

**T.C.
HİTİT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI**

**PROBİYOTİKLERİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN IN VİTRO KO-KÜLTÜR
MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Tuğba UYSAL KILIÇ

ÇORUM 2021

**PROBİYOTİKLERİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN IN VİTRO KO-KÜLTÜR MODELİNDE ARAŞTIRILMASI**

Tuğba UYSAL KILIÇ

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

Yüksek Lisans Tezi

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Gülçin ALP AVCI**

ÇORUM 2021

Tuğba UYSAL KILIÇ tarafından hazırlanan “Probiyotiklerin Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisinin In Vitro Ko-Kültür Modelinde Araştırılması” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Gülçin AKÇA

Doç. Dr. Gülçin ALP AVCI

Doç. Dr. Emre AVCI

Hitit Üniversitesi Lisansüstü Yönetim Kurulu’nun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile Tuğba UYSAL KILIÇ’ın Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Prof. Dr. Muhammed Asif YOLDAŞ
Müdür V.

TEZ BEYANI

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

Tuğba UYSAL KILIÇ

PROBİYOTİKLERİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN IN VİTRO KO-KÜLTÜR MODELİNDE ARAŞTIRILMASI

Tuğba UYSAL KILIÇ

HİTİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2021

ÖZET

Hücrelerin, genetik ve çevresel etkiler ile değişime uğraması sonucu kontrolsüz çoğalmasına genel olarak kanser denilmektedir. Bağırsak kanseri ise kalın bağırsak (kolon) kanseri ve kolorektal kanser olarak da bilinir. Kanser türleri arasında, kolorektal kanserler yaygın görülen ve mortal seyreden bir kanser türüdür. Ülkemizde ve dünyada sık görülen kolorektal kanserlerdeki artışta beslenme alışkanlığının ciddi boyutlarda etkisi gözlenmektedir. Bu sebeple bilim insanları özellikle kanser riskini azaltan ek gıda takviyeleri geliştirmek ve optimum beslenme dizaynının önemini ortaya koymak için halihazırda çalışmaktadır. Bu çalışmada iki farklı probiyotik suş ve onlardan elde edilen postbiyotikler kullanılarak, kolon kanseri hücre hatlarına uygulanmıştır. Çalışmada hem kanser hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerine, hem de migrasyon üzerine etkilerine beraber bakılmıştır. Uygulama sonuçlarımız, probiyotiklerin ve postbiyotiklerin önemli ölçüde hücre canlılığına ve migrasyonuna etkisini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *L. plantarum*, *L. reuteri*, postbiyotik, kolorektal kanser.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PROBIOTICS ON COLON CANCER CELLS IN VITRO CO-CULTURE MODEL

Tuğba UYSAL KILIÇ

HİTİT UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE
Ocak 2021

ABSTRACT

Uncontrolled proliferation of cells as a result of genetic and environmental changes is often referred to as cancer. Bowel cancer is also known as large intestine (colon) cancer and colorectal cancer. Among the cancer types, colorectal cancers are commonly seen and mortally coursed. Nutritional habits have a serious impact on the increase in colorectal cancers, which are common in our country and in the world. For this reason, scientists are currently working with the goal to develop additional food supplements that reduce the risk of cancer and to reveal the importance of the most optimal nutritional design. In this study, two different probiotic strains and postbiotics obtained from them, were applied to colon cancer cell lines. In the study, both the effects on the viability of cancer cells and their effects on migration were examined together. Our application results showed that probiotics and postbiotics had a significant effect on cell viability and migration.

Keywords: *L. plantarum*, *L. reuteri*, postbiotic, colorectal cancer.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımın gerçekleőmesi için bana olanak sağlayan danıőman hocam sayın Doç.
Dr. Gölin ALP AVCI' ya;

Tez İzleme Kurulu'nda ve Tez Jürisi'nde bulunarak değerli önerilerini paylaőan ve
vakitlerini ayıran kıymetli hocalarıma;

Her koşulda yanımda olduklarını sonsuz anlayıőları, destekleri ve sevgileriyle bana
hissettiren eőim Samet Kılıç, annem Zehra Uysal, babam Mustafa Uysal ve kardeőim
Onur Uysal'a;

Her zor kararımda yanımda olduğunu gösteren, desteklerini esirgemeyen tüm Fen
Edebiyat Fakóltesi aileme,

Ve son olarak tez sürecimde bana her zaman destek olup, yalnız bırakmayan tüm
arkadaőlarıma,

Sonsuz teőekkürlerimi sunuyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1.GİRİŞ.....	1
2.KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1.Kanser.....	4
2.2.Kanser Hücresinin Özellikleri.....	5
2.3.Kolorektal Kanserler.....	7
2.3.1.Epidemiyoloji.....	9
2.3.2.Risk Faktörleri.....	9
2.4.Gastrointestinal Mikrobiota.....	11
2.5.Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri.....	15
2.6.Probiyotikler.....	15
2.7.Probiyotiklerin Sağlığa Yararları.....	17
2.8.Bağırsak Epitel Bariyerinin Probiyotiklerle Güçlendirilmesi.....	19
2.9.Probiyotik Suşlar.....	19
2.10.Suş seçimi.....	20

2.11. Laktik Asit Bakterileri	20
2.12. <i>Lactobacillus</i> Cinsi	22
2.13. <i>Lactobacillus plantarum</i>	23
2.14. Kolorektal Kanser (KRK) Riskini Azaltan Probiyotik Etki Mekanizmaları	25
2.15. Mikrobiyota Kompozisyonunun Probiyotiklerle Modülasyonu	26
2.16. Postbiyotikler Metabolitler	28
2.17. Postbiyotiklerin Tanımı, Sınıflandırılması	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Araştırmanın Tipi	30
3.1.2. Araştırmanın Örneklemi ve Evreni	30
3.1.3. Araştırmanın yürütüldüğü laboratuvarlar	30
3.1.4. Araştırma için materyallerin temini	30
3.1.5. Araştırmanın değişkenleri	30
3.1.6. Araştırmada kullanılan kültür ortamları ve hazırlanışı	31
3.1.7. Araştırmada kullanılan hücre hatları, malzeme ve cihazlar	31
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Hücre Kültürü	33
3.2.2. Kanser ve Sağlıklı Fibroblast Hücre Kültürü	33
3.2.3. TC20™ Automated Cell Counter cihazı ile hücre sayımı	34
3.2.4. <i>L. plantarum</i> ve <i>L. reuteri</i> aktifliği ve muhafazası	35
3.2.5. <i>L. plantarum</i> ve <i>L. reuteri</i> suşlarından postbiyotiklerin eldesi	36
3.2.6. Probiyotik ve postbiyotiklerin hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi	37
3.2.7. Yara iyileşmesi hücre migrasyon testi	40
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	42
4.1. Kolon Kanseri ve Sağlıklı Fibroblast Hücre Hatlarının Çoğaltılması	42
4.2. TC20™ Automated Cell Counter ile Hücre Sayısı ve Canlılığının Tespiti	43

4.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> ve <i>Lactoacillus reuteri</i> 'nin Saflık Kontrolü ve Hücre Kültürü İçin Hazırlanması	44
4.4. MTT Analizi ve Değerlendirilmesi	45
4.5. Yara iyileşmesi hücre migrasyon analizi.....	58
4.6. Tartışma.....	62
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR	69
ÖZ GEÇMİŞ	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. İnsan GIS'deki mikroorganizma miktarı ve türleri.....	13
Çizelge 2.2. Bazı Probiyotik Suşların Listesi.....	17
Çizelge 2.3. Probiyotiklerin bazı faydaları ve mekanizmaları.....	18
Çizelge-3.1. MTT testi için hazırlanan deney grupları.	37
Çizelge-3.2. Migrasyon testi için hazırlanan deney grupları.	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin orijinal bölgelerinden vücudun diğer bölgelerine yayıldığı süreç.	1
Şekil 2.1. Kanserin temel özellikleri.	6
Şekil 2.2. Kanserin temel özellikleri.	7
Şekil 2.3. Bağırsak mikrobiyomu, bağırsak ve beyin arasındaki çift yönlü iletişim kanalları. Bağırsak mikrobiyotası ve bağırsaktaki özel hücreler tarafından üretilen endokrin, nörokrin ve iltihaplanma ile ilgili sinyaller, prensipte beyni etkileyebilir. Buna karşılık beyin, mikrobiyal bileşimi ve işlevi endokrin ve sinir mekanizmaları yoluyla etkileyebilir.	12
Şekil 2.4. Gastrointestinal sistemin farklı bölümlerinde bulunan mikroorganizmalar. ...	16
Şekil 2.5. Potansiyel probiyotik etki mekanizmaları ve KKK ile ilgili faktörler.	26
Şekil 3.1. Işık absorpsiyonunun derecesi, hücre içinde ve hücre yüzeyinde biriken formazan konsantrasyonunun derecesine bağlıdır. Formazan konsantrasyonu ne kadar büyükse, mor renk o kadar koyu ve dolayısıyla absorbans da o kadar yüksek olur.	39
Şekil 4.1. Lactobacillus plantarum'un 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	47
Şekil 4.2. Lactobacillus plantarum postbitotiklerinin 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	47
Şekil 4.3. Lactobacillus reuteri'nin 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	48
Şekil 4.4. Lactobacillus reuteri postbitotiklerinin 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	48
Şekil 4.5. Lactobacillus plantarum'un 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	50
Şekil 4.6. Lactobacillus plantarum postbitotiklerinin 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	50
Şekil 4.7. Lactobacillus reuteri'nin 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	51

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. Lactobacillus reuteri postbitotiklerinin 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	51
Şekil 4.9. Lactobacillus plantarum'un 24 saat sonunda CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	53
Şekil 4.10. Lactobacillus plantarum postbitotiklerinin 24 saat sonunda Caco-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	53
Şekil 4.11. Lactobacillus reuteri'nin 24 saat sonunda CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	54
Şekil 4.12. Lactobacillus reuteri postbitotiklerinin 24 saat sonunda CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.	54
Şekil 4.13. Probiyotik ve postbitotiklerin 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin birlikte gösterimi.	55
Şekil 4.14. Probiyotik ve postbitotiklerin 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin birlikte gösterimi.	56
Şekil 4.15. Probiyotik ve postbitotiklerin 24 saat sonunda CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin birlikte gösterimi.	57
Şekil 4.16. Probiyotik ve postbitotiklerin L929, HT-29 ve CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin birlikte gösterimi.	57
Şekil 4.17. L929 ve HT-29 hücrelerinin zamana bağlı migrasyon bölgesindeki canlı hücre alanı değişim grafikleri (10X).	61

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Lactobacillus Plantarum, Dennis Kunkel Mikroskobu / Bilimsel Fotoğraf Kütüphanesi tarafından 3 Ekim 2018'de yüklenen bir fotoğraf	24
Resim 3.1. Hücreler 37°C'de, %5 karbondioksit içeren normoksik inkübatör ortamında çoğaltılmıştır.	34
Resim 3.2. TC20™ Automated Cell Counter hücre sayım lamı ile canlı ve ölü hücrelerin belirlenmesi.....	35
Resim 3.3. A) Lactobacillus plantarum B) Lactobacillus reuteri.....	36
Resim 3.5. Migrasyon testi için 12-kuyucuklu plakalarda yoğunlaşmış adheren hücreler üzerinde bir yara modeli gerçekleştirilmiştir.	40
Resim 3.6. Yara modeli şematize hali.....	40
Resim 4.1. A) L929 (40X), B) Caco-2 (40X), HT-29 (40X).....	42
Resim 4.2. Hücreler Trypan-Blue boyası ile boyanarak otomatik olarak sayıldı ve canlılıkları tespit edildi.....	43
Resim 4.3. A) Lactobacillus plantarum (100X) B) Lactobacillus reuteri (100X)	44
Resim 4.4. L929 hücrelerinin zamana bağlı migrasyon görüntüleri (10X).	59
Resim 4.5. HT-29 hücrelerinin zamana bağlı migrasyon görüntüleri (10X).	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C Santigrat derece

Kısaltmalar

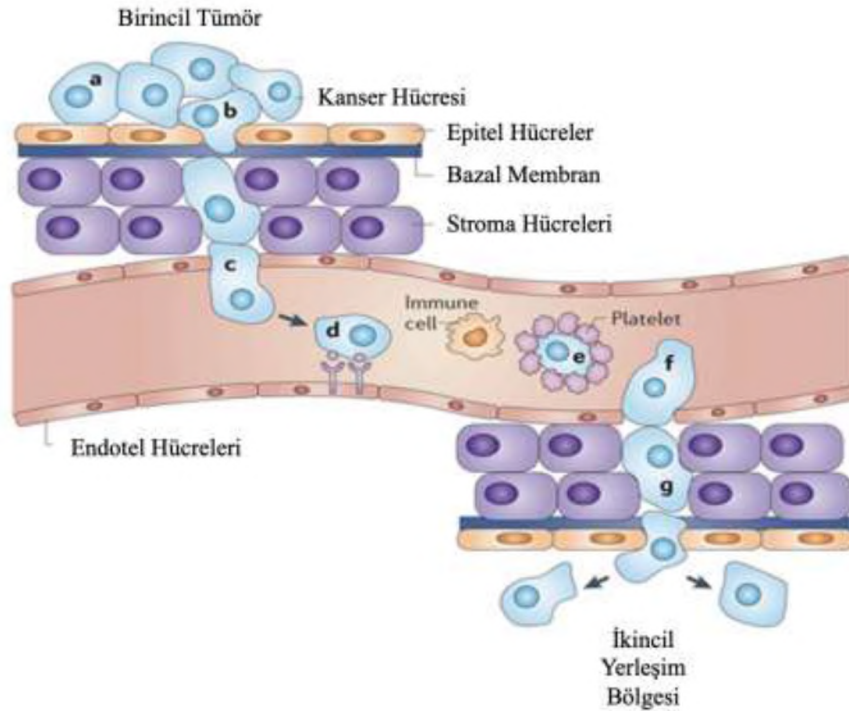
GIS	Gastrointestinal sistem
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
PBS	Fosfat Buffer Saline
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
FBS	Fetal Bovine Serum
NF-κB	Nükleer transkripsiyon faktörü kappa B
SDT	Sitoletal distansiyonlu toksinler
SNF	Sitotoksik nekrotize edici ajan
AMP	Antimikrobiyal peptitler
NO	Nitrik oksit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
LAB	laktik asit bakterileri
H₂O₂	Hidrojen peroksit
CO₂	Karbondioksit
KZYA	Kısa zincirli yağ asitleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
LPO	Lipid peroksidasyonu
KRK	Kolorektal kanser
MUTYH	mutY DNA glycosylase
MAP	MUTYH ile ilişkili polipoz

FAP	Ailevi adenomatöz polipoz
DIİ	Diyet inflamatuvar indeksi
GM	Gastrointestinal Microbiota
IL-12	interlökin-12
NK	Doğal öldürücü hücreler
IgA	İmmünoglobulin A
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
BS	İrritabl bağırsak sendromu
BV	Bakteriyel vajinoz
BFT	Bacteroides fragilis, enterotoksijenik toksin
BV	Bakteriyel vajinoz

1. GİRİŞ

Hücrelerin, genetik ve çevresel etkiler ile değişime uğraması sonucu kontrolsüz çoğalmasına genel olarak kanser denilmektedir. Bağırsak kanseri ise kalın bağırsak (kolon) kanseri ve kolorektal kanser olarak da bilinir. Kanser türleri arasında, kolorektal kanserler yaygın görülen ve mortal seyreden bir kanser türüdür. Tüm dünyada en sık görülen üçüncü kanser türü olan kolorektal kanserler, kanser nedeni ölümlerin ikinci sırasında yer almaktadır. Kısaca hem dünyada hem de ülkemizde gastrointestinal sistemin (GIS) en sık rastlanan kanser türüdür (Siegel, 2011).

Kolorektal kanserler GIS üzerinde kolonun iç tabakasında adenmatöz polip adı verilen iyi huylu hücre kümeleri ile başlarlar. Kolon ve rektumun duvarı birçok katmandan oluşur. Başlangıç mukoza adı verilen bu en iç tabakada ortaya çıkar ve ardından diğer tabakalara doğru büyümeye başlar. Dolayısıyla kanserleşmiş bu hücreler bağırsak duvarında büyüebilmek veya yakın çevredeki damar ve lenf bezlerine ya da vücudun uzak bölgelerine taşınabilmek için iç tabakalara yayılım gösterirler (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin orijinal bölgelerinden vücudun diğer bölgelerine yayıldığı süreç (Schroeder,2011).

Kolorektal kanserlerin büyük bir çoğunluğu adenomatöz poliplerin kansere dönüşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Oluşan tümör önce bağırsak mukozasında yerleşir, sonrasında bağırsak ve bağırsak çevresindeki yapılara tutunur ve son aşamada diğer organlara doğru yayılım gösterir (Ömer Rıdvan, 2015).

Ülkemizde ve dünyada sık görülen kolorektal kanserlerdeki artışta beslenme alışkanlığının ciddi boyutlarda etkisi gözlenmektedir. Bu sebeple bilim insanları özellikle kanser riskini azaltan ek gıda takviyeleri geliştirmek ve optimum beslenme dizaynının önemini ortaya koymak için halihazırda çalışmaktadır.

Tüm bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda; probiyotikler, patojenik olmayan yani zararsız mikroorganizmalar olup konağın sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunan bakteriler olarak günümüzde kaçınılmaz bir araştırma konusu haline gelmiştir (Fuller, 1986; Lakritz, 2014). Bundan dolayıdır ki kanser gelişiminde ve ilerleme sürecinde beslenmenin rolü ve önemi özellikle GIS kanserlerinde epidemiyolojik çalışmalar ile güçlü şekilde desteklenmektedir (Willett, 2000).

Sindirim sistemini ve dolayısıyla tüm sistemleri etkileyebilen probiyotikler; bağırsak duvarına tutunarak patojen mikroorganizmalara karşı biyolojik bir baraj inşa eden, bağırsak mikrobiyom balansı düzenleyen, bifidobakteriler, enterokoklar, streptokoklar ve laktobasillerden oluşan, canlı ve faydalı mikroorganizmalardır.

Probiyotik mikroorganizmaların en önemli etkileri; enteropatojen mikroorganizmaların, konakçının gastrointestinal sistemine kolonizasyonunu engellemek amacıyla kolon epitel yüzeyinde bulunan bağlanma bölgeleri üzerinde yarışa girerek, ürettikleri organik asitler aracılığıyla bağırsak pH'sını düşürerek patojen mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini durdurmak, aynı zamanda diasetil, asetaldehit, hidrojen peroksit (H₂O₂), karbondioksit (CO₂) ve bakteriyosin gibi birçok antimikrobiyal maddeler vasıtasıyla, patojen bakterilerin üreme ve çoğalmalarını kontrol altında tutmak ve mikroflora dengesini sağlamak olarak belirtilmektedir (Trichopoulos, 2005).

Bu etkilerin yanında bazı probiyotik bakteriler fermantasyon yoluyla bilhassa propionat ve asetat gibi bazı kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) üretirler. Bu KZYA'ı apoptoz yolunu kullanarak insan kolon kanser hücrelerini öldürebilir. Bu yolak probiyotik bakteri gelişimi sırasında üretilen ve kültür süpernatantında bulunan kısa zincirli yağ asitlerinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve lipid peroksidasyonu (LPO) tetiklemesi, sonrasında ise mitokondriyal transmembran potansiyelini azaltması; buna bağlı olarak antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonunu değiştirerek kaspaz-3 faaliyetini artırması ile gerçekleşmektedir (Jan, 2002). Şaşırtıcı olarak, bir kısa zincirli yağ asidi olan butirat, kolon kanseri hücrelerini apoptoza yönlendirirken sağlıklı hücrelerde bu durumu gerçekleştirmediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Hague, 1997).

Bugüne kadar yapılan çalışmalardan edinilen bilgilere göre; ROS artışı, yaygın olarak apoptoz sürecinde gözlenmektedir. Dolayısıyla ROS miktarında gözlenen artış apoptozun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Birçok anti-kanser ilacın veya doğal bileşiklerin kanser hücrelerinde apoptozu indükledikleri için ROS düzeyini arttırdığı bilinmektedir (Jeong, 2016).

Antioksidanlar ise hipoksi, fiziksel ve kimyasal ajanlar, enfeksiyonlar, nutrisyonel bozukluklar gibi hücre hasarını artıran süreçleri genellikle önlemektedir (Simon, 2000). Ancak farklı prooksidanlarla etkilenen ROS miktarındaki aşırı artış oksidatif strese yol açabilmekte ve normal hücrelerde de apoptoza neden olabilmektedir (Tartik, 2016). Aynı zamanda bu reaktif oksijen türleri hücre zarlarındaki doymamış yağ asitleri ile etkileşime girerek LPO'nu tetikleyebilmektedir (Barrera, 2012).

Literatüre göre normal hücrelerde negatif etkilerinin olduğu düşünülen reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyon ürünleri farklı bir açıdan bakıldığında kanser tedavi sürecinde yararlı da olabilirler. ROS 'un ve hücre zarındaki doymamış yağ asitleri ile etkileşime girmesi sonucu oluşan LPO ürünlerinin kanser ilerlemesini engellemek ve da kanser hücrelerini apoptoza sürüklemek için kullanılabileceğini gösteren araştırma sonuçları da literatürde mevcuttur (Omotayo, 2013).

Bu bilgiler, probiotikler ve onlardan elde edilen ürünlerin kanser tedavisinde bioterapotik olarak kullanılabileceği düşüncesini uyandırmaktadır.

Bu çalışma ile probiyotiklerin; kanserli hücrelerde hücre göçü, hücreler arası cross-talk faaliyeti ve anti-proliferatif etkileri açıklanarak probiotiklerin kolon kanseri açısından farklı bir paradigması açıklığa kavuşturulacaktır.

Literatürde ve klinik uygulamalarda kolon kanseri hastalarının prognostik olarak değerlendirilmesi klinik parametrelerle sınırlı kalmaktadır. Dolayısıyla hastalığın seyrine ve tedavi sürecine yol gösteren tümör agresifliğinin biyobelirteçleri henüz kesin olarak tanımlanamamıştır. Bu açıdan ko-kültür araştırmalarının in vivo tümör modelini ve cross-talk ilişkilerini mikroçevre düzeyinde daha iyi yansıttığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmadaki amacımız; Caco-2, HT-29 kolon kanseri hücre hattını ve L929 fare sağlıklı fibroblast hücre hattını *L. plantarum* ve *L. reuteri* suşlarının hem kendileri hem de büyütüldüğü besiyerleri ile muamele ederek; aynı zamanda probiyotik bakteriler ile Caco-2, HT-29 kolon kanseri hücre hattını ve L929 fare sağlıklı fibroblast hücre hattını ko-kültüre ederek kanser hücrelerinin ölüm oranını yükseltmek ve migrasyon yeteneğinin nasıl değiştiğini araştırmak ve analiz etmektir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser, günümüzde küresel olarak en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Kanser teşhisi konulmuş halihazırda 11 milyondan fazla hasta mevcut olmakla birlikte, bu oran 2020 yılında 16 milyona yükselmiştir (Siegel, 2017).

Geçmiş yüzyıla bakıldığında kanser günümüze kıyasla yaygın değildi; son 30 yıldan beri, muhtemelen değişen yaşam tarzımız, alışkanlıklarımız ve artan yaşam beklentimiz nedeniyle, görülme sıklığı endişe verici bir şekilde artmıştır. Kanser, 20.

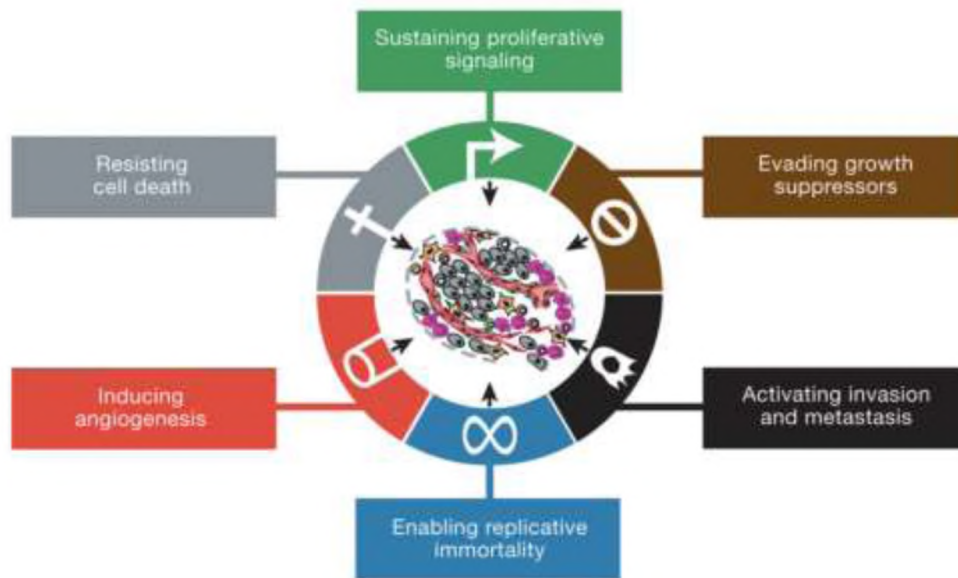
yüzyılın en korkunç hastalıklarından biridir. 21. yüzyılda sürekliliği ve artan insidansı ile daha da yayılmaktadır. Bu durumun endişe vermesinin sebebi, her dört kişiden birinin ömür boyu kanser riski taşımasıdır (Roy, 2016).

Kanser nedir? Basitçe; kanser, hücrelerin anormal büyümesidir. Kanserler herhangi bir organ veya vücut yapısından kaynaklanır ve büyümeyi durdurma yeteneğini yitirmiş küçük hücrelerden oluşur. Bir laboratuvar testi veya radyolojik rutin testler ile "tesadüfen" veya tamamen farklı bir nedenle de tespit edilebilir. Genel olarak, kanser tespit edilmeden önce 1 cm büyüklüğe ulaşmalı veya 1 milyon hücreden oluşmalıdır (Mackay, 2006). Oluşan bu hücre kümesi, "kitle", "tümör", "nodül", "yumru" veya "lezyon" olarak adlandırılmaktadır. Bu genel kuralın istisnaları arasında kan ve kemik iliği kanserleri (lösemi ve lenfomalar) bulunur; bunlar sıklıkla bir "kitle" oluşturmaz, ancak laboratuvar testlerinde açıkça tespit edilebilmektedir. Normal bir hücrenin kanserli bir hücreye dönüşümü, muhtemelen kanserin oluşumunda bu kadar kritik bir olay değildir; daha ziyade, vücudun bağışıklık hücrelerinin sayıca az olduğu durumda, yeni oluşan kanser hücrelerini tanımlayıp yok edememesidir (Hanahan, 2011). Bağışıklıktan kaçış da dahil olmak üzere kanser, aşamalı olarak büyümek ve genişlemek için farklı stratejilerden yararlanan karmaşık ve dinamik bir durumdur. Kronik stres, yaşlılık, önceki kemoterapi kullanımı, analjezik, antibiyotik ve kortikosteroid gibi ilaçların kötüye kullanımı gibi faktörlerden dolayı bağışıklık sistemi baskılanan kişilerde kanser riski katlanarak artmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda da bağışıklık sisteminin kanser ile ilişkisindeki önemi ön plana çıkmaktadır. Nitekim Hanahan ve Weinberg tarafından 2011'de güncellenen derleme, kanserin yeni bir ayırt edici özelliği olarak "immün yıkımdan kaçış" kavramını içeriyordu (Vesely, 2011).

2.2. Kanser Hücresinin Özellikleri

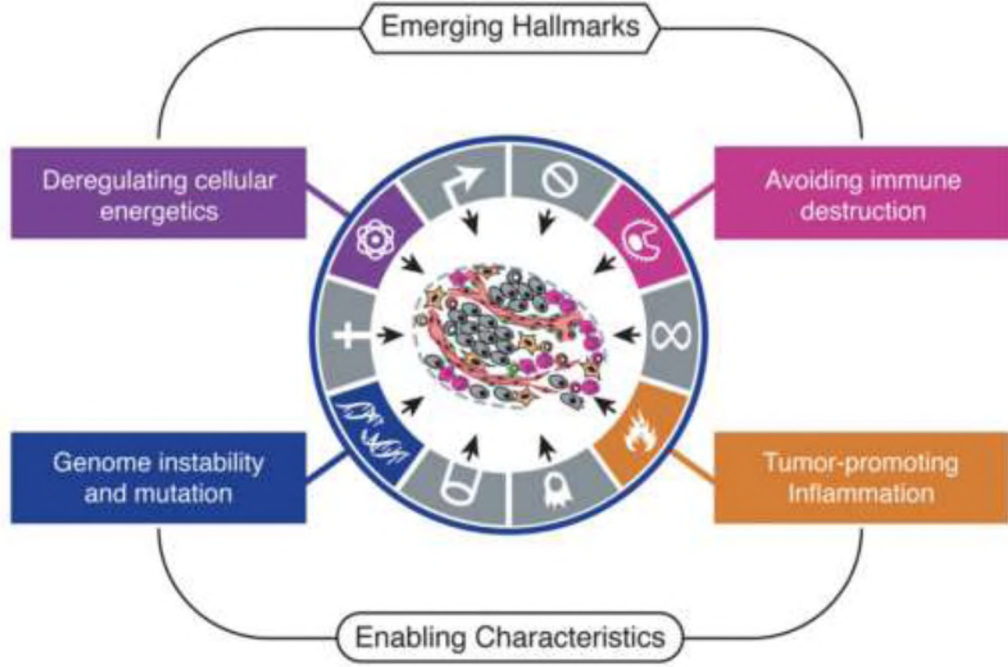
Kanserin karmaşık yapısının ortaya konulabilmesi için kanser hücrelerinin özelliklerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Çünkü 120'den fazla türü vardır. Bu kanserlere karşı etkili tedavilerin geliştirilmesi de ancak kanserin temel özelliklerinin tespit edilmesine bağlıdır.

Kanser araştırmacıları olan Robert Weinberg ve Douglas Hanahan 2000 yılında kanserin fizyolojisi ile ilişkili 6 önemli değişikliği sıralayan " The Hallmarks of Cancer" başlıklı derlemeyi yayınlamışlardır (Fu-Xiang Yu, 2015). Derlemeye göre kanserleşme sürecinde hücrelerde görülen temel değişiklikler şunlardır (şekil 2.1.): Programlı hücre ölümünden (apoptoz) kaçma, büyümeyi inhibe edici sinyallere bağımsızlık, büyüme sinyallerinde kendine yeterlilik, sınırsız bölünme potansiyeli, anjiyogenez, invazyon ve metastaz.



şekil 2.1. Kanserinin temel zellikleri (Hanahan,2000).

2000 yılında kanser hücresinin temel özelliklerini özetleyen Hanahan ve Weinberg, 2011 yılında çıkan en son derlemelerinde bu fonksiyonel özellikler listesine yenilerini de eklediler. Bu yeni zellikler: Hücresel enerji metabolizmalarının yeniden düzenlenmesi, immün yıkımdan kaçış, genom instabilitesi ve mutasyon, tümör tetikleyici inflamasyon (Tümör mikroçevresinin desteklenmesi) (şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Kanserinin temel özellikleri (Hanahan,2011).

2.3. Kolorektal Kanserler

Dünya çapında ortalama yaşam standartlarının iyileştiği, hastalıkların teşhis ve tedavisini önemli ölçüde iyileştiren yeterli sağlık hizmetlerine erişimin arttığı bir çağda yaşıyoruz. Bu gelişmelerin, dünyanın çoğu bölgesinde ortalama yaşam beklentisi üzerinde etkili olmuştur. Ancak, bu tıbbi gelişmelerin bir sonucu olarak bulaşıcı hastalıklardan ölüm oranları küresel olarak iyileşmiş olsa da, kansere bağlı ölüm oranı son 40 yılda neredeyse %40 artmıştır (Kuipers, 2013).

Kolorektal kanser 1950'de oldukça nadirdi, ancak batı ülkelerinde baskın bir kanser haline geldi; şimdi ise kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10' unu oluşturuyor. Bu artmış insidans, batı ülkelerinde nüfusun yaşlanması ve kötü beslenme alışkanlıkları, sigara, düşük fiziksel aktivite ve obezitenin yaygınlığı olarak açıklanıyor. Bu sıklıktaki değişiklik sadece sporadik hastalık oranlarında değil, aynı zamanda bazı

ailesel kanser sendromlarında da belirgin bir şekilde gözlemlenebilmektedir (Warthin, 1983; Vasen, 2015).

Kolorektal kanser (KRK), dünyada hem erkeklerde hem de kadınlarda teşhis edilen en yaygın üçüncü kanserdir (erkeklerde prostat kanseri, kadınlarda meme kanseri ve akciğer kanserinden sonra). Tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık %41 'i proksimal kolonda meydana gelir; yaklaşık %22 'si distal kolon ve %28 'i ise rektumu içermektedir. Ancak, menşe yerinde yaşa ve cinsiyete bağlı olarak potansiyel farklılıklar gözlenmektedir (Cheng, 2011). Etkili kanser tarama önlemleri nedeniyle kolorektal kanser insidansı ve ölüm oranı azalmış olsa da, önümüzdeki 15 yılda %60 'lık bir artış beklenmekte ve 2030 'da 13 milyon insanın kanserden öleceği tahmin edilmektedir. Çevresel ve genetik faktörler kolon kanserinin patogeneğinde büyük rol oynamaktadır (Siegel, 2018).

Bağırsak kanseri, sigmoidoskopi veya kolonoskopi sırasında kolondan bir örnek alınarak teşhis edilebilir. Bunu daha sonra hastalığın yayılıp yayılmadığını belirlemek için tıbbi görüntülemeler izler. Tarama, kolorektal kanserden ölümlerin önlenmesi ve azaltılmasında oldukça etkilidir. 50-75 yaşlarından başlayarak birkaç yöntemden biri ile tarama yapılması önerilmektedir (Bosman, 2014). Kolonoskopi sırasında bulunan küçük polipler çıkarılabilir, fakat büyük bir polip veya tümör bulunursa, kanserli olup olmadığını kontrol etmek için bir biyopsi yapılabilir. Aspirin ve diğer steroidal olmayan anti-inflamatuar ilaçlar riski azaltır. Ancak yan etkileri nedeniyle genel kullanımları bu amaçla tavsiye edilmemektedir (Theodoratou, 2017).

Kolorektal kanser için kullanılan tedaviler, ameliyat, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavinin bazı kombinasyonlarını içerebilir. Kolonun duvarına hapsolmuş kanserler ameliyatla tedavi edilebilirken, geniş çapta yayılan kanser genellikle tedavi edilemez, tedavi yaşam kalitesini ve semptomları iyileştirmeye yöneliktir (Bray, 2018). Bireysel hayatta kalma olasılığı, kanserin ne kadar ilerlemiş olduğuna, tüm kanserin ameliyatla çıkarılıp çıkarılamayacağına ve kişinin genel sağlığına bağlıdır. Küresel olarak, kolorektal kanser, tüm vakaların yaklaşık %10

'unu oluşturan üçüncü en yaygın kanser türüdür. Vakaların %65 'inden fazlasının bulunduğu gelişmiş ülkelerde daha yaygındır. Kadınlarda erkeklerden daha az yaygındır (Horat, 2013).

2.3.1. Epidemiyoloji

Kolorektal kanser insidansı her ülkede farklılık gösterir. Bu insidans değişkenliğine çeşitli faktörlerin katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Spesifik olarak, çeşitli faktörler arasında sosyoekonomik statü, düşük sosyo-ekonomik durum, kolorektal kanser gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmektedir (Bailey, 2015). Erişkin kolorektal kanserlerin yaklaşık %35 'inin kalıtsal kolorektal kanser sendromları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir ve insidanstaki artışın nedeni şu anda bilinmemektedir. Etkili tarama önlemleri, erken müdahaleler, daha iyi tedavi seçenekleri nedeniyle, kolorektal kanserden ölüm oranı 1990'dan 2007'ye yaklaşık %35 azalmıştır ve günümüzde en yüksek ölüm oranlarından yaklaşık %50 oranında azalma tespit edilmiştir (Siegel, 2017).

2.3.2. Risk Faktörleri

Kolorektal kanserin gelişmesinde yaş, genetik ve çevresel faktörler büyük rol oynamaktadır. Kalıtsal kolorektal kanser sendromları arasında Lynch Sendromu (Kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser), ailevi adenomatöz polipoz (FAP), MUTYH (mutY DNA glycosylase) ile ilişkili polipoz (MAP) bulunur. Lynch sendromu ve ailevi adenomatöz polipoz, tüm kolorektal kanser insidansının sadece yaklaşık %5 'ini oluşturan kalıtsal kolorektal kanser sendromunun büyük çoğunluğuna katkıda bulunur (Thanikachalam, 2019). Yukarıdaki kalıtsal kolon kanseri sendromlarının yokluğunda bile birinci derece akrabalarda ailede kolon kanseri öyküsü bulunması, vakaların yaklaşık %20 'sinde kolorektal kanser gelişme riskini artırır. Birinci derece akrabalarda kolorektal kanser öyküsü ile genel popülasyonla karşılaştırıldığında risk iki katın üzerinde artmaktadır.

Kolorektal kanser ile diğer iyi bilinen ilişkiler arasında Afro-Amerikan etnik köken, erkek cinsiyet, iltihaplı bağırsak hastalığı - crohn hastalığından daha sık ülseratif kolit, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, kırmızı et ve işlenmiş et, tütün kullanımı, alkol kullanımı, abdominal radyasyon öyküsü, akromegali, immünosüpresif ilaçların kullanıldığı böbrek nakli, diabetes mellitus ve insülin direnci, androjen yoksunluğu tedavisi, kolesistektomi, koroner arter hastalığı ve üreterokolik anastomoz olarak sıralanabilmektedir (Finlay, 2018).

KRK insidansında azalma ile ilişkilendirilen koruyucu faktörler arasında düzenli fiziksel aktivite, meyve ve sebzeler açısından zengin diyet, yüksek lifli diyet, folat açısından zengin diyet, kalsiyum, süt ürünleri, D vitamini, Vitamin B6, magnezyum alımı, balık tüketimi, düzenli aspirin kullanımı, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar bulunmaktadır. Shivappa ve arkadaşları tarafından yapılan yakın tarihli bir meta-analizde, besinlerin 'diyet inflamatuvar indeksi (Dİİ)' kullanılarak belirli gıdalarda KRK insidansında artmış risk olduğunu gösterilmiştir. Yüksek bir Dİİ skoru pro-inflamatuar potansiyel ile korelasyon göstererek KRK riskini artırmıştır. Burada daha düşük bir Dİİ skoru anti-inflamatuar potansiyel ile korelasyon göstererek KRK riskini azaltmıştır (Shivappa, 2017). Anti-inflamatuar gıda bileşenleri arasında lif, alkol, tekli doymamış yağ asitleri, çoklu doymamış yağ asitleri, omega 3, omega 6, niasin, tiamin, riboflavin, B6 vitamini, B12, çinko, magnezyum, selenyum, A vitamini, C vitamini, D vitamini, E vitamini, folik asit, beta karoten, antosiyanidinler, flavan-3-ols, flavonoller, flavanonlar, flavonlar, izoflavonlar bulunmaktadır. Birkaç çalışma ise, alkol tüketimi ile kolorektal kanser insidansı arasında nedensel bir rol olduğunu göstermiştir (Fedirko, 2011; Cho, 2004; Mizoue, 2008).

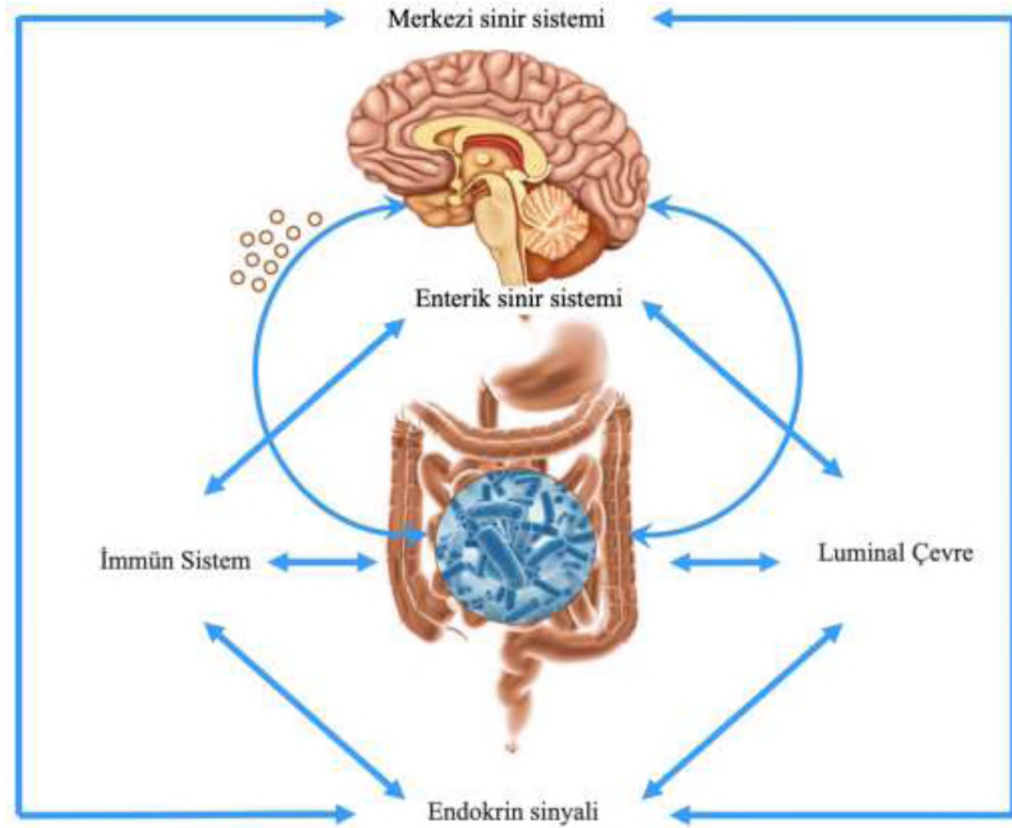
İleriye dönük yapılan çalışmaların meta-analizi, yoğun alkol kullanımı (>50 g/gün) ile kolorektal kanserle ilişkili mortalite arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Cai, 2014; Dashti, 2017).

Beslenmenin önemi birçok kanser çeşidinde gösterildiği üzere kolon kanseri üzerine de bilhassa etkilidir. Beslenme gastrointestinal sistem ve kolon sağlığı üzerine bu

kadar etkiliyken üzerinde durmak istediğimiz asıl konu microbiota ve probiyotiklerdir.

2.4. Gastrointestinal Mikrobiota

Gastrointestinal Mikrobiyota (GM) 3 milyondan fazla gen içeren ve enzimlerin üretiminde rol alan sağlıklı yaşam veya hastalığa neden olabilecek metabolitler üreten son derece karmaşık bir ekosistemdir. Bazı hipotezlere göre; KKK, kronik inflamatuvar ve metabolik hastalıklardaki hızlı artışa bakıldığında kentsel yaşamın yakın zamandaki evrimsel sürece etkisi ve bakteri çeşitliliğindeki büyük daralmanın önemli bir rolü olduğu öne sürülmektedir. Antibiyotik kullanımı, diyet değişiklikleri ve bulaşıcı hastalıklar, konağın mikrobiyotasında değişikliklere neden olmaktadır. Sonuç olarak, organizma çeşitliliğinin daralması da olası fonksiyonel eksikliklere ve metagenomik bileşenlerin kaybına yol açmaktadır (Hand, 2016). Kolonik mikrobiyal fermentasyondan kaynaklı metabolitlerin türü ve miktarı büyük ölçüde mikrobiyal kompozisyona, geçiş süresine ve substrat varyasyonuna bağlıdır. Bu fermentasyon ürünlerinden bazılarının kolon epiteli üzerinde koruyucu etkileri, ancak bazı metabolitlerin ise proinflamatuvar veya prokarsinojenik etkileri olduğu görülmüştür. Mikrobiyota tarafından üretilen metabolitler, sağlığa yararlı veya patojenik olabilir. Mikrobiyota, merkezi sinir sistemi dahil vücuttaki tüm immün süreçleri etkilemektedir. Bağırsak beyin ekseninin iki yönlü olduğu bilinmektedir (Şekil 2.3.) ve konağın genetik yapısının yanında mikrobiyal ekosisteminden de etkilenmektedir. Bunlar dışında mikrobiyota, oksidatif toksisite yoluyla nörodejenerasyona ve iltihaplanmaya da neden olabilmektedir (Hamer, 2011).



Şekil 2.3. Bağırsak mikrobiyomu, bağırsak ve beyin arasındaki çift yönlü iletişim kanalları. Bağırsak mikrobiyotası ve bağırsaktaki özel hücreler tarafından üretilen endokrin, nörokrin ve iltihaplanma ile ilgili sinyaller, prensipte beyni etkileyebilir. Buna karşılık beyin, mikrobiyal bileşimi ve işlevi endokrin ve sinir mekanizmaları yoluyla etkileyebilir (Hamer, 2011).

İnsan vücudunun çeşitli mikrobiyotalar yoluyla kolonileştirilmesi, dengeli ve çeşitli bir ekosistemin yaratılması, çok fazla zaman gerektiren özel bir süreçtir. Gastrointestinal ekosistem doğum anından itibaren oluşmaya başlayan ve yaşam boyunca değişen bir oluşumdur. Doğum öncesi dönemde ise mikrobiyomun şekillenmeye başladığına dair göstergeler de mevcuttur (American Cancer Society Colorectal Cancer Facts & Figures, 2019; Ferlay, 2015). Bunun dışında mikrobiyota bazı değiştirilebilir (örneğin diyet, antibiyotikler) ve değiştirilemeyen faktörlerden (yaş, cinsiyet) etkilenir. Etkileşimlerinin bu etkileri kolon tümörlerini veya irritabl bağırsak sendromu (IBS) gibi enflamatuar bağırsak hastalıklarını başlatabilir. Bu da, yaklaşık olarak 1000 mikroorganizma türüne ait gram başına 10^{12} (cfu/g) 'den fazla

mikroorganizma içeren çok çeşitli bir ekosistemdir. Bakteriler tarafından kolona yapılan kolonizasyon, metabolik ve enzimatik potansiyeller üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Bakteriler, birçok endojen ve eksojen bileşiğin metabolizmasına katılır. Oluşan bu bakteriyel aktivite nedeniyle, konakçının fizyolojisini yararlı veya zararlı bir şekilde etkileyen birçok bileşik oluşur. Gastrointestinal sistemdeki (GIS) bakteri sayısı ve cinsi Çizelge 2.1.'de özetlenmiştir (Tárraga, 2015).

Çizelge 2.1. İnsan GIS'deki mikroorganizma miktarı ve türleri (Wronkowski, 2018).

Gastrointestinal Sistem	Toplam Kolonik Sayı (log CFU / mL)	Ana Mikroorganizma Türleri
Oral kavite	10^8	Streptococcus, Eubacteria, Capnocytophaga, Veillonella, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Neisseria, Treponema, Lactobacterium, Eikenella, Leptotrichia, Peptostreptococcus, Propionibacterium, Rothia, Scardovia, Parascardovia, Pentostreptococcus, Propionibacterium, Rothia, Scardovia, Parascardium Alternaria, Geotrichum
Yutak	10^{4-6}	Streptococcus, Prevotella, Veillonella
Mide	10^{2-4}	Helicobacter (pylori türleri), Lactobacillus, Staphylococcus, Streptococcus, Clostridium, Capnocytophaga, Deinococcus, Veillonella, Escherichia, Bifidobacterium, Prevotella, Caulobacter, Actinobacillus, Corynphibacterium, Rothia, Gemella, Leptothia, Gemella
Onikiparmak bağırsağı	10^3	Enterococcus, Lactobacillus, Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Enterobacteriaceae, maya
Jejunum	10^4	
İleum	10^7	
Kalın bağırsak	10^{10-11}	Enterococcus, Lactobacillus, Bacteroides, Fusobacterium, Bifidobacterium, Clostridium, Enterobacteriaceae, Peptococcus, Peptostreptococcus, Staphylococcus, Ruminococcus, Eubacterium, Streptococcus, Actinomyces (mikroskobik) türleri, Finegoldiaccus türleri, Finegoldiaccus) tür coli), Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Enterococcus (faecalis türleri), Bacillus
Rektum	10^{11-12}	

Gastrointestinal mikrobiyotaya dinamik yapısı ile karakterizedir. Bu sisteme dahil olan probiyotikler, "yeterli miktarlarda alındığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanır (Libudzisz, 2016). Bunlar doğal bağırsak mikrobiyotasına ait çoğunlukla laktik asit bakterileridir (LAB); *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Pedococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Weissella* ve *Bifidobacterium*, ayrıca *Saccharomyces*, *Bacillus* ve *Escherichia* (Collado, 2016; Niederreiter, 2018). Belirli bir türdeki tüm bakterilerin aynı özelliklere sahip olmadığı ve organizmada aynı etkiyi göstermeyebileceği bilinmektedir. Her durum

suşa bağılıdır ve her suş probiyotik bir suş değildir (Krakowiak, 2015). Belgelenmiş özelliklere sahip probiyotik tür / suş örnekleri aşağıda belirtilmiştir (WHO, FAO, 2002);

Lactobacillus casei shirota, kolorektal kanser ve mesane kanseri üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir. Bağırsak mikrobiyomunun dengesinin korunmasında olumlu etkiler gösterir ve ayrıca bağırsağı rahatsızlıklara karşı korur. İmmünomodülatör etkiye sahiptir ve fagositler yoluyla interlökin-12 (IL-12) üretimini indükleyerek konağın bağışıklık savunmasını güçlendirebilir. Kolorektal kanser tedavisine destek olur, fekal enzimlerin aktivitesini azaltır ve organizmayı gıda mutajenlerine karşı korur,

Lactobacillus fermentum NCIMB 5221, hiperinsülinemi, insülin direnci, hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemiye potansiyel olarak modüle edebilir. Antiproliferatif etkiye sahiptir,

Weissella cibaria JW15, doğal öldürücü hücrelerin (NK) aktivitesini artırarak bağışıklık sisteminin işlevini güçlendirir,

Saccharomyces cerevisiae var. *boulardii* 'nin antiinflamatuvar ve antibakteriyel etkileri vardır. İmmüoglobulin A (IgA) sekresyonunu artırır ve epitel bariyerinin bütünlüğünü korur. Seyahat edenlerin ishal tedavisinde yardımcı olduğu da bilinmektedir.

Bu ve daha birçok faydalarından dolayı probiyotik bakteriler bağırsak mikrobiyotasında önemli bir basamakta incelenmektedir.

Bakterilerin ana yaşam alanı bağırsaklardır. Bu nedenle bakterilerin sindirim sisteminin bu kısmına canlı haldeyken ulaşması önemlidir. Bu nedenle, sindirim enzimlerinin etkisine karşı bakteriyel direnç veya mide suyunun düşük asitlik seviyesi gerekli görünmektedir (Fiedurek, 2014). Antibakteriyel özellikleri sayesinde probiyotik bakteriler, patojenik bakterilerin büyümesini ve epitel hücelere

yapışmasını azaltır. Besin maddeleri için diğer mikroorganizmalarla rekabet ederler. Buna doğrudan etkileşim denir. Ayrıca, bakteriyosin gibi antimikrobiyal aktivite bileşiklerinin üretimine bağlı olan dolaylı bir etki de vardır. Dolayısıyla probiyotikler, bağırsak ekosisteminin kalitatif ve kantitatif bileşimini etkileyebilirler (Fijan, 2014).

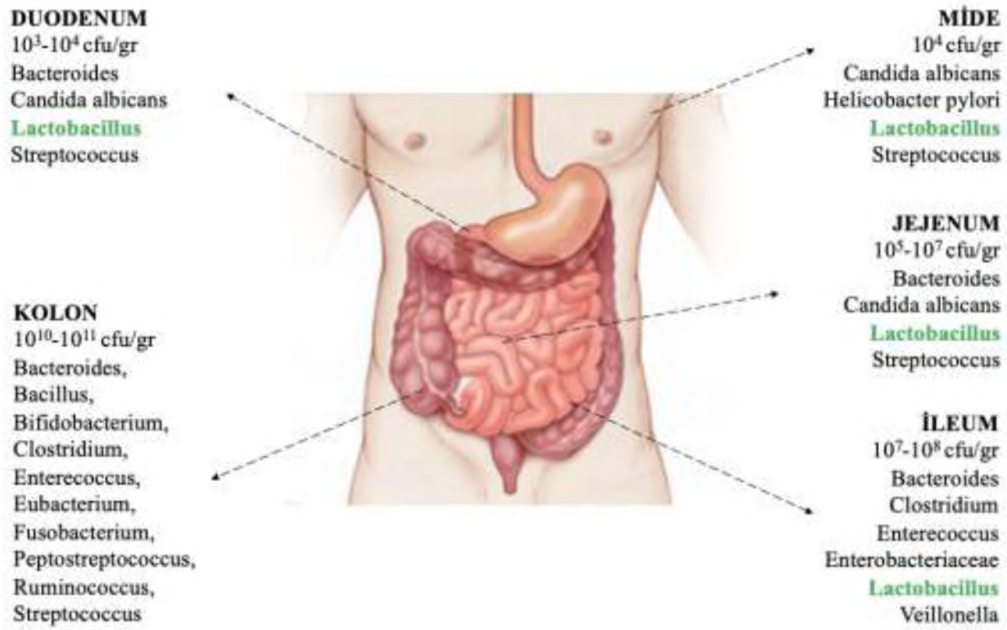
2.5. Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri

İnsan yaşamı boyunca meydana gelen değişikliklerin yanında sindirim sisteminin mikrobiyotası da vücutta önemli işlevleri yerine getirir. Metabolik fonksiyon, seçilmiş B vitaminlerinin üretimi, K vitamini, sindirilmiş ve sindirilmemiş gıda artıklarının fermantasyonu, kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) şeklinde enerji depolamasından oluşur. Trofik fonksiyon ise, bağışıklık sisteminin homeostazına ve ayrıca bağırsak epitelinin kontrolüne dayanır; ve bağırsakta patojenik bakterilerle yararlı bakteriler arasındaki rekabet ile ilişkili koruyucu bir işlev bulunmaktadır (Jach, 2013; Mojka, 2014).

Lactobacillus ve *Bifidobacterium* cinsine ait bakteriler bağırsakta anti-inflamatuar etki gösterir. Dolayısıyla bu bakterilerin azalması, hastaların sistemik dolaşımında proinflamatuar sitokinlerin seviyesinin (örneğin; İnterlökinler 6 ve 8; tümör nekrozis faktörü- α) yükseldiği düşük bir inflamasyon derecesine sebep olabilir (Liong, 2008; Moraes-Filho, 2015).

2.6. Probiyotikler

İnsan vücudu, insan hücrelerinden on kat daha fazla mikrobiyal hücre içerir. Bu mikroorganizmalar ağız boşluğu dahil vücudun her yerinde bulunur; cilt, ürogenital, solunum ve gastrointestinal sistem gibi, fakat gastrointestinal sistem (GI) bunların içerisinde en yoğun kolonize organdır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Gastrointestinal sistemin farklı bölümlerinde bulunan mikroorganizmalar (Coşkun, 2006).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2001 yılında probiyotikleri "yeterli miktarda uygulandığında konağa sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlamıştır (Bubnov, 2018). Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için; aşağıda verilen belirli koşulları sağlaması gerekmektedir. Bazı probiyotik suşlar Çizelge 2.2 'de listelenmiştir.

- Öncelikle, endüstriyel bir süreçte bile yaşıyor olmalıdır.
- Raf ömrü boyunca dayanıklı olmalıdır.
- Tüketimden sonra bağırsakta yaşayabilmelidir.
- Ev sahibi kişiye sağlık yararları sağlamalıdır (Fuller, 1992).

Çizelge 2.2. Bazı Probiyotik Suşların Listesi (Holzapfel, 2001).

<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifidobacterium</i> species
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. animalis</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>B. breve</i>
<i>Lb. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>
<i>Lb. paracasei</i>	<i>B. longum</i>
<i>Lb. plantarum</i>	
<i>Lb. reuteri</i>	
<i>Lb. rhamnosus</i>	
Other lactic acid bacteria	Non-lactic acid bacteria
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Leuconosioc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	

2.7. Probiyotiklerin Sağlığa Yararları

Her mikroorganizma 'probiyotik' olarak kabul edilemeyeceğinden, onları tanımlamak için bazı zorunlu ve belirleyici kriterler vardır. Bu kriterlerden bazıları aşağıda verilmiştir.

- İnsan üzerinde olumlu bir etki sergilemeli ve herhangi bir patojenik etkiye sahip olmamalıdır;
- Gıdalarda dayanıklı olmalı ve gıdanın raf ömrü boyunca canlı kalmalıdır,
- Gastrointestinal sistem boyunca dayanabilmeli,
- Bağırsak epitel hücrelerine tutunup ve kolonileşebilmelidir,
- Mide ve bağırsakta safra tuzu ve mide asidi gibi sert koşullara dirençli olmalı,
- Antimikrobiyal maddeler üretebilmelidir,
- Bazı zorlu teknolojik süreçleri hızlandırabilmelidir,

- Sağlık için olumlu etkileri olup ve bağırsak mikroflorasını düzenleyebilmelidir (Shewale, 2014).

Probiyotikler, yeterli miktarlarda alındığında birçok sağlık yararı kanıtlanmış mikroorganizmalardır. Bu faydalardan bazıları Çizelge 2.3 'de gösterilmektedir. Pek çok bilimsel kaynak gıdalardaki probiyotik konsantrasyonunun yararlı olması için en az 10^6 cfu/gr veya cfu/ml olması gerektiğini belirtmesine rağmen, probiyotiklerin terapötik etkilerinden yararlanmak için probiyotiklerin günlük tüketim seviyesi 10^8 - 10^9 cfu/gr veya cfu/ml olmalıdır (Kechagia, 2013).

Probiyotiklerin insan sağlığı üzerinde çeşitli yapıcı sonuçları vardır ve her geçen gün yeni araştırmalara yer verilmektedir. Bu sağlık yararlarından bazıları ve insan vücudundaki ilgili mekanizmalar Çizelge 2.3 'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.3. Probiyotiklerin bazı faydaları ve mekanizmaları (Nagpal, 2012).

Sağlık yararları	İlgili mekanizmalar
Alerjik reaksiyonlara karşı etki	Antijen miktarını ayarlayarak ve bunun translokasyonunu inhibe ederek immünolojik yanıtların seviyesini kontrol etme
Bağışıklık sistemini güçlendirir	Kontaminasyona ve tümörlere karşı savunmanın güçlendirilmesi ve desteklenmesi. Th1 / Th2 seviyesinin ayarlanması, zararlı metabolitlerin azaltılması
Yüksek tansiyonu düşürür	Peptidaz aktivitesi, antihipertansif tripeptidler ve ACE inhibitörleri gibi görünen hücre duvarı bileşenleri sağlar
Kolesterol seviyesini düşürür	Safra tuzu hidrolaz enzimlerinin etkisinde değişiklik, safra asitlerinin dekonjugasyonu ve antioksidatif etki
Anti-kanserojen, anti-tümör etki	Mutajen asimilasyonu, immünomodülatör tetikleyici, bağırsak mikroflorası tarafından kansere neden olan ajan oluşumunun engellenmesi.
Helicobacter pylori kontaminasyonu	H. pylori'nin mukoza hücrelerine yapışmasına izin vererek büyümesini ve çoğalmasını önlemek.
Sindirim sistemini ve gastrointestinal sistemi etkileyen endikasyonları düzenler	Özellikle Lactobacill aktivitesi sayesinde bağırsak mikroflorasını düzenleyerek zararlı metabolitleri azaltma
Besin değerini artırır	Bir enzimin katalizör aktivitesi için gerekli vitamin ve kofaktör üretimini sağlama
Kolon kanserine karşı yararlı etkileri vardır	Kanserojen özellik gösteren zararlı metabolitlerin yok edilmesi, bağışıklık sistemini iyileştirme, kolon mikroorganizmalarının zararlı enzimatik hareketlerini ayarlama
Ürogenital sağlık için önemlidir	Ürogenital bölgeye yapışmaya yardımcı olma, biyoyüzey-aktif maddeler gibi inhibitör oluşumu, patojenik aktiviteyi sınırlama

2.8. Bağırsak Epitel Bariyerinin Probiyotiklerle Güçlendirilmesi

Bağırsak mukozasının bütünlüğünün bozulması ve bariyer disfonksiyonu, alerjenler için geçirgenliğin artmasına neden olarak, bağışıklığın stres tepkisine ve iltihaplanmaya yol açmaktadır (Rao, 2013). Enflamatuvar reaksiyon, belirli bir bölgede ve ona bitişik mukozada başlar. Patojenik bakteri bağırsak epiteline girerse, epitel bariyerine zarar vererek KRK riskini artırır (Kahouli, 2013). Normal koşullarda, bağırsağın bariyer işlevi bağırsak sistemini toksinlere, patojenlere ve diğer hasarlara karşı koruyabilir. Tam bağırsak mukozal bariyeri, fiziksel, immünolojik, kimyasal ve biyolojik bariyerleri içermektedir (Liu, 2016).

Epitel hücrelerinin sinyal yolları; tüm mikroorganizmalar, bunların yapısal bileşenleri ve onlar tarafından üretilen metabolitler tarafından uyarılır (Madsen, 2012). Hsieh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Bifidobacterium* cinsine ait bazı bakteri türlerinin epitel bütünlüğünü geliştirme ve TNF- α 'nın neden olduğu epitel bariyerinin bozulmasını önleme kabiliyetine sahip olduğunu gösterilmiştir (Hsieh, 2015). Diğer bazı araştırmacılar, nekrotizan enterokolitin in vitro bir modelinde, *Lactobacillus* suşlarının, sıkı bağlantıların bütünlüğünü ve bağırsak bariyerini güçlendirdiğini göstermişlerdir (Blackwood, 2017).

2.9. Probiyotik Suşlar

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak sınıflandırılması için belirli kriterleri taşınması gerekmektedir. Tüm probiyotikler aynı etkiye ve aynı terapötik özelliklere sahip değildir. İstenilen terapötik etkilere ulaşmak için doğru suş seçimi ve miktarı oldukça önemlidir. Bu nedenle olası en iyi probiyotik seçimi önemlidir. Probiyotikleri seçmenin temel amacı, güvenli ve istenen özelliklere sahip olmaları ve çeşitli avantajlar yaratmalarıdır. Dahası, tüketiciye ulaşana kadar yeteneklerini korumalarıdır (Nagpal, 2012).

2.10. Suş seçimi

Doğru probiyotik suşunun seçimi, ürünleri canlı probiyotik kültürlerle formüle etmede ve sağlık yararları sağlamada çok önemli bir faktördür (Terpou, 2019). Probiyotik suşu seçerken, işlemeye dayanıklılığı, bağırsaklarda yaşayabilirliği, büyümesi ve insan üzerindeki terapötik endikasyonları büyük önem taşımaktadır. In vitro ve in vivo araştırmalar, yukarıdaki standartları sağlamak için kullanılabilir ve ayrıca bu araştırmalar probiyotikleri nitelendirirken suş ve aktivitesi hakkında da bilgi verir.

Suşların tanımlanabilmesi ve karakterizasyonu için fenotipik ve kalıtsal yöntemlerin bir karışımının kullanılması önerilmektedir. Öncelikle hayvanlar üzerinde in vitro deneyler yapılır. Hayvan deneyleri başarılı olduğunda, suşu karakterize etmek için klinik muayeneler, hasta araştırmaları ve büyük insan araştırmaları yapılır (Robinson, 2005).

Gıda üreticilerinin probiyotik gıdaların üretimi sırasında dikkate alması gereken özelliklerden bazıları FDA ve WHO tarafından ortaklaşa belirlenmiş ve aşağıda verilmiştir:

1. Ürünlerdeki tüm suşların kaydedilmesi ve ürün içeriğindeki tüm probiyotiklerin suş derecesinin uygun açıklaması,
2. Kullanılabilirlik süresinin (raf ömrü) doğruluğunun garantisinin dürüst ve aldatıcı olmadan işaretlemesi,
3. Güvenlik ve kapasitesi için; gerekli olan özellikler için her türün tasviri,
4. İnsan araştırmalarında tıbbi avantajların onaylanması (Sanders, 2008).

2.11. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), gram pozitif bakterilerin önemli bir parçasıdır ve spor oluşturmeyen, aside dayanıklı, solunmayan çubuk veya kok mikroorganizmaları olarak sınıflandırılabilirler. İsimleri, karbonhidratların fermantasyonundan sonra

ürettikleri laktik asitten gelmektedir (Axelsson, 2004). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* ticari olarak probiyotik bakteriler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır ve bunların arasında; *Lactobacilli*, insan mikrobiyotasının önemli bir bölümünü temsil etmektedir. *Lactobacilli* cinsi gıdalarda, özellikle süt ürünleri, balık, et ve fermente gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunur. Mikroorganizmalar için ölümcül olabilen mide pH 'ıyla baş edebilirler. İnce bağırsakta ve insan vajinal mikrobiyotasında çok yoğun olan bakteriler arasındadırlar. Ayrıca, gıda fermantasyonunda önemli bir rol oynamalarının yanı sıra, antimikrobiyal aktivite, bağışıklığın artırılması, anti-tümorojenik aktiviteler gibi bazı önemli tıbbi etkilere sahiptirler ve konakçı immünomodülasyonunu indükleyerek stabilize edebilirler ve çok çeşitli gastrointestinal bozuklukların semptomlarını azaltabilirler. En bol bulunan laktobasiller, *L. casei*, *L. delbruckeii*, *L. murinus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* ve *L. ruminus* ve *L. rhamnosus*, sindirim sistemi dışındaki koşullardan neredeyse hiç izole edilmez ve cilt ve mukozal yüzeyleri kolonize ettikleri için bağırsakta otokton mikroorganizmalar olarak kabul edilir (Heeney, 2018).

LAB'leri genellikle güvenli gıda sınıfı mikroorganizmalar olarak kabul edilirler ve teknolojik olarak endüstriyel prosesler için uygundur. Bu nedenle doğal olarak birçok gıda için starter kültür olarak kullanılırlar. LAB 'nin çoğu, başlangıç kültürleri olarak kullanılmaktadır. Süt fermantasyonları için, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve ayrıca bazı *Leuconostoc* veya diğer *Lactobacillus* spp. kullanılmaktadır (Russo, 2015). LAB suşları ayrıca gıda endüstrisinde şu amaçlarla kullanılmaktadır: un oluşumu, muhafazası ve fermente ürünlerin üretimi gibi (Zhang, 2010).

Günümüzde birçok probiyotik bakteri (çiğ süt, peynir, yoğurt ve tereyağı) özellikle *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* hem gıdalarda hem de ilaç pazarında bulunabilmektedir (Öner, 2014). *Lactobacillus* diğer laktik asit bakterilerinden farklı olarak insanlar için önemli bir yerdedir. Bazı *Lactobacillus* türlerinin yaygın olarak ishal veya kabızlığın önlenmesi ve tedavisinde, bağırsaktaki mikrobiyotanın denge durumunun antimikrobiyal kullanılarak iyileştirilmesi, kolesterolün düşürülmesi, laktoz intoleransı semptomlarının azaltılması, gıda alerjisinin engellenmesi,

bağışıklık sistemine destek ve asit ve safra toleransı ile antitümörjenik kapasiteler gibi etkileri bilinmektedir (Shehata, 2016).

2.12. *Lactobacillus* Cinsi

Laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* cinsi karbonhidrat metabolizması ile karakterizedir. Gram pozitif ve kesinlikle fermentatiftirler, mikro-aerofilik ve kemo-organotrofik, spor oluşturmeyen, çubuk ve kokobasil şeklinde tanımlanırlar (Stiles, 1997; Felis, 2007). *Lactobacillus*, glikoliz işlemi sırasında laktik asit üretmek için katalizör görevi görebilen bir bakteri grubudur.

Bu grup, sağlıklı vajinada baskın olan bakteridir ve kadın üreme sisteminin korunmasında önemli rol oynar. *Lactobacillus*, hücrel ve humoral bağışıklığı etkiler. Bir yandan, bu bakteriler timustan köken almış hücrelerin (T hücreleri) çoğalmasını ve farklılaşmasını artırabilir, öte yandan da, bir bağışıklık duyarlılaştırıcı olarak *Lactobacillus*'lar, kemik iliğinden köken almış hücrenin (B hücreleri) immünolojik olarak tanınmasını ve çoğalmasını artırabilirler (Lee, 2010; Yao, 2007). *Lactobacillus* ayrıca makrofajları uyararak ve kanser hücrelerinin enerji metabolizmasını bozarak nitrik oksit (NO) üretir (Sandes, 2017).

Ayrıca, diğer probiyotiklerle kombinasyon halinde uygulanan *Lactobacillus* türleri, irritabl bağırsak sendromu (IBS) vakalarına fayda sağlar, ancak etkinlik derecesi hala belirsizdir. Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotası alışılmadık derecede yüksek seviyelerde fırsatçı bakteriye maruz kaldığında homeostazı döndürerek IBS'yi tedavi etmeye yardımcı olur. Ek olarak, *Lactobacillus* türleri ülsera neden olan *Helicobacter pylori* bakterisinin neden olduğu enfeksiyon vakalarında probiyotik olarak da uygulanabilmektedir. *Helicobacter pylori* kanserle bağlantılıdır ve antibiyotik direnci, mevcut antibiyotik bazlı eradikasyon tedavilerinin başarısını engellemektedir. *Lactobacillus* probiyotikleri, bir adjuvan olarak tedavi ile birlikte uygulandığında, etkinliği büyük ölçüde artar ve yan etkileri azalabilir (Ruggiero, 2014). Ayrıca *Lactobacillus*, bakteriyel vajinoz (BV) gibi ürogenital ve vajinal enfeksiyonların kontrolüne yardımcı olmak için kullanılırlar. *Lactobacillus*, laktik asit ve H₂O₂'nin (hidrojen peroksit) yanı sıra belirli bakterilerin patojenik büyümesini

baskılamak için bakteriyosinler üretir. Laktik asit vajinal pH'ı yaklaşık 4,5 veya altına düşürerek diğer bakterilerin hayatta kalmasını engeller ve H₂O₂ normal bakteriyel mikrobiyotayı ve normal vajinal pH'ı yeniden oluşturur. Çocuklarda, *L. rhamnosus* gibi *Lactobacillus* suşları, bu probiyotik bakteriler tarafından salgılanan anti-enflamatuar sitokinlere bağlı olarak, dermatit olarak da bilinen atopik egzamanın azalması ile ilişkilidir. Ayrıca olgunlaşmış süt ve yoğurttaki diğer probiyotik organizmalarla birlikte laktobasil, LgA (+) sayısını artırarak insanlarda bağırsak mukozasında bağışıklık gelişimine yardımcı olur (Cribby, 2014; Ashraf, 2014).

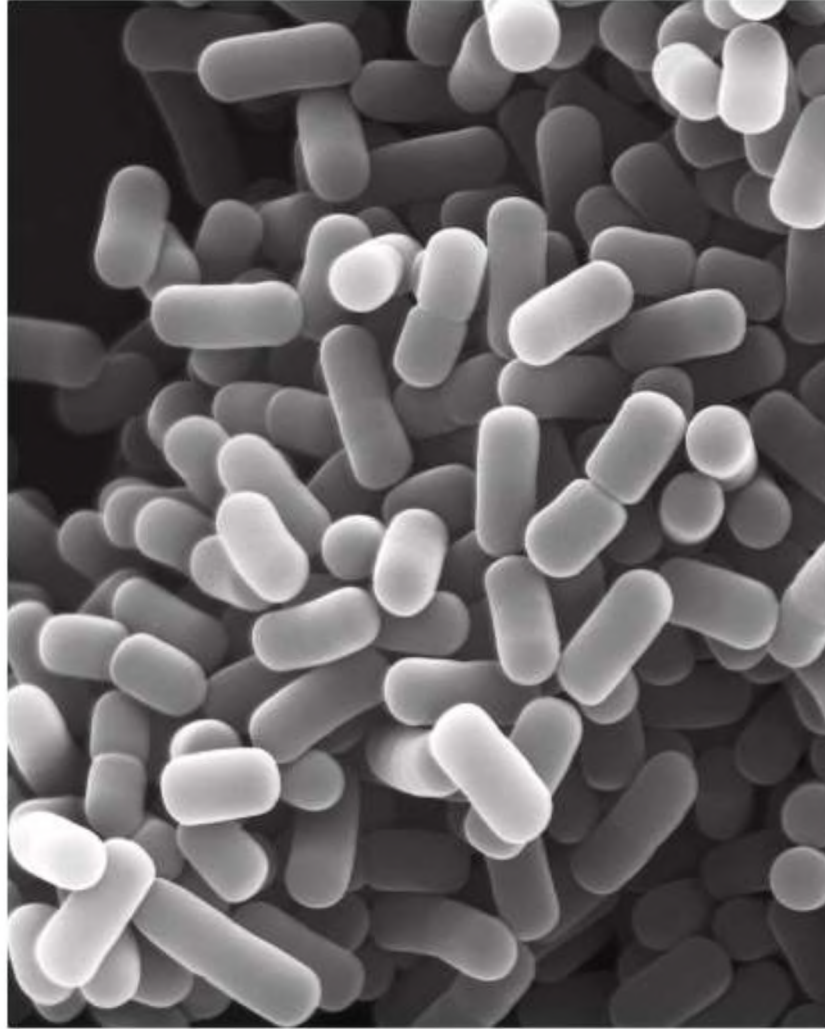
Literatürde laktik asit bakterilerinin, özellikle *Lactobacillus*'un tedavi amaçlı kullanılan türlerinin karsinogenezin başlamasını veya ilerlemesini birden fazla yolak ile inhibe ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Probiyotiklerin, kolorektal kanser mekanizmasını inhibe etmesi, modüle bağırsak mikrobiyotası, kolon fizikokimyasal koşullarının iyileştirilmesi, bağırsak epitel bariyerini güçlendirmek, bakterileri azaltmak zararlı enzimler üretmek, kanserojenleri etkisiz hale getirmek, anti-kanserojen metabolitler üretmek ve bağırsak iltihabını hafifletmek, probiyotiklerin antikanser aktivitesinin altında yatan mekanizmalar olmamasına rağmen iyi bilinmektedir. Spesifik bir örnek olarak, *L. plantarum* 'un bağışıklık sistemini modüle ettiği ve kolorektal kanseri inhibe ettiği azoksimetan ve dekstran sodyum sülfat tarafından indüklenen bir CRC modelinde gösterilmiştir (Lee HA, 2015).

2.13. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum, birçok fermente gıda ürününde ve anaerobik bitki maddelerinde yaygın olarak bulunan *Lactobacillus* cinsinin yaygın bir üyesidir. Aynı zamanda tükürükte de bulunur (ilk izole edildiği yer). *L. plantarum* Gram pozitif, basil şeklindeki bir bakteridir. *L. plantarum* hücreleri, tek başına, çiftler halinde veya kısa zincirler halinde meydana gelen, genellikle 0,9–1,2 µm genişliğinde ve 3–8 µm uzunluğunda düz, yuvarlak uçlu (Resim 2.5) çubuklardır (E Giraud). *L. plantarum*, laktik asit bakterileri arasında bilinen en büyük genomlardan birine sahiptir ve çok

esnek, çok yönlü bir türdür. *L. plantarum*, pH 3,4 ile 8,8 arasında 12 ° C ila 40 ° C sıcaklık aralığında büyüebilmektedir. *L. plantarum*, birçok lactobacillus türü gibi, MRS ortamı kullanılarak kültürlenebilir (Giraud,1997).



Resim 2.1. *L. plantarum*, Dennis Kunkel Mikroskobu / Bilimsel Fotoğraf Kütüphanesi tarafından 3 Ekim 2018'de yüklenen bir fotoğraftır.

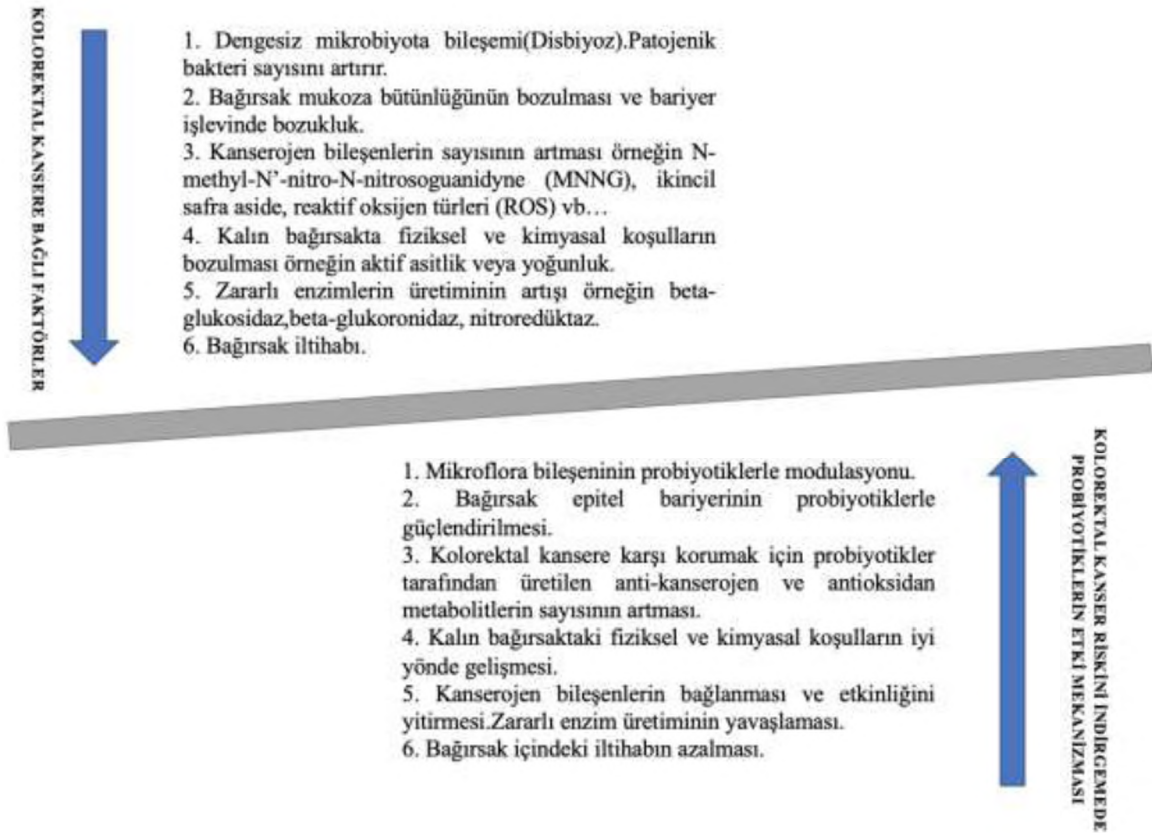
Laktobasiller, oksijeni soluyabilmeleri, ancak solunum zinciri veya sitokromları olmaması, tüketilen oksijenin hidrojen peroksit olarak son bulması nedeniyle sıra dışıdır (Matejčeková, 2016). Peroksitin, rakip bakterileri gıda kaynağından dışlamak için bir silah görevi gördüğü varsayılmaktadır. Hemen hemen tüm diğer oksijene toleranslı hücrelerde bulunan koruyucu enzim süperoksit dismutaz yerine, bu

organizma milimolar miktarlarda mangan polifosfat biriktirir. Manganez aynı zamanda *L. plantarum* tarafından reaktif oksijen seviyelerini düşürmek için kullanılır. Manganez komplekslerinin hücreleri oksijen hasarından koruduğu kimya, demir tarafından altüst edildiğinden, bu hücreler neredeyse hiç demir atomu içermez; tersine, karşılaştırılabilir hacme sahip bir *Escherichia coli* hücresi, bir milyondan fazla demir atomu içerir. Bu nedenle, *L. plantarum*, gerçek katalazlar gibi bir Hem kompleksi gerektiren aktif enzimler yaratmak için kullanılamaz (Brooijmans, 2009).

L. plantarum, bol olması, insan kaynaklı olması ve büyümesi kolay olması nedeniyle, sağlık etkileri açısından birçok kez test edilmiştir. Değerinin daha iyi anlaşılabilmesi için birçok çalışma ve uygulamaya ihtiyaç duyulmaktadır. *L. plantarum*, önemli antioksidan aktivitelere sahiptir ve ayrıca bağırsak geçirgenliğinin korunmasına yardımcı olur (Bested, 2013). Bağırsaklarda gaz üreten bakterilerin büyümesini baskılayabilir ve IBS'den muzdarip bazı hastalara fayda sağlayabilir. Mikrop dengesi oluşturmaya ve sindirim enzim modellerini stabilize etmeye yardımcı olur. *L. plantarum*, hipokampal beyinden türetilen nörotrofik faktörü artırmak için yapılan deneylerde bulunmuştur; bu, *L. plantarum* 'un depresyon tedavisinde yararlı bir role sahip olabileceği anlamına gelmektedir. *L. plantarum* 'un insan mide-bağırsak yolunda hayatta kalma yeteneği, onu terapötik bileşikler veya proteinler için olası bir in vivo uygulama aracı haline getirmiştir (Bixquert, 2009; Bested, 2013).

2.14. Kolorektal Kanser (KRK) Riskini Azaltan Probiyotik Etki Mekanizmaları

Kolorektal kanser riskinin azaltılabileceği birkaç mekanizma bilinmektedir (Şekil 2.5). Bu süreç bağırsak mikrobiotasındaki olumlu kalitatif ve kantitatif değişikliklerin yanı sıra metabolik aktivitede ve bağırsağın fizikokimyasal koşullarındaki değişikliklerle ilişkilidir (Wasilewska, 2013; Dos Reis, 2017).



Şekil 2.5. Potansiyel probiyotik etki mekanizmaları ve KRK ile ilgili faktörler
(Sobhani, 2011)

2.15. Mikrobiyota Kompozisyonunun Probiyotiklerle Modülasyonu

Mikrobiyal bileşimin kompozisyonu bağırsakta öbiyoz olmalıdır. Fakat bu kompozisyon bazen KRK geliştirmek için uygun koşulların meydana gelmesi üzerinde bir etkiye sahip olabilmektedir. Süreç bu şekilde tersine döndüğünde, bağırsak mikrobiyotasının işlevleri ve bileşimleri disbiyoz durumuna geçmektedir. Sonuç olarak, KRK riskini artırabilen kronik iltihaplanma meydana gelebilmekte ve kanserojenik bileşik üretiminde artış gözlemlenebilmektedir.

Sobhani ve arkadaşları yaptığı araştırmada sağlıklı insanlardan ve KRK hastalarından alınan dışkı örneklerini karşılaştırmışlar ve hem *Bacteroides* hem de *Prevotella* cinslerinin yoğunluğunun KRK çalışma grubunda önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (99). Bağırsak ekosisteminde; *Lactobacillus*' un bazı türleri *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Proteobacteria* cinsi bakterilerden daha düşük miktarlarda mevcuttur. Bunlara ek olarak, KRK'li hastalarda *Salmonella* ve *Clostridium* cinsinin birkaç türünün daha fazla sayıda mevcut olduğu da bulunmuştur (Kahouli, 2013).

Bacteroides spp. ve *Clostridium* spp. KRK patogeneğinde rol oynayan bakteriler olarak sınıflandırılmaktadır. Buna karşılık, laktik asit bakterilerine (LAB) ait mikroorganizmaların önleyici / koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Probiyotikler patojenik bakterilerle rekabet ederek miktarlarını azaltır ve LAB bakterilerinin sayısını artırırlar (Uccello, 2012).

Bacteroides fragilis, enterotoksijenik toksin (BFT, fragilisin) üretir. Bu toksin de, KRK riskini artıran bir bileşiktir. Wnt sinyal yolları, hücre farklılaşması ve hayatta kalma dahil olmak üzere bu süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. BFT toksini, hücresel proliferasyonu artırmak için beta-katenin ve nükleer transkripsiyon faktörü kapp B'ye (NF-kB) bağlı Wnt sinyal yolunu aktive eder. Bu toksin, kanserin ilerlemesine yol açan iltihaplanma araçlarının indüksiyonunu etkiler.

Bir diğer enfektif grup *Escherichia coli*, dört filogenetik gruba (A, B1, B2 ve D) ayrılır. B2 ve D grupları genellikle patojeniktir (parenteral ve bağırsak hastalıklarında rol oynarlar). Filogenetik grup B2'den bazı suşlar, KRK riski oluşturan kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı (örneğin, Crohn hastalığı) ile ilişkilidir (Bonnet, 2014). Yapılan bir çalışma, KRK 'lı kişilerde kolon zarı üzerinde *E. coli* (filogenetik grup B2'den) tarafından üretilen siklomodülünlerin sayısını göstermiştir. *E. coli* 'nin patojenik suşu, birkaç toksini, örneğin sitotoksik nekrotize edici ajan (SNF), sitoletal distansiyonlu toksinler (SDT) ve diğer çeşitli virülans faktörlerini sentezleyebilir. Siklomodülün, genotoksik bir toksindir. Hücre döngüsü ilerlemesi, hücre bölünmesi ve apoptozun bir modülatörü olabilir (Buc, 2013).

Bir organizmadaki probiyotikler, antibakteriyel özellikleri, epitele yapışma yetenekleri ve antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra patojenik bakterilerle rekabet yoluyla diğer mikroorganizmaları etkiler. Patojenleri bağlayabilir veya besinler için onlarla rekabet edebilirler. Probiyotik mikroorganizmalarının bakteriyosinler, dekonjuge safra asitleri, reuterin, hidrojen peroksit ve laktik asit gibi antimikrobiyal maddeler ürettiği bulunmuştur. Bu maddelerin her biri, probiyotik mikrobiyomların kanserojen ve patojenik mikropları engellediği unsurlardan biri olabilir (Gosai, 2011).

2.16. Postbiyotikler Metabolitler

Bilim insanları, probiyotik bakterilerimizin sağlığı düzenlenmesinde ne kadar önemli olduğunu anlamaya başladıkça, mekanizmalarını aramaya başladılar. Probiyotik bakterilerin keşfinden sonra yapılan çalışmalar ile birlikte, 'insan biyolojik işleyişinin çoğunu nasıl ve neden düzenleyebiliyor?' sorusu en çok merak edilen konu oldu. Probiyotik bakteriler, şaşırtıcı derecede karmaşık küçük kimyasal üretim tesisleridir. Metabolik süreçleri, gıdalardaki lifleri sindirmelerine ve fermente etmelerine olanak tanır, bu da "postbiyotik metabolitler" olarak bilinen çok çeşitli ve sağlığı düzenleyen bileşiklerin üretilmesine neden olur (Gosai, 2018).

2.17. Postbiyotiklerin Tanımı, Sınıflandırılması

Son yıllarda, çoğu araştırmacı şu tür terimleri kullanmıştır: "biyojenik", "hücesiz süpernatant", "abiyotik", "metabiyotik", "paraprobiyotik", "hayalet probiyotikler", "psödoprobiyotik" ve probiyotiğin cansız kısımlarını tanımlamak için "postbiyotik". Bunlar arasında literatürde en çok kullanılan terim 'postbiyotik' terimidir (Almada, 2016; Homayouni, 2020).

Postbiyotik'ler inaktive edilmiş mikrobiyal hücreler (ölü hücreler), hücre fraksiyonları (peptidoglikan türevi muropeptidler, teikoik asitler, endo ve ekzopolisakkaritler ve hücre yüzeyi proteinleri) veya canlı probiyotikler tarafından

üretilen hücre metabolitleri (Kısa Zincirli Yağ Asitleri, enzimler, bakteriyosinler ve organik asitler) olabilmektedir (Cicenia, 2014).

Daha iyi bilinen postbiyotik metabolitlerden bazıları şunları içerir:

- B vitamini sentezi (biyotin, kobalamin, folatlar, nikotinic asit, pantotenik asit, piridoksin, riboflavin ve tiamin (Hill, 1997),
- K34 Vitamini
- Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA'ler): asetik, propiyonik ve bütirik asit (Morrison, 2016),
- Glutasyon: *Lactobacillus fermentum* ME3 tarafından sentezlenene (Mikelsaar, 2009),
- Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) (Dobson, 2012),
- Fenilaktik asit (Ohhira, 2004),
- D-amino asitler (Cava, 2011),
- Hidrojen peroksit (Hertzberger, 2014),
- Uçucu organik bileşikler (Bos, 2013)
- Fitoöstrojenler: Equol, enterolakton, enterodiol (Frandenfeld, 2014)
- Ürolitin A ve ürolitin B (Larrosa, 2006)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın Tipi

Bu tez in vitro alternatif ve tanımlayıcı bir çalışma olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Araştırmanın Örneklemi ve Evreni

Bu araştırma, ticari hücre hatlarının kullanıldığı, *In Vitro* bir çalışma olarak gerçekleştirilmiştir. İnsan ya da hayvan materyali kullanılmamıştır.

3.1.3. Araştırmanın yürütüldüğü laboratuvarlar

Bu çalışma Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda, Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı ve Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.4. Araştırma için materyallerin temini

Çalışmamızda kolon kanseri hücre hatları (HT-29, CaCo-2) ve karşılaştırma amaçlı sağlıklı fibroblast hücre hattı (L929); Probiyotik olarak ise *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus reuteri* Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda, Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.5. Araştırmanın değişkenleri

Bağımsız değişkenler; *Lactobacillus plantarum*'un kendisi ve postbiyotik ürünleri; *Lactobacillus reuteri*'nin kendisi ve postbiyotik ürünleri; kolon mikroçevresi.

Bağımlı değişkenler; Hücre canlılığı, migrasyonu ve tümör hücre davranışı.

3.1.6. Araştırmada kullanılan kültür ortamları ve hazırlanışı

Probiyotik kültürü için ihtiyaç dahilinde besiyeri protokolüne uygun olarak tartılan MRS Broth (Merck) besiyeri distile su ile hazırlanmıştır. Deney öncesi pH'sı $6,8 \pm 0,02$ ayarlanarak steril edilmiştir. Hücre kültürü ortamı için Dulbecco's Modified Eagle Medium (Cegrogen Biotech, GmbH); %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Merck), penisilin/streptomisin ve L-glutamin ile complete olarak hazırlanmıştır.

3.1.7. Araştırmada kullanılan hücre hatları, malzeme ve cihazlar

HT-29 (tümörojenik kolon) hücre hattı
CaCo-2 (tümörojenik kolon) hücre hattı
L929 (sağlıklı fare fibroblast) hücre hattı
Dulbecco's Modified Eagle Medium
Fötal sığır serum
L-glutamin
Penisilin- Streptomisin (10,000U/ml)
Tripsin/EDTA Solusyonu
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi Dulbecco pH 7.4 (1X)
Tripan mavisi
Steril Dimetil sülfoksit (DMSO)
25cm ² hücre kültür flaskı
75cm ² hücre kültür flaskı
Filter Tip Universal (1000 µl)
Filter Tip Universal (200 µl)
Filter Tip Universal (20 µl)
Serolojik Pipette (5 ml)
Serolojik Pipette (10 ml)
Serolojik Pipette (25 ml)

Pasteur pipeti (5 ml)
Polipropilen santrifüj tüpü (15 ml)
Polipropilen santrifüj tüpü (50 ml)
Microcentrifuge tubes (1.5 ml)
Cryogenic Storage Vials (2 ml)
Etanol
Karbondioksit inköbatörü
Fosfat Buffer Saline (1X) (PBS)
İzopropil alkol
Gliserol
Elisa Okuyucu
MRS Broth (MERCK)
<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>
Spektrofotometre cihazı
pH Metre
5ml'lik cam deney tüpleri
Agar agar
Parafilm
Otoklav
0,45µm şırınga filtresi
0,22µm şırınga filtresi
Lam-Lamel
Gram boyama malzemeleri
Işık Mikroskopu
MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
İzopropil alkol
DMEM (without phenol red)
96 well plate
12 well plate

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü biyokimyasal, immünolojik, fizyolojik, metabolik ve patojenik birçok sürecin aydınlatılması; gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi; sinyal mekanizmalarının anlaşılabilmesi; hücre ölümü ve hücre canlılığı gibi olayların açıklanabilmesi için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Genel olarak hücre kültür ortamları %5 karbondioksit ve %95 oksijen içeren, hiperoksit nemli ve 37°C sıcaklığa sahip ortamlardır. Hücreler bu in vitro ortama uyum sağlayabildikleri koşulda canlılıklarını devam ettirebilirler.

3.2.2. Kanser ve Sağlıklı Fibroblast Hücre Kültürü

CaCo-2, HT-29 ve L929 hücre hatları deneylerde kullanılmak üzere T-25 flasklara açılarak çoğaltılmıştır. Hücrelerin canlılığını devam ettirebilmesi için %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 Penisilin/streptomisin ile zenginleştirilmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kullanılmıştır. Hücreler genel olarak 37°C'de, %5 karbondioksit içeren normoksik inkübatör ortamında çoğaltılmıştır (Resim-3.1).

Canlılığı pozitif şekilde devam ettirilen hücreler deneysel uygulama için istenilen yoğunluğa ulaştığında complete besiyeri uzaklaştırılıp hücre yüzeyi PBS ile 3 kere yıkanarak; Tripsin-EDTA ile 3-5 dakika karbonndioksit inkübatöründe 37°C'de enzim aktive edilerek, hücrelerin birbiriyle olan kaderin bağlantıları inhibe edilmiştir. Yeterli süre sonunda enzim aktivitesini durdurmak için complete medium (FBS içeren besin ortamı) eklenmiştir. Hücreler yaklaşık 1200 rpm'de 3-5 dakika arası santrifüj edilmiştir. TC20™ Automated Cell Counter cihazı ile Trypan-Blue boyası kullanılarak hücre sayımı yapılarak tüm deneyler için uygun hücre sayısı belirlenmiştir.



Resim 3.1. Hücreler 37°C’de, %5 karbondioksit içeren normoksik inkübatör ortamında çoğaltılmıştır.

3.2.3. TC20™ Automated Cell Counter cihazı ile hücre sayımı

Trypsin-EDTA ile kaldırılmış adheren hücre süspansiyonundan 10 µl alarak üzerine 10 µl %0.4’lük Trypan-Blue boyası ilave edilmiştir. Trypan-Blue negatif yüklü bir boyadır. Hücre membranı zarar görmemiş, canlı bir hücre ise, boya hücre içine giremez. Ancak canlı olmayan hücreler hücre membran bütünlüğü bozulduğundan boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi rengi yansıtırlar. Hücre süspansiyonu ve boya karışımından 10 µl alınarak ve TC20™ Automated Cell Counter hücre sayım lamına yerleştirilmiştir (Resim-3.2). Cihaz lamın sayım alanına göre mililitredeki total canlı ve ölü hücre sayısı ile birlikte canlılık yüzdesini de vermektedir.

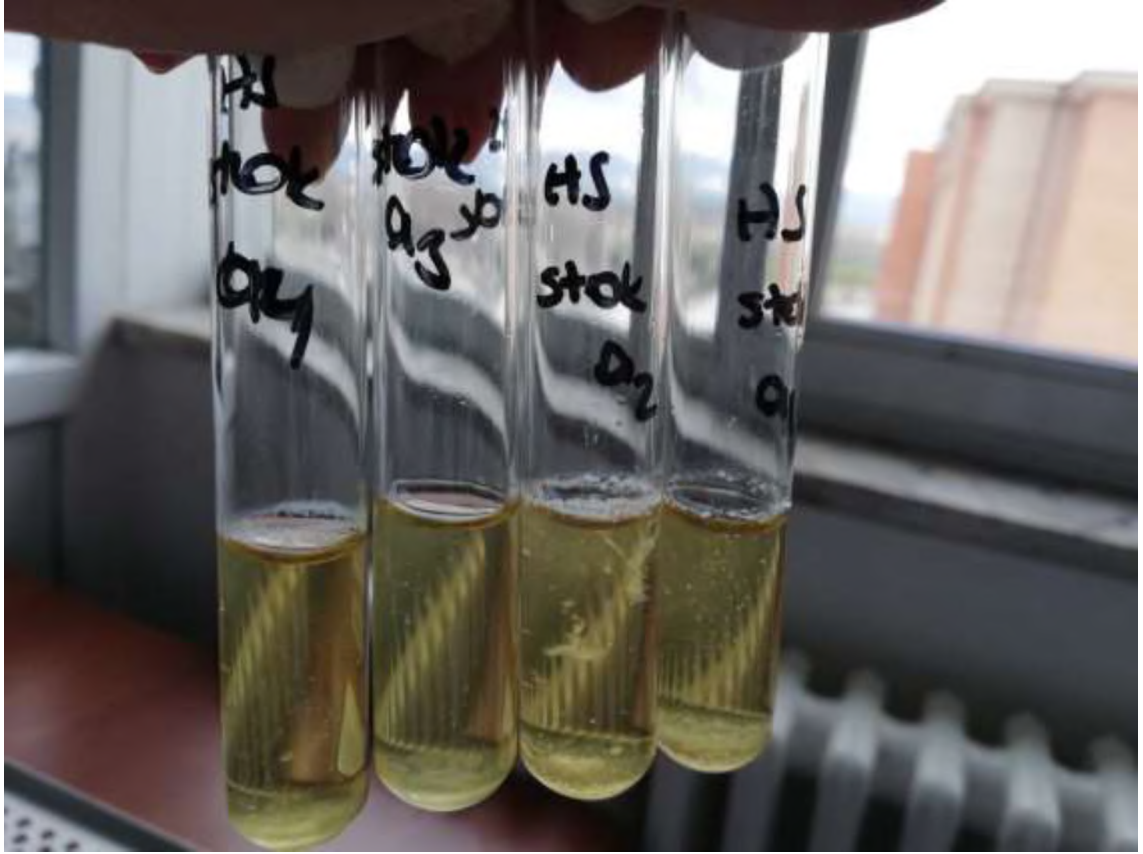


Resim 3.2. TC20™ Automated Cell Counter hücre sayım lamı ile canlı ve ölü hücrelerin belirlenmesi.

3.2.4.L. plantarum ve L. reuteri aktifliği ve muhafazası

Hazırlanan sıvı MRS Broth besiyerinin pH:6,8±0,02 olacak şekilde asit-baz dengesi sağlanmış, deneye alınmadan önce 121°C’de 15dk steril edilerek 5 ml’lik cam deney tüplerine aktarılmıştır. Besiyerine 3 paralel olacak şekilde arşivden alınan *Lactobacillus plantarum* ve *Lactoacillus reuteri*’den 100’er µl ekilip, 37°C’de, %5 karbondioksitli ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası aktifleştirilen *Lactobacillus plantarum* ve *Lactoacillus reuteri* preparatları hazırlanarak, gram boyama yöntemi ile boyanıp mikroskopik olarak incelenmiştir (Resim-3.3). Saf suşlar hem stok alınmak üzere hem de deneye hazır hale getirilmek üzere 2. aktifliğe alınmıştır. 37°C’de, %5 karbondioksitli ortamda 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Stoğa alınmak üzere aktifleştirilmiş saf kültürlerden 400 µl alınarak; otoklavda steril edilmiş 600 µl gliserol, 1,5 ml hacmindeki endorf tüplerde karıştırılarak, kapakları parafilmli bbir şekilde -80°C’de muhafaza edilmiştir.



Resim 3.3. A) *Lactobacillus plantarum* B) *Lactobacillus reuteri*

3.2.5. *L. plantarum* ve *L. reuteri* suşlarından postbiyotiklerin eldesi

Lactobacillus plantarum ve *Lactobacillus reuteri* suşlarının birinci ve ikinci aktiflikleri yapıldıktan sonra aktif kültürler santrifüjlenerek hücre pelleti uzaklaştırılmıştır. Elde edilen postbiyotikler canlılık deneyi için kullanılacak konsantrasyonlarda yani %5, %10, %20, %30, %40, %50 oranlarında 6 farklı konsantrasyon DMEM besiyeri ile hazırlanmıştır. Hazırlanan postbiyotikler canlılık testi için 0,22 µm şırınga filtresinden geçirilerek steril edilmiştir.

3.2.6. Probiyotik ve postbiyotiklerin hücre hatlarının canlılığı üzerine etkisi

Bu deney setinde hücre canlılığını belirlemek üzere MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) kullanılmıştır.

MTT testi, hücre canlılığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, MTT'nin formazana enzimatik indirgenmesinin mitokondriyal süksinat dehidrojenaz tarafından katalize edildiği bilinmektedir. Bu nedenle, MTT testi mitokondriyal solunuma bağlıdır ve dolaylı olarak bir hücrenin hücresel enerji kapasitesini değerlendirmeye olanak sağlamaktadır. MTT testi, çok kuyucuklu plakalarda, tabanı kaplanmış hücre tek tabakalarından kolaylıkla ölçülebilen bir kolorimetrik reaksiyondur (Chacon, 1997).

MTT testi için; CaCo-2, HT-29 ve L929 hücre hatları buldukları flasktan trypsin-EDTA yardımı ile kaldırılarak hücre sayımına alınmıştır. Hücreler %90-99 arasında canlılıkla elde edilmiştir. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactococcus reuteri* suşlarının ve postbiyotiklerinin toksisite testleri TS EN ISO 10993-5 (Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirilmesi- Bölüm 5: Vücut Dışı Sitotoksikite Deneyleri) standardına uygun olarak incelenmiştir.

Her örnek grubu için üç tekrarlı setler kurulmuştur. Kontrol olarak hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip %20 DMSO ve canlılığı temsil eden hücre besi ortamı (DMEM) kullanılmıştır. Hazırlanan deney grupları Çizelge -3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge-3.1. MTT testi için hazırlanan deney grupları.

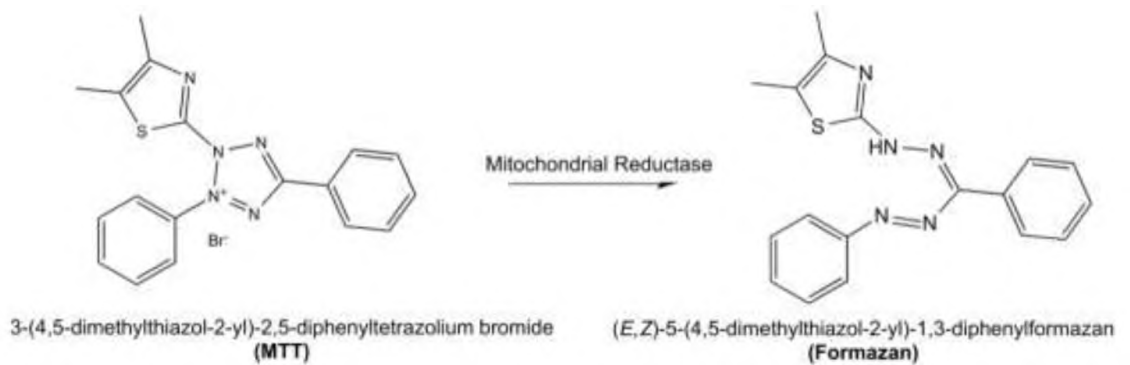
Örnekler	Hücre Tipi	İnkübasyon Süresi
<i>L.plantarum</i> %5	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> %10	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> %20	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> %30	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> %40	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat

<i>L.plantarum</i> %50	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> (postbiyotik) %5	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> (postbiyotik) %10	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> (postbiyotik) %20	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> (postbiyotik) %30	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> (postbiyotik) %40	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.plantarum</i> (postbiyotik) %50	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> %5	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> %10	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> %20	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> %30	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> %40	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> %50	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> (postbiyotik) %5	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> (postbiyotik) %10	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> (postbiyotik) %20	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> (postbiyotik) %30	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> (postbiyotik) %40	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat
<i>L.reuteri</i> (postbiyotik) %50	CaCo-2, HT-29 ve L929	24 saat

Herbir hücre hattından sayılan hücreler her kuyucuğa 1×10^4 /100µl hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. Hücreler ortam adaptasyonu için 22-26 saat boyunca 37°C 'de, %5 karbondioksitli ortamda inkübe edilmiştir. Çizelge-3.1'de belirtilen deney grupları da bu inkübasyon sonunda 24 saat boyunca aynı ortam koşullarında uygulanmıştır. Kontrol olarak %20 DMSO kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre canlılığı MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Morfolojik değişiklikler mikroskopik olarak incelenmiştir.

Şekil-3.1'de gösterildiği gibi sarı renkli bir tetrazol olan MTT, canlı hücrelerde mor formazana indirgenir. Çözünmeyen mor formazan ürününü renkli bir çözelti halinde getirmek için ise genellikle dimetil sülfoksit, asitleştirilmiş bir etanol çözeltisi veya seyreltilmiş hidroklorik asit içinde bir deterjan, sodyum dodesil sülfat gibi stop çözeltileri kullanılır (Mosmann, 1983).

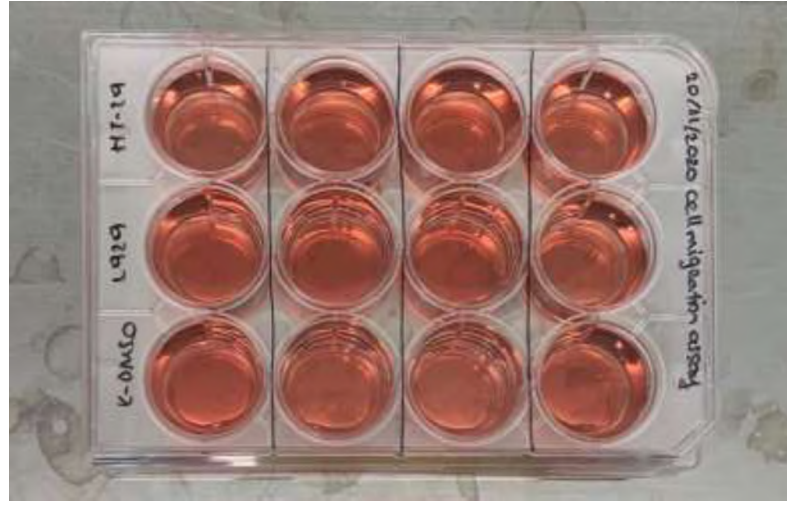
Bu araştırmada TS EN ISO 10993-5 standartlarına uygun olarak MTT fenol kırmızısı olmayan DMEM ortamında 1:1 oranında çözdürülmüştür. Stop çözeltisi olarak izopropil alkol kullanılmıştır. Reaksiyon 2 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda 570 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.



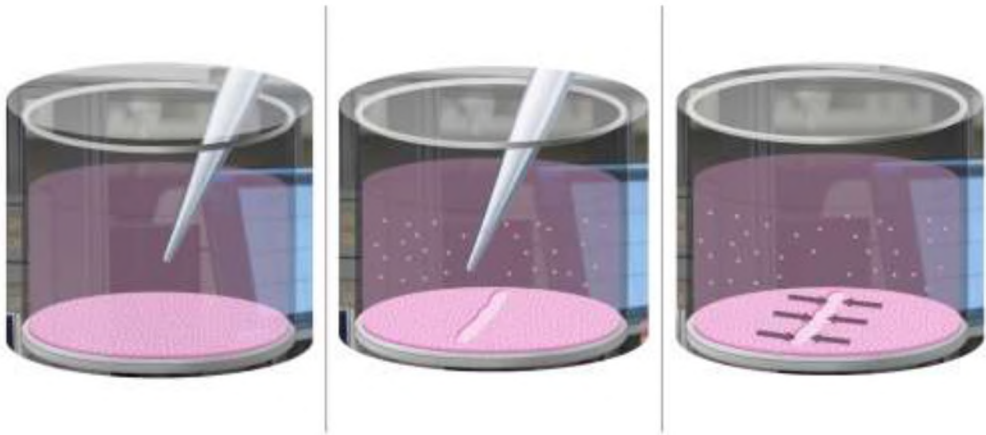
Şekil 3.1. Işık absorpsiyonunun derecesi, hücre içinde ve hücre yüzeyinde biriken formazan konsantrasyonunun derecesine bağlıdır. Formazan konsantrasyonu ne kadar büyükse, mor renk o kadar koyu ve dolayısıyla absorbans da o kadar yüksek olur.

3.2.7. Yara iyileşmesi hücre migrasyon testi

Migrasyon testi; HT-29 ve L929 hücre hatları üzerinde yapılan canlılık testi sonucuna göre belirlenen konsantrasyonlarda *L.plantarum*, *L.reuteri* ve sırasıyla bunların postbiyotikleri 12-kuyucuklu plakalarda yoğunlaşmış adheren hücreler üzerinde bir yara modeli oluşturularak gerçekleştirilmiştir (Resim-3.5-6).



Resim 3.5. Migrasyon testi için 12-kuyucuklu plakalarda yoğunlaşmış adheren hücreler üzerinde bir yara modeli gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.6. Yara modeli şematize hali (BioTek Instruments, Cell Migration Assays video).

Her örnek grubu için üç tekrarlı setler kurulmuştur. Bu deney grubunda da kontrol olarak hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip %20 DMSO ve canlılığı temsil eden hücre besi ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan deney grupları Çizelge-3.2’de gösterilmiştir.

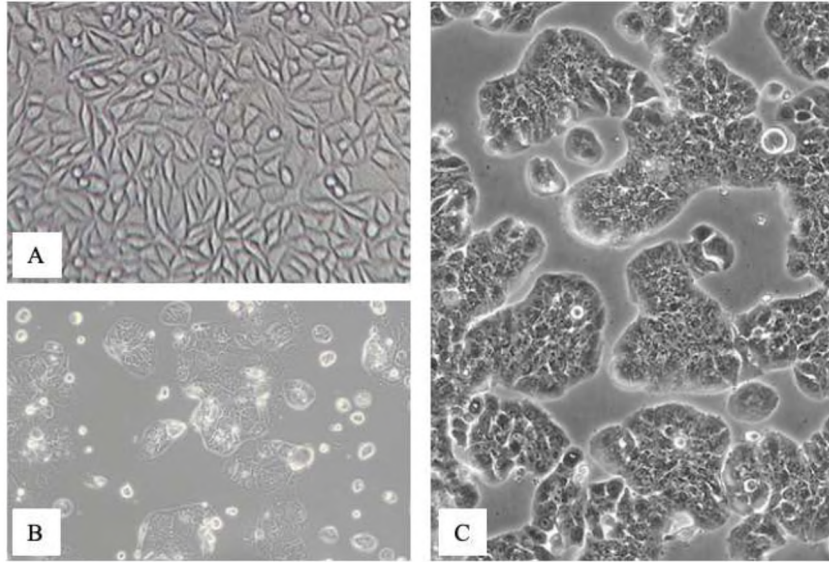
Çizelge-3.2. Migrasyon testi için hazırlanan deney grupları.

Örnekler	Hücre Tipi	İnkübasyon Süresi	Fotoğraflama süresi
<i>L.plantarum</i> %30	HT-29 ve L929	24 saat	Sırasıyla 0, 6,12,24. saatler
<i>L.plantarum</i> (postbiyotik) %30	HT-29 ve L929	24 saat	Sırasıyla 0, 6,12,24. saatler
<i>L.reuteri</i> %30	HT-29 ve L929	24 saat	Sırasıyla 0, 6,12,24. saatler
<i>L.reuteri</i> (postbiyotik) %30	HT-29 ve L929	24 saat	Sırasıyla 0, 6,12,24. saatler

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Kolon Kanseri ve Sağlıklı Fibroblast Hücre Hatlarının Çoğaltılması

Araştırmadaki deneylerin gerçekleştirilebilmesi için seçilen CaCo-2, HT-29 ve L929 hücre hatları Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda, Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edildikten sonra, deneylerde çalışılmak üzere uygun kültür koşullarında çoğaltıldılar (Resim-4.1).



Resim 4.1. A) L929 (40X), B) Caco-2 (40X), HT-29 (40X) (ATCC, Igcstandarts).

Hücreler hergün inverted mikroskop altında kontrol edilerek, yaklaşık olarak 2-3 günde bir besi ortamları tazelenmiştir. Hücre agresifliğine göre konflue olma süreleri değişmekle beraber, hücreler birer pasaj atıldıktan sonra hücre canlılıkları ve sayıları belirlenerek çalışmaya alınmışlardır. Hücre sayımı ve canlılık kontrolü TC20™ Automated Cell Counter cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

4.2. TC20™ Automated Cell Counter ile Hücre Sayısı ve Canlılığının Tespiti

Hücre sayımları, hücre sağlığı ve proliferasyon oranını izlemek, hücreleri sonraki deneylere ve hücre bazlı çalışmalara hazırlamak amacıyla önem taşımaktadır. Hücrelerin sayılması ve canlılık oranının belirlenmesi, in vitro hücre kültürü için gerekli bir adımdır. Tutarlı hücre konsantrasyonları, deneysel tekrarlanabilirlik ve doğruluk açısından oldukça önemlidir.



Resim 4.2. Hücreler Trypan-Blue boyası ile boyanarak otomatik olarak sayıldı ve canlılıkları tespit edildi.

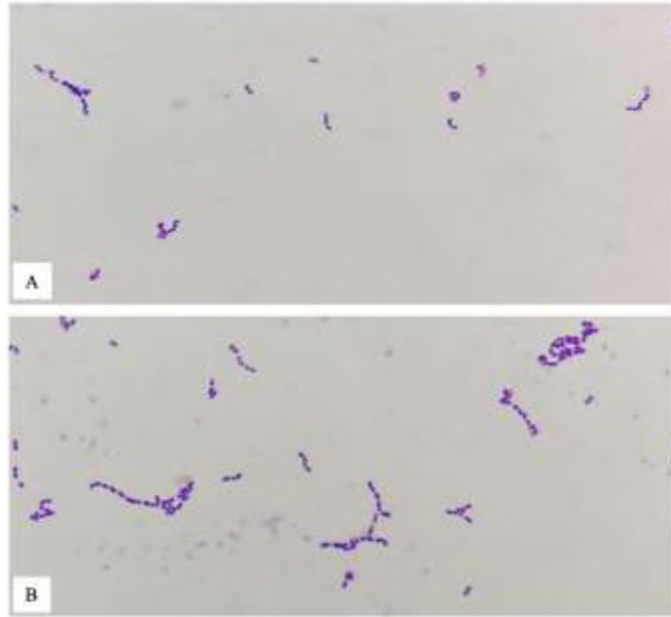
CaCo-2, HT-29 ve L929 hücrelerinin pasaj sonrası canlılıkları ve hücre sayıları tespit edildi. Her hücre hattı için yaklaşık %90-99 canlılık elde edildi (Resim-4.2). Hücre sayıları deney tiplerine göre ayarlanarak 96-kuyucuklu plaka ve 12-kuyucuklu plakaya uygun olacak şekilde ayarlandı. Hücreler 24 saat 37°C'de, %5 karbondioksitli ortamda inkübe edilerek ortama tutunmaları ve adaptasyonları sağlandı.

4.3. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactococcus reuteri*'nin Saflık Kontrolü ve Hücre Kültürü İçin Hazırlanması

Besiyerine 3 paralel olacak şekilde arşivden alınan *Lactobacillus plantarum* ve *Lactococcus reuteri*'den 100'er µl ekilip, 37°C'de, %5 karbondioksitli ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası aktifleştirilen *Lactobacillus plantarum* ve *Lactococcus reuteri* preparatları hazırlanarak, gram boyama yöntemi ile boyanıp mikroskopik olarak incelenmiştir. Saf suşlar hem stok alınmak üzere hemde deneye hazır hale getirilmek üzere 2. aktifliğe alınmıştır. 37°C'de, %5 karbondioksitli ortamda 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tekrar gram boyamaları yapılarak saf oldukları gösterilmiştir (Resim-4.3-A,B).

Saf elde edilen *Lactobacillus plantarum* ve *Lactococcus reuteri*; spektrofotometre cihazında 600 nm dalga boyunda OD değerleri 0,600'e ayarlanarak, belirlenen konsantrasyonlarda (sırasıyla %5, %10, %20, %30, %40, %50) hücre besin ortamı ile karıştırılarak MTT analizine hazırlanmıştır.



Resim 4.3. A) *Lactobacillus plantarum* (100X) B) *Lactococcus reuteri* (100X).

4.4. MTT Analizi ve Değerlendirilmesi

MTT testi, canlı hücre yoğunluğunu spektrofotometrik olarak ölçme mantığına dayanan bir testtir. Çalışmamızda 96 kuyucuklu plakalara belirlenen plan düzeninde CaCo-2, HT-29 ve L929 hücre hatları ekildi. Hücrelerin 24 saat süreyle 37°C'de, %5 karbondioksitli ortamda inkübe edilerek metabolik fonksiyonlarının düzenlenmesi ve ortama adaptasyonları beklendi. İnkübasyon sonunda metabolik olarak fonksiyonlarını düzenleyen hücrelerin besiyeri tamamen uzaklaştırılarak, belirlenen konsantrasyonlarda (sırasıyla %5, %10, %20, %30, %40, %50) hazırlanan probiyotikler ve postbiyotikler uygunlandı. Uygulama sonrası 24 saatlik ölçüm için aynı koşullarda inkübasyonları sağlandı. Bu 24 saatlik sürenin sonunda, MTT test kiti (Sigma Aldrich, USA) ile hücre canlılığı ve yoğunluğu ya da *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus reuteri*'nin hem kendilerinin hemde postbiyotiklerinin, hücreler (CaCo-2, HT-29 ve L929) üzerindeki olası etkileri mikropkaya okuyucu ile 570 nm okutularak logaritmik eğim çizgisi belirlendi.

Elde edilen sonuçlara göre;

Lactobacillus plantarum'un artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile *L. plantarum*'un L929 hücrelerinin canlılığı üzerine proliferatif bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla % 30,37; 43,66; 57,67; 70,11; 79,56; 85,74 olarak artmıştır (Şekil 4.1).

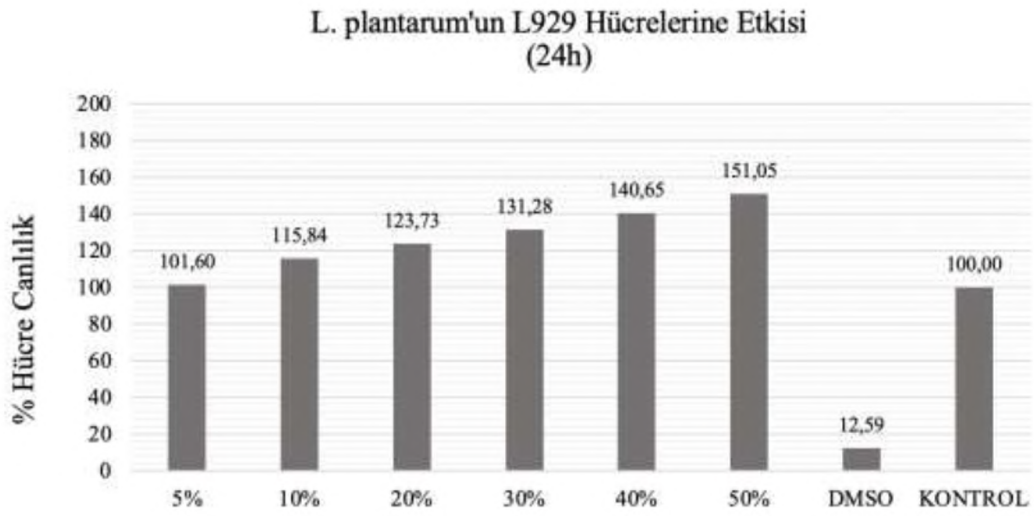
Lactobacillus plantarum'dan elde edilen postbiyotiklerin artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile L929 hücrelerinin canlılığı üzerine yine proliferatif bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla % 35,38; 50,15; 61,99; 74,44; 86,31; 93,65 olarak artmıştır (Şekil 4.2).

Lactobacillus reuteri'nin artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile *L. reuteri*'nin L929 hücrelerinin canlılığı üzerine proliferatif bir

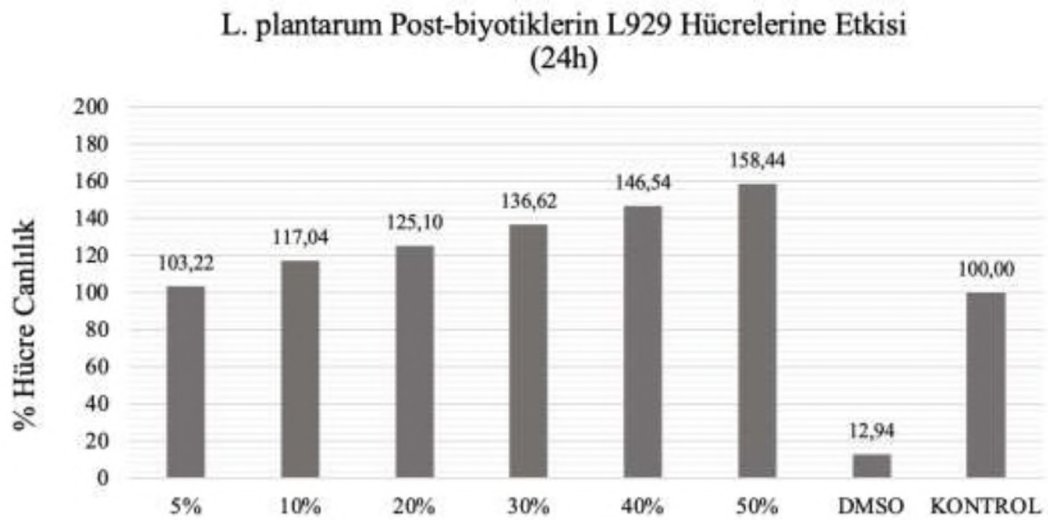
etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla % 26,56; 40,69; 54,46; 65,91; 74,19; 82,78 olarak artmıştır (Şekil 4.3).

Lactobacillus reuteri'den elde edilen postbiyotiklerin artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile L929 hücrelerinin canlılığı üzerine yine proliferatif bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla % 33,07; 46,86; 59,71; 72,48; 83,62; 89,66 olarak artmıştır (Şekil 4.4).

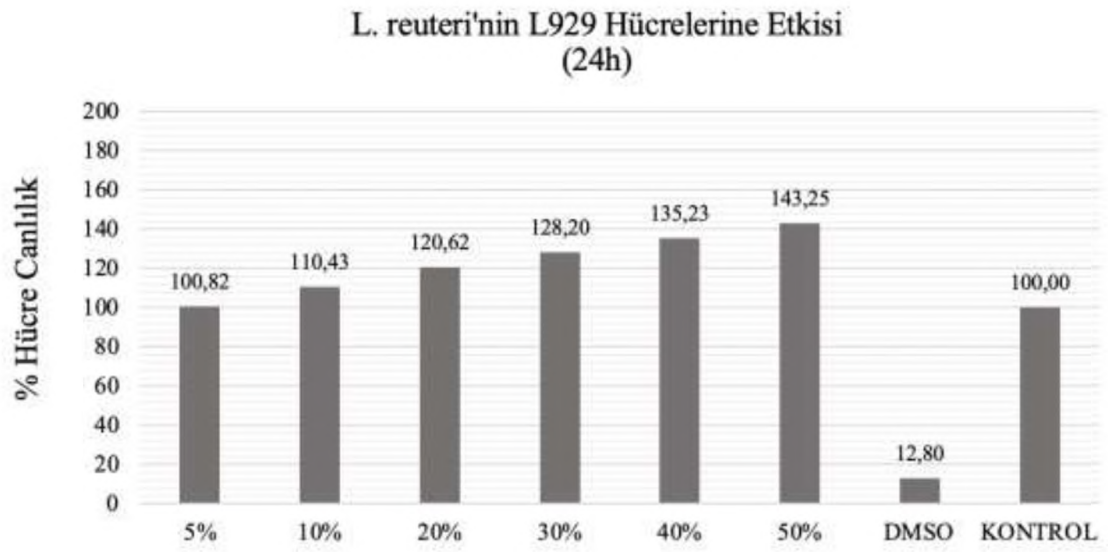
DMSO %20 oranında sitotoksik kontrol olarak kullanılırken, kendi besin ortamında bulunan hücreler ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Karşılaştırmalı sonuçlar bu iki kontrol grubu baz alınarak hesaplanmıştır.



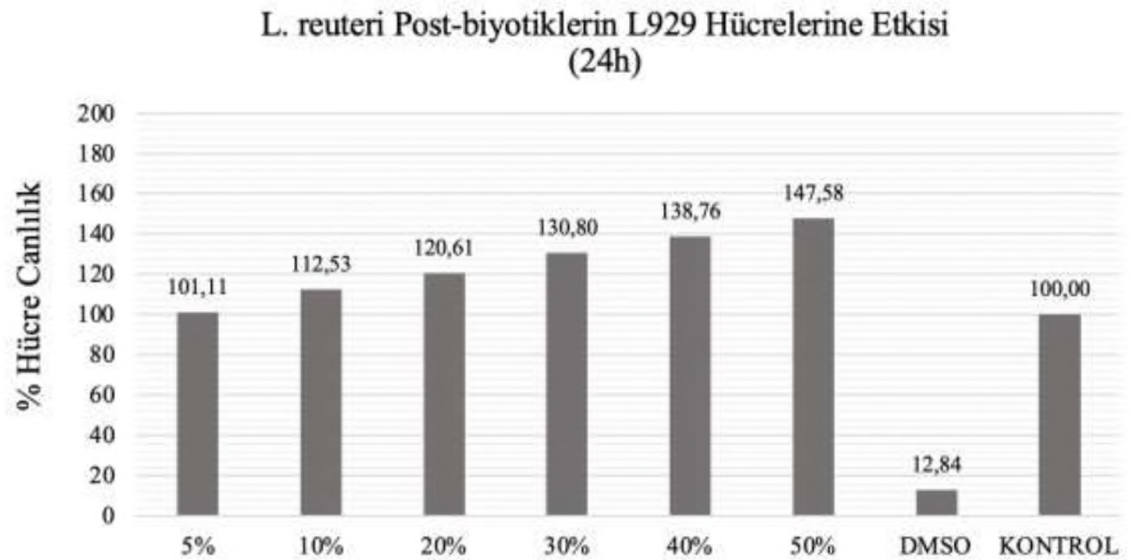
Şekil 4.1: *Lactobacillus plantarum*'un 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.2: *Lactobacillus plantarum* postbitotiklerinin 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.3: *Lactobacillus reuteri*'nin 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.4: *Lactobacillus reuteri* postbiotiklerinin 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

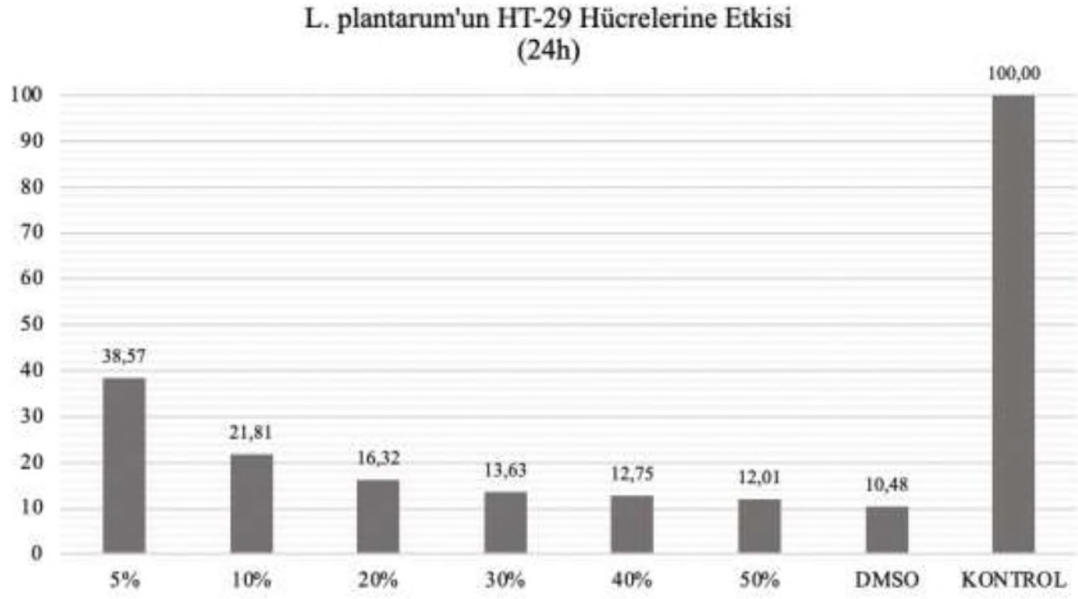
Lactobacillus plantarum'un artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile *L. plantarum*'un HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine sitotoksik bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla 38,57; 21,81; 16,32; 13,63; 12,75; 12,01 olarak azalmıştır (Şekil 4.5).

Lactobacillus plantarum'dan elde edilen postbiyotiklerin artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine yine sitotoksik bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla 74,70; 52,86; 39,07; 23,51; 13,24; 11,04 olarak azalmıştır (Şekil 4.6).

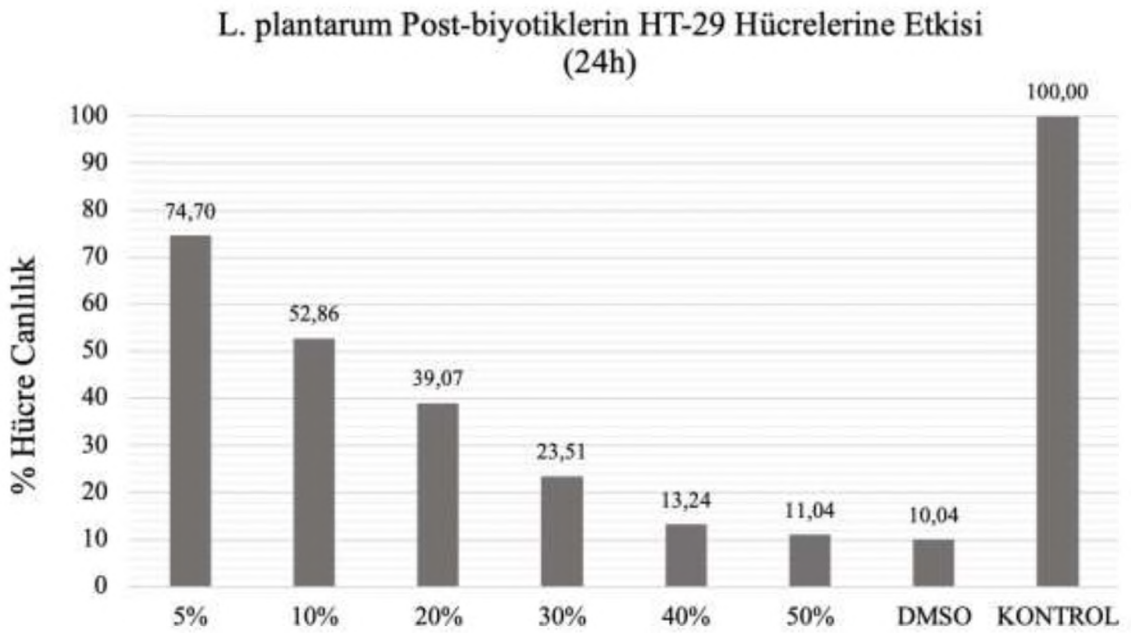
Lactobacillus reuteri'nin artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile *L. reuteri*'nin HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine sitotoksik bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla 33,11; 25,72; 17,12; 13,96; 13,19; 12,51 olarak azalmıştır (Şekil 4.7).

Lactobacillus reuteri'den elde edilen postbiyotiklerin artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine yine sitotoksik bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla 57,85; 41,10; 30,44; 21,73; 17,52; 12,89 olarak azalmıştır (Şekil 4.8).

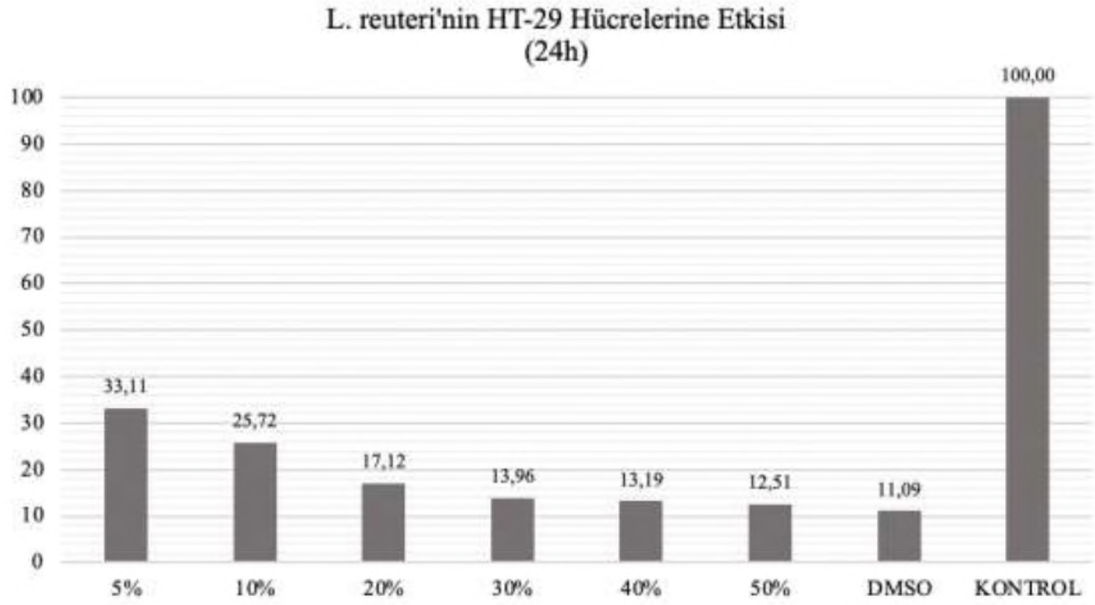
DMSO 20% oranında sitotoksik kontrol olarak kullanılırken, kendi besin ortamında bulunan hücreler ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Karşılaştırmalı sonuçlar bu iki kontrol grubu baz alınarak hesaplanmıştır.



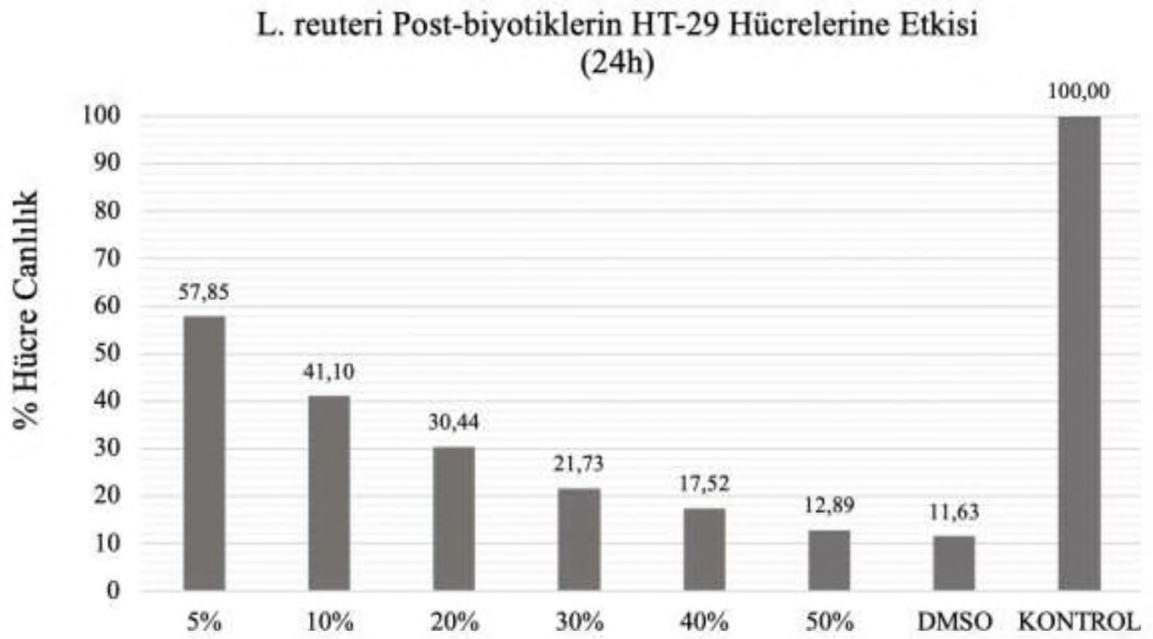
Şekil 4.5: *Lactobacillus plantarum*'un 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.6: *Lactobacillus plantarum* postbitotiklerinin 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.7: *Lactobacillus reuteri*'nin 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.8: *Lactobacillus reuteri* postbitotiklerinin 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

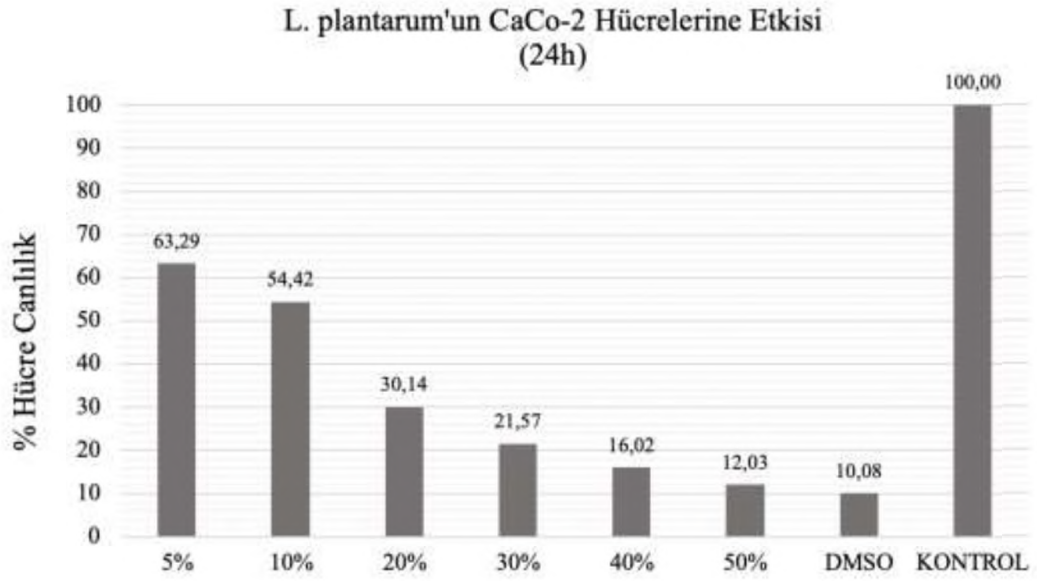
Lactobacillus plantarum'un artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile *L. plantarum*'un Caco-2 hücrelerinin canlılığı üzerine sitotoksik bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla 63,29; 54,42; 30,14; 21,57; 16,02; 12,03 olarak azalmıştır (Şekil 4.9).

Lactobacillus plantarum'dan elde edilen postbiyotiklerin artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile Caco-2 hücrelerinin canlılığı üzerine yine sitotoksik bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla 77,04; 61,79; 43,07; 28,30; 19,59; 13,22 olarak azalmıştır (Şekil 4.10).

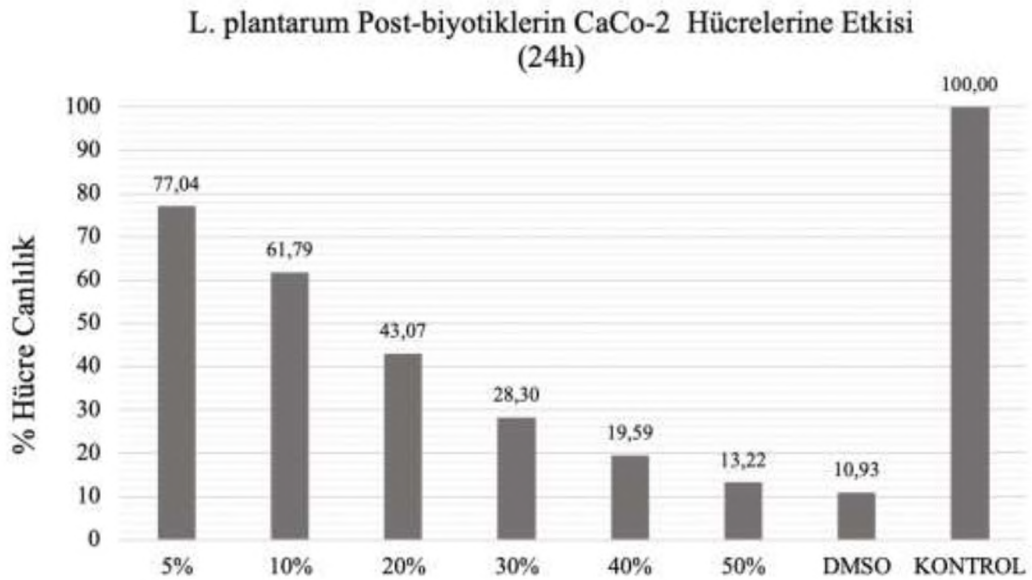
Lactobacillus reuteri'nin artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile *L. reuteri*'nin Caco-2 hücrelerinin canlılığı üzerine sitotoksik bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla 60,44; 50,34; 28,09; 19,22; 14,85; 11,82 olarak azalmıştır (Şekil 4.11).

Lactobacillus reuteri'den elde edilen postbiyotiklerin artan dozlarda (%5, %10, %20, %30, %40, %50) hücreye uygulanması ile Caco-2 hücrelerinin canlılığı üzerine yine sitotoksik bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı sırasıyla 73,44; 60,06; 41,61; 22,50; 15,02; 12,87 olarak azalmıştır (Şekil 4.12).

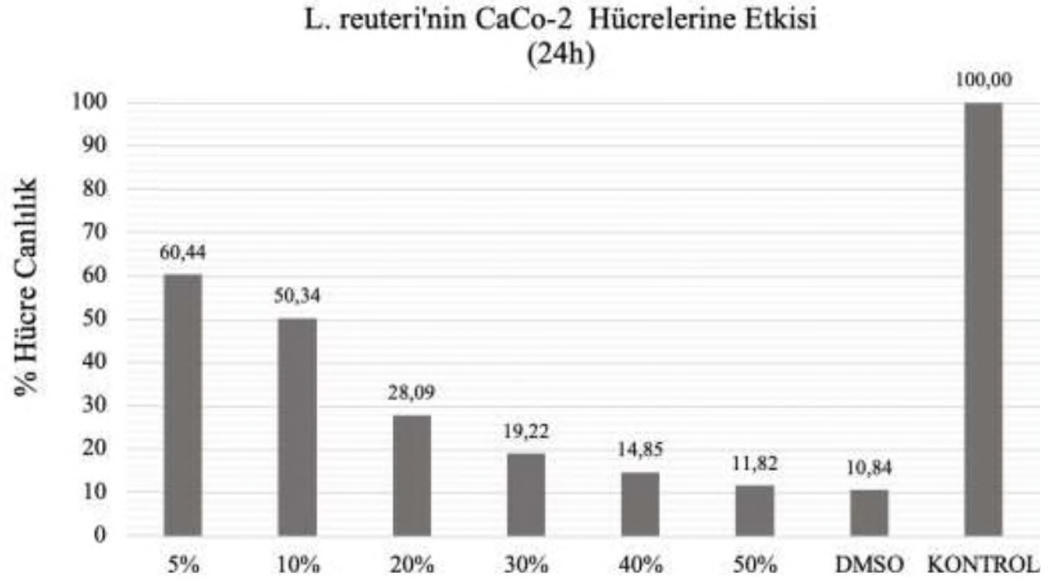
DMSO %20 oranında sitotoksik kontrol olarak kullanılırken, kendi besin ortamında bulunan hücreler ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Karşılaştırmalı sonuçlar bu iki kontrol grubu baz alınarak hesaplanmıştır.



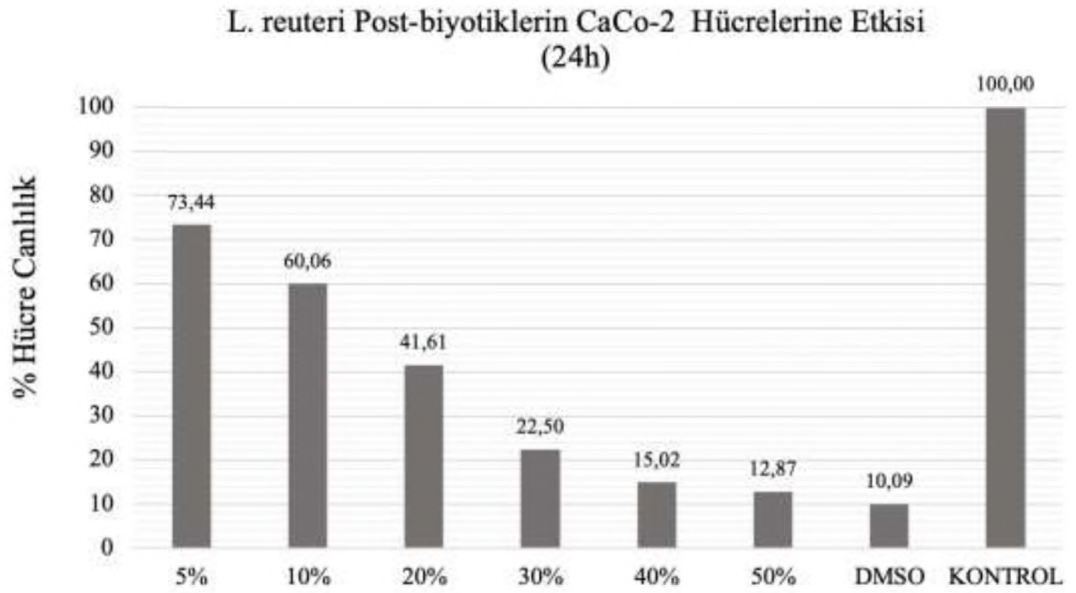
Şekil 4.9: *Lactobacillus plantarum*'un 24 saat sonunda CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.10: *Lactobacillus plantarum* postbitotiklerinin 24 saat sonunda Caco-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

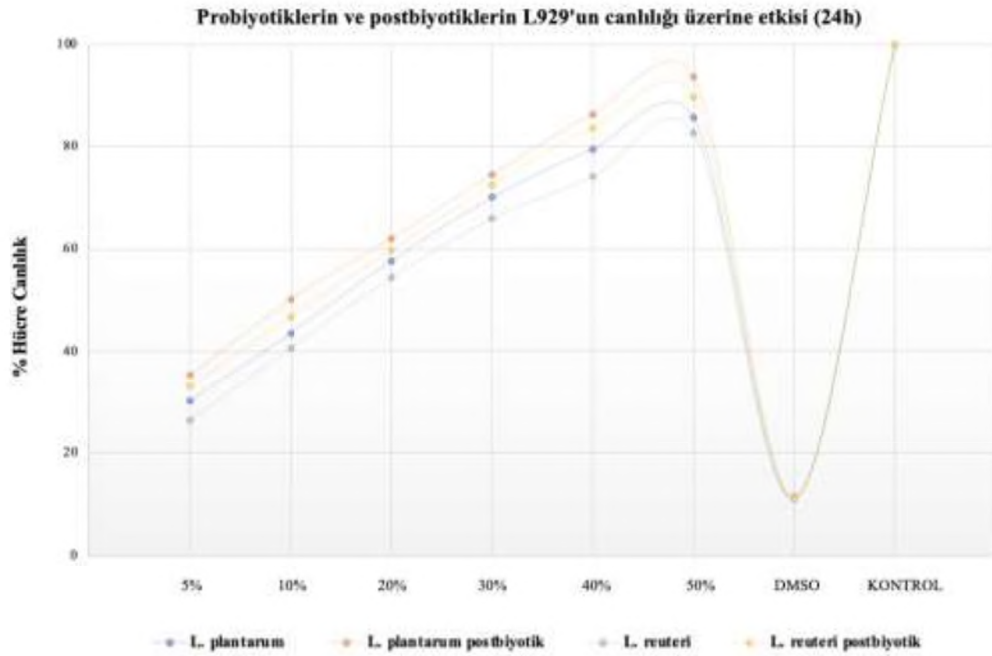


Şekil 4.11: *Lactobacillus reuteri* 'nin 24 saat sonunda CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

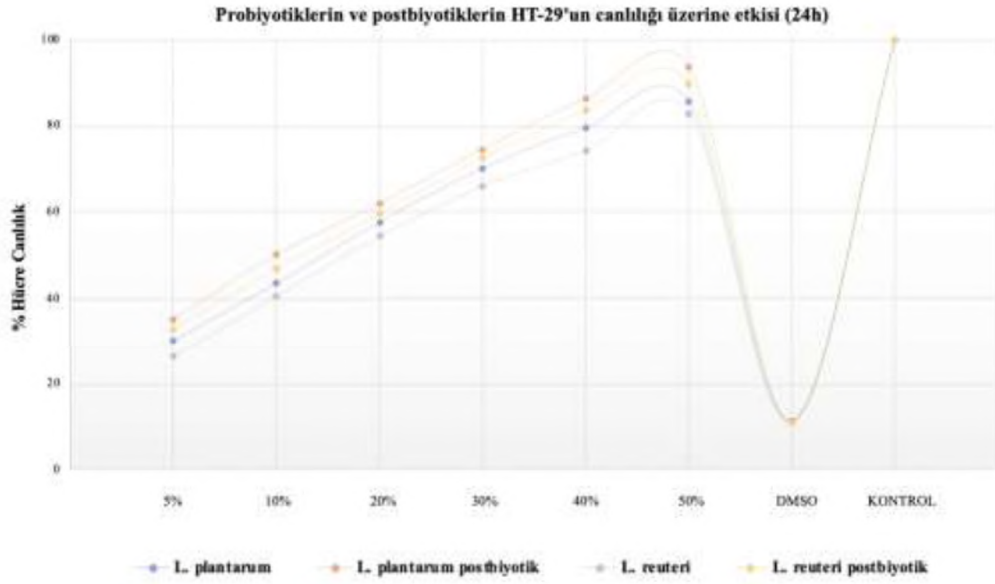


Şekil 4.12: *Lactobacillus reuteri* postbitotiklerinin 24 saat sonunda CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

Elde edilen verilere göre L929 hücrelerinin *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus reuteri*'nin hem kendileri hem de postbiyotikleri tarafından proliferasyonlarının tetiklendiği, ancak HT-29 ve Caco-2 hücrelerinin çoğalmalarının ihibe olduğu hatta hücre canlılığındaki önemli düşüşle sitotoksik etkili oldukları saptanmıştır. Bu sonuçlar her hücre hattı için; kendi içerisinde beraber değerlendirildiğinde L929 için en etkili etken maddenin *Lactobacillus plantarum*'dan elde edilen postbiyotikler olduğu görülmektedir (Şekil 4.13,14,15,16).

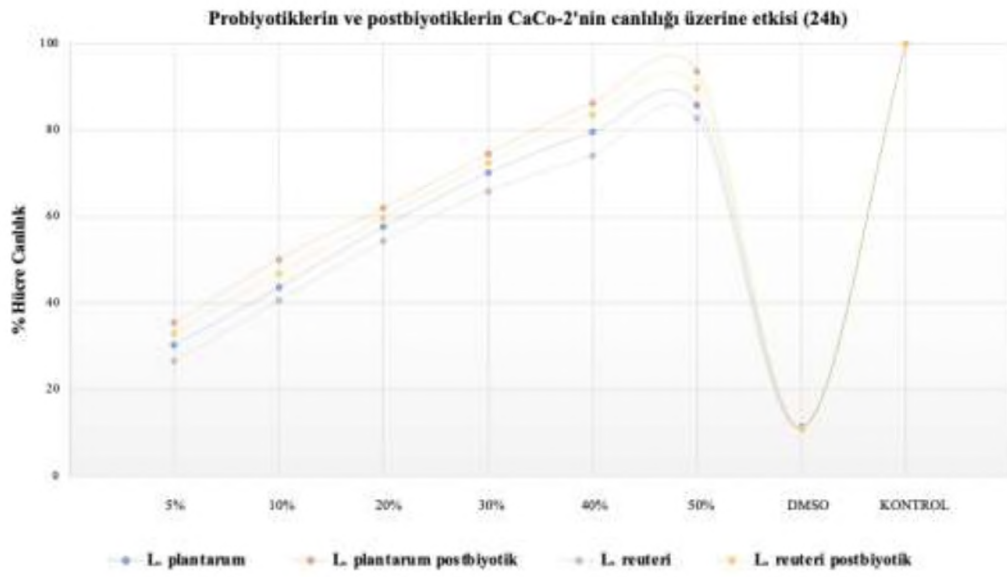


Şekil 4.13: Probiyotik ve postbitotiklerin 24 saat sonunda L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin birlikte gösterimi.

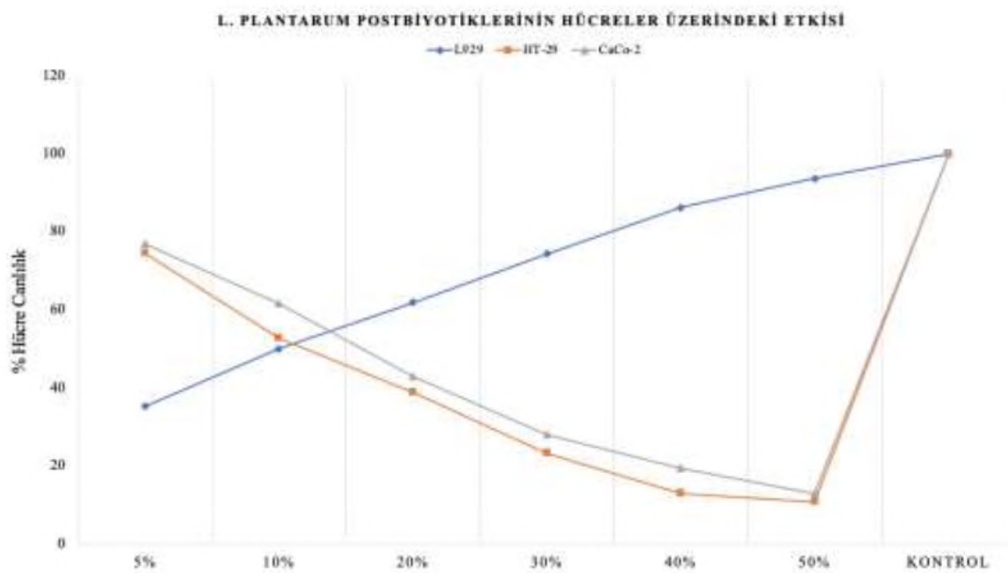


Şekil 4.14: Probiyotik ve postbitotiklerin 24 saat sonunda HT-29 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin birlikte gösterimi.

Tüm grafiklere bakıldığında (Şekil 4.16,17,18) hem hücre canlılığında hem de hücre ölümünde en etkili parametre *Lactobacillus plantarum*'dan elde edilen postbiyotikler olarak saptanmıştır. Bu parametre L929 hücrelerinde proliferasyonu tetikleyen en etkili parametre iken HT-29 ve CaCo-2 hücrelerinde hücre ölümünden sorumlu en etkili parametre olarak saptanmıştır.



Şekil 4.15: Probiyotik ve postbitotiklerin 24 saat sonunda CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin birlikte gösterimi.



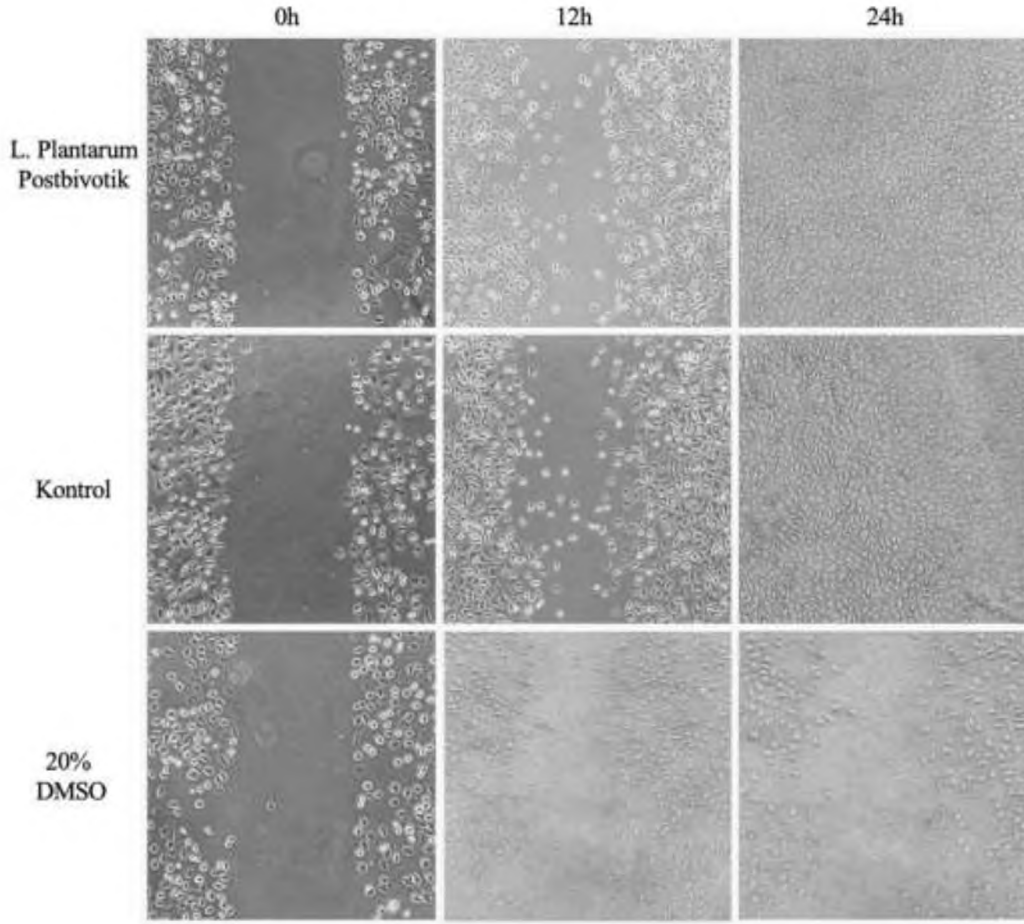
Şekil 4.16: Probiyotik ve postbitotiklerin L929, HT-29 ve CaCo-2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin birlikte gösterimi.

4.5. Yara iyileşmesi hücre migrasyon analizi

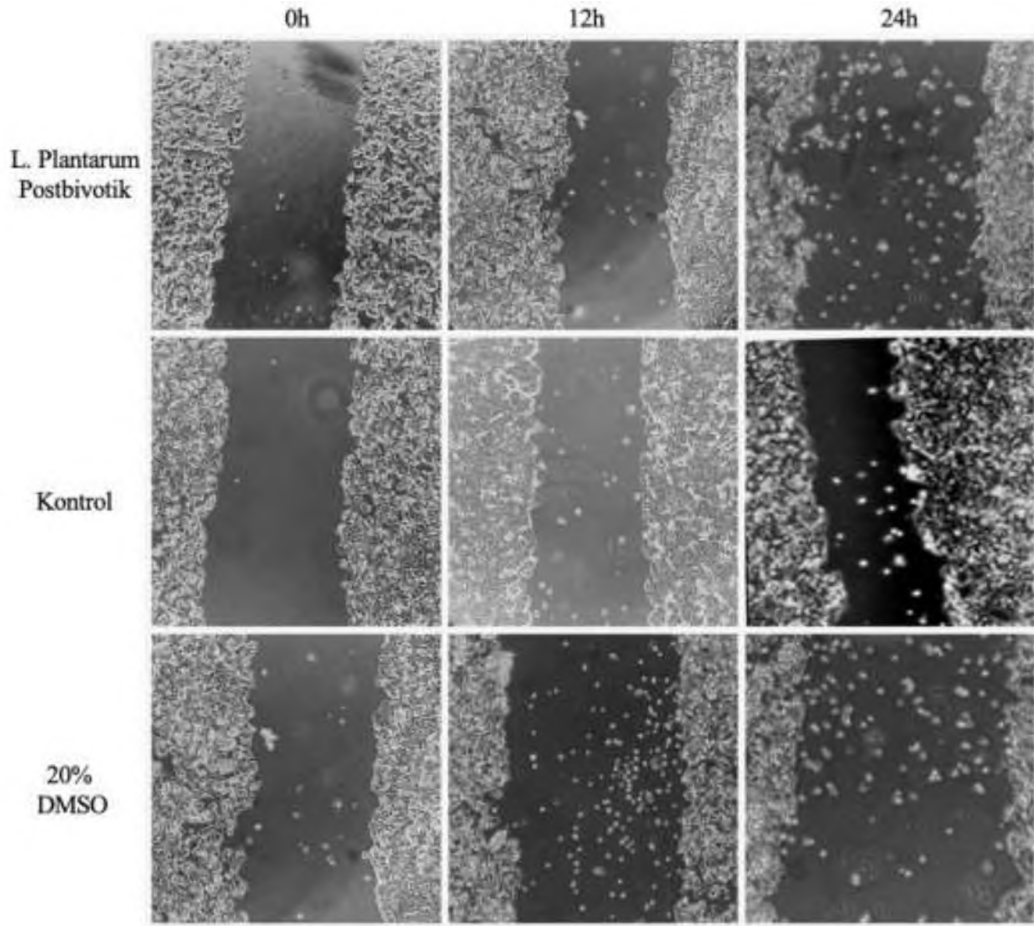
Hücre canlılığını belirlemek için yapılan MTT testi sonuçlarına göre *Lactobacillus plantarum*'dan elde edilen postbiyotiklerin logaritmik eğim çizgisinden elde edilen yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC50) değerleri yara iyileşmesi hücre migrasyon testi için kullanılmıştır.

MTT verileri doğrultusunda HT-29 için logaritmik eğim çizgisinden yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC50) değeri 17,92; L929 için logaritmik eğim çizgisinden yarı-maksimum etkin konsantrasyonu (EC50) değeri 226,9 olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu konsantrasyonlar hücre migrasyon testinde kullanılmak üzere hesaplanmıştır.

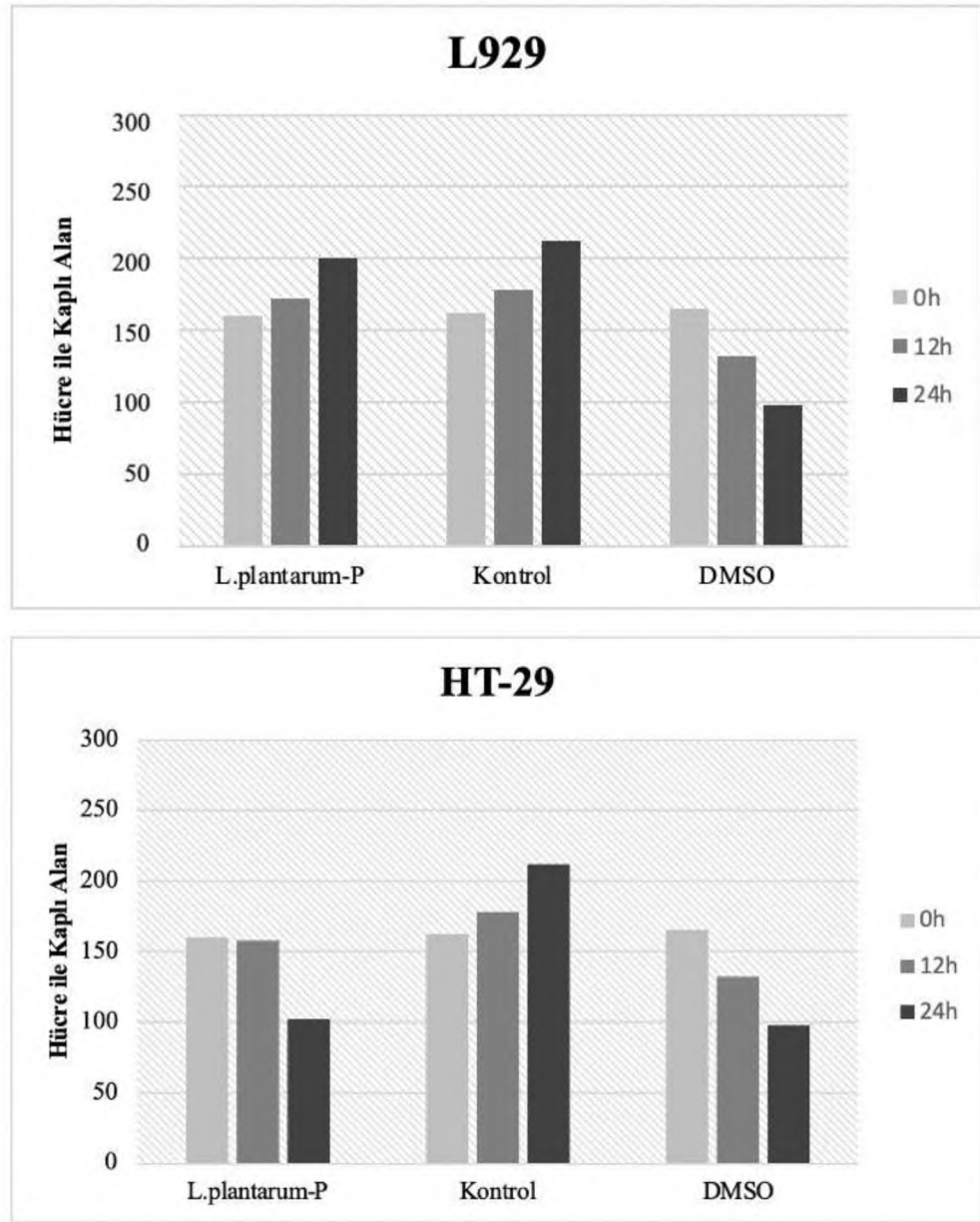
Migrasyon testi için bir kanserli hücre hattı HT-29 ve bir de normal sağlıklı fare fibroblast hücre hattı olan L929 kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde hücre canlılığı ile paralel olarak L929 hücrelerinde *Lactobacillus plantarum*'un elde edilen %20 oranındaki postbiyotik kontrole kıyasla migrasyonu artırmış olup, HT-29 hücre hattında azalttığı görülmüştür (Resim-4.4-5 ve Şekil-17).



Resim 4.4. L929 hücrelerinin zamana bağlı migrasyon görüntüleri (10X).



Resim 4.5. HT-29 hücrelerinin zamana bağlı migrasyon görüntüleri (10X).



Şekil 4.17. L929 ve HT-29 hücrelerinin zamana bağlı migrasyon bölgesindeki canlı hücre alanı değişim grafikleri (10X).

4.6. Tartışma

Bu sonuçlar doğrultusunda araştırmamız literatürdeki benzer çalışmalar ile uyumlu bulgulara sahiptir. Literatüre bakıldığında; Mohammad Mehdi Soltan Dallal ve arkadaşları iki standart *Lactobacillus* türünün (*L. acidophilus* ve *L. casei*) süpernatantları ve bakteri ekstraktlarını kullanarak CaCo-2 hücrelerinin çoğalması, nekroz, apoptoz, migrasyon ve invazyon üzerinde probiyotiklerin etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma sonuçlarına göre; *Lactobacilli* süpernatantlarının hücre proliferasyonunu azalttığı ve hücre apoptozunu artırdığı, ancak hücre nekrozu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Öte yandan, *Lactobacilli* ekstresi, hücre proliferasyonunu azaltmış ve hücre apoptozunu artırmıştır. *Lactobacilli* ekstresinin ayrıca hücre nekrozuna yol açtığı saptanmıştır. Ayrıca, probiyotik ajanların hem süpernatantları hem de hücre özleri, hücrelerin migrasyon ve invazyonunda azalmaya neden olmuştur (Mohammad, 2015).

Son zamanlarda, birçok çalışma bağırsak florası ile kolorektal kanserlerin başlangıcı, ilerlemesi ve tedavisi arasında korelasyonlar bildirmiştir. JaeJin An ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada bu konu üzerinde durulmuştur. İnsanlardaki en temsilci simbiyotik bakteri olan *Lactobacillus plantarum* süpernatantının, 5-FU'ya dirençli kolorektal kanser hücrelerinin (HT-29 ve HCT-116) özelliklerini seçici olarak inhibe ettiği doğrulanmıştır. *Lactobacillus plantarum* süpernatantının, kolorektal kanserlerin spesifik markörleri CD44, 133, 166 ve ALDH1'in ekspresyonunu inhibe ettiği, *Lactobacillus plantarum* süpernatantı ve 5-FU'nun kombinasyon terapisinin, yine kolorektal kanserlerin hayatta kalmasını inhibe ettiği ve kaspaz-3 aktivitesini indükleyerek hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. *Lactobacillus plantarum* süpernatantının ve 5-FU'nun kombinasyon terapisinin, kemoterapiye dirençli kolorektal kanser hücrelerinin Wnt /-katenin sinyalini etkisiz hale getirerek ve kolonosferlerin oluşumunu ve boyutunu azaltarak bir antikanser mekanizmasını indüklediği tespit edilmiştir (JaeJin, 2016).

Lin Zhou ve ekibinin yaptığı bir başka çalışmada; mikrofluidik sistem kullanılarak *C. Butyricum*, HCT116 hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmiş, hücre döngüsünün

durmasına neden olmuş ve apoptozu teşvik etmiştir. Ancak aynı durumların Caco-2 hücreleri üzerinde önemli bir etkisi gösterilmemiştir (Lin Zhou, 2018).

Literatür ışığında kolorektal kanserler genel olarak tartışılırsa; erkeklerde en sık görülen üçüncü kanser ve dünya çapında kadınlarda ikinci en yaygın kanserdir (Armaghany, 2012). Bu kanser genellikle benign bir tip olarak kabul edilir, bu nedenle erken evre kolorektal kanser hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı %63'tür (Burns, 2000). Bununla birlikte, insan popülasyonlarında kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir (Kune, 2011). Kolorektal kanser hastalarının çoğu, hastalığın ileri aşamalarında, özellikle metastatik aşamada teşhis edilir ve bu da hasta sağkalım oranını %10'a düşürür (Yazdi, 2010). Öte yandan, cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi de dahil olmak üzere tüm kolorektal kanserlerin yaygın tedavileri hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmektedir. Bu noktalar dikkate alındığında, bu kanserle baş etmek için daha etkili profilaksi stratejileri gereklidir.

Son 20 yılda yapılan farklı çalışmalar, besin bileşenlerinin üretimine ek olarak, probiyotiklerin konakçı üzerinde bazı olumlu sağlık etkilerinin olabileceğini göstermiştir (Kocian, 1994; Kalantzopoulo, 1997). Bu probiyotikler, mikroorganizmanın kombinasyonunu düzenleyen farklı türde bakteriyosinler üretirler. Ayrıca bu probiyotikler, toksik materyallerin bağırsak duvarına yapışmasını önlemekte ve azoredüktaz gibi kanserojen enzimlerin aktivitesini baskılayarak bağırsakları kanser öncesi lezyonların oluşumuna karşı korumaktadır (Burns, 2000).

Elsa Jocouton ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada; bağırsak mikrobiyotasının bağırsak sağlığında önemli bir rol oynadığının ve bileşimindeki bir dengesizliğin, kronik bağırsak iltihabı ve kolorektal kanser (KRK) gelişimine yol açabileceği üzerinde durulmuştur. Çalışmaya göre probiyotik bakteri kullanımı, kanseri tedavi etmek ve önlemek için ortaya çıkan bir alternatifi temsil etmektedir. Ayrıca, bu yararlı bakterilerin tüketiminin, KRK karsinogenezinde önemli bir rol oynadığı çeşitli çalışmalarda da açıklanan bağırsak mikrobiyotasının bileşimini olumlu bir şekilde modüle edebildiği de belirtilmiştir. Bu bağlamda, çalışma antiinflamatuvar ve antikanser özellikleri ile iyi bilinen bir probiyotik suş olan

Lactobacillus casei BL23 ile oral tedavinin koruyucu etkisini değerlendirmektedir. İlk olarak, KRK, C57BL6 farelerinde azoksümetan (8 mg / kg) ile tek bir intraperitoneal enjeksiyon ve ardından ayarlanabilir bir iyileşme süresi ile ayrılan içme suyunda dört sıra dekstran sodyum sülfat (% 2.5) ile indüklenmiştir. Sonuçlara bakıldığında, *L. casei BL23*'ün fareleri KRK gelişimine karşı önemli ölçüde koruduğunu göstermektedir; spesifik olarak, *L. casei BL23* tedavisi histolojik skorları ve proliferatif indeks değerlerini düşürmüştür (J. Elsa, 2017).

KRK için cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi dahil olmak üzere çok sayıda başarılı tedavi seçeneği vardır. Ancak yan etkileri ve sınırlamaları büyüktür. Konakçının adaptif bağışıklığının uyarılması yoluyla tümör büyümesinin önlenmesi ve inhibe edilmesi için probiyotikler etkili bir strateji olabilirler. Bu doğrultuda, Jingtao Hu ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada iki *Lactobacillus* suşunun potansiyel anti-tümör bağışıklık tepkilerini araştırmışlardır. *Lactobacillus plantarum A* ve *Lactobacillus rhamnosus b*, farelere oral yol ile 14 gün boyunca uygulanmıştır. Daha sonra, CT26 hücreleri kullanılarak önceden aşılınmış farelerde deri altı ve ortotopik bağırsak tümörleri oluşturulmuştur. Sonuç olarak, oral yolla alınan *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* ile BALB / c farelerinde CT26 hücre büyümesinin inhibe olduğu ve BALB / c farelerin hayatta kalma süresinin uzadığı gösterilmiştir. *L. plantarum* uygulanan fareler, *L. rhamnosus* uygulanan farelere kıyasla koruyucu bağışıklığı artırmış, CD8⁺ ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin efektör fonksiyonlarını artırarak CT26 hücreleri ile mücadeleye karşı tümör dokusuna infiltrasyonun ve IFN- γ üretiminin up-regülasyonunun arttığını göstermişlerdir (Jingtao Hu ve ark., 2015).

Çalışmamıza benzer; Hojjat Sadeghi-Aliabadi ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları başka bir araştırmada doğal bir *Lactobacillus plantarum A7* suşunun ve bir *Lactobacillus rhamnosus GG* suşunun ısı ile öldürülmüş hücrelerinin ve hücresiz süpernatantlarının anti-proliferatif aktiviteleri, insan kolon kanseri hücre hatları (Caco-2 ve HT-29) ve normal hücreler üzerinde değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ısıyla öldürülmüş hücrelerin ve her iki probiyotik suşun hücresiz süpernatantlarının, kanser ve çalışmamızdan farklı olarak normal hücrelerin büyüme oranını düşürdüğünü

göstermiştir. Hojjat Sadeghi-Aliabadi ve arkadaşlarının bu sonuçlar ile, anti-proliferatif etkinin, resmi olarak onaylanmış probiyotiklere adanmış özel bir özellik olmayabileceğini vurgulamıştır (Hojjat S.A. ve ark., 2014).

Bazı *Lactobacillus* suşlarının ekzopolisakkaritinin (EPS) anti-kanser aktiviteleri sergilediği literatürde bulunmaktadır. Mengying Sun ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada; dört *Lactobacillus plantarum* suşu (*Lactobacillus plantarum-12*, *L. plantarum-14*, *L. plantarum-32* ve *L. plantarum-37*) tarafından üretilen ham EPS'lerin HT-29 hücre apoptozu üzerindeki etkileri incelenmiştir. *L. plantarum-12* ham EPS (50, 100, 250, 500 ug / ml), pozitif doza bağlı bir şekilde HT-29 hücrelerinde çoğalan hücre nükleer antijeninin (PCNA) ekspresyonu üzerinde önleyici etkiler uyguladığını göstermiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesi ve apoptoz oranı da, kontrol hücrelerine kıyasla *L. plantarum-12* ham EPS'sinin konsantrasyonları ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde de artmıştır. Diğer çalışmalar, pro-apoptotik proteinler Bax, Cyt C, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'un ekspresyonunun up-regülasyonu ve anti-apoptoz proteini Bcl-2 ekspresyonunun HT-29 hücrelerinde azaldığını göstermiştir. Bu çalışma sonucunda, *L. plantarum-12* tarafından üretilen EPS'nin, insan kolon kanseri hücre hattı HT-29'un mitokondriyal yolla proliferasyonunu inhibe edebileceğini öne sürmüşlerdir (Mengying Sun ve ark., 2020).

Bilimsel araştırmalar, bağırsak mikrobiyotasının hastaların antikanser tedavilerine ve toksik yan etkilere duyarlılıkta merkezi bir rol oynadığını göstermiştir. Bağırsak mikrobiyotası karakterizasyonu, bileşimi ve kolorektal kanserde meydana gelen değişiklik hakkındaki bilgileri oldukça geliştirmiştir.

Bununla birlikte, kolorektal karsinogen ile ilişkili konakçı ve patojenler arasındaki etkileşimleri daha iyi anlamak için metabolomik ve metatranskriptomik yaklaşımları içeren daha derinlemesine çalışmalar yapılmalıdır. Geleneksel kanser tedavileri hala ana akım tedaviler olsa da; probiyotikler, kolorektal kanserin başlangıcına karşı önleyici faaliyete ve tedavisine dayalı olarak artan bir ilgi görmüştür. Bu sebeple, probiyotikler, hastaların tedavilere uyumunu ve genel yaşam kalitelerini önemli

ölçüde iyileştirebilecek gibi görünmektedir. Probiyotiklerin antikanser tedavilerinin yan etkilerini hafifletmedeki yararlı etkisini gösteren halihazırda yayınlanan in vivo sonuçlara rağmen, eylemlerini tam olarak anlamak için daha fazla randomize çift kör, plasebo kontrollü klinik çalışmaların yapılması gereklidir.

Bağırsak mikrobiyomunu değerlendiren çalışmalar, bununla kolorektal kanserin patogenezi ve tedavisi arasında umut verici bağlantılar olduğunu göstermiştir. Kolorektal kanserdeki sonuçları iyileştirmek için hayvan deneylerinde daha fazla araştırmaya ve klinik deneyler ihtiyaç duyulmaktadır.

Son olarak kolorektal kanserin önlenmesi ve tedavisi için yardımcı tedavide rutin kullanıma ek olarak, probiyotik uygulamasının yalnızca olumlu sonuçlarını elde etmek ve zararlı yan etkilerden kaçınmak için hastaya özgü klinik ve patolojik backgroundu dikkate alan kişiselleştirilmiş bir yaklaşım benimsenmelidir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırma in vitro alternatif ve tanımlayıcı bir çalışma olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki amacımız; Caco-2, HT-29 kolon kanseri hücre hattını ve L929 fare sağlıklı fibroblast hücre hattını *L. plantarum* ve *L. reuteri* suşlarının hem kendileri hem de büyütüldüğü besiyerleri ile muamele ederek; yani aynı zamanda probiyotik bakteriler ile Caco-2, HT-29 kolon kanseri hücre hattını ve L929 fare sağlıklı fibroblast hücre hattını ko-kültüre ederek kanser hücrelerinin ölüm oranını yükseltmek ve migrasyon yeteneğinin nasıl değiştiğini araştırmak ve analiz etmektir. Bu araştırmamız amacı dahilinde değerlendirildiğinde;

1. Ko-kültür için kullandığımız her iki probiyotik bakterinin de (*L. plantarum* ve *L. reuteri*) kanser hücreleri üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.
2. Araştırma kapsamında postbiyotik olarak kullanılan her iki probiyotiğin metabolitleri de kanser hücreleri üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.
3. Farklı olarak hem ko-kültürün hem de postbiyotiklerin L929 hücre hattı üzerinde proliferatif bir özellikte olduğu saptanmıştır.
4. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda karşılaştırmalı olarak bakıldığında postbiyotiklerin, probiyotik bakterilerin kültürde direk kullanılmasına göre daha etkili olduğu bulunmuştur.
5. Yara iyileşmesi deneylerinde canlılık testi ile paralel ve beklenen sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre postbiyotiklerin IC50 ve EC50 değerleri kullanılmış ve kanserli hücre hatlarında yaranın açılmasına sağlıklı hücre hattında ise yaranın hızla kapanmasına olanak sağlamıştır.

6. Bu sonuçlar doğrutusunda probiyotiklerin yararlı etkilerinin bağışıklık sisteminin güçlendirilmesiyle sınırlı olmadığı gösterilmiştir; kolorektal kanser hücrelerinin habis fenotiplerini de etkili bir şekilde baskıladığı gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aguilar-Toala, J. R., Garcia-Varela H., Garcia V., Mata-Haro A., Gonzalez-Cordova B., Vallejo-Cordoba A., Hernandez Mendoza, (2018), Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology* 75, 105–14. doi: 10.1016/j.tifs.2018.03.009.
- Almada C. N., R. C. Martinez, A. S. Sant'Ana, (2016), Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science & Technology* 58, 96–114.
- American Cancer Society Colorectal Cancer Facts, (2017), American Cancer Society, Atlanta, GA, USA, 1–40.
- Armaghany T., Wilson JD., Chu Q., Mills G., (2012), Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res.*, 5(1), 19 – 27.
- Ashraf, Shah, Rabia, Nagendra P., (2014), "Immune system stimulation by probiotic microorganisms". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54 (7), 938–56. doi:10.1080/10408398.2011.619671
- ATCC, <https://www.lgcstandards-atcc.org/en.aspx>.
- Axelsson, L., (2004), Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-*, 139, 1-66.
- Bailey, C.E., Hu, C.Y., You, Y.N., Bednarski, B.K., Rodriguez-Bigas, M.A., Skibber, J.M., Cantor, S.B., & Chang, G.J., (2015), Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, *JAMA Surg.*, 150, 17–22.
- Barrera, G., (2012), Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy, *ISRN Oncology*, 1-21.
- Bested Alison C., Logan Alan C., Selhub Eva M., (2013), "Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: Part II – contemporary contextual research". *Gut Pathogens*. 5 (1), 3. doi:10.1186/1757-4749-5-3. PMC 3601973.
- Bested Alison C., Logan Alan C., Selhub Eva M., (2013), "Intestinal microbiota, probiotics and mental health: From Metchnikoff to modern advances: Part III – convergence toward clinical trials". *Gut Pathogens*. 5 (1), 4. doi:10.1186/1757-4749-5-4
- BioTek Instruments Inc., Scratch Assay Starter Kit for Wound Healing and Cell Migration Assays video.

- Bixquert Jiménez, M., (2009), "Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics: An etiopathogenic approach at last?". *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 101 (8), 553–64. doi:10.4321/s1130-01082009000800006.
- Blackwood, B.P., Yuan, C.Y., Wood, D.R., Nicolas, J.D., Grothaus, J.S., Hunter, C.J., (2017), Probiotic *Lactobacillus* Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *J. Probiotics Health*, 5.
- Bonnet M., Buc E., Sauvanet P., Darcha C., Dubois D., Pereira B., Déchelotte P., Bonnet R., Pezet D., Darfeuille-Michaud A., (2014), Colonization of the Human Gut by *E. coli* and Colorectal Cancer Risk. *Clin. Cancer Res.* 20, 859–867.
- Bos LD., et al., (2013 May), Volatile Metabolites of Pathogens: A Systemic Review, *PLoS Pathog.*, 9(5), e1003311.
- Bosman, FT., (2014), Colorectal Cancer, In Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*, the International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 92–402.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, RL., Torre, LA., & Jemal, A., (2018), Global cancer statistics, *Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*.
- Brooijmans, R. J. W., De Vos, W. M., Hugenholtz, J., (2009), "Lactobacillus plantarum WCFS1 Electron Transport Chains". *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (11), 3580–3585. doi:10.1128/AEM.00147-09
- Bubnov, R. V., Babenko, L. P., Lazarenko, L. M., Mokrozub, V. V., & Spivak, M. Y., (2018), Specific properties of probiotic strains: relevance and benefits for the host. *EPMA Journal*, 9(2), 205-223.
- Buc E., Dubois D., Sauvanet P., Raisch J., Delmas J., Darfeuille-Michaud A., Pezet D., Bonnet R., (2013), High Prevalence of Mucosa-Associated, *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLoS ONE* 8, e56964.
- Burns AJ., Rowland IR., (2000), Anti – carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol.*, 1(1), 13 – 24.
- Burns AJ., Rowland IR., (2000), Anti – carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol*, 1(1), 13 – 24.
- Cai, S., Li, Y., Ding, Y., Chen, K., Jin, M., (2014), Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death, A meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev.*, 23, 532–539.

- Cava F., et al., (2011 Mar), Emerging knowledge of regulatory roles in D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci.*, 68(5), 817-831.
- Chacon E., Acosta D., Lemasters J.J., (1997), 'In Vitro Methods in Pharmaceutical Research' Chapter: 9 - Primary Cultures of Cardiac Myocytes as In Vitro Models for Pharmacological and Toxicological Assessments'', Pages 209-223.
- Cheng, L., Eng, C., Nieman, L.Z., Kapadia, A.S., & Du, X.L.,(2011), Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the United States from 1976 to 2005. *Am. J. Clin. Oncol.*, 34, 573–580.
- Cho, E., Smith-Warner, S.A., Ritz, J., van den Brandt, P.A., Colditz, G.A., Folsom, A.R., Freudenheim, J.L., Giovannucci, E., Goldbohm, R.A., & Graham, S.,(2004), Alcohol intake and colorectal cancer, A pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann. Intern. Med.*, 140, 603–613.
- Cicenia, A., A. Scirocco, M. Carabotti, L. Pallotta, M. Marignani, C. Severi, (2014), Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. *Journal of Clinical Gastroenterology* 48, S18–S22.
- Collado, M.C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, & E., Salminen, S., (2016), Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.*, 6, 23129.
- Coşkun, T., (2006), Pro-, Pre- ve Sinbiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 49,128-148.
- Cribby S., Taylor M., Reid G., (March 9, 2009), "Vaginal microbiota and the use of probiotics". *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.*, 256490. doi:10.1155/2008/256490.
- Dashti, S.G., Buchanan, D.D., Jayasekara, H., Ait Ouakrim, D., Clendenning, M., Rosty, C., Winship, I.M., Macrae, F.A., Giles, G.G., Parry, S., (2017), Alcohol Consumption and the Risk of Colorectal Cancer for Mismatch Repair Gene Mutation Carriers. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, 26, 366–375.
- Dobson A., et al., (2012), Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 1-6.
- Dos Reis, S.A., da Conceição, L.L., Siqueira N.P., Rosa, D.D., da Silva L.L., Peluzio M.D., (2017), Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutr. Res.* 37, 1–19.
- E Giraud, B Lelong and M Raimbault. (1991), Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum* *Applied Microbiology and Biotechnology.* 36(1), 96–99.

- Elsa J., Florian C., Harry S., Philippe L., Luis G., Bermúdez H., (2017), Probiotic Strain *Lactobacillus casei* BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Front. Immunol*, 8, 13-23.
- Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., & La Vecchia, C., (2011), Alcohol drinking and colorectal cancer risk, An overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann. Oncol.*, 22, 1958–1972.
- Felis GE., Dellaglio F., (2007), "Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria", *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44-61.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, & D., Bray, F.(2012), Cancer incidence and mortality worldwide, Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN, *Int. J. Cancer*, 136, 359–386.
- Fiedurek, J., (2014), (Ed.) Probiotics. In *Microbiome and Human Health*, University of Maria Curie-Skłodowska Publishing House, Lublin, Poland, 124–125.
- Fijan, S., (2014), Microorganisms with Claimed Probiotic Properties, An Overview of Recent Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11, 4745–4767.
- Finlay, A., Macrae, R.M.G., Seres, D., & Savarese, D.M.F., (2018), Colorectal Cancer, Epidemiology, Risk Factors, and Protective Factors.
- Food and Agriculture Organization (FAO), (2002), World Health Organization (WHO). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, FAO/WHO: London, ON, Canada, 1–11.
- Frandsenfeld CL., et al., (2014), Obesity prevalence in relation to gut microbial environments capable of producing equol or O-desmethylangolensin from the isoflavone daidzein. *Eur J Clin Nutrition*, 68, 526-530.
- Fu-Xiang, Y., Wei-Jian, H., Bin, H., Yi-Hu, Z., Qi-Yu, Z., & Lin, C., (2015), Bone marrow mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell proliferation and invasion.
- Fuller, R. (1986). Probiotics. *Journal of Applied Bacteriology*, 63, 1–7.
- Fuller, R., (1992), History and development of probiotics. In *Probiotics*, Springer, 1-8.
- Gosai V., Ambalam P., Raman M., Kothari C.R., Kothari R.K., Vyas B.R.M., Sheth N.R., (2011), Protective effect of *Lactobacillus rhamnosus* 231 against N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in animal model. *Gut Microbes* 2, 319–325.

- Hague, A., Singh, B., Paraskeva, C., (1997), Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells, Further fuel for the in vivo versus in vitro debate, *Gastroenterology*, 112(3),1036–1040
- Hamer HM., De Preter V., Windey W., & Verbeke K. (2011), Functional analysis of colonic bacterial metabolism, relevant to health, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302, 1-9.
- Hanahan, D., Weinberg, RA.,(2000), The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100(1), 57–70.
Hanahan, D., Weinberg, RA.,(2011), Hallmarks of cancer, The next generation, *Cell*,144,646-74.
- Hand T.W., Vujkovic-Cvijin I, Ridaura V.K., & Belkaid Y., (2016), Linking the microbiota, chronic disease and the immune system, *Endocrinol Metab*, 27(12), 831-843.
- Heeney, D. D., Gareau, M. G., and Marco, M. L., (2018), Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? Current opinion in biotechnology, 49, 140-147. doi:10.1016/j.copbio.2017.08.004.
- Hertzberger R., et al., (Jan 2014), H₂O₂ Production in Species of the *Lactobacillus acidophilus* Group: a Central Role for a Novel NADH-Dependent Flavin Reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2229-2239.
- Hill MJ., (1997), Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev.*, 6, S43–S45.
- Hojjat S.A., Fatemeh M., Hossain F., Maryam M., (2014), Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iran J Basic Med Sci.* 17(10): 815–819.
- Holzapfel, W., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, K., & Schillinger, U., (2001), Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 73, 365S-373S.
- Homayouni Rad A., L. Aghebati Maleki, H. Samadi Kafil, A. Abbasi, (2020), Postbiotics: A novel strategy in food allergy treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 12, 1–8. doi: 10.1080/10408398.2020.1738333.
- Horat, MA., Cuzick, J., (2013), Role of aspirin in cancer prevention, *Current Oncology Reports*, 15(6), 533–540.
- Hsieh, C.Y., Osaka, T., Moriyama, E., Date, Y., Kikuchi, J., Tsuneda, S., (2015), Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol. Rep.*, 3, e12327.

- Jach, M., Łoś, R., Maj, M., & Malm, A., (2013), Probiotics—technological and manufacturing aspects. *Post. Mikrobiol.*, 52, 161–170.
- JaeJin An, Eun-Mi Ha, (2016), Combination Therapy of *Lactobacillus plantarum* Supernatant and 5-Fluorouracil Increases Chemosensitivity in Colorectal Cancer Cells. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 26(8), 1490–1503
- Jan, G., Belzacq, A.S., Haouzi, D., Rouault, A., Métivier, D., & Kroemer G., (2002), Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death*, 9, 179–188.
- Jeong, CH., Joo, SH., (2016), Downregulation of Reactive Oxygen Species in Apoptosis. *J Cancer Prev*, 21(1), 13–20.
- Jingtao H., Chunfeng W., Liping Y., Wentao Y., Haibin H., Fei M., Shaohua S., Zhuang D., (2015), Anti-tumour immune effect of oral administration of *Lactobacillus plantarum* to CT26 tumour-bearing mice. *J. Biosci.* 40(2), 269–279.
- Kahouli I., Tomaro-Duchesneau C., Prakash S., (2013), Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. *J. Med. Microbiol.* 62, 1107–1123.
- Kahouli, I., Tomaro-Duchesneau, C., & Prakash, S., (2013), Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. *J. Med. Microbiol.*, 62, 1107–1123.
- Kalantzopoulos G., (1997), Fermented products with probiotic qualities. *An-aerobe.*, 3(2-3), 185 – 190.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M., (2013), Health benefits of probiotics: a review. *ISRN nutrition*.
- Kocian J., (1994), Lactobacilli in the treatment of dyspepsia due to dysmicrobia of various causes. *Vnitr Lek.*, 40(2): 79 – 83.
- Krakowiak, O., Nowak, R., (2015), Human digestive tract microflora—Significance, development, modification. *Post Fitoter*, 3, 193–200.
- Kuipers, EJ., Rösch, T., Bretthauer, M., (2013), Colorectal cancer screening—optimizing current strategies and new directions, *Nat Rev Clin Oncol.*, 10, 130–42.
- Kune G., Watson L., (2011), Lowering the Risk of Rectal Cancer among Habitual Beer Drinkers by Dietary Means. *Adv Prev Med.*, 874048.

- Lakritz, J.R., Poutahidis, T., Levkovich, T., Varian, B.J., Ibrahim, Y.M., & Chatzigiagkos, A., (2014), Beneficial bacteria stimulate host immune cells to counteract dietary and genetic predisposition to mammary cancer in mice. *Int. J. Cancer*, 135, 529–540.
- Landete, José María, Rodríguez, Héctor, Curiel, José Antonio, De Las Rivas, Blanca, De Felipe, Félix López, Muñoz, Rosario, (2010), "Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by *Lactobacillus plantarum* Strains". *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, pp., 387–396. doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00043-7., ISBN 9780123744203.
- Larrosa M., et al., (2006), Urolithins, Ellagic Acid-Derived Metabolites Produced by Human Colonic Microflora, Exhibit Estrogenic and Antiestrogenic Activities. *J Agric Food Chem.*, 54(5), 1611-1620.
- Lee HA., et al, (2015), Dead nano-sized *Lactobacillus plantarum* inhibits azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon cancer in Balb/c mice. *J Med Food*, 18(12),1400–1405
- Lee TY., Kim YH., Lee KS., (2010), et al, Human papillomavirus type 16 E6-specific antitumor immunity is induced by oral administration of HPV16 E6-expressing *Lactobacillus casei* in C57BL/6 mice. *Cancer Immunol Immunother.*, 59(11), 1727–1737.
- Libudzisz, Z.,(2016), Microflora of the human digestive tract and its effect on the body, University of Life Sciences, *Microorganisms in Food and Nutrition*, 31–40.
- Lin Zhou, Sifeng Mao, Qiushi Huang, Xiangwei He, Jin-Ming Lin, (2018), Inhibition of anaerobic probiotics on colorectal cancer cells using intestinal microfluidic systems. *Science China Chemistry* volume 61, pages1034–1042.
- Liong, M.T., (2008), Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated Mechanisms and In-vivo Evidence. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 854–863.
- Liu, D., Jiang, X.Y., Zhou, L.S., Song, J.H., & Zhang, X., (2016), Effects of Probiotics on Intestinal Mucosa Barrier in Patients with Colorectal Cancer after Operation: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicine*, 95, e3342.
- López, T.P.J., Albero, J.S., & Rodríguez-Montes, J.A., (2014), Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer. *Clin. Med. Insights Gastroenterol*, 7, 33–46.
- Mackay, J., Jemal, A., Lee, NC., & Parkin, DM., (2006), *The Cancer Atlas*. Atlanta, American Cancer Society.

- Madsen, K.L. (2012). Enhancement of Epithelial Barrier Function by Probiotics. *J. Epithel. Biol. Pharmacol*, 5, 55–59.
- Mengying S., Wenwen L., Yinglong S., Yanfeng T., Guangqing M., Fenglian M., (2020), The Effects of *Lactobacillus plantarum*-12 Crude Exopolysaccharides on the Cell Proliferation and Apoptosis of Human Colon Cancer (HT-29) Cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, doi:10.1007/s12602-020-09699-8.
- Mikelsaar M., Zilmer M., (2009), *Lactobacillus fermentum* ME-3: an anti-microbial and anti-oxidative probiotic. *Micro Ecol Health Dis.*, 21(1), 1-27.
- Mizoue, T., Inoue, M., Wakai, K., Nagata, C., Shimazu, T., Tsuji, I., Otani, T., Tanaka, K., Matsuo, K., Tamakoshi, A.,(2008), Alcohol drinking and colorectal cancer in Japanese, A pooled analysis of results from five cohort studies. *Am. J. Epidemiol.*, 167, 1397–1406.
- Mohammad Mehdi Soltan Dallal, Majid Mojarrad, Fatemeh Baghbani, Reza Raoofian, Jalal Mardaneh, Zohreh Salehipour, (2015), Effects of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on Colorectal Tumor Cells Activity (CaCo-2), *Arch Iran Med.*, 18(3).
- Mojka, K., (2014), Probiotics, prebiotics and synbiotics—Characteristics and functions. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 95, 541–549.
- Moraes-Filho, J.P., Quigley, E.M., (2015), The Intestinal Microbiota and the Role of Probiotics in Irritable Bowel Syndrome, A review. *Arq. Gastroenterol*, 52, 331–338.
- Morrison DJ., Preston T., (2016 May), Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 3,7(3), 189-200.
- Mosmann T., (December 1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of Immunological Methods*, 65 (1–2), 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H., (2012), Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334(1), 1-15.
- Niederreiter, L., Adolph, T.E., & Tilg, H.,(2018), Food, microbiome and colorectal cancer. *Dig. Liver Dis.*, 50, 647–652.
- Ohhira I., et al., (2004), Identification of 3-phenyllactic acid as a possible antibacterial substances produced by *Enterococcus faecalis* TH10. *Biocontrol Science*, 9(3),77-81.

- Omotayo, O., Erejuwa, OO., Sulaiman, Ab., & Wahab, MS., (2013), Evidence in Support of Potential Applications of Lipid Peroxidation Products in Cancer Treatment, *Oxid Med Cell Longev*, 1-8.
- Ömer T., 2015. Kolon ve Rektum Kanseri. Türk Cerrahi Derneği. <http://www.turkcerrahi.com/wp-content/uploads/kolon-ve-rektum-kanseri.pdf>.
- Öner O., Aslım B., Aydas SB., (2014), "Mechanisms of cholesterol-lowering effects of lactobacilli and bifidobacteria strains as potential probiotics with their bsh gene analysis", *J Mol Microbiol Biotechnol*, 24, 12-18.
- Rao, R.K., Samak, G.,(2013) Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Curr. Nutr. Food Sci.*,9, 99–107.
- Robinson, R. K., (2005), *Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products*: John Wiley & Sons.
- Roy, PS., Saikia, BJ.,(2016), *Indian Journal of Cancer, Cancer and cure, A critical analysis*,53,3,441-442.
- Ruggiero P., (November 2014), "Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*". *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 5 (4), 384–91. doi:10.4291/wjgp.v5.i4.384.
- Russo, P., Peña, N., de Chiara, M. L. V., Amodio, M. L., Colelli, G., and Spano, G., (2015), Probiotic lactic acid bacteria for the production of multifunctional fresh-cut cantaloupe. *Food Research International*, 77, 762-772.
- Sanders, M., (2008), Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 Suppl 2, S58-61; discussion S144. doi:10.1086/523341
- Sandes S., Alvim L., Silva B., (2017), et al, Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: looking for immunobiotics through in vitro and in vivo approaches for immunoprophylaxis applications. *Microbiol Res.*, 200(1), 1–13.
- Schroeder, A., (2011), Treating metastatic cancer with nanotechnology, *Nat Rev Cancer*,12(1), 39-50.
- Scientists Revisit(2011), Hallmarks of Cancer, *Science Daily*,04-04.
- Shehata MG., El Sohaimy SA., El-Sahn MA., Youssef MM., (2016), "Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity", *Annals of Agricultural Science*, 61(1), 65-75.

- Shewale, R. N., Sawale, P. D., Khedkar, C., & Singh, A., (2014), Selection criteria for probiotics: A review. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*, 9.
- Shivappa, N., Godos, J., Hebert, J.R., Wirth, M.D., Piuri, G., Speciani, A.F., & Grosso, G., (2017), Dietary Inflammatory Index and Colorectal Cancer Risk-A Meta-Analysis. *Nutrients*, 9, 1043.
- Siegel, R., Ward, E., & Brawley, O., (2011), Cancer statistics, the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths, *CA Cancer J Clin*, 61, 212-36.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., & Jemal, A., (2018), Cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.*, 68, 7–30.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fedewa, S.A., Ahnen, D.J., Meester, R.G.S., Barzi, A., & Jemal, A., (2017), Colorectal cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.*, 67, 177–193.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., & Jemal, A., (2017), Cancer Statistics, *CA Cancer J Clin*, 67, 7-30.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., & Levi-Schaffer, F., (2000), Role of reactive oxygen species in apoptosis induction, *Apoptosis*, 5, 415–418.
- Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval F., Roperch J.P., Letulle S., Langella P., Corthier G., Tran Van Nhieu J., Furet J.P., (2011), Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients. *PLoS ONE* 6, e16393.
- Stiles M.E., Holzapfel W.H., (1997), "Review article. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy", *Int. J. Food Microbiol.*, 36, 1-29.
- Tartik, M., Darendelioglu, E., Aykutoglu, G., & Baydas, G., (2016), Turkish propolis suppresses MCF-7 cell death induced by homocysteine, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 704-712.
- Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N., (2019), Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*, 11(7), 1591. doi:10.3390/nu11071591
- Thanikachalam, K., Khan, G., (2019), Colorectal Cancer and Nutrition, *Nutrients*, 11, 164.
- Theodoratou, E., Timofeeva, M., Li, X., Meng, X., Ioannidis, J.P., (2017), Nature, Nurture, and Cancer Risks, Genetic and Nutritional Contributions to Cancer, *Annual Review of Nutrition*, 37, 293–320.

- Trichopoulos, D., Lagiou, P., & Adami, H.-O.,(2005), Towards an integrated model for breast cancer etiolog, the crucial role of the number of mammary tissue-specific stem cells. *Breast Cancer Res.*, 7(1),13–7.
- Uccello M., Malaguarnera G., Basile F., D'agata V., Malaguarnera M., Bertino G., Vacante M., Drago F., Biondi A., (2012), Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surg.* 12, S35.
- Vasen, H.F.A., Tomlinson, I., Castells, A., (2015), Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 12,88–97.
- Vesely, MD., Kershaw, MH., Schreiber, RD., & Smyth, MJ.,(2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 29,235-271.
- Warthin, AS.,(1913), Heredity with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan. *Arch Intern Med.*, 12,546–55.
- Wasilewska E., Złotkowska D., Pijagin M.E., (2013), The role of intestinal microflora and probiotic bacteria in prophylactic and development of colorectal cancer. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 67, 837–847.
- Willett W.C.,(2000), Diet and Cancer, *The Oncologist*, 5(5), 393–404.
- Wronkowski,Z., Bruzewicz, S., (2008), Malignant neoplasms of the large intestine, General information In *Colorectal Cancer*, PZWL Medical Publisher, 25–40.
- Yao XY., Yuan MM., Li DJ., (2007), Molecular adjuvant C3d3 improved the anti-hCGbeta humoral immune response in vaginal inoculation with live recombinant *Lactobacillus* expressing hCGbeta-C3d3 fusion protein. *Vaccine.*, 25(32), 6129–6139.
- Yazdi MH., Soltan Dallal MM., Hassan ZM., Holakuyee M., Agha Amiri S., Abolhassani M., et al., (2010), Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* induces IL-12 production in the spleen cell culture of BALB/c mice bearing transplanted breast tumor. *Br J Nutr.*, 104(2), 227 – 232.
- Z. Matejčková, et al, (2016), Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. *Acta Chimica Slovaca.* 9(2), 104—108.
- Zhang, H., Ma, L., Jiang, S., Lin H., Zhang, X., Ge, L., and Xu, Z., (2010), Enhancement of biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* by salicylic acid against gray mold spoilage of strawberries. *International Journal*

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : UYSAL KILIÇ, TUĞBA

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji ABD	2017
Lisans	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2013

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2019	Hitit Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1. Eskiizmir G., Calıbası Kocal G., Uysal T., Ellidokuz H., Baskin Y. Cetuximab alone has a dose-dependent antitumor effect in oral cavity cancer cells: an in vitro study.' Experimental Study, ENT Updates, 2016;6(3):105-1

2. Uysal T., Mert N., Cavas L., Ellidokuz H., Baskin Y. Fractionated Triterpenoid Glycosides From Sea Cucumber Inhibit Invasion And Metastasis In Human Cancer Cells.' FEBS Journal, Volume:283 (2016).
3. Mert N., Uysal T., Cavas L., Ellidokuz H., Baskin Y., Cytotoxic Effect Of Fractionated Triterpenoid Glycosides From *Holothuria Polii* In Human Cancer Cells.' FEBS Journal, Volume:283 (2016)
4. Cakıroglu E., Uysal T., Calıbası Kocal G., Aygenli F., Baran G., Baskin Y. The Role of *Morus Nigra* Extract and Its Active Compounds as Drug Candidate on Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line HT-29.' International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research, 2017; 2(1): 10-14, doi: 10.11648/j.ijcocr.20170201.13

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler :

1. Uysal T., Cakıroglu E., Calıbası Kocal G., İnanc Ş., Baskin Y. Osteosarcoma Tumor Microenvironment Relationship in 3D In vitro Co-Culture Models, 4th International Medical Congress For Student And Young Doctors, Bakü, Azerbeycan 2017 Oral Presentation
2. Baskin Y., Cakıroglu E., Calıbası Kocal G., Uysal T., Ellidokuz H. Prospective, Observational Nationwide Study On Pharmacogenomics/Genetics Of Childhood Cancers In A Cohort Of Turkish Paediatric Oncology Group (TURKPEDGX). 48th Congress Of The International Society Of Paediatric Oncology (SIOP) (19-22 Ekim 2016), Dublin, İrlanda, Poster Presentation
3. Baskin Y., Cakıroglu E., Calıbası Kocal G., Uysal T., Ellidokuz H. Turkey Childhood Cancers Pharmacogenomics / Genetics (Turkpedpgx) Study Tpop Cohort. XIX. National Pediatric Cancer Congress (Mayıs 2016) İzmir, Türkiye, Oral Presentation
4. Guldas N., Akbarpour M., Uysal T., Cakıroglu E., Baskin Y., Ellidokuz H. Pro-Inflammatory Effects Of Carvacrol On *Staphylococcus Aureus*. 6th Southeast European Conference On Chemotherapy And Infection. (13-15 Kasım 2015), Thessaloniki, Greece, Poster Presentation
5. Akbarpour M., Baskin Y., Uysal T., Calıbası Kocal G., Cakıroglu E., Ellidokuz H., Oztop İ. Role of RAS/RAF/MAP Kinase Pathway in Personalized Cancer Management of Metastatic Colorectal Cancer. 2nd International Medical Congress for Student and Young Doctors (6-7 Kasım 2015), Bakü, Azerbeycan, Oral Presentation
6. Uysal T., Baskin Y., Calıbası Kocal G., Akbarpour M., Cakıroglu E. In Vitro Systems in Cancer Research. 2nd International Medical Congress

- for Student and Young Doctors (6-7 Kasım 2015), Bakü, Azerbeycan, Oral Presentation
7. Kaya B., MEtin M., Kaya S., Un S., Eker O., Yazkan A., Akbarpour M., Uysal T., Cakıroglu E. Baş Boyun Kanseri Hücre Hattında Fitokimyasalların Anti Kanser Özelliklerinin Araştırılması. IX. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu (Eylül 2015), İzmir, Türkiye, Poster Presentation (Investigation of Anticancer Features of Phytochemicals in Head and Neck Cancer Cell Line. IX. Symposium of Special Study Module (September 2015), Izmir, Turkey, Poster Presentation)
 8. Kıvanç G, Yakup D, Mahmut T, Bedirhan S, Serhat T, Buket B, Nigar A, Birkan A, Ozan TE, Anwar A, Kağan Dağdeviren, Mahdi A, Tugba U, Ece Çakıroğlu, Mustafa C, Baskın Y, Hülya Ellidokuz. Hekimlerin Biyoinformatik ve Tıbbi Bilişim Alanındaki Farkındalıkları. IX. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu (Eylül 2015), İzmir, Türkiye, Poster Presentation (Awareness of Physicians on Bioinformatics and Medical Informatics. IX. Symposium of Special Study Module (September 2015), Izmir, Turkey, Poster Presentation)
 9. Kanser Araştırmalarında Sık Kullanılan Biyoinformatik Veri Tabanları. IX. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu (Eylül 2015), İzmir, Türkiye, Poster Presentation (Bioinformatics Databases Commonly Used in Cancer Research. IX. Symposium of Special Study Module (September 2015), Izmir, Turkey, Poster Presentation)
 10. Ahmet Burak Kale, Büşra Dügeroğlu, Figen Tuna,, Gurbet Yağmacı, Gülcan Candemir,, Güşta Uysal,, Hümeyra Köse,, Merve Can, Ece Çakıroğlu, Mahdi Akbarpour, Tuğba Uysal,, Baskın Y. Kolorektal Kanser Hücre Hattında İlaç Adayı Olarak Morus Nigra Ekstraktı Ve Etken Maddelerinin Rolü. IX. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu (Eylül 2015), İzmir, Türkiye Poster Presentation (The Role of Morus Nigra Extract and Active Ingredients as Drug Candidates in Colorectal Cancer Cell Line. IX. Symposium of Special Study Module (September 2015), Izmir, Turkey, Poster Presentation)
 11. Baskın Y, Çalibaşı G, Ece Çakıroğlu, Tuğba Uysal, Demir N, Sağol Ö, Ellidokuz H, Öztop İ. Türk Toplumunda Gastro-İntestinal Stromal Tümörlerde PDGFRA Mutasyon Dağılımı. 10. Onkolojik Araştırmalar Çalıştayı (6-9 Kasım 2014) Antalya, Türkiye, Poster Presentation (PDGFRA Mutation Distribution in Gastrointestinal Stromal Tumors in Turkish Population, 10 th Oncologic research workshop, Antalya, Poster Presentation)
 12. Tuğba Uysal, Ece Çakıroğlu, Çalibaşı Koçal G, Baskın Y. Cross-Talk Between Cells In 2D And 3D Co-Culture Model. 3rd International

- Medical Congress For Student And Young Doctors (1-3 Kasım 2016), Bakü, Azerbeycan, Oral Presentation
13. Tuğba Uysal, Nazlı Mert, Çavaş L, Ellidokuz H, Baskın Y. Cytotoxic Effect Of Fractionated Triterpenoid Glycosides From *Holothuria Polii* In Human Cancer Cells. FEBS (2016), Kuşadası, İzmir, Poster Presentation
 14. Dönem 2 Öçm Grubu Öğrencileri, Ece Çakıroğlu, Tuğba Uysal, Baskın Y. Igr-39 Melanoma Hücre Hattı Üzerinde İzmir Kekığı (*Origanum Onites*) Ekstresinin Antikanser Özellikleri. X. ÖÇM Sempozyumu (Eylül 2016), İzmir, Türkiye, Poster Presentation (Anticancer effects of *Origanum onites* extract on IGR-39 melanoma cells, poster presentation)
 15. Baskın Y., Çakıroğlu E., Calıbası Kocal G., Uysal T., Ellidokuz H. Turkey Childhood Cancers Pharmacogenomics / Genetics (Turkpedpgx) Study Tpop Cohort. XIX. National Pediatric Cancer Congress (Mayıs 2016) İzmir, Türkiye, Oral Presentation

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1. İnciraltı Kampüsünde Biyoistatistik ve Biyoinformatik Program Kullanım Sıklığı ve Farkındalığı. Deü Tıp Fakültesi Dergisi, Cilt 28, Sayı 2, Ağustos 2014, 45 – 50, Poster Presentation (Biostatistical And Bioinformatics Program Usage Intensity and Awareness in Inciraltı Campus. Journal of DEÜ Faculty of Medicine. Volume 28, Issue 2, August 2014, 45 – 50).

