

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BAKTERİ TEMELLİ KANSER TERAPÖTİK MEKANİZMALARININ
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sohaib Wisam MADDAH AL-ANI

1600005197

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

AĞUSTOS 2019

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BAKTERİ TEMELLİ KANSER TERAPÖTİK MEKANİZMALARININ
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sohaib Wisam MADDAH AL-ANI

1600005197

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20 EYLÜL 2019

Tezin Savunulduğu Tarih : 27 AĞUSTOS 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

Doç. Dr. Pınar OBAKAN

AĞUSTOS 2019

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmamda bakteri temelli kanser terapötik mekanizmalarını inceledim. Bu çalışmayı Türkçe bir şekilde yapmak ve tez çalışmalarında ana dilimden farklı bir dil kullanmak benim için zaman zaman zorlayıcı olsa da vazgeçmeden, pes etmeden elimden geleni yaptığıma inanıyorum. İlk başlarda yabancı olduğum için oldukça zorlansam da git gide daha fazla keyif aldığım, çokça tecrübe ve bilgi edindiğim, kendimi alanımda güzel bir şekilde geliştirdiğim güzel bir süreç olduğunu düşünüyorum. Hayatımın bu unutulmaz tecrübesini yaşadığım T.C Kültür Üniversitesi ailesine bana kattıkları tüm güzellikler için teşekkürlerimi sunuyorum. Öncelikle tez konumu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurarak bana yardımcı olan, tez çalışmalarım ve yüksek lisans eğitimim süresince kendisine ne zaman danışsam sabırla değerli vakitlerini, değerli fikirlerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her aşamada yol gösterici olan ve yetişmemde çok büyük emeği geçen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Elif Damla ARISAN' a sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Ayrıca yine tez çalışmalarımın başından sonuna kadar hep yanımda olan, değerli fikir görüşlerini benimle paylasan ve kıymetli zamanlarını bana ayıran Sayın Prof. Dr. Narçin Palavan ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN, Sayın Doç . Dr. Pınar OBAKAN, Sayın Araş . Gör. Pelin ÖZFİLİZ'e ve Sayın Araş. Gör. Özge BERRAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın en güzel zamanlarını birlikte geçirdiğim, desteklerini her ihtiyacım olduğunda benden esirgemeyen ve bu tezin hazırlanması sırasında da her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca hayatımın her aşamasında yanımda olan benden dualarını ve desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen, bana verdikleri sevgi dolu desteği her zaman kalbimde hissettiğim sevgili annem ve sevgili babama sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR ve SEMBOLLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.2. Kolon Kanseri	5
1.3. <i>Lactobacillus</i> Suşları	10
1.4. <i>Lactobacillus</i> Suşlarının Tanımlanması	17
1.5. <i>Lactobacillus</i> Suşlarının Etkileri	22
1.6. Kolon Kanseri Tedavisinde <i>Lactobacillus</i> Suşları	23
2. MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1. MATERYAL	28
2.1.1. Bakteri Kültürleri ve Besi Ortamları	28
2.1.2. Kullanılan İnsan Kanseri Hücreleri	28
2.1.2. Hücre Kültürü Donanımları	28
2.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	28
2.2. YÖNTEM	28
2.2.1. Bakteri Hücre Stoklarının Hazırlanması	28
2.2.2. İnsan Kolon Kanseri Hücre Hatlarının Hazırlanması	29
2.2.3. Bakteri Özleri / Fraksiyonları Hazırlık	29
2.2.4. Mikroskopik Yöntemler	30
2.2.4.1. Işık Mikroskobu	30
2.2.4.2. Floresan Mikroskobu	30
2.2.5. Koloni Oluşturma Deneyi	30
2.2.6. ELİZA testi	31
2.2.7 Yara iyileşmesi deneyi	31
2.2.8. İstatistiksel Analiz	31
3. SONUÇLAR	32
3.1. Bakteri Karakteristiklerinin Tanımlanması	32

3.2. Işık Mikroskobu Hücre Morfolojisinin İzlenmesi	32
3.3. DiOC6 ile Mitokondri Membran Potansiyelindeki Değişimin İzlenmesi	32
3.4. Propidyum İyodür ile Hücre Ölümünün Belirlenmesi	33
3.5. Koloni Oluşturma Deneyi	38
3.6. Enflamasyon ile Moleküler Hedeflerdeki Değişimleri Gösterilmesi	38
3.7. Yara iyileşmesi deneyi	41
4. TARTIŞMA	44
5. KAYNAKLAR	47
EK A: Cihazlar	56
EK B: Hücre Kültürü	58
EK C: Kullanılan Kimyasallar	59
EK D: Bakteri Kültürü	60

KISALTMALAR ve SEMBOLLER

°C	: Santrigrad derece
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APC	: Adenomatosis Poliposis Coli
Ark.	: Arkadaşları
ATP	: Adenozin trifosfat
Bcl-2	: B-hücre lenfoma 2
BH	: Bcl-2 homoloji bölgesi
Caco2	: İnsan Kolon Kanseri
CO ₂	: Karbondioksit
dk	: dakika
DNA	: Deoksiriboz Nükleik asit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
FAP	: Ailevi Adenomatöz Poliposis
HNPCC	: Kalıtsal Polipsiz Kolorektal Kanser
KRK	: Kolorektal kanser
KZYA	: Kısa Zincirli Yağ Asitleri
LAB	: Laktik asit bakterileri
mRNA	: Haberci RNA
N	: Neomisin
NADP	: Nikotinamidadenindinükleotit fosfat
NF-kB	: Nükleer transkripsiyon faktörü
OT	: Oksitetrasiklin
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
R	: Dirençli
RNA	: Ribonükleik Asit
S	: Duyarlı

sn : Saniye
spp : Türleri
WHO : Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1. Kanser Hücrelerinin Çoğalması (Alberts ve ark. 2007).....	2
Şekil 1. 2. Kanser Hücrelerinin Gelişimi (Alberts ve ark. 2007).....	4
Şekil 1. 3. Sindirim Sisteminde Kolon Kanserinin Gözlenmesi (Ricchi ve ark. 2003).	6
Şekil 1. 4. Kolon Kanserinin Dönüşümü (Tuynman, 2004).	7
Şekil 3. 1. Hücre morfolojisinin HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 48 saat sonrasında gösterimi. 100x büyütme..	34
Şekil 3. 2. Hücrelerde mitokondri membran potansiyelinin DiOC6 boyası ile HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 48 saat sonrasında gösterimi. 100x büyütme.....	35
Şekil 3. 3. Hücre ölümünün belirlenebilmesi amacı ile HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 48 saat sonrasında propidyum iyodür (PI) boyama sonuçları floresan mikroskop ile incelendi. 100x büyütme.....	36
Şekil 3. 4. HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli 48 saat boyunca hücreler bakteri protein lizatlarına maruz bırakıldıktan sonra yeni besiyerinde 7 gün boyunca takip edildi. Fikse edilen hücreler kristal viyole ile boyanarak koloni oluşturma potansiyelleri irdelendi.	37
Şekil 3. 5. HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinin enflamasyon ile ilgili moleküler markırlara ilişkin kolorimetrik ELİZA sonuçları Abs 450 nm de okuması yapılmıştır.	39
Şekil 3. 6. HCT116 dt kolon kanseri hücrelerinin enflamasyon ile ilgili moleküler markırlara ilişkin kolorimetrik ELİZA sonuçlarının protein miktarı ile normalize edilen verilerinin sunumu. Kolon grafikler 2 tekrarlı deney sonuçlarının Ort±Std.hata olarak yer almaktadır.....	40
Şekil 3. 7. HCT116 p53-/- kolon kanseri hücrelerinin enflamasyon ile ilgili moleküler markırlara ilişkin kolorimetrik ELİZA sonuçlarının protein miktarı ile normalize edilen verilerinin sunumu. Kolon grafikler 2 tekrarlı deney sonuçlarının Ort±Std.hata olarak yer almaktadır.	41
Şekil 3. 8. HCT116 dt Yara iyileşmesi deneyi kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 0 saat , 24 saat , 48 saat sonrasında gösterimi. 10x büyütme	42

Şekil 3. 9. HCT116 dt kolon kanseri hücrelerinin sonuçlarının protein miktarı ile normalize edilen verilerinin sunumu. Kolon grafikler tekrarlı deney sonuçlarının 48 saat sonra yapılan tüm tedaviler tedavinin iyi sonuçlarını göstermektedir Ort±Std 245 µm.....42

Şekil 3.10 HCT116 p53-/- Yara iyileşmesi deneyi kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 0 saat , 24 saat ,48 saat sonrasında gösterimi. 10x büyütme.....43

Şekil 3.11. HCT116 p53-/- kolon kanseri hücrelerinin sonuçlarının protein miktarı ile normalize edilen verilerinin sunumu. Kolon grafikler tekrarlı deney sonuçlarının 48 saat sonra yapılan tüm tedaviler tedavinin iyi sonuçlarını göstermektedir Ort±Std 233 µm.....43



TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. Gece boyu 37°C’de kültüre edilen laktik asit bakterilerinin OD600 optik yoğunluklarının gösterimi	29
---	----



ÖZET

Dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden biri kanserdir. Bütün kanserler hücrelerden başlar ve bunun sonucunda hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve bu bölünen hücrelerin yine kontrolsüz yayılması gerçekleşir. Kolon kanseri tüm dünyada ve Türkiye'de kanser vakaları arasında ön sıralarda bulunduğu kabul edilmektedir. Kolon kanseri, sindirim sisteminin son kısmı olan kalın bağırsakta gözlenir ve kolon kanserlerinin hemen hepsi, kolon duvarlarındaki iyi huylu poliplerin zamana bağlı olarak kötü huylu poliplere dönüşümüyle açığa çıkar.

Kolon kanserinde de öteki kanser çeşitlerinde olduğu gibi kimyasal metodlar terapötik ve önleyici strateji olarak kabul edilebilir. Ancak, probiyotikler de kolon kanseri hastalarında yinelemeyi engellemede ve yan etkileri azaltmada bioterapotikler olarak kullanılabilmektedir. Kolon kanserine yakalanma riskinin yaşa bağlı artış göstermesine ek olarak, yeme alışkanlıkları da hastalığın gelişiminde etkilidir. Beslenme yoluyla alınan probiyotik *L. reuteri*'nin bağırsakta ürettiği sekonder metabolitlerin, örneğin organik asitlerin, kolon kanseri riskini azaltmada etkili olduğu gözlenmektedir.

Bu çalışmada bakteri temelli kanserlerin terapötik mekanizmaları incelenecektir. Çalışmada ilk olarak kanser ve kolon kanseri kavramsal olarak ele alınacaktır. Daha sonra *Lactobacillus* suşlarının tanımlamasına, etkilerine ve kanser tedavisindeki önemine yer verilecektir. Çalışmanın araştırma bölümünde ise yapılan deney kavramsal çerçeve ışığında analiz edilecektir.

ABSTRACT

One of the leading causes of death in the world is cancer. All cancers start from the cells, resulting in uncontrolled division of the cells and the uncontrolled spread of these dividing cells. Colon cancer is considered to be in the forefront among all cancer cases in the world and Turkey. Colon cancer is observed in the large intestine, which is the last part of the digestive system, and almost all of the colon cancers are revealed by the transformation of benign polyps on the colon walls into malignant polyps over time.

In colon cancer, as in other types of cancer, chemical methods can be considered as therapeutic and preventive strategies. However, probiotics can also be used as bio-therapies in colon cancer patients to prevent recurrence and reduce side effects. In addition to increasing age-related risk of colon cancer, eating habits are also effective in the development of the disease. It is observed that the probiotic *L. reuteri*, which is taken by nutrition, is effective in reducing the risk of colon cancer by secondary metabolites produced in the intestine, for example organic acids.

In this study, the therapeutic mechanisms of bacteria-based cancers will be examined. Cancer and colon cancer will be discussed conceptually. Next, the definition, effects and importance of *Lactobacillus* strains in cancer treatment will be discussed. In the research section of the study, the experiment will be analyzed in the light of the conceptual framework.

1. GİRİŞ

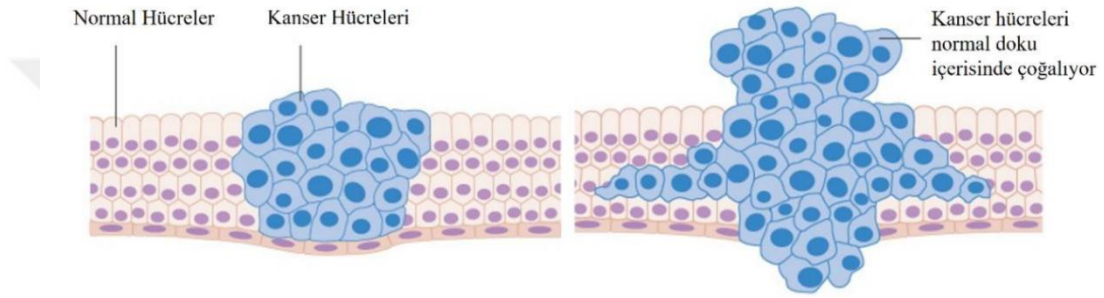
1.1. Kanser

Kanser dünyadaki önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve diğer ülkelerde yapılan araştırmalarda elde edilen istatistiksel veriler, ölümlerin büyük bir oranının kansere bağlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir (Ferlay J, Bray F, Pisani P 2002; Siegel, Miller, and Jemal 2019). Ayrıca kansere bağlı ölümlerde kolon kanserlerinin etkili olduğu görülmektedir. Kolon ve rektum kanseri, özellikle birçok batı ülkesinde oldukça kayda değer bir sağlık problemi olarak değerlendirilmektedir (Perše and Cerar 2012). Türkiye İstatistik Kurumu (2016) verilerine göre Türkiye'de sindirim sisteminde görülen kanser vakaları arasında gastrik ve kolon kanserlerinin ön sıralarda bulunduğu kabul edilmektedir.

Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik kanser hücrelerinin sürekli, kontrolsüz çoğalmasıdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organları da istila eder ve sonunda tüm vücuda yayılır. Kanser hücrelerinin ortak özelliği olan çoğalmayı denetleyen mekanizmaların ortadan kalkması, çok hücreli sistemlerde biriken anomalilerin sonucudur. Kanser hücrelerini normal hücreden ayıran birçok davranış da bu özelliği yansıtır.

Tüm kanserler hücrelerden başlar. Vücudumuz yüz milyondan fazla hücreye sahiptir ve kanser, bir hücrede veya küçük bir hücre grubunda meydana gelen değişikliklerle başlar (Şekil 1.1). Bir kanserin başlaması için, bir hücrenin veya bir hücre grubunun genlerinde bazı değişiklikler olur ve bunun sonucunda hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve bu bölünen hücrelerin yine kontrolsüz yayılması gerçekleşir (Alberts B, Johnson A, Lewis J 2002). Kanserleri köken aldıkları dokuları göz önünde bulundurarak sınıflandıracak olursak; lösemi ve lenfoma, kan hücrelerinden;

sarkoma, bağ ve kas dokulardan; karsinoma, epitel dokulardan köken alan kanser türleridir (Alberts B, Johnson A, Lewis J 2002). Kanserlerin oluşumunda pek çok aşama mevcuttur ve her adım kanserlerin gelişimini hızlandırmaktadır (Musa et al. 2004). Kanserlerin oluşumu ve gelişimi sürecinde gerçekleşen olaylar henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, bu süreçte bazı önemli genlerde oluşan ve kanserli hücelere bazı büyüme avantajları kazandıran mutasyonların çoğalması ön plana çıkmakta, beslenme alışkanlıkları da önemli bir yer tutmaktadır (LÜLEYAP et al. 2011).



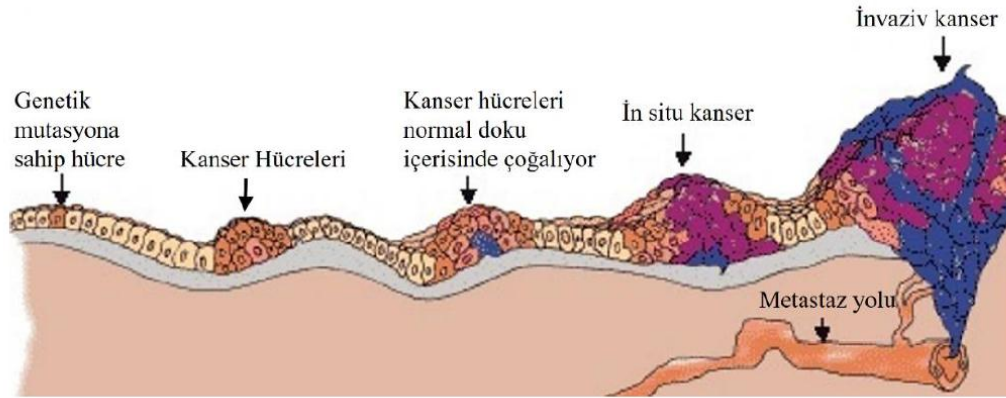
Şekil 1. 1. Kanser Hücrelerinin Çoğalması (Alberts ve ark. 2007).

Benzer bir ifadeyle kanser, canlılığın en başlıca birimi olan hücrede, hücre içi ve dışı ile iletişim kurmasında görevli sinyallerin, normal hücrelerde sınırlı ve doğru bölünmeyi kontrol ederken, kanser hücrelerinde sınırsız ve yanlış bölünmeleri kontrol edememesi olarak tanımlanabilmektedir (Pogribny and Beland 2009). Farklı hücre türleri farklı işleri yapmakla sorumludur ancak temelde benzer özelliklere sahiptirler. Hepsinde çekirdek denilen bir kontrol merkezi bulunmakta ve çekirdeğin içerisinde uzun deoksiribonükleik asit (DNA) dizilerinden oluşan kromozomlar yer almaktadır (Musa et al. 2004). Yönetici molekül olarak DNA, hücrenin nasıl davranacağını belirleyen kodlanmış mesajlardan oluşan binlerce gen içermektedir. Genin ifadesi olan haberci RNA (mRNA) ve protein hücrenin kontrol edilmesinde görevlidirler ve hücrenin ne tür bir hücre olacağına, ne yapacağına, ne zaman bölüneceğine, ne zaman öleceğine karar verirler (LÜLEYAP et al. 2011).

Kanser vücutta yer alan herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkabildiğinden, gerek davranış, gerekse tedaviye cevap yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren yüzden fazla değişik kanser türü mevcuttur. Kanser patolojisinde en önemli konu benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümörleri birbirinden ayırabilmektir. Hücrelerin anormal çoğalması sonucunda ortaya çıkan tümör benign ya da malign olabilir (Douglas Hanahan and Weinberg 2011; D Hanahan and Weinberg 2000).

Deride görülen basit siğiller gibi benign tümörler çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırlar. Buna karşılık malign tümörler hem çevredeki normal dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılır (metastaz). Aslında sadece malign tümörler kanser olarak tanımlanır (Ferlay J, Bray F, Pisani P 2002).

Genellikle genler, hücrelerin düzenli ve kontrollü bir şekilde çoğalmasını sağlar ve vücudun sağlıklı kalması için yeterli sayıda hücrenin üretilip üretilmediğinden sorumludurlar. Bazen hücre bölünmesinde genlerde mutasyon adı verilen değişiklikler meydana gelebilir. Bazı mutasyonların sonucunda, hücrenin artık talimatları anlamadığı, kontrolden çıkmaya başladığı durumlar gözlenebilir (Şekil 2) ve normalden farklı işleyen anormal proteinler üretilir. Belirli genlerdeki mutasyonlar, bir hücrenin bölünmesini tetikleyen proteinlerin çok fazla ya da hücrenin bölünmesini durdurabilen proteinlerin çok az üretilmesine neden olabilir (Douglas Hanahan and Weinberg 2011). Bu mutasyonların sonucunda hastalıklar veya hastalıkların gelişimleri gibi kavramların tümünde genetik bir temelden söz edilebilir. Son yıllarda kanser hastalığı için etkili gen sayısı 421 iken, 6251 gen de kanser hastalığında aday genler olarak gösterilmektedir (LÜLEYAP et al. 2011).



Şekil 1. 2. Kanser Hücrelerinin Gelişimi (Alberts B, Johnson A, Lewis J 2002).

Kanser hücrelerinde genel olarak bulunan ve onları normal hücrelerden ayıran bazı özellikler yer almaktadır. Kanser hücreleri; çoğalırken (proliferasyonda) dış sinyallere ihtiyaç duymazlar ve bunun sonucunda apoptozla ilgili gelen sinyallerden normal hücrelere göre daha az etkilenirler. Mutasyon oranı oldukça yüksek ve buna bağlı olarak oldukça kararsız hücrelerdir. Sınırsız sayıda bölünebilme özelliğine sahiptirler. Beslenmelerini ve dağılmalarını kolaylaştırabilmek için anjiyogenezi (damarlanmayı) indükleyebilir ve bunun sonucunda metastaz yaparak diğer dokulara dağılabilir ve bu dokularda çoğalmaya devam edebilirler (Şekil 1. 2)

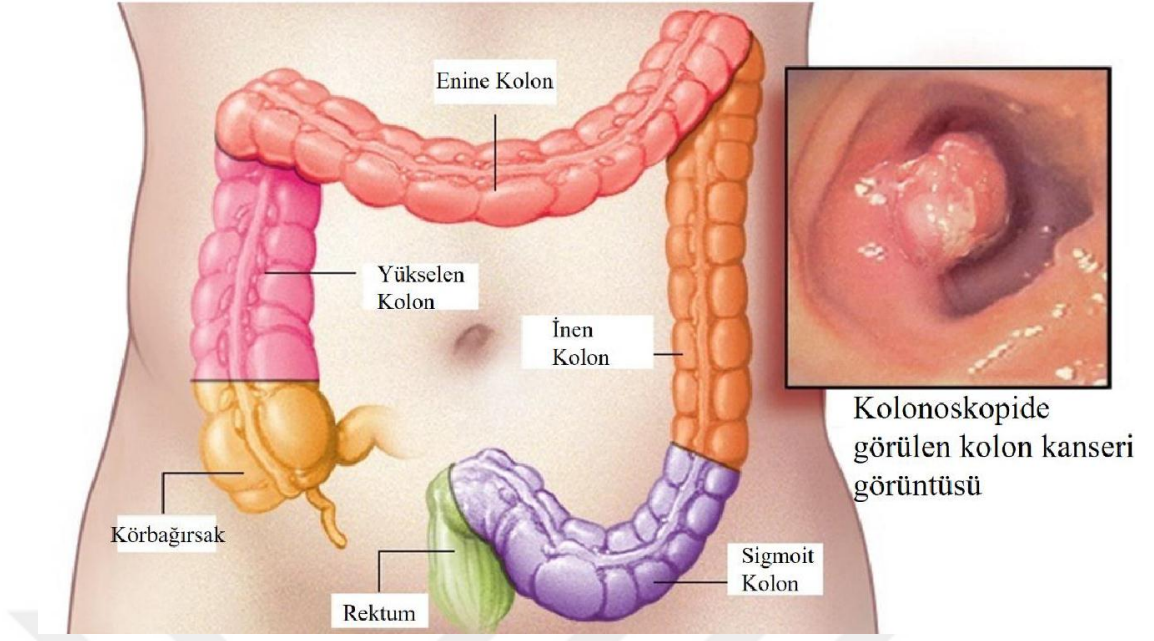
Kanseri tehlikeli yapan, bunların yayılma ve metastaz yapma özellikleridir. Benign tümörler genellikle ameliyat ile çıkartılabildiği halde, malign tümörlerin vücudun uzak bölgelerine yayılması hastalığın tedavisini güçleştirir. Gerek malign, gerekse benign tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılır. Kanserlerin çoğu üç ana grupta toplanabilir: karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomlar epitel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen sarkomlar, kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusunda gelişen solid tümörlerdir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan lösemi ve lenfomalar ise sırasıyla kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişir. Tümörler ayrıca geliştikleri organa ve ilgili hücrenin türüne göre de sınıflandırılır (Cooper and Hausman 2007)

Canlı organizmalarda görülen hücre çoğalmasının düzenlenmesi, bazen çeşitli etmenlerle bozulabilmektedir. Organizmanın ihtiyacı olmasa bile herhangi bir dokuda görülen kontrol dışı hücre bölünmesi hücrelerin sayısında anormal bir artışa neden olabilmektedir ve normal bir hücrede bazı genetik değişimlerin etkisiyle süreç kanser oluşumuna yönelmektedir (Douglas Hanahan and Weinberg 2011; D Hanahan and Weinberg 2000). Bu kanserli hücrelerin şekil ve işlevleri normal hücrelerden farklılık göstermektedir. Sonuç olarak, hem yapısal hem de fonksiyonel açıdan normal olmayan bir doku kitlesi ortaya çıkmakta ve bu kitle tümör olarak anılmaktadır. Tümör alanındaki hücrelerde aşırı ve kontrolsüz artış sonrası yükselen besin gereksinimlerini karşılayabilmek için kan ve lenf yoluyla diğer dokulara yayılma başlar (Pogribny and Beland 2009). Buna göre tümörler bulundukları alanlarda sınırlı kalarak büyüme gösteriyorsa yani vücudun diğer bölgelerine dağılmıyorsa iyi huylu (benign); devamlı bölünerek büyüme gösteriyor ve lenf ya da kan dolaşımı yoluyla metastaz yaparak vücudun diğer bölgelerine dağılma gösteriyorsa kötü huylu (malign) tümörler olarak adlandırılmaktadır (Colotta et al. 2009; Douglas Hanahan and Weinberg 2011).

1.2. Kolon Kanseri

Kolon kanseri, kolon ve rektumu kaplayan epitel tabakasından köken alan yaygın bir kanser türüdür (Siegel, Miller, and Jemal 2019). Dünya genelinde her sene 1 milyondan fazla yeni kolorektal kanser (KRK) durumu teşhis edilmektedir. KRK dünyada en sık görülen üçüncü kanserdir (Terzic ve ark., 2010). KRK özellikle sanayi ülkelerinde yaygın olarak görülen ve kanser ölümlerinde ikinci en büyük sebebi oluşturan kanser türüdür (Terzić et al. 2010).

Kolon kanseri, sindirim sisteminin son kısmı olan kalın bağırsakta (kolon), rektal kanser ise kolonun son kısımlarında gözlenir (Şekil 1.3), ikisi birlikte kolorektal kanser olarak anılır (Ricchi 2003). Çoğu kolon kanseri vakası adenomatöz polip olarak adlandırılan küçük, kanserli olmayan hücre yığınları olarak başlar ve zamanla bu poliplerin bazıları kolon kanserlerine dönüşebilir (Borinstein et al. 2010).



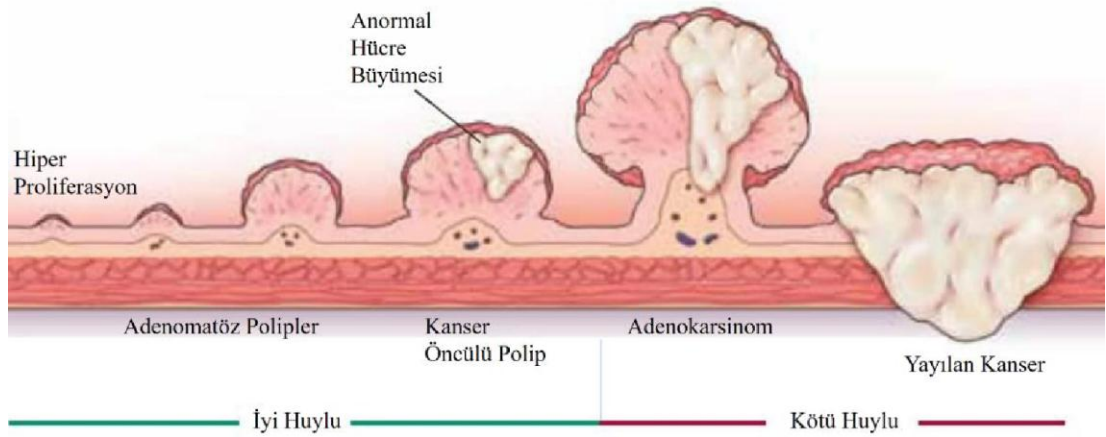
Şekil 1. 3. Sindirim Sisteminde Kolon Kanserinin Gözlenmesi (Ricchi 2003).

Kolon kanseri tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerindendir (Ferlay J, Bray F, Pisani P 2002). Kolon kanseri (ABD’de) tüm kanser çeşitleri içerisinde erkeklerde ve kadınlarda en yaygın gözlenen üçüncü kanser çeşididir (Siegel, Ward, and Jemal 2012). Sindirim sisteminde kalın bağırsakta meydana gelen kolon kanseri dünyadaki en çok görülen kanser türlerinden biri olup özellikle gelişmiş ülkelerde çok sayıda ölüme neden olabilmektedir (H. et al. 2009) Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalar, kolon kanseri erken dönemlerde uygun metotlarla tespit edilebilirse, hastalığın önlenebileceğini ortaya çıkarmaktadır (Siegel, Miller, and Jemal 2019).

Kolon ve rektum kanserleri (kolorektal kanserler; KRK) batı ülkelerinde ki en yaygın kanser tiplerindendir ve birleşik devletlerde, her yıl, yaklaşık 140,000 vaka rapor edilmektedir (toplam kanser olgularının yaklaşık %10’u). Kolon kanserlerinin çoğu (diğer kanser tipleri gibi) kalıtılan hastalık değildir, yani ebeveynlerden çocuklarına direkt olarak aktarılamaz. Bununla birlikte, kolon kanserinin iki kalıtsal formu tanımlanmıştır. Her iki sendromda da, kansere yatkınlık geninin kalıtılması kanser gelişme olasılığını artırmaktadır. Kolon kanserinin kalıtsal formlarından biri (ailesel adenomatoz polipozis) oldukça nadirdir, toplam kolon kanseri olgularının %1’inden daha azdır. Kolon kanserinin ikinci kalıtsal formu (kalıtsal polipsiz kolorektal kanser veya HNPCC) daha yaygındır ve bütün kolon kanseri olgularının

%15'ini oluşturmaktadır (Cooper and Hausman 2007). Primer kolorektal kanserlerin %95'ini adenokarsinomlar oluşturur. Kolon kanserlerinin yaklaşık %30'u rektumda %25'i sigmoidde %5-10'u inen kolonda %10-15'i transvers kolonda, çıkan kolon-çekumda da %25'i yerleşir. Yapılan bir çalışmada KRK yaklaşık %45'inin rektumda %22'sinin de sigmoid kolonda görüldüğü bildirilmiştir (Sis et al. 2005).

Kolon kanserlerinin hemen hepsi, kolon ve rektum duvarlarındaki iyi huylu poliplerin zamana bağlı olarak kötü huylu poliplere dönüşümüyle açığa çıkar (Şekil 1.4) (Borinstein et al. 2010). İlk seviyelerde semptomları yoktur, ancak tespitleri tarama metotları ile gerçekleştirilebilir. Devamındaki safhalarda karında ağrı, iştahta kesilme, kiloda kayıp ve rektal kanamalar gözlenebilir. Tedavi hastalığın evresi göz önünde bulundurularak yalnızca ameliyat ile kanserli dokunun alınmasıyla yapılır; ancak ilerlemiş evrelerde ameliyata ek olarak kemoterapi ve radyoterapi de uygulanabilir.



Şekil 1. 4. Kolon Kanserinin Dönüşümü (Tuynman, Peppelenbosch, and Richel 2004)

Kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %90'ı genetik yatkınlık olmaksızın sporadik, yaklaşık %10'u ise genetik nedenli olarak tespit edilmiştir. Tarihsel olarak, kolorektal kanser sınıflandırması yalnızca klinik ve patolojik özelliklere dayanmaktadır (Compton and Greene 2009). Ancak bazı kanserli dokulardaki mutasyon analiz çalışmaları, normal bağırsak epitel hücrelerinin kanserleşmesinden sorumlu olan genetik adımların niteliğini ve sayısını belirleyebilmektedir (Boyce 2018).

Birçok kolon kanseri çalışması, bu kanserin bir dizi mekanizma ile meydana geldiğini göstermektedir. Bu mekanizmalar tümör süpresör genlerde (APC, p53) meydana gelen mutasyonlar, onkogen aktiviteleri ve epigenetik değişim mekanizmaları (metilasyon, asetilasyon) olarak ileri sürülmektedir (Tuynman, Peppelenbosch, and Richel 2004).

Örneğin, Ailevi Adenomatöz Polipozis (FAP) hastalığı sürecinde ortaya çıkan ilk mutasyon kalıtsaldır ve kolonda yüzlerce benign adenomların gelişmesine sebep olabilmektedir. Oluşan ilk mutasyon 5. kromozomda yer alan APC (Adenomatosis 6 polipozis koli) geninde gerçekleşmektedir (Douglas Hanahan and Weinberg 2011). Kolon kanserli vakalarda mutasyon geçirmiş APC genine ait ürün olarak aktif olmayan APC proteininin varlığı açığa çıkarılmıştır. Bu vakalarda, preadenokarsinom APC gen mutasyonu nedeniyle gelişmekte ve sonraki süreçte tamamen adenokarsinoma dönüşüm göstermektedir (Şekil 1.4) (Tuynman, Peppelenbosch, and Richel 2004).

Kolorektal kanserin erken safhaları genellikle semptomatik değildir. Bununla birlikte kolorektal kanserin erken safhalarında tarama yapılarak saptanabilmesi önemlidir. Bu hastalık ilerleyen dönemde, rektal kanama, gaitada kan, bağırsak doğasının değişmesi, alt abdomende kramplara sebep olmaktadır. Kolorektal kansere yakalanma riski yaşa bağlı olarak artmaktadır. Teşhis edilmiş vakaların % 90'dan fazlası 50 yaş ve üzeridir. Aynı zamanda bazı kalıtsal genetik mutasyonlar (ailesel adenomatoz polipozis-FAP) ve kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser-HNPCC), bireysel ya da ailesel kolorektal kanser ve/ veya polip öyküsü ya da kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları geçmişi hastalıkla ilişkili risk faktörleri arasındadır. Ayrıca obezite, hareketsizlik, sigara ve alkol tüketimi, aşırı kırmızı et tüketimi, sebze ve meyve tüketimindeki yetersizlik kolorektal kanser riskini artıran faktörler arasındadır (American Cancer Society, 2008).

KRK durumlarının büyük bir oranı kalıtılabilir genetik değişikliklerden daha çok çevresel sebeplerle ilgilidir. Risk faktörleri çevresel ve besin kaynaklı mutajenleri, özel bağırsak kommensalleri ve patojenleri, ve tümör gelişiminden önce gelen kronik bağırsak inflamasyonunu içermektedir Bir kaç onkogenin aktivasyonunu ve iki ya da

daha fazla tümör baskılayıcı geninin kaybını içeren genetik bozukluklar kanser gelişimi için yeterlidir (Terzić et al. 2010; Jasperson et al. 2010).

Kolorektal tümörlerde KRK'ye yol açan iki temel genetik yolak belirlenmiştir: Birinci yolak, sporadik KRK'lerin % 60-70'inde görülür, Adenomatous Polyposis Coli (APC) tümör-suppressor genindeki inaktive edici, K-ras onkogenindeki aktive edici ve p53 tümör-suppressor genindeki inaktive edici mutasyonları içerir. İkinci yolak, sporadik KRK'lerin geri kalan % 15-20'sinde görülür, hatalı yanlış eşleşme tamir sistemini içerir. Bu tamir sisteminin kaybı genomik instabiliteye ve tümör-suppressor genlerinde (Bax gibi) fonksiyon kaybına ve onkogenlerde fonksiyon kazanılmasına (β -catenin'de olduğu gibi) yol açan yüksek sayıda mutasyonların birikmesine sebep olur (Douglas Hanahan and Weinberg 2011).

Kolit bağımlı kanser (Colitis-Associated Cancer (CAC)) ateşli bağırsak hastalığı (Inflammatory Bowel Disease (IBD)) ile ilgilidir. Tedavisi zor ve ölüm oranı yüksektir. Noninflamatuvar KRK ve CAC benzer kanser gelişim evrelerini içermektedir. IBD-bağımlı kanserin bir inflamasyon-displazi (dysplasia)- karsinoma sırasında gerçekleştiği düşünülmektedir. İnflamasyon kolon epitelindeki değişiklikler kaskadını, bu da epitel hücrelerinin apoptotik ve regeneratif aktivitelerini indüklemektedir (Terzić et al. 2010). NO ve nitrik oksit sentazlar, NF-kB, ROT ve RNT'ler, COXs, pro- ve antiinflamatuvar sitokinler, metaller; antioksidan enzimler, peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör ligandları, kinazlar, büyüme faktörleri ve tümör engelleyici proteinler, p53 ve retinoblastoma (pRb)'nin hepsi kronik inflamasyon ve kanserin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel hedeflerdir (Hofseth 2008).

Kolon kanseri vakalarının görülme yoğunluğu yaşa göre değişim göstermekte ve takribi olarak 2 milyon kişide bulunan bu kanser türünün 65 yaş ve üstünde yoğunlaştığı görülmektedir (Guessous et al. 2010). Kolon kanserine yakalanma riskinin yaşa bağlı artış göstermesine ek olarak, düzensiz yaşam biçimi ve yeme alışkanlıkları hastalığın gelişiminde etkilidir. Aşırı kilo, aşırı kırmızı ve işlenmiş et tüketimi, alkol tüketimi, yüksek yağ veya düşük lifli diyet hastalığa yakalanma riskini artıran faktörlerdendir (Lakritz et al. 2014). Beslenme yoluyla alınan probiyotiklerin bağırsakta ürettikleri sekonder metabolitlerin, örneğin organik asitler

ve peptitlerin, kolon kanseri riskini azaltmada etkili olduğu gözlenmektedir (Garagnani, Pirazzini, and Franceschi 2013).

Transkripsiyon faktörü NF- κ B bir dimerdir; altbirimlerin her kombinasyonu farklı genlerin düzenlemesinde yer alır. 5 alt birimi bulunur: p105/p50, p100/p52, RelA (p65), c-Rel ve RelB. Bunlar sitoplazmada öncü olarak veya özel inhibitörler, KB inhibitor proteinleri (I κ B), ile inaktif halde bulunurlar (Terzić et al. 2010). Tümör gelişimine yardımcı olan sitokinlerin çoğu NF- κ B transkripsiyon faktörleri aracılığıyla aktif hale getirilir veya öncü kanser hücrelerde ve immün/inflamatuvar hücrelerinde NF- κ B sinyalleşmesini aktif hale getirir. NF- κ B ‘nin kolorektal ve kolitis-bağımlı tümörögenezde belirgin bir rolü vardır. Kolorektal ve kolitisbağımlı tümörlerin % 50’sinden fazlasında tipik olmayan NF- κ B aktivasyonu belirlenmiştir. NF- κ B ‘nin aktivasyonu, hücre proliferasyonu ve angiogenez ile, hücre ölümünün engellenmesiyle, ve hücre invazyonu ve metastazının promot edilmesiyle tümörögenezi destekleyebilir. NF- κ B’nin antiapoptotik aktivitesi diğer genler paralelinde Bcl-2, Bcl-x_L, ve cFLIP’in aktivasyonu yoluyla düzenlenir. NF- κ B ‘leri aktiveleştirilmiş kanser hücreleri kemoterapötiklere ve iyonize radyasyona karşı dirençlidir. NF- κ B aktivitelerinin önlenmesi bu ajanlara karşı hücre duyarlılığını oldukça arttırır (Terzić et al. 2010).

1.3. *Lactobacillus* Suşları

Lactobacillus cinsi, bugüne kadar tanımlanan laktik asit bakteri cinsleri içerisinde bulunan en büyük grubu kapsamaktadır (Leroy et al. 2006). Laktobasiller çubuk ya da kokobasil şeklinde, Gram (+), hareketsiz, mikroaerofilik ya da anaerobik ve sporsuz bakterilerdir. Ayrıca bu mikroorganizmaların bazı aminoasitler ve vitaminler gibi farklı gelişme faktörlerine ihtiyaçları vardır. Doğada zengin karbonhidrat içeren ortamlarda bulunduğu için genellikle insan veya hayvan mukozal membranlarında, bitkisel materyallerde, gübrelerde, fermente olan ya da bozulan gıdalarda bulunmaktadır (De Roos and Katan 2000).

Lactobacillus suşlarının, enzimlerin antimikrobiyal etkisine, asitli ortama, yüksek oksidasyon redüksiyon potansiyeline ve düşük yüzey gerilimine diğer probiyotik bakterilere kıyasla daha dirençli olduklarından özellikle fermente süt ürünlerinde

tercih edildikleri de verilen bilgiler arasındadır. Araştırma dünyasının “Yiyeceklerin bir kısmında bulunan canlı mikroorganizmalar yeterli miktarda tüketildiği zaman, konak hücre için sağlık yardımı sunar” düşüncesini genellediği belirtilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu genellemeyi tartışmak için yapılan araştırmalara bir sınırlama getirmiş ve yaklaşımlara bir netlik kazandırmak istemiştir. Bunun için de WHO, probiyotiklerin gıdalarda olması gerektiğini ve faydalı mikroorganizmaların ve bioteröpatik ajanlar bulunmayan gıdaların kullanımını öngörmediğini belirtmiştir (Morelli and Capurso 2012).

Genellikle DNA’larında %50’den daha az guanin+sitozin (G+C) içeren laktobasillerin ribozomları ise 50S büyük ve 30S küçük olmak üzere iki alt üniteden oluşan 70S tipindedir. 50S’lik büyük alt birim, 5S rRNA ve 23S rRNA ile yaklaşık 35 çeşit protein içerirken, 30S’lik küçük alt birim ise 16S rRNA ve 25 farklı protein içerir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında genellikle 16S rRNA’nın nükleotid dizilimlerinden yararlanılmaktadır. 16S rRNA’da bulunan değişken olan bölgeler yakın akrabalıkları, sabit olan bölgeler ise uzak akrabalıkların tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen, Yanagida, and Shinohara 2005).

Kanser genetiği; genetik faktörler ile radyasyon, kimyasal karsinojenler ve diyet gibi çevresel etmenlerin kombinasyonu şeklinde tanımlanabilmektedir. Bundan dolayı kanser gelişiminde beslenmenin rolü özellikle sindirim sistemi kanserlerinde epidemiyolojik çalışmalar tarafından güçlü şekilde desteklenmektedir (Dasari et al. 2017). Yapılan bazı çalışmalar, *Lactobacillus* suşlarının çeşitli kanser hücre hatlarında anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkilerini göstermektedir (Fichera and Giese 1994). Çalışmalar aynı zamanda probiotik bakteri suşlarının hayvan modellerinde karaciğer, mesane ve göğüs tümörlerini potansiyel probiotik aktiviteleriyle inhibe ettiğini ortaya çıkarmaktadır. Örneğin *Lactobacillus reuteri* insanlarda ve hayvanlarda doğal olarak yaygın bulunan güçlü anti-inflamatuvar ve anti-proliferatif etkileri olan probiotik bir türü temsil etmektedir (Gui et al. 2015; Choi et al. 2006).

Orla-Jensen 1919 yılında temel fizyolojik özelliklerine dayanarak *Lactobacillus* cinsini, *Thermobakterium*, *Streptobakterium* ve *Betabakterium* olmak üzere 3 alt gruba ayırmıştır (ORLA-JENSEN 2007). Ayrıca laktobasillerin pentoz ve hekzozları

fermente edebilme gibi fermentatif özelliklerine ve hücre duvarındaki peptidoglikan tipine göre sınıflandırmaları da yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre:

a) Obligat homofermantatif laktobasiller: Sahip oldukları aldolaz enzimiyle Empden-Meyerhof Parnas (EMP) metabolik yolunu kullanarak heksozları sadece laktik asite fermente ederler. Bu organizmalar fosfoketolaz enzimine sahip olmadıklarından pentozları fermente edemezler. Örneğin; *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* vb.

b) Fakültatif heterofermantatif laktobasiller: İki tip enzime sahiptirler, pentoz ve heksozları fermente edebilirler. Heksozların neredeyse tamamı EMP metabolik yoluyla laktik asite dönüştürülür. Glikoz varlığında fosfoglikonat metabolik yolu enzimleri baskılanır. Bazı türler ise glikoz sınırlamasında laktik, asetik, formik asit ve CO₂ üretmektedir. Pentozları da fosfoketolaz yolunu kullanarak laktik ve asetik asite fermente ederler. Örneğin; *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sakei* vb.

c) Zorunlu heterofermantatif laktobasiller: Heksozları fosfoglikonat yolunu kullanarak eşit hacimlerde laktat, etanol, asetik asit ve CO₂ oluşturacak şekilde fermente ederler. Pentozları ise aynı yolu kullanarak laktik ve asetik asite fermente ederler. Örneğin; *L. bifementas*, *L. brevis* ve *L. fermentum* vb. In vitro şartlarda optimum üreme sıcaklıkları 37°C'dir ve üremek için protein yönünden zenginleştirilmiş ortamlara ihtiyaç duyarlar. En iyi üreme ortamlarından biri olan Rogosa agarda 35-37°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucunda gelişme gösterirler. Rogosa agar üzerinde beyaz, düzgün kenarlı, yaklaşık 1 mm çapında yuvarlak ve beyaz koloniler oluşturarak ürerler. Laktobasiller genellikle zengin karbonhidrat içeren ortamlarda gelişirler. Glikozu karbon kaynağı olarak kullanan laktobasiller ya homofermantatif (%85'ten fazla laktik asit üreten) ya da heterofermantatifler (eşit oranlarda laktik asit, karbondioksit ve etanol ve/veya asetik asit üreten). Glukozdan gaz üretemeyen laktobasiller, fruktoz, galaktoz, glukoz, maltoz, mannoz, riboz, trehaloz ve sükrozdan asit üretebilirler. Bu mikroorganizmalar fermentasyon sürecinde laktik asit üreterek ortamın pH'sını 3,2-3,5'e kadar düşürmeleri nedeniyle aside dayanıklıdır (Gursoy and Kinik 2010; Gürsoy, Kınık, and Gönen 2005).

Bazı probiotik bakteriler fermentasyon ile özellikle propionat ve asetat olmak üzere bazı KZYA'ni üretirler ve bunlar apoptoz aracılığıyla insan kolon kanser hücrelerini öldürebilirler. Bu süreç bakteri kültürü supernatantında bulunan ya da saf KZYA'nin reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve lipid peroksidasyonu (LPO) artırması, sonrasında mitokondrial trans-membran potansiyelini düşürmesi ve buna bağlı olarak anti-apoptotik Bcl-2 aktivitesini değiştirmesi, kaspaz-3 aktivitesini artırması ve çekirdekdeki kromatin stabilitesinin bozulmasını indüklemesiyle gerçekleşmektedir (Hu et al. 2015)(Khan and Kang 2017). Ayrıca, KZYA'nden biri olan butiratın, kolon kanser hücrelerinde apoptoza yol açarken normal hücrelerde bu durumu gerçekleştirmediği önceki çalışmalarda gösterilmektedir (Hague, Butt, and Paraskeva 1996).

Laktobasiller düşük pH değerlerinde ve geniş bir sıcaklık aralığında gelişebildikleri için gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilirler. Birçok araştırma, laktik kültür içeren süt ürünlerinin kolesterol düşürücü etkileri olduğunu gösterilmiştir. Vücuttaki safra tuzlarının emilmesi, bazı laktobasillerin safra tuzlarını parçalaması nedeniyle engellenmektedir. Buna bağlı olarak karaciğer safra tuzu üretimi için fazla miktarda serum kolesterolü kullanmakta ve dolayısıyla serumda kolesterol miktarı azalmaktadır (Vaughan and Oram 2003).

İntestinal sistemde koloni oluşturan laktik asit bakterileri, gıdalarla alınan kanserojen maddelerin inaktivasyonunu sağlarken bu maddelerin yayılmasını engeller. Ayrıca nitrozaminlerin ve safra streollerinin kanser etmeni maddelere dönüşmesinin engellenmesinde de etkin rol oynamaktadır. *Lactobacillus acidophilus* içeren fermente gıdalar tüketildiğinde, *L. acidophilus*'un tümör başlatıcıları ve prekarsenojenlerin üretimine katılan koliformlar gibi bakterileri baskılayarak intestinal mikrofloranın olumlu yönde gelişmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (ÇATALOLUK 2003).

Probiyotikler, intestinal sistemin mikrobiyal dengesini düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan, canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır. Bunların içerisinde *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri en yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır. Laktik kültürlerin, özellikle *L. acidophilus* içeren süt ürünlerinin serum kolesterol düzeyini düşürücü ve fekal laktobasil sayısını arttırıcı

etkileri olduđu belirlenmiřtir (Rolfe 2000). Probiyotik bakterilerin serum kolesterolünü dűřürücü etkilerini açıklamaya yönelik deęiřik görűřler bulunmaktadır. En çok kabul gören görűř; probiyotiklerin safra tuzlarını serbest asitlere parçalayarak intestinal sistemden hızlı bir řekilde uzaklařtırıldıđını ileri sürmektedir. Serbest safra tuzları vücuttan atıldıđı için, kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezi, vücuttaki toplam kolesterol konsantrasyonunu dűřürebilmektedir (De Boever, Deplancke, and Verstraete 2000).

Bir bařka görűře göre ise, probiyotik laktik asit bakterileri asit üretimi sonucu pH'yı dűřürerek, dekonjuge safra tuzları ile kolesterolün presipitasyonuna neden olmasdır. *L. acidophilus* probiyotiđinin kolesterol dűřürücü rolü olduđu bildirilmiřtir. Ancak testikular fonksiyona etkisinin arařtırıldıđı bir çalıřmaya rastlanmamıřtır. Bu sebeple çalıřmada, yüksek kolesterol diyeti ile beslenen Sprague Dawley ırkı erkek ratlara tedavi amaçlı *L. acidophilus* probiyotiđinin verilmesinin testikular fonksiyonda önemli olan testosteron, FSH ve lűteinizan hormon (LH), ABP, faktör iliřkili apoptoz düzeyinin nasıl etkilendiđi ELISA test kitleri ile belirlenmesi amaçlanmıřtır.

Laktobasiller, yođurt, tereyađı, peynir gibi sűt ürünleri; sucuk gibi et ürünleri ve turřu gibi sebze ürünleri üretiminde starter kűltür olarak kullanılmaktadırlar. Laktobasillerin gıda fermentasyonlarında starter kűltür olarak kullanımında fermente gıdaların korunmasının yanında, aroma ve tekstür oluřumuna da katkıda bulunması amaçlanır. *Lactobacillus* türlerinin starter kűltür olarak kullanıldıđı endűstriler genelde ekmek, řarap, bira, peynir ve silaj gibi fermente gıdalardır (Hugenholtz and Kleerebezem 1999). Peynir endűstrisinde laktik asit bakterilerinin laktik asit, tat ve koku maddeleri üretmesi ayrıca tekstürel yapının oluřmasını sađladıđı için starter kűltür olarak kullanımları yaygındır. Laktik asit bakterilerinin yapıyı oluřturması ve tat-koku maddeleri üretmesi sahip oldukları enzimler vasıtasıyla karbonhidratları, proteinleri ve yađları hidrolize etmesi sonucu oluřmaktadır. Laktobasiller peynir üretiminde starter kűltür ya da ek kűltür (genellikle starter dıřı laktik asit bakterileri olarak adlandırılan ve fakűltatif heterofermentatif laktobasillerden oluřan kűltür) olarak kullanılabilir. Bu amaçla kullanılan en yaygın laktobasiller, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii subsp. lactis*'tir (Gursoy and Kinik 2010). Laktobasillerin bazı türlerinin otolizi sonucu

olgunlaştırmayı hızlandırması da özellikle peynir teknolojisinde kullanımlarını desteklemektedir.

Laktik asit gram pozitif bakterilerine ait olan *Lactobacilli*'nin anaerobik sporsuz ve genomik olmasının yanısıra DNA (Deoksiribonükleik asit)'sın da düşük GC (guanin-sitozin) içerdiği bildirilmiştir. İnsan sağlığına yararlı olduğu için *Lactobacillus acidophilus*'un (*L. acidophilus*), günlük fermante ürünler ve probiyotik destek ürünlerinin içeriğinde bir bileşik olarak pazarlara sunulduğu ifade edilmektedir. Aynı zaman da *Lactobacilli*'nin alerjik tedavilerde ve antibiyotik kaynaklı ishal vakalarının ve *Escherichia coli*'nin antagonisti olarak gastrointestinal enfeksiyonlar da önemle kullanıldığı bildirilmektedir. Bunların yanı sıra immün sistem düzenlenmesi ve kolesterol seviyesinin de kontrolünde katkısı olduğu belirtilmiştir (Patel et al. 2012).

Laktobasiller laktik asit, H_2O_2 ve bakteriosin üreterek patojen mikroorganizmaların üremesini inhibe etmektedir. Laktobasiller laktik asit üreterek pH'yı düşürmekte ve dolayısıyla gıdalardaki patojenler üzerine inhibitör etkiye bulunmaktadır. Laktobasillerin laktik asit dışında ürettikleri yağ asitleri ve bazı organik asitler de inhibitör etkisini artırmaktadır. Laktobasiller katalaz negatif olduklarından sitokrom oksidaz sistemini kullanamazlar ve buna bağlı olarak da H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye doğal olarak parçalayamazlar. Laktobasil türleri ürettikleri H_2O_2 'yi yaşadıkları mikroçevreye bırakırlar ve biriken H_2O_2 diğer bakteriler için toksik radikal özelliği gösterir. Ortamdaki diğer bakterilerin hücre duvar yapıları bozulur, üremeleri durur ve laktobasillerin mikrofloradaki hakimiyetlerinin devamı sağlanır (Kandler, Stetter, and Köhl 2019). Bakteriyosin olarak adlandırılan polipeptidler gıda bozulmalarını ve hastalık yapıcı bakterilerin gelişimini engelleme özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde geniş kullanım alanına sahiptir. Ayrıca enfeksiyon tedavisinde insan ve hayvanlarda olumlu etki gösterdiğinden antibiyotiklere alternatif olarak düşünülmektedir. Laktobasillerin salgıladıkları bakteriyosin, lizozim, proteaz gibi kimyasallar, Gram (+) ve Gram (-) bakterileri inhibe etmektedir. Bu bakteriyosinler katyonik protein yapıları ve hücre geçirgenliğini bozabilen mekanik etkileriyle tanınmaktadır. Gram (+) bakterilerin Gram (-) bakterilerden farklı olarak bakteriyosine özgü olarak evrimleşebilmeleri ve ürettikleri bakteriyosinlerden etkilenmeleri sayesinde Gram (+) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin

daha etkin bir kullanıma sahip olduğu düşünülmektedir. Laktobasillerin bakteriosinler dışında ürettikleri antimikrobiyel peptitler gibi benzer özellikler taşıyan diğer maddelerin de fungusların yanı sıra pekçok Gram (+) ve Gram (-) bakterinin üremesini baskıladığı bildirilmiştir (Weiss, Schillinger, and Kandler 1983; Leroy et al. 2006).

Laktik asit bakterilerinin probiyotik etkisi iki farklı şekilde ortaya çıkar. Birincisi fermantasyon ile farklı miktarlarda laktik, asetik ve formik asit oluşturmaları; ikincisi ise vitaminlerin, bakteriyosinlerin ve yağ asitlerinin sentezinde görev yapmalarıdır (P. Bourlioux 2015; Pierre Bourlioux et al. 2003). Laktobasiller, laktik asit bakterileri içerisinde probiyotik potansiyelleri en fazla olan bakterilerdir. Bağırsak florasını düzenlemek ve enfeksiyonları önlemek amacıyla 1915 yılından beri laktobasiller kullanılmaktadır. Probiyotik olarak en çok kullanılan laktobasil türleri arasında; *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. plantarum* ve *L. fermentum* yer almaktadır (Gastrointestinal Microbiology 2016)(Ouwehand 2017).

Laktik asit suşları tarafından üretilen ekzopolisakkaritler, gıdaların tekstürüne ve reolojik özelliklerine olumlu etkileri bulunan maddelerdir. Ekzopolisakkaritler sineresisi önlemesi ve stabiliteyi koruması nedeniyle süt endüstrisinde açısından önemlidir. Akdeniz bölgesinden toplanan 40 farklı yoğurt örneğinden izole edilen laktik asit bakterileri tanımlanarak ekzopolisakkarit üretimleri belirlenmiştir. İzolatların çoğunluğunu oluşturan *L. bulgaricus* suşlarının önemli bir kısmında ekzopolisakkarit üretiminin olduğu gözlemlenmiştir (Demir and Başbülbul 2017). Ayrıca tarhana fermentasyonunda rol oynayan türlerden ekzopolisakkarit üretenler tanımlanmış ve bu suşların ürettikleri ekzopolisakkaritler karakterize edilmiştir. Çalışmada ekzopolisakkarit üretiminde inkübasyon sıcaklığının ve ortam pH'nın etkili olduğu ve ortamda sakkaroz ve maltoz varlığında üretimin anlamlı oranda arttığı belirlenmiştir. İzole edilen *Lactobacillus* türlerinden *L. plantarum*'un ekzopolisakkarit üreticisi olduğu ve üretilen ekzopolisakkaritlerin reolojik özellikleri nedeniyle teknolojik açıdan önemli olduğu bulunmuştur.

1.4. *Lactobacillus* Suşlarının Tanımlanması

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan geleneksel yöntemler morfojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakteristiklere dayanan fenotipik yöntemlerdir. Laktobasillerin geleneksel yöntemlerle tanımlanmasında ilk olarak bu bakterilerin bulundukları ortamdan izole edilerek saf kültürlerinin elde edilmesi gerekir. Saf kültürlerin öncelikle Gram reaksiyonu, mikroskopik morfolojisi ve katalaz aktivitesi belirlenmektedir. Gram pozitif, çubuk şekilli, katalaz negatif özellik gösteren isolatların cins seviyesinde tanımlanmaları için farklı fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanabilmektedir. *Lactobacillus* cinsi laktik asit bakterilerinin % GC içerikleri düşük (% 33- 55) ve genom büyüklükleri 1.8 Mb ile 3.3 Mb arasındaır.

Biyokimyasal ve fizyolojik testlerden glukozdan gaz oluşturma, fermentasyon son ürünü, karbonhidrat metabolizması, arjininden amonyak üretimi, büyüme sıcaklığı aralığı (10- 60°C), pH değerleri ve farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testleri sıklıkla başvurulanan yöntemlerdir (Holzapfel and Schillinger 2002). Uzun yıllardan beri laktik asit bakterilerinin taksonomisi belirlenirken fenotipik özellikleri dikkate alınmış olsa da gelişen moleküler tiplendirme yöntemleri yapılan bu alt gruplandırmanın uygun olmadığını göstermiştir.

Geleneksel yöntemler zaman alıcı, zahmetli ve tecrübe gerektiren yöntemlerdir. Bu yöntemlerin bu tür dezavantajlarını elimine etmek amacıyla hazır test kitleri geliştirilmiştir. Buna örnek olarak bazı substratları fermente etme veya asimile etme özelliklerine dayanan Analytical Profile Index (API) (BioMerieux, France) sistemi verilebilir. Ticari API test kitleri özellikle gıda endüstrisinde *Lactobacillus* türlerinin tanısında yaygın olarak kullanılan fenotipik yöntemlerden birisidir (Kunduhoglu et al. 2012; Elcioglu and Kunduhoglu 2014). Her mikroorganizmanın biyolojik enerji sağlamak için kullandığı karbonhidrat kaynakları farklılık göstermektedir. API testlerinde bu özellik karakterizasyon amacıyla kullanılmaktadır. Bu nedenle tanımlama sisteminde farklı mikroorganizmalar için farklı prosedürler (örneğin API 20 NE, API Staph, API 50 CH) uygulanır.

Laktik asit bakterilerinin özellikle laktobasillerin tanımlanmasında kullanılan API 50 CH sistemi standartlaştırılmış bir sistemdir ve 49 biyokimyasal testi içermektedir. Bu

testler laktik asit bakterilerinin karbonhidrat metabolizmalarını ve metabolik ürünlerini inceleyerek tanımlama yapmaktadır. API 50 CHL besiyeri kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon testlerinde ise, sonuçlar inkübasyondan sonra oluşan renk değişimine göre yorumlanır. Fermentasyon ile pH'ın değişmesi indikatör boyaların renginin değişmesine neden olur. Bu sistemlerin avantajı tekrarlanabilirliği, tanımlama süresini kısaltması ve birden fazla biyokimyasal testin bir arada yapılabilmesidir. Ancak en büyük dezavantajları ise, bilinmeyen bir bakterinin tanımlanmasında kullanıldıkları zaman yanlış sonuçlar verebilmeleridir (Elcioglu and Kunduhoglu 2014).

Geleneksel yöntemler birçok tanısal biyokimyasal testin sonuçlarının derin bir tecrübe ile değerlendirilmesini gerektiren karmaşık ve zaman alıcı yöntemlerdir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasını kolaylaştırmak için çok çeşitli yaklaşımlar denenmiştir. Bunlardan biyokimyasal karakteristiklere dayanarak tanımlama yapan kit sistemleri, her ne kadar bilgisayarla desteklenmiş ve otomatize edilmiş sistemler olsa da sıklıkla yanlış veya güvenilir olmayan sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca kitlerin tanımlama kapasitelerinin ve doğruluğunun da düşük olduğu ifade edilmiştir (Giraffa and Carminati 2007). Kütle spektrometresi (MS), çeşitli bileşiklerin kütle oranını analiz etmek için kullanılan analitik bir tekniktir. 1980'lerin başından beri kütle spektrometrisi, proteinlerin analizi ve karakterizasyonu için güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. Özellikle matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı (MALDI-TOF)-MS son yıllarda mikroorganizma tanımlamada yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. MALDI-TOF MS, mikroorganizmaların peptid profillerinin çıkarılması ve sistemin kütüphanesindeki bilinen mikroorganizmalara ait verilerle karşılaştırılarak tanımlama yapılması esasına dayanır (Marvin et al. 2001).

Yöntemin temeli, kısa lazer darbeleri ile kristalize örnek materyalin iyonlaşmasına dayanır. İyonlar hızlanır ve uçuş zamanı bir vakumlu uçuş tüpünde ölçülür. Küçük kütleye sahip olan iyonlar detektöre daha çabuk ulaşırlar. Analiz sonucunda mikroorganizmaya ait proteinlerin, detektöre çarpma zamanına bağlı olarak kütle spektrumu oluşturulur. Elde edilen yeni spektrum, veri tabanındaki mevcut spektrumlarla karşılaştırılarak tanımlanır. Yöntemsel olarak basit bir yaklaşım olarak

kabul edilen MALDI-TOF-MS, sarf malzemelerinin maliyetini ve tanımlama için harcanan süreyi büyük ölçüde azalttığı belirtilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması amacıyla kullanılan geleneksel yöntemler ve ticari kitler zaman alıcı olduğu kadar aynı zamanda sıklıkla yanlış tanımlamalara neden olmaktadır. Bu durum bu bakterilerin tanımlanmasında daha güvenilir olan moleküler yöntemlere duyulan ilgiyi artırmıştır. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi (RFLP), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) analizi, mitokondriyal ve ribozomal DNA sekans (dizi) analizi, elektroforetik tiplendirme ve real-time PCR gibi moleküler yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Moleküler yöntemlerden özellikle polimer zincir reaksiyonunu (PCR) temel alan yöntemler, mikroorganizmaları tanımlamak ve tiplendirmek için kullanılan hızlı ve güvenilir yöntemler olarak dikkat çekmektedir. PCR yöntemi DNA üzerindeki hedef bölge veya bölgelerin uç kısımlarına bağlanan kısa oligonükleotidler (primerler) vasıtasıyla hedef bölgenin üstel olarak amplifikasyonunu sağlayan bir işlemdir. PCR tekniğinde, tekrar edilen sıcaklık döngüleri doğal replikasyon sürecini taklit ederek hedef DNA dizisinin in vitro şartlarda çok sayıda kopyası elde edilir (Temmerman, Huys, and Swings 2004).

Bir sıcaklık döngüsü denatürasyon, oligonükleotidlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır. Denatürasyon aşamasında ortalama 94-98°C'lerde DNA'nın çift sarmalının ayrılması (denatürasyon) sağlanır. Denatürasyon sıcaklığının optimum seviyeden yüksek olması DNA polimeraz enziminin aktivitesinin düşmesine neden olurken, optimum seviyeden düşük olması denatürasyonun tam olarak gerçekleşmemesine neden olmaktadır. Annealing aşamasında tek zincirli kalıp DNA'nın iki ucunda bulunan tamamlayıcı bölgelere primerler bağlanır. Bu aşamada sıcaklık, primerlere bağlı olmakla birlikte ortalama 37-65°C'dir. Uzama evresinde ise, DNA polimeraz enziminin aktivitesi ile DNA çift zincirinin tamamlanması ve uzaması sağlanır. Bu aşama Taq polimeraz (*Thermus aquaticus*'a ait DNA polimeraz) enziminin optimum aktivite gösterdiği 72°C'de gerçekleştirilir. Her bir sıcaklık döngüsünde kalıp DNA iki katına çıktığı için reaksiyon boyunca ürün miktarı üssel olarak artış göstermektedir. Reaksiyon sonunda PCR ürünleri molekül büyüklüklerine göre agaroz jel elektroforezinde

ayrılır ve oluşan bantlar ultraviyole ışık altında görüntülenir (Temmerman, Huys, and Swings 2004; Giraffa and Carminati 2007).

PCR tekniğiyle herhangi bir organizmaya ait hedef gen bölgesi çoğaltılıp yeterli oranda genetik materyal sağlandıktan sonra PCR ürünleri (amplikonlar) ikincil metotlar kullanılarak daha ileri derecede analiz edilebilmektedir (Wilding ve Kricka, 1996). Moleküler tanımlama yöntemlerinin çoğu PCR'a dayanan tekniklerdir. Laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemlerle karakterizasyonunda; vurgulu alan jel elektroforezi (PFGE), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA analizi (RAPD), restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizm (RFLP) analizi ve tekrarlayan ekstrasenik palindromik PCR (rep-PCR) analizi gibi fingerprint yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Vurgulu alan jel elektroforezi (PFGE), başlangıçta mayalar ve diğer ökaryotik organizmaların kromozom sayısının ve boyutunun analizi için kullanılmış olsa da zamanla etkili bir sınıflandırma metodu haline gelmiştir. PFGE yönteminin esası, DNA fragmentlerinin vurgulu elektriksel alanda boyutlarındaki farklılığa bağlı olarak göç etmesine dayanmaktadır (Giraffa and Carminati 2007).

PCR ürünlerinin restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm analizi (PCR-RFLP) oldukça sık kullanılan DNA'ya dayalı yöntemlerden biridir. DNA dizisindeki farklılıklar, DNA'yı spesifik bölgelerden kesen restriksiyon endonükleazlar kullanılarak analiz edilmektedir. Elde edilen farklı boyutlardaki fragmentler agaroz jel elektroforezi kullanılarak ultraviyole ışık altında görüntülenir. PCR-RFLP tekniğinin tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, hızlı ve ucuz olması yöntemin avantajları arasındadır. Ancak restriksiyon endonükleaz aktivitesiyle DNA üzerinde çok fazla sayıda kesim yapılması elde edilen fazla sayıdaki fragmentlerin değerlendirilmesinde karmaşık sonuçlar elde edilmesine neden olmaktadır (Chen, Yanagida, and Shinohara 2005).

PCR-RAPD analizi, günümüzde yaygın olarak kullanılan fingerprint yöntemlerinden birisidir. Mikroorganizmaların türe spesifik fingerprintlerini oluşturmak amacıyla rastgele dizayn edilmiş yaklaşık 10 bazlık kısa primerler kullanılır. Primerler, PCR sonucunda farklı DNA bölgelerini amplifiye ederek farklı boyutlarda fragmentler meydana getirirler. Elde edilen fragmentler, elektroforez jeli üzerinde boyutlarındaki farklılıklara bağlı olarak farklı hızlarda hareket eder ve türe özgü fingerprintleri

oluştururlar. Bu yöntem, fingerprintleri elde edilecek türlerin DNA dizisi hakkında ön bilgiye ihtiyaç duyulmaması nedeniyle avantajlı bulunsa da, tekrarlanabilirliğinin düşük olması en büyük dezavantajıdır (Comi et al. 2005).

PCR'a dayalı başka bir fingerprint yöntemi ise rep-PCR'dır. rep-PCR tekniğinde genom üzerinde tekrarlayan diziler özel oligonükleotid primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmaktadır. PCR sonrası elde edilen farklı boyutlardaki fragmentler, elektroforez jelindeki yürüme karakteristiklerine göre türe spesifik fingerprintler meydana getirmektedir (Danilovič et al. 2011).

Günümüzde bakterilerin tanımlanmasında kullanılan en güvenilir yöntemin, 16S rDNA ve 23S rDNA genleri ile 16S rDNA-23S rDNA genleri arası bölgenin dizi analizi olduğu kabul edilmektedir. Söz konusu DNA bölgeleri universal primelerle amplifiye edildikten sonra nükleotid dizisi belirlenmekte ve <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/web> sitesi kullanılarak BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) ya da RDP II (Ribozomal Database Project) gibi veri tabanlarındaki 16S ribozomal DNA dizileri ile karşılaştırılmaktadır. Analiz sonucunda sorgulanan dizilerin benzerlik yüzdeleri incelenerek bakteriyel izolatların cins, tür hatta alt-tür seviyesinde tanımlanması yapılmaktadır. Ancak son yıllarda yalnızca bir bölgenin dizi analizinin yakın ilişkili türlerin tanımlanmasında yeterli olmadığı, güvenilir bir tanımlama için birden fazla bölgenin analiz edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Altschul et al. 1990).

Bakteriyel tanımlamada türe spesifik primerler kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforetik analizi oldukça sık kullanılan yöntemlerdendir. Bu amaçla klasik PCR'ın dışında son yıllarda real-time PCR yöntemi de kullanılmaktadır. "Real-time PCR", PCR yönteminde sıcaklık döngülerini sağlayan cihazların (thermocyclers), hassas deteksiyon sistemleriyle birleştirilmesi sonucu geliştirilmiş bir yöntemdir. Real-time PCR'da ürünlerin analizi eş zamanlı olarak yapılmakta, klasik PCR'da gerekli olan agaroz jel elektroforezi ve oluşan bantların ultraviyole ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlere ihtiyaç kalmamaktadır. Real-time PCR'da reaksiyon sırasında gerçekleşen her amplifikasyon döngüsünde her bir örnek için floresans sinyaller ölçülerek sayısal değerlere dönüştürülmektedir. Bu amaçla diziye özgün olmayan floresans boyalar

veya diziye özgün problemler gibi PCR ürünlerinin tespitinde farklı yöntemler geliştirilmiştir.

1.5. *Lactobacillus* Suşlarının Etkileri

Lactobacillus suşları, çiğ süt ürünlerinde, bitkisel ürünlerde, anne sütünde ve diğer sıcak kanlı canlıların sindirim sisteminde yoğun olarak bulunmaktadır. *Lactobacillus* suşlarının, ürünlerin lezzetli olmasını sağlaması, yoğun miktarda laktik asidin üretilmesi, ürünlerin duyu özelliklerini iyileştirmesi gibi etkileri de bulunmaktadır. Ayrıca *Lactobacillus* suşlarının, kanser hastalıklarında tedavi sürecini hızlandırdığı, bazı kronik hastalıkların tedavisinde etkili olduğu, bağışıklık sistemini uyarması, kolesterolün seviyesini düşürmesi, patojen mikroorganizmaların gelişimini engellemek gibi çeşitli olumlu etkilerinin olduğu da belirlenmiştir.

Lactobacillus suşlarının rasyona katılmaları sonucunda insanlarda canlı ağırlık kazanımlarında artış görüldüğü, yemden yararlanmanın iyileştiği, üretimin yükseldiği ve gastrointestinal hastalıkların azaldığı bildirilmiştir. Buna rağmen etki şekilleri konusunda halen tam bir fikir birliği sağlanamamıştır. *Lactobacillus* suşları mikroorganizmalar *Escherichia coli* gibi bağırsak patojenleri için antagonistik etki oluştururlar. *Lactobacillus* suşları mikroorganizmaların çoğunluğu laktik, asetik ve formik asit gibi organik asitler üreterek bağırsak pH'sını düşürürler. Böylece Gram negatif patojen bakterilerin üremesini engelleyen bir ortam. Ayrıca bu mikroorganizmalar ürettikleri hidrojen peroksit, organik asit, bakteriyosin gibi maddeler sayesinde antibakteriyel özellik gösterirler (Ouwehand 2017).

Lactobacillus suşları, patojen bakterilerin çoğalmak için gereksinim duydukları besinleri tüketirler ve bu bakterilerin üremelerini inhibe ederler (kompetatif eksklüzyon). Probiyotik mikroorganizmalarda intestinal epitel hücrelere adezyonu sağlayan çeşitli yüzey determinantları bulunabilmektedir ve özellikle laktik asit bakterilerinin mikrobiyel adezyonu, pasif kuvvetler, elektrostatik ilişkiler, hidrofobik, sterik kuvvetlerle ve lipoteikoik asit, lektinlerle kaplı özgün yapılarla ilişkilidir (Servin and Coconnier 2003). Bu yapılar sayesinde *Lactobacillus* suşlarının patojen mikroorganizmalara karşı intestinal sistemde bir bariyer oluşturduğu ve patojenlerin epitel hücrelerine bağlanmasını azalttığı da bildirilmiştir.

Lactobacillus suşlarının son yıllarda bildirilmiş olan önemli etkilerinden birisi de immun sistem üzerindeki immunmodülatör ve immunostimulan etkileridir. Probiyotikler intestinal epitel hücreleri, lökositler, B- ve T- lenfositleri ile immun sistemin diğer yardımcı hücrelerini etkileyebilmektedirler. *Lactobacillus* suşları bu immunmodülatör özelliklerini endotoksik lipopolisakkaritler, peptidoglikanlar ve lipoteikoik asitler sayesinde gerçekleştirmektedir. Lipoteikoik asitler ayrıca diğer antijenler için taşıyıcı rol de oynayabilmekte ve bu şekilde immun cevabı uyaracakları hedef dokulara bağlayabilmektedir. Probiyotik mikroorganizmalar proinflatuar sitokinlerin ve kemokinlerin gelişiminde anahtar rol oynamaktadır. Kanseri hastalığı üzerinde yapılan araştırmalarda özellikle beslenme tarzının önemli bir etken olduğu gösterilmiştir. *Lactobacillus* suşlarının antikarsinojenik etkisinin belirlenmesi için yapılan araştırmalarda probiyotik bakterileri içeren diyetlerin kanser riskini azaltabildiği bildirilmiştir. Araştırmalarda ayrıca, probiyotik bakterilerin bağırsak ve diğer organlarda mutajenik ve genotoksik etkileri engelleyebildiğini ve böylece antikarsinojenik etkileri olduğu ortaya konulmuştur (Hirayama and Rafter 2000; Thomas, Suzuki, and Zhao 2015).

1.6. Kolon Kanseri Tedavisinde *Lactobacillus* Suşları

Bağırsak ya da geleneksel fermente ürünlerden köken alan probiyotik bakterilerin seçilmesi *in vitro* ya da *in vivo* çalışmalara uygunluk açısından oldukça önemlidir. Çeşitli çalışmalar bazı probiyotik bakterilerin bazı KZYA'nin düzeylerini etkileme yeteneğini göstermiştir ancak bu probiyotik bakterilerin anti-kanser etkisinin KZYA'nin seviyelerine bağlı olarak değiştiği oldukça seyrek gösterilmiştir (Kailasapathy 2014).

Lactobacillus fermentum'un, anti-kanser etkileri daha önceki çalışmalarla karakterize edilen diğer bazı probiyotik bakterilere (*L. acidophilus* ve *L. rhamnosus*) kıyasla, kolon kanseri hücrelerine karşı daha yüksek oranda anti-proliferatif etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca ilginç bir şekilde, *L. fermentum*'un kolonun kanserli hücrelerine karşı inhibe edici olduğu ancak normal hücrelerine karşı zararlı etkilerinin olmadığı da ortaya konulmaktadır (Meenakshi 2015; Meenakshi Malhotra 2015; Kahouli et al. 2017; Kahouli and Handiri 2016). Bu etkiler, *L. fermentum*'un bazı KZYA'ni üretebilme kabiliyetine sahip olması açısından kuvvetle

ilişkilendirilmektedir. Bu bakterinin kolon kanseri tedavisinde alternatif bir biyoterapötik olarak antioksidan ve anti-kanser bileşikler ürettiği gösterilmektedir.

Bağırsaktaki bakteriyel fermantasyon ile üretilen bazı KZYA'nın anti-inflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmektedir. Ma ve ark. (2004) çalışmalarında *L. reuteri*'nin insan bağırsak epitel hücrelerinde sinyal nükleer faktör-kB (NF-κB) nükleer translokasyon inhibisyonu yoluyla anti-inflamatuvar etkilere aracılık ettiğini göstermektedir (Ma, Forsythe, and Bienenstock 2004).

L. reuteri bakteri türünün kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını önleyecek KZYA'ni üretip üretemeyeceğini denemek amacıyla, beş farklı *L. reuteri* hattını normal hücre hattı besiyerinde yetiştirmiş ve kolon kanseri hücrelerine bu besiyerlerini uygulamışlardır. Bu çalışmayla KZYA'nın probiyotik *L. reuteri* tarafından üretilmesi potansiyeli değerlendirilirken aynı zamanda anti-proliferatif etkileri in vitro olarak karşılaştırılmaktadır. Elde ettikleri bulgulara göre *L. reuteri*'nin KZYA'nın üretimi ile bağlantılı olarak kolon kanseri hücresi büyümesini inhibe etmede önemli bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Böylece *L. reuteri*'nin anti-kanser ve anti-kanserojenik bileşikler üretme kabiliyetinin varlığı ile kolon kanserinde potansiyel biyoterapötik etkisinin olduğu ileri sürülmektedir (Meenakshi 2015):

Kanserli hücrelerin apoptoz sürecinde kolonda gerçekleşen fermantasyon ürünü olan butirat ile indüklenmesi, kolorektal kansere karşı korunmada önemli bir mekanizma olarak düşünülmektedir. Butiratın önemli bir etkisi histon deasetilazı (kromatin gevşemesini engeller ve epigenetik olarak apoptotik gen ekspresyonunu baskılanmasına yol açar) inhibe etmektir, butirat bu enzimi inhibe ederek spesifik hücre ölüm genlerinin baskıdan kurtulması ile apoptozu indükleyebilir (Dasari et al. 2017; Choi et al. 2006). Dahası KZYA'nden olan butiratın kolon kanseri hücrelerinde apoptozu yol açarken normal hücrelerde apoptozu baskılayarak bu durumu gerçekleştirmediği de önceki çalışmalarda gösterilmektedir (Hague, Butt, and Paraskeva 1996).

Kolon kanseri için alternatif biyoterapötik potansiyeli olduğu düşünülen *Propionibacterium pentosaceus*, *Lactobacillus salivarius* gibi insan kaynaklı

probiyotik bakteriler ile yapılan çalışmada kanserli hücrelerin inhibisyonu sergilenmektedir. Kolon kanseri hücrelerinin proliferatif inhibisyon mekanizmalarında probiyotik bakterilerin doğrudan kolon kanseri hücrelerine yapışabilecekleri veya ürettikleri bazı KZYA'ndan özellikle bütirik ve propiyonik asitlerin sinerjetik şekilde etki göstererek anti-kanser özelliğini tetikleyebileceğini ileri sürmektedir (Thirabunyanon and Hongwittayakorn 2013).

Propionibacterium cinsine ait fermantasyon ürünlerinden bazı KZYA'nın insan kolon kanseri hücre hatlarındaki ROS üretimini arttırdığı araştırmalarda tespit edilmiştir. Bu durumun gerçekleşmesinde bazı KZYA'nın indüklenmesine bağlı olarak mitokondrial membran geçirgenliğinde artış gözlenmiş ve bu artışın hücre içi ROS oluşumundaki çoğalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Dasari et al. 2017). ROS'un mitokondrial membran geçirgenliğine etkileri sonucunda anti-apoptotik Bcl-2 aktivitesini değiştirmesi, apoptotik kaspaz-3 aktivitesini artırması ve çekirdekteki kromatin stabilitesinin bozulmasını indüklemesiyle birlikte apoptoz sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir (Hu et al. 2015) (Hofmanová et al. 2014).

Lactobacillus'un, iki farklı deney modelinde yani meyve sineği ve fare bağırsaklarında, endojen ROS oluşumunun ve ROS'a bağlı hücre proliferasyonunun güçlü indükleyicisi olduğu gösterilmektedir. Buna ek olarak, *Lactobacillus* kaynaklı ROS üretiminin ve hücre proliferasyonunun bağırsak epitel hücrelerinde fonksiyonel olarak işlevi bulunan Nox1 (NADPH oksidaz 1) enzimine bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Mikroorganizma taşımayan hayvan modellerinde ROS üretimi gerçekleşmemekte ve bastırılmış epitel hücrelerin büyümesi bu durumla ilişkilendirilmektedir. Bu veriler sonucunda enterositlerde ROS üreten bir enzimin bakteri kaynaklı aktivasyonunun hücre proliferasyonunu etkilediği ileri sürülmektedir (R. D. Jones, Hancock, and Morice 2000; R. M. Jones et al. 2013).

Antikanser potansiyeline sahip olan *Lactobacillus plantarum* ile fermente edilmiş soya fasulyesi tohum pudrası hazırlayarak HCT116 kolon kanseri hücrelerini bu özüt ile inkübe etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda, özüt kolon kanseri hücrelerinde, morfolojik değişikliklere, doza bağımlı biçimde hücrelerin koloni oluşumunda azalmaya ve apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Hücrelerin ölümü sürecinde özütün DNA fragmentasyonuna, oksidatif hasara ve indirgenmiş mitokondriyal zar

potansiyeline neden olarak HCT116 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği ileri sürülmektedir (Khan and Kang 2017). Çalışmada, *L. plantarum* ile fermente edilmiş soya fasulyesi özütü pro-apoptotik Bax'ın aktivasyonuna ve anti-apoptotik Bcl-2'nin inhibisyonuna bunun sonrasında da zayıflamış mitokondriyal membran potansiyeliyle sitokrom-c'nin salınmasına neden olarak kaspaz aracılı hücre ölümüne neden olduğu gösterilmektedir. Bu çalışma, insan kolon kanserli HCT116 hücrelerinde *Lactobacillus plantarum* fermente soya fasulyesi tohumunun apoptotik rolünü ortaya koymaktadır.

Rat model organizmada 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile indüklenen kolon kanserinde probiyotik bakteri türü *Lactobacillus plantarum*'un antioksidan ve antikanser özellikleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada, kanserli ratların kolon ve plazmasında artmış LPO ürünleri, artmış antioksidan enzim aktiviteleri (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon-S transferaz) ve markör enzim (alkalin fosfataz ve asit fosfataz) aktiviteleri gözlemlenmiştir. Kolon kanseri başlangıcı ya da diğer evrelerinde *L. plantarum* ile beslenen ratlarda LPO, antioksidan enzim aktiviteleri ve markör enzimlerin, kolonda ve plazmada ölçülen değerlerin istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede değişim gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu değişimler, zamana bağlı olarak *L. plantarum* takviyesi ile normale dönüşmüştür. *L. plantarum* öncesi ve sonrası ratlarda ortalama tümör hacmi çapı ve toplam tümör sayısı istatistiksel olarak azalma göstermiştir. Ayrıca, histopatolojik incelemelerde, kontrol grubu ile tedavi edilen gruplar arasında belirgin farklar gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, *L. plantarum*'un, antioksidan bağımlı bir mekanizma yoluyla ratlarda DMH kaynaklı kolon kanseri oluşumunun gelişimini modüle edebildiğini göstermektedir (Satish Kumar et al. 2011). Apoptoza direnç gösteren kolon kanseri hücresinde (Caco-2) KZYA'ndan bütiratın, anti-tümör özellik gösteren bir madde olarak apoptozu indüklemesi test edilmektedir (Ruemmele et al. 2003). Bütirat, pro-apoptotik Bak protein ekspresyonunu artırırken anti-apoptotik Bcl-x_L protein ekspresyonunu düşürmektedir. Bunun sonucunda mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c'nin salınması ile prokaspaz-9, -3 ve -1'in sırasıyla aktive olup aktif kaspaz kaskadlarının oluşması süreci gerçekleşmektedir (Ruemmele et al. 2003). KZYA'ndan olan bütiratın intrinsik apoptoz yolağında anahtar enzimler olan kaspaz-3 ve kaspaz-1 aktivasyonu ile Caco-2 hücre hattında apoptozu indüklediği gösterilmektedir.

Bu tez kapsamında hedefimiz probiyotik bakterilerden elde edilen protein lizatlarının HCT116 doğal tip (dt) ve p53-/- hücrelerde hücre sağkalım ve ölümü, hücre çoğalması üzerine etkilerinin gösterilmesidir.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL

2.1.1. Bakteri Kùltürleri ve Besi Ortamları

Çalışmamızın amacı kolon kanserine yakalanma riskini azaltmada etkili olabilecek metabolik aktiviteye sahip mikroorganizmalar olarak laktik asit bakterileri: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis* ve *Lactobacillus reuteri* kullanılmıştır. Bu çalışmada belirlenen mikroorganizmalar Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden temin edilmiştir. *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* (Leichmann) (ATCC® 9649™) den elde edilmiştir. Ayrıca karışık kùltür olarak ifade edilen bakteriler probiyotik olarak Eczaneden satın alınan 7 farklı türün bir arada bulunduğu bir üründen çoğaltılmıştır. Laktik asit bakterileri Mann Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinde çoğaltılmıştır (EK D).

2.1.2. Kullanılan İnsan Kanser Hücreleri

İnsan kolon kanseri hücre dizileri HCT 116 (CCL - 247), American Type Culture Collection'dan (ATCC) satın alınmıştır. Kolon kanseri p53^{-/-} Dr. Bert Vogelstein'in (Johns Hopkins Kimmel Kanser Merkezi) üretimi ile elde edilmiştir. HCT 116 dt ve p53^{-/-} DMEM ortamında (PAN Biotech) büyütülmüştür.

2.1.2. Hücre Kùltürü Donanımları

Hücre kùltüründe kullanılan materyaller Ek B'de yer almaktadır.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Kullanılan cihazlar Ek A'de bulunmaktadır. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Ek C'de bulunmaktadır.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Bakteri Hücre Stoklarının Hazırlanması

Kullanılan bakteri hücreleri, genomuna, hücresel metabolik faaliyetlerine ve temel fizyolojik özelliklerine göre uygun olan MRS sıvı ve katı besiyerinde 37°C'de geliştirilmiştir. Bakteri stokları %20 oranında gliserol içeren besiyerinde -80° C'de saklanmıştır.

2.2.2. İnsan Kolon Kanseri Hücre Hatlarının Hazırlanması

İnsan kolon kanseri HCT116 dt (ATCC CCL-247) ve p53-/- (Bert Vogelstein Howard Hughes Medical Inst. Johns Hopkins Üniversitesi) kolon kanseri hücreleri %5 CO₂ içeren 37 ° C’de nemli atmosferde aseptik koşullar altında büyütülmüşlerdir. Besiyeri içerisinde % 10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sıgır serumu, standart DMEM, %1 esansiyel olmayan aminoasit eki, 2mM glutamin ve 100 u / mL penisilin / 100 µg / mL streptomisin ortamında hücreler kültüre alınmışlardır.

2.2.3. Bakteri Özleri / Fraksiyonları Hazırlık

MRS sıvı besiyerinde gece boyu 37°C’de kültüre edilen laktik asit bakterileri, yoğunluğu Tablo 1 de belirtildiği gibi geç log/erken sabit büyüme evresinde 10⁹ CFU/mL olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin OD600 deki optik yoğunlukları spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Tablo 2. 1. Gece boyu 37°C’de kültüre edilen laktik asit bakterilerinin OD600 optik yoğunluklarının gösterimi

Laktik Asit Bakteri Adı	OD600
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2.812
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	2.479
<i>Lactobacillus casei</i>	2.402
<i>Lactobacillus lactis</i>	2.507
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2.729
<i>Lactobacillus karışık</i>	2.728

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis* ve *Lactobacillus reuteri* bakterileri MRS sıvı besiyerinde gece boyu kültüre edildi ve hücre yoğunluğu 10⁹ CFU/ml’e ayarlandı. Bakteri kültürü iki kez santrifüjlenir (1700 g, 15 dakika, 4 °C) ve 0,22 µm’lik bir filtreden geçirildi. Isı-ölümlü sonike (HK-SON) fraksiyonu eldesi için bir gece boyunca üretilen bakteri kültürleri 100 °C’de 40 dakika ısıtıldı ve her 10 dakikada bir karıştırıldı. Isı ile öldürülmüş bakteri kültürleri daha sonra sonike edildi (10 tur, 1 dakika/round,% 70 genlik, 50W) ve ardından santrifüj edildi (13000 g, 40 dakika, 4 °C). Bakteri kültürlerinden elde edilen özütlerin protein konsantrasyonu, Bradford yöntemiyle belirlendi. 96 kuyucuklu petriye 1,5 µg/µl konsantrasyona sahip sıgır serum albumin (BSA) artan miktarlarda (1.5, 3, 4.5, 6 µg) kullanılarak standart bir eğri elde edildi.

Proteinler üzerine 200 µl Bradford solüsyonu eklenerek 5 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Mikroplaka okuyucuda 595nm’de elde edilen absorbans değerleri kullanılarak ve protein konsantrasyon değerleri hesaplandı.

2.2.4. Mikroskopik Yöntemler

2.2.4.1. Işık Mikroskobu

HCT 116 yabancı tip ve p53-/- hücresinin günlük durumu ve morfolojisi SOID XDS-1B ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

2.2.4.2. Floresan Mikroskobu

Propidyum İyodür (PI) Boyama

Hücre ölümünün değerlendirilmesi amacıyla Propidyum İyodür boyaması yapılır. Kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı. Ardından, bakteri özütlerinden elde edilen protein örneğinden 500 µg 48 saat boyunca hücrelere uygulandı. Her bir kuyucuğa 2 µl/ml PI (40 mg/ml) uygulanarak 30 dakika boyunca 37°C inkübe edildi. Floresan mikroskobunda ile ölü hücrelerin tayini gerçekleştirildi (Ex/Em: 577/590 nm, Olympus IX70).

3,3’ Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DiOC6) Boyama

Kolon kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bakteri özütlerinden elde edilen protein örneğinden 500 µg 48 saat boyunca hücrelere uygulandı. Her bir kuyucuğa 1 nM DiOC6 eklenerek 15 dakika 37°C inkübe edildi. Boyanan hücreler floresan mikroskobunda incelendi (Ex/Em: 488/ 525 nm, Olympus IX70).

2.2.5. Koloni Oluşturma Deneyi

Kolon kanseri hücreleri 3×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu petrilere ekildikten sonra, hücrelere bakteri protein özütü uygulaması 500 µg olacak şekilde yapıldı. 48 saat sonra medya atılıp, yerine yeni besiyeri konuldu. Hücreler yaklaşık 10 gün boyunca 37°C’ de % 5 CO₂ içeren hücre inkübatöründe inkübe edildi. Ardından koloni oluşturan hücreler Metanol/Aseton ile fiks edilir ve % 0,5 Kristal Viyole ile boyanır. Koloni sayımları gerçekleştirilir.

2.2.6. ELİZA testi

Bakteri fraksiyonlarından elde edilen proteinlerin, kolon kanseri hücrelerinde inflamasyon belirteci olan sinyal yollarına etkisinin belirlemek üzere PathScan İnflamasyon çok-hedefli sandviç ELİZA kit (CST) kullanıldı. Kolon kanseri hücreleri 1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı. 48 saat boyunca 500 µg/ml bakteriden elde edilen protein özütü uygulandı. Protokole uygun olarak, 1x hücre lizis tamponu ile protein izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen total protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi. Pathscan'ın mikrokuyucuklarına 200 µg olacak şekilde 1:1 oranda dilüsyon tamponu ile birleştirilerek dağıtıldı ve gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Ardından, mikrokuyucuklarda bulunan içerik atıldı ve kuyucuklar 200 µl yıkama tamponu ile 4 defa yıkandı. Yıkama işlemini takiben, 100 µl primer antikor (NF-κB p65, P-NF-κB p65 S536, p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)) ile 1 saat 37°C' de inkübe edildi. İnkübasyon işleminin ardından yıkama işlemi tekrarlandı. 100 µl HRP-bağlı sekonder antikor ile 30 dakika 37°C inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrar edildi. Antikorlar ile inkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra TMB tamponu ile 10 dakika 37°C'de inkübe edildi. STP solüsyonu her mikrokuyucuğa eklendi. Başlangıç rengi mavi iken, STOP solüsyonu eklenmesinin ardından renk değişimi sarı olarak gözlemlendi. ELİZA okuyucuda 450 nm'de okutularak renge bağlı değişimler saptandı. Buna bağlı olarak grafik oluşturuldu.

2.2.7 Yara iyileşmesi deneyi

Her kuyuya 100.000 hücre ektik, hücreler yapıştıktan sonra 100ul pipet ucuyla her kuyuda çizgi çizerek yara açtık, yara açma sonrası kalkan hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için kirli medyayı attık 1 mL 1xPBS ile yıkama yaptık sonrasında 1xPBS i de atıp 2 mL temiz medya koyup dozlarına göre ilaçlamaları yaptık. Sonrasında 0. saat 24. saat ve 48. saat çekimlerini yaparak açtığımız yaraların kapanma derecelerini inceledik.

2.2.8. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin arasındaki farklar deney sonuçlarının ortalaması alındıktan sonra standart sapma değeri ile sunuldu. Yapılan bakteri özütlerinden elde edilen protein uygulamasının, uygulanmamış olan kontrol örneklerine göre farklılıkları t-test uygulanarak gösterildi ve 0,05 anlamlılık seviyesine göre p değeri hesaplandı.

3. SONUÇLAR

3.1. Bakteri Karakteristiklerinin Tanımlanması

Bakterilerin karakteristik özellikleri Gram Boyama ile MRS besiyerinde büyütüldükten sonra kontrol edildi. Bu amaçla tüm hücrelere Gram Boyama protokolü uygulandı ve büyüme sıcaklıklarının kültür ortamında optimizasyonu gerçekleştirildi.

Tüm bakteriler Gram boyama sonuçlarına göre Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2. Işık Mikroskobu Hücre Morfolojisinin İzlenmesi

Laktik asit bakterilerinden elde edilen protein özütünün, kolon kanseri hücre büyümesine olan inhibe edici etkisi, ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Bakterilerden elde edilen protein lizatları (500 µg/ml) olacak şekilde 48 saat boyunca hücrelere uygulanmış ışık mikroskobunda genel olarak hücre morfolojileri incelenmiştir (Şekil 3.1). Bakteri protein lizatlarının maruz kalan HCT116 dt kolon kanseri hücrelerinde sırası ile *L. bulgaricus*, *L. casei*, ve *L. lactis* hücre sayısında/yoğunluğunda azalmaya neden olmuştur. Benzer şekilde *L. casei*, ve *L. lactis* HCT116 p53-/- hücrelerinde yoğunluğun azalmasına neden olmuştur.

3.3. DiOC6 ile Mitokondri Membran Potansiyelindeki Değişimin İzlenmesi

Benzer şekilde elde edilen protein lizatlarının kolon kanseri hücrelerine uygulanmasını takiben, hücrelerde mitokondri membran potansiyeli DiOC6 boyama ile tanımlanmıştır. Mitokondri membran potansiyelindeki değişimleri hücre yoğunluğunun azalması ile ilişkili olarak potansiyel hücre ölümü üzerindeki etkileri göstermesi planlanmıştır. Bu amaçla 48 saat boyunca bakteri protein lizatlarına (500 µg/ml) maruz bırakılan hücrelerde DiOC6 boyaması gerçekleştirilmiş ve örnekler floresan mikroskobunda incelenmiştir (Şekil 3.2.).

Hücre kolonilerine de bakılarak, yoğunluğun iyi dağılmamasına rağmen hücrelerde DiOC6 ile boyama oranının uygulama yapılmayan kontrole oranla önemli ölçüde azaldığı dikkati çekmektedir. Kontrole oranla yapılan nicel gözlemlerde, floresan boyama oranının p53-/- HCT116 kolon kanseri hücrelerinde tüm örneklerde azaldığı belirlenmiştir.

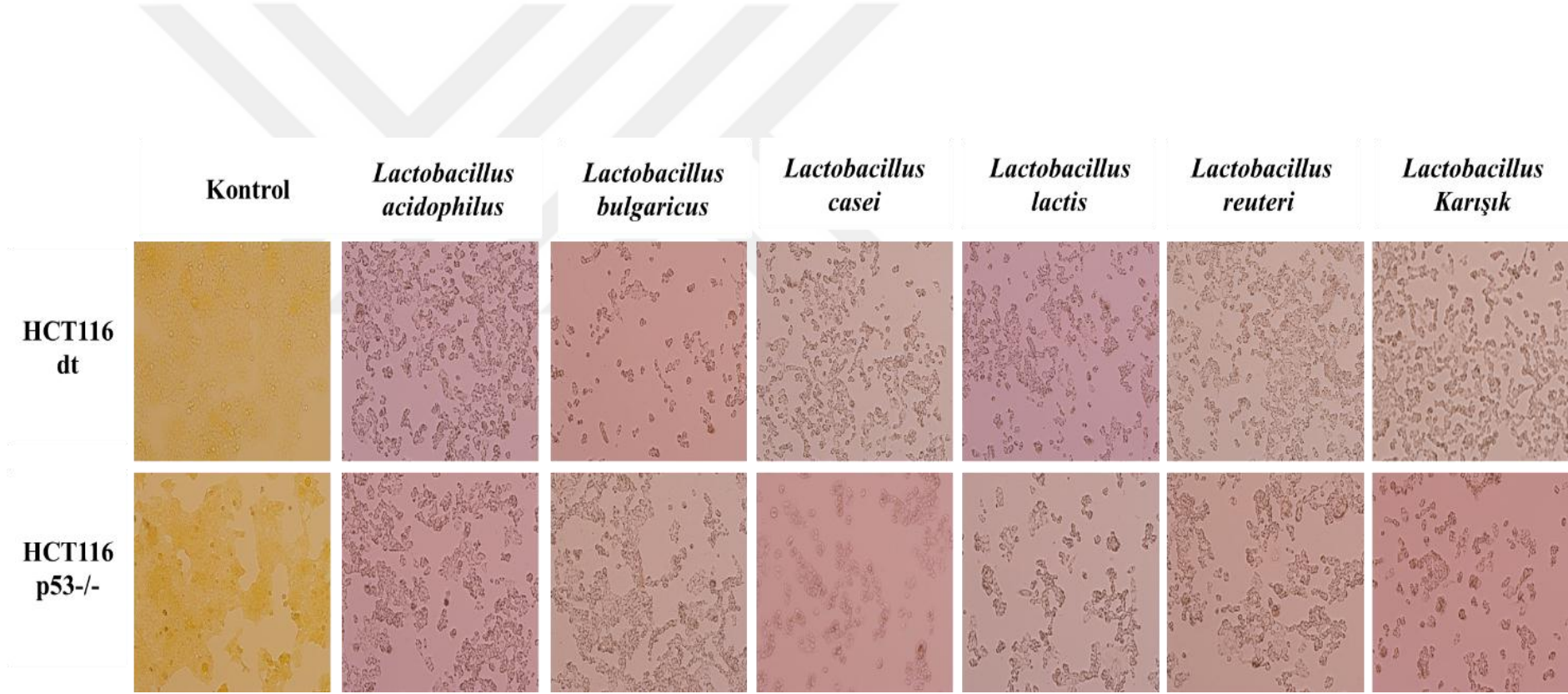
Bununla beraber ışık mikroskobu gözlemlerinden farklı olarak *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* ve *L. reuteri* uygulaması HCT116 dt kolon kanseri hücrelerinde DiOC6 boyama yoğunluğunda kontrole oranla azalmaya neden olmuştur.

Benzer şekilde HCT116 dt hücrelerde karışık probiyotik kültür olan ticari üründen elde edilen protein lizati etki göstermiş ve kontrole oranla DiOC6 boyama yoğunluğunda azalmaya neden olmuştur.

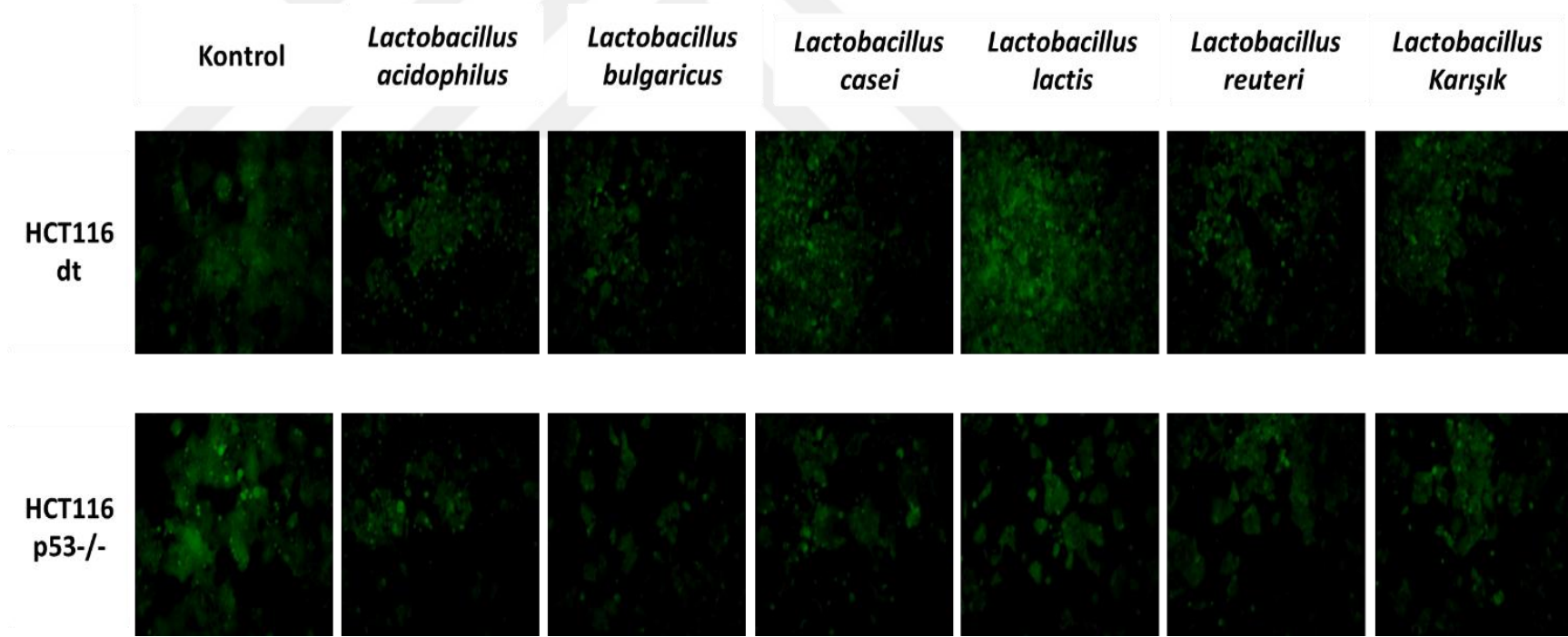
3.4. Propidyum İyodür ile Hücre Ölümünün Belirlenmesi

HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücre hatlarında bakteri protein lizatlarının hücre canlılığına ket vurma ve böylece hücre ölümüne neden olması potansiyeli propidyum iyodür (PI) boyama ile irdelenmiştir. Hücreler 48 saat boyunca daha önce gerçekleştirilen ışık mikroskobu, DiOC6 boyama deneyleri ile aynı yoğunlukta Petri kaplarına ekilmiş ve ardından PI boyaması gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).

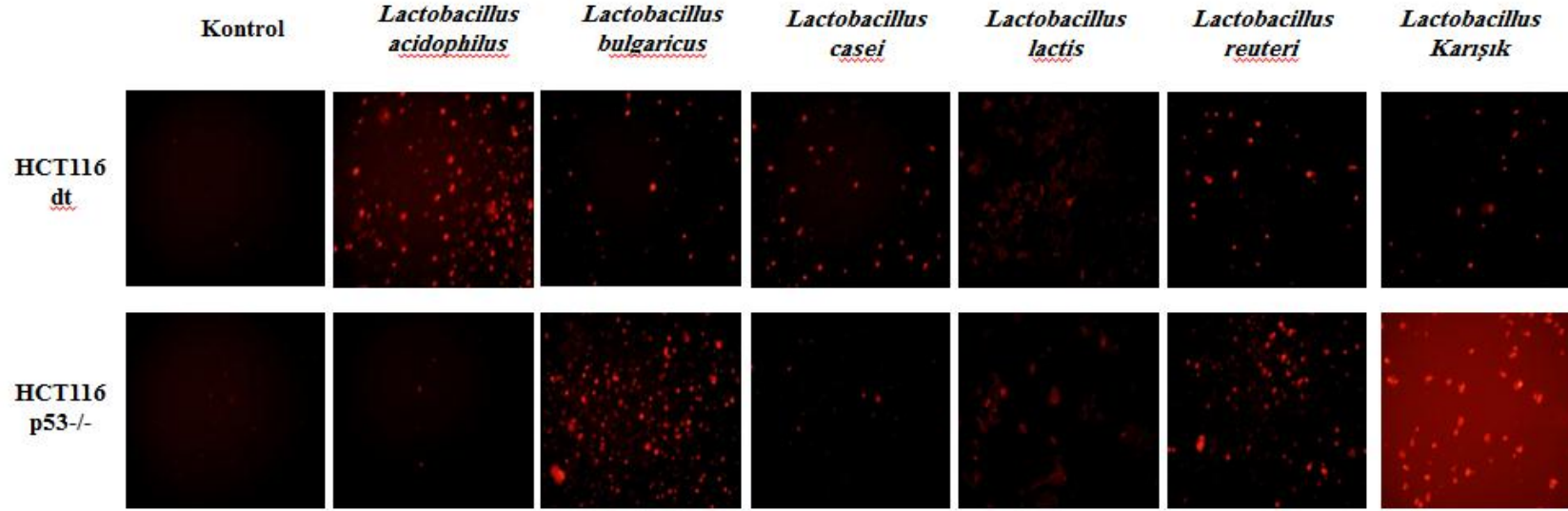
PI boyaması sonuçlarına göre her bir bakteri lizatına maruz bırakılan kolon kanseri hücresi uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılmıştır. DiOC6 boyama örneklerinde görülen sonuçlara benzer şekilde PI boyaması yoğunlukla HCT116 p53-/- kolon kanseri hücrelerinde gözlenmiş, ancak *L. acidophilus*'un etkisi sınırlı kalmıştır. HCT116 dt hücreler incelendiği zaman, en fazla hücre ölümü *L. acidophilus* uygulaması yapılan hücrelerde gözlenmiş, diğer uygulama örneklerinde ise kontrole oranla PI boyanan hücre sayısında artış gözlenmiştir.



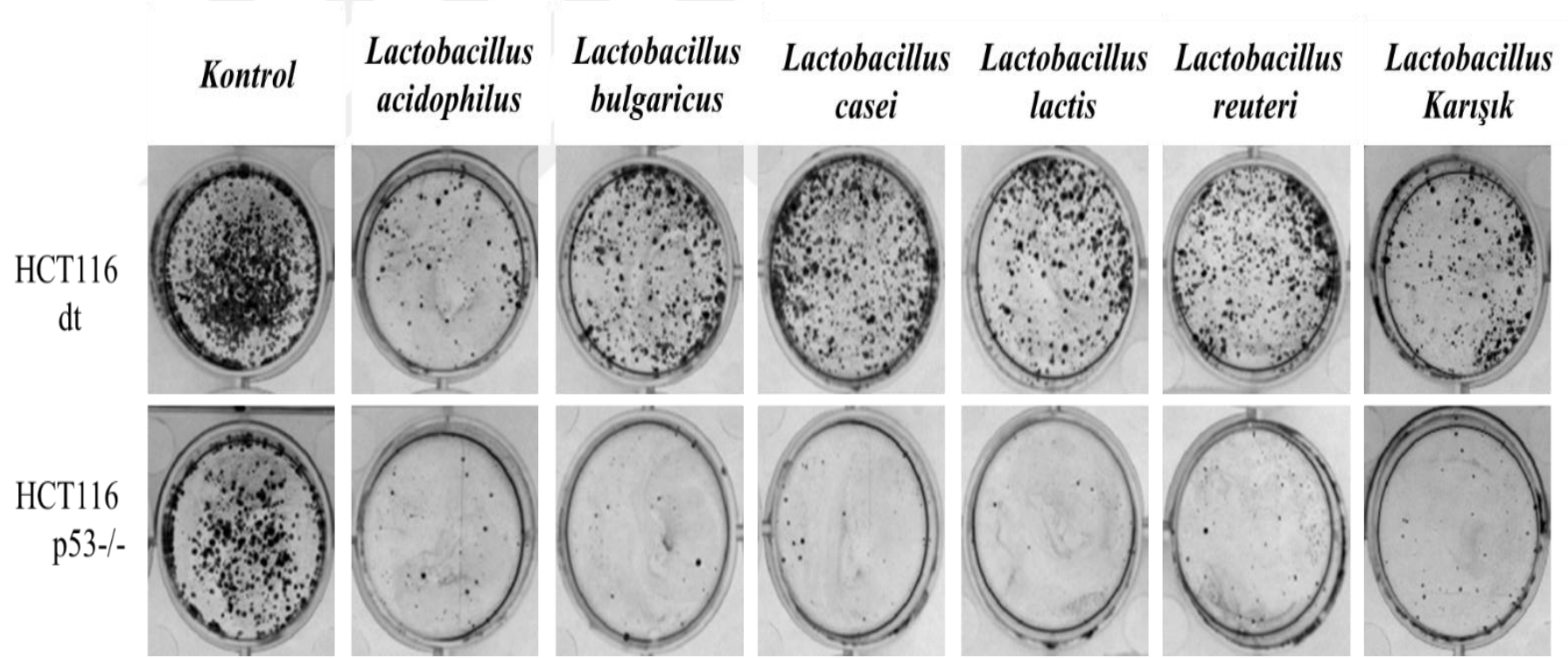
Şekil 3. 1. Hücre morfolojisinin HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 48 saat sonrasında gösterimi. 100x büyütme



Şekil 3. 2. Hücrelerde mitokondri membran potansiyelinin DiOC6 boyası ile HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 48 saat sonrasında gösterimi. 100x büyütme



Şekil 3. 3. Hücre ölümünün belirlenebilmesi amacı ile HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 48 saat sonrasında propidyum iyodür (PI) boyama sonuçları floresan mikroskop ile incelendi. 100x büyütme



Şekil 3. 4. HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli 48 saat boyunca hücreler bakteri protein lizatlarına maruz bırakıldıktan sonra yeni besiyerinde 7 gün boyunca takip edildi. Fikse edilen hücreler kristal viyole ile boyanarak koloni oluşturma potansiyelleri irdelendi.

3.5. Koloni Oluşturma Deneyi

Hücrelerin bakteri protein lizatları uygulanması sonucunda koloni oluşturma potansiyelleri koloni oluşturma deneyi ile test edilmiştir. Koloni oluşturma potansiyeli uygulama yapılmayan hücelere göre karşılaştırılmıştır (şekil 3.4). Önceki deney sonuçlarımız ile uyumlu olarak p53-/- HCT116 kolon kanseri hücelerinde tüm bakteri protein lizatları koloni formasyonuna kontrol hücelere oranla ket vurmuştur. Yine PI sonucu ile uyumlu olarak *L. acidophilus* koloni oluşturma potansiyeline en fazla ket vuran bakteri tipi olarak belirlenmiştir. HCT116 dt kolon kanseri hücelerinde tüm bakteri lizatları koloni çapına ket vurucu etki göstermekle birlikte, en az etki *L. casei* uygulaması sonrasında gösterilmiştir.

Ticari üründe görülen koloni formasyonundaki azalma karma kültürlerden elde edilen protein lizatlarının da bakterilerin tek başına etkisi kadar anlamlı düzeyde koloni formasyonuna ket vurucu etki gösterdiğine dikkati çekmiştir.

3.6. Enflamasyon ile Moleküler Hedeflerdeki Değişimleri Gösterilmesi

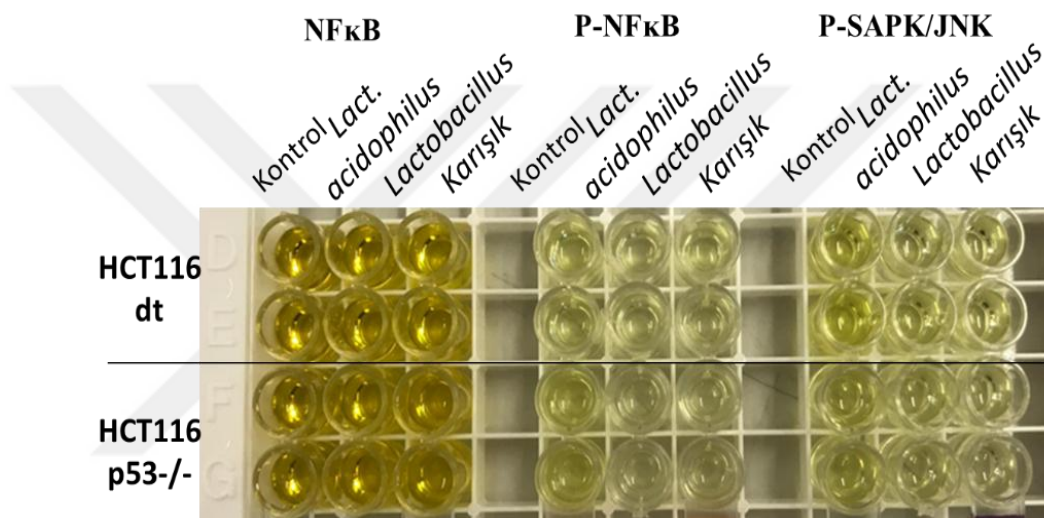
HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücelerinde bakteri protein lizatlarının etkilerinin moleküler düzeyde tanımlanmasına yönelik olarak PathScan Inflammation Sandviç ELİZA testi seçili bakteri grupları için gerçekleştirildi. Bu hedefler içinde hücre sağ kalımı ve ölümünde birçok sinyal yolağında etkili olan NF-B ve p-NF-B miktarları uygulama yapılmayan kontrole oranla ELİZA testi ile belirlenmiştir (şekil 3.5). Ayrıca hücelerde stres kararının tanımlanmasına yönelik olarak p-SAPK/JNK ile ilgili olarak ELİZA testinde veri eldesi gerçekleştirilmiştir.

Sandviç ELİZA testine göre NF-B miktarlarında artış görülmekle beraber, p-NF-B düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Ancak p-SAPK/JNK sonuçlarının hem *L. acidophilus* hem de karma kültürü temsilen kullanılan ticari probiyotik üründen elde edilen protein lizatları ile HCT116 dt hücelerinde azalıyor olması hücre stres kararının alınmasında bakteri lizatlarının enflamasyon ile ilgili süreçlerde etkili olabileceğini göstermektedir (şekil 3.6).

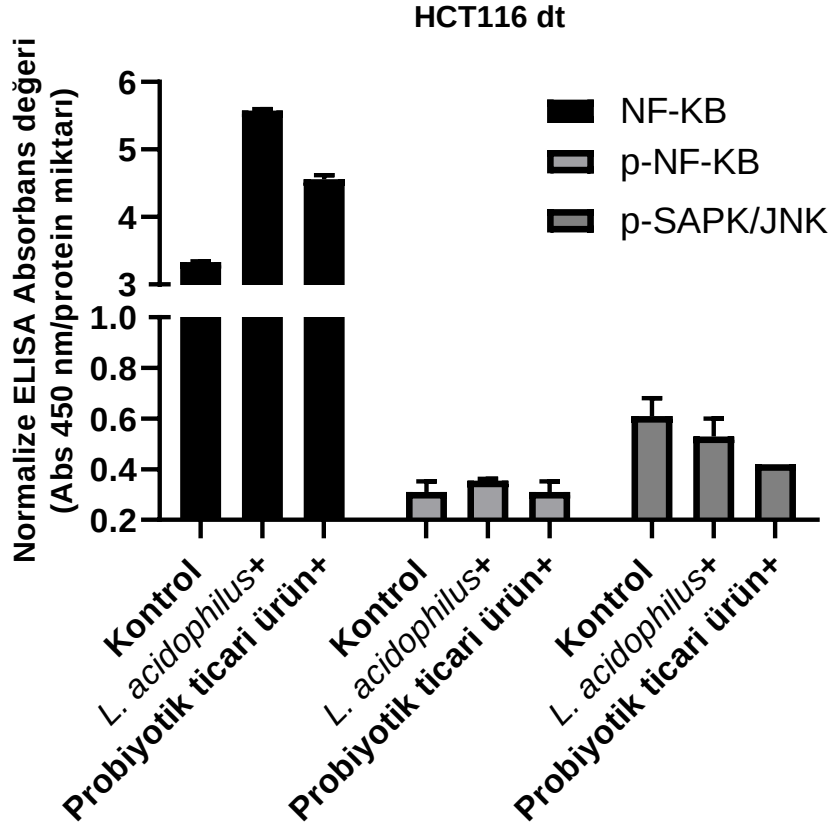
HCT116 p53-/- kolon kanseri hücelerinde özellikle probiyotik karma kültürden elde edilen NF-B miktarlarında kontrole oranla artış görülmekle birlikte *L. acidophilus*

bu hedefler üzerinde etkili olmamıştır. Bu sonuçlara uyumlu şekilde p-NF- κ B miktarında *L. acidophilus* uygulaması sonucunda azalma gözlenmiştir (Şekil 3.7).

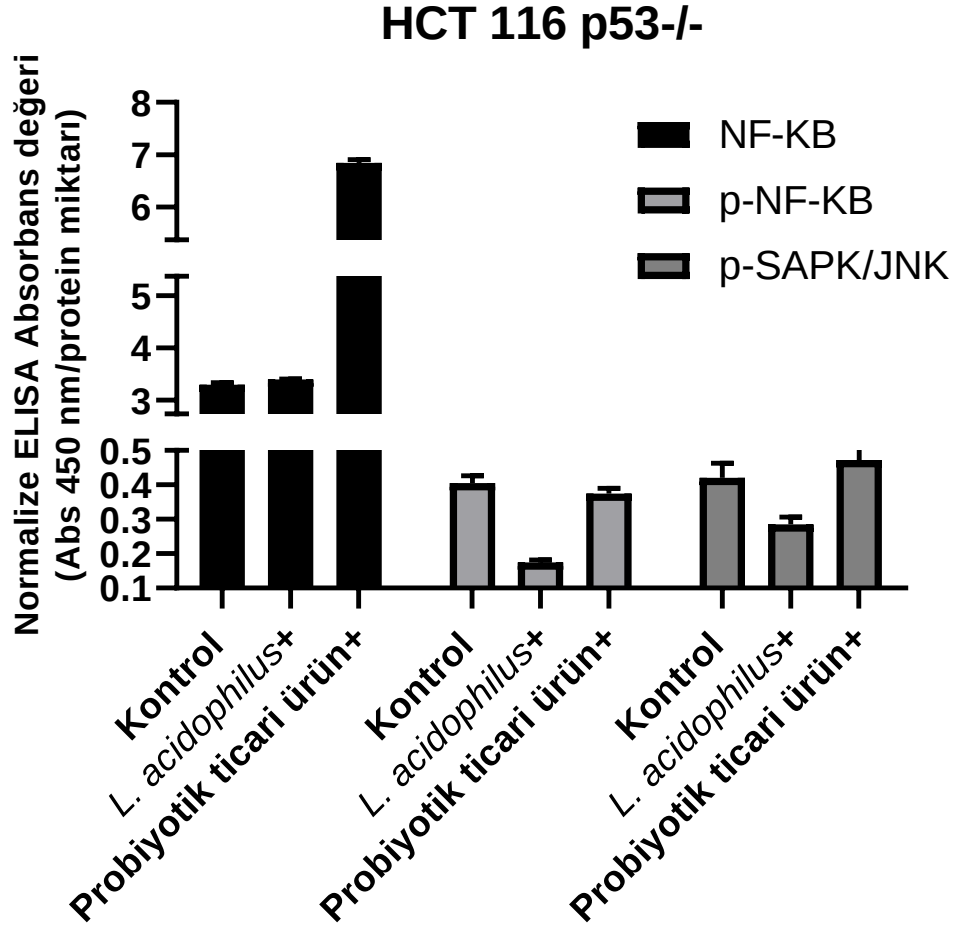
Benzer durum p-SAPK/JNK sonuçlarında da gözlenmiştir. Bu durumda hücrelerde karma kültür kontrole benzer bir etki göstermiştir. Dt ve p53-/- HCT116 kolon kanseri hücreleri arasında görülen bu farklı cevap mekanizması fonksiyonel p53'ün enflamasyon ile ilgili moleküler karar mekanizmasındaki önemini ortaya koymaktadır.



Şekil 3. 5. HCT116 dt ve p53-/- kolon kanseri hücrelerinin enflamasyon ile ilgili moleküler markırlara ilişkin kolorimetrik ELİZA sonuçları Abs 450 nm de okuması yapılmıştır.



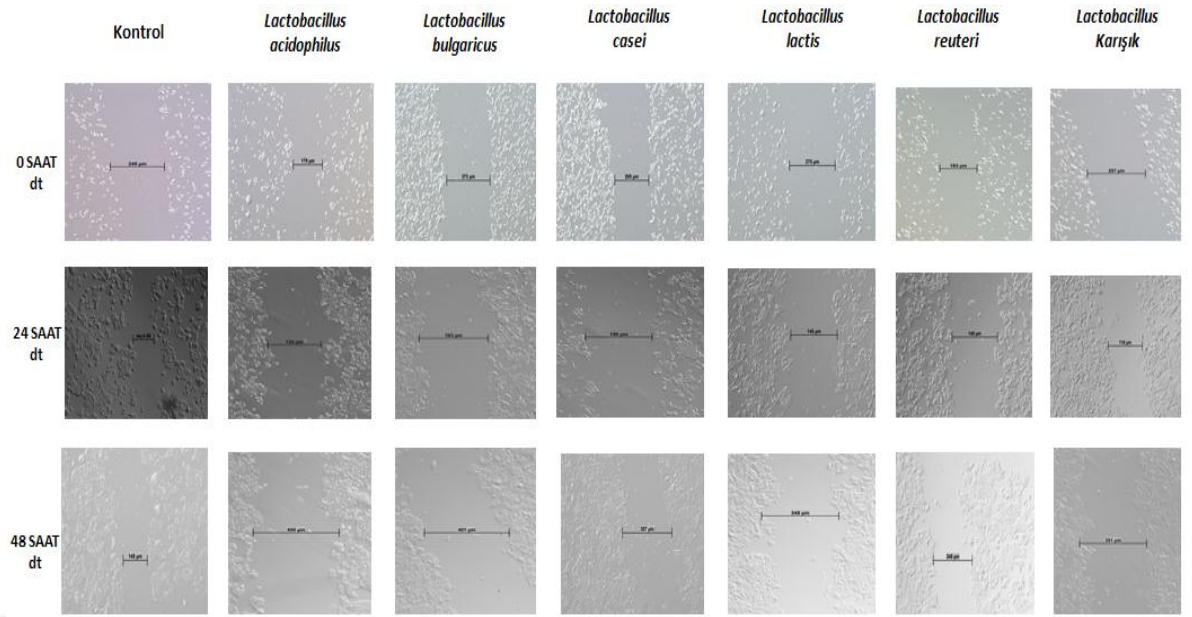
Şekil 3. 6. HCT116 dt kolon kanseri hücrelerinin enflamasyon ile ilgili moleküler markırlara ilişkin kolorimetrik ELİZA sonuçlarının protein miktarı ile normalize edilen verilerinin sunumu. Kolon grafikler 2 tekrarlı deney sonuçlarının Ort±Std.hata olarak yer almaktadır.



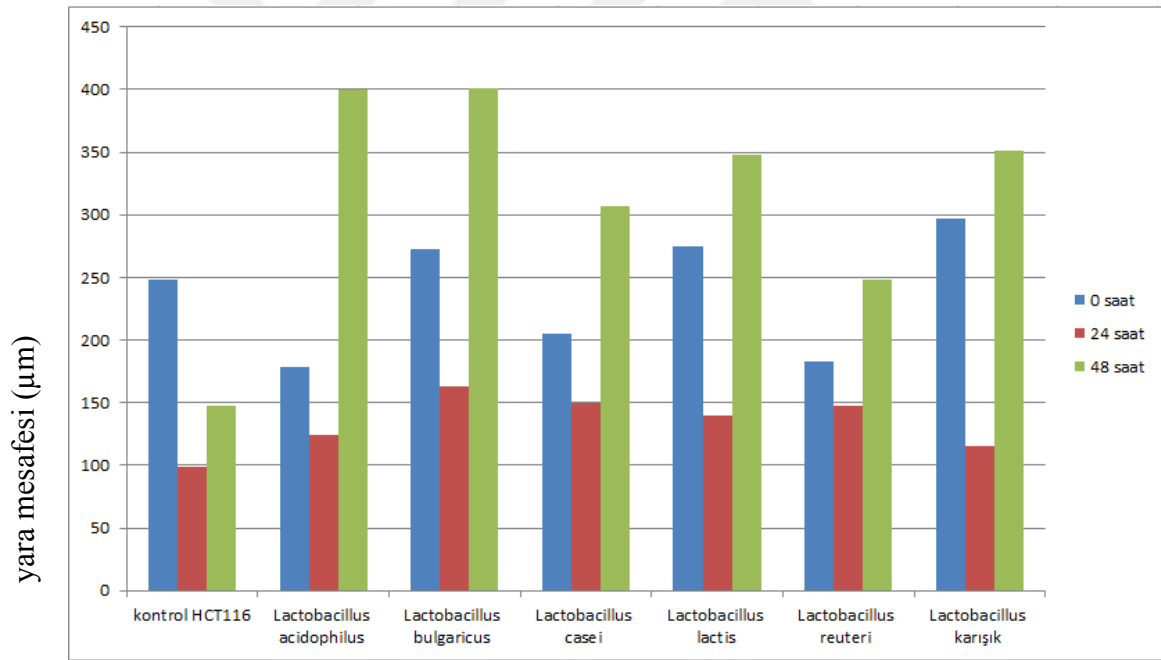
Şekil 3. 7. HCT116 p53-/- kolon kanseri hücrelerinin enflamasyon ile ilgili moleküler markırlara ilişkin kolorimetrik ELİZA sonuçlarının protein miktarı ile normalize edilen verilerinin sunumu. Kolon grafikler 2 tekrarlı deney sonuçlarının Ort±Std.hata olarak yer almaktadır.

3.7. Yara iyileşmesi deneyi

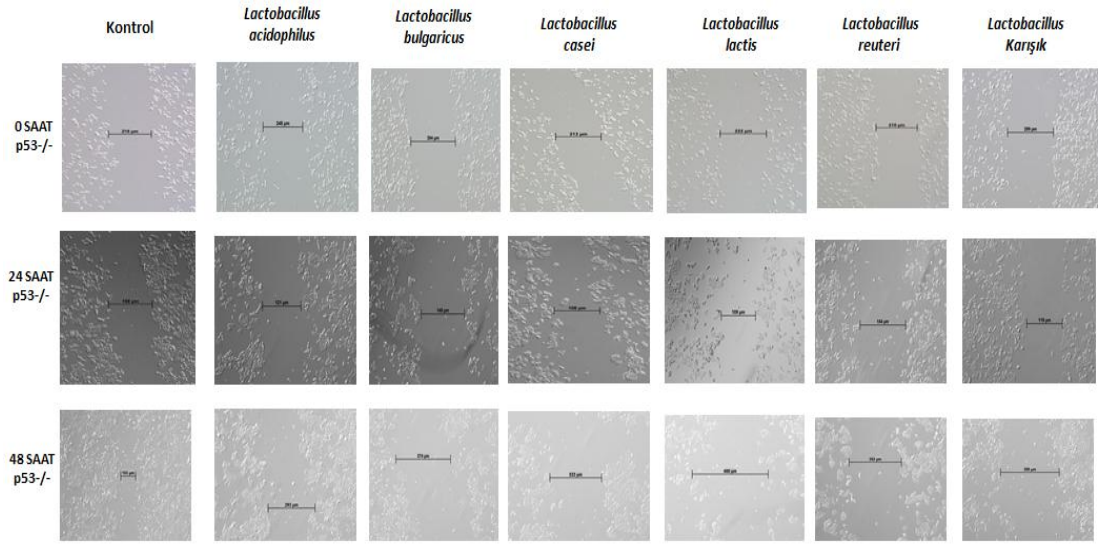
Yara iyileşme deneyleri ile test Hücreler wound healing assaye tabii tutulduklarında yaranın kenarında duran hücreler geçici Burada tedavinin etkinliğini görüyoruz Kontrol yoğunluğu eksikliğinden 24 saat sonra kontrole kıyasla Kontrolün daraldığını ve hücrelerin biriktiğini ve ölçümün azaldığını görüyoruz. Protein uygulama edilen diğer tüm hücreler daha açık ve daha az yoğun iken. Lactobacillus acidophilus ve Lactobacillus lactis Lactobacillus karışık Yara açılmasında artış görüyoruz .



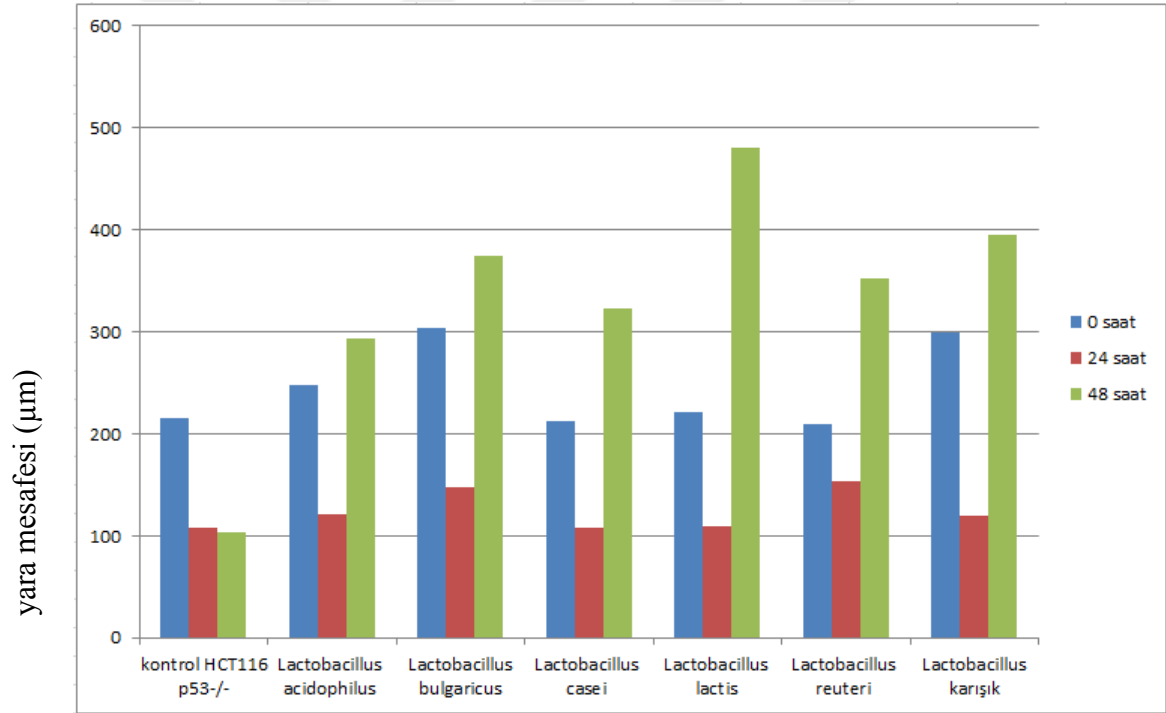
Şekil 3. 8. HCT116 dt Yara iyileşmesi deneyi kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 0 saat , 24 saat , 48 saat sonrasında gösterimi. 10x büyütme



Şekil 3. 9. HCT116 dt kolon kanseri hücrelerinin sonuçlarının protein miktarı ile normalize edilen verilerinin sunumu. Kolon grafikler tekrarlı deney sonuçlarının 48 saat sonra yapılan tüm tedaviler tedavinin iyi sonuçlarını göstermektedir Ort±Std 245 µm



Şekil 3.10 HCT116 p53-/- Yara iyileşmesi deneyi kolon kanseri hücrelerinde bakteri protein uygulamasını takiben 0 saat , 24 saat ,48 saat sonrasında gösterimi. 10x büyütme



Şekil 3.11. HCT116 p53-/- kolon kanseri hücrelerinin sonuçlarının protein miktarı ile normalize edilen verilerinin sunumu. Kolon grafikler tekrarlı deney sonuçlarının 48 saat sonra yapılan tüm tedaviler tedavinin iyi sonuçlarını göstermektedir Ort±Std 233 µm

4. TARTIŞMA

Günümüzde kolon kanseri vakalarının artış gösteriyor olması ve kanserden ölüm oranlarında kolon kanserinin hem kadın hem de erkek popülasyonunda dünya çapında öncü kanserlerden birisi olması nedeni ile kanserin nedenleri, yeni tedavilerin geliştirilmesi gibi konularda araştırmalar yoğunlukla devam etmektedir. Bu nedenle kolon kanseri büyük bir halk sağlığı problemi olarak her yıl yaklaşık 1,2 milyon yeni vaka yeni nesil tedavilere ve koruma stratejilerine ihtiyaç duymaktadır. Yaklaşık % 40'lık ölüm oranıyla dünyadaki en yaygın üçüncü kanser olarak kabul edilmektedir. Kolon kanserinin nedenleri arasında gösterilen genetik bozuklukların yanı sıra önemli çevresel sorunlardan biri yeme alışkanlıkları, gıdaların tüketilme şekilleri ve dolayısı ile bağırsak mikrobiyotası, kanserden korunma stratejilerinde özellikle bağırsak mikrobiyotası üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinen laktobasillerin önemi ortaya koymaktadır (Hirayama and Rafter 2000).

Probiyotik bakterilerin bozulan bağırsak mikrobiyotasında “disbiosise” engel teşkil etmeleri nedeni ile kişilerin beslenmelerinde probiyotikten zengin gıdalar ile beslenmesinin kansere karşı önleyici olabileceği ifade edilmektedir. Ayrıca steroid olmayan anti-enflamatuar ajanların (aspirin gibi) COX ailesi üzerinde etkili olarak kolon kanseri üzerinde anti-enflamatuar etkiler önleyici olduğu gösterilmiştir (Janakiram and Rao 2014). Kolon kanserinin önemli nedenlerinden biri olarak gösterilen enflamasyon konusunda tüm stratejilerin kolon kanseri gelişimi ve kötü prognozunda etkili olabileceğine yönelik birçok metal analiz sonucu dikkati çekmektedir. Bu anlamda en dikkat çekici verilerden biri enflamatuar bağırsak hastalıklarına sahip bireylerde kolon kanserine yakalanma risk oranının 6 kat daha fazla olarak gösterilmesidir.

Tez kapsamında laktobasillerin temelde kolon kanseri hücrelerinde moleküler etkilerine yönelik öncü sonuçlarının tanımlanması amaçlanmış olup, ayrıca ticari probiyotik ürünlerin bakteri suşlarının tek başına etkileri ile karşılaştırmalı olarak hücre sağ kalımı, ölümü açısından irdelenmiştir. Ayrıca enflamasyon ile ilişkili birçok genin transkripsiyonunu sağlayan NF- κ B ve p-NF- κ B miktarları gösterilmiş, stres ile ilişkili yanıt mekanizması ve hücre ölümü arasındaki ilişkinin tanımlanması için p-SAPK/JNK hedefindeki değişimler *L. acidophilus* ve probiyotik ticari üründen

elde edilen karma bakteri kültürü lizatları için değerlendirilmiştir (Gürsoy, Kınık, and Gönen 2005).

Günümüzde, probiyotik kullanımı, kanser tedavisi ve önlenmesi için umut vaat eden bir stratejiyi temsil etmektedir. Probiyotikler “yeterli miktarda kullanıldığında konağa sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalardır”. En yaygın probiyotik türleri, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsine aittir (R. M. Jones et al. 2013). İlginç bir şekilde, epidemiyolojik çalışmalar, düzenli olarak fermente süt ürünleri (probiyotik içeren), özellikle yoğurt tüketen sağlıklı gönüllülerde kolon kanseri insidansının daha düşük olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, probiyotiklerin antikanser etkilerini (30 yıldan fazla bir süredir biriken) teşvik edici gözlemlerine rağmen, moleküler nedenleri tam olarak henüz aydınlatılamamıştır. Probiyotik bakterilerin kolon kanseri başlangıcına karşı olumlu etkileri üç farklı mekanizma ile açıklanabilir: (i) immün tepkinin modülasyonu, (ii) hücre apoptozunun indüklenmesi veya (iii) antioksidan aktivitenin düzenlenmesi. Daha önce gerçekleştirilen deneylerde bir gıda takviyesi olan VSL3'ün (sekiz probiyotik bakterinin bir karışımı), immün tepkimeyi modüle ettiği gösterilmiştir. Çeşitli kimyasallar ile tetiklenen kolon kanseri modellerinde ayrıca Laktobasillerin önleyici etkileri gösterilmiştir. Ayrıca, *Lactobacillus gasseri* ve *Bifidobacterium longum*'un hücresel proliferasyonu inhibe ettiği ve 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile ilişkili bir CRC modelinde fagositik aktiviteyi arttırdığı ve böylece aberrant kript odaklarının çoğunun tümör boyutunu azaltıcı etki gösterdiği bilinmektedir. Ek olarak, önemli bir probiyotik suş olan *Lactobacillus casei* Shirota, doğal katil (NK) hücreleri dendritik hücrelerin sitokin salgıları üzerinde etkili olarak kimyasal olarak tetiklenen kolon kanseri tümörlerinde baskılayıcı etki göstermiştir.

Probiyotik suşu *L. casei* BL23 ile gerçekleştirilen literatürde yer alan verilerde (Choi et al. 2006), kimyasal indükleme ile meydana getirilen kolit modelinde, anti-enflamatuar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *L. casei* BL23, insan papilloma virüsü (HPV) ile tetiklenen kanserlerde antitümoral etkiyi immün modülasyon ile gösterdiği tanımlanmıştır .

HCT116 dt kolon kanseri hücrelerinde *L. casei*'den elde edilen protein lizatları koloni formasyonuna kontrol hücrelere oranla ket vurmamış, ancak p53 -/- kolon kanseri hücrelerinde diğer tüm probiyotikler gibi ket vurucu etki göstermiştir

(Fichera and Giese 1994). Bu nedenle *L. casei*'nin deney modelinde protein lizatları önceki literatürde yer alan deney sonuçları kadar etkili olmamıştır. Bu nedenle *L. casei* uygulama modelinde bakterinin kendisinin canlı olarak anti-enflamatuar etki gösterdiği, protein lizatları ile benzer etkinin görülmediği sonucuna varılmıştır. Ancak p53'ün yoksunluğu durumunda tüm bakterilerden elde edilen lizatların etkili sonuçlar ortaya çıkarması nedeni ile genetik alterasyonların çok sık görüldüğü kolon kanseri vakalarında probiyotik bakterilerden elde edilen bakteri proteinlerinin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

L. casei ile ilgili bağırsak enflamatuar hastalıkları ve kolon kanseri ilgili önceki literatür verilerine göre kolon kanseri hastalarında mikrobiyotadaki bozukluklar 16S rDNA ile feçeste fare modelinde tanımlanmıştır. Farelere *L. casei* BL23'ün verilmesi ile mikrobiyotadaki çeşitlilik artmış ve Firmicute/ Bacteroidetes oranının değişmesine neden olmuştur. baskınlığı azalmıştır (Choi et al. 2006). Ancak dışkı sonuçlarının tüm bağırsak mikrobiyota topluluğunu baz alması yüksek potansiyelde olmakla birlikte, kolonda görülen tümör mikroçevresindeki mikrobiyal topluluk değişimlerini gösterme potansiyeli sınırlıdır. Bu nedenle ileride tümör modelinde, tümör mikroçevresinde bakteri topluluklarının tanımlanması, ilgili metabolitlerin ortaya çıkartılmasıdır.

Tez kapsamında koloni formasyonuna HCT116 dt hücrelerinde ket vuran *L. acidophilus* ile ilişkili literatür verisi derlendiğinde kolon kanseri bağlamında enflamasyonun tümör teşvik edici rolüne yönelik olarak oral yolla alınan *Lactobacillus acidophilus* patojenik bağırsak enflamasyonu pasifleştirici etki gösterdiği ifade edilmektedir (Kailasapathy 2014). Bu nedenle kanserleşme öncesi potansiyel malign dönüşüm gösterebilecek kolon poliplerinin azaldığı gösterilmiştir. Pro ve anti enflamatuar sitokinlerdeki değişimlere neden olan *Lactobacillus acidophilus* tümör mikroçevresinde immun modülasyon ile terapotik potansiyele sahiptir (De Roos and Katan 2000; Kahouli et al. 2017).

Tez sonucunda çıkan verilerin daha fazla hücre modelinde etkilerinin doğrulanması, moleküler mekanizmaların açıklanması için önem arz etmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. Isolating, Cloning, and Sequencing DNA. New York: Garland Science; <https://doi.org/10.1016/j.jde.2007.11.003>.
- Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Boever, P De, B Deplancke, and W Verstraete. 2000. "Fermentation by Gut Microbiota Cultured in a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem Is Improved by Supplementing a Soygerm Powder." *The Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/jn/130.10.2599>.
- Borinstein, Scott C., Melissa Conerly, Slavomir Dzieciatkowski, Swati Biswas, M. Kay Washington, Patty Trobridge, Steve Henikoff, and William M. Grady. 2010. "Aberrant DNA Methylation Occurs in Colon Neoplasms Arising in the Azoxymethane Colon Cancer Model." *Molecular Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1002/mc.20581>.
- Bourlioux, P. 2015. "Faecal Microbiota Transplantation: Key Points to Consider." *Annales Pharmaceutiques Francaises*. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2015.02.001>.
- Bourlioux, Pierre, Berthold Koletzko, Francisco Guarner, and Véronique Braesco. 2003. "The Intestine and Its Microflora Are Partners for the Protection of the Host: Report on the Danone Symposium 'The Intelligent Intestine,' Held in Paris, June 14, 2002." In *American Journal of Clinical Nutrition*.
- Boyce, Gregory A. 2018. "Colorectal Cancer Staging." *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. [https://doi.org/10.1016/s1052-5157\(18\)30616-0](https://doi.org/10.1016/s1052-5157(18)30616-0).
- ÇATALOLUK, O. 2003. "The Development of a Modified Method for Isolating Plasmids from Exopolysaccharide Producing Lactobacillus Species Using Conventional Plasmid Isolation Methods." *Turk J Biol*.
- Chen, Y. S., Fujitoshi Yanagida, and I. Shinohara. 2005. "Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Soil Using an Enrichment Procedure." *Letters in*

- Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01653.x>.
- Choi, S. S., Y. Kim, K. S. Han, S. You, S. Oh, and S. H. Kim. 2006. "Effects of Lactobacillus Strains on Cancer Cell Proliferation and Oxidative Stress in Vitro." *Letters in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01913.x>.
- Colotta, Francesco, Paola Allavena, Antonio Sica, Cecilia Garlanda, and Alberto Mantovani. 2009. "Cancer-Related Inflammation, the Seventh Hallmark of Cancer: Links to Genetic Instability." *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>.
- Comi, Giuseppe, Rosalinda Urso, Lucilla Iacumin, Kalliopi Rantsiou, Patrizia Cattaneo, Carlo Cantoni, and Luca Cocolin. 2005. "Characterisation of Naturally Fermented Sausages Produced in the North East of Italy." *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.007>.
- Compton, C. C., and F. L. Greene. 2009. "The Staging of Colorectal Cancer: 2004 and Beyond." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/canjclin.54.6.295>.
- Cooper, Geoffrey M, and Robert E Hausman. 2007. *The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition*. Sinauer Associates.
- Danilović, Bojana, Nataša Joković, Ljiljana Petrović, Katarina Veljović, Maja Tolinački, and D. Savić. 2011. "The Characterisation of Lactic Acid Bacteria during the Fermentation of an Artisan Serbian Sausage (Petrovska Klobasa)." *Meat Science*. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.026>.
- Dasari, Subramanyam, Chandrasekhar Kathera, Avilala Janardhan, Arthala Praveen Kumar, and Buddolla Viswanath. 2017. "Surfacing Role of Probiotics in Cancer Prophylaxis and Therapy: A Systematic Review." *Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.11.017>.
- Demir, Esra, and Gamze Başbülbul. 2017. "Screening of Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dairy Products." *Biotechnology Journal International*. <https://doi.org/10.9734/bji/2017/33504>.
- Elcioglu, O., and B. Kunduhoglu. 2014. "Probiotic Characteristics of Natural

- Lactobacilli Isolated from Traditional Kargi Tulum Cheese.” *Italian Journal of Food Science*.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, et al. 2002. “Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide.” GLOBOCAN. 2002.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.1440>.
- Fichera, Giuseppe A., and Günter Giese. 1994. “Non-Immunologically-Mediated Cytotoxicity of Lactobacillus Casei and Its Derivative Peptidoglycan against Tumor Cell Lines.” *Cancer Letters*. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)90244-5](https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)90244-5).
- Garagnani, Paolo, Chiara Pirazzini, and Claudio Franceschi. 2013. “Colorectal Cancer Microenvironment: Among Nutrition, Gut Microbiota, Inflammation and Epigenetics.” *Current Pharmaceutical Design*.
- Gastrointestinal Microbiology*. 2016. *Gastrointestinal Microbiology*.
<https://doi.org/10.3109/9781420014952>.
- Giraffa, Giorgio, and Domenico Carminati. 2007. “Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications.” In *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74520-6_1.
- Guessous, Idris, Chiranjeev Dash, Pauline Lapin, Mary Doroshenk, Robert A. Smith, and Carrie N. Klabunde. 2010. “Colorectal Cancer Screening Barriers and Facilitators in Older Persons.” *Preventive Medicine*.
<https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2009.12.005>.
- Gui, Q. F., H. F. Lu, C. X. Zhang, Z. R. Xu, and Y. M. Yang. 2015. “Well-Balanced Commensal Microbiota Contributes to Anti-Cancer Response in a Lung Cancer Mouse Model.” *Genetics and Molecular Research*.
<https://doi.org/10.4238/2015.May.25.16>.
- Gursoy, Oguz, and Ozer Kinik. 2010. “Incorporation of Adjunct Cultures of Enterococcus Faecium, Lactobacillus Paracasei Subsp. Paracasei and Bifidobacterium Bifidum into White Cheese.” *Journal of Food, Agriculture and Environment*.

Gürsoy, Oğuz, Özer Kınık, and İbak Gönen. 2005. "Probiyotikler ve Gastrointestinal Sağlığa Etkileri." *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi*.

H., Hosogi, Nagayama S., Kanamoto N., Yoshizawa A., Suzuki T., and Nakao K. 2009. "Biallelic APC Inactivation Was Responsible for Functional Adrenocortical Adenoma in Familial Adenomatous Polyposis with Novel Germline Mutation of the APC Gene: Report of a Case." *Japanese Journal of Clinical Oncology*.

Hague, A, A J Butt, and C Paraskeva. 1996. "The Role of Butyrate in Human Colonic Epithelial Cells: An Energy Source or Inducer of Differentiation and Apoptosis?" *The Proceedings of the Nutrition Society*.

Hanahan, D, and R A Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell*.

Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hirayama, Kazuhiro, and Joseph Rafter. 2000. "The Role of Probiotic Bacteria in Cancer Prevention." *Microbes and Infection*. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00357-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00357-9).

Hofmanová, Jiřina, Nicol Straková, Alena Hyršlová Vaculová, Zuzana Tylichová, Barbora Šafaříková, Belma Skender, and Alois Kozubík. 2014. "Interaction of Dietary Fatty Acids with Tumour Necrosis Factor Family Cytokines during Colon Inflammation and Cancer." *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2014/848632>.

Hofseth, Lorne J. 2008. "Nitric Oxide as a Target of Complementary and Alternative Medicines to Prevent and Treat Inflammation and Cancer." *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.024>.

Holzapfel, Wilhelm H., and Ulrich Schillinger. 2002. "Introduction to Pre- and Probiotics." In *Food Research International*. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00171-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00171-5).

Hu, Panpan, Wei Song, Yujuan Shan, Ming Du, Minghui Huang, Chen Song, and Lanwei Zhang. 2015. "Lactobacillus Paracasei Subsp. Paracasei M5L Induces Cell Cycle Arrest and Calreticulin Translocation via the Generation of Reactive

- Oxygen Species in HT-29 Cell Apoptosis.” *Food and Function*.
<https://doi.org/10.1039/c5fo00248f>.
- Hugenholtz, Jeroen, and Michiel Kleerebezem. 1999. “Metabolic Engineering of Lactic Acid Bacteria: Overview of the Approaches and Results of Pathway Rerouting Involved in Food Fermentations.” *Current Opinion in Biotechnology*.
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00016-6).
- Janakiram, Naveena B., and Chinthalapally V. Rao. 2014. “The Role of Inflammation in Colon Cancer.” *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-3-348-837-8_2.
- Jasperson, Kory W., Thérèse M. Tuohy, Deborah W. Neklason, and Randall W. Burt. 2010. “Hereditary and Familial Colon Cancer.” *Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>.
- Jones, Rheinallt M., Liping Luo, Courtney S. Ardita, Arena N. Richardson, Young Man Kwon, Jeffrey W. Mercante, Ashfaque Alam, et al. 2013. “Symbiotic Lactobacilli Stimulate Gut Epithelial Proliferation via Nox-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species.” *EMBO Journal*.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2013.224>.
- Jones, Richard D., John T. Hancock, and Alyn H. Morice. 2000. “NADPH Oxidase: A Universal Oxygen Sensor?” *Free Radical Biology and Medicine*.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00320-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00320-8).
- Kahouli, Imen, and Nadia R Handiri. 2016. “Characterization of L. Reuteri NCIMB 701359 Probiotic Features for Potential Use as a Colorectal Cancer Biotherapeutic by Identifying Fatty Acid Profile and Anti-Proliferative Action against Colorectal Cancer Cells.” *Drug Designing: Open Access*.
<https://doi.org/10.4172/2169-0138.1000131>.
- Kahouli, Imen, Meenakshi Malhotra, Susan Westfall, Moulay A. Alaoui-Jamali, and Satya Prakash. 2017. “Design and Validation of an Orally Administered Active L. Fermentum-L. Acidophilus Probiotic Formulation Using Colorectal Cancer Apc Min/+ Mouse Model.” *Applied Microbiology and Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7885-x>.
- Kailasapathy, Kasipathy. 2014. “Microencapsulation for Gastrointestinal Delivery of

Probiotic Bacteria.” In *Nano- and Microencapsulation for Foods*.
<https://doi.org/10.1002/9781118292327.ch7>.

Kandler, Otto, Karl-Otto Stetter, and Ruth Köhl. 2019. “Lactobacillus Reuteri Sp. Nov., a New Species of Heterofermentative Lactobacilli.” *Zentralblatt Für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, Angewandte Und Ökologische Mikrobiologie*. [https://doi.org/10.1016/s0172-5564\(80\)80007-8](https://doi.org/10.1016/s0172-5564(80)80007-8).

Khan, Imran, and Sun Chul Kang. 2017. “Apoptotic Activity of Lactobacillus Plantarum DGK-17-Fermented Soybean Seed Extract in Human Colon Cancer Cells via ROS–JNK Signaling Pathway.” *Journal of Food Science*.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13732>.

Kunduhoglu, Buket, Ozlem Elcioglu, Yekta Gezginc, and Ismail Akyol. 2012. “Genotypic Identification and Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Turkish Kargi Tulum Cheese.” *African Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.5897/AJB12.125>.

Lakritz, Jessica R., Theofilos Poutahidis, Tatiana Levkovich, Bernard J. Varian, Yassin M. Ibrahim, Antonis Chatzigiagkos, Sheyla Mirabal, Eric J. Alm, and Susan E. Erdman. 2014. “Beneficial Bacteria Stimulate Host Immune Cells to Counteract Dietary and Genetic Predisposition to Mammary Cancer in Mice.” *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.28702>.

Leroy, Frédéric, Tom De Winter, Tom Adriany, Patricia Neysens, and Luc De Vuyst. 2006. “Sugars Relevant for Sourdough Fermentation Stimulate Growth of and Bacteriocin Production by Lactobacillus Amylovorus DCE 471.” *International Journal of Food Microbiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.016>.

LÜLEYAP, H. Ümit, Müzeyyen İZMİRLİ, Dilge ONATOĞLU, Semra KOÇ, M. Şah TOPÇUOĞLU, Davut ALPTEKİN, Ayfer PAZARBAŞI, A. İrfan GÜZEL, and Ursula G. FOSTER. 2011. “Investigation of P53 Tumor Suppressor Gene Mutations in Patients with a Lung Mass Using Sequence Analysis.” *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. <https://doi.org/10.5336/medsci.2009-16585>.

Ma, Donglai, Paul Forsythe, and John Bienenstock. 2004. “Live Lactobacillus

- Reuteri Is Essential for the Inhibitory Effect on Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Interleukin-8 Expression.” *Infection and Immunity*.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5308-5314.2004>.
- Marvin, L. F., C. Zatylny, J. Leprince, H. Vaudry, and J. Henry. 2001.
 “Characterization of a Novel Sepia Officinalis Neuropeptide Using MALDI-TOF MS and Post-Source Decay Analysis.” *Peptides*.
[https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00480-6](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00480-6).
- Meenakshi, Imen Kahouli. 2015. “In-Vitro Characterization of the Anti-Cancer Activity of the Probiotic Bacterium Lactobacillus Fermentum NCIMB 5221 and Potential against Colorectal Cancer.” *Journal of Cancer Science & Therapy*.
<https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000354>.
- Meenakshi Malhotra, Imen Kahouli. 2015. “Identification of Lactobacillus Fermentum Strains with Potential against Colorectal Cancer by Characterizing Short Chain Fatty Acids Production, Anti-Proliferative Activity and Survival in an Intestinal Fluid: In Vitro Analysis.” *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*.
<https://doi.org/10.4172/1948-593x.1000132>.
- Morelli, Lorenzo, and Lucio Capurso. 2012. “FAO/WHO Guidelines on Probiotics.” *Journal of Clinical Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.1097/mcg.0b013e318269fdd5>.
- Musa, Daoud, Nihat Dilsiz, Hatice Gumushan, Gulruh Ulakoglu, and Muharrem Bitiren. 2004. “Antitumor Activity of an Ethanol Extract of Nigella Sativa Seeds.” *Biologia, Bratislava*.
- ORLA-JENSEN. 2007. “La Classification Des Bactéries Lactiques.” *Le Lait*.
<https://doi.org/10.1051/lait:19243627>.
- Ouwehand, A. C. 2017. “A Review of Dose-Responses of Probiotics in Human Studies.” *Beneficial Microbes*. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0140>.
- Patel, Ravi M., Loren S. Myers, Ashish R. Kurundkar, Akhil Maheshwari, Asma Nusrat, and Patricia W. Lin. 2012. “Probiotic Bacteria Induce Maturation of Intestinal Claudin 3 Expression and Barrier Function.” *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.025>.

- Perše, Martina, and Anton Cerar. 2012. "Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks." *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1155/2012/718617>.
- Pogribny, Igor P., and Frederick A. Beland. 2009. "DNA Hypomethylation in the Origin and Pathogenesis of Human Diseases." *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0015-5>.
- Ricchi, P. 2003. "Aspirin Protects Caco-2 Cells from Apoptosis after Serum Deprivation through the Activation of a Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/P21Cip/WAF1Pathway." *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.64.2.407>.
- Rolfe, R D. 2000. "The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health." *The Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.396S>.
- Roos, Nicole M. De, and Martijn B. Katan. 2000. "Effects of Probiotic Bacteria on Diarrhea, Lipid Metabolism, and Carcinogenesis: A Review of Papers Published between 1988 and 1998." *American Journal of Clinical Nutrition*.
- Ruemmele, F. M., S. Schwartz, E. G. Seidman, S. Dionne, E. Levy, and M. J. Lentze. 2003. "Butyrate Induced Caco-2 Cell Apoptosis Is Mediated via the Mitochondrial Pathway." *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gut.52.1.94>.
- Satish Kumar, R., P. Kanmani, N. Yuvaraj, K. A. Paari, V. Pattukumar, and V. Arul. 2011. "Lactobacillus Plantarum AS1 Binds to Cultured Human Intestinal Cell Line HT-29 and Inhibits Cell Attachment by Enterovirulent Bacterium Vibrio Parahaemolyticus." *Letters in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03136.x>.
- Servin, Alain L., and Marie H  l  ne Coconnier. 2003. "Adhesion of Probiotic Strains to the Intestinal Mucosa and Interaction with Pathogens." *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*. [https://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00052-0).
- Siegel, Rebecca L., Elizabeth M. Ward, and Ahmedin Jemal. 2012. "Trends in Colorectal Cancer Incidence Rates in the United States by Tumor Location and Stage, 1992-2008." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-1020>.

- Siegel, Rebecca L, Kimberly D Miller, and Ahmedin Jemal. 2019. "Cancer Statistics, 2019." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
<https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- Sis, B., S. Sarioglu, S. Sokmen, M. Sakar, A. Kupelioglu, and M. Fuzun. 2005. "Desmoplasia Measured by Computer Assisted Image Analysis: An Independent Prognostic Marker in Colorectal Carcinoma." *Journal of Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.018705>.
- Temmerman, Robin, Geert Huys, and Jean Swings. 2004. "Identification of Lactic Acid Bacteria: Culture-Dependent and Culture-Independent Methods." In *Trends in Food Science and Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.007>.
- Terzić, Janoš, Sergei Grivennikov, Eliad Karin, and Michael Karin. 2010. "Inflammation and Colon Cancer." *Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>.
- Thirabunyanon, Mongkol, and Penrat Hongwittayakorn. 2013. "Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria of Human Origin Induce Antiproliferation of Colon Cancer Cells via Synergic Actions in Adhesion to Cancer Cells and Short-Chain Fatty Acid Bioproduction." *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9995-y>.
- Thomas, Linda V., Kaori Suzuki, and Jia Zhao. 2015. "Probiotics: A Proactive Approach to Health. A Symposium Report." *British Journal of Nutrition*.
<https://doi.org/10.1017/s0007114515004043>.
- Tuynman, J. B., M. P. Peppelenbosch, and D. J. Richel. 2004. "COX-2 Inhibition as a Tool to Treat and Prevent Colorectal Cancer." *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.08.004>.
- Vaughan, Ashley M., and John F. Oram. 2003. "ABCA1 Redistributes Membrane Cholesterol Independent of Apolipoprotein Interactions." *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.m300078-jlr200>.
- Weiss, Norbert, Ulrich Schillinger, and Otto Kandler. 1983. "Lactobacillus Lactis, Lactobacillus Leichmannii and Lactobacillus Bulgaricus, Subjective Synonyms of Lactobacillus Delbrueckii, and Description of Lactobacillus Delbrueckii

Subsp. Lactis Comb. Nov. and Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus Comb. Nov.” *Systematic and Applied Microbiology*.
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80012-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80012-5).

6 . EKLER

EK A: Cihazlar

Tablo 2 . Kullanılan cihazlar listesi.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Santrifüj (Büyük)	5810R	Eppendorf
Spin minispin plus	SN0708	LabNet
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5 µl-10 µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20 µl-200 µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200 µl-1000 µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Distile Su	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Derin Dondurucu (-80 °C)	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Nanodrop		BO-GA
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell 150	Thermo
Fluoresan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
Santrifüj	NF 200	Nüve

Dondurucu (-20 °C)		Arçelik
Mikroplaka okuyucu	680	biorad
Sonikatör		Farmakım
iMark Microplate Reader		Gen-Era



EK B: Hücre Kültürü

Tablo 3. Hücre kültürü donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
McCoys 5A		Pan BioTech
6 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
25 santimetrekarelik hücre büyütme kapları	90026	TPP
75 santimetrekarelik hücre büyütme kapları	90076	TPP
Steril pipetler (5 ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10 ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0,22µm)	99722	TPP
Trypsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
Filtreler (0.22)	99722	TPP
Hemositometre	Heracell 1150	Neubauer

EK C: Kullanılan Kimyasallar

Tablo 4. Deneylerde kullanılan kimyasallar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
DiOC6	2129966	Fluka
PI	D1306	Invitrogen
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
PBS	BE17-51-5F	LONZA
BSA	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
DMSO	D5879	Sigma-Aldrich
Kresylviolett	1.05235.0025	Merck

EK D: Bakteri Kültürü

Tablo 5. deneylerde kullanılan Bakteri'ler kültürü

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
MRS agar	1.10660.0500	MERCK
MRS broth	1.10661.0500	MERCK

7.ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı: SOHAIB WISAM MADDAH AL-ANI

KİŞİSEL BİLGİLER

Cinsiyet : Erkek

Uyruğu : Irak

Doğum Yeri : Bağdat

Doğum tarihi : 22 / 04 / 1991

İletişim Bilgileri:

Adres: Avcılar Merkez. Menekşe Sok. No:004 D:19 AVCILAR /İSTANBUL

Telefon: 00905061230548 - 009647705357963

E-posta: suhaib.swm@gmail.com

Öğrenim Durumu:

DERECE	ALAN	ÜNİVERSİTE	YIL
Lisans	Tıbbi Laboratuvar Teknolojisi	AL-Mamon Üniversitesi	2010-2014
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Istanbul Kültür Üniversitesi	2016-2019

2011	Bağdat Üniversitesi'nde Laboratuvar Analiz Kursu
2014	Irak Sağlık Meslekleri Üyesi
2015	Irak Sağlık Derneği Üyesi
2017	Certificate Of Training In The City Medical Hospital in baghdad
2017	Marmara Üniversitesi 6. Kök Hücre Sempozyumu
2018	Yıldız Teknik Üniversitesi 6.Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi
2015-	Biyolojik Öğretmeni