnvaziv olmayan meme kanseri; süt kanallarında meydana gelmiş olan tümörlerdir.

2.İnvaziv meme kanseri; yağ ve bağ dokularında oluşmuş olan tümörlerdir.

En çok görülen meme kanserleri aşağıda verilmiştir:

* İn Sitü Duktal Karsinom (DCIS): en çok görülen invaziv olmayan meme kanseridir (Sharma ve diğ. 2010).

* İn Sitü Lobüler Karsinom (LCIS): az görülen invaziv olmayan meme kanseridir. Daha çok lobüllerde gelişir (Clauser ve diğ. 2016)

* İnfiltratif Duktal Karsinoma (IDC): invaziv meme kanseri olarak bilinen ve meme kanserlerinin %80'ini oluşturan en yaygın kanser türüdür. İlk olarak süt kanallarında ve bu kanalların duvarlarına yayılarak yağ dokusunu istila eder.

Daha az görülen meme kanserleri şu şekilde sıralanabilir:

* Medüller Karsinom: İnvaziv meme kanseri olarak bilinir. Medüller kanserler tüm meme kanserlerinin %5'ni oluşturur.

* Müsinöz Karsinom: Mukus üreten nadir bir kanser türüdür. Diğer invaziv karsinom tiplerine sahip kanserlere göre daha iyi bir prognoz gösterir.

* Tübüler karsinom: İnvaziv karsinom olarak bilinen bu meme kanseri türü diğer meme kanserlerinin %2'sini oluşturur.

* Enflamatuvar meme kanseri: Son derecede hızlı büyüyen bu kanserler kadınlar arasında çok az görülür (%1). Lenf damarlarını tıkayarak kalın, çukurlu ve iltihaplı göğüslerin ortaya çıkmasına neden olur.

* Filloïd tümör: iyi huylu olarak bilinen bu tarz meme kanserleri çok az ölüme neden olur. Memenin bağ dokularında gelişme sağlayan bu tümörler cerrahi yöntemlerle çıkarılır (Sharma ve diğ. 2010).

1.11 Propolis Oluşumu ve Tanımı

Apis mellifera L. neredeyse çiçekli bitkiler kadar uzun bir zamandan günümüze kadar gelmiştir. Arılar, ekvator yağmur ormanlarından Avrasya'nın, Kuzey Amerika'nın tropik çölleri ve yarı arktik bölgelerine kadar dünyanın her yerine yayılmıştır. Arıların geniş yayılış alanına sahip olması ve evrimsel başarısı, onların ürettiği ürünlerden, kolonileri için gıda yapı malzemelerinden ve savunma

silahlarından kaynaklanır. Arı zehri, balmumu ve arı sütü, kimyasal olarak arılar tarafından sentezlenir. Bal, polen ve propolis ise arıların bitkilerden aldıkları ürünleri değiştirerek ürettikleri ürünlerdir (Bankova ve diğ. 2018).

Propolis (arı tutkalı), arıların kovayı kuvvetlendirmek ve mikroorganizmalara karşı koymak amacıyla bitkilerden toplayarak oluşturduğu kahverengi tonlarında reçelimsi bir maddedir. Kelime anlamı Yunanca`dan gelen propolis; pro – savunma, polis ise şehir anlamı taşımaktadır. Bal arıları, genellikle ılıman bölgelerde bulunan kavak, karaağaç, kayın, atkestanesi ve bazı kozalaklı açık tohumlu bitkilerden propolis toplar (Ghisalberti, 1979). Propolis, kovadaki tarakları onarmak, ince kenarları güçlendirmek ve çatlakları kapatmak amacıyla yapı malzemesi olarak kullanılmasının yanısıra kovadaki ölü bir arının etrafını sararak hem çürümesini tetikleyici yönde, hem de bakteri ve küf oluşumunun daha az görülmesini sağlamaktadır (Simone ve diğ. 2009). Aynı zamanda propolis, bal arılarının bağışıklık sisteminde birçok arı patojenlerine karşı detoksifikasyon olarak birincil ilaç gibi işlev görmektedir. Koloni refahı için propolis bulunması çok önemli unsurlardandır (Simone ve diğ. 2017).

İşçi arılar, yaralanmış veya doğal akıntısı olan bitkilerin, yapraklarından, tomurcuklarından lipofilik malzeme, reçine, kauçuk hammaddesi gibi topladıkları farklı bitkisel sıvıları kovanda balmumu ile karıştırıp çeşitli işlemlerden geçirerek propolisi üretirler (Banknova ve diğ. 2018). Endüstrileşmenin artması, doğal bitki örtüsünün azalması gibi insanoğlunun doğaya verdiği ciddi zararlar nedeniyle bitki bulamayan arılar taze boya veya asfalt gibi zehirli ürünlerden reçineli madde toplayarak propolis üretmektedir. Bu tür propolis`ler kirlenmiş propolis olarak bilinir (Alqarni ve diğ. 2015).

1.11.1 Propolis'in Kimyasal İçeriği

Propolisin kimyasal içeriği alındığı yılın mevsimlerine ve alındığı bölgelere göre farklılık gösterir. Çünkü arıların farklı habitatlardan ve farklı bitkilerden topladığı ürünler değişkendir. Bu yüzden standardizasyonu çok zordur. Aynı zamanda toplanan saf propolisin *in vitro* çalışmalarda kullanılabilmesi için farklı çözücülerle homojen hale gelmesi de gerekmektedir (Sforcin ve Bankova 2011).

Soğukken sert ve kırılabilen, fakat ısıya maruz bırakıldığında yumuşak, esnek ve çok yapışkan bir lipofilik malzeme olan propolis, hoş aromatik bir kokuya sahiptir. Propolis genelde rengi kahverengi olarak bilinse de, yeşil ve kırmızı renklere de olabilir. Kimyasal içeriği oldukça zengin olup %30 balmumu, %50 reçine, %5 polen ve %10 uçucu yağlardan oluşmaktadır. Diğer %5'lik diliminde ise fenolik asitler (sinamik ve kafeik asit), bazı esterler, flavonoidler (flavonlar, flavanonlar, flavonoller ve dihidroflavonol kalkanları), aromatik aldehytler, alkoller, yağ asitleri, terpenler, stilbenler ve β -steroidler gibi çeşitli bileşenler vardır (Silva-Carvalho ve diğ. 2015). Tablo 1. 2 'de propolisin; flavanoid, yağ asidi, alifatik asit, şeker, mikroelement, aromatik asit, ester, vitamin, alkol ve terpenlerin bileşik yüzdeleri verilmiştir (Sawicka ve diğ. 2012).

Tablo 1. 2: Propolisin kimyasal içeriği (Sawicka ve diğ. 2012).

Flavanoidler (%18-20)	Yağ ve alifatik asitler (%24-26)	Şekerler (%15-18)	Mikroelemetnler (%0.5–2.0)
Apigenin	Butanedioik asit	D-Altros	Bakır (Cu)
Astaksantin	Propanoik ait	D-Glucose	Magnezyum (Mg)
Chrysin	Dekanoik asit	D-Fruktoz	Çinko (Zn)
Tectochrysin	Undecanoik asit	Maltoz	Alüminyum (Al)
Pinobanksin	Malik asit	D-Eritrotetrofuranos	Silisyum (Si)
Skualen	D-Arabinoik asit	Sorbofranos	Demir (Fe)
Pinostrobin chalcone	Tartarik asit	Arabinofranos	Mangan (Mn)
Pinokembrin	Gluonik asit	d-Arabinos	Kalay (Sn)
Genkvanin	a-D-Glukofranuronik asit	a-D-Galaktopiranos	Krom (Cr)
Galangin	Ostadekanoik asit	a-D-Glucopiranosid	Nikel (Ni)
Piloin	Heksa-dekanoik asit	Aromatik asitler (%5-10)	Esterler (%2–6)
Asesetin	Tetradekanoik asit		
Kaemferide	Pentandoik asit	Kaffeik asit	Kafeik ve fenetil ester
Rhamnositrin	Glutamik asit	Ferulik asit	
Diğer bazı flavonlar	Fosforik asit	Benzoik asit	4,3Acetyloxycaffeate
Vitaminler (%2–4)	İsoferulik asit	Sinnamik asit	Kinnamik asit
	2,3,4-trihidroksi butirik asit	Alkol ve terpenler (%2–3.3)	3-Methoxy-4 cinnamate
A	b-D-Glukopiranuronik asit		
B1/ B2	9,12-Oktadekadienoik asit	Gliserol	3,4 dimethoxy- trimethylsilyl ester
E		Eritritol	
C		a-Cedrol	2-propenoik asit methil ester
PP		Ksilitol	

2. MATERYAL ve METOD

2.1 Malzemeler

2.1.1 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tryptic Soy Broth (TSB-Biokar, BK046HA); Agar (Sigma, 05039); Agaroz (Sigma, A9539); Kristal Viyole (Merck, 1.15940.01100); Glasiyal Asetik asit (Merck, 1.00056.2500); Sülfürik asit (Sigma, 30743); Soyum Klorür (NaCl, 31434); Baryum Klorür (Merck, 1.01719.0500); Peptone From Casein (Trypton, Fluka, 70169); Pepton Bacteriologic (Biolife, 4122592); D-Glucose (Sigma-49159); Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640, Sigma, R8758); Tripsin-EDTA (Gibco, 25200); Fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 10270); Penisilin (Sigma, P4333); Dimetil sülfoksit (DMSO-Merck, 1.16743.1000), Glisin (Multicell, 800-045-LG), Trizma Base (Sigma, T1503); Sodyum dodesil sülfat (SDS-Sigma, L3771), Yağsız süt tozu (Skim milk powder, Bioshop, SKI400.1); Trizma Base (Sigma, T1503); KiloGreen 2x qPCR MasterMix (Abm); Triton X-100 (Bio Basic, DB0198); 1 kb DNA ladder (Fermentas, SM0311), Protein ladder (Abm, G252); Sodyum deoksikolat (Sigma, D6750); Proteaz inhibitör tableti (Thermo, 36978); Çinko klorür ($ZnCl_2$, Sigma, 31650); Magnezyum klorit ($MgCl_2$, Merck, M8266); NBT (Nitroblue tetrazolium, Biomatik, Cat#A4120); BCIP (5-bromo-4-kloro-indol-fosfat, Sigma, B6149); Fenozin metasulfat (Sigma, P9625).

Çalışmamızda kullanılan kitler: cDNA Sentez Kiti (Abm, G236); Annexin V - EGFP Apoptoz Kiti I (BioVision, K104); BCA protein tayin kiti (BioVision, K813); RNA izolasyon kiti (innuPREP RNA Mini Kit 2.0).

2.1.2 Kullanılan Cihazlar

Gerçek zamanlı PZR cihazı (Applied Biosystems StepOne); Thermal Cyler (PZR cihazı, Optimus 96G Gradient TC-O96G), Terazı (Radwag, AS 220/C/2); Güç kaynağı (Major Science MP-300V); UV jel görüntüleme kabini (gelLite Jel);

Mikroplaka spektrofotometre, Take 3 mikro-Hacim plakası (Biotek Epoch); Hücre sayma ve analiz cihazı (NanoEntek Arthur); Laminar flow kabini (Nüve MN 120); Infrared Spektrometresi (Perkin-ElmerUATR Teo Spectrometer); İnverted mikroskop (Oxion Inverso Inverted Mikroskop); CO₂ inkübatörü (Nüve, EC 160); Inkübatör (Nüve, EN 120); Santrifüj (Alfagen Süper Mini Santrifüj 14K; Hettich, EBA 20); Otoklav (Nüve, OT 4060); pH Metre (InoLap pH 720); Agaroj Jel Elektroferez Aparatı (Thermo EC320); Poli Akrilamid Jel Elektroferez Aparatı (Each omniPAGE electrophoresis system); -80°C buzdolabı (Nüve, DF490); Floresan mikroskobu (Olympus BX53F Fluorescent Microscope); Infrared Spektrometresi (Perkin-ElmerUATR Two Spectrometer).

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Propolis Örnekleri ve Temin Edildikleri Kaynaklar

Çalışmada 2014-2015 yıllarında Cezayir'in Mila (propolis1) ve Skikda (propolis2) illerinden toplanan iki adet propolis örneğinin petrol eter, kloroform, etil asetat ve metanol özütleri kullanılmıştır. Propolis alt fraksiyonları, Dr. Narimane Segueni (Laboratory of natural product and organic synthesis. Department of Chemistry, University Constantine 1. Algeria)'den temin edilmiştir. Örnekler deneyler sırasında +4°C' de muhafaza edilmiştir.

Dörder alt fraksiyon olmak üzere toplam 8 örnek bulunmaktadır. Propolis kaynakları ve alt fraksiyonların kodları Tablo 2. 1'de verilmiştir.

Tablo 2. 1: Propolis alt fraksiyonları ve kodları.

Propolis 1 (Mila,Algeria)		Propolis 2 (Skikda,Algeria)	
Özüt ↓	Örnek kodu ↓	Özüt ↓	Örnek kodu ↓
Petrol eter	P1-P	Petrol eter	P2-P
Kloroform	P1-K	Kloroform	P2-K
Etil asetat	P1-E	Etil asetat	P2-E
Metanol	P1-M	Metanol	P2-M

Propolis örneklerinin uygulanabilinmesi için homojen hale getirmek gerekmektedir. Bunun için çözücü olarak DMSO (dimetilsülfoksit) kullanılmıştır.

2.1.4 Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Biyofilm inhibisyonu, antiyüzme ve antikayma aktivitesi çalışmalarında *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisi kullanılmıştır. *S. aureus* suşu, Refik Saydam Hıfzısıhha Kültür Koleksiyonu (Ankara)'ndan ve *E. coli* ATCC 25922 ise Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakterioloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

2.1.5 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı

Sitotoksosite ve anti-kanser çalışmalarında kullanılan insan meme kanser hücre hattı MDA-MB-231 kullanılmıştır. Ve Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyokimya Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir

2.1.6 Çalışmada Kullanılan Primerler

Propolis alt fraksiyonlarının, kanser ile ilişkili genlere etkilerinin belirlenmesi için için uygun primer dizileri saptanmıştır. Saptanmış dizilerin blastlanması için NCBI/Primer-BLAST veri tabanından doğruluğu tespit edildikten sonra Gerçek zamanlı - PZR çalışmalarında kullanılmak üzere Sentegen Biyoteknoloji (Ankara) firmasına 100 nM skalada sentezlettirilip +4°C'de muhafaza edilmiştir. Sonra uygun miktar suda çözülerek -20°C'de saklanmıştır. Çalışmada insan meme kanseri ile ilişkili kullanılan primerler Tablo 2. 2'te verilmiştir.

Tablo 2. 2: Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.

<i>Seçilmiş Genler</i>	<i>İleri Primer (f) (5'→3')</i> <i>Geri Primer (r) (5'→3')</i>	<i>Yapışma sıcaklığı</i>
CyclinD2 (Siklin D2)	CGCCCCACCCCTCCAG	63 ⁰ C
	CCGCCCAGACCCTCAGACT	
CDK4 (Sikline bağımlı kinaz 4)	GCTAGCAGACTTTGGACTAGCCAG	60 ⁰ C
	AGCTCGGTACCACAGGGTCA	
CDKN1A (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1)	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	52 ⁰ C
	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC	
P53 (Tümör protein p53)	ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT	61 ⁰ C
	GTGGTACAGTCAGAGCCAACC	
BAX (BCL-2 ilişkili X proteini)	AGAGGATGATTGCCGCCGT	61 ⁰ C
	CAACCACCCTGGTCTTGGATC	
BCL2 (B-hücreli lenfoma 2)	TGCACCTGACGCCCTTCAC	62 ⁰ C
	AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG	
CASP3 (Kaspaz 3)	GCA GCAAACCTC AGG GAA AC	56 ⁰ C
	GCT GGA ATT ACC GCG GCT	
B-Aktin (Beta aktin)	TCC TCC TGA GCG CAA GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT CTG	62 ⁰ C

2.1.7 Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Western blot analizinde antikorlar, üretici firmanın talimatları gereği TBS tamponu ile hazırlanmış yağsız süt tozunda çözülerek kullanılmıştır. Tablo 2. 3'de çalışmamızda insan meme kanseri ile ilişkili kullanılan antikor listesi ve temin dildiği firmalar belirtilmiştir.

Tablo 2. 3: Kullanılan antikor listesi.

Antikor Listesi
BCL-2 (Abcam, ab117115)
CDK4 (Boster, MA1020)
BAX(Santa Cruz, sc-20067)
P53 (Santa Cruz, sc-55476)
Casp-3 (Santa Cruz, sc-56062)
GAPDH (Abcam, ab8245)
Anti-Mouse-ALP (Sigma, A3562)
Anti-Rabbit-ALP (Sigma, A-3687)

2.2 Metod

2.2.1 Antibiyofilm Aktivite Tayini

TSB besiyerinde geliştirilen bir gecelik taze kültür 0,5 MacFarland tüpüne göre ayarlanmıştır. Daha sonra 96'lık mikrolakalara toplam hacim 200 µl olacak şekilde %5 bakteri hücresi, besiyeri ve farklı konsantrasyonlarda propolis ilave edilmiş ve 24 saat 37 °C'de inkübe edilerek biyofilm oluşumu sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda planktonik hücreler uzaklaştırılmış ve kuyular 0,01 M PBS (pH 7,2) ile birkaç kez yıkanmıştır. Ardından %0,1 kristal viyole ile boyanan kuyular distile su ile yıkandıktan sonra 200 µL %20'lik glasiyal asetik asit ilave edilmiştir. Biyofilm kütlesinin optimal yoğunluğu 570 nm'de mikrolate okuyucu ile belirlenmiştir. Biyofilm indirgeme yüzdesi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır. Propolis içermeyen bakteri kültürü (pozitif) ve bakteri içermeyen propolis+besiyeri (negatif) kontrol olarak kullanılmıştır. (Nostro ve ark. 2016; Bai ve ark. 2019).

$$\text{Biyofilm indirgeme (\%)} = [(Kontrol OD - \text{Örnek OD}) / Kontrol OD] \times 100.$$

2.2.2 Hücre Hareketliliği Swimming (yüzme hareketi) ve Swarming (kayma hareketi) İnhibisyonu

Propolis fraksiyonlarının yüzme (*E. coli*) ve kayma (*S. aureus*) hareketlerine karşı inhibisyon etkileri de tespit edilmiştir. Her bir alt fraksiyonun minimum ve maksimum antibiyofilm etki gösterdiği konsantrasyonlar kullanılmıştır. Yüzme inhibisyon tespiti için, *E. coli* (12 saatlik kültür, 0.5 Mac Farland) kültüründen 5 µL propolis içeren yüzme agar (% 1 tripton, % 0.25 NaCl ve % 0.5 agar) petrilere nokta ekim yapılmıştır. Kayma inhibisyon tespiti için ise *S. aureus* ATCC 29213 (12 saatlik kültürü 0.5 Mac Farland) kültüründen farklı konsantrasyonlarında propolis içeren Kayma Agar (% 1 pepton, % 0.25 NaCl, % 0.5 D-glikoz ve % 0.5 agar) petrilere 5 µL nokta ekim yapılmıştır. Petriler ters çevrilmeden 37°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutularak ve inkübasyon sonunda koloni çapları milimetrik olarak kumpas vasıtasıyla ölçülmüştür. Propolis içermeyen besiyerinde üreyen bakteriler

pozitif kontrol olup ve % inhibisyon aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Monte ve ark. 2014)

$$\% \text{ inhibisyon} = [(\text{kontrol zonu} - \text{örnek zonu}) / \text{kontrol zonu}] \times 100.$$

2.2.3 Floresan Mikroskop Analizi

Her propolis örneğinin maksimum antibiyofilm etki gösterdiği doz ve 12 cm`lik yuvarlak lamel içeren bakteri (Mac Farland kültürü, lamel yüzeyinde biyofilm oluşumu için 24 saat 37<sup>0</sup>C`de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda lamel alınarak 1 defa steril dH₂O ile yıkanmış ve lamel üzerini örtecek şekilde SYBR Green ve Propidyum iyodür (PI) karışımı konmuştur. SYBR Green/PI karışımı 100µL dH₂O içerisinde 1:3 oranında hazırlanmıştır. Lameller boya solusyonunda karanlık odada 20 dak. bekletilmiştir. Süre sonunda lamel üzerine immersiyon yağı damlatılarak Floresans mikrokopta yeşil ve kırmızı ışıktaki 100x büyütmede örnekler incelenmiştir (Feng ve diğ. 2018).

2.2.4 FITR Analizi

Bakteri kültürü (0.5 Mac Farland) her propolis alt fraksiyonunun maksimum antibiyofilm etki gösterdiği dozun (µg/ml) bulunduğu besiyerinde 24 saat 37 ⁰C`de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 10.000 x g`de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernetant uzaklaştırılarak pellet distile su ile iki kez yıkanmıştır. Peletin IR çekimleri, 400-4000 cm⁻¹ arasında Kızılötesi Spektrometresi (Infrared Spectroscopy) ile yapılmıştır.

2.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

İnsan meme hücre hattı (MDA-MB-231) 37 °C`de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüvde inkübe edildi. Besiyeri olarak Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640) kullanıldı. Ticari olarak satın alınan besiyerinin içerisine hücrelerin gelişimini ve çoğalmalarını pozitif yönde artıran %10 fetal sığır serumu (FBS) buna ek olarak

kontaminasyonu engellemek için %1 penisilin+streptomisin kombinasyonu eklenmiştir. Steril 75 cm²'lik flasklarda üretilen hücreler, 1-3 günde bir hücre yoğunluğu izlenmiştir. Hücre yoğunluk yüzdesi gözle görünecek (~% 70 +) yoğunluğa ulaştığında besiyeri uzaklaştırılarak fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkandı. Ardından hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA ilave edilerek normal inkübasyon şartlarında 2-3 dakika bekletildi. Daha sonra kalkan hücrelerin üzerine taze besiyeri ilave edilerek 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernetant uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 1 ml taze besiyeri eklendi ve hücreler çalışmalar için hazır hale getirildi.

2.2.6 Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı

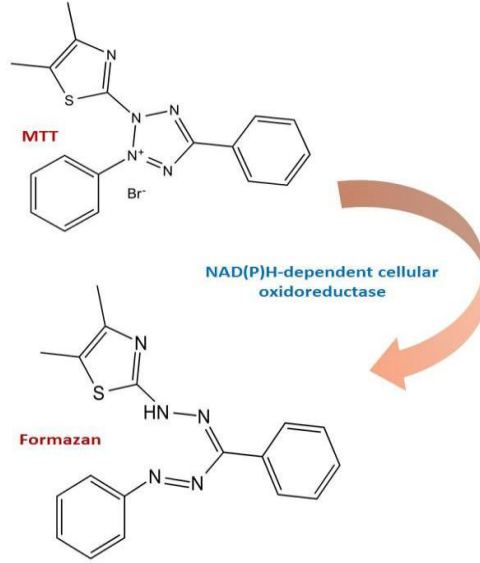
Tripan mavisi ortamın boyanmasına olanak sağlayan, membranı zarar görmüş hücrelerin içine girerek ölü hücrelerin aksine canlı hücrelerin renksiz kalmasıyla ve sayımını gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Hücre pasajlaması sonrasında pelet 1 ml yeni besiyeri ile çözüldükten sonra % 0.4 lük tripan mavisi ile 1:1 dilüsyon yapılmıştır. Hemen ardından toma lamına 25µl karışımdan yüklenek ışık mikroskopunda hücrelerin sayılması gerçekleştirilmiştir.

2.2.7 Sitotoksisite Analizi

MTT, ilaçların taranması için hücre canlılığı ve sitotoksisitenin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. MTT'nin (sarı renkli) ve diğer tetrazolyum boyaların azaltılmasına dayanan MTT deneyi, NAD (P) H'ye bağlı selüler oksidoredüktaz enzimlerine bağlı olarak hücrel metabolik faaliyetlere dayanır (Şekil 2. 1).

Propolis alt fraksiyonlarının sitotoksisite aktivitesinin belirlenmesi için MTT analiz yöntemi kullanılmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakaya ekilen meme kanseri hücreleri yapışmaları için 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem özellikli etüvde 24 saat inkübe edildi. Süre sonrasında besiyeri uzaklaştırıldı ve taze besiyeri ile farklı konsantrasyonlarda (2,5-250 µg/ml) propolis örnekleri son hacim 200µl olacak şekilde hücrelerin üzerine eklendi. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra sıvı kısım

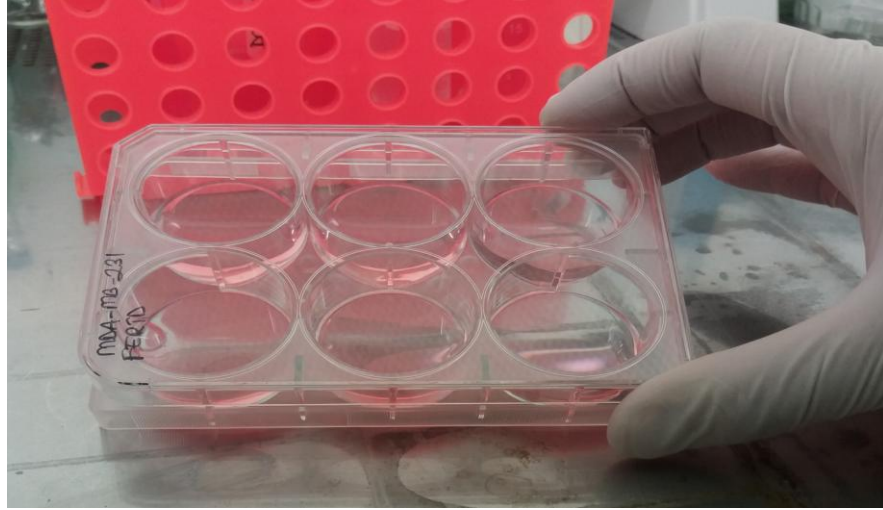
uzaklaştırıldı. Peletin üzerine 100 µl taze besiyeri, 10 µl MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazolyum bromid) (10 mg/ml) eklendi ve 4 saat etüvde bekletildi. Süre sonunda sıvı kısım uzaklaştırılarak kuyucuklara 50µl DMSO eklendi ve çalkalayıcıda düşük devirde 3 dakika karıştırıldı. Formazon kristallerinin çözünmesi için 30 dakika inkübe edildi ve mikropilaka okuyucuda 590 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak EC₅₀ değerleri hesaplandı.



Şekil 2. 1: MTT- nin Formazona dönüşümü (Bahuguna ve diğ. 2017).

2.2.8 MDA-MB-231 Hücre Hattından Total RNA İzolasyonu

Her propolis alt fraksiyonu EC₅₀ değerlerinde hücre hattından toplam RNA izole edildi. İzolasyon için AnalytikJena RNA izolasyon kiti kullanıldı ve izolasyon, üretici firmanın talimatına göre yapıldı. Pellet üzerine parçalamak için tampon Lysis (RL) eklendi ve filtre D ile 11.000 x g de 2 dakika santrifüj edildi. Ardından alıcı tüpdeki süzöntü üzerine 400µl %70-lik Etanol eklenerek filtre R'ye aktarıldı. Aynı devirlerde santrifüj yapılarak bundan sonraki aşamalarda süzöntüler atılmış ve aynı filtre üzerine sırasıyla yıkama solusyonu HS ve LS eklendi. Son olarak ependorfa alınmış R filtresi üzere 60µl RNAaz içermeyen su eklenerek santrifüj edildi. Son ürün olan toplam RNA -80°C derin dondurucuda saklandı.



Şekil 2. 2: MDA-MB-231 hücre hattından toplam RNA izolasyonu.

2.2.9 Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

İzole edilen RNA, yatay agaroz jel elektroforezi (AGE) ile görüntülendi. Bunun için %1'lik Agaroz jel kullanıldı. 0,4 g Agaroz 40 ml 1X Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponunda çözülerek içine 0,75µl Etidyum Bromid (0,625 mg/ml) eklendi. Jel, elektroforez tankına yerleştirildi ve üzeri 1X TAE tamponu ile kapatıldı. Elektroforez, 45 dakika, 90 V ve 500 mA'de gerçekleştirildi. Kuyulara marker ve örnek yükleme miktarları Tablo 2. 4'de gösterildi.

Tablo 2. 4: Kuyulara yüklenen RNA ve marker konsantrasyonları.

<u>RNA örneği için</u>		<u>Marker için</u>	
5µl RNA örneği	8µl kuyulara yüklenir	5µl kuyulara yüklenir	6 µl 1kb DNA Marker
2µl Boya (6x Loading DYE)			2µl Boya (6x Loading DYE)
1µl Enjeksiyonlu su			2µl Enjeksiyonlu su

2.2.10 RNA'nın Spektrofotometrik Analizi

RNA konsantrasyonu spektrofotometrik olarak, Take 3 mikro-Hacim plakası kullanılarak optik dansite (OD) ölçümü ile yapılmıştır (OD_{260nm}/OD_{280nm} >3.2).

2.2.11 cDNA Sentezi

RNA'dan cDNA sentezi için EasyScript cDNA Sentez kiti kullanıldı. Sentez üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı. cDNA sentez karışım konsantrasyonları Tablo 2. 5`de verilmiştir.

Tablo 2. 5: cDNA karışımı ve prosedürü.

Bileşenler	Kullanılan hacim	Son konsantrasyonlar
RNA	***	2.5 µg/ml
dNTP Karışımı (herbiri 10mM)	1µl	0.5 µM
Oligo (dT) Primer	1µl	500 µM
RNAaz içermeyen su	***	14.5 µl
<i>İlk karışımın özet hesaplanması : 14.5 - (1µl Oligo (dT) + 1µl dNTP + kite göre hesaplanmış RNA konsantrasyon miktarı)</i>		
Hazırlanan reaksiyon karışımı blok ısıtıcıda 65 °C'de 5 dakika bekletilir.Süre sonrasında 5 dakika buzda bekletilir.		
5X RT Tamponu	4µl	1X
Reverse Transkriptaz Enzimi (200U/µl)	1 µl	200 U/rxn
Ribonükleaz İnhibitörü (40U/µl)	0,5 µl	20 U/rxn
Buzda bekleyen karışımın üzerine son hazırladığımız karışımdan ekleyip (5,5µl) blok ısıtıcıda 50 °C'de 60 dk + 85 °C'de 5 dk programlayarak son reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen cDNA -20 C derin dondurucuda saklandı.		

2.2.12 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonları

Termal siklus cihazlarında günümüzde çok kullanılan bir yöntem olan PZR – polimeraz zincir reaksiyonları (PZR), çift sarmallı DNA zincirinin istenilen bölgesini çoğaltılmasına dayanan bir sistem olarak bilinir. Aynı zamanda RNA`dan DNA oluşturulmasında ve başka özelliklere dayanan bir reaksiyondur. Burada uzayan zincirin sentezi için taq polimeraz ve deoksiniükleosid trifosfatlar (dNTP) gerekmektedir. Ve polimerazın işlev görmesinde önemli tanpon maddeler kullanılmaktadır. Aynı zamanda Mg^{+2} kofaktörü iyonlarının uygun konsantrasyonlarda kullanılması gerekir. Genel olarak PZR reaksiyonlarında 3 basamak mevcuttur:

→Denatürasyon: Sıcaklığın yüksek safhada tutularak hedeflenmiş DNA`nın çift sarmalının ayrılarak tek sarmallı DNA` haline gelmesi (95⁰C).

→Annealing (Bağlanma): Hedeflenmiş DNA'ya özgül primerin bağlanması (55-65°C).

→Extention (Uzama): Hedeflenmiş zincirin sentezlenerek uzaması için dNTP'ler varlığı ile DNA polimerazın bağlanması (72°C).

Tek döngü yukarıdaki basamaklardan ibaret olup, her seferinde DNA iki katına çıkarılır. Bu döngülerin sayısı arttırılarak hedeflenmiş DNA'nın çoklu sayıda kopyası elde edilir. Döngü sayıları 30-40 arası değişebilir ve deney prosodürüne göre tüm faktörler laboratuvar şartlarına göre farklılık gösterir (Ehtisham ve diğ 2016). Zamanla bazı PZR çeşitleri geliştirilmiştir. Bunlardan son yıllarda en çok kullanılanı Gerçek zamanlı PZR'dir. Kantitatif bir sonuç elde edebildiğimiz bu sistemle gelişmiş olan teknolojiyi destekleyen termal siklus cihazlarının floresan ışınları algılayarak kısa bir sürede zahmetsiz bir şekilde sonuç elde edilebilen sisteme dayanmaktadır (Arya ve diğ. 2014).

Propolis ekstraktlarının mRNA üzerine etkisini belirlemek için KiloGreen 2X qPZR MasterMix kiti kullanıldı. Örnekler üretici firmanın talimatına göre hazırlandı. Elde edilen sonuçlar, StepOne software 2.3 programı yardımıyla hesaplandı. House keeping gen olan β -aktin'e göre normalize edildi. Reaksiyon ortamı ve reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli döngü, sıcaklık ve süreler Tablo 2. 6 ve 2. 7'de verilmiştir.

Tablo 2. 6: Gerçek zamanlı-PZR reaksiyon ortamı.

Bileşenler	Hacim	Son konsantrasyon
KiloGreen 2X qPZR Master Mix	10 μ l	1X
Şablon DNA		≤ 100 ng/reaksiyon
İleri Primer		300 nM
Geri Primer		300 nM
RNAaz içermeyen su	20 μ l'ye tamamlanır	-
Total Hacim	20 μ l	-

Tablo 2. 7: Polimeraz zincir reaksiyon kuşulları. a, b, d, c, e, f: Akış sırası.

Ön denetürasyon	PZR döngüsü x40				Erime Eğrisi Analizi	
95 ⁰ C	95 ⁰ C				95 ⁰ C	
10:00	00:15				00:15	
A	b	c		72 ⁰ C	e	f
		60 ⁰ C		00:30		60 ⁰ C
		00:30	d			01:00

2.2.13 MDA-MB-231 Hücre Hattında Apoptoz Tayini

Meme kanseri hücre hattında apoptoz tayini için Annexin V Apoptoz Saptama Kiti I kullanıldı. İlk olarak MDA-MB-231 hücreleri toplanarak 2 defa fosfat tampon çözeltisiyle (PBS) çöktürüldü. Pelet üzerine 100µl 1X Bağlanma Tamponu eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 5 µl Annexin-V eklenerek 20 dakika buzda karanlık ortamda bekletildi. Gerçekleşen reaksiyon tüpü 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 100 µl Bağlanma Tamponu ve 1µl PI eklendi. 10 dakika buz + karanlıkta bekletilen örnekten 25 µl alınarak tek kullanılmış plastik tabakaya yerleştirilerek NanoEntek Arthur cihazında hücre sayımı ve analiz gerçekleştirildi.

2.2.14 Propolis Alt Fraksiyonların MDA-MB-231 Hücre Hattında Protein Ekspresyon Seviyesinin Tayini

2.2.14.1 RIPA Tamponu ile Protein İzolasyonu

RIPA olarak bilinen Radio-immünopresipitasyon deneyinde membrana bağlı protein ile birlikte Triton X-100 ya da NP-40 ilave edilerek nükleer protein izole edilir (Terzioğlu 2014). Çalışmamızda protein izolasyonunda RIPA tamponu kullanıldı (Tablo 2. 8).

Tablo 2. 8: Protein izolasyonunda kullanılan RIPA tampon içeriği.

Kimyasal adı	Konsantrasyon
NaCl	150 mM
Triton X-100 (ve ya NP-40)	% 1
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	% 0.1
Tris (pH 8.0)	50 mM
Sodyum deoksikolat (ve ya deoksikolik asit)	% 0.1

Hücrelere uygulanmadan önce 1ml RIPA tamponuna 2 µl proteaz inhibitör tableti ilave edildi. Hücreler RIPA tamponu ile kaldırıldıktan sonra 30 dakika buzda bekletildi. Ardından +4 °C’ de 10.000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısım temiz bir ependorfa alınarak -80°C derin dondurucuda saklandı.

2.2.14.2 Bikinkoninik Asit ile Protein Tayini

Bikinkoninik asit (BCA) ile protein miktar tayini, alkali bir ortamda bikinkoninik asitle proteinlerin kompleks oluşturması sonucu Cu⁺² iyonunun Cu⁺¹’e indirgenmesiyle oluşan komplekse dayanan bir yöntemdir. Reaksiyon gerçekleşirken mor renkli bir kompleks oluşur. Ve konsantrasyon arttıkça rengin koyulaşması orantılı olarak artmaktadır (Smith ve diğ. 1985). Hassaslığıyla bilinen Bikinkononik asit (BCA) ile protein tayini çok yaygın kullanılan yöntemlerdendir. Bu yöntem ile protein tayin etmenin avantajlarından biri de az miktarda proteinin kullanılmasıdır.

Bu deneyde BCA protein tayin kiti (BioVision) kullanıldı. Reaktif karışımı, 50 (solusyon A): 1 (solusyon B) oranında hazırlandı. Kit içerisinde bulunan protein standardı sığır serum albümini (BSA) 2 mg/ml; 1,5 mg/ml; 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,025 mg/ml konsantrasyonlarda kullanıldı. 96 kuyucuklu mikrolakalara 200µl reaktif karışımı ve 25µl seyreltilmiş protein standardı konuldu. 37°C’ de 30 dakika inkübasyondan sonra 562 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu yardımıyla protein miktarı ölçüldü.

2.2.14.3 SDS-PAGE Elektroforezi

İki farklı akrilamid jel ile elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için ayırıştırma (%8,5'lik) ve yükleme (%4'lük) jelleri Tablo 2. 9'da verildiği oranlarda hazırlanmıştır.

Tablo 2. 9: Ayırıştırma ve yükleme jelinin hazırlanması.

↓Ayırıştırma jeli↓

↓Yükleme jeli↓

Jel içerisindeki bileşen	Kullanılan miktar	Jel içerisindeki bileşen	Kullanılan miktar
dH ₂ O	4.5 ml	dH ₂ O	2.5 ml
Jel çözeltisi	2.85 ml	Jel çözeltisi	750 µl
Ayırıştırma tamponu	2.5 ml	Yükleme tamponu	1.25 ml
%10 SDS	150µl	%10 SDS	100 µl
APS	50 µl	APS	25 µl
TEMED	6.5 µl	TEMED	5 µl
Toplam hacim 10 ml		Toplam hacim 5 ml	

Düzenek kurulur ve kulaklı cam arka tarafa gelecek şekilde ayarlanır. İlk önce ayırıştırma jeli iki cam arasına dökülür ve donmasını beklenir. Ardından yükleme jeli dökülür ve iki cam arasına proteinleri yüklemek için boşluk yaratan tarak yerleştirildi. Sonrasında oluşmuş ilk kuyucuğa molekül ağırlığı bilinen proteinlerden oluşan ve ticari olarak satın alınan ladder yüklendi. Sonraki kuyucuklara da BCA yöntemiyle miktar tayini ettiğimiz proteinler jele yüklenerek elektroforez başlatıldı. Elektroforez tamponu varlığında proteinler, ayırıştırma jeline 10 mA'de 100 V ve yükleme jeline geldiklerinde ise 20 mA'de 200 V akımla yürütüldü.

2.2.14.4 Western Blot Analizi

Elektroforezden sonra jel, soğuk transfer tamponunda 10 dakika bekletildi. Ardından nitrosellüloz membran ile sandviçlendi. Sırasıyla; sünger, kaba filtre kağıdı, Whatman # 1 kağıdı, jel, nitrosellüloz membran, Whatman # 1 kağıdı, kaba filtre kağıdı ve sünger üst üste konuldu ve sistem hava kabarcığı olmamasına dikkat

edilerek kapatıldı. Sandviç hazırlanırken kağıtlar, nitrosellüloz membran ve süngerler soğuk transfer tamponu ile doyuruldu. Hazırlanan sandviç, anot kutbunun anoda, katot kısmının da katoda gelmesine dikkat edilerek transfer tankına yerleştirildi. Transfer, soğuk transfer tamponu içerisinde +4°C’de buzdolabında 5 V ve 350 mA’de 90 dakika süresince gerçekleştirildi.

Transfer sonrası nitrosellüloz membran, sandviç sisteminden alındı ve nonspesifik bağlanmaların önüne geçmek için %5’lik bloklama solusyonuna konuldu. Membran bloklama solusyonunda 45 dakika +4°C’de düşük devirde çalkalandı. Süre sonrasında membran primer antikorda +4°C’de düşük devirde gece boyu çalkalandı. Daha sonra 15 dakika olmak şartıyla 3 kez soğuk koşullarda TBST tamponunda çalkalanan membran 2. antikorda 1 saat bekletildi. TBST tamponu ile yıkama işleminden sonra görüntüleme yapıldı.

Alkalen Fosfataz (ALP) ile görüntüleme, Ey ve Ashman (1986)’ın yöntemine göre yapıldı. Tris (pH: 8,8), NaCl (1 M), MgCl₂ (100 mM), ZnCl₂ (100 mM), Dietanolamin, NBT (Nitroblue tetrazolium), BCIP (5-bromo-4-kloro-indol-fosfat) ve Fenozin kimyasallardan oluşan solusyon ile nitrosellüloz membrane karanlıkta muamele edildi. Görüntüleme gerçekleştikten sonra blot kurutularak alüminyum folyo içinde saklandı.

SDS-PAGE elektroforezi ve Western Blot’da kullanılan tamponların konsantrasyonları:

- 10 X Elektro tamponu: 72 gr Glisin ve 15 g Trisma Base yaklaşık 500 ml dH₂O’da çözüldü.
- Elektroforez tamponu (Running Buffer): 100 ml Elektro tamponu, 1 g SDS ile karıştırılır ve 1000 ml’e dH₂O ile tamamlandı.
- Blotlama tamponu (Transfer Buffer): 100 ml Elektro tamponu, 200ml Methanol ile karıştırılır ve 1000 ml’e dH₂O ile tamamlandı.
- Yükleme jeli tamponu (Stacking buffer): 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8). 6 gr Trisma Base yaklaşık 40 ml dH₂O’da çözülür. 10 M HCl ile pH’sı 6.8’e ayarlanarak son hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.

- Ayrışma jeli tamponu (Separating Buffer): 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8). 18.15 gr Tris yaklaşık 60 ml distile suda çözüldü. 10 M HCl ile pH'sı 8.8'e ayarlanarak son hacim dH₂O ile 100 ml' ye tamamlandı.

- Akrilamid-Bisakrilamid Solüsyonu (%30T, %2,67C): 29.2 gr akrilamid az miktar suda çözüldü. Sonra üstüne 0.8 g bisakrilamid eklendi. Son hacim dH₂O ile 100 ml'e tamamlanarak iyice çözüldü ve filter kağıdından süzüldü.

$$\%T = (\text{gr akrilamid} + \text{gr bis} / \text{toplam hacim}) \times 100$$

$$\%C = (\text{gr bis} / \text{gr akrilamid} + \text{gr bis}) \times 100$$

- APS (%10) Amonyum persülfat: 0.1 gr amonyum persulfat 1000µl dH₂O'da çözünerek, her deney esnasında taze olarak hazırlandı.

- Sodyum dodesil sülfat (%10`luk SDS): 10 gr SDS 100 ml dH<sub>2</sub>O`da çözüldü.

- Bloklama solusyonu (%5): 100ml TBST solüsyonu içerisinde 5 gr yağsız süt tozu çözünerek hazırlanmıştır.

- Deneyde kullanılan birincil(primer) ve ikincil(secondary) antikor solusyonları: Ticari firmanın talimatları gereği %5`lik bloklama solusyonunda çözünerek kullanılmıştır.

- TBST solüsyonu: 29.44 gr NaCl , 20 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.4), 500 µl Tween 20 karıştırılır ve son hacim dH₂O ile 1 lt e tamamlanmıştır.

Tablo 2. 10: Yükleme tamponu 4X SDB (sample dilution buffer).

Bileşenler	Alınan hacim	Son konsantrasyon
1 M Tris-HCl pH6.8	2.5 ml	0.25 M
Gliserol	4 ml	% 40
β-merkaptoetanol	2 ml	% 20
SDS	0.8 g	% 8
Bromfenol mavisi	1 mg	% 0.01
Son hacim distile suyla 10 ml'e tamamlanır		

Tampon pH'sı son hacime tamamlanmadan önce 6.8'e titre edilir. Titrasyon için 1 M HCl kullanıldı. Stok -80 °C'de, aktif kullanılan örnek ise -20 °C'de muhafaza edildi.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1 Propolis Alt Fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Üzerine Antibiyofilm Etkisi

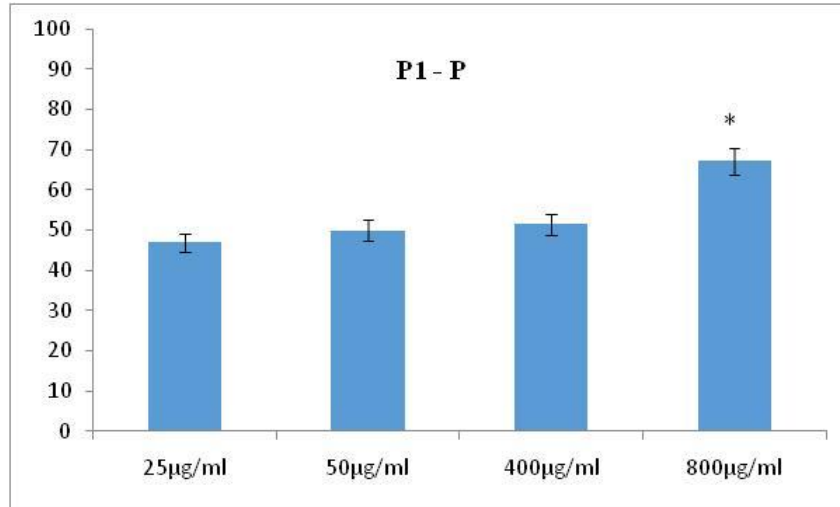
Mikroorganizmalar biyofilm tabakasını, fiziksel ve kimyasal etkilerden korunmak amacıyla oluşturlar ve bu topluluk içerisinde besin ve genetik materyal alışverişi gerçekleşir. Biyofilm yapısı içindeki mikroorganizmalardaki bu genetik düzenlenmeler, onların kimyasal maddelere karşı direnç geliştirmesine neden olur. Gelişen bu direnç ile birlikte oldukça karmaşık bir yapı olan biyofilm ve patojenlerle mücadeleyi daha da zorlaştırır. Dolayısıyla oluşan biyofilm hem toplum sağlığında ölüm gibi ciddi sonuçlara hem de ekonomik kayıplara neden olur. Bu nedenle biyofilm oluşturma yeteneğine sahip patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların önlenmesi gerekir. Bu da biyofilm tabakasının oluşumunun önüne geçilmesiyle mümkün olabilir. Bu amaçla antimikrobiyal etkisi olduğu bilinen birçok doğal ürünün antibiyofilm özellikleri de araştırılmaktadır.

Propolis, günümüzde farmakolojik, tıbbi ve biyolojik özellikleri en çok araştırılan arı ürünüdür. Güçlü antimikrobiyal ve antibiyofilm etkili flavanoidler ve sayısız bileşenler yönünden zengin olan propolis, *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların gözde maddesidir. Bitki veya propolis gibi doğal ürünlerin özütleme işlemlerinde kullanılan çözücü tipine göre farklı bileşenler açığa çıkar ve bu da farklı biyolojik etkiye neden olur. Farklı organik çözücülerden elde edilen özütlerin kimyasal kompozisyon ve bileşen çeşitliliği ürünün etki mekanizmasını etkileyeceği gibi canlı tipi, türü veya cinsine göre de farklı biyolojik etki yaratacaktır. Bu nedenle de su veya en uygun kimyasal çözücü seçilerek doğal ürünlerden ekstrakt elde edilir. Örneğin, metanol flavanoidlerin ekstraksiyonu için en uygun çözücüdür (Wagh 2013, Kothari 2014).

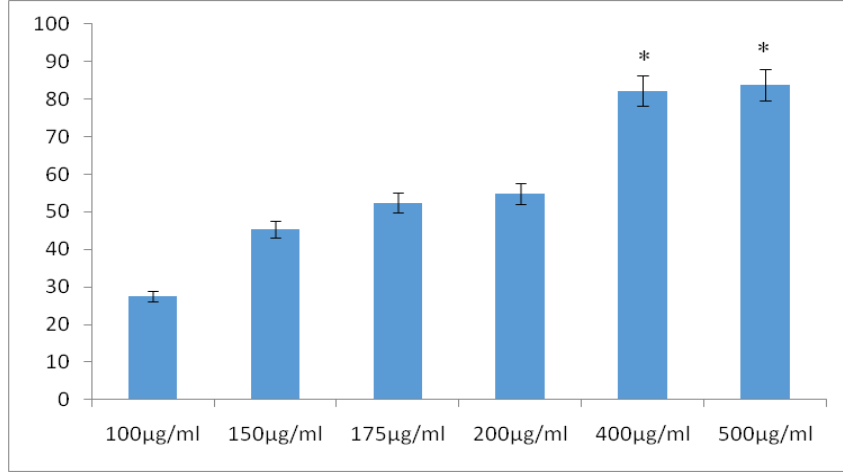
Bu tez çalışmasında Dr. Narimane Segueni (Laboratory of natural product and organic synthesis, Department of Chemistry, University Constantine 1. Algeria) tarafından 2 farklı ilden toplanan (Mila ve Skikda, Cezayir) ve dört farklı organik çözücü (petrol eter, kloroform, etil asetat ve metanol) ile ekstrakte edilen propolis kullanılmıştır.

Çalışmada propolisin 10-800 µg/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda (10-25-50-100-150-175-200-400-500-600-700 ve 800 µg/ml) biyofilm aktivitesi *Staphylococcus aureus* ATCC 29213'e karşı test edilmiştir. Genel olarak propolis örneklerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak biyofilm inhibisyon aktivitesinde de artış olmuştur. Ayrıca her özütün etkili oldukları konsantrasyonların farklı olduğu da tespit edilmiştir. Mila ve Skikda propolisleri kıyaslandığında Mila kaynaklı propolisin daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Mila kaynaklı propolis fraksiyonları arasında metanol ve kloroform özütleri, petrol eteri ve etil asetat özütlerine kıyasla daha belirgin aktiviteye sahiptir. Bu sonuç hiç kuşkusuz her özütün kimyasal içeriğinin farklı olmasıyla ilişkilidir.

Mila (Cezayir)'dan toplanan propolisin petrol eter özütü (P1-P) minimum %46,88 (25 µg/ml) ve maksimum %67 (800 µg/ml) oranında etki göstermiştir (Şekil 3. 1). Ayrıca 25-400 µg/ml konsantrasyonlarda biyofilm inhibisyon etkisinin birbirine yakın olduğu da dikkat çekmiştir.



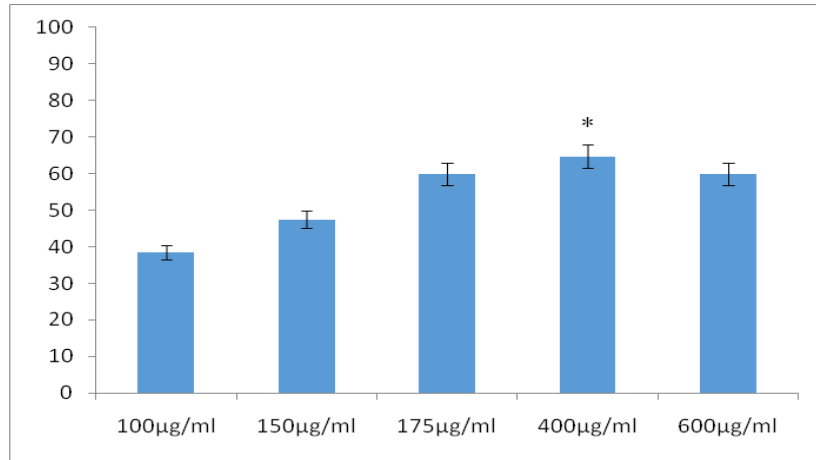
Şekil 3. 1: Petrol eter (Mila, Cezayir; P1-P) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi. Sonuçlar DMSO etkisi çıkartılarak değerlendirildi. *: Diğer konsantrasyonlardan farklı (p<0.05).



Şekil 3. 2: Kloroform (Mila, Cezayir; P1-K) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi. Sonuçlar DMSO etkisi çıkartılarak değerlendirildi. *: Diğer konsantrasyonlardan farklı ($p<0.05$).

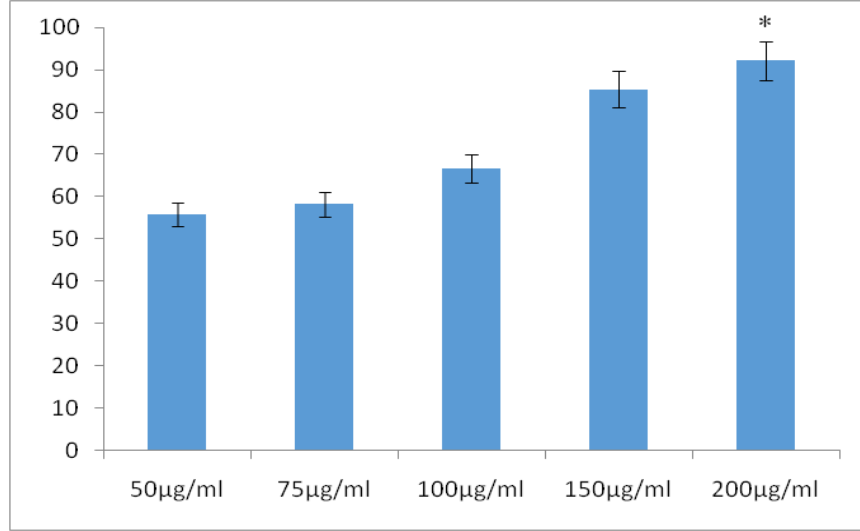
Kloroform fraksiyonu (P1-K), petrol eter fraksiyonunun aksine daha düşük konsantrasyonlarda antibiyofilm aktivite göstermiştir. Diğer bir değişle, petrol eterine kıyasla daha etkilidir. En yüksek aktiviteye 400 µg/ml (%82) ve 500 µg/ml (%83) konsantrasyonlarda ulaşılmıştır (Şekil 3. 2). Kloroform özütü bakteriyel biyofilmin yaklaşık %55'ini 200 µg/ml konsantrasyonda inhibe etmiştir.

Benzer şekilde etil asetat fraksiyonu (P1-E) da 175 µg/ml (%59,83), 400 µg/ml (%64,66) ve 600 µg/ml (59,88)'de birbirine yakın inhibisyon göstermiştir. Maksimum etkiye 400 µg/ml'de ulaşılmıştır (Şekil 3. 3).

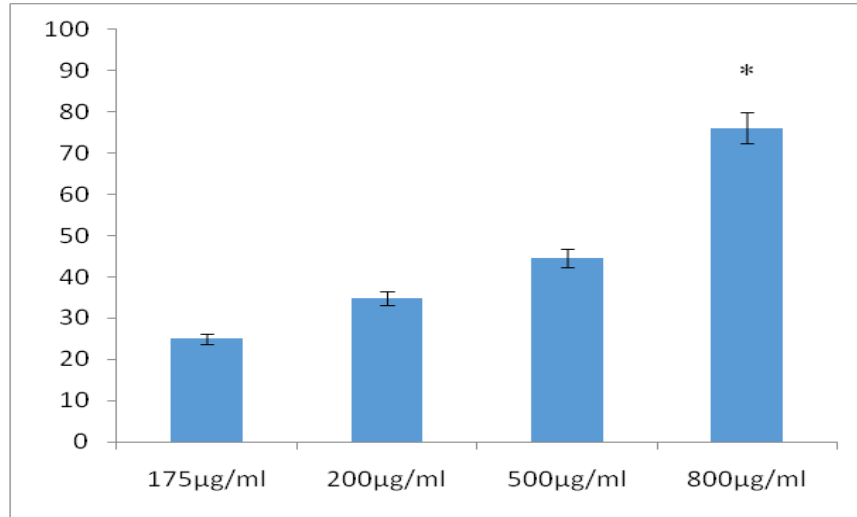


Şekil 3. 3: Etil asetat (Mila, Cezayir; P1-E) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi. Sonuçlar DMSO etkisi çıkartılarak değerlendirildi. *: Diğer konsantrasyonlardan farklı ($p<0.05$).

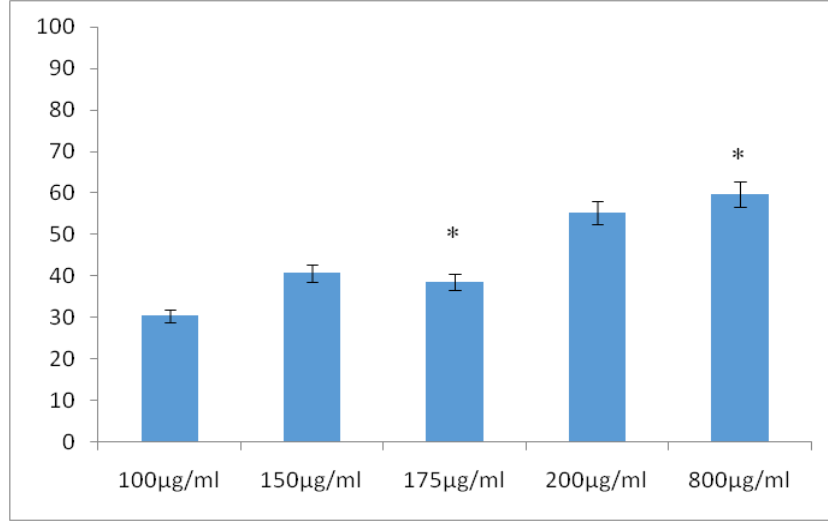
Mila kaynaklı propolis fraksiyonları arasında en etkili olan metanol (P1– M) fraksiyonudur. Diğer fraksiyonlara kıyasla çok düşük konsantrasyonlarda etki göstermesi dikkati çekmiştir. Metanol fraksiyonunun antibiyofilm aktivitesi minimum %55 (50 µg/ml) ve maksimum %92 (200 µg/ml)'dir (Şekil 3. 4).



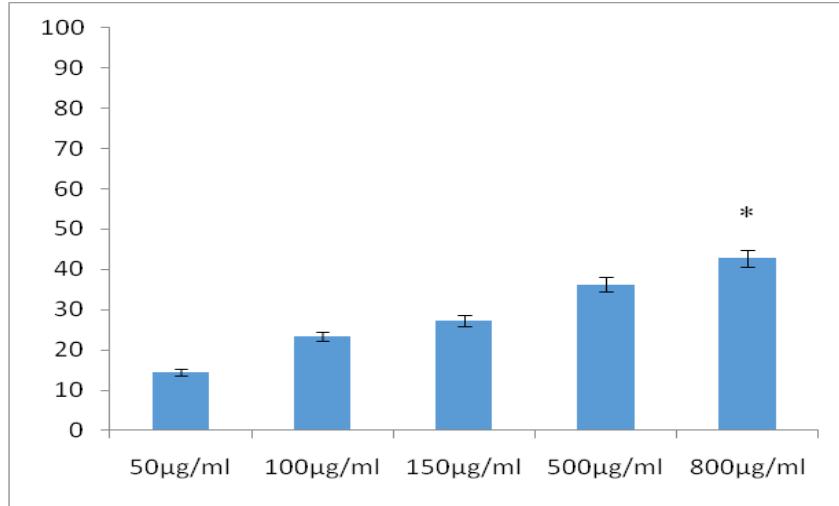
Şekil 3. 4: Metanol (Mila, Cezayir; P1–M) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi. Sonuçlar DMSO etkisi çıkartılarak değerlendirildi. *: Diğer konsantrasyonlardan farklı ($p<0.05$).



Şekil 3. 5: Petrol eter (Skikda, Cezayir; P2–P) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi. Sonuçlar DMSO etkisi çıkartılarak değerlendirildi. *: Diğer konsantrasyonlardan farklı ($p<0.05$).



Şekil 3. 6: Kloroform (Skikda, Cezayir; P2-K) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi. Sonuçlar DMSO etkisi çıkartılarak değerlendirildi. *: Diğer konsantrasyonlardan farklı ($p<0.05$).



Şekil 3. 7: Metanol (Skikda, Cezayir; P2-M) fraksiyonunun antibiyofilm etkisi. Sonuçlar DMSO etkisi çıkartılarak değerlendirildi. *: Diğer konsantrasyonlardan farklı ($p<0.05$).

Cezayir-Skikda kaynaklı propolisin petrol eter (%76), kloroform (%59) ve metanol (%42) fraksiyonları maksimum antibiyofilm aktiviteye 800 µg/ml konsantrasyonda ulaşmıştır (Şekil 3. 5, 3. 6 ve 3. 7). Etil asetat fraksiyonunun denenen konsantrasyonlarda herhangi bir antibiyofilm aktivitesi gözlenmemiştir. Ancak etil asetat özütünün antimikrobiyal etkisinin olup olmadığının anlaşılması için hem daha yüksek konsantrasyonlarda hem de farklı gram pozitif, gram negatif ya da insan patojeni *Candida* türlerine karşı etkinliğinin araştırılmasının uygun olacağına karar verilmiştir.

Genel olarak, Mila ve Skikda propolislerinin antibiyofilm aktivitesi kıyaslandığında Skikda'dan toplanan propolis daha az etkili olmuştur. Bu farklılık bakteri türü, tipi, propolisin kimyasal içeriği, propolis konsantrasyonu ve biyofilm oluşum süresi gibi birçok faktörden kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle özellikle farklı mikroorganizma türlerinin de denenerek Skikda propolisinin etki ettiği tür veya grup belirlenmelidir. Diğer taraftan Mila kaynaklı metanol özütünün en etkili özüt olması antibakteriyel etkili olduğu bilinen flavanoidlerden kaynaklanmış olabilir. Çünkü metanol, flavanoidlerin ekstraksiyonu için en uygun çözücüdür (Wagh 2013, Kothari 2014). Nitekim Kafkas ve Ural dağlarının etrafındaki bölgelerden toplanan propolislerin yüksek antibiyofilm aktivitesi onların zengin flavanoid içeriklerinden kaynaklanmaktadır (Bryan ve diğ. 2015).

Propolisin kimyasal içeriği coğrafik bölgeye, iklime veya bitki türüne göre değişir. Kimyasal içeriğindeki bu çeşitlilik propolise güçlü antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidant, antiviral, antikanser, anti-inflamatuar ve antialerjik gibi birçok biyolojik ve tıbbi özellik kazandırır. Elbette bu yararlı özellikler, yapısındaki flavanoidler, aromatik asitler, yağ asitleri ve vitaminlerden kaynaklanır. Örneğin, aromatik asitlerden kafeik asit ve ferulik asit ile flavanoidlerden chrysin ve galanginin propolisin yapısında yüksek miktarda bulunduğu ve propolisin antibakteriyel, antibiyofilm ve antikanser etkisinin bu bileşiklerden kaynaklandığı birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (Patel 2016; Przybyłek ve diğ. 2019; Ahangari ve diğ. 2018). Doğal ürünlerde bulunan biyoaktif bileşikler genelde bakteri zarının geçirgenliği arttırmakta, ATP sentezini, membran transportu ve hareketliliği azaltmaktadır (Tsuchiya ve Iinuma 2000). Bununla birlikte bu tür bileşikler DNA giraz enzimini de inhibe etmektedir (Mirzoeva ve ark., 1997).

Stan ve ark. (2016) Romanya'dan temin ettikleri propolis örneklerinin *Staphylococcus* sp. klinik suşları üzerindeki etkisini değerlendirmiş ve etanol özütlerin belirgin derecede antibiyofilm aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılara göre, propolis bakterilerin substratlara yapışmasını önlemekte ve çözünebilir virulans enzimleri inhibe etmektedir. Benzer bir başka çalışmada ise Polonya propolisinin etanol özütü *Staphylococcus epidermidis* biyofilmine doza bağlı bir etki göstermiştir (Wojtyczka ve ark. (2013). Şili propolisinin etanol özütü ise *Streptococcus mutant* suşlarının biyofilm oluşumunu düşük oranda inhibe

ederken (Veloz ve diğ. 2015), Tunus propolisinin etanol özütü oral streptokoklarda mükemmel bir antibiyofilm aktivite göstermiştir (Khouidi ve diğ. 2010). Diğer taraftan Daikh ve diğ. (2020), Cezayir propolisinin petrol eter, kloroform, etil asetat ve metanol özütlerinin (300 µg/ml) *S. aureus* ATCC 29213 bakterisine karşı antibiyofilm etkisini araştırmışlar ve bu etkinin kullanılan organik çözücü ve propolisin toplandığı coğrafik bölgeye bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, metanol özütünün yüksek antibiyofilm etkisinin, diğer fraksiyonlara kıyasla metanol fraksiyonundaki kafeik ve ferulik asit içeriğinin daha fazla olmasından kaynaklandığını da ifade etmişlerdir. Kafeik asitin antibiyofilm etkisi bilimsel olarak da gösterilmiştir (Luís ve diğ. 2014).

Çalışmamızda kullandığımız propolis örnekleri Cezayir'in Mila ve Skikda illerine aittir. Kullanılan test bakterisinin (*S. aureus* ATCC 29213) biyofilm oluşumu üzerine etkisi karşılaştırıldığında, Mila propolisi Skikda propolisinden daha etkilidir. Farklı coğrafi veya botanik kökenli propolis örnekleri, yapısındaki biyolojik olarak aktif bileşikler arasındaki etkileşimler nedeniyle farklı antibakteriyel aktivite de sergiler. Diğer bir deyişle, propolisteki bazı bileşikler diğer bileşiklerle sinerjik etki gösterebilir. Bu nedenle, propolisin çok iyi tanımlanmış kompozisyonunun kesin mikrobiyal aktivitesini teorik olarak rapor etmek mümkün değildir. Ancak elde edilen çalışma sonuçlarına göre Mila ve Skikda propolisleri hem orijin farklılığından hem de organik çözücü tipinden dolayı farklı antibiyofilm etki göstermiştir.

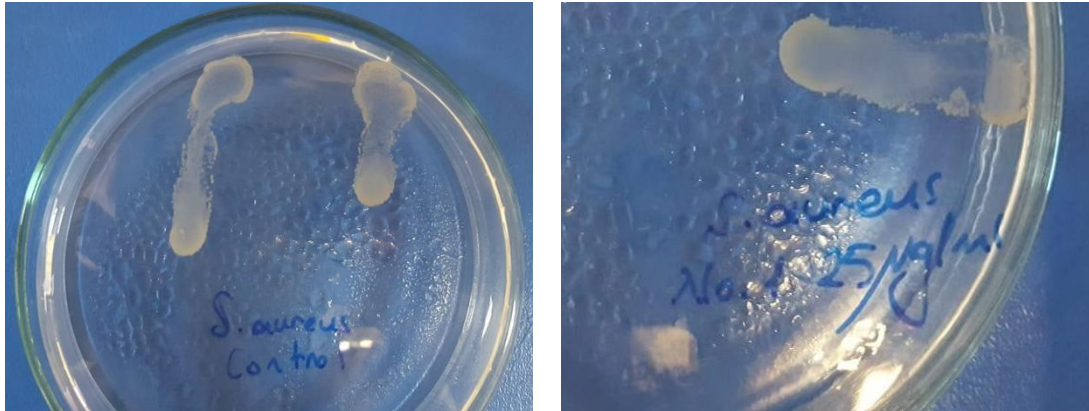
3.2 Propolis Fraksiyonlarının Anti-kayma ve Anti-yüzme Aktivitesine Etkisi

Kayan hücreler, oluşan koloniden koordineli bir şekilde hızlı ve duraklamadan ilerleyerek, tipik koloni morfolojisinden bir miktar farklılaşma geçirene kadar göç eder. Düzenli göç ve birleştirme döngüleri, agar yüzeyinde karakteristik bir eş merkezli halka düzenine sahip koloni oluşturur (Allison ve Hughes, 1991; Rauprich ve diğ. 1996). Bakterilerde hareketlilik, patogeneizde, antibiyotik dirençliliğinde veya biyofilm oluşumda önemli rol oynamaktadır. Örneğin *Salmonella enterica* türünde kayma hareketi sadece direncin gelişimiyle ilişkilidir (Kim ve diğ. 2003; Kim ve Surette, 2003).

Günümüzde bitki veya propolis gibi doğal ürünlerden elde edilen özütlerin bakteri hareketliliği üzerine etkisi araştırılan önemli konulardandır. Örneğin, *Amomum tsaoko* bitkisi meyvelerinin etanol ekstraktı, *S. aureus* ATCC 6538'in kayma hareketini %90'ın üstünde inhibe etmiştir (Rahman ve diğ. 2017). Marco ve diğ. (2017), İtalyan propolisinin *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 bakterisinin yüzme ve kayma hareketliliğine etkisini araştırmışlardır. İtalyan propolisi 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonda yüzme hareketliliğini sırasıyla %50 ve %25, kayma hareketliliğini ise 50 µg/ml konsantrasyonda %5 ve 100 µg/ml konsantrasyonda ise %50 oranında inhibe etmiştir.

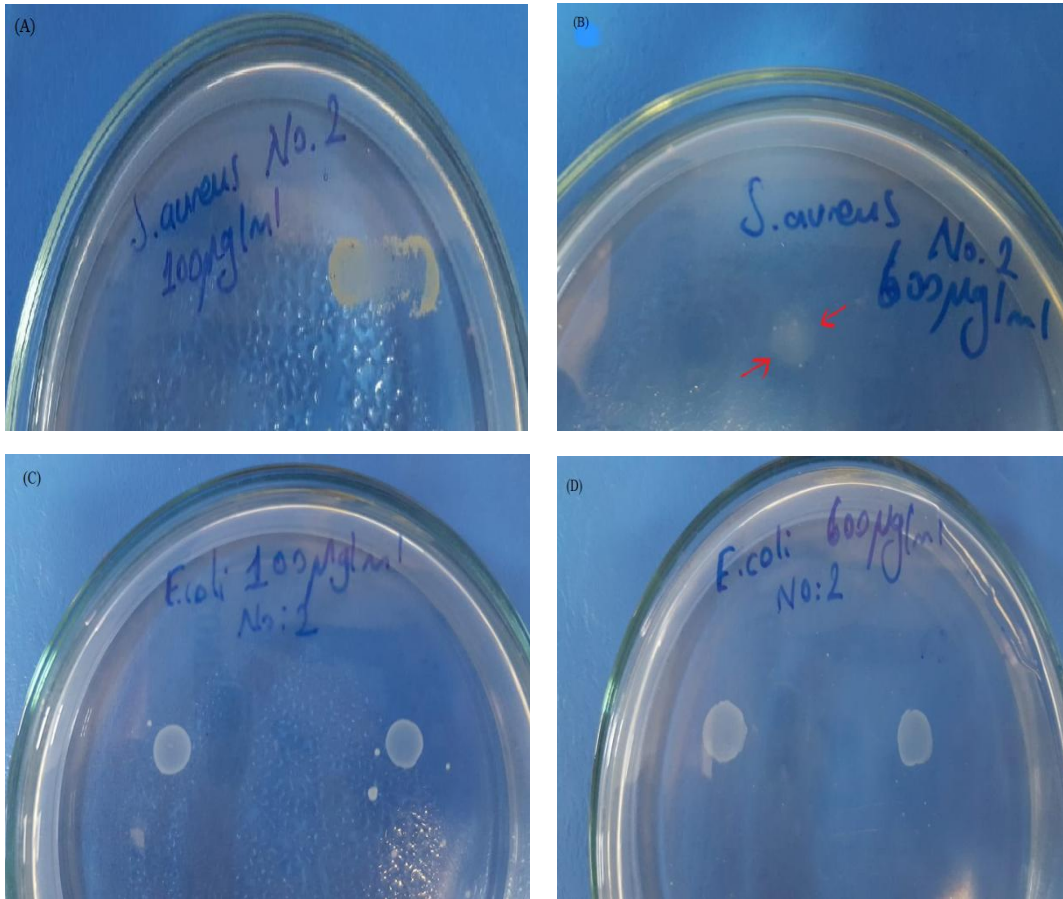
Çalışmamızda propolis alt fraksiyonların en düşük ve en yüksek iki dozda anti-kayma ve anti-yüzme aktivitesi test edilmiştir. Ölçümler milimetrik cetvelle yapılmıştır.

Mila kaynaklı P1 kodlu propolisin petrol eter fraksiyonu yüksek konsantrasyonda (800 µg/ml) *S. aureus*'un hareketliliğini %100 inhibe ederken 25 µg/ml konsantrasyonda hareketliliğin %5,5'i inhibe olmuştur (Şekil 3. 8). 25 ve 800 µg/ml ortamında ise *E. coli*'nin hareketliliği üzerine herhangi bir inhibisyon etki gözlenmemiştir. Bilindiği üzere *S. aureus* flajellar olmayan bir harekete sahipken *E. coli* flajellar hareket yapmaktadır. Bu fraksiyonunun *E. coli* hareketliliğine herhangi inhibisyon etki göstermemesi, flajellar harekete spesifik olmadığı sonucunu düşündürmüştür.



Şekil 3. 8: Petrol eter (Mila, Cezayir) fraksiyonunun anti-kayma aktivitesi. Bakteri propolis içermeyen (sol) ve 25 µg/ml propolis içeren (sağ) yumuşak agarda geliştirilmiştir.

Kloroform fraksiyonunun 100 ve 600 µg/ml anti-yüzme ve anti-kayma aktivitesi test edilmiş ve artan konsantrasyonlara bağlı olarak inhibisyonda da artış gözlenmiştir. Buna göre minimum dozda *S. aureus*'un kayma aktivitesine %29,4 oranında etki gösterirken maksimum dozda bu oran %77,5 olmuştur (Şekil 3. 9- A, B). Kloroform özütünün maksimum ve minimum dozlarının *S. aureus*'un aksine *E. coli*'nin hareketliliğine aynı oranda (%40) etki gösterdiği dikkat çekmiştir (Şekil 3. 9- C, D). Etil asetat fraksiyonu, düşük konantrasyonda (100µg/ml) *S. aureus*'un hareketliliğine %79,26 oranından etkili olurken maksimum konsantrasyonda %100 etki göstermiştir. Aynı zamanda düşük konsantrasyonda (100 µg/ml) *E. coli*'nin hareketliliğinde %25,20 oranında inhibisyon etkisi olmuştur. Bu sonuç, türe spesifik olduğunu düşündürmüştür.

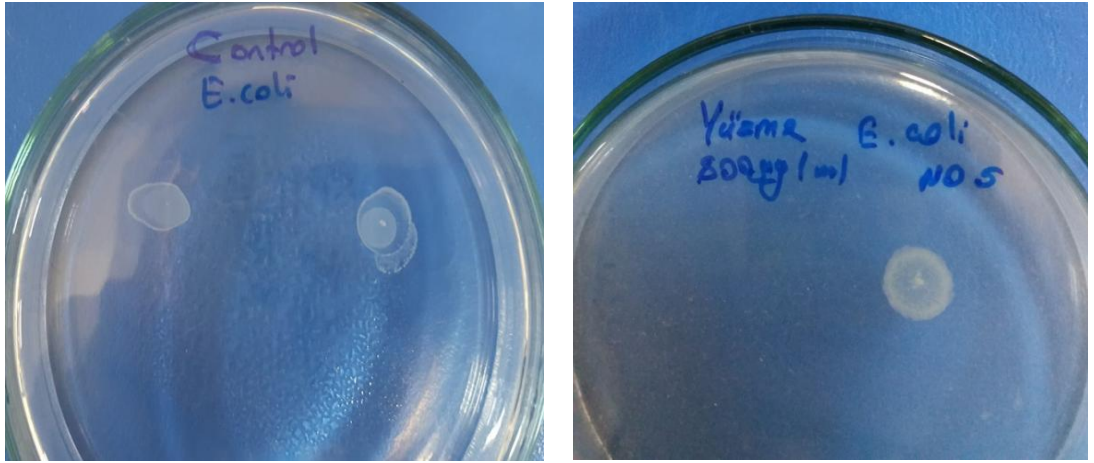


Şekil 3. 9: Kloroform (Mila, Cezayir) fraksiyonunun anti-kayma ve anti-yüzme aktivitesi. Anti-kayma (A ve B) ve anti-yüzme (C ve D).

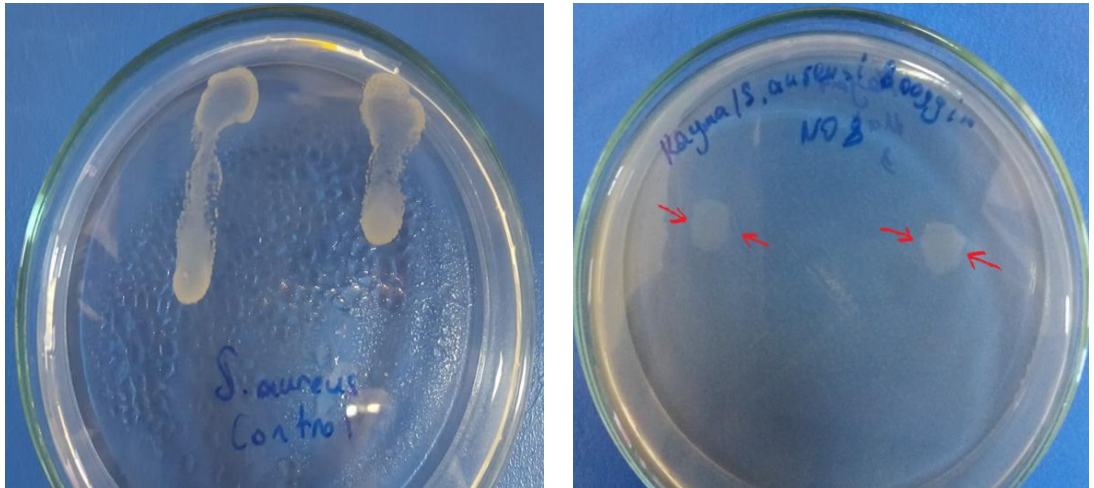
P2 kodlu Skikda propolisinin petrol eter fraksiyonunun *S. aureus*'un hareketliliğinde herhangi bir etkisi gözlenmezken, *E. coli* hareketliliğinde sadece 800

$\mu\text{g/ml}$ dozda %6 oranında ihibisyon etkisi olmuştur (Şekil 3. 10). Benzer şekilde metanol fraksiyonu da *E. coli* üzerine etki göstermezken *S. aureus* üzerine $800 \mu\text{l/ml}$ 'de %66 oranında anti-kayma aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 3. 11).

Mila propolisinin metanol, Sikikda propolisinin ise etil asetat ve kloroform fraksiyonlarının test bakterilerinin hareketlilikleri üzerinde etkilerinin olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 3. 10: Petrol eter (Skikda, Cezayir) fraksiyonunun anti-yüzme aktivitesi. Bakteri propolis içermeyen (sol) ve $800 \mu\text{g/ml}$ propolis içeren (sağ) yumuşak agarda geliştirilmiştir.

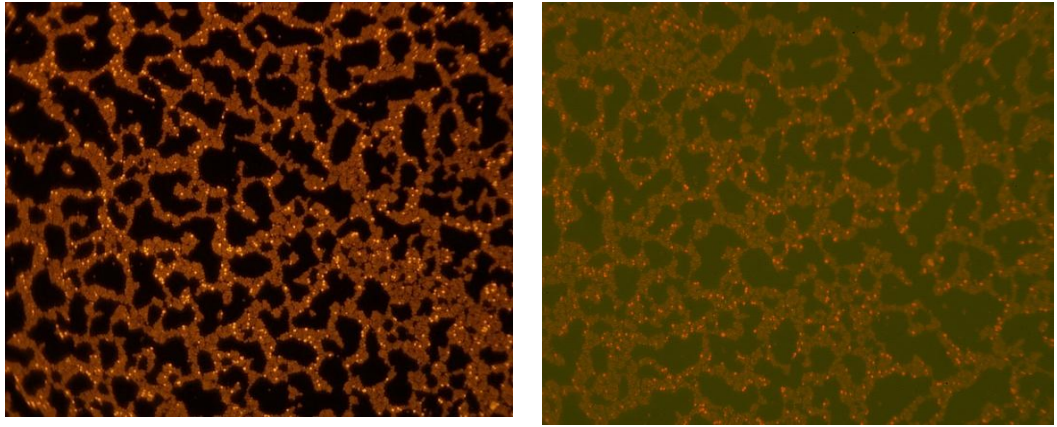


Şekil 3. 11: Metanol (Skikda, Cezayir) fraksiyonunun anti-kayma aktivitesi. Bakteri propolis içermeyen (sol) ve $800 \mu\text{g/ml}$ propolis içeren (sağ) yumuşak agarda geliştirilmiştir.

3.3 Floresan Mikroskop ile Biyofilm Yapısının İncelenmesi

Propolis ile muamele edilmiş ve edilmemiş *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapısı, farklı ışıktaki (yeşil ve mavi) floresan mikroskopta incelenmiştir. Floresan mikroskop analizinde, propolis örneklerinin maksimum antibiyofilm aktivite gösterdikleri en yüksek konsantrasyonları kullanılmıştır.

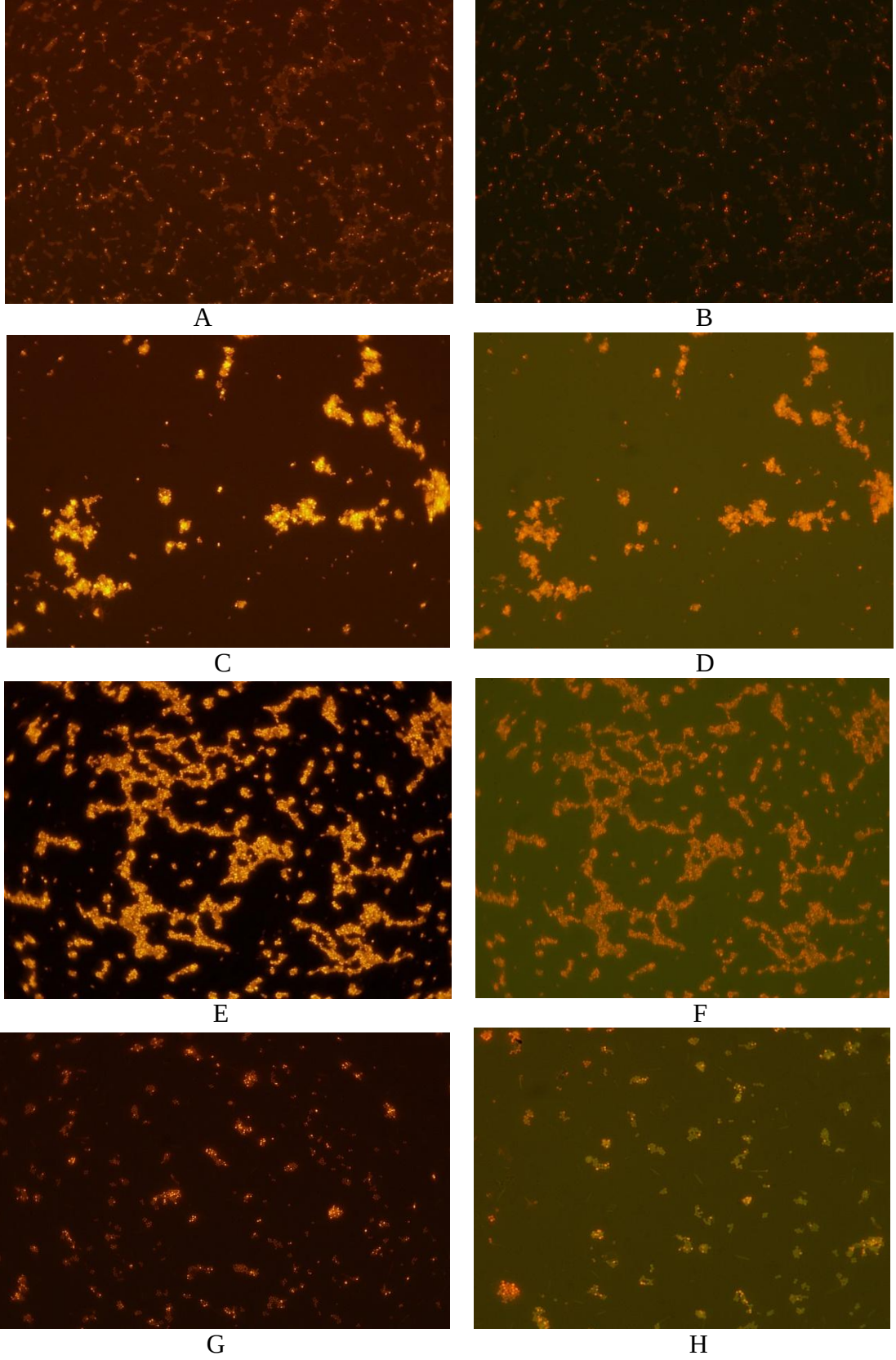
Propolis ile muamele edilmemiş bakteri biyofilm yapısı (kontrol) Şekil 3.12'de verilmiştir. Biyofilm yapısının kompakt ve yoğun topluluk halinde ve her topluluğun birbiriyle su kanalları ile bağlantılı olduğu belirgin şekilde görülmektedir.



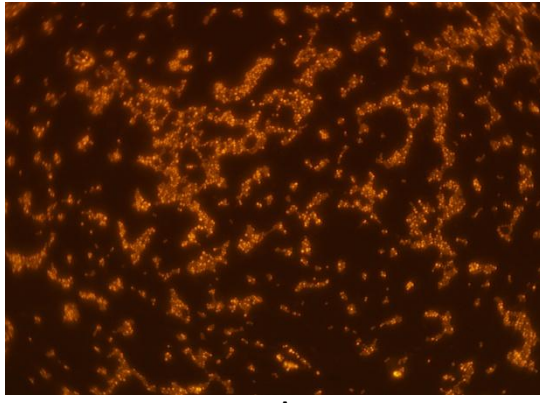
Şekil 3. 12: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 bakterisinin floresan mikroskobunda biyofilm yapısı. Mikroskop görüntüleri yeşil (sol) ve mavi (sağ) filtre ile çekilmiştir.

Kontrol grubunun aksine, genel olarak her iki propolis (Mila ve Skikda) örneğinin alt fraksiyonları ile muamele edilmiş bakteri biyofilm oluşumunda gözle görülür derecede bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.13 ve 3.14). Biyofilm topluluklarının bozulduğu ve topluluklar arasındaki su kanallarında yer yer kopmalar olduğu da dikkat çekmiştir. Canlı hücre (parlak) sayısındaki azalış ve ölü hücre (mat) sayısındaki artış kontrole göre belirgin derecededir.

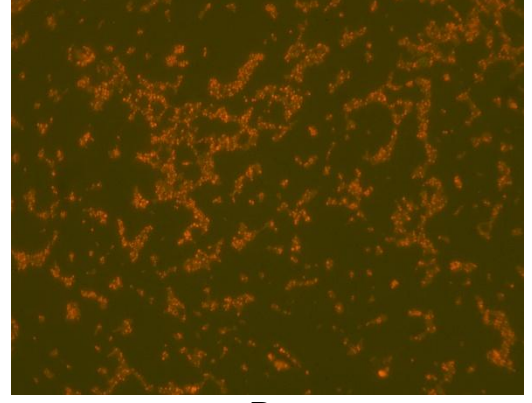
Mila ve Skikda fraksiyonlarının floresan görüntülerini birbiriyle kıyasladığımızda Mila propolisi fraksiyonlarının daha etkili olduğu görülmektedir. Özellikle Skikda propolisinin etil asetat özütünün (Şekil 3.14 G ve H) kontrole benzer görüntüsü, antibiyofilm aktivitesinin olmadığı sonucunu kanıtlar niteliktedir. Floresan mikroskop analizi ile antibiyofilm aktivite sonuçları birbiriyle paraleldir.



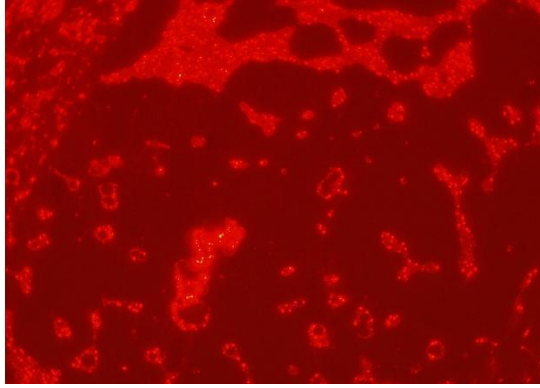
Şekil 3.13: Propolis (Mila, Cezayir) ile muamele edilmiş *S. aureus* ATCC 29213'ün floresan mikroskopta biyofilm görüntüsü. Bakteri, 800 µg/ml petrol eter (A, B), 500 µg/ml kloroform (C, D), 400 µg/ml etil asetat (E, F) ve 200 µg/ml metanol (G, H) fraksiyonu ile muamele edilmiştir.



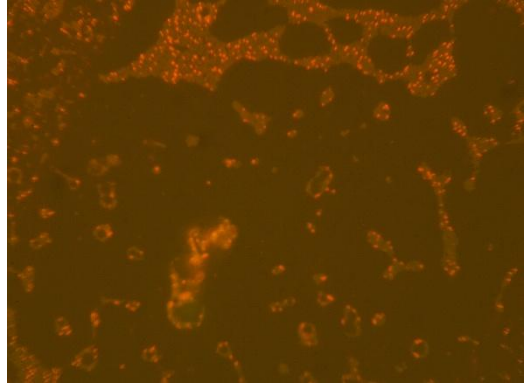
A



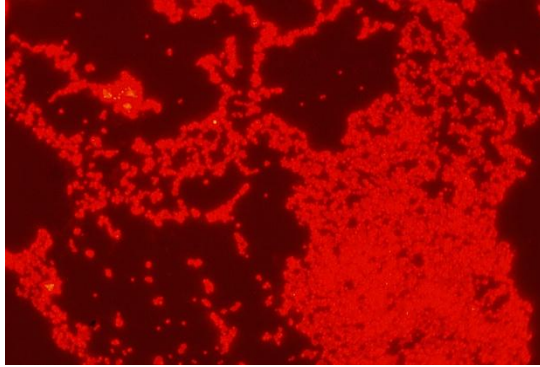
B



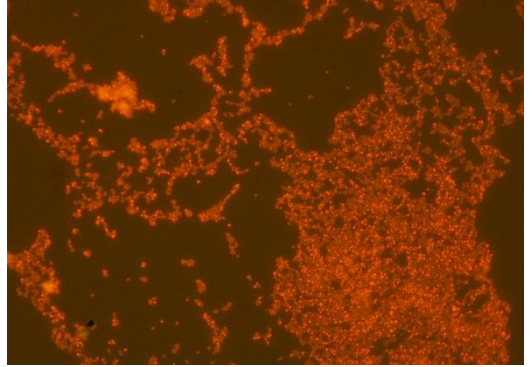
C



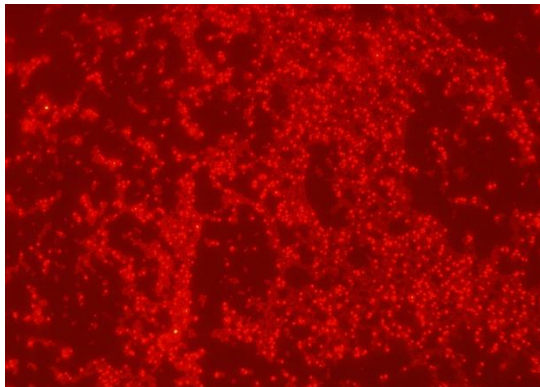
D



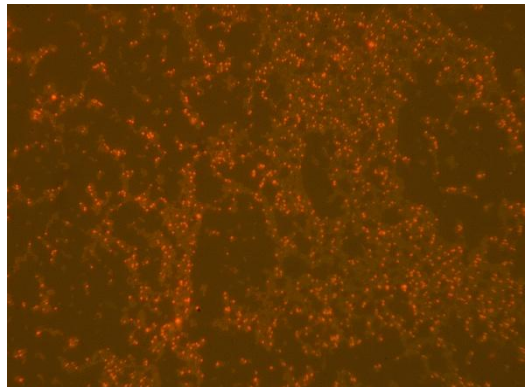
E



F



G



H

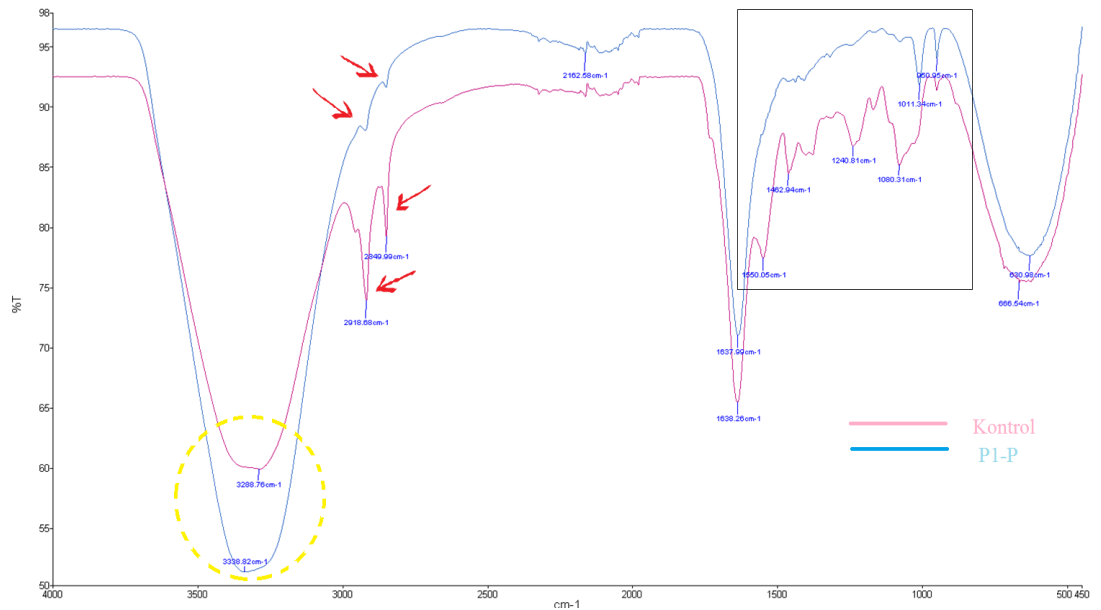
Şekil 3. 14: Propolis (Skikda, Cezayir) ile muamele edilmiş *S. aureus* ATCC 29213'ün floresan mikroskopta biyofilm görüntüsü. Bakteri, 800 µg/ml petrol eter (A, B), 800 µg/ml kloroform (C, D), 800 µg/ml metanol (E, F) ve 800 µg/ml etil asetat (G, H) fraksiyonu ile muamele edilmiştir.

3.4 FTIR Analizi Sonuçları

Polipeptitlerin ve proteinlerin konformasyonel yapısını incelemek için kızılötesi (IR) spektroskopisinin kullanımı 1950'ye kadar uzanır. 1970'lerde ise araştırmacılar, proteinlerdeki katlanma ve konformasyonunun dinamiklerini incelemek için bu analitik tekniği kullanmaya başladılar. Daha sonra da IR spektroskopisinin uygulanması, nükleik asitlerin ve lipidlerin analizine ve karbonhidratların araştırılmasına kadar genişletildi (Mantsch 2001; Beekes ve diğ. 2007). Kızılötesi spektrumlardaki karakteristik frekanslar, yoğunluklar ve bant genişlikleri, moleküllerdeki fonksiyonel grupların tanımlanmasına ve biyolojik ürünlerdeki konformasyonel olarak farklı yapıların karakterizasyonuna izin verir (Beekes ve diğ. 2007). Üstelik geleneksel mikrobiyal tekniklerle varlığı gösterilemeyen sulardaki patojen bakterileri belirlemek için de FT-IR spektroskopisi kullanılabilir. Hatta bu yöntem klor uygulamasının etkinliğini doğrulamak ve hücre hasarı ya da ölüm derecesini tahmin etmek için de yararlı olabilir (Al-Qadiri ve diğ. 2008). FTIR spektroskopisinin süt ve gıda kaynaklı *S. aureus* izolatlarının tanımlanması için hızlı ve sağlam bir yöntem olduğu da gösterilmiştir (Lamprell ve diğ. 2006; Hegazi ve diğ. 2019) Mısır propolisinin etanol ekstraktını FTIR ile bazı araştırmacılar tarafından analiz edilmiştir. Buna göre, 3427 cm^{-1} dalga boyu fenolik bileşikler, 1633 cm^{-1} dalga boyu flavanoid ve lipidlerin gerilme C=O titreşimini, 1367 cm^{-1} dalga boyu C-O-H titreşimlerini ve 1028 cm^{-1} dalga boyu ise aromatik eterlerin gerilmesine bağlı olarak C-O-C bağının değişimlerini yansıtmaktadır. Fernandes ve diğ. (2017), Lapachol'un yarı sentetik türevleri olan β -Lapachon ve Lapachol Oxime'in *S. aureus* ATCC 25923 karşı antibakteriyal etkisini FTIR analizi ile de gözlemlemişlerdir. FTIR analizine göre Lapachol Oxime ile muamele edilen örneklerde 650-1450 cm^{-1} arasındaki şiddetlenme C=C bağlarındaki değişimler ve metilen gruplarındaki 1465 cm^{-1} civarındaki şiddetlenme de membran lipid deformasyonu gerçekleşmiştir. Bakteri β -Lapachon ile muamele edildiğinde ise 1820-1660 cm^{-1} aralığında oluşan şiddetlenme, hücre duvarındaki ester bağlarındaki (C=O) değişimi karakterize etmektedir. Farklı bitki özütlerinin FTIR analizi hidroksil gruplar, alkanlar (C-H), alkenler (C=C), aromatik halkalar (C=O), karboksilik (C=O) ve aromatik amidlerin varlığı FTIR ile gösterilmiştir (Ahmad ve Ali 2013).

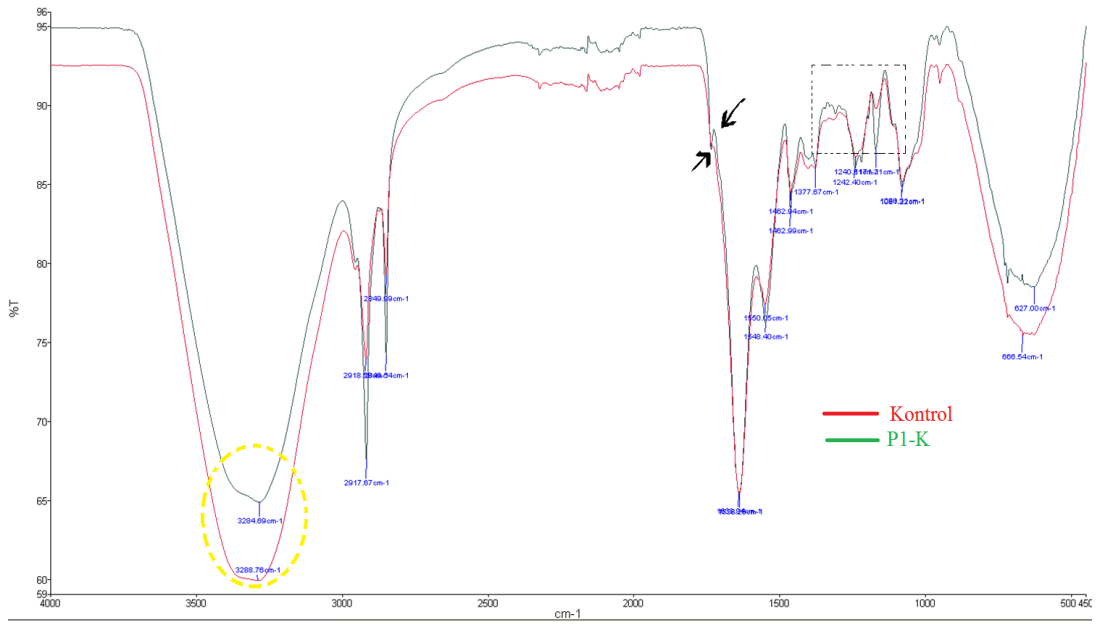
Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda biz de propolis örneklerimizin bakteri hücre duvarındaki hangi gruplara etki ettiğini gözlemlemek için propolis ile muamele edilen *S. aureus* hücreleri FTIR analizi ile incelendi. Bunun için her propolis fraksiyonu en yüksek antibiyofilm aktivitesi gösterdiği maksimum dozda *S. aureus* bakterisine uygulanmıştır. 4000 – 450 cm^{-1} aralığında ortaya çıkan değişiklikler farklı renk ve ayrıştırıcılarla belirtilmiştir. Genel olarak tüm propolis alt fraksiyonlarında 900-450 cm^{-1} dalga boylarında kontrolden farklı olarak yeni titreşimler olduğu gözlenmiştir. Bu titreşimler, doğru parmak izi bölgesi olarak bilinir ve henüz tam oluşmamış fonksiyonel grupları ve tamamlanmamış hücre bileşenlerini ifade etmektedir (Baker ve diğ. 2014).

Petrol eteri (Mila) fraksiyonu ile muamele edilmiş bakterinin FTIR analizi Şekil 3. 15`de verilmiştir. Sarı halka içerisindeki ve kırmızı okla işaretlenmiş bölgede (3500-2500 cm^{-1}) gözlenen farklılığın lipid yapısındaki CH_2 grubundaki değişiklikten kaynaklandığı düşünülmüştür. Benzer şekilde 1740-1230 cm^{-1} arasındaki titreşimsel değişimler, hücre membranındaki olası deformasyonlara yorumlanmıştır. 1100 cm^{-1} dalga boyundaki yükselen titreşim ise polisakkarit bileşenlerindeki değişimi göstermektedir. Siyah çerçeveyle alınmış bölgede 1300-1100 cm^{-1} dalga boyuna uygun gelen kısımda titreşimin inmeden yükseldiği görülmektedir. Bu dalga boyu, nükleik asit yapısındaki PO^2 ve PO^{2-} gruplarındaki farklılığı göstermektedir.



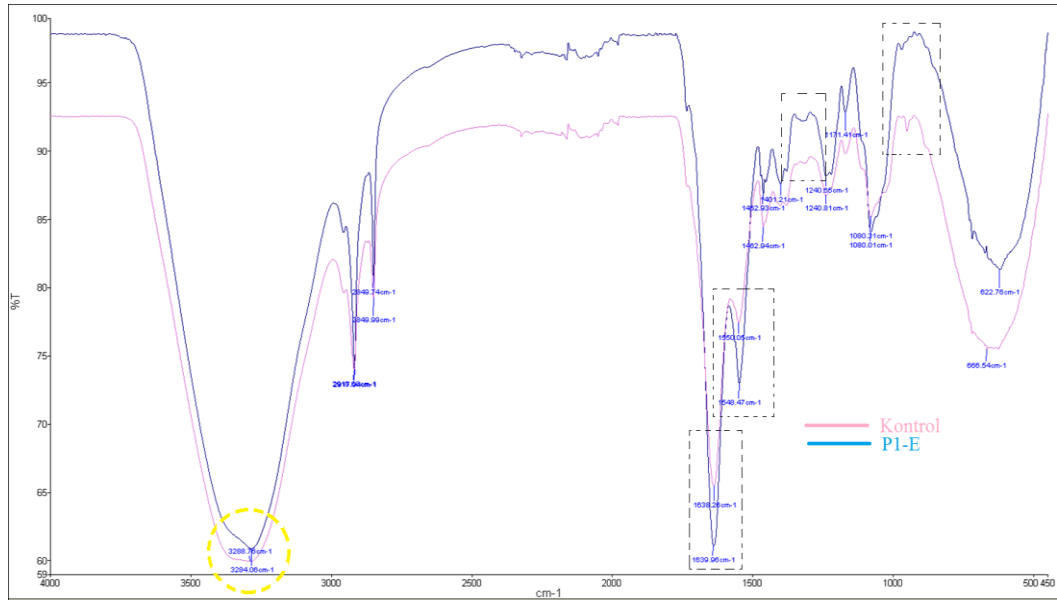
Şekil 3. 15: Petrol eter (P1-P) ile muamele edilen *S. aureus* ATCC 29213`ün FTIR analizi.

Kloroform (Mila) fraksiyonu ile muamele edilmiş bakterinin FTIR analizi Şekil 3. 16'de verilmiştir. Siyah okla gösterilen asimetrik titreşim (1800 cm^{-1}) lipid gruplarındaki C=O ester bağlarında değişimi göstermektedir. Siyah çerçeve içerisindeki bölgede hem $1740\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$ arasındaki titreşimsel değişimler hücre membranında gerçekleşmiş olan deformasyonla birlikte, 1100 cm^{-1} dalga boyundaki değişiklik hücre duvarındaki ve biyofilm yapısındaki polisakkarit bileşenlerindeki olası değişimi göstermektedir.



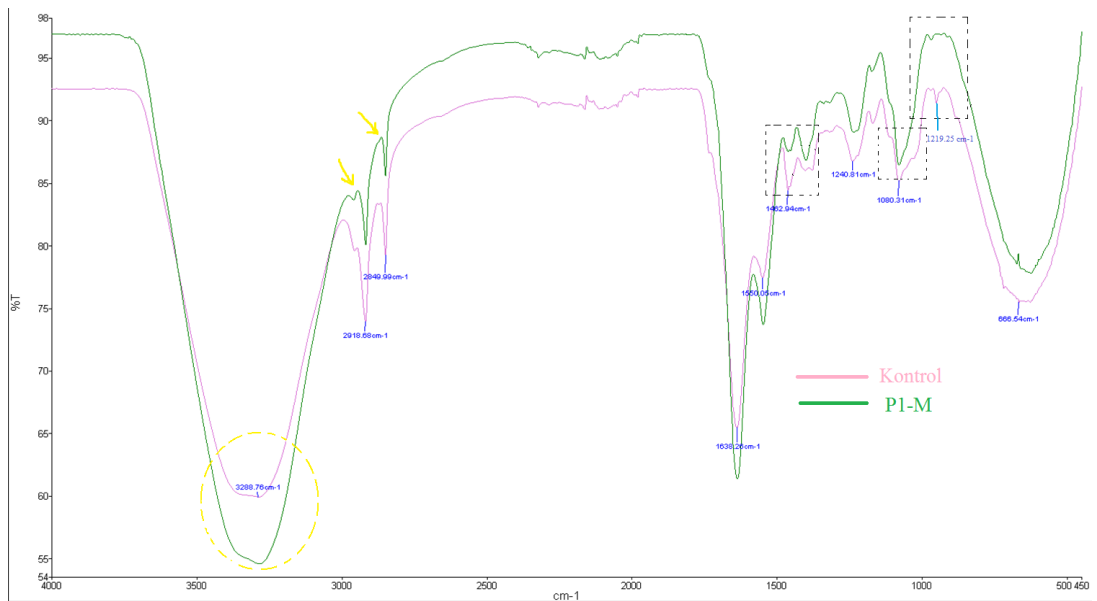
Şekil 3. 16: Kloroform (P1-K) ile muamele edilen *S. aureus* ATCC 29213'ün FTIR analizi.

Etil asetat (Mila) fraksiyonu ile muamele edilmiş bakterinin FTIR analizine göre $3500\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ dalga boylarındaki küçük değişiklik membrandaki lipitin CH_2 gruplarındaki değişikliği göstermektedir. Siyah çerçeveler içerisindeki bölgede hem $1740\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$ arasındaki titreşimsel değişimler hücre membranında gerçekleşmiş olan deformasyonla birlikte, 1100 cm^{-1} dalga boyundaki değişiklik hücre duvarındaki ve biyofilm yapısındaki polisakkarit bileşenlerindeki değişimi göstermektedir (Şekil 3. 17).



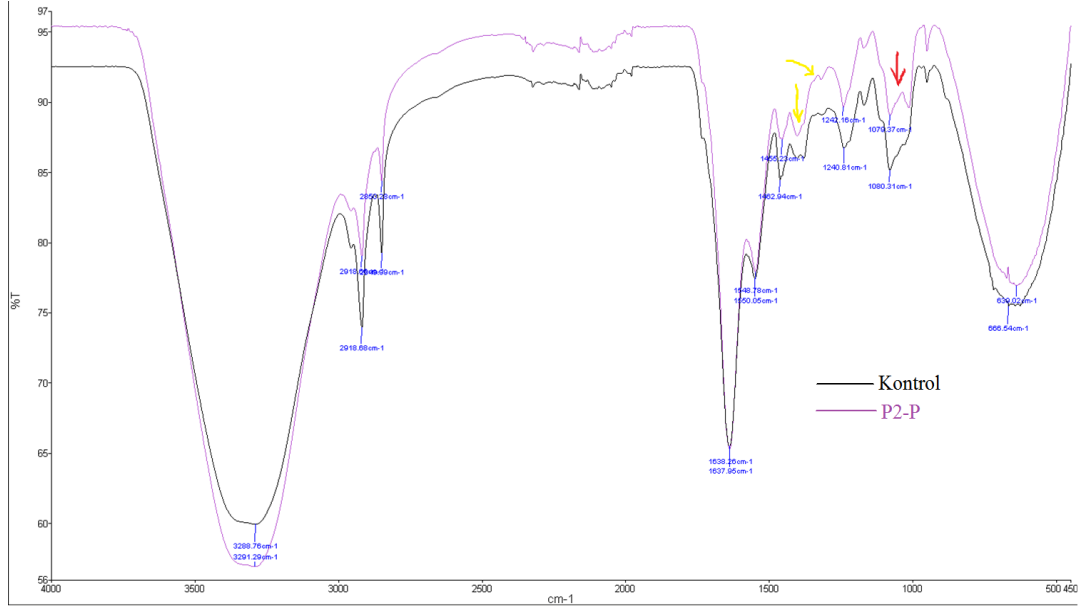
Şekil 3. 17: Etil asetat (P1-E) ile muamele edilen *S. aureus* ATCC 29213'ün FTIR analizi.

Metanol fraksiyonu (Mila) ile muamele edilen bakteri hücresinin FTIR analizi Şekil 3. 18'te verilmiştir . Sarı oklarla görülen titreşim ($\sim 2800 \text{ cm}^{-1}$), lipid yapısındaki CH_2 gruplarındaki değişiklik anlamına gelmektedir. $1100\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyundaki değişiklik polisakkarit bileşenlerindeki karbonhidratların CO-O-C gruplarındaki değişimi yansıtmaktadır. Ek olarak 1080 cm^{-1} dalga boyundaki kayma nükleik asit yapısındaki PO^2 ve PO^{2-} gruplarında olası değişiklik olarak yorumlanabilir.



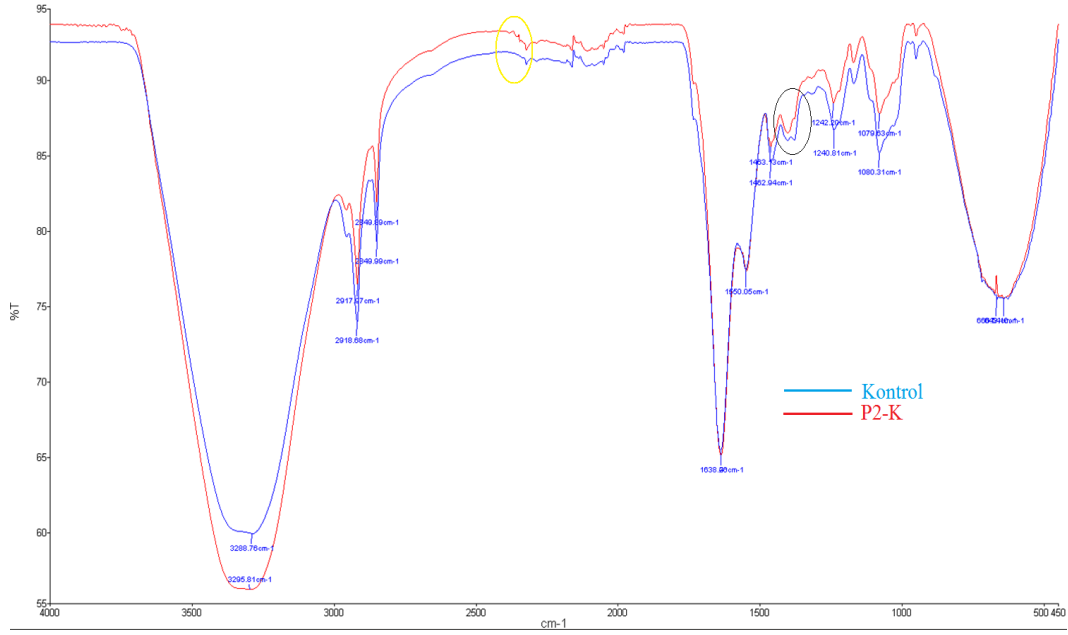
Şekil 3. 18: Metanol (P1-M) ile muamele edilen *S. aureus* ATCC 29213'ün FTIR analizi.

Petrol eter ile muamele edilen örnekte diğer örneklerden farklı olarak görülen ve kırmızı okla gösterilen pik (1100 cm^{-1} civarı) dikkati çekmiştir. İlgili pik aralığının polisakkarit bileşenlerde belirgin derecede bir farklılığı yansıtmaktadır (Şekil. 3.19).



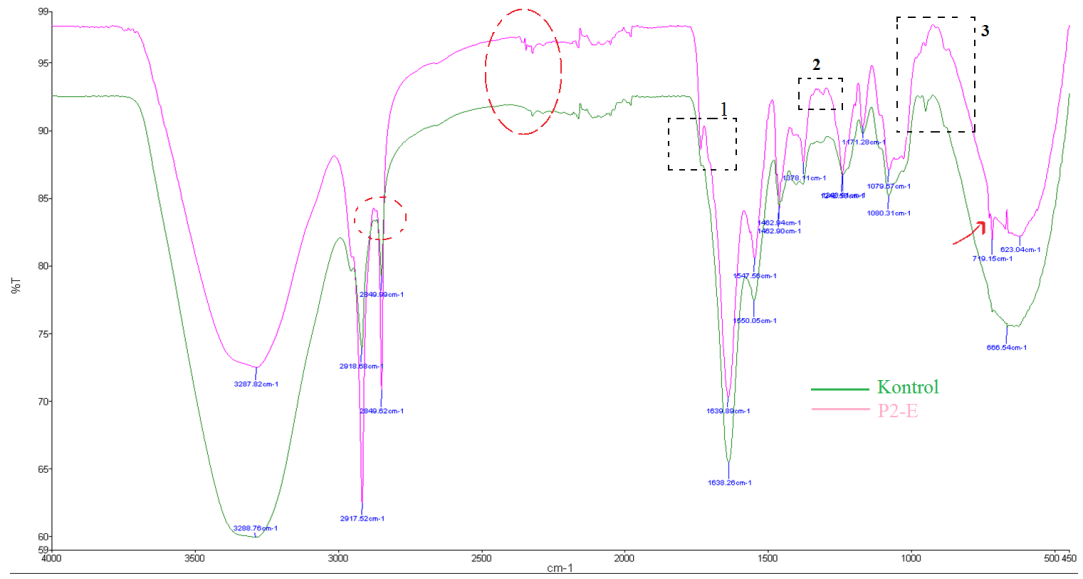
Şekil 3. 19: Petrol eter (P2-P) ile muamele edilen *S. aureus* ATCC 29213'ün FTIR analizi.

Şekil 3. 20`da sarı halka içerisinde gösterilen ve kontrolden farklı iki pik görülmektedir. Piklerin şiddeti 1740-1230 cm^{-1} aralığında olup hücre membranında gerçekleşen deformasyonları işaret ettiği düşünülmüştür. Siyah halka içinde görülen yaklaşık 1300 cm^{-1} dalga boyundaki pikteki değişiklik nükleik asit yapısındaki fosfat gruplarında değişimleri göstermiştir.



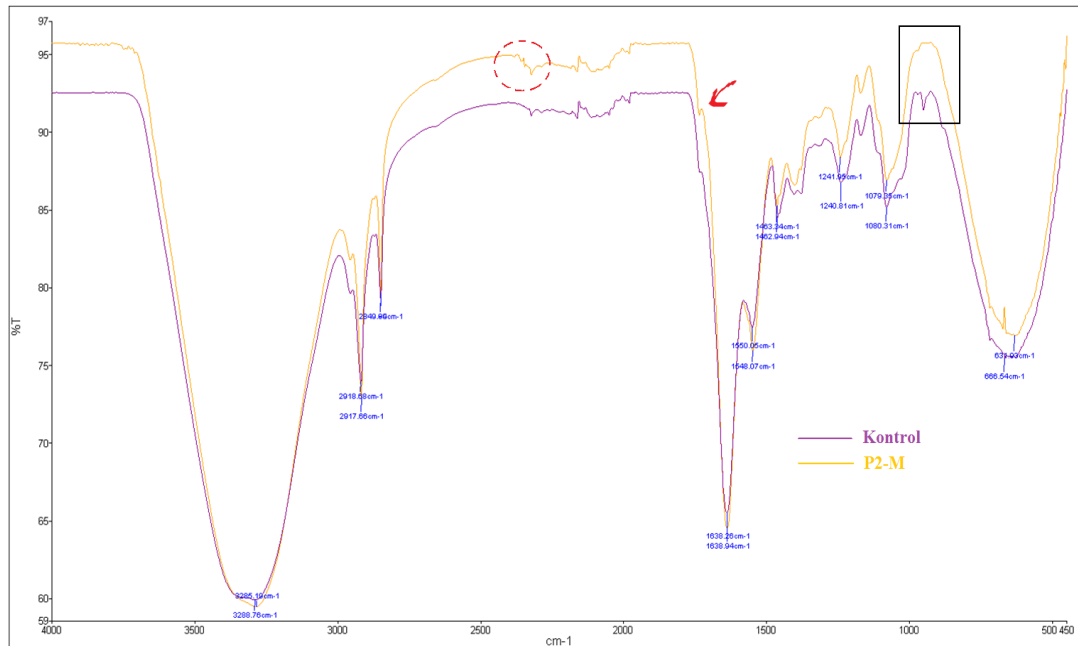
Şekil 3. 20: Kloroform (P2-K) ile muamele edilen *S. aureus* ATCC 29213'ün FTIR analizi.

Şekil 3. 21'de gösterildiği üzere küçük kırmızı halka içinde oluşmuş şiddetlenme lipit yapısındaki CH_2 gruplarındaki değişimi göstermektedir. 1. siyah çerçeve içinde belirtilmiş olan bölgedeki ester gruplarındaki $\text{C}=\text{O}$ değişimlerini gösteren asimetrik titreşim (1800 cm^{-1}) hem kontrol hem de diğer propolis fraksiyonlarının $\text{C}=\text{O}$ gruplarında yaptığı değişiklikten daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca kırmızı okla gösterilen 719 cm^{-1} dalga boyundaki kayma da etil asetatı diğer fraksiyonlardan ayıran diğer farklılık olmuştur. 2. siyah çerçevedeki $1740\text{-}1230 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki titreşimsel değişimler hücre membranındaki proteinlerin COO^- gruplarındaki değişimlerle ilişkilidir.



Şekil 3. 21: Etil asetat (P2-E) ile muamele edilen *S. aureus* ATCC 29213'ün FTIR analizi.

Metanol fraksiyonunun (Skikta) FTIR analizi Şekil 3. 22'de gösterilmiştir. Bakteri hücreesindeki değişiklikler içerisinde siyah çerçeve içerisinde gösterilen ve yaklaşık 900 cm^{-1} civarındaki kaybolan pik, protein ve polisakkarit yapısında ciddi bir değişikliği göstermiştir.



Şekil 3. 22. Metanol (P2-M) ile muamele edilen *S. aureus* ATCC 29213'ün FTIR analizi.

Örneklerimizde propolisin bakteri hücre duvarında meydana getirdiği değişimler FTIR analizi ile gözlemlenmiştir. Ancak literatürde mevcut konu ile ilgili detaylı çalışmalar olmadığı için hangi fonksiyonel gruplarda bozulmalar olduğu anlaşılamamıştır. Gelecekte farklı ürünlerle muamele edilmiş bakteri hücrelerinde meydana gelen değişiklikler FTIR spektroskopisi ile daha yoğun olarak araştırılmalı ve bu teknikle elde edilen sonuçlar bakterilerde değişimlerin gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılması için yol gösterici olacaktır. Ayrıca ham propolis örneklerimizin FTIR analizini de yaparak içindeki bileşiklerin ve fonksiyonel grupların varlığının incelenmesi gerektiği de düşünülmüştür.

3.5 Sitotoksite Analizi

Propolisin sitotoksik ve antikanser aktivitesi ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur (Eroğlu ve diğ. 2008, Turan ve diğ 2015, Demir ve diğ 2016; Xavier ve diğ. 2017; Utispan ve diğ 2017; Kebisa ve diğ 2018; Mora ve diğ 2019). Örneğin Cezayir propolisinin kolon kanser üzerine güçlü sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ve bu etkiden kafeik ve ferulik asitlerin sorumlu olduğu ifade edilmiştir (Daikh ve diğ. 2020). Biyolojik olarak aktif fitokimyasallar yönünden zengin olan Cezayir propolislerinin immünomodulan etkisi de rapor edilmiştir (Soltani et al. 2017). Benzer şekilde, Cezayir propolisi insan akciğer kanser hücrelerinin gelişimini inhibe etmiş ve apoptoza neden olmuştur (Kebisa ve diğ. 2018). Üstelik Cezayir propolisinin akciğer kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği de *in vitro* çalışmalarla doğrulanmıştır (Brihoum ve diğ. 2018).

Biz de çalışmamızın bu aşamasında propolis örneklerimizin sitotoksik ve antikanser aktivitesini meme kanser hücrelerinde (MDA-MB-231) inceledik. Bu amaçla hücreler önce tripan mavisi ile sayılmış ve 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 2×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Propolis fraksiyonlarının sitotoksik etkisi için yedi farklı (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml) konsantrasyonu denenmiştir. İlk olarak MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi ile sekiz propolis alt fraksiyonunun MDA-MB-231 hücre hattı için etkili dozları (EC50 değerleri) bulunmuştur (Tablo 3. 1). Her fraksiyonun hücre hattına uygulanmasından elde

edilen EC50 değeri; etken maddenin uygulanan hücre hattı (MDA-MB-231) üzerinde olan %50'lik bir etki veya hücre hattının %50'sinde görülen anormallik, yapı değişikliği veya ölümdür.

Propolis fraksiyonlarının iki farklı canlı grubunda (bakteri ve kanser) çalışılması aynı çözücüyle (DMSO) gerçekleşse de uygulanan konsantrasyonlar ve miktarlar farklı olmaktadır. Çünkü kontrol amaçlı uygulanan veya çözücü olarak kullanılan DMSO etkisi, bakteri ve insan hücreleri için farklı sonuçlara neden olur. Bu nedenle kanser çalışmalarımızda kullanılan dozlar ve farklı koşullar nedeniyle P1 – P, P1 – K, P2 – P, P2 – K fraksiyonları DMSO'da, P1 – E, P1 – M, P2 – E, P2 – M fraksiyonları ise saf su ile seyreltilmiş %10'luk DMSO'da çözülerek hazırlanmıştır. Ve her deneyde uygulanan fraksiyonun çözücü ile gerçekleştirilen uygun olduğu kontrol gruplarına dikkat edilmiştir.

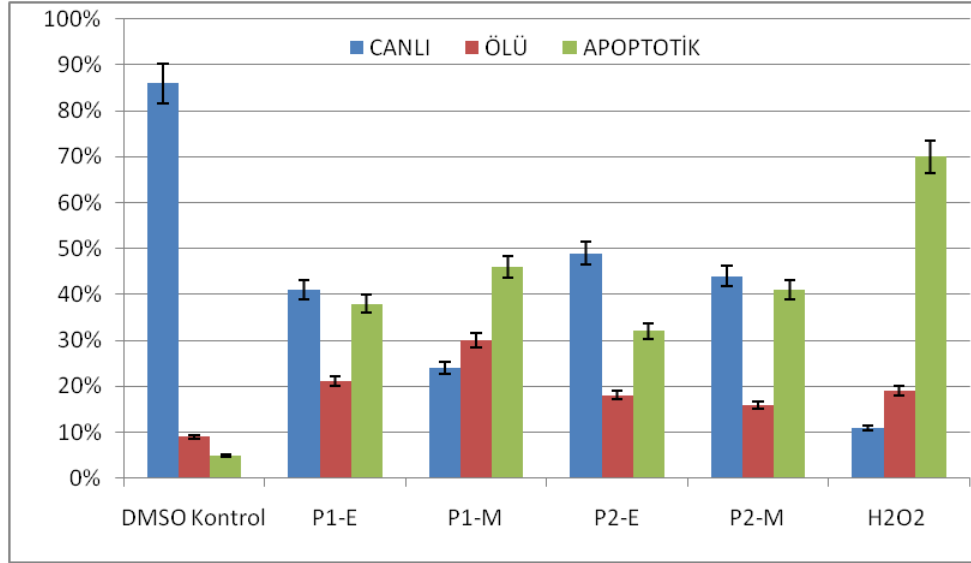
Tablo 3. 1: Propolis fraksiyonlarının sitotoksik dozu

MDA-MB-231	
Propolis Fraksiyonu	EC₅₀ Değeri
P1 – P	104 µg/ml
P1 – K	103 µg/ml
P1 – E	97 µg/ml
P1 – M	117 µg/ml
P2 – P	70 µg/ml
P2 – K	108 µg/ml
P2 – E	85 µg/ml
P2 – M	67 µg/ml

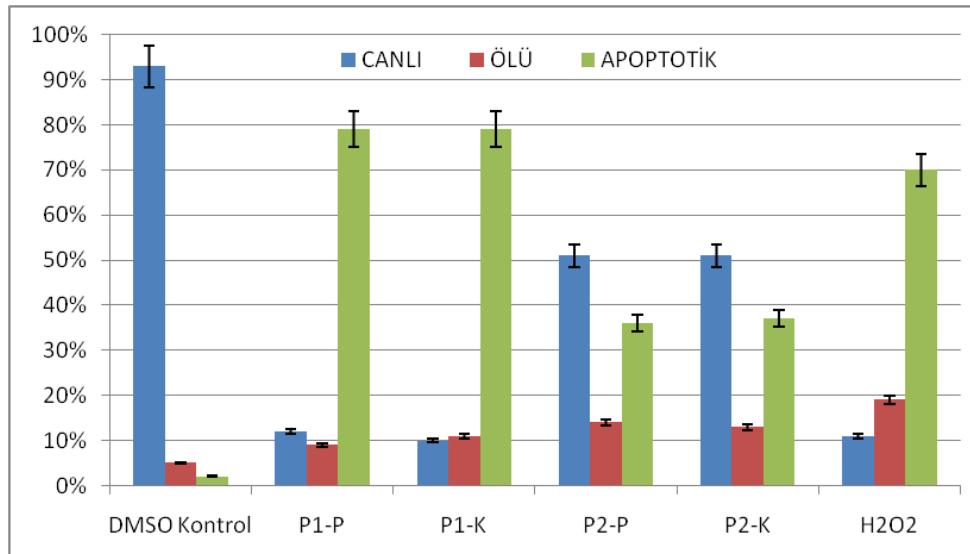
3.6 Propolis Fraksiyonların MDA-MB-231 Hücre Hattında Apoptoz Tayini

Bu deney, propolis ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattında gerçekleşen ortamdaki canlı, ölü ve apoptozda olan hücrelerin yüzdesini vermektedir. DMSO negatif kontrol, H₂O₂ (hidrojen peroksit) de pozitif kontroldür.

H₂O₂'nin hücreler için apoptotik etkisi olduğu bilinmektedir. Propolis örneklerinin hücre hattı üzerindeki etkileri Şekil 3. 23 ve 3. 24'da verilmiştir.



Şekil 3. 23: P1-E, P1-M, P2-E ve P2-M propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında canlı, ölü, apoptotik yüzdesel (%) etki grafiği. H₂O₂ pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3. 24: P1-P, P1-K, P2-P ve P2-K propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında canlı, ölü, apoptotik yüzdesel (%) etki grafiği. H₂O₂ pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

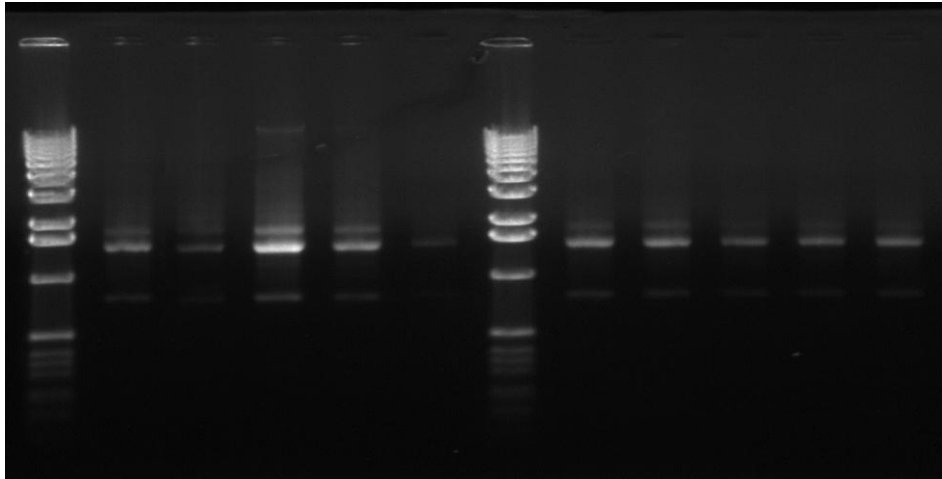
Propolis gibi doğal ürünlerde çeşitli hücre hatları üzerinde sitotoksik ve antikanser etkili çok sayıda biyoaktif maddeler vardır. Örneğin, kafeik asit fenil esterleri (CAPE) propolisteki en yaygın bileşiklerdir. CAPE'nin MDA-MB-231

hücre proliferasyonunu inhibe ettiği (Chang et al. 2017) ve insan miyeloid kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi (Jin et al. 2008) bilimsel olarak kanıtlanmıştır. Her ne kadar biz bu çalışmada kullandığımız propolislerin kimyasal analizlerini yapmamış olsak da literatür bilgilerine göre propolisin zengin içeriğinden kaynaklı olarak güçlü sitotoksik ve antikanser etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Her iki propolisin tüm alt fraksiyonlarının apoptoza yol açtığı da çalışmamızda görülmüştür.

3.7 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Propolis ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattından toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 3. 25). cDNA sentezi, üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır.

Apoptoz yolağında, hücre döngüsü ve Tümör baskılayıcı genlere özgü primerler kullanarak KiloGreen 2X qPZR Master Mix kiti ile üretici firmanın önerdiği talimatlara göre mRNA düzeyinde ekspresyon tayini gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak B-aktin kullanılmış ve hedef genlerin ekspresyon seviyeleri $\Delta\Delta C_t$ metotuna göre normalize edilmiştir.

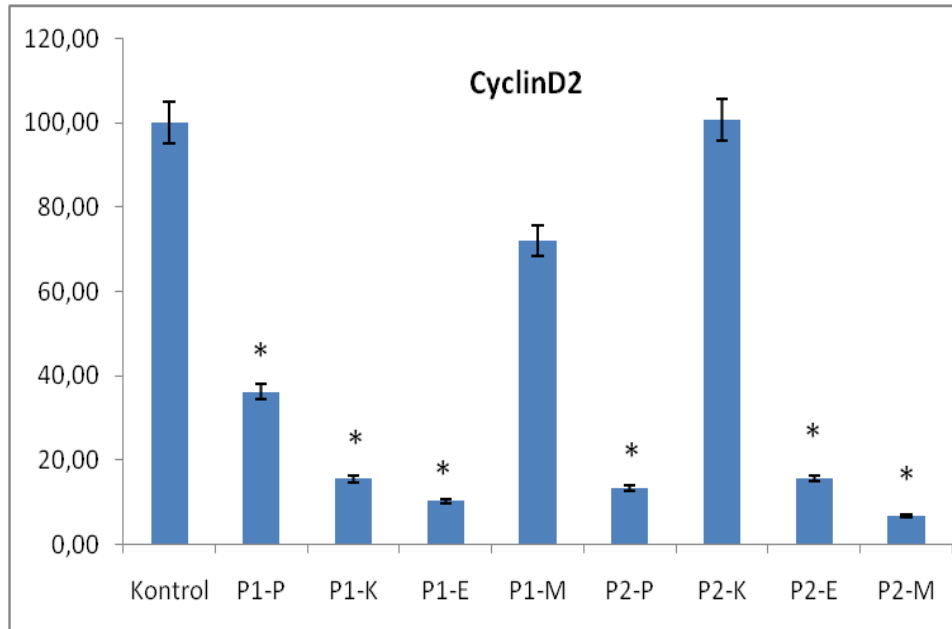


Şekil 3. 25: Propolis fraksiyonları uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi. Soldan sağa Hat 1: GeneRulerTM 1bp DNA Marker; Hat 2: Kontrol (%100 DMSO); Hat 3: P1-P; Hat 4: P1-K; Hat 5: P2-P; Hat 6: P2-K; Hat 7: GeneRulerTM 1bp DNA Marker; Hat 8: Kontrol (%10 DMSO); Hat 9: P1-E; Hat 10: P1-M; Hat 11: P2-E; Hat 12: P2-M.

3.7.1 Hücre Döngüsünü Düzenleyici Genler

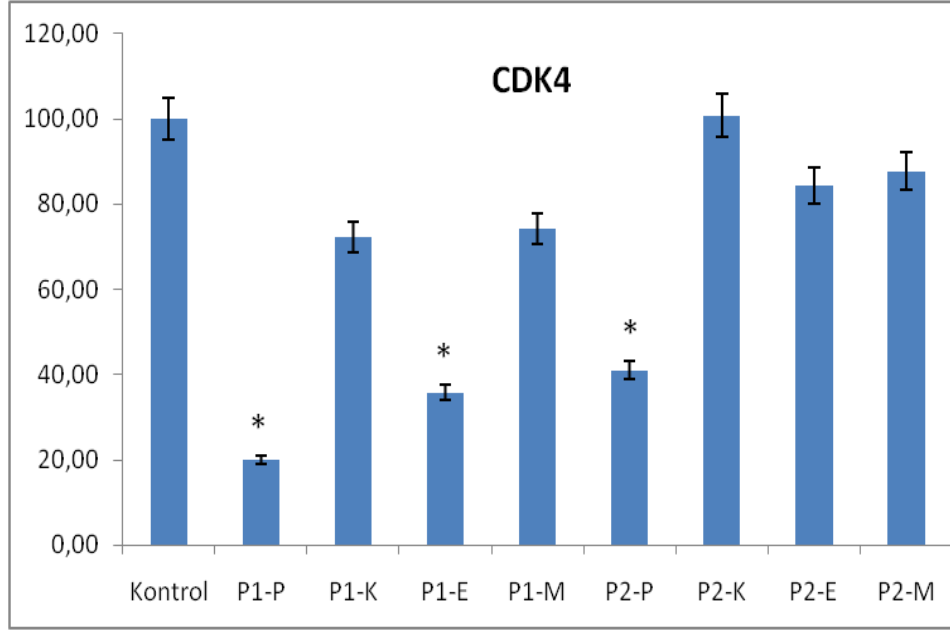
MDA-MB-231 hücre hattına propolis fraksiyonlarının uygulanması sonucu mRNA seviyesindeki değişimler için, hücre döngüsünü düzenleyici olan CDK4, CDKN1A ve Cyclin D2 genleri incelenmiştir.

Hücre döngüsünde düzenleyici olan SiklinD2 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-E, P2-M propolis alt fraksiyonlarında sırasıyla 2.76, 6.45, 9.75, 1.39, 7.6, 6.66, 15.66 kat azalış gözlenirken, P2-K fraksiyonu 1.08 kat artış gözlenmiştir (Şekil 3. 26).



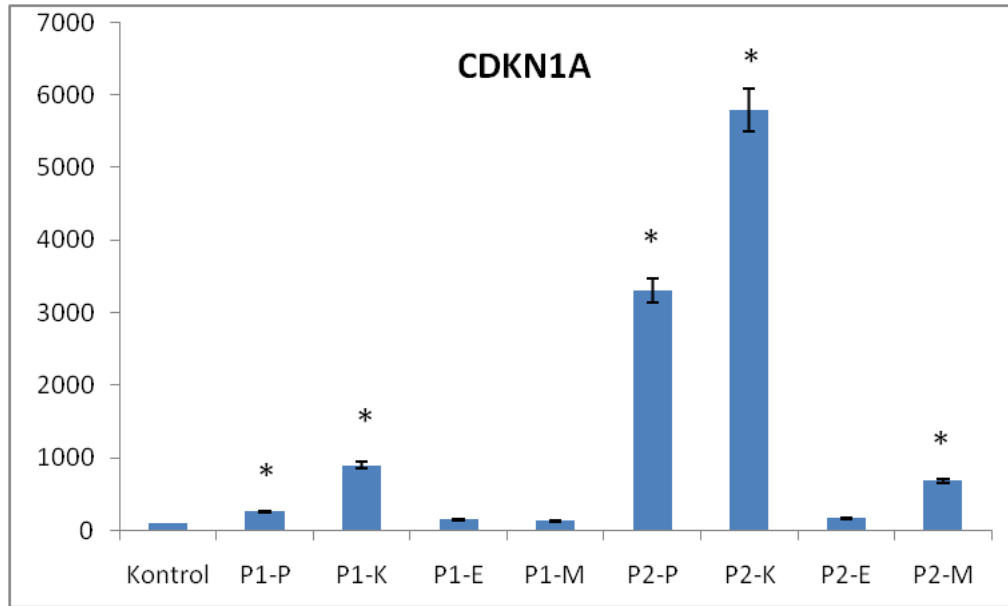
Şekil 3. 26: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) CyclinD'nin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Hücre döngüsünde diğer bir düzenleyici gen olan CDK4 mRNA ekspresyon düzeyinde propolis fraksiyonlarından P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-E, P2-M sırasıyla 5.02, 1.38, 2.79, 1.34, 2.43, 1.19, 1.15 kat azalış gözlenirken P2-K fraksiyonunda 1.08 kat artış gözlenmiştir (Şekil 3. 27).



Şekil 3. 27: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) CDK4'ün mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır*: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

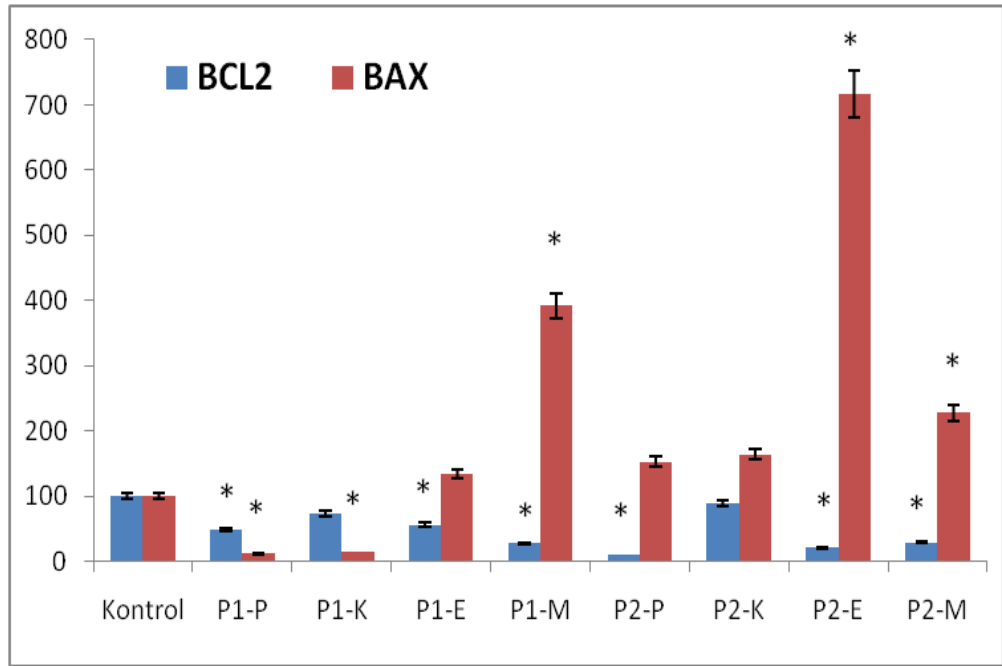
Son olarak hücre döngüsünü düzenleyen siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden CDKN1A geninin mRNA ekspresyon düzeyinde propolis fraksiyonları P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E, P2-M sırasıyla 2.61, 9, 1.47, 1.32, 33.12, 57.88, 1.67, 6.82 kat artış gözlemlendi (Şekil 3. 28).



Şekil 3. 28: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) hattında CDKN1A'nın mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır*: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

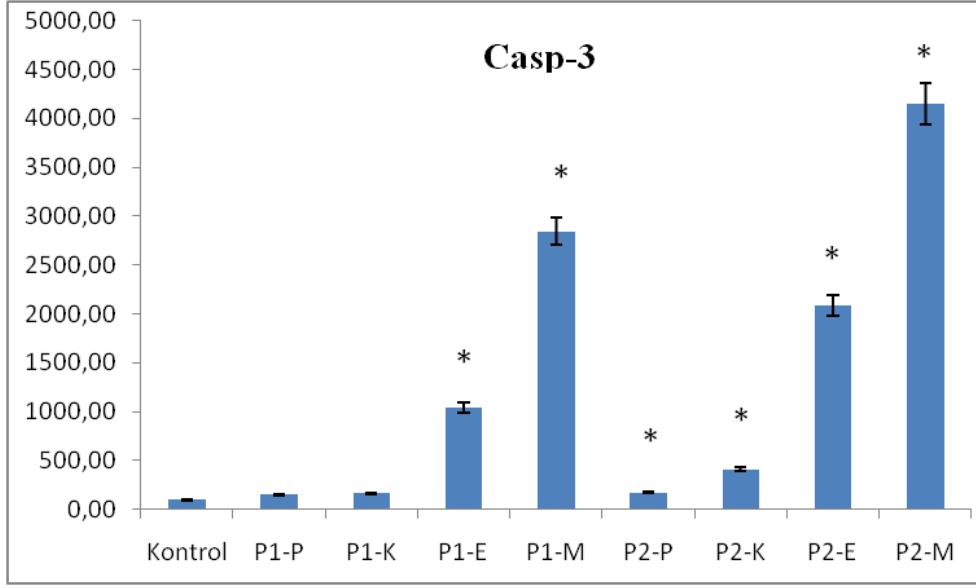
3.7.2 Apoptoz Yolağı İle İlişkili Genler

Bu yolla birlikte birbirleriyle ilişkili genler BCL-2 ve BAX genlerinin mRNA ekspresyon düzeyi incelenmiştir. BCL-2 için P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E, P2-M propolis fraksiyonları sırasıyla 2.08, 1.36, 1.81, 3.63, 9.9, 1.13, 4.85, 3.48 kat azalışa neden olmuştur. P1-P ve P1-K propolis örnekleri BAX geninin mRNA ekspresyon düzeyini sırasıyla 8.60 ve 6.98 kat azaltırken P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E ve P2-M sırasıyla 1.34, 3.91, 1.52, 1.63, 7.16, 2.27 kat arttırmıştır (Şekil 3. 29).



Şekil 3. 29: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) hattında apoptoz yolağında ilişkili BCL-2 ve BAX genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

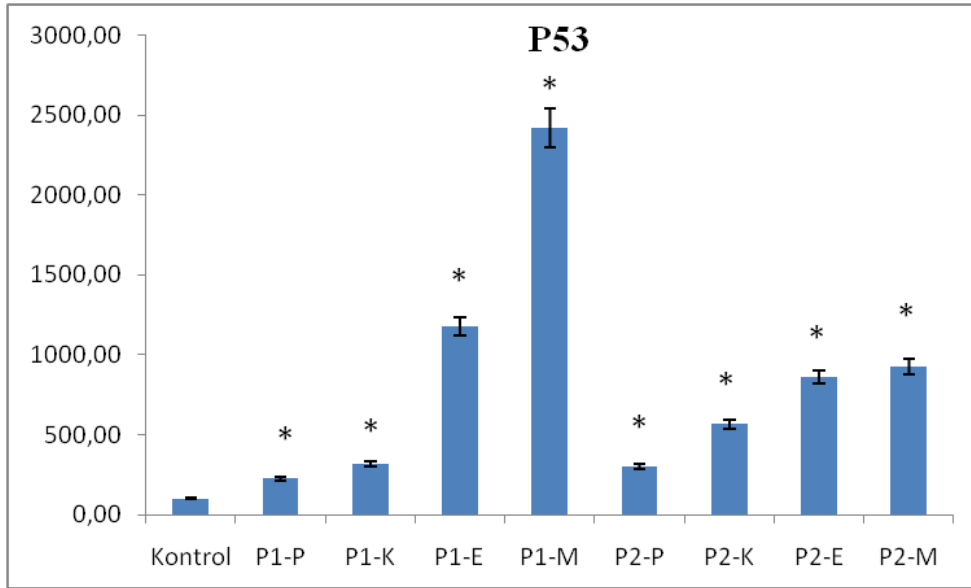
Apoptoz yolağında görevli kaspaz ailesinden olan Casp-3 (kaspaz-3) mRNA ekspresyon seviyesinde propolis fraksiyonları P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E, P2-M sırasıyla 1.49, 1.62, 10.41, 28.44, 1.73, 4.11, 20.82, 41.50 kat artış gözlenmiştir (Şekil 3. 30).



Şekil 3. 30: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) Casp-3`ün mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

3.7.3 P53 Geni

Tümör baskılayıcı gen olan P53`ün mRNA ekspresyon düzeyinde P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E, P2-M sırasıyla 2.27, 3.16, 11.79, 24.16, 3.01, 5.68, 8.6, 9.2 kat artış gözlemlendi (Şekil 3. 31).

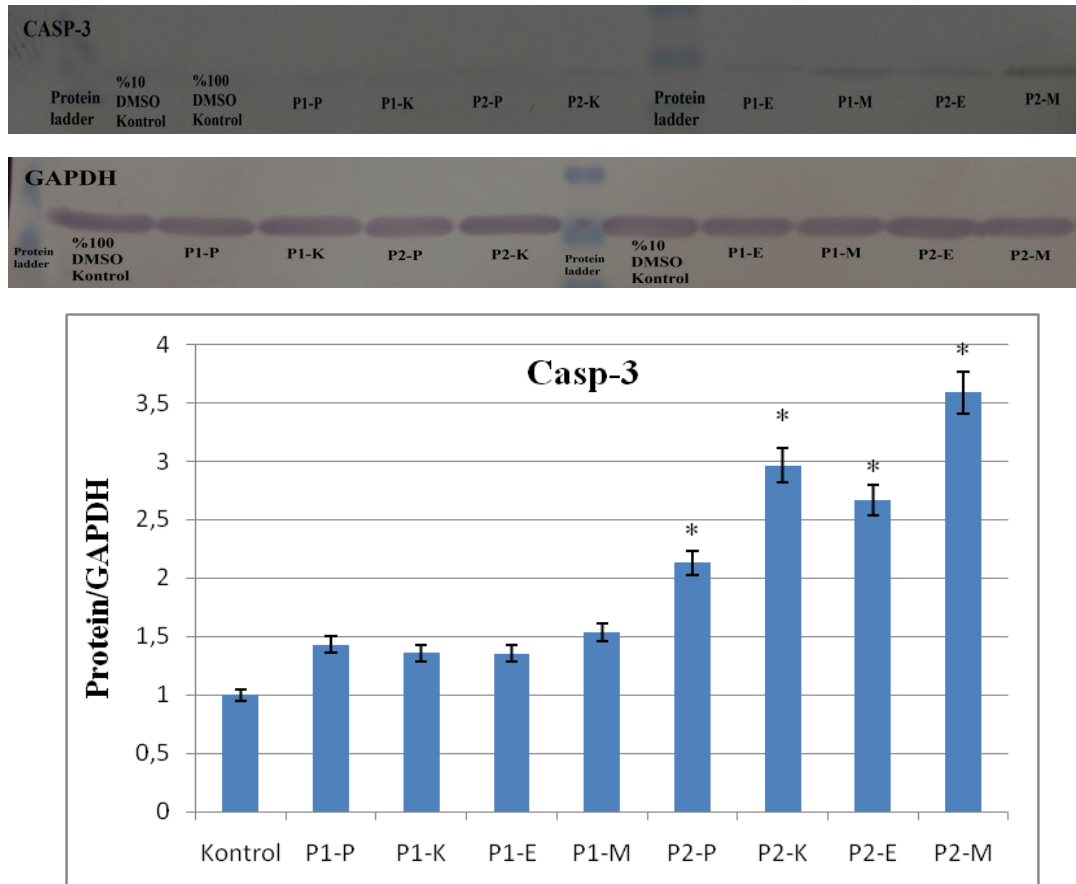


Şekil 3. 31: Propolis fraksiyonlarının meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) P53`ün mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

3.8 Western Blot Analizi

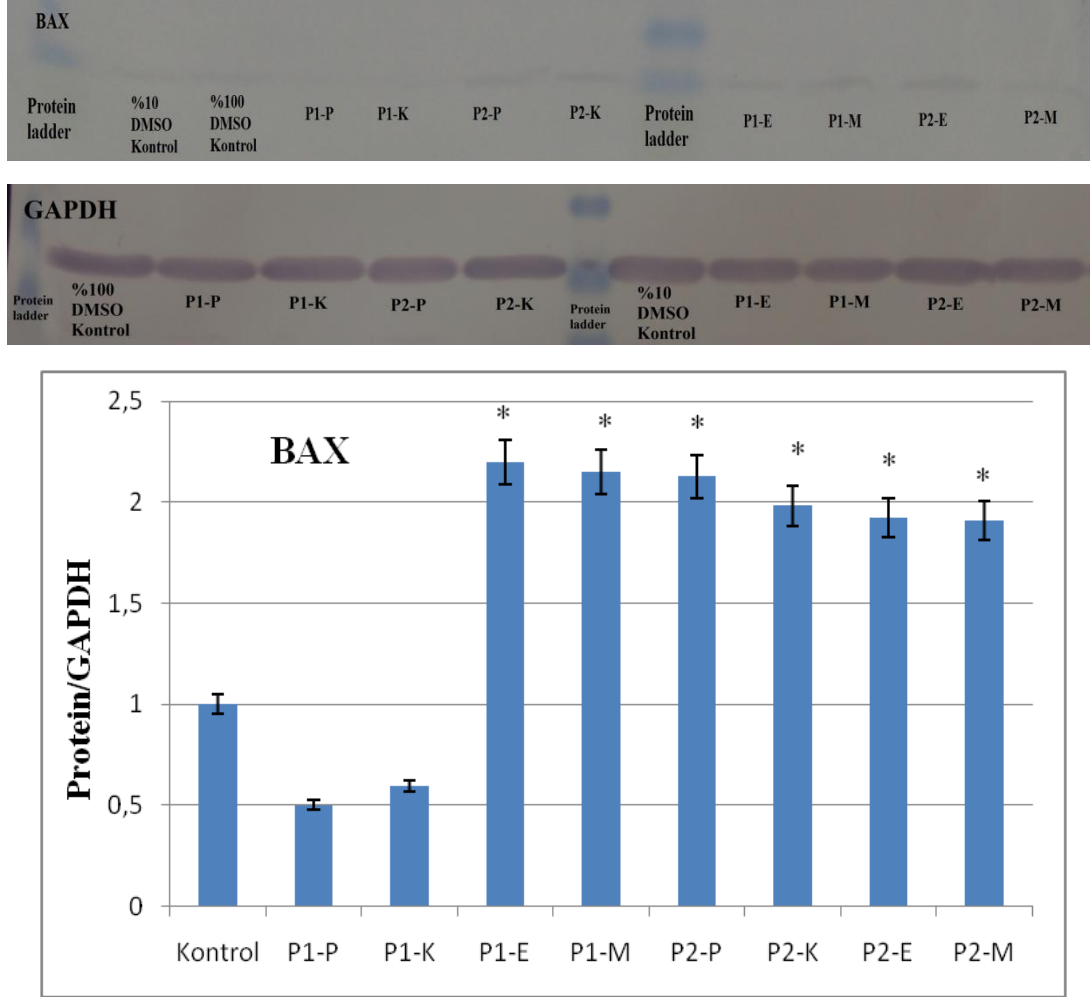
Cezayir (Mila ve Sikikta) propolis alt fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu hücrede çeşitli görevleri olan Casp-3, BAX, BCL-2, CDK-4 ve P53 protein seviyesindeki değişimler aydınlatıldı. Western Blot analizinde bulunan sonuçlar mRNA ekspresyon seviyesindeki sonuçları ile anlamlı olup olmadığı karşılaştırıldı. Deney sonucu oluşmuş protein bantlarının yoğunlukları (kalınlıkları ve b.) densitometrik analiz ile Scion Image Software programı kullanılarak belirlendi.

Propolis fraksiyonlarının uygulandığı MDA-MB-231 hücre hattında oluşan Casp-3 protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E, P2-M sırasıyla 1.42, 1.35, 1.35, 1.53, 2.1, 2.96, 2.66, 3.58 kat artış gözlemlendi (Şekil 3. 32).



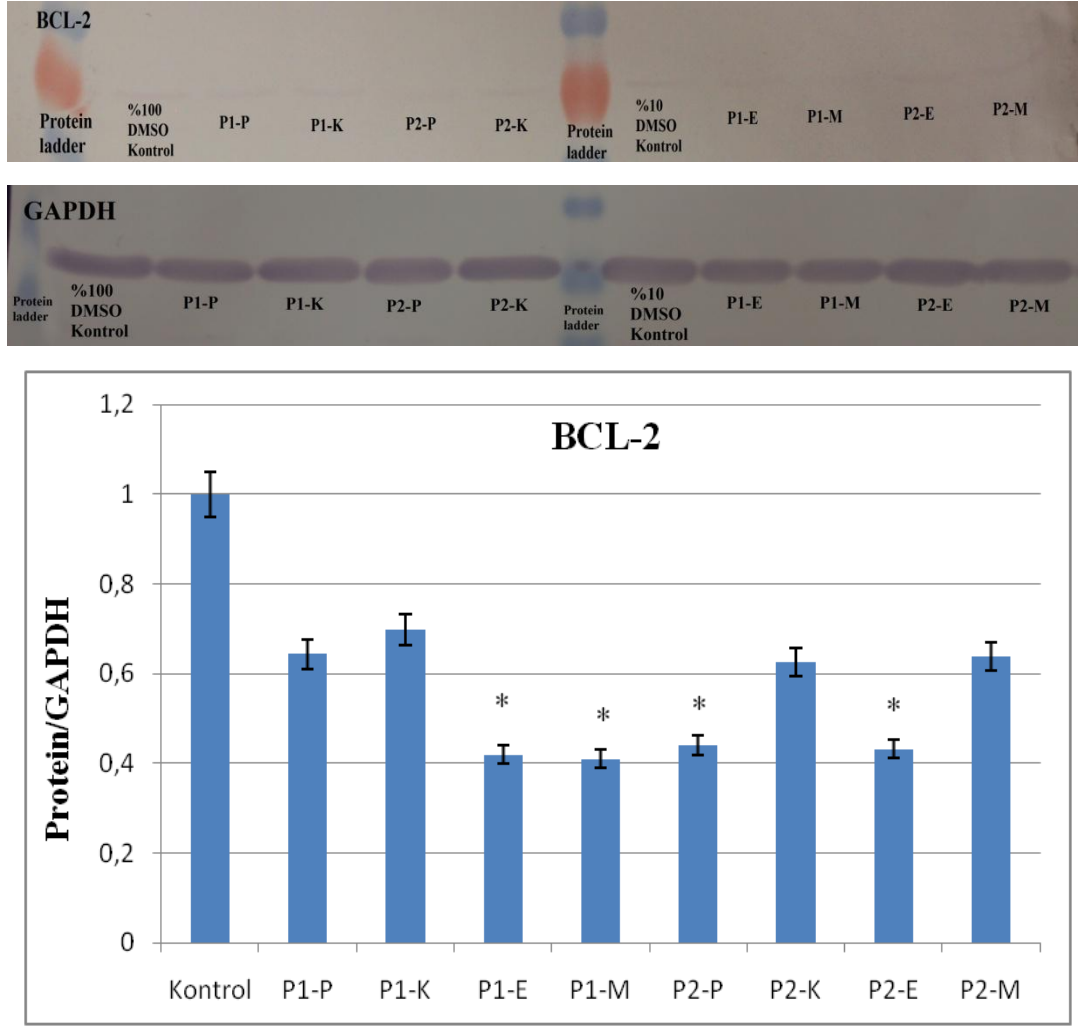
Şekil 3. 32: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden Casp-3'e protein seviyesinde olan etkisi. Elde edilen sonuçlar GAPDH ile normalize edildi. Scion Image Software programı kullanılarak bantların yoğunluklarının densitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol değeri 1,0 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

Propolis fraksiyonlarının uygulandığı MDA-MB-231 hücre hattında oluşan BAX protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde P1-P, P1-K sırasıyla 2 ve 1.69 kat azalış gözlenirken, P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E, P2-M sırasıyla 2.19, 2.15, 2.12, 1.98, 1.92, 1.91 kat artış tespit edildi (Şekil 3. 33).



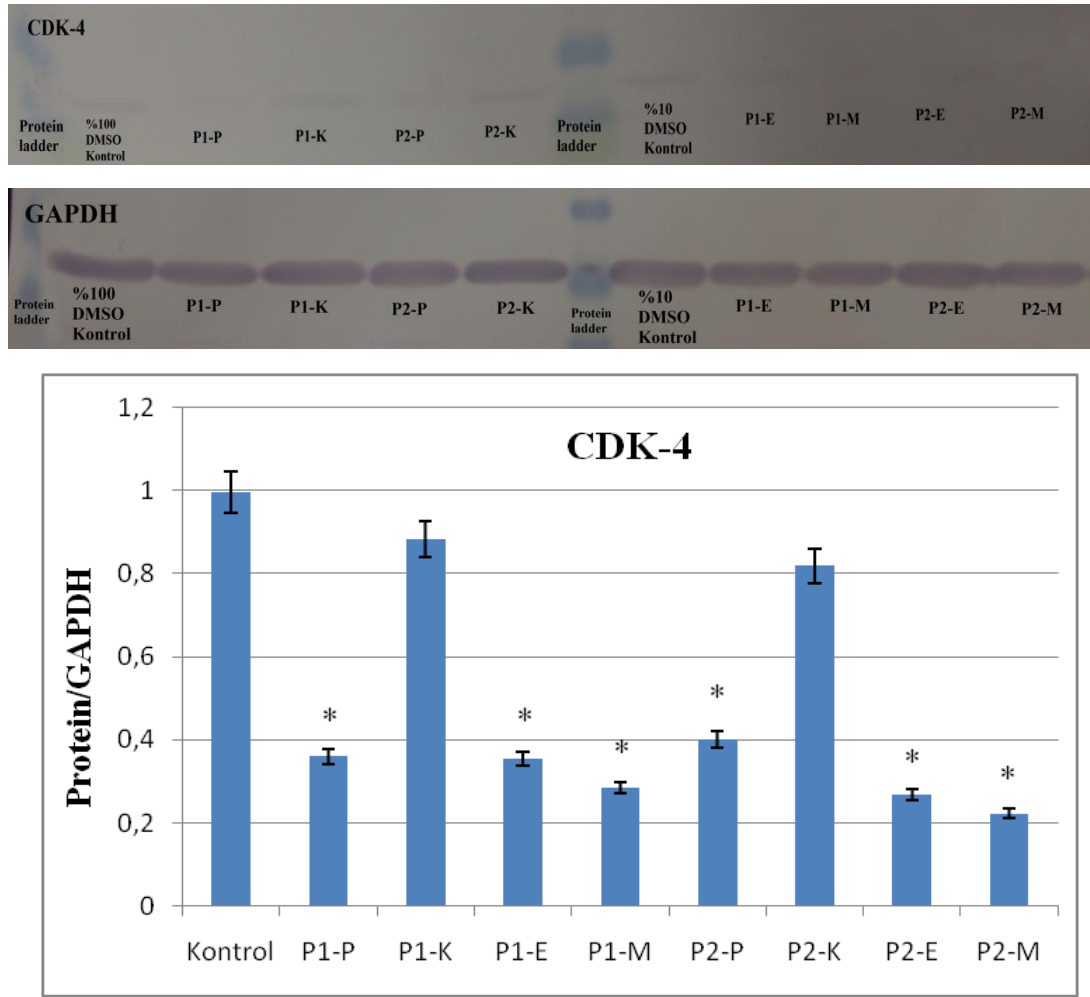
Şekil 3. 33: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden BAX'a protein seviyesinde olan etkisi. Elde edilen sonuçlar GAPDH ile normalize edildi. Scion Image Software programı kullanılarak bantların yoğunluklarının densitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol değeri 1,0 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

Propolis fraksiyonlarının uygulandığı MDA-MB-231 hücre hattında oluşan BCL-2 protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E, P2-M sırasıyla 1.56, 1.44, 2.38, 2.43, 2.32, 1.61, 2.32, 1.58 kat azalış bulunmuştur (Şekil 3. 34).



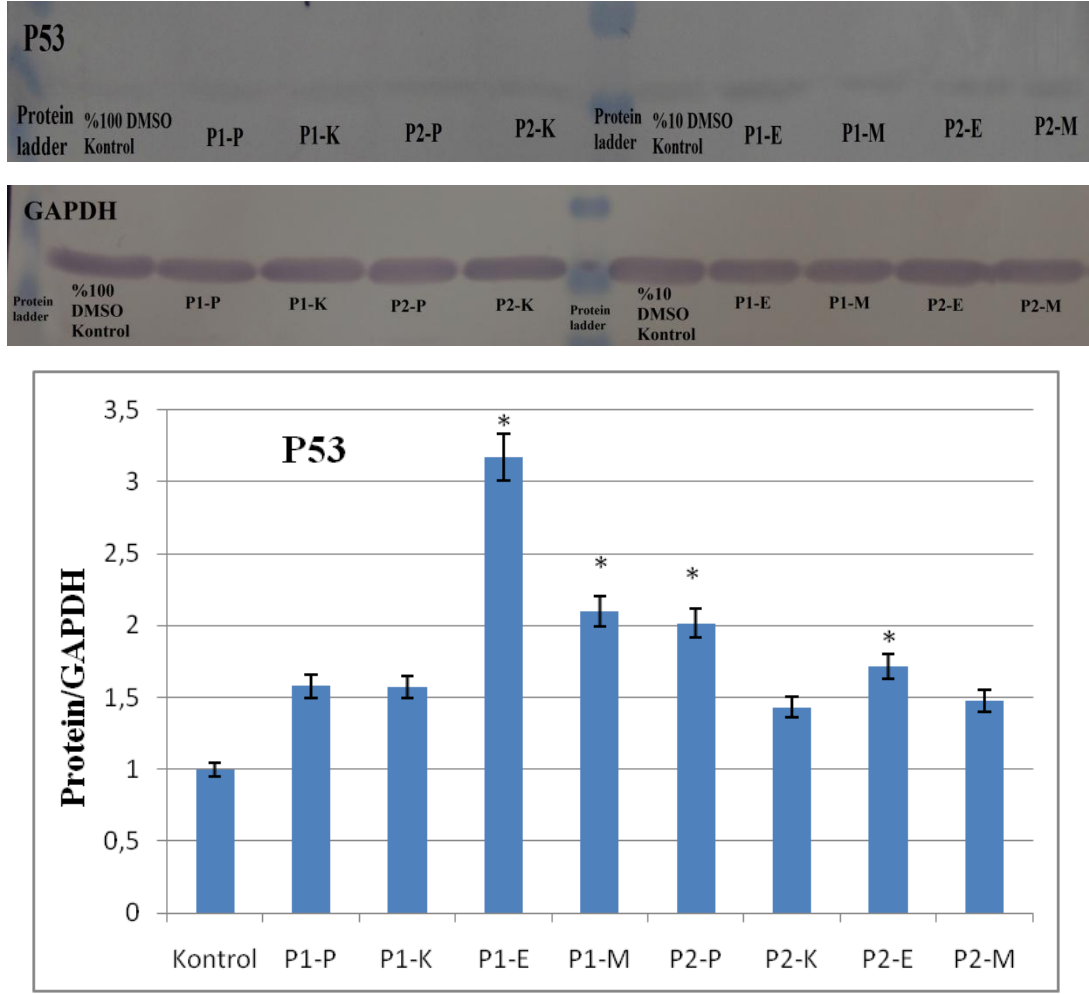
Şekil 3. 34: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden BCL-2'e protein seviyesinde olan etkisi. Elde edilen sonuçlar GAPDH ile normalize edildi. Scion Image Software programı kullanılarak bantların yoğunluklarının densitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol değeri 1,0 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$).

Propolis fraksiyonlarının uygulandığı MDA-MB-231 hücre hattında oluşan CDK-4 protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E, P2-M sırasıyla 2.86, 1.13, 2.85, 3.44, 2.5, 1.23, 3.85, 4.54 kat azalış bulunmuştur (Şekil 3. 35).



Şekil 3. 35: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden CDK-4'e protein seviyesinde olan etkisi. Elde edilen sonuçlar GAPDH ile normalize edildi. Scion Image Software programı kullanılarak bantların yoğunluklarının densitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol değeri 1,0 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$).

Propolis fraksiyonlarının uygulandığı MDA-MB-231 hücre hattında oluşan P53 protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde P1-P, P1-K, P1-E, P1-M, P2-P, P2-K, P2-E, P2-M sırasıyla 1.58, 1.57, 3.17, 2.1, 2.01, 1.43, 1.71, 1.48 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 3. 36).



Şekil 3. 36: Propolis fraksiyonlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanması sonucu apoptotik proteinlerden P53'e protein seviyesinde olan etkisi. Elde edilen sonuçlar GAPDH ile normalize edildi. Scion Image Software programı kullanılarak bantların yoğunluklarının densitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol değeri 1,0 alınmıştır *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

Propolis fraksiyonlarının mRNA seviyesinde hücre kapsamında bazı yollarla ilişkili yedi genin (CDKN1A, Syclin D2, CDK4, Bax, Bcl-2, Casp-3, P53) ekspresyon düzeyindeki değişimleri saptanmıştır. Ayrıca beş farklı gendeki değişikliklerin protein (CDK4, Bax, Bcl-2, Casp-3, P53) seviyesinde western blot analizi de yapılmıştır. Mila propolisinin kloroform, etil asetat ve metanol fraksiyonları ile Skikda propolisinin petrol eteri, kloroform, etil asetat ve metanol fraksiyonları tümör baskılayıcı genlerle (Casp-3) ilişkili proteinlerin mRNA düzeyinde artışına neden olmuş ve apoptoza yol açmıştır. Bcl-2 geni ile ilişkili proteinlerin mRNA düzeylerinde Mila (petrol eter, etil asetat, metanol) ve Skikda (petrol eter, etil asetat ve metanol) propolisleri azalışa neden olmuştur. Bax geni ile

ilişkili proteinlerin mRNA seviyesinde Mila propolisinin petrol eter ve kloroform fraksiyonları azalışa neden olurken Mila propolisinin metanol fraksiyonu ile Skikda propolisinin kloroform, etil asetat ve metanol fraksiyonları belirgin derecede artışa yol açmıştır. Apoptoz yolağı ile ilişkili genlerdeki bu değişiklikler Western blot ile de doğrulanmıştır.

Bilindiği üzere tek halde aktif olmayan CDK'lar, siklinlerin bağlanmasıyla işlev görürler. Siklinlerin bağlanmasıyla oluşan siklin-CDK kompleksi hücre döngüsü için önemlidir. Bu nedenle tez çalışmamızda propolisin hücre döngüsüne etkisinin de anlaşılması için hücre döngüsü düzenleyici CyclinD2, CDK4 ve CDKN1A genleri de incelenmiş ve protein seviyesinde western blot analizleri ile doğrulanmıştır. Mila propolisinin petrol eter, kloroform ve etil asetat ile Skikda propolisinin petrol eter, etil asetat ve metanol fraksiyonları CyclinD2 geni mRNA seviyesinde baskılamıştır. CDK4 geni ise sadece Mila propolisinin petrol eter ve etil asetat ile Skikda propolisinin petrol eter fraksiyonu tarafından baskılanmıştır. Sonuçlar western blot ile de doğrulanmıştır. Mila propolisinin petrol eter ve kloroform fraksiyonları ile Skikda propolisinin petrol eter, kloroform ve metanol fraksiyonları CDKN1A genini teşvik etmiştir. CDKN1A geninde mRNA ekspresyon seviyesindeki bu artış ve CDK4 genin hem mRNA hem de western blot analizleri hücre döngüsünün muhtemelen G1 fazında durakladığını göstermiştir. Doğal ürünlerdeki fenolik bileşiklerin veya propolis bileşenlerinin hücre döngüsünü düzenleme ve durdurma etkisi bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Sánchez-Carranza ve diğ. 2017; Anantharaju ve diğ. 2016; Popolo 2009).

Tüm propolis fraksiyonları, tümör baskılayıcı P53 genini ile ilişkili proteinlerin mRNA düzeylerinde artışa neden olmuş ve apoptozu indüklemiştir (Bkz. Şekil 3. 35). P53 geni, hatalı hücreyi tanır ve mutasyonları azaltarak normal hücreyi kontrol altına alır. Hem mRNA hem de western blot analizlerine göre P53 gen ekspresyonundaki artış, hatalı hücre döngüsünün baskılandığını ve Cezayir propolisinin insan meme hücre hattında (MDA-MB-231) hücreyi apoptaza sürüklediğini göstermiştir.

Propolisin antikanser etkisi ile ilgili detaylı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Çin ve Brezilya propolisinin etanol ekstraktının antikanser aktivitesi CaCo2, HCT116, HT-29 ve SW480 kolon kanser hücre hatları üzerine test edilmiş ve her iki

propoliste doza bağı olarak hücreler üzerine büyüme inhibisyonu görülmüştür. Çin propolisi, HCT116 hücre hattında tümör supresyonu (p21CIP1 ve p53) ile ilişkili proteinlerin mRNA düzeylerinde doza bağı bir artışa neden olmuş ve apoptozu indüklemiştir. Bu da Çin propolisinin antikanser etkiye sahip bileşikler içerdiğini göstermektedir (Ishihara ve diğ. 2009). Benzer şekilde, CAPE ve Çin propolisinin saf etanol ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattında antikanser etkileri karşılaştırılmıştır. Kaspaz-3 ve PARP genleri ile TLR-4 sinyal yolağının western blot analizi ile protein boyutunda değişimleri incelenmiştir. CAPE ve propolis 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonda kaspaz-3'te artışa neden olmuştur. PARP protein seviyesini CAPE baskımlarken propolis az da olsa arttırmıştır. TLR-4 sinyal yolağına CAPE'nin çok az etkisi olurken bu yolağın regülasyonunda propolisin belirgin derecede azalışa yol açtığı tespit edilmiştir. Çin propolisinin ve CAPE'nin kaspaz-3'ü aktive ederek, TLR4 sinyal yolağını ise bastırarak meme kanseri hücrelerinde apoptoza sürüklediği ifade edilmiştir (Chang ve diğ. 2017). Küba propolisi de MCF-7 meme kanser hücre hattı üzerinde MDA-MB 231'den daha belirgin antiproliferatif etki göstermiştir. Bu etki hem konsantrasyona ve hem de zamana bağılıydı, propolis kısmen apoptoza da neden olmuştur. Araştırmacılar propolisin hücre döngüsünün G1 fazında, doz ve zamana bağı bir şekilde MCF-7 hücre büyümesini önemli derecede inhibe ettiğini ifade ederek Küba propolisinin östrojen benzeri bir aktiviteye sahip olduğunu varsaymışlardır (Popolo ve diğ. 2009).

Rzepecka-Stojko ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada Polonya propolisinin %75'lik etanol ekstraktının ve ticari olarak satın alınmış kafeik asit fenil ester'in (CAPE) MDA-MB-231 hücre hattında 24, 48, 72 saat inkübasyon sonucu farklı konsantrasyonlarda sitotoksik etkilerini gözlemlemişlerdir. Propolis ekstraktı çalışılan en yüksek konsantrasyonda (200µg/ml) 24 saat inkübasyon sonucu %40 oranında sitotoksik aktivite göstermiştir. Aynı konsantrasyonda 48 saat inkübasyon sonucunda ise %95'in üstünde, 72 saat inkübasyonda ise %100 sitotoksik aktivite gözlemlemişlerdir. CAPE'nin ise çalışılan her üç saat diliminde 40 ve 80 µM konsantrasyonlarda %95'in üstünde sitotoksik aktivitesi olmuştur. Aynı zamanda propolis ekstraktını ve CAPE'nin IC₅₀ değerleri 24 saatlik inkübasyon sonucu sırasıyla 232.31 µg/ml ve 21.05 µM olarak saptamışlardır. Xuan ve diğ. (2014) yaptıkları çalışmada Çin propolisinin %95'lik etanol ile ekstrakte ederek iki meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında P53 geninin protein boyutunda

western blot analizi ile değişimlerini gözlemlemişlerdir. Bulunan sonuçlar propolisin MDA-MB-231 hücre hattına 25-200 µg/ml konsantrasyonda 48 saat inkübasyonu sonucu konsantrasyon artışında giderek anlamlı şekilde azalmalar gerçekleşmiştir. Fakat aynı şartlar altında MCF-7 hücre hattına uygulandığında ise P53 proteininde diğer hücre hattının tam tersine anlamlı şekilde arttığı rapor etmişlerdir. Araştırmacılara göre MCF-7 hücre hattı yabanıl tip (wild-type) P53'e sahiptir. Bulunan sonuçlara göre de hücredeki apoptozu indüklemek için artan konsantrasyonda P53 proteininde artış beklenmektedir. Bizim tez çalışmamızda Cezayir propolisinin tüm fraksiyonları P53 geninin hem gerçek zamanlı PZR hem de protein boyutunda western blot analizleri sonucu anlamlı şekilde artışlar birbirini destekler nitelikte olup, Cezayir propolisi de MDA-MB-231 hücre hattında apoptoza yol açmıştır.

Kardanol, bazı ağaçların kabuklarında ve propoliste bulunan fenolik bileşiktir. Meme kanseri üzerinde pozitif yönde etkisi bazı çalışmalar ile aydınlatılmıştır. Örneğin, Tayland propolisinden saflaştırılan kardanolun 30 µg/ml konsantrasyonda meme kanseri (BT-474) hücre hattında etkisi araştırılmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonunda gerçek zamanlı PZR analizlerine göre Bcl-2 ve P21 geninin ekspresyon seviyesinde artış, siklin D1, siklin E, CDK4 ve CDK2 genlerinde ise azalma gözlemlenmiştir (Buahorm ve diğ. 2015). Benzer şekilde Trabzon'dan toplanan Türk propolisinin etanol ekstraktı (EEP), östrojen bağımlı meme kanseri hücre hattında (MCF-7); P53, Bax ve P21 (CDKN1A) genleriyle ilişkili protein seviyesinde doza bağılı artışa neden olmuş ve bu aktivite western blot ile de doğrulanmıştır (Misir ve diğ. (2019). Japon propolisinin metanol ekstraktının insan lenfoma (U937) hücre hattında apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Motomura ve diğ. 2008).

4. SONUÇ ve ÖNERİ

Günümüzde propolis, bal arıları tarafından toplanan bitki reçinelerinden elde edilen doğal bir üründür ve yüzyıllardır halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Propolisin antimikrobiyal, antioksidant, antiülser ve antitümör aktivitesi bilimsel çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu yüzden, bilinen özelliklerinden dolayı yararlı veya potansiyel bir doğal ürün olarak bilimsel çalışmaların önemli konusu olmuştur. Özellikle insan sağlığını koruyabileceği veya geliştirebileceği iddiasıyla gıda sektöründe de yiyecek ve içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sunulan çalışmada iki farklı bölgeden temin edilen Cezayir propolisinin petrol eter, kloroform, etil asetat ve metanol fraksiyonlarının antibiyofilm, antikayma, antiyüzme ve antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. Propolisin *S. aureus* ATCC 29213 biyofilmini inhibe etkisi hem doza bağlı olarak değişmiş hem de coğrafik orijine bağlı olarak bu etki farklılık göstermiştir. Üstelik propolisin biyofilm inhibisyon sonuçlarının floresan mikroskop ve FTIR analizi ile de paralel olduğu görülmüştür. Diğer yandan, meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231)'nda tümör baskılayıcı, hatalı hücre döngüsünü engelleyici ve hücrenin apoptoz yolağıyla ilişkili genlerde indükleyici yönde etkiler de göstermiştir.

Sonuç olarak, Mila ve Skikda kaynaklı Cezayir propolisinin, kullanılan meme kanseri hücresi üzerine sitotoksik etkisi *in vitro* olarak gösterilmesine rağmen, insanlarda ve hayvanlarda bu antikanser etkinin nasıl gerçekleştiğini anlamak için *in vivo* araştırmaya da ihtiyaç vardır. Ek olarak, propolisin antibiyofilm ve antikanser aktivitesinin hangi bileşiklerden kaynaklandığını anlamak için kimyasal içeriği de detaylı olarak analiz edilmelidir.

5. KAYNAKLAR

Acree, M. E., Morgan, E., David, M. Z., “S. aureus Infections in Chicago, 2006-2014: Increase in CA MSSA and Decrease in MRSA Incidence”, *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 38, (10), 1226–1234, (2017).

Adams, J. M., Cory, S., “The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy”, *Oncogene*, 26 (9), 1324-1337, (2007).

Ahangari, Z., Naseri, M., Vatandoost, F., “Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics”, *Iran. Endod. J.*, 13 (3), 285-292, (2018).

Ahmad, B., Ali, C., “Physiochemical, minerals, phytochemical contents, antimicrobial activities evaluation and fourier transform infrared (FTIR) analysis of Hippophae rhamnoides L. leaves extracts”, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 7 (7) 375-388, (2013).

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., Khan, U., “Awareness and current knowledge of breast cancer”, *Biological Research*, 50 (33), 2 –23, (2017).

Algburi, A., Comito, H., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T., Chikindas, M. L., “Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond”, *Appl. Environ. Microbio.*, 83 (3), e02508-16, (2017).

Allison, C. and Hughes, C., “Closely linked genetic loci required for swarm cell differentiation and multicellular migration by *Proteus mirabilis*”, *Mol. Microbiol*, 5, 1975–1982. (1991).

Al-Qadiri, H. M., Al-Alami, N. I., Al-Holy, M. A., Rasco, B. A., “Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Absorbance Spectroscopy and Multivariate Analysis To Study the Effect of Chlorine-Induced Bacterial Injury in Water”, *J. Agric. Food Chem*, 56, 8992–8997, (2008).

Alqarni, A. S., Rushdi, A. I., Owayss, A. A., Raweh, H. S., El-Mubarak, A. H., Simoneit, B. R. T., “Organic Tracers from Asphalt in Propolis Produced by Urban Honey Bees, *Apis mellifera* Linn.”, *Plos One*, 10, (6), 1-18, (2015).

American Cancer Society 2019., “Cancer Facts & Figures 2019”, (2019), <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html> (2019).

Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G., Madhunapantula, S. V., “An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers”, *Nutr J.*, 15, 1-16. (2016).

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powes, M. E., Shirtliff, M. E., “*Staphylococcus aureus* biofilms”, *Virulence*, 2:5, 445-459, (2011).

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. RH., “Basic principles of real-time quantitative PCR”, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 5, (2), 209-219, (2005).

Asai, K., Yamada, K., Yagi, T., Baba, H., Kawamura, I., Ohta, M., “Effect of incubation atmosphere on the production and composition of staphylococcal biofilms”, *J. Infect. Chemother.*, 21, 55-61, (2015).

Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., Khang, S. C., “MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug”, *Bangladesh J. Pharmacol.*, 12, 115–118, (2017).

Bai, J. R., Zhong, K., Wu, Y. P., Elena, G., Gao, H., “Antibiofilm activity of shikimic acid against *Staphylococcus aureus*”, *Food Control*, 95, 327–333, (2019).

Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G., Sule- Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., Gardner, P., Martin, F. L “Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials”, *Nat. Protoc.*, 9 (8), 1771-1791, (2014).

Bankova, V., Popova, M., Trusheva, B., “The phytochemistry of the honeybee”, *Phytochemistry*, 155, 1-11, (2018).

Bartek, J., Lukas, J., Bartkova, J., “Perspective: defects in cell cycle control and cancer”, *J. Pathol.*, 187 (1), 95-9, (1999).

Beekes, M., Lasch, P., Naumann, D., “Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research”, *Veterinary Microbiology*, 123, 305-319, (2007).

Becker, K., Al Laham, N., Fegeler, W., Proctor, R. A., Peters, G., Eiff, C. V., “Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Analysis Is a Powerful Tool for Studying the Dynamic Changes in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants”, *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3274–3278, (2006).

Bitrus, A. A., Zunita, Z., Khairani-Bejo, S., Othman, S., Nadzir, N. A. A., “Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and characterization of the attachment site (attB) of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolates”, *Microbial Pathogenesis*, 123, 323–329, (2018).

Boudjemaa, R., Steenkeste, K., Canette, A., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M-P., Marlière, C., “Direct observation of the cell-wall remodeling in adhering *Staphylococcus aureus* 27217: An AFM study supported by SEM and TEM”, *The Cell Surface*, 5, (100018), (2019).

Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boulmeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., Lahouel, M., “Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant activity”, *Braz. J. Pharm. Sci.*, 54 (1), 1-12, (2018).

Bryan, J., Chen, T. P., Liu, T., Azzam, R., Belonis, K. N., Castaldi, M., Epstein, J., Traba, C., “The Prevention and Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation using Russian Propolis Ethanol Extracts”, *World J. Pharm. Sci.*, 3 (3), 390-400, (2015).

Buahorm, S., Puthong, S., Palaga, T., Lirdprapamongkol, K., Phuwapraisirisan, P., Svasti, J., Chanchao, C., “Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation”, *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23, 1-11. (2015).

Cabadak, H., “Hücre Siklusu ve Kanser Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık”, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3), 51 –61, (2008).

Chang, H., Wang, Y., Yin, X., Liu, X., Xuan, H., “Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy”, *BMC Complement Altern. Med.*, 17, 1-9. (2017).

Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., Li, X., “Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum Sensing-Dependent Infection”, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 17477-17500, (2013).

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R., “The BCL-2 family reunion”, *Mol. Cell.*, 37 (3), 299-310, (2010).

Chulu, J. L. C., Liu, H. J., “Recent Patents on Cell Cycle Regulatory Proteins”, *Recent Patents on Biotechnology*, 3, 1-9, (2009).

Ciofu, O., Mandsberg, L. F., Wang, H., Høiby, N., “Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections”, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 65, 215-225, (2012).

Clauser, P., Marino, M. A., Baltzer, P. A. T., Bazzocchi, M., Zuiani, C., “Management of Atypical Lobular Hyperplasia, Atypical Ductal Hyperplasia, and Lobular Carcinoma in Situ”, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 16 (3), 335-346, (2016).

Cole, A. M., Tahk, S., Oren, A., Yoshioka, D., Kim, Y-H., “Determinants of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage”, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, (6), 1064–1069, (2001).

Daikh, A., Segueni, N., Doğan, N. M., Arslan, S., Mutlu, D., Kivrak, I., Akkal, S., Rhouati, S., “Comparative study of antibiofilm, cytotoxic activity and chemical composition of Algerian propolis”, *Journal of Apicultural Research*, 59, 160- 169, (2020).

David, M. D., Elliott, T., “Coagulase-negative staphylococci”, *British Journal of Hospital Medicin*, 76 (8), (2015).

Dembogurski, D. S. O., Trentin, D. S., Boaretto, A. G., Rigo, G. V., Silva, R. C., Tasca, T., Macedo, A. J., Carollo, A., Silva, D. B., “Brown Propolis-Metabolomic Innovative Approach to Determine Compounds Capable of Killing *Staphylococcus Aureus* Biofilm and *Trichomonas Vaginalis*”, *Food Res. Int.*, 111, 661-673, (2018).

Demir, S., Aliyazicioglu, Y., Turan, I., Misir, S., Mentese, A., Yaman, S. O., Kilinc, K., Deger, O., “Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line”, *Journal Nutrition and Cancer*, 68 (1), 165-172, (2016).

Distelhorst, C. W., Bootman, M. D., “Bcl-2 interaction with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: role in Ca²⁺ signaling and disease”, *Cell Calcium*, 50 (3), 234-241, (2011).

Ehtisham, M., Wani, F., Wani, I., Kaur, P., Nissar, S., “Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics” *Indian Journal of Contemporary Dentistry*, 4, 30-35, (2016).

El-Hadedy, D., El-Nour, S. A., “Identification of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from Egyptian food by conventional and molecular methods”, *Academy of Scientific Research & Technology*, 10, 129-135, (2012).

Elmore, S., “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death”, *Toxicologic Pathology*, 35, 495 –516, (2007).

Eroğlu, H. E., Özkul, Y., Tatlısen, A., Silici, S., “Anticarcinogenic and antimutagenic effects of Turkish propolis and mitomycin-C on tissue cultures of bladder cancer”, *Journal Natural Product Research*, 22 (12), 1060-1066, (2008).

Feng, J., Yee, R., Zhang, S., Tian, L., Shi, W., Zhang, W. H, Zhang, Y., “A Rapid Growth-Independent Antibiotic Resistance Detection Test by SYBR Green/Propidium Iodide Viability Assay”, *Front. Med.*, 5, 1-11, (2018).

Fernandes, A. W. C., Anjos Santos, V. L. D., Melo Araújo, C. R., Cruz Araújo, E. C. D., Oliveira, H. P. D., Costa, M. M. D., “Antimicrobial activity and FTIR characterization of lapachol derivatives against *Staphylococcus aureus*” *Afr. J. Microbiol. Res.*, 11 (22), 915-919, (2017).

Ghisalberti, E. L., “Propolis: A review”, *Bee World*, 60, 59-84, (1979).

Gowrishankar, S., Pandian, S. K., “Modulation of *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) extracellular polymeric layer by marine cyclic dipeptide-cyclo(L-leucyl-L-prolyl) thwarts biofilm formation”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1859, 1254–1262, (2017).

Guo, H., Wang, Z., Du, Q., Li, P., Wang, Z., Wang, A., “Stimulated phase-shift acoustic nanodroplets enhance vancomycin efficacy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms”, *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4679–4690, (2017).

Han, S-J., Guo, Q-Q., Wang, T., Wang, Y.-X., Zhang, Y. – X, Liu, F., Luo, Y. –X., Zhang, J., Wang, Y.- L., Yan, Y. –X., Peng, X. –X., Ling, R., He, Y., “Prognostic Significance of Interactions Between ER Alpha and ER Beta and Lymph Node Status in Breast Cancer Cases ”, *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (10), 6081 –6084, (2013).

Hanahan, D., Weinberg, R. A., “Hallmarks of Cancer: The Next Generation”, *Cell*, 144 (5), 646 –674, (2011).

Hao, Y., Winans, S. C., Glick, B. R., Charles, T. C., “Identification and characterization of new LuxR/LuxI-type quorum sensing systems from metagenomic libraries”, *Environ. Microbiol.*, 12, 105-117, (2010).

Hegazi, A. G., El-Houssiny, A. S., Fouad, E. A., “Egyptian propolis 14: Potential antibacterial activity of propolis-encapsulated alginate nanoparticles against different pathogenic bacteria strains”, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, 10, 1-8, (2019).

Hengzhuang, W., Wu, H., Ciofu, O., Song, Z., Høiby, N., “In Vivo Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Colistin and Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infection”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12, 2683–2690, (2012).

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Kashtanov, D., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., “Antibiotic resistance of bacterial biofilms”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 322-332, (2010).

Huleihel, M., Pavlov, V., Erukhimovitch, V., “The use of FTIR microscopy for the evaluation of anti-bacterial agents activity”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96, 17-23, (2009).

Ishihara, M., Naoi, K., Hashita, M., Itoh, Y., Suzui, M., “Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines.”, *Oncol. Rep.*, 22 (2) 349-354, (2009).

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, H., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., Kamil, M. A., “Bacterial biofilm and associated infections”, *Journal of the Chinese Medical Association*, 81, 7-11, (2018).

Jenul, C., Horswill, A. R., “Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence”, *Microbiol. Spectr.*, 6, (1), (2018).

Jesinger, R. A., “Breast Anatomy for the Interventionalist”, *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, 17 (1), 3-9, (2014).

Jin, U. H., Song, K. H., Motomura, M., Suzuki, I., Gu, Y. H., Kang, Y. J., Moon, T. C., Kim, C. H., “Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells”, *Mol. Cell Biochem.*, 310, 43–48, (2008).

Kaczanowski, S., “Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging”, *Phys. Biol.*, 13 (3), 1 –14, (2016).

Kebsa, W., Lahouel, M., Rouibah, H., Zihlif, M., Ahram, M., Abu-Irmaileh, B., Al-Ameer, H. J., Shhab, M. A., “Reversing Multidrug Resistance in Chemo-resistant Human Lung Adenocarcinoma (A549/DOX) Cells by Algerian Propolis Through Direct Inhibiting the P-gp Efflux-pump, G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction”, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 18 (9), 1330 - 1337, (2018).

Khuwaja, G. A., Abu-Rezq, A. N., “Bi-modal breast cancer classification system”, *Pattern Analysis and Applications*, 7, 235-242, (2004).

Kim, W., and Surette, M. G., “Swarming populations of *Salmonella* represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance”, *Biol. Proced. Online*, 5, 189–196, (2003).

Kim, W., Killam, T., Sood, V., Surette, M. G., “Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics”, *J. Bacteriol*, 185, 3111–3117, (2003).

Kothari, V., “Working with Natural Products (Extracts): Certain Useful Suggestions to Avoid Trouble”, *A. A. S. C. I. T*, 1 (2), 37-39, (2014).

Kouidhi, B., Zmantar, T., Bakhrouf A., “Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation”, *Anaerobe*, 16, 566-571, (2010).

Kumar, M. A., Anandapandian, K. T. K., Parthiban, K., “Production and Characterization of Exopolysaccharides (EPS) from Biofilm Forming Marine Bacterium”, *Braz. Arch. Biol. Technol*, 54, 259-265, (2018).

Lamprell, H., Mazerolles, G., Kodjo, A., Chamba, J. F., Noël, Y., Beuvier, E “Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from different species of *Staphylococcus* using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy”, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 125-129, (2006).

Lee, H.- B., Han, W., “Unique Features of Young Age Breast Cancer and Its Management”, *J. Breast Cancer*, 17 (4), 301 –307, (2014).

Leone, S., Noviello, S., Boccia, G., De Caro, F., Esposito, S., “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: role of daptomycin/ β -lactams combination”, *Le Infezioni in Medicina*, 2, 99-104, (2015).

Lowry, F. D., “*Staphylococcus aureus* infections”, *The New England Journal of Medicine*, 339, (8) 520-532, (1998).

Luís, A., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A, P., Domingues, F., “Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids”, *Biofouling*, 30, 69- 79, (2014).

Mace, P. D., Shirley, S., Day, C. L., “Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins”, *Cell Death and Differentiation*, 17, 46-53, (2010).

Machado-Silva, A., Perrier, S., Bourdon, J. C., “p53 family members in cancer diagnosis and treatment”, *Seminars in Cancer Biology*, 20, 57-62, (2010).

Mantsch, H., “Historical survey of infrared and Raman spectroscopy of biological materials”, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 1-14, (2001).

Marco, S. D., Piccioni, M., Pagiotti, R., Pietrella, D., “Antibiofilm and Antioxidant Activity of Propolis and Bud Poplar Resins versus *Pseudomonas aeruginosa*”, *Saudi J. Biol. Sci.*, 2017, 1-11, (2017).

Mehraj, J., Witte, W., Akmatov, M. K., Layer, F., Warner, G., Karuse, G., “Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community”, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 398, 55-87, (2016).

Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., Calder, P. C., “The Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria”, *Microbiol. Res.*, 152, 239-246, (1997).

Misir, S., Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, I., Hepokur, C., “Effect of Turkish Propolis on miRNA Expression, Cell Cycle, and Apoptosis in Human Breast Cancer (MCF-7) Cells”, *Nutrition and Cancer*, 72 (1), 133-145. (2019).

Monte, J., Abreu, A. C., Borges, A., Somões, L. C., Somões, M., “Antimicrobial Activity of Selected Phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and Their Biofilms”, *Pathogens*, 3 (2), 473–498, (2014).

Monteiro, J. M., Fernandes, P. D., Vaz, F., Pereira, A. R., Tavares, A. C., Ferreira, M. T., Pereira, P. M., Veiga, H., Kuru, E., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Filipe, S. R., Pinho, M. G., “Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle”, *Nature Communications*, 6, (8055), (2015).

Mora, D. P. P., Santiago, K. B., Conti, B. J., Oliveira Cardoso, O., Conte, F. L., Oliveira, L. P. G., Golim, M. A., Uribe, J. F. C., Gutiérrez, R. M., Buitrago, M. R., Popova, M., Trusheva, B., Bankova, V., García, O. T., Sforcin, J. M., “The chemical composition and events related to the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: A comparative assessment of Colombian samples”, *Phytotherapy Research*, 33 (3), 591-601, (2018).

Moran, M. S., Schnitt, S. J., Giuliano, A. E., Harris, J. R., Khan, S. A., Horton, J., Klimberg, S., Chavez-MacGregor, M., Freedman, G., Houssami, N., Johnson, P. L., Morrow, M. “SSO-ASTRO Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery with Whole Breast Irradiation in Stage I and II Invasive Breast Cancer”, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 88 (3), 553-564, (2014).

Motomura, M., Kwon, K. M., Suh, S-J., Lee, Y-C., Kim, Y-K., Lee, I-S., Kim, M-S., Kwon, D. Y., Suzuki, I., Kim, C-H., “Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation”, *Environ Toxicol Pharmacol*, 26, 61-67. (2008).

Neuman, H. B., Morrogh, M., Gonen, M., Van Zee, K. J., Morrow, M., King, T. A., “Stage IV Breast Cancer in the Era of Targeted Therapy: does surgery of the primary tumor matter?”, *Cancer*, 116 (5), 1226-1233, (2010).

Ngo-Thi, N. A., Kirschner, C., Naumann, D., “Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry”, *Journal of Molecular Structure*, 661-662, 371–380, (2003).

Nkondjock, A., Ghadirian, P., “Epidemiology of breast cancer among BRCA mutation carriers: an overview”, *Cancer Letters*, 205, 1-8, (2004).

Nostro, A., Guerrini, A., Marino, A., Tacchini, M., Di Giulio, M., Grandini, A., Akin, M., Cellini, L., Bisignano, G., Saraçoglu, H. T., “In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria”, *International Journal of Food Microbiology*, 238, 33–39, (2016).

Nuridin, N., Françolis, P., Magnani, A., Xanthopoulos, N., Mathieu, H. J., Barbucci, R., Vaudaux, P., Descouts, P., “Effect of toluene extraction on Biomer™ surface: I. ESCA, ATR/FTIR, contact angle analysis and biological properties”, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 7, 49-60, (1996).

Otto, M., “Staphylococcal Biofilms”, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322, 207-228, (2008).

Paharik, A. E., Horswill, A. R., “The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, regulation, and host response”, *Microbiol. Spectr.*, 4 (2), (2016).

Patel, S. “Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents”, *Journal of Dietary Supplements*, 13(3) 245-268, (2016).

Pippo, F., Gregorio, L., Congestri, R., Tandoi, V., Rossetti, S., “Biofilm growth and control in cooling water industrial systems”, *FEMS Microbiology Ecology*, 94, (fiy044), (2018).

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D’Orazi, G., “Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies”, *AGING*, 8 (4), 603 –619, (2016).

Plati, J., Bucur, O., Ceci, C., Khosravi-Far, R., “Dysregulation of Apoptotic Signaling in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities”, *J. Cell Biochem.*, 104 (4), 1124 –1149, (2008).

Popolo, A., Piccinelli, L. A., Morello, S., Cuesta-Rubio, O., Sorrentino, R., Rastrelli, L., Pinto, A. “Antiproliferative Activity of Brown Cuban Propolis Extract on Human Breast Cancer Cells”, *Natural Product Communications*, 4 (12) 1711-1716, (2009).

Przybyłek, I., Karpiński, T. M. “Antibacterial Properties of Propolis”, *Molecules*, 24(11), 1-17, (2019).

Rahman, M. R. T., Lou, Z., Yu, F., Wang, P., Wang, H., “Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of *Amomum tsaoko* (*Amomum tsaoko* Crevost et Lemarie) on foodborne pathogens”, *Saudi J. Biol. Sci.*, 24, 324–330, (2017).

Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., Buckingham-Meyer, K., Stewart, P. S., “Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States”, *Journal of Bacteriology*, 189, 4223–4233, (2007).

Řezanka T., Čejková, A., Masák, J., “Chapter 10 - Natural Products: Strategic Tools for Modulation of Biofilm Formation”, *Studies in Natural Products Chemistry*, 38, 269–303, (2012).

Rauprich, O., Matsushita, M., Weijer, C. J., Siegert, F., Esipov, S. E. and Shapiro, J. A., “Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development”, *J. Bacteriol*, 178, 6525–6538, (1996).

Riccardi, C., Nicoletti, I., “Carlo, R and Ildo, N. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc 1: 1458-1461”, *Nature Protocols*, 1 (3), 1458 – 1461, (2006).

Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Welss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S., Bayles, K. W., “The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*”, *PNAS*, 104, 8113-8118, (2007).

Rother, K., Kirschner, R., Sängner, K., Böhlig, L., Mössner, J., Engeland, K., “p53 downregulates expression of the G1/S cell cycle phosphatase Cdc25A”, *Oncogene*, 26, 1949-1953, (2007).

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., Tiwari, V., “Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action”, *Virulence*, 9, 522-554, (2018).

Rzepecka-Stojko, A., Kabała-Dzik, A., Moździerz, A., Kubina, R., Wojtyczka, R. D., Stojko, R., Dziedzic, A., Jastrzębska-Stojko, Z., Jurzak, M., Buszman, E., Stojko, J., “Caffeic Acid Phenethyl Ester and Ethanol Extract of Propolis Induce the Complementary Cytotoxic Effect on Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines”, *Molecules*, 20, 9242-9262, (2015).

Salem, M. M., Donia, T., Abu-Khudir, R., Ramadan, H., Ali, E. M. M., Mohamed, T. M., “Propolis Potentiates Methotrexate Anticancer Mechanism and Reduces its Toxic Effects”, *Nutrition and Cancer*, 72 (3), 460-480, (2019).

- Sánchez-Carranza, J. N., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Salas-Vidal, E., Cuevas, V., Jiménez, E. W., Veloz G, R. A., Carraz, M., González-Maya, L., “Phenolic Compounds Isolated from *Caesalpinia coriaria* Induce S and G2/M Phase Cell Cycle Arrest Differentially and Trigger Cell Death by Interfering with Microtubule Dynamics in Cancer Cell Lines”, *Molecules*, 22 (4), 1-14, (2017).
- Sawicka, D., Car, H., Borawska, M. H., Nikliński, J., “The anticancer activity of propolis”, *Folia Histochem. Cytobiol.*, 50, 25-37, (2012).
- Sforcin, J. M., Bankova, V., “Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?”, *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253-260, (2011).
- Shah, R., Rosso, K., Nathanson, S. D., “Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer”, *World J. Clin. Oncol.*, 5 (3), 283 –298, (2014).
- Shalini, S., Dosrstyn, L., Dawar, S., Kumar, S., “Old, new and emerging functions of caspases”, *Cell Death and Differentiation*, 22, 526 –539, (2015).
- Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., Sharma, K. K., “VARIOUS TYPES AND MANAGEMENT OF BREAST CANCER: AN OVERVIEW”, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, 1 (2), 109-126, (2010).
- Sharma, D., Misba, L., Khan, A. U., “Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities”, *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 8:76, (2019).
- Shrout, J. D., Tolker-Nielsen, S. A., “The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation”, *MRS Bull*, 36, (5), 367–373, (2011).
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., Almeida-Aguiar, C., “Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development”, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2015, 1-29, (2015).
- Simone, M., Evans, J. D., Spivak, M., “Resin Collection and Social Immunity in Honey Bees”, *The Society for the Study of Evolution*, 3 (11), 3016-3022, (2009).
- Simone, M., Borba, R. S., Wilson, M., Spivak, M., “Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health”, *Insects*, 8, (2), 2-20, (2017).
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., “Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid”, *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85, (1985).

Soltani, E. K., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Esteban, M.A., Zerroug, M. M., “Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses”, *Fish & Shellfish Immunology*, 62, 57-67. (2017).

Speziale, P., Visai, L., Rindi, S., Pietrocola, G., Provenza, G., Provenzano, M., “Prevention and Treatment of Staphylococcus Biofilms”, *Current Medicinal Chemistry*, 15, 3185-3195, (2008).

Stan, T., Marutescu, L., Mariana, C., Chifiriuc, C., Lazar, V., “Anti-Pathogenic Effect of Propolis Extracts from Different Romanian Regions on Staphylococcus Sp. Clinical Strains”, *Romanian Biotechnological Letters*, 21, 11166- 11175, (2016).

Suhaili, S. H., Karimian, H., Stellato, M., Lee, T. - H., Aguilar, M. -I., “Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization”, *Biophys. Rev.*, 9, 443 –457, (2017).

Terzioğlu, G., “ Küçük Isırgan Otunun (Urtica Urens’in) Prostat Kanseri Üzerine Etkisinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Ünianrsitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, (2014).

Thomsen, S., Tatman, D., “Physiological and Pathological Factors of Human Breast Disease That Can Influence Optical Diagnosis”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 838, 171-193, (1998).

Tsuchiya, H., Inuma, M., “Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*”, *Phytomedicine*, 7 (2) 161-165, (2000).

Turan, I., Demir, Y., Misir, S., Kilinc, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y., Deger, O., “Cytotoxic Effect of Turkish Propolis on Liver, Colon, Breast, Cervix and Prostate Cancer Cell Lines”, *Trop. J. Pharm. Res.*, 14 (5), 777-782, (2015).

Türkyılmaz, M., Hacıkamiloğlu, E., Baran Deniz, E., Boztaş, G., Dünder, S., Kavak Ergün, A., Sevinç, A., Tütüncü, S., Atik, E., “2014 Yılı Türkiye Kanseri İstatistikleri”, (2017), https://hsqm.saglik.gov.tr/tr/kanser_istatistikleri/yillar/2014-yili-turkiye-kanser-istatistikleri.html, (2015).

Utispan, K., Chitkul, B., Koontongkaew., “Cytotoxic Activity of Propolis Extracts from the Stingless Bee *Trigona Sirindhornae* Against Primary and Metastatic Head and Neck Cancer Cell Lines”, *APOCP*, 18 (4), 1051-1055, (2017).

Veloz, J. J., Saavedra, N., Lillo, A., Alvear, M., Barrientos, L. & Salazar, L. “Antibiofilm activity of Chilean propolis on *Streptococcus mutans* influenced by the year of collection”, *Biomed. Res. Int.*, 2015, 291-351 (2015).

Villa, F., Piits, B., Stewart, P. S., Giussani, B., Rancornì, S., Albanese, D., Giordano, C., Tunesi, M., Cappitelli, F., “Efficacy of Zosteric Acid Sodium Salt on the Yeast Biofilm Model *Candida albicans*”, *Microb. Ecol.*, 62, 584–598, (2011).

Vousden, K. H., Lane, D. P., “p53 in health and disease”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 275 – 283, (2007).

Wang, V. D. “Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials”, *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013 22 1-11, (2013).

Wardenburg, J. B., Patel, J. R., Schneewind, O., “S Surface Proteins and Exotoxins Are Required for the Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Pneumonia”, *Infection and Immunity*, 75, (2), 1040–1044, (2007).

Westall, F., Steele, A., Toporski, J., Walsh, M., Allen, C., Guidry, S., McKay, D., Gibson, E., Chafetz, H., “Polymeric substances and biofilms as biomarkers in terrestrial materials' Implications for extraterrestrial samples”, *Journal of Geophysical Research*, 105, 511-527, (2000).

WHO., “CANCER”, (2018), <https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/cancer> (2018).

Wojtyczka, R. D., Dziedzic, A., Danuta, I., Kępa, I., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Smoleń Dzirba, J., Stojko, J., Sajewicz, M., Wąsik, T. J. “Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs”, *Molecules*, 18, 9623-9640, (2013).

Wu, H., Moser, C., Wang, H-Z., Høiby, N., Song, Z-J., “Strategies for combating bacterial biofilm infections”, *International Journal of Oral Science*, 7, 1-7, (2014).

Xavier, J. A., Valentim, I. B., Camatari, O. S., Almeida, A. M. M., Goulart, H. F., Souza Ferro, J. N., Oliveira Barreto, E., Cavalcanti, B. C., Bottoli, C. B. G., Goulart, M. O. F., “Polyphenol profile by UHPLC-MS/MS, anti-glycation, antioxidant and cytotoxic activities of several samples of propolis from the northeastern semi-arid region of Brazil”, *Pharmaceutical Biology*, 55 (1), 1884-1893, (2017).

Xuan, H., Li, Z., Yan, H., Sang, Q., Wang, K., He, Q., Wang, Y., Hu, F., “Antitumor Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 2014, 1-11. (2014).

Yalaza, M., İnan, A., Bozer, M., ‘‘Male Breast Cancer’’, *J. Breast Health*, 12, 1-8, (2016).

Yokuş, B., Çakır, D. Ü., ‘‘Kanser Biyokimyası’’, *Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1 (2), 7 –18, (2012).

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : FARID NASIRLI

Doğum Yeri ve Tarihi : Sheki AZERBAYCAN / 24.08.1995

Lisans Üniversite : Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Elektronik posta : ferid9595@hotmail.com.tr

İletişim Adresi : Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat
Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji
Laboratuvarı 20070 Pamukkale/Denizli

Konferans listesi :

• Nazime Mercan Doğan, **Farid Nasirli**, Şevki Arslan, Segueni Narimane, Amina Daikh, Salah Akkal, Salah Rhouati “Cytotoxic and Anticancer Activity of Petroleum ether extract of Algerian Propolis”, 6th World Congress on Medicinal and Aromatic Plants, Kuzey Kıbrıs (2019).