

T.C.  
BİNGÖL-BİTLİS EREN ÜNİVERSİTELERİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE (HT-29)  
*Lactobacillus reuteri* TÜRÜNDEN ELDE EDİLEN BAZI KISA  
ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİNİN APOPTOTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ  
EKREM DARENDELİOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

BİNGÖL-2017

T.C.  
BİNGÖL-BİTLİS EREN ÜNİVERSİTELERİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE (HT-29)  
*Lactobacillus reuteri* TÜRÜNDEN ELDE EDİLEN BAZI KISA  
ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİNİN APOPTOTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Ekrem DARENDELİOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 27.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu  
(uygun olan kalıp diğeri silinecektir) ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.  
Mehmet ÇİFTÇİ  
Jüri Başkanı

Prof. Dr.  
Mustafa KARATEPE  
Üye

Doç. Dr.  
Mehtap ÖZÇELİK  
Üye

Yrd. Doç. Dr.  
Bülent KAYA  
Üye

Yrd. Doç. Dr.  
Yusuf TEMEL  
Üye

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim Y. ERDOĞAN  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesinden sonuçlanmasına kadar her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren ve benden deneysel çalışmaların yapılması ve yorumlanması esnasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, kendisini akademisyen olarak benimsediğim, hem bilimsel anlamda hem de insani değerler bakımından kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye teşekkür ederim. Tez konusunda bilgi birikimini esirgemeyen, çalışmaların tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren, eski danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ ve Sayın Prof. Dr. Ekrem ATALAN hocalarıma vermiş oldukları destek ile göstermiş oldukları yakın ilgi ve emeklerinden ötürü teşekkürlerimi sunuyorum. Tez çalışmasına desteklerinden dolayı Bingöl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (BAP-Proje No: FEF.4.16.002) teşekkür ederim.

Tez izleme sınavlarım esnasında yaptıkları yönlendirmeler ve katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent KAYA'ya ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Yusuf TEMEL'e, deneysel çalışmalar esnasında yardımlarını gördüğüm Sayın Arş. Gör. Musa TARTIK, Sayın Osama Hamid SHAREEF, Sayın Yrd. Doç. Dr. Şükrü BENGÜ'ye ve Sayın Doç. Dr. Nevzat ESİM'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak bende büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve dualarını esirgemeyen anne, baba ve kardeşlerime ve Bingöl Üniversitesindeki kıymetli dostlarıma; tezin hazırlanması sırasında gösterdikleri sabır, fedakârlık ve desteklerinden dolayı eşim Elif ve çocuklarım Zeynep ile Hüseyin Ömer'e özellikle teşekkürü bir borç bilirim.

**Ekrem DARENDELİOĞLU**

**Bingöl 2017**

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ .....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Kanser .....	1
1.2. Kolon Kanseri .....	4
1.3. Probiyotik Kaynaklı KZYA.....	6
1.4. Kolon Kanseri Tedavisinde Bazı Probiyotikler ve KZYA .....	7
1.5. Kanserli Hücrede Apoptoz Süreci .....	9
1.5.1. İntrinsik (İç) Yolağa Bağlı Apoptoz.....	11
1.6. Apoptoz Sürecinde ROS .....	11
1.7. Apoptoz Sürecinde LPO .....	12
1.8. Apoptoz Sürecinde İlgili Genlerin Ekspresyonundaki Değişimler .....	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	20
3.1. Materyal .....	20
3.1.1. DeneYlerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	23
3.1.1.1. pH Ayarlamada Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanması.....	23
3.1.1.2. PBS ve TBS Çözeltilerinin Hazırlanması .....	23
3.1.1.3. Protein Yükleme ve Yürütme Tamponlarının Hazırlanması ...	24
3.1.1.4. TBE (5X) Tamponu ve %0,8 lik Agaroz Jelin Hazırlanması ..	24

3.2. Metotlar.....	25
3.2.1. Hücreler .....	26
3.2.2. Hücre Kültürü.....	26
3.2.2.1. <i>L. reuteri</i> Türü ile Şartlandırılmış Besiyeri Hazırlanması .....	26
3.2.3. Deneysel KZYA'nin HPLC/UV-Vis Dedektörüyle Tayini .....	29
3.2.4. Hücre canlılığı analizi .....	31
3.2.4.1. Deneysel Gruplar .....	31
3.2.5. ROS Analizi .....	32
3.2.6. LPO analizi.....	32
3.2.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (QRT-PCR) Deneyleleri .....	32
3.2.8. Western Blot Tekniğı ile Hedef Proteinlerin Analizi.....	34
3.2.9. DNA Fragmentasyonu.....	35
3.2.10. İstatistiksel Analizler.....	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	37
4.1. KZYA'nin Miktarları.....	37
4.2. KZYA'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri .....	38
4.3. KZYA'nin ROS Üzerine Etkileri .....	40
4.4. KZYA'nin LPO Üzerine Etkileri.....	42
4.5. KZYA'nin Apoptozla İlişkili mRNA Ekspresyon Seviyelerine Etkisi .....	45
4.6. KZYA'nin Apoptozla İlişkili Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerine Etkisi .....	48
4.7. KZYA'nin DNA Fragmentasyonu Üzerine Etkileri.....	52
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	53
KAYNAKLAR .....	55
ÖZGEÇMİŞ .....	65

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive edici Faktör-1
BSA	: Sığır Serum Albümin
DCFH-DA	: 2,7'-Diklorofluoresein Diasetat
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Besiyeri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
FBS	: Fötal Sığır Serum
HT-29	: İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
kDa	: Kilodalton
KZYA	: Kısa Zincirli Yağ Asitleri
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Haberci RNA
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroföresi
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu
Pen-strep	: Penisilin-Streptomisin
PIC	: Proteaz İnhibitör Kokteyli
PMSF	: Fenilmetansülfonilflorit
PVDF	: Polivinilidenflorit
QRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamalı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

ŞB	: Şartlandırılmış Besiyeri
TB	: Tasarlanmış Besiyeri
TBA	: 2-tiyobarbitürik Asit
TBE	: Tris Borik Asit EDTA
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri
TBS	: Tris Tampon Tuzu
TCA	: Trikloroasetik Asit
$\mu$ l	: Mikrolitre
$\mu$ M	: Mikromolar



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Normal hücreler içerisinde kanser hücrelerinin bulunması ve çoğalması.....	2
Şekil 1.2.	Mutasyon sonrası kanser hücrelerinin gelişimi ve çoğalması.....	3
Şekil 1.3.	Sindirim sisteminde kolonun pozisyonu ve kolon kanserinin, sindirim sisteminin alt kısmı olan kalın bağırsakta (kolonda) gözlenmesi.....	4
Şekil 1.4.	Kolon kanserinde poliplerin zamana bağlı olarak kansere dönüşümü ...	5
Şekil 1.5.	Fermantasyon ürünü olarak kısa zincirli yağların oluşumu .....	7
Şekil 1.6.	Laktik asit bakterilerinin apoptoz yolları üzerindeki etki mekanizmaları.....	8
Şekil 1.7.	Apoptoz yolları ve intrinsik yoldaki moleküller.....	10
Şekil 3.1.	DeneySEL çalışma şeması.....	25
Şekil 3.2.	<i>L. reuteri</i> bakterilerinin yetiştirilmesi ve şartlandırılmış besiyeri hazırlanması.....	28
Şekil 3.3.	HPLC-UV-Vis Dedektörüyle KZYA'nin tayin edilmesi ve yeni besiyeri tasarlanması.....	30
Şekil 3.4.	DeneySEL grupların tasarlanması.....	31
Şekil 4.1.	Şartlandırılmış DMEM besiyeri içerisindeki maddelerin standart konsantrasyon grafikleri ve denklemleri.....	37
Şekil 4.2.	HT-29 kolon kanseri hücresinde KZYA'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 4.3.	HT-29 kolon kanseri hücresinde KZYA'nin ROS üretimi üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.4.	HT-29 kolon kanseri hücresinde KZYA'nin LPO birikimi üzerine etkisi .....	43



Şekil 4.5.	HT-29 kolon kanseri hücrelerinde KZYA'nın apoptoz ile ilgili gen ekspresyonu seviyesine etkileri .....	46
Şekil 4.6.	HT-29 kolon kanseri hücrelerinde KZYA'nın apoptoz ile ilgili proteinlerin ekspresyonu seviyelerine etkileri .....	49
Şekil 4.7.	HT-29 kolon kanseri hücrelerinde KZYA'nın genomik DNA üzerindeki etkileri.....	52



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar, reaktifler ve materyaller.....	20
Tablo 3.1.	(Devamı): Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar, reaktifler ve materyaller.....	21
Tablo 3.2.	Deneylerde kullanılan tüm cihazlar ve ekipmanlar .....	22
Tablo 3.2.	(Devamı): Deneylerde kullanılan tüm cihazlar ve ekipmanlar.....	23
Tablo 3.3.	Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR deneylerinde kullanılan genlere ait primer sekans dizileri.....	33
Tablo 3.4.	Western Blot deneylerinde kullanılan antikorlara ait kullanım özellikleri.....	35
Tablo 4.1.	Şartlandırılmış DMEM besiyeri içerisindeki analizi yapılan maddelerin miktarları.....	38

# İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE (HT-29) *Lactobacillus reuteri* TÜRÜNDEN ELDE EDİLEN BAZI KISA ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİNİN APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

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

Kimyasal yöntemler kolon kanserinde diğer kanser türlerinde olduğu gibi terapötik ve önleyici strateji olarak kabul edilebilir. Ancak, probiyotikler de kolon kanseri hastalarında yinelemeyi engellemede ve yan etkileri azaltmada bio-terapotikler olarak kullanılabilir. Kolon kanserine yakalanma riskinin yaşa bağlı artış göstermesine ek olarak, yeme alışkanlıkları da hastalığın gelişiminde etkilidir. Beslenme yoluyla alınan probiyotik *L. reuteri*'nin bağırsakta ürettiği sekonder metabolitlerin, örneğin organik asitlerin, kolon kanseri riskini azaltmada etkili olduğu gözlenmektedir. Kısa Zincirli Yağ Asitleri (KZYA) gastrointestinal sistemde bulunan bakterilerin fermentasyon ürünleridir ve bu bakteriler ana enerji kaynağı olarak karbonhidrat kullanarak doymuş alifatik organik asitler olan KZYA'ni üretirler. Asetik, propiyonik, bütirik ve laktik asitler de dâhil olmak üzere üretilen çeşitli KZYA vardır ve bazı KZYA'nin insan kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemeye özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışma ile probiyotiklerin anti-proliferatif ve pro-apoptotik faaliyetleri açıklanarak probiyotiklerden *L. reuteri*'nin ürettiği KZYA ve diğer metabolitlerin insan kolon kanseri hücreleri (HT-29) üzerinde ROS oluşumu ve LPO seviyesinde meydana getirdiği değişiklikler ile mitokondrial apoptoz yolağındaki etkileri gözlemlenmiştir. Sonuç olarak *L. reuteri*'den elde edilen KZYA, HT-29 hücrelerinin ölüm oranlarını artırırken, ROS ve LPO üretimi yükselmiş ve mitokondrial apoptoz yolağı üzerindeki ilgili genlerin hem transkripsiyon hem de translasyon seviyesinde anlamlı şekilde değiştiği gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolon kanseri, Probiyotikler, *L. reuteri*, HT-29, KZYA, ROS, LPO, Mitokondriyal apoptoz yolağı.

# **THE INVESTIGATION OF APOPTOTIC EFFECTS OF SCFAs FROM *Lactobacillus reuteri* ON (HT-29) HUMAN COLON CANCER CELLS**

## **ABSTRACT**

Cancer is one of the leading causes of death in the world. All cancers start from cells, resulting in uncontrolled division of cells and uncontrolled spread of these dividing cells. Colon cancer is considered to be one of the leading causes of death around the World and Turkey. Colon cancer is seen in the large intestine, the last part of the digestive tract, and almost all of the colon cancers initiation, the benign polyps on the colon walls, gradually turn into malignant polyps.

In colon cancer or other types of cancer, chemical methods can be considered a therapeutic and preventive strategy. However, probiotics can also be used as biotherapeutics to reduce recurrence and side effects in colon cancer patients. In addition to the age-related increase in risk of developing colon cancer, eating habits are influential in the development of colon cancer. Secondary metabolites produced by the intestinal tract of probiotic *L. reuteri* taken by nutrition, for example organic acids, have been shown to be effective in reducing the risk of colon cancer. Short Chain Fatty Acids (SCFAs) are the fermentation products of bacteria found in the gastrointestinal tract, which use carbohydrates as the main energy source and produce saturated aliphatic organic acids, SCFAs. There are several SCFAs which including acetic, propionic, butyric and lactic acids, and some SCFAs have been shown to have apoptosis inducing properties in human colon cancer cells.

In this study, the anti-proliferative and pro-apoptotic activities of probiotics were explained and the effects of SCFAs and other metabolites produced by *L. reuteri* on mitochondrial apoptosis were observed with changes in ROS formation and LPO level on human colon cancer cells (HT-29). In conclusion, SCFAs from *L. reuteri* increased the mortality rates of HT-29 cells, increased ROS and LPO production, and observed that the genes involved in the mitochondrial apoptosis pathway changed significantly at transcriptional and translational levels.

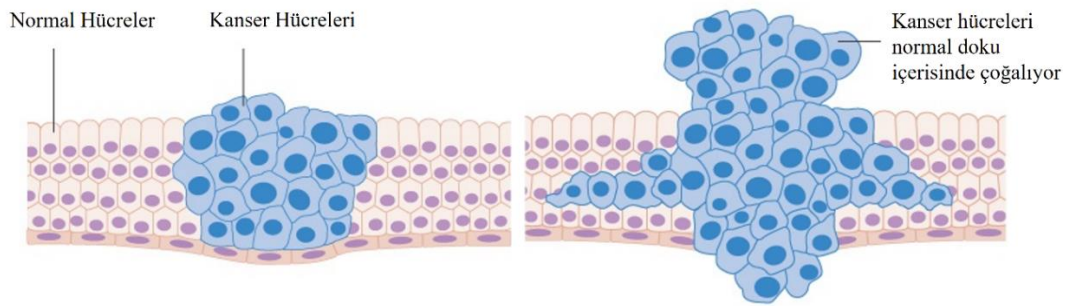
**Keywords:** Colon cancer, Probiotics, *L. reuteri*, HT-29, SCFAs, ROS, LPO, Mitochondrial apoptosis pathway.

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Kanser

Kanser dünyadaki önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve diğer ülkelerde yapılan araştırmalarda elde edilen istatistiksel veriler, ölümlerin büyük bir oranının kansere bağlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir (Ferlay et al. 2010; Rebecca et al. 2016). Ayrıca kansere bağlı ölümlerde kolon kanserlerinin etkili olduğu görülmektedir. Kolon ve rektum kanseri, özellikle birçok batı ülkesinde oldukça kayda değer bir sağlık problemi olarak değerlendirilmektedir (Perše and Cerar 2011). Türkiye İstatistik Kurumu (2016) verilerine göre Türkiye'de sindirim sisteminde görülen kanser vakaları arasında gastrik ve kolon kanserlerinin ön sıralarda bulunduğu kabul edilmektedir.

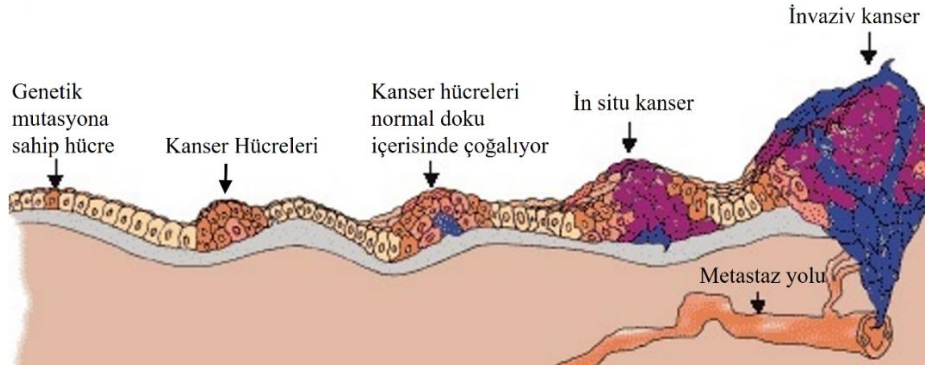
Tüm kanserler hücrelerden başlar. Vücudumuz yüz milyondan fazla hücreye sahiptir ve kanser, bir hücrede veya küçük bir hücre grubunda meydana gelen değişikliklerle başlar (Şekil 1.1) (Url 1). Bir kanserin başlaması için, bir hücrenin veya bir hücre grubunun genlerinde bazı değişiklikler olur ve bunun sonucunda hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve bu bölünen hücrelerin yine kontrolsüz yayılması gerçekleşir (Alberts et al. 2007; Url 2). Kanseri köken aldıkları dokuları göz önünde bulundurarak sınıflandıracak olursak; lösemi ve lenfoma, kan hücrelerinden; sarkoma, bağ ve kas dokulardan; karsinoma, epitel dokulardan köken alan kanser türleridir (Alberts et al. 2007). Kanserin oluşumunda pek çok aşama mevcuttur ve her adım kanserlerin gelişimini hızlandırmaktadır (Dilsiz 2004). Kanserin oluşumu ve gelişimi sürecinde gerçekleşen olaylar henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, bu süreçte bazı önemli genlerde oluşan ve kanserli hücrelere bazı büyüme avantajları kazandıran mutasyonların çoğalması ön plana çıkmakta, beslenme alışkanlıkları da önemli bir yer tutmaktadır (Lüleyap 2008; Lakritz et al. 2014).



Şekil 1.1. Normal hücreler içerisinde kanser hücrelerinin bulunması ve çoğalması (Url 2)

Benzer bir ifadeyle kanser, canlılığın en başlıca birimi olan hücrede, hücre içi ve dışı ile iletişim kurmasında görevli sinyallerin, normal hücrelerde sınırlı ve doğru bölünmeyi kontrol ederken, kanser hücrelerinde sınırsız ve yanlış bölünmeleri kontrol edememesi olarak tanımlanabilmektedir (Öner 2003; Pogribny 2010). Farklı hücre türleri farklı işleri yapmakla sorumludur ancak temelde benzer özelliklere sahiptirler. Hepsinde çekirdek denilen bir kontrol merkezi bulunmakta ve çekirdeğin içerisinde uzun deoksiribonükleik asit (DNA) dizilerinden oluşan kromozomlar yer almaktadır (Dilsiz 2004). Yönetici molekül olarak DNA, hücrenin nasıl davranacağını belirleyen kodlanmış mesajlardan oluşan binlerce gen içermektedir. Genin ifadesi olan haberci RNA (mRNA) ve protein hücrenin kontrol edilmesinde görevlidirler ve hücrenin ne tür bir hücre olacağına, ne yapacağına, ne zaman bölüneceğine, ne zaman öleceğine karar verirler (Lüleyap 2008).

Genellikle genler, hücrelerin düzenli ve kontrollü bir şekilde çoğalmasını sağlar ve vücudun sağlıklı kalması için yeterli sayıda hücrenin üretilip üretilmediğinden sorumludurlar. Bazen hücre bölünmesinde genlerde mutasyon adı verilen değişiklikler meydana gelebilir. Bazı mutasyonların sonucunda, hücrenin artık talimatları anlamadığı, kontrolden çıkmaya başladığı durumlar gözlenebilir (Şekil 1.2) ve normalden farklı işleyen anormal proteinler üretilebilir. Belirli genlerdeki mutasyonlar, bir hücrenin bölünmesini tetikleyen proteinlerin çok fazla ya da hücrenin bölünmesini durdurabilen proteinlerin çok az üretilmesine neden olabilir (Dilsiz 2004). Bu mutasyonların sonucunda hastalıklar veya hastalıkların gelişimleri gibi kavramların tümünde genetik bir temelden söz edilebilir. Son yıllarda kanser hastalığı için etkili gen sayısı 421 iken, 6251 gen de kanser hastalığında aday genler olarak gösterilmektedir (Lüleyap 2008).



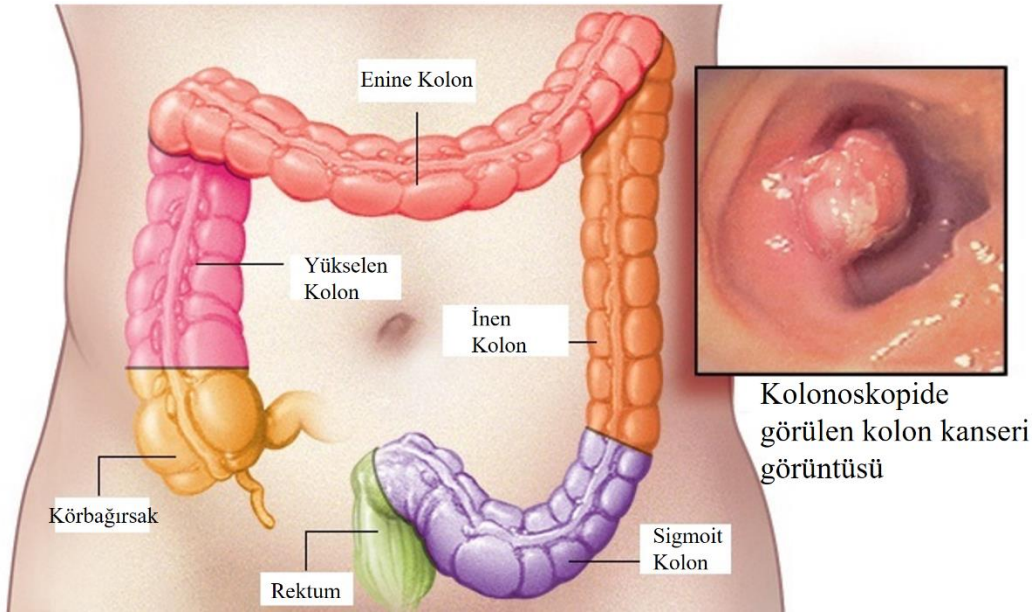
Şekil 1.2. Mutasyon sonrası kanser hücrelerinin gelişimi ve çoğalması (Url 3)

Kanser hücrelerinde genel olarak bulunan ve onları normal hücrelerden ayıran bazı özellikler yer almaktadır. Kanser hücreleri; çoğalırken (proliferasyonda) dış sinyallere ihtiyaç duymazlar ve bunun sonucunda apoptozla ilgili gelen sinyallerden normal hücrelere göre daha az etkilenirler. Mutasyon oranı oldukça yüksek ve buna bağlı olarak oldukça kararsız hücrelerdir. Sınırsız sayıda bölünebilme özelliğine sahiptirler. Beslenmelerini ve dağılmalarını kolaylaştırabilmek için anjiyogenezi (damarlanmayı) indükleyebilir ve bunun sonucunda metastaz yaparak diğer dokulara dağılabilir ve bu dokularda çoğalmaya devam edebilirler (Şekil 1.2) (Alberts et al. 2007).

Canlı organizmalarda görülen hücre çoğalmasının düzenlenmesi, bazen çeşitli etmenlerle bozulabilmektedir. Organizmanın ihtiyacı olmasa bile herhangi bir dokuda görülen kontrol dışı hücre bölünmesi hücrelerin sayısında anormal bir artışa neden olabilmektedir ve normal bir hücrede bazı genetik değişimlerin etkisiyle süreç kanser oluşumuna yönelmektedir (Lüleyap 2008). Bu kanserli hücrelerin şekil ve işlevleri normal hücrelerden farklılık göstermektedir. Sonuç olarak, hem yapısal hem de fonksiyonel açıdan normal olmayan bir doku kitlesi ortaya çıkmakta ve bu kitle tümör olarak anılmaktadır. Tümör alanındaki hücrelerde aşırı ve kontrolsüz artış sonrası yükselen besin gereksinimlerini karşılayabilmek için kan ve lenf yoluyla diğer dokulara yayılma başlar (Dilsiz 2004; Pogribny 2010). Buna göre tümörler buldukları alanlarda sınırlı kalarak büyüme gösteriyorsa yani vücudun diğer bölgelerine dağılmıyorsa iyi huylu (benign); devamlı bölünerek büyüme gösteriyor ve lenf ya da kan dolaşımı yoluyla metastaz yaparak vücudun diğer bölgelerine dağılma gösteriyorsa kötü huylu (malign) tümörler olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.2) (Lüleyap 2008).

## 1.2. Kolon Kanseri

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

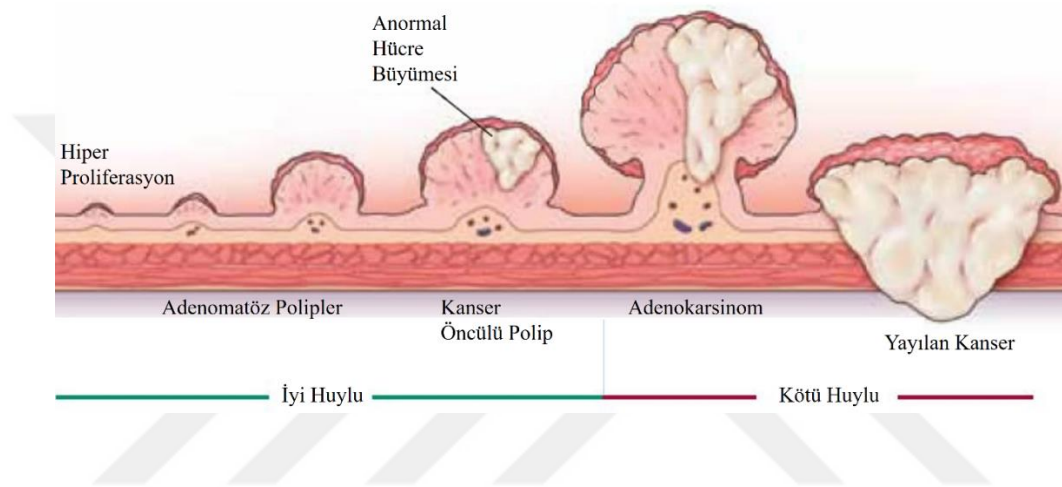


Şekil 1.3. Sindirim sisteminde kolonun pozisyonu ve kolon kanserinin, sindirim sisteminin alt kısmı olan kalın bağırsakta (kolonda) gözlenmesi (Url 4)

Kolon kanseri tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerindedir (Ferlay et al. 2010). Kolon kanseri (ABD’nde) tüm kanser çeşitleri içerisinde erkeklerde ve kadınlarda en yaygın gözlenen üçüncü kanser çeşididir (Rebecca et al. 2016). Sindirim sisteminde kalın bağırsakta meydana gelen kolon kanseri dünyadaki en çok görülen kanser türlerinden biri olup özellikle gelişmiş ülkelerde çok sayıda ölüme neden olabilmektedir (Nakao et al. 2009; Tian et al. 2011). Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalar, kolon kanseri erken dönemlerde uygun metotlarla tespit edilebilirse, hastalığın önlenebileceğini ortaya çıkarmaktadır (Halpern et al. 2009).



Kolon kanserlerinin hemen hepsi, kolon ve rektum duvarlarındaki iyi huylu poliplerin zamana bağlı olarak kötü huylu poliplere dönüşümüyle açığa çıkar (Şekil 1.4) (Borinstein et al. 2010). İlk seviyelerde semptomları yoktur, ancak tespitleri tarama metotları ile gerçekleştirilebilir. Devamındaki safhalarda karında ağrı, iştahta kesilme, kiloda kayıp ve rektal kanamalar gözlenebilir. Tedavi hastalığın evresi göz önünde bulundurularak yalnızca ameliyat ile kanserli dokunun alınmasıyla yapılır; ancak ilerlemiş evrelerde ameliyata ek olarak kemoterapi ve radyoterapi de uygulanabilir (Url 1).



Şekil 1.4. Kolon kanserinde poliplerin zamana bağlı olarak kansere dönüşümü (Url 5)

Kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %90'ı genetik yatkınlık olmaksızın sporadik, yaklaşık %10'u ise genetik nedenli olarak tespit edilmiştir. Tarihsel olarak, kolorektal kanser sınıflandırması yalnızca klinik ve patolojik özelliklere dayanmaktadır (Bogaert and Prenen 2014). Ancak bazı kanserli dokulardaki mutasyon analiz çalışmaları, normal bağırsak epitel hücrelerinin kanserleşmesinden sorumlu olan genetik adımların niteliğini ve sayısını belirleyebilmektedir (Öner 2003). Birçok kolon kanseri çalışması, bu kanserin bir dizi mekanizma ile meydana geldiğini göstermektedir. Bu mekanizmalar tümör süpresör genlerde (APC, p53) meydana gelen mutasyonlar, onkogen aktiviteleri ve epigenetik değişim mekanizmaları (metilasyon, asetilasyon) olarak ileri sürülmektedir (Tuynman et al. 2004; Bogaert and Prenen 2014).

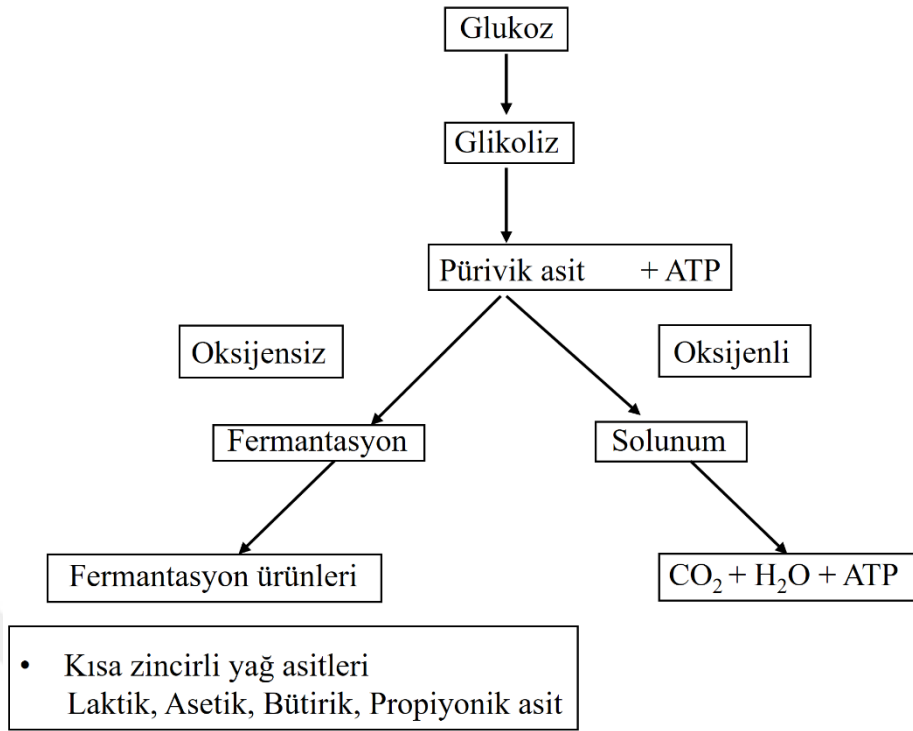
Örneğin, Ailevi Adenomatöz Polipozis (FAP) hastalığı sürecinde ortaya çıkan ilk mutasyon kalıtsaldır ve kolonda yüzlerce benign adenomların gelişmesine sebep olabilmektedir. Oluşan ilk mutasyon 5. kromozomda yer alan APC (Adenomatözis

polipozis koli) geninde gerçekleşmektedir (Öner, 2003; Bogaert and Prenen 2014). Kolon kanserli vakalarda mutasyon geçirmiş APC genine ait ürün olarak aktif olmayan APC proteininin varlığı açığa çıkarılmıştır. Bu vakalarda, preadenokarsinom APC gen mutasyonu nedeniyle gelişmekte ve sonraki süreçte tamamen adenokarsinoma dönüşüm göstermektedir (Şekil 1.4) (Tuynman, 2004; Bogaert and Prenen 2014).

Kolon kanseri vakalarının görülme yoğunluğu yaşa göre değişim göstermekte ve takribi olarak 2 milyon kişide bulunan bu kanser türünün 65 yaş ve üstünde yoğunlaştığı görülmektedir (Guessous et al. 2010). Kolon kanserine yakalanma riskinin yaşa bağlı artış göstermesine ek olarak, düzensiz yaşam biçimi ve yeme alışkanlıkları hastalığın gelişiminde etkilidir. Aşırı kilo, aşırı kırmızı ve işlenmiş et tüketimi, alkol tüketimi, yüksek yağ veya düşük lifli diyet hastalığa yakalanma riskini artıran faktörlerdendir (Lakritz et al. 2014; Url 1). Beslenme yoluyla alınan probiyotiklerin bağırsakta ürettikleri sekonder metabolitlerin, örneğin organik asitler ve peptitlerin, kolon kanseri riskini azaltmada etkili olduğu gözlenmektedir (Garagnani et al. 2013).

### **1.3. Probiyotik Kaynaklı KZYA**

Kısa Zincirli Yağ Asitleri (KZYA) gastrointestinal sistemde bulunan bakterilerin fermentasyon ürünleridir (Şekil 1.5). Bu bakteriler, ana enerji kaynağı olarak karbonhidrat kullanırlar ve doymuş alifatik organik asitler olan KZYA'ni üretirler. Üretilen KZYA'nin miktarı fermantasyon yeri, diyet, gastrointestinal sistemde harcanan zaman ve mevcut bakterilerin bileşimi gibi farklı faktörlere bağlıdır (Besten et al. 2013). Asetik, propiyonik, bütirik ve laktik asitler de dâhil olmak üzere metabolik aktivitenin sonucu olarak üretilen çeşitli KZYA vardır ve bazı KZYA'nin insan kolonik karsinom hücrelerinin apoptozunu indüklemeye ile birlikte anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (VanZanten et al. 2013). Ayrıca gastrointestinal sistemdeki konukçu hücreler için tercih edilen enerji kaynağıdır ve bağırsak mukoza astarının onarımı, otonom sinir sisteminin uyarılması ve gastrointestinal sistem ile ilişkili hormonların üretimi gibi birçok hücrenel sürece de dâhil olurlar (Noverr and Huffuagle 2004).

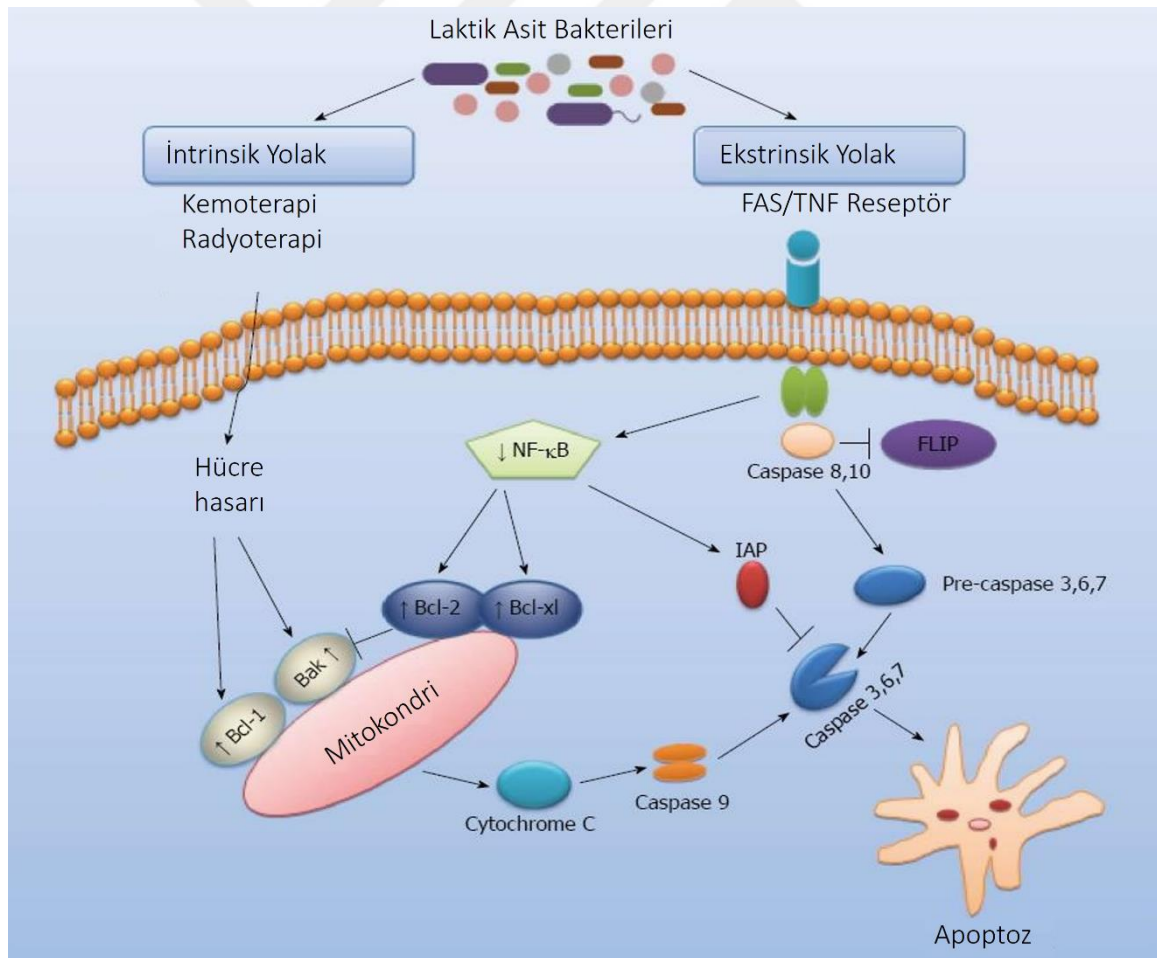


Şekil 1.5. Fermentasyon ürünü olarak kısa zincirli yağların oluşumu

#### 1.4. Kolon Kanseri Tedavisinde Bazı Probiyotikler ve KZYA

Kolon kanserinde diğer kanser türlerinde olduğu gibi kimyasal yöntemler, terapötik ve önleyici strateji olarak kabul edilebilir (Kahouli et al. 2015a). Ancak, probiyotikler de kolon kanseri hastalarında yinelemeyi önlemede ve yan etkileri azaltmada bioterapotikler olarak kullanılabilir (Gianotti et al. 2010; Liu et al. 2011; Kahouli et al. 2013). Kolon kanserindeki artışta beslenme alışkanlığının önemli etkisi gözlenmektedir. Buna bağlı olarak özellikle kanser riskini azaltan gıda takviyeleri oluşturmak, en uygun beslenme tasarımının önemini ortaya çıkarmaktadır (Fuller 1989). Probiyotikler de bu açıdan patojenik olmayan mikroorganizmalar olup konağın sağlığı ya da fizyolojisi üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır (Fuller 1989; Lakritz et al. 2014). Probiyotiklerin bağırsakta ürettikleri sekonder metabolitlerin hücresel çoğalma ve farklılaşmada, apoptozda ve kolon kanseri riskini azaltmada etkili olduğu gözlenebilmektedir (Garagnani et al. 2013; Lakritz et al. 2014).

Kanser genetiği; genetik faktörler ile radyasyon, kimyasal karsinojenler ve diyet gibi çevresel etmenlerin kombinasyonu şeklinde tanımlanabilmektedir. Bundan dolayı kanser gelişiminde beslenmenin rolü özellikle sindirim sistemi kanserlerinde epidemiyolojik çalışmalar tarafından güçlü şekilde desteklenmektedir (Willett 2000). Yapılan bazı çalışmalar, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerinin çeşitli kanser hücre hatlarında anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkilerini göstermektedir (Fichera and Giese 1994; Biffi et al. 1997). Çalışmalar aynı zamanda probiotik bakteri suşlarının hayvan modellerinde karaciğer, mesane ve göğüs tümörlerini potansiyel probiotik aktiviteleriyle inhibe ettiğini ortaya çıkarmaktadır (Reddy and Rivenson 1993; Aso et al. 1995; Biffi et al. 1997). Örneğin *Lactobacillus reuteri* insanlarda ve hayvanlarda doğal olarak yaygın bulunan güçlü anti-inflamatuvar ve anti-proliferatif etkileri olan probiotik bir türü temsil etmektedir (Reuter 2001; Ma et al. 2004) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Laktik asit bakterilerinin apoptoz yolları üzerindeki etki mekanizmaları (Zhong et al. 2014)

Bazı probiyotik bakteriler fermentasyon ile özellikle propionat ve asetat olmak üzere bazı KZYA'ni üretirler ve bunlar apoptoz aracılığıyla insan kolon kanser hücrelerini öldürebilirler (Jan et al. 2002). Bu süreç bakteri kültürü supernatantında bulunan ya da saf KZYA'nin reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve lipid peroksidasyonu (LPO) artırması, sonrasında mitokondrial trans-membran potansiyelini düşürmesi ve buna bağlı olarak anti-apoptotik Bcl-2 aktivitesini değiştirmesi, kaspaz-3 aktivitesini artırması ve çekirdekdeki kromatin stabilitesinin bozulmasını indüklemesiyle gerçekleşmektedir (Zoratti and Szabb 1995; Marzo et al. 1998; Decaudin et al. 1998; Jan et al. 2002). Bunlara ilaveten KZYA'nden biri olan butiratın, kolon kanser hücrelerinde apoptoza yol açarken normal hücrelerde bu durumu gerçekleştirmediği önceki çalışmalarda gösterilmektedir (Hague et al. 1995, 1997).

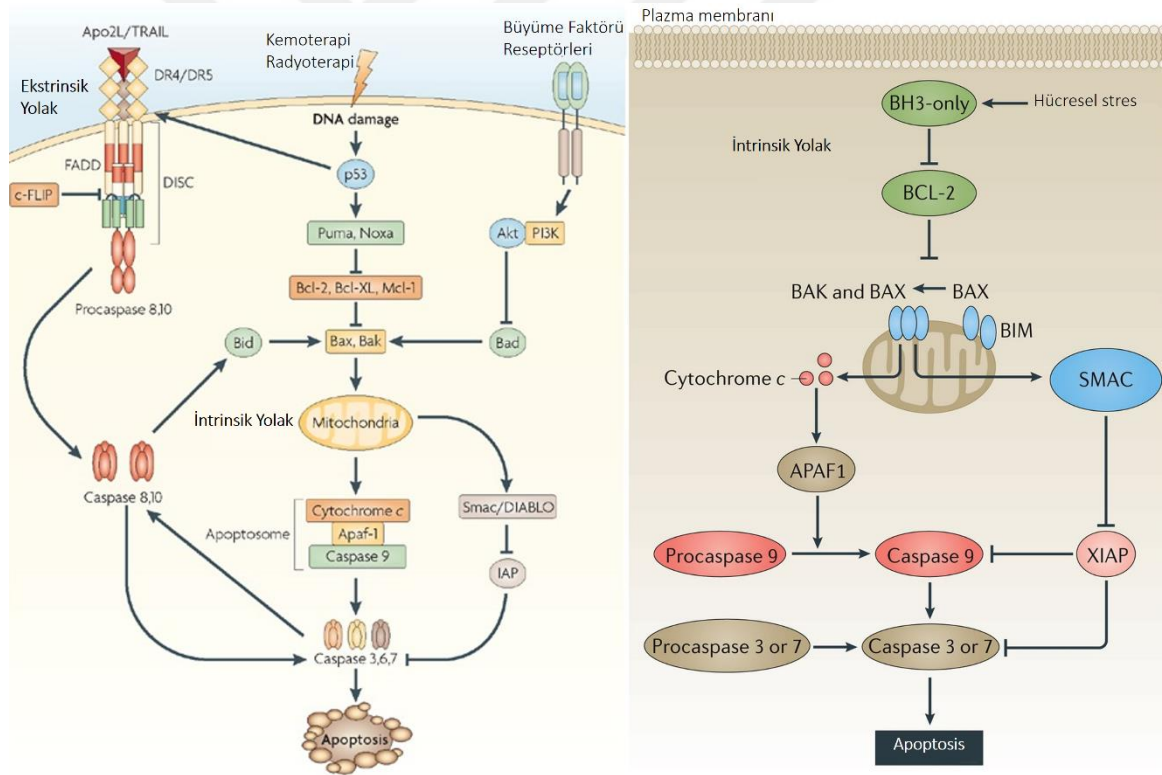
### **1.5. Kanserli Hücrede Apoptoz Süreci**

Apoptoz, genetik olarak düzenlendiği için programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanabilir (Renehan et al. 2001; Lüleyap 2008). Apoptoz genellikle farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalarla karakterize edilir. Apoptoz, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve işleyişi, embriyonik gelişme ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli işlemlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilebilir (Elmore 2007). Apoptozdaki aksaklıklar insanlarda nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün bozukluklar ve birçok kanser türü de dâhil olmak üzere birçok probleme yol açan faktörlerdir (Dilsiz 2004). Bir hücrenin ömrünü veya ölümünü kontrol etme kabiliyeti, muazzam terapötik potansiyeli nedeniyle oldukça yoğun çalışılmaktadır (Elmore 2007). Hatta önemli apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin birçoğu tanımlanmış olsa da, bu proteinlerin eylemsizliği veya eylemlerinin artmasının moleküler mekanizmaları açıklığa kavuşturulamamıştır (Elmore 2007).

En basit modelde apoptozun evreleri, başlatma, genetik düzenlenme ve efektör mekanizmaları olarak düşünülebilir (Renehan et al. 2001; Lüleyap 2008). Apoptozun başlatıcıları, anti kanser ilaçları, gama ve ultraviyole ışınları, interleukin-1 ve sitokinler gibi hayatta kalma faktörlerinin yoksun bırakılması şeklinde sınıflandırılabilir. Başlatmada bu uyarılar çeşitli yollarla karakteristik bir gen ifadesi kalıbı üretirler

(Renehan et al. 2001). Genetik düzenlenme ve efektör mekanizmalarda ise Bcl-2 gen ailesi çalışılmıştır ve bazıları pro-apoptotik veya "ölüm genleri" ve bazıları da anti-apoptotik veya "hayatta kalma genleri" olarak adlandırılır (Renehan et al. 2001). Ana efektörlerde kaspazlar adı verilen (kaspaz-9, -8, -3, vd.) bir proteaz ailesidir (Şekil 1.7) (Renehan et al. 2001; Lüleyap 2008).

Diğer bazı çalışmalar, iki ana apoptoz yolağı olduğuna işaret ediyor ki bunlar ekstrinsik veya ölüm reseptörü yolağı ve intrinsik veya mitokondriyal yolak olarak adlandırılır. Bununla birlikte, şu anda iki yolağın birbirine bağlı olduğunu ve bir yolaktaki moleküllerin diğer yolaktaki molekülleri etkileyebileceğini gösteren kanıtlar da mevcuttur (Şekil 1.7) (Igney and Krammer, 2002).



Şekil 1.7. Apoptoz yolakları ve intrinsik yolaktaki moleküller (Ashkenazi 2008; Ashkenazi et al. 2017)

### 1.5.1. İntrensik (İç) Yolağa Bağlı Apoptoz

Hücrel stres ile intrinsik yolağın aktivasyonunu takiben, pro-apoptotik BH3, anti-apoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> ve Mcl-1'i inhibe eder. Pro-apoptotik proteinler Bak ve Bax proteinlerinin aktivasyonu ve anti-apoptotik Bcl-2 ile oligomerizasyonu, mitokondrial dış membran permeabilitesinin bozulmasına neden olur. Bunu takiben mitokondrideki kaspaz aktivatörleri olarak bilinen sitokrom-c ve Smac proteinlerinin sitoplazmada çoğalması gözlenir. Sitokrom-c, prokaspaz-9 ve Apaf-1 (Apoptotik Proteaz Aktive edici Faktör-1) ile kompleks oluşturur ve bu da prokaspaz-9'un aktivasyonuna neden olur. Aktif kaspaz-9 daha sonra prokaspaz-3'ü ve prokaspaz-7'yi aktive eder ve sonuç olarak intrinsik apoptoz yolağındaki görevli tüm proteinler hücrenin ölümüne neden olurlar (Şekil 1.7) (Ashkenazi 2008; Ashkenazi et al. 2017).

### 1.6. Apoptoz Sürecinde ROS

ROS terimi genellikle hidroksil, alkoksil veya peroksil, süperoksit veya nitroksil gibi radikal türler için kullanılmaktadır. ROS, alerjik ve alerjik olmayan inflamasyonlara karşı inflamatuvar hücreler tarafından üretilmektedir. ROS'un hem DNA'yı hem de proteinleri yüksek oranda tahrip edici etkileri mevcuttur (Simon et al. 2000). Bunlara ilaveten ROS artışı, genellikle apoptozun ilerlemesinde gözlenmekte ve ROS üretimi apoptozun bir göstergesi olabilmektedir. Kanser hücrelerinde apoptozu indükledikleri için birçok anti kanser ilacın ve doğal bileşiklerin ROS düzeyini arttırdığı bilinmektedir (Jeong and Joo 2016).

ROS yüksek kimyasal aktiviteye sahiptir ve hücre çoğalması ile apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Darendelioglu et al. 2016). Bununla birlikte, antioksidanlar (indirgenmiş glutatyon, katalaz, süperoksit dismutaz) normal şartlarda hücre hasarını genellikle önlemektedirler (Simon et al. 2000). Ancak farklı pro-oksidanlarla indüklenen ROS miktarındaki aşırı artış hücrel antioksidan savunma sisteminin temizleme etkinliğini aşarak oksidatif strese yol açar ve apoptozu neden olabilmektedir (Darendelioglu et al. 2016). ROS hücre zarlarındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek LPO indükleyebilir (Barrera 2012).

### 1.7. Apoptoz Sürecinde LPO

Oksidatif stresin ikinci mesajcısı olarak da LPO düşünülebilir (Barrera 2012). Son yıllarda LPO ile ilgili çalışmalar LPO'nun hücre biyolojisi ve insan sağlığında önemli rol oynadığını göstermektedir. LPO genel olarak serbest radikal gibi oksidanların çoklu doymamış yağ asitleri içeren lipidlerin özellikle karbon-karbon çift bağlarına saldırdığı bir süreç olarak tanımlanabilir (Ayala et al. 2014). LPO reaksiyonları, hem hücre membranı hem de mitokondri membranlarında oluşabilir ve daha sonra apoptoz veya otofaji yoluyla hücre ölümünü tetikleyebilir (Choi et al. 2007).

Omotayo (2013)'ya göre sağlıklı hücrelerde zararlı etkilerinin olduğu düşünülen ROS ve sonucundaki LPO ürünleri aynı zamanda kanser tedavisinde yararlı da olabilirler. ROS'un ve ortaya çıkan LPO ürünlerinin kanser büyümesini engellemek veya kanser hücresi ölümünü indüklemek için kullanılabileceğini düşündüren araştırma bulguları da mevcuttur (Omotayo 2013). Aynı zamanda LPO ürünlerinin diğer anti-kanser ajanlarının anti-tümör etkisini güçlendirme potansiyelinin olduğu da düşünülmektedir (Jan et al. 2002; Omotayo 2013). Örneğin ileri aşamadaki kanserlerde, bazı anti-kanser ilaçları ve radyasyon tedavileri sonucunda ortaya çıkan oksidatif stresin daha da artması, kanser hücrelerinde görülen antioksidan savunma sistemlerinin üstesinden gelerek bu hücreleri apoptoza yönlendirebilmektedir (Barrera 2012). LPO hücreler arası sinyal iletim mekanizmasını, hücre proliferasyonunu, apoptozun başlatılmasını ve ilerlemesini kontrol edebilmektedir. Ayrıca LPO ve ROS'un, kanser öncesi ve sonrasında hasar görmüş hücreleri ortadan kaldıran apoptozun tetikleyicisi ve temel aracısı olduğu da gösterilmiştir (Dominguez et al. 2007).

Malondialdehit (MDA) yaygın olarak gözlenen LPO ürünlerinden birisidir (Grotto 2009). MDA'nın birikiminin membran geçirgenliğini değiştirebildiği ve aynı zamanda membran lipid çift katmanının akışkanlığını bozduğu gözlenmektedir (Jan et al. 2002; Gasparovic et al. 2013). Örneğin uzun zincirli yağ asitleri ile muamele edilen tümör hücrelerindeki LPO artışı, antioksidanların tükenmesine ve proteinlerin fosforilasyonunda artışa neden olmaktadır. Uzun zincirli yağ asitleri LPO'nu arttırarak, muhtemelen fosforilasyon ve P450 aktivitesinin indüklenmesiyle Bcl-2 ifadesini baskılayarak apoptozu



indükleyebildiği ileri sürülmektedir. Dolayısıyla uzun zincirli yağ asitleri tümör hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini üretirken onkogen ekspresyonu seviyesinde etki yapabilmektedir (Das 1999). Dahası MDA en mutajenik LPO ürünlerinden birisidir ve DNA'da deoksiadenozin ve deoksiguanozin ile reaksiyona girerek mutajenik olan DNA eklentilerinin gelişmesine yol açabilmektedir (Feng et al. 2006; Niedernhofer et al. 2003).

### 1.8. Apoptoz Sürecinde İlgili Genlerin Ekspresyonundaki Değişimler

Hücrelerin apoptoza gitmesi sürecinde mitokondriyal (intrinsik) yolak, mitokondrinin zar yapısının bozulup geçirgenliğinin artması ve bunun sonucu olarak sitokrom-c'nin sitoplazmadaki miktarının artmasını içeren en önemli mekanizmalardan bir tanesini oluşturmaktadır (Kim et al. 2015). İntrinsik yolak ile apoptozun düzenlenmesinde yakından ilgili genler ve onların ürünleri olan proteinler vardır. Bunlardan biri anti-apoptotik faaliyet gösteren Bcl-2'dir ve sitokrom-c'nin sitoplazmadaki artışını engellemek suretiyle hücreleri apoptoza karşı korurken, diğeri ise pro-apoptotik bir üye olan Bax'tır ve programlanmış hücre ölümünü uyarıcı özellik göstermektedir (Shabnam et al. 2004). Mitokondrinin sitokrom-c'ye geçirgenliği, mitokondrideki porlarda bulunan Bcl-2 ve Bax proteinlerinin translokasyonlarıyla ilgili olarak değişim göstermektedir (Reed 1997; Jurgensmeier et al. 1998). Sitoplazmada Apaf-1 ile birleşen sitokrom-c prokaspaz-9'un aktivasyonuna yol açar ve aktive edilmiş kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktive etmektedir (Ashkenazi et al. 2017).

Çalışmamızda *L. reuteri*'nin ürettiği KZYA ve diğer metabolitlerin insan kolon kanseri hücreleri (HT-29) üzerinde ROS oluşumu ve LPO seviyesinde meydana getirdiği değişiklikler ile mitokondriyal apoptoz yolağındaki etkilerini gözlemleyebilmek için farklı deney grupları tasarlanmıştır. Böylece HT-29 hücrelerinin çoğalmaları ya da ölmeleri, ROS ve LPO üretimi seviyeleri ile mitokondriyal apoptoz yolağı üzerindeki karşılaştırmalı etkileri mRNA ve protein seviyeleri ölçülerek belirlenmiştir.

Bu çalışma ile probiyotiklerin anti-proliferatif ve pro-apoptotik faaliyetleri açıklanarak probiyotikler ve tedavi amaçlı mikrobiyoloji açısından yeni bir paradigma açıklığa kavuşturulacaktır. Sonuç olarak bu çalışmadaki amacımız; HT-29 hücrelerini *L.*

*reuteri*'nin büyütüldüğü besiyerleri ile muamele edip kanser hücrelerinde ölüm oranını arttırmak ve bu inhibisyonun mitokondrial apoptoz yolağında hangi mekanizmalar ile gerçekleştirdiklerini moleküler biyoloji yöntemleriyle araştırmak ve analiz etmektir.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bağırsak ya da geleneksel fermente ürünlerden köken alan probiotik bakterilerin seçilmesi *in vitro* ya da *in vivo* çalışmalara uygunluk açısından oldukça önemlidir (Kahouli et al. 2015a). Çeşitli çalışmalar bazı probiotik bakterilerin bazı KZYA'nin düzeylerini etkileme yeteneğini göstermiştir ancak bu probiotik bakterilerin anti-kanser etkisinin KZYA'nin seviyelerine bağlı olarak değiştiği oldukça seyrek gösterilmiştir (Sivieri et al. 2013; Kailasapathy 2013; Thirabunyanon and Hongwittayakorn 2013).

Kahouli et al. (2015a) çalışmalarında *Lactobacillus fermentum*'un, anti-kanser etkileri daha önceki çalışmalarla karakterize edilen diğer bazı probiyotik bakterilere (*L. acidophilus* ve *L. rhamnosus*) kıyasla, kolon kanseri hücrelerine karşı daha yüksek oranda anti-proliferatif etkisinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca ilginç bir şekilde, *L. fermentum*'un kolonun kanserli hücrelerine karşı inhibe edici olduğu ancak normal hücrelerine karşı zararlı etkilerinin olmadığı da ortaya konulmaktadır (Kahouli et al. 2015a). Bu etkiler, *L. fermentum*'un bazı KZYA'ni üretebilme kabiliyetine sahip olması açısından kuvvetle ilişkilendirilmektedir. Bu bakterinin kolon kanseri tedavisinde alternatif bir biyoterapötik olarak antioksidan ve anti-kanser bileşikler ürettiği gösterilmektedir (Kahouli et al. 2015a).

Bağırsaktaki bakteriyel fermentasyon ile üretilen bazı KZYA'nin anti-inflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmektedir (Al-Lahham et al. 2010). Ma et al. (2004) çalışmalarında *L. reuteri*'nin insan bağırsak epitel hücrelerinde sinyal nükleer faktör-kB (NF-kB) nükleer translokasyon inhibisyonu yoluyla anti-inflamatuvar etkilere aracılık ettiğini göstermektedir.

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

Hücre canlılığı ile ilgili yapılan çalışmada KZYA'nin *in vitro* ve *in vivo* gastrointestinal dokudaki hücre proliferasyonunu düzenlediği sonuçlar gösterilmektedir (Gui and Shen 2016). Doza bağlı KZYA'nin tüketiminin epitel hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin seviyelerini nasıl indüklediği gözlemlendiğinde orta seviye miktarındaki beslenme grubunda hücre proliferasyonu ile ilgili siklin A, siklin B1, siklin D1, siklin E1, CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6 genlerinin ekspresyon seviyelerini arttırdığı kaydedilmiştir (Gui and Shen 2016). Bu sonuca bağlı olarak orta seviye miktarlı KZYA diyeti hücre çoğalmasını kontrol eden genlerin ekspresyonunu anlamlı derecede etkileyerek düzenleyebilmektedir (Gui and Shen 2016).

Kanserli hücrelerin apoptoz sürecinde kolonda gerçekleşen fermantasyon ürünü olan butirat ile indüklenmesi, kolorektal kansere karşı korunmada önemli bir mekanizma olarak düşünülmektedir. Butiratın önemli bir etkisi histon deasetilazı (kromatin gevşemesini engeller ve epigenetik olarak apoptotik gen ekspresyonunu baskılanmasına yol açar) inhibe etmektir, butirat bu enzimi inhibe ederek spesifik hücre ölüm genlerinin baskıdan kurtulması ile apoptozu indükleyebilir (Medina et al. 1997). Butiratın proenzim formundaki prokaspaz-3'ün aktif kaspaz-3'e dönüştürülmesine yol açarak kolorektal kanser hücrelerinde apoptoz programını indükleyebildiği gösterilmektedir (Medina et al. 1997). Dahası KZYA'nden olan butiratın kolon kanseri hücrelerinde apoptozu açarken normal hücrelerde apoptozu baskılayarak bu durumu gerçekleştirmediği de önceki çalışmalarda gösterilmektedir (Hague et al. 1995, 1997; Lim et al. 2010).

Kolon kanseri için alternatif biyoterapötik potansiyeli olduğu düşünülen *Propionibacterium pentosaceus*, *Lactobacillus salivarius* gibi insan kaynaklı probiyotik bakteriler ile yapılan çalışmada kanserli hücrelerin inhibisyonu sergilenmektedir. Kolon kanseri hücrelerinin proliferatif inhibisyon mekanizmalarında probiyotik bakterilerin doğrudan kolon kanseri hücrelerine yapışabilecekleri veya ürettikleri bazı KZYA'nden özellikle bütirik ve propiyonik asitlerin sinerjetik şekilde etki göstererek anti-kanser özelliğini tetikleyebileceğini ileri sürmektedir (Thirabunyanon and Hongwittayakorn 2013).

Tang et al. (2011) çalışmalarında faydalı bakterilerden *Propionibacterium* cinsine ait fermantasyon ürünlerinden bazı KZYA'nin insan kolon kanseri hücre hatlarındaki ROS üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durumun gerçekleşmesinde bazı KZYA'nin indüklenmesine bağlı olarak mitokondrial membran geçirgenliğinde artış gözlenmiş ve bu artışın hücre içi ROS oluşumundaki çoğalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Tang et al. 2011). ROS'un mitokondrial membran geçirgenliğine etkileri sonucunda anti-apoptotik Bcl-2 aktivitesini değiştirmesi, apoptotik kaspaz-3 aktivitesini artırması ve çekirdekdeki kromatin stabilitesinin bozulmasını indüklemesiyle birlikte apoptoz sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir (Zoratti and Szabb 1995; Marzo et al. 1998; Decaudin et al. 1998; Jan et al. 2002; Hofmanová et al. 2014).

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

Khan and Kang (2017) çalışmalarında, antikanser potansiyeline sahip olan *Lactobacillus plantarum* ile fermente edilmiş soya fasulyesi tohum pudrası hazırlayarak HCT-116 kolon kanseri hücrelerini bu özütle inkübe etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda, özüt kolon kanseri hücrelerinde, morfolojik değişikliklere, doza bağımlı biçimde hücrelerin koloni oluşumunda azalmaya ve apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Hücrelerin ölümü sürecinde özütün DNA fragmentasyonuna, oksidatif hasara ve indirgenmiş mitokondriyal zar potansiyeline neden olarak HCT-116 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği ileri sürülmektedir (Khan and Kang 2017). Çalışmada, *L. plantarum* ile fermente edilmiş soya fasulyesi özütü pro-apoptotik Bax'ın aktivasyonuna ve anti-apoptotik Bcl-2'nin inhibisyonuna bunun sonrasında da zayıflamış mitokondriyal membran potansiyeliyle sitokrom-c'nin salınmasına neden olarak kaspaz aracılı hücre ölümüne neden olduğu gösterilmektedir. Bu çalışma, insan kolon kanserli HCT-116 hücrelerinde *Lactobacillus plantarum* fermente soya fasulyesi tohumunun apoptotik rolünü ortaya koymaktadır (Khan and Kang 2017).

Kumar et al. (2012) çalışmalarında rat model organizmada 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile indüklenen kolon kanserinde probiyotik bakteri türü *Lactobacillus plantarum*'un antioksidan ve antikanser özellikleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada, kanserli ratların kolon ve plazmasında artmış LPO ürünleri, artmış antioksidan enzim aktiviteleri (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon-S transferaz) ve markör enzim (alkalin fosfataz ve asit fosfataz) aktiviteleri gözlemlenmiştir. Kolon kanseri başlangıcı ya da diğer evrelerinde *L. plantarum* ile beslenen ratlarda LPO, antioksidan enzim aktiviteleri ve markör enzimlerin, kolonda ve plazmada ölçülen değerlerin istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede değişim gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu değişimler, zamana bağlı olarak *L. plantarum* takviyesi ile normale dönüşmüştür. *L. plantarum* öncesi ve sonrası ratlarda ortalama tümör hacmi çapı ve toplam tümör sayısı istatistiksel olarak azalma göstermiştir. Ayrıca, histopatolojik incelemelerde, kontrol grubu ile tedavi edilen gruplar arasında belirgin farklar gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, *L. plantarum*'un, antioksidan bağımlı bir mekanizma yoluyla ratlarda DMH kaynaklı kolon kanseri oluşumunun gelişimini modüle edebildiğini göstermektedir (Kumar et al. 2012).

Gui and Shen (2016)'e ait çalışmada KZYA'nın doza bağlı olarak hücrede apoptozu düzenlediği sonuçlar gösterilmektedir. KZYA'nın hücre apoptozunda rol oynayan genlerin mRNA seviyelerini düzenlemesinde, orta seviyede tüketilen KZYA beslenme grubunda apoptotik genlerin (kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, p53 ve Bax) ekspresyonları ve Bax/Bcl-2 genlerinin ekspresyon oranları anlamlı derecede artış göstermektedir. Dolayısıyla, orta seviyede tüketilen KZYA diyetinin, apoptozu indüklediği söylenmektedir (Gui and Shen 2016).

Bir diğer çalışmada apoptoza direnç gösteren kolon kanseri hücrelerinde (Caco-2) KZYA'ndan bütiratın, anti-tümör özellik gösteren bir madde olarak apoptozu indüklemesi test edilmektedir (Ruemmele et al. 2003). Bütirat, pro-apoptotik Bak protein ekspresyonunu artırırken anti-apoptotik Bcl-X<sub>L</sub> protein ekspresyonunu düşürmektedir. Bunun sonucunda mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c'nin salınması ile prokaspaz-9, -3 ve -1'in sırasıyla aktive olup aktif kaspaz kaskadlarının oluşması süreci gerçekleşmektedir (Ruemmele et al. 2003). KZYA'ndan olan bütiratın intrinsik apoptoz yolağında anahtar enzimler olan kaspaz-3 ve kaspaz-1 aktivasyonu ile Caco-2 hücre hattında apoptozu indüklediği gösterilmektedir (Ruemmele et al. 2003).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Kullanılan tüm kimyasallar, reaktifler ve materyaller, analitik saflıkta ve steril olarak tedarik edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Deneilerde kullanılan tüm kimyasallar, reaktifler ve materyaller

Kimyasal, Reaktif ve Materyal adı	Şirket	Menşei Ülke
Laktik asit	Sigma-Aldrich	ABD
Asetik asit	Sigma-Aldrich	ABD
Bütirik asit	Sigma-Aldrich	ABD
Propiyonik asit	Sigma-Aldrich	ABD
Sodyum klorit	Sigma-Aldrich	ABD
Dulbecco`s modified eagle medyumu (DMEM)	Bio West	Fransa
Fötal sığır serumu (FBS)	Biological Industry	ABD
Laktobasil MRS Sıvı Besiyeri	LABM Company	İngiltere
Tripsin	Biological Industry	ABD
Tris (Trizma) Base	Sigma-Aldrich	ABD
2',7'-Diklorofloresein diasetat (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich	ABD
Etilenediaminetetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich	ABD
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich	ABD
Tween	Sigma-Aldrich	ABD
Trikloroasetik asit (TCA)	MERCK	Almanya



Tablo 3.1. (Devamı): Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar, reaktifler ve materyaller

2-tiyobarbiturik asit (TBA)	ACROS	ABD
Malondialdehit bis	Sigma-Aldrich	ABD
DNA izolasyon kiti	G-Dex	Belçika
Etidyum bromit	Sigma-Aldrich	ABD
Gliserol	Sigma-Aldrich	ABD
Etanol	Sigma-Aldrich	ABD
Agaroz	Sigma-Aldrich	ABD
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich	ABD
Primerler (Bax, Bcl-2, sitokrom-c, kaspaz-3, kaspaz-9, beta aktin)	Molgen	Türkiye
Antikorlar (Bax, Bcl-2, sitokrom-c, kaspaz-9, beta aktin)	Santa Cruz	ABD
RNA izolasyon kiti	Qiagen	Almanya
cDNA sentez kiti	Bioeksen	Türkiye
DNA Markörü	Serva	Almanya
Kantitatif gerçek zamanlı PZR kiti	Bioeksen	Türkiye
ECL protein görüntüleme kiti	Abcam	İngiltere
Fosfat Tampon Tuzu (PBS)	Sigma-Aldrich	ABD
25 cm <sup>2</sup> lik T flasklar	Greiner	Almanya
75 cm <sup>2</sup> lik T flasklar	Greiner	Almanya
2 ml serolojik pipetler	Greiner	Almanya
5 ml serolojik pipetler	Greiner	Almanya
10 ml serolojik pipetler	Greiner	Almanya
15 ml santrifüj tüpleri	LabSolute	Almanya
50 ml santrifüj tüpleri	LabSolute	Almanya
0,5 ml endorf tüpleri	IsoLab	Almanya
1,5 ml endorf tüpleri	IsoLab	Almanya
96-kuyu plakalar	LabSolute	Almanya

Kullanılan tüm cihazlar ve ekipmanlar Tablo 3.2 de belirtildiği üzere tercih edilmiştir.

Tablo 3.2. Deneilerde kullanılan tüm cihazlar ve ekipmanlar

<b>Cihazlar ve Ekipmanlar</b>	<b>Şirket</b>	<b>Menşei Ülke</b>
Otoklav	Hirayama	Japonya
Derin Dondurucu	Nuaire	İngiltere
Buzdolabı	Arcelik	Türkiye
Elektroforez Tank Sistemleri	Bio-Rad	ABD
İnkübatör	Jeno Tech	Kore
5% CO <sub>2</sub> İnkübatör	Nuair	ABD
Steril Kabin	Bilser	Türkiye
Işık Mikroskobu	Olympus	ABD
HPLC/UV-Vis	Shimadzu	Japonya
Spektrofotometre	Shimadzu	Japonya
Floran Mikroskop	Olympus	ABD
Laminar Hava Akım Kabini	Esco	ABD
Mikropipet Setleri	Eppendorf	ABD
Manyetik Karıştırıcı	Ika	Almanya
Saf Su Cihazı	Human	Çin
Kantitatif gerçek zamanlı PZR Rotor-Gene Q	Qiagen	Almanya
Jel Görüntüleme	Bio-Rad	ABD
Trans-Blot Sistemi	Bio-Rad	ABD
SpectraMax Plus 384 Mikroplaka Okuyucu	Molecular Devices	Almanya
UV-Spektrofotometre	Shimadzu	Japonya
iCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	Acea Bioscience	ABD
X Ray Film Sabitleme	Carestream	ABD
pH Metre	Thermo	ABD
PZR Termal-Döngü	Sensquest	Almanya

Tablo 3.2. (Devamı): Deneylerde kullanılan tüm cihazlar ve ekipmanlar

Çalkalayıcı	Gerhardt	Almanya
Buz Makinesi	Hoshizaki	Japonya
Masa Üstü Santrifüj	Hermle	Almanya
Spektrofluorometre	Perkin-Elmer Ls55	ABD

### 3.1.1. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneylerde kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

#### 3.1.1.1. pH Ayarlama Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanması

Deneyler esnasında pH ayarlama işlemlerinde kullanılmak üzere 0,1 M NaOH ve HCl çözeltileri hazırlandı.

- 1 M 100 ml NaOH çözeltisi yaklaşık olarak 4 g NaOH tartılarak manyetik karıştırıcı yardımıyla önce bir miktar saf suda çözülerek ve daha sonra 100 ml'ye tamalanarak hazır hale getirildi.
- 1 M 100 ml HCl çözeltisi %36'lık HCl'den yaklaşık olarak 8,5 ml alınıp saf su ile 100 ml'ye tamalanarak hazır hale getirildi.

#### 3.1.1.2. PBS ve TBS Çözeltilerinin Hazırlanması

Deneyler esnasında kullanılmak üzere 1 litre PBS ve TBS çözeltileri hazırlandı.

- 1 L PBS hazırlamak için 5 adet tablet şeklindeki PBS 1 L saf su içerisinde çözülüp daha sonra pH= 7,4 şeklinde ölçüldü.
- 10X TBS hazırlamak için 800 ml saf su içerisinde 60,5 g Tris ve 87,6 g NaCl çözülerek daha sonra pH= 7,6 olacak şekilde ayarlanıp çözelti 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti deneylerde kullanımından önce 10 defa seyreltilerek 1X şeklinde kullanıldı.

### 3.1.1.3. Protein Yükleme ve Yürütme Tamponlarının Hazırlanması

Western Blot deneyleri esnasında kullanılmak üzere örnek yükleme ve yürütme (5X) tampon çözeltileri hazırlandı.

1. 10 ml örnek yükleme tamponu hazırlamak için %10 SDS, 0,5 M Tris-Cl (pH: 6,8), %5 Gliserol 0,5 ml/10 ml, %25 2-Merkaptoetanol, %0,05 Bromofenol Mavisi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
2. 1 L 5X yürütme tamponu hazırlamak için 0,025 M Trizma Base, 0,192 M Glisin, %0,1 SDS 1L saf suda çözülerek hazır hale getirildi. Çalışmadan önce 1X olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı.

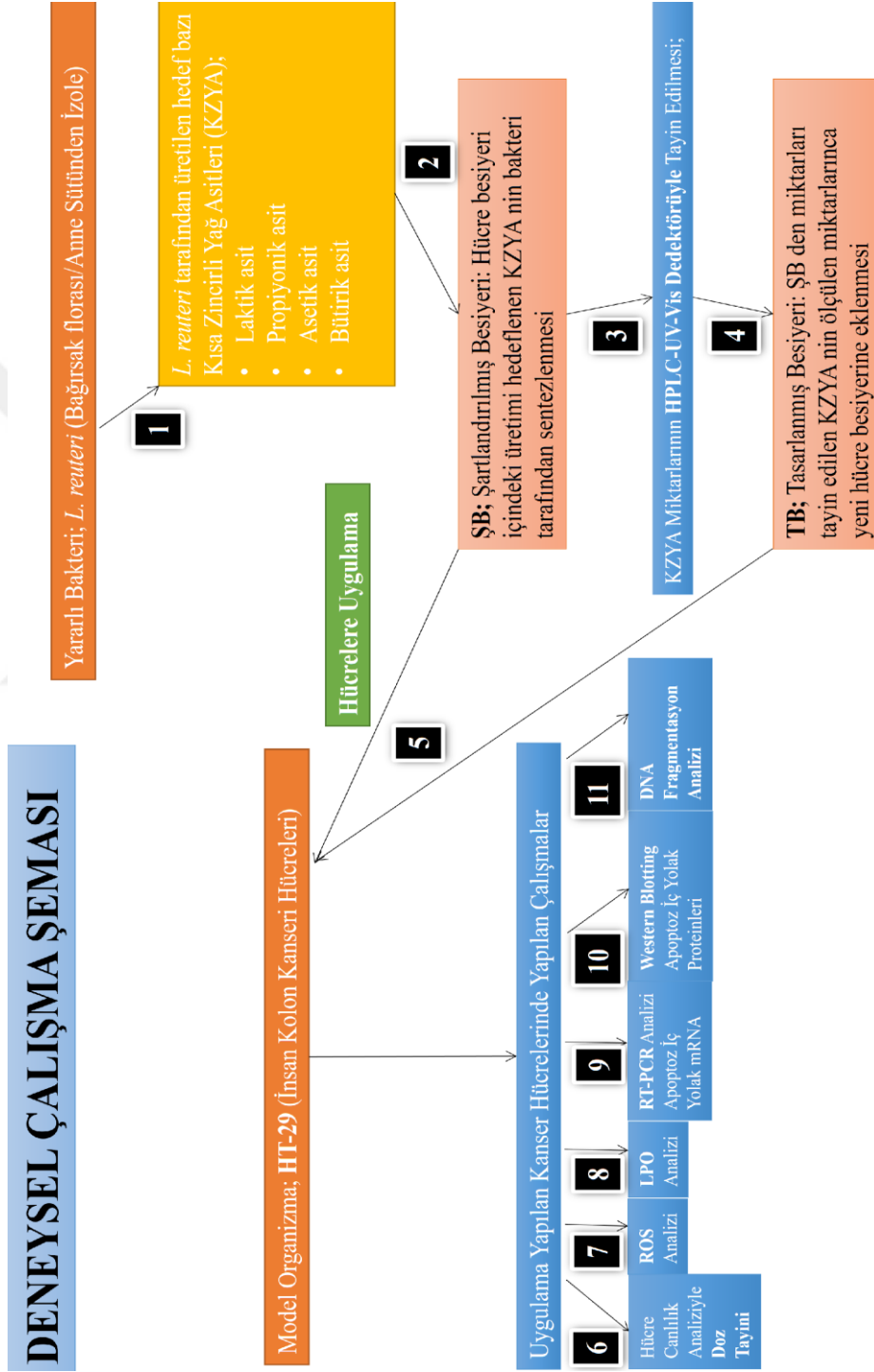
### 3.1.1.4. TBE (5X) Tamponu ve %0,8 lik Agaroz Jelin Hazırlanması

DNA fragmentasyonu deneyleri esnasında kullanılmak üzere 1 litre 5X TBE tampon çözeltisi ve %0,8'lik agaroz jeli hazırlandı.

1. 1 L 5X TBE hazırlamak için 54 gr Tris, 27,5 gr Borik Asit ve 20 mL 0,5 M EDTA tartılarak pH= 8 olacak şekilde ayarlanarak 1 L saf suda çözüldü.
2. %0,8 lik agaroz jeli hazırlamak için 0,8 gr agaroz tartılarak 1X TBE ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırında kaynatılarak eritilip soğutuldu. Sonrasında jel kalıbına dökmeden hemen önce içine 5 µl etidyum bromür eklenerek karıştırılıp jel kalıbına döküldü. Kuyucukların oluşması için jel içerisine tarak konularak jel hazır hale getirildi.

### 3.2. Metotlar

Deneysel çalışmalar şekil 3.1’de gösterildiği üzere tasarlanmış ve uygulanmıştır.



Şekil 3.1. Deneysel çalışma şeması

### 3.2.1. Hücreler

HT-29 (ATCC® HTB-38™) hücre hattı Uludağ Üniversitesinden temin edilmiştir. Bingöl Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında uygun koşullarda tutulmaktadır. *Lactobacillus reuteri* (ATCC®-23272) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilerek Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarında uygun şartlarda tutulmaktadır.

### 3.2.2. Hücre Kültürü

HT-29 (ATCC® HTB-38™) hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 antibiyotik içeren Dulbecco's modified eagle medyumunu (DMEM) büyüme medyumunda %5 CO<sub>2</sub> etüvde 37°C'de 2 ya da 3 günde bir pasajlanarak çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücreler yaklaşık olarak %70 – 80 yoğunluğa ulaştığında deneylerde kullanılmaya başlanmıştır. *Lactobacillus reuteri* (ATCC®-23272) bakteri hücreleri deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) *Lactobacillus* sıvı büyüme besiyerinde 37°C'de çalkalayıcı etüvde 140 rpm'de çalkalanarak günde bir pasajlanarak çoğaltıldı.

#### 3.2.2.1. *L. reuteri* Türü ile Şartlandırılmış Besiyeri Hazırlanması

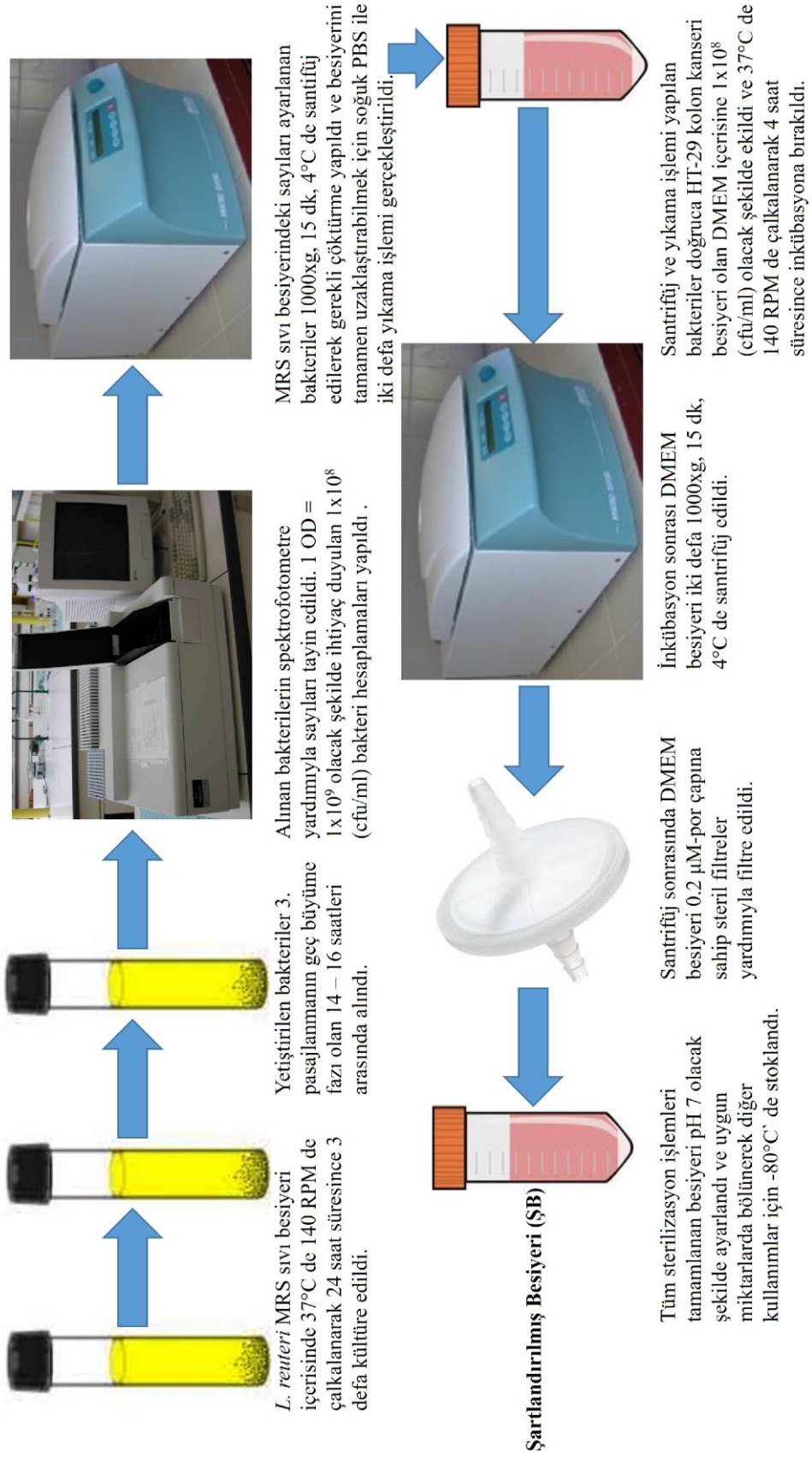
*L. reuteri* türü ile şartlandırılmış besiyeri (ŞB) hazırlanması süresince aşağıdaki protokol takip edildi (Kahouli et al. 2015b).

1. Deneyde kullanılan bakteriler 3 defa kültüre edilerek 3. pasajlanmanın geç büyüme fazı olan 14 – 16 saatleri arasında toplandı.
2. Toplanan bakterilerin spektrofotometre yardımıyla sayıları tayin edilerek (1 OD =  $1 \times 10^9$  cfu/ml) ihtiyaç duyulan  $1 \times 10^8$  cfu/ml miktarındaki bakteri 1000xg, 15 dk, 4°C'de santifüj edilerek gerekli çöktürme yapıldı ve besiyerini tamamen uzaklaştırabilmek için soğuk fosfat tampon tuzu (PBS) ile iki defa yıkama işlemi gerçekleştirildi.
3. Santrifüj ve yıkama işlemi yapılan bakteriler doğruca HT-29 kolon kanseri besiyeri olan antibiyotik ve FBS içermeyen DMEM içerisine  $1 \times 10^8$  cfu/ml olacak

şekilde ekildi ve 37°C'de, 140 rpm'de çalkalanarak 4 saat süresince inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon sonrası DMEM besiyeri iki defa 1000xg, 15 dk, 4°C'de santrifüj edildi ve DMEM besiyeri 0,2 µM-por çapına sahip steril filtreler yardımıyla filtre edildi.
5. Tüm sterilizasyon işlemleri tamamlanan bu ŞB'ne %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin (pen-strep) antibiyotik olacak şekilde FBS ve antibiyotik eklendi.
6. Sonra 1 M NaOH ve HCl yardımıyla pH:7 olacak şekilde ayarlanarak ve uygun miktarlarda bölünerek diğer kullanımlar için -80°C` de stoklandı (Şekil 3.2).





Şekil 3.2. *L. reuteri* bakterilerinin yetiştirilmesi ve ŞB hazırlanması

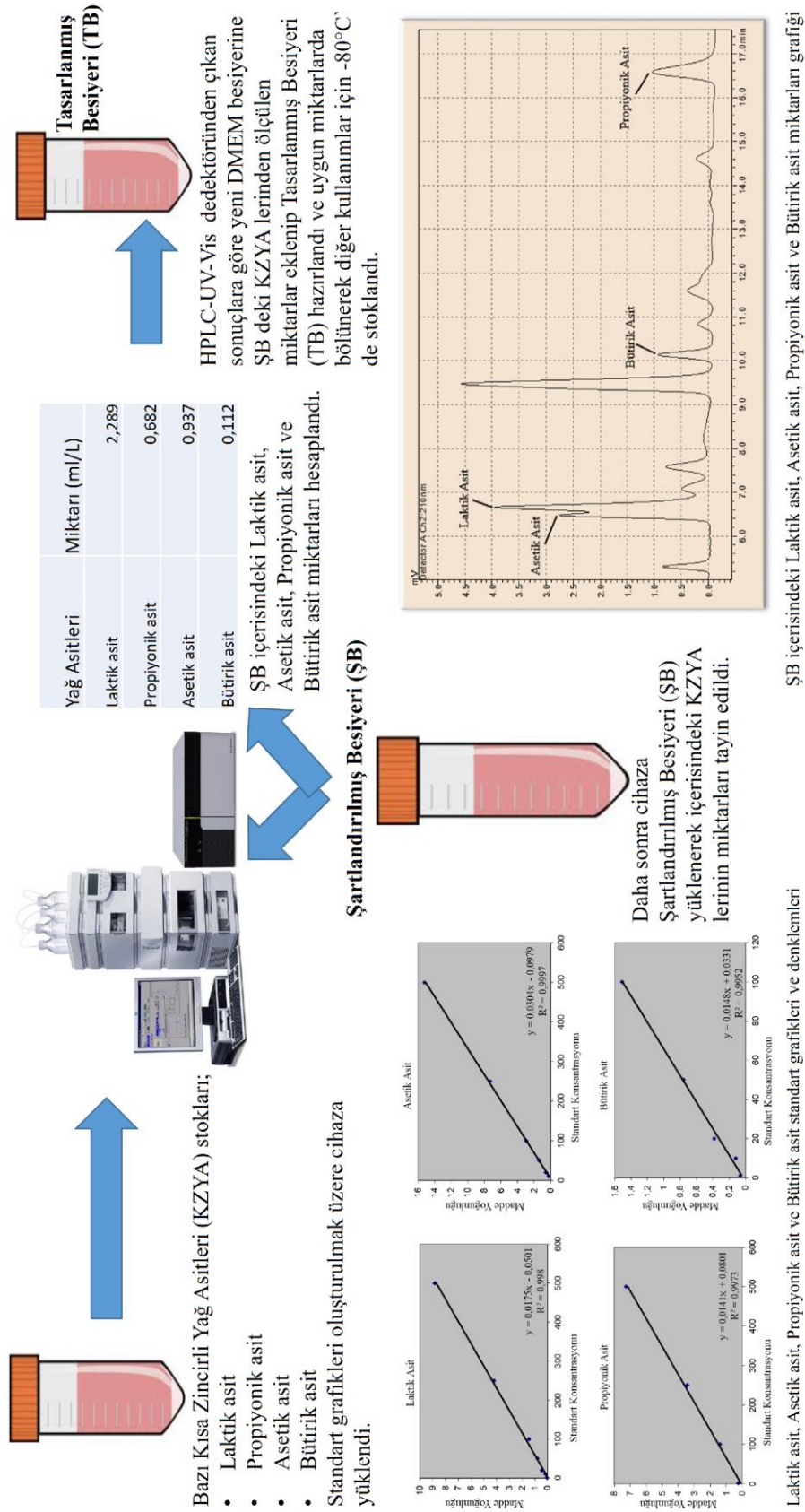


### 3.2.3. Deneysel KZYA'nin HPLC/UV-Vis Dedektörüyle Tayini

Deneysel KZYA'nin HPLC/UV-Vis dedektörüyle tayini süresince aşağıdaki protokol takip edildi.

1. Birer organik asit olan laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asite ait kromatoğrafik ayırım işlemi için gerekli standartlar, 1000 ppm'lik (milyonda bir konsantrasyon) ana stoklardan; 500, 250, 100, 50, 20, 10 ve 5 ppm olacak şekilde hazırlandı.
2. Daha sonra standartların, HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Japonya) sistemiyle SIL-20A HT otosampler, CTO-10AS kolon fırını ve SPD- 20A UV-VİS dedektör kullanılarak kromatoğrafik ayırımları gerçekleştirildi.
3. Kromatoğrafik ayırım için Quiros (2009) metodu modifiye edildi ve izokrotik sistem kullanılarak, mobil faz 1mM perklorik asit, kolon akış hızı 1 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı 60°C ve dedeksiyon dalga boyu 210 nm olarak ayarlandı.
4. GL Sciences marka ODS-3, 25 mm x 4,6 x 3µm kolon kullanılarak 5, 10, 20, 50, 100, 250 ve 500 ppm'lik standart grafiğe karşı okuma yapıldı.

ŞB içerisindeki KZYA'nin miktar tayinleri örneklerin spesifik bulunma zamanı ve standartların kütlesi ile kıyaslanarak hesaplandı ve bu aşamada belirlenen miktarlar normal besiyerine sentetik olarak eklenerek tasarlanmış besiyeri (TB) hazırlandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. HPLC-UV-Vis Dedektörüyle KZYA'nin tayin edilmesi ve yeni besiyeri tasarlanması

### 3.2.4. Hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığı analizleri süresince aşağıdaki protokol takip edildi.

1. Hücre canlılığı analizleri icelligence gerçek zamanlı ölçüm alabilen cihaz ile hücrelerin uygun sayıları tespit edilerek başlatıldı.
2. Daha sonra HT-29 hücreleri 8-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğunda 10-15 bin hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat süresince 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde hücrelerin zemine tutulması için bekletildi.
3. Ekim yapılan hücrelerin üzerlerine ŞB ve TB belirli konsantrasyonlarda eklenerek 24 saat süresince 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde bekletildi ve sonuçlar kaydedildi.
4. ŞB ve TB için uygun inhibisyon dozları tayin edilerek etkin doz belirlendi.

#### 3.2.4.1. Deneysel Gruplar

1. Kontrol grubu; HT-29 hücrelerine sadece DMEM besiyerinin 24 saat süreyle uygulandığı grup.
2. ŞB grubu; HT-29 hücrelerine şartlandırılmış DMEM besiyerinden etkin dozun (1:1) 24 saat süreyle uygulandığı grup.
3. TB grubu; HT-29 hücrelerine tasarlanmış DMEM besiyerinden etkin dozun (1:1) 24 saat süreyle uygulandığı grup (Şekil 3.4).



**Kontrol Grubu;** Sadece DMEM besiyerinin bulunduğu grup. (5ml besiyeri; 24 saat inkübasyon)



**ŞB Grubu;** Şartlandırılmış besiyerinden etkin dozun hücrelere uygulandığı grup. (2,5ml DMEM besiyeri + 2,5ml ŞB; 24 saat inkübasyon)



**TB Grubu;** Tasarlanmış besiyerinden etkin dozun hücrelere uygulandığı grup. (2,5ml DMEM besiyeri + 2,5ml TB; 24 saat inkübasyon)

Şekil 3.4. Deneysel grupların tasarlanması

### 3.2.5. ROS Analizi

ROS analizleri süresince aşağıdaki protokol takip edildi (Shen et al. 1996).

1. ROS analizi 2',7'-Diklorodihidroflororesin diasetat (DCFH-DA) kullanılarak yapılmıştır.
2. HT-29 hücreleri deneysel grupta belirtildiği üzere muamele edildikten sonra kaldırılıp santrifüjle toplandı.
3. Daha sonra her bir örnekte  $1 \times 10^6$  hücre için 2  $\mu$ M DCFH-DA eklenerek ve karanlık ortamda 37°C de 1 saat inkübe edildi.
4. Daha sonra, spektrofloreometre kullanılarak 485 eksitasyon ve 525 emisyon değerlerinde florasan şiddeti ölçümü yapıldı.
5. Ölçülen Florasan Yoğunluğu (RFU) % olarak hesaplanarak sonuçlar hazırlandı.

### 3.2.6. LPO analizi

LPO analizleri süresince aşağıdaki protokol takip edildi (Smith et al. 1982).

1. LPO analizi, MDA'dan oluşan tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) miktarının ölçülmesi ile tamamlandı.
2. Hücreler deneysel grupta belirtildiği üzere muamele edildikten sonra alınarak 250  $\mu$ l trikloroasetik asit (TCA) (%70 w/v) ve 1 mL tiyobarbitürik asit (%0,8 w/v) ile reaksiyona sokulup 95°C kaynayan su banyosunda 30 dk boyunca tutuldu.
3. Sonra aniden buza konularak 5 dk beklendi ve 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra ELISA reader cihazı kullanılarak 532 nm absorbans ölçümleri alınarak her bir örneğin MDA seviyeleri hesaplandı.
4. Örneklerin MDA seviyeleri hazırlanan standart eğri yardımıyla hesaplandı ve yapılan ölçüm sonuçları nmol/ml şeklinde ifade edildi.

### 3.2.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (QRT-PCR) Deneyleri

QRT-PCR deneyleri süresince aşağıdaki protokol takip edildi.

1. HT-29 hücreleri 25 cm<sup>2</sup> lik flasklarda 2-3x10<sup>6</sup> olacak kadar yetiştirildikten sonra deneysel grupta belirtildiği üzere muamele edildi.

2. Hücreler soğuk PBS ile yıkandı ve 2500 rpm'de 3 dk santrifüj ile izole edildi.
3. Daha sonra total ribonükleik asit (RNA) izolasyon kiti vasıtasıyla total RNA izolasyonu yapıldı.
4. İzole edilen RNA'ların saflığı nanodrop yöntemiyle ölçüldükten sonra (260/280 = 1,8-2,1); total RNA içerisinde bulunan ve gen ekspresyon ifadesi olarak bilinen mRNA'lar, cDNA sentez kiti ile cDNA'lere dönüştürüldü.
5. Apoptotik süreçte ekspresyonlarında değişiklik beklenen Bax, Bcl-2, sitokrom-c, kaspaz-3, kaspaz-9 ve housekeeping gen (referans gen) beta aktin'e uygun primerler (Tablo 3.3) ve QRT-PCR master mix kiti ile rölatif gen ekspresyon QRT-PCR deneyleri yapıldı.
6. Sonuçlar, Ct (Cycle treshold) metodu ile  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülüne göre hesaplanarak grafikleri hazırlandı (Yuan et al. 2006).

Tablo 3.3. QRT-PCR deneylerinde kullanılan genlere ait primer sekans dizileri (R: Reverse: Geri, Ters; F: Forward, İleri)

Gen Adı	5'-3' Yönünde Primer Sekans Dizileri
Bax (F)	TGGAGCTGCAGAGGATGATTG
Bax (R)	CGGGGATTGATCAGACACGTAA
Bcl-2 (F)	TTTAATTGTATTTAGTTATGGCCT
Bcl-2 (R)	CAATAAACAATTCTGTTGACG
Sitokrom-c (F)	AACAAAGGCATCATCTGGGGAG
Sitokrom-c (R)	CACAGGTGAATCTTGCTTGGT
Kaspaz-9 (F)	ATTGTGAACATCTTCAATGG
Kaspaz-9 (R)	AGTAGGACACAAAGATGTCA
Kaspaz-3 (F)	TAGTTGCAATTGAATTAAATTAGGA
Kaspaz-3 (R)	TAGAATACACAGTCTTAAGTGG
Beta Aktin (F)	AAAGCGGCCTTGGAGTGTGT
Beta Aktin (R)	CATGGCTGGGGTGTTGAAGG

### 3.2.8. Western Blot Tekniği ile Hedef Proteinlerin Analizi

Hedef proteinlerin analizleri süresince aşağıdaki protokol takip edildi.

1. HT-29 hücreleri 25 cm<sup>2</sup> lik flasklarda 2-3x10<sup>6</sup> olacak kadar yetiştirilerek deneysel grupta belirtildiği üzere muamele edildikten sonra PBS ile yıkanıp santrifüj edilerek protein izolasyonuna hazır hale getirildi.
2. Hücreler 1:5 (w/v) oranında protein izolasyon kiti (Abcam, UK) yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi.
3. Proteinlerin proteaz aktivitesi ile bozulmalarını engellemek amacıyla homojenizasyon işlemleri esnasında hem proteaz inhibitör kokteyli (PIC) ve Fenil metan sülfonil florit (PMSF) kullanılıp hem de tüm işlemler buz içerisinde yapıldı.
4. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4°C'de 20 dk süreyle 14000 rpm'de santrifüj edildiler ve elde edilen süpernatantlar mikrosantrifüj tüplere alınarak Bradford yöntemi kullanılarak her bir örnek içerisindeki protein miktarları tayin edildi.
5. Daha sonra western blot deneyleri yapıncaya kadar -80°C'de saklandı.
6. Hücre kültürüne ait protein lizatları jele yükleme tamponu ile inkübe edilerek Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği ile %12 konsantrasyondaki hazır jelde yürütme tamponu varlığında yürütüldü.
7. Devamında Bax, Bcl-2, sitokrom-c, prokaspaz-9 ve housekeeping olarak beta aktin için Western blot tekniği kullanılarak Polivinilidenflorit (PVDF) membrana aktarıldı.
8. Daha sonra %5'lik sığır serum albümin (BSA) ile 1 saat süresince blotlama işlemi gerçekleştirildi.
9. Sonrasında membranda sabitlenen proteinlere ait bantlar uygun primer antikorlar (Tablo 3.4) aracılığıyla 3 saat süresince inkübe edildi.

Bu membranlar;

1. 5x5 dk olacak şekilde TBS-T (Tris Tampon Tuzu-Tween20 %0,1) ile yıkandı.
2. Primerlere uygun sekonder (Tablo 3.4) ile 1,5 saat inkübe edildi.
3. 5x5 dk TBS-T ile yeniden yıkandı.

4. Daha sonra ECL tamponu ile yaklaşık 3-4 dk inkübe edilip membrandaki ışımaya sayesinde medikal X-Ray görüntü sabitleme cihazında protein bantları X-Ray filmlere sabitlendi.
5. Daha sonra bu bantların komputere yazılım programı aracılığıyla sentezlenme miktarları hesaplandı (Image Lab, Bio Rad).
6. Hesaplama kullanılan yöntem, hedef genlerin housekeeping gen olan beta aktin ile normalize edilmesi ve kontrole göre yüzde değişimi olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 3.4. Western Blot deneylerinde kullanılan antikorlara ait kullanım özellikleri

Antikor Adı	Antikor Kullanım Özellikleri
Bax (23 kDa)	Dilüsyon: 1:500; Santa Cruz, sc-20067; Mouse monoclonal
Bcl-2 (26 kDa)	Dilüsyon: 1:500; Santa Cruz, sc-7382; Mouse monoclonal
Sitokrom-c (15 kDa)	Dilüsyon: 1:500; Santa Cruz, sc-13156; Mouse monoclonal
Prokaspaz-9 (46 kDa)	Dilüsyon: 1:500; Santa Cruz, sc-81663; Mouse monoclonal
Beta Aktin (43 kDa)	Dilüsyon: 1:500; Santa Cruz, sc-47778; Mouse monoclonal
Sekonder	Dilüsyon: 1:1000; Santa Cruz, sc-2005; Anti-Mouse HRP

### 3.2.9. DNA Fragmentasyonu

DNA fragmentasyon deneyleri süresince aşağıdaki protokol takip edildi.

1. HT-29 hücreleri 75 cm<sup>2</sup> lik flasklarda 6-7x10<sup>6</sup> olacak kadar yetiştirildikten sonra deneysel grupta belirtildiği üzere muamele edilerek izolasyon öncesi PBS ile yıkandı ve santrifüjlenerek DNA izolasyonuna hazır hale getirildi.
2. İzolasyon esnasında DNA izolasyon kit protokolü uygulandı (G-Dex, Belçika).
3. İzolasyonu tamamlanan nükleer DNA Etidium Bromide içeren %0,8 lik agaroz jelde yürütülerek daha sonra jel ultra viole ışık altında izlenmeye alındı.
4. DNA da meydana gelen fragmentleşme GelDoc EZ cihazıyla tespit edilerek ve kayıt altına alındı.

### 3.2.10. İstatistiksel Analizler

Tüm sonuçlar en az üçer kere tekrarlandı. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5.01 yazılımı ile yapıldı ve karşılaştırılabilir veri grupları tek yönlü ANOVA Newman-Keuls Post-Hoc Testi ile değerlendirildi;  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi.

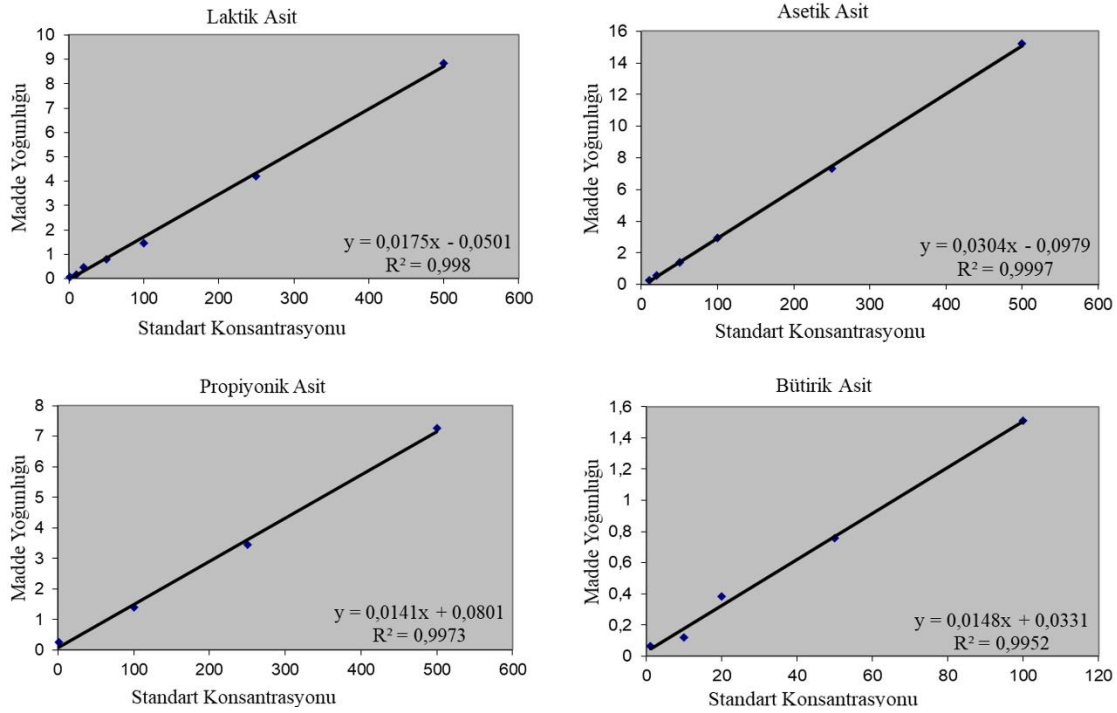




## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. KZYA'nın Miktarları

Şartlandırılmış DMEM besiyeri içerisindeki bazı KZYA'nın varlığı ve miktarları HPLC/UV-Vis Dedektörüyle belirlendi (Şekil 4.1). Her bir yağ asidi için 5, 10, 20, 50, 100, 250 ve 500 ppm'lik standart grafiğe karşı okuma yapılarak standart grafikleri ve denklemleri hazırlandı. Tablo 4.1'de ŞB içerisinde Laktik asit (2,289 µl/ml), asetik asit (0,937 µl/ml), propiyonik asit (0,682 µl/ml) ve bütirik asite (0,112 µl/ml) ait miktarlar ve alıkonulma süreleri gösterilmektedir. DMEM içerisindeki *L. reuteri* bakterisinin 4 saatlik inkübasyonu sonucunda ikincil metabolit olarak en çok laktik asit üretimi gözlenirken en az ise bütirik asit üretimi gözlenmektedir (Tablo 4.1).



Şekil 4.1. Şartlandırılmış DMEM besiyeri içerisindeki maddelerin standart konsantrasyon grafikleri ve denklemleri

Bundan önceki çalışmalarda *L. reuteri* türüne ait farklı izolasyon hatlarının ürettiği sekonderlerden KZYA'nin üretim miktarları farklılıklar göstermektedir. Örneğin Kahouli et al. (2015b) çalışmalarında beş farklı *L. reuteri* hücre hattının normal besiyeri içerisinde iki saatlik inkübasyonu sonucunda sırasıyla, L.r NCIMB 11951 hattında; Laktat 369 mg/L, asetat 131 mg/L, propiyonat 111 mg/L ve bütirat 29 mg/L; L.r NCIMB 701089 hattında; Laktat 208 mg/L, asetat 43 mg/L, propiyonat 38 mg/L ve bütirat 0 mg/L; L.r NCIMB 701359 hattında; Laktat 643 mg/L, asetat 116 mg/L, propiyonat 78 mg/L ve bütirat 28 mg/L; L.r NCIMB 702655 hattında; Laktat 233 mg/L, asetat 86 mg/L, propiyonat 45 mg/L ve bütirat 29 mg/L; L.r NCIMB 702656 hattında; Laktat 642 mg/L, asetat 182 mg/L, propiyonat 161 mg/L ve bütirat 59 mg/L üretimi olduğunu göstermiştir. Ayrıca kontrol amaçlı değerlendirilen *Lactobacillus acidophilus* türünden elde edilen KZYA'nin miktarları ise Laktat 1948 mg/L, asetat 114 mg/L, propiyonat 0 mg/L ve bütirat 14 mg/L şeklinde ölçülmüştür (Kahouli et al. 2015b). Mevcut sonuçlara göre *Lactobacillus* cinsine ait farklı türlerden ya da aynı türün farklı suşlarından üretilen KZYA miktarları farklılıklar gösterebilmektedir.

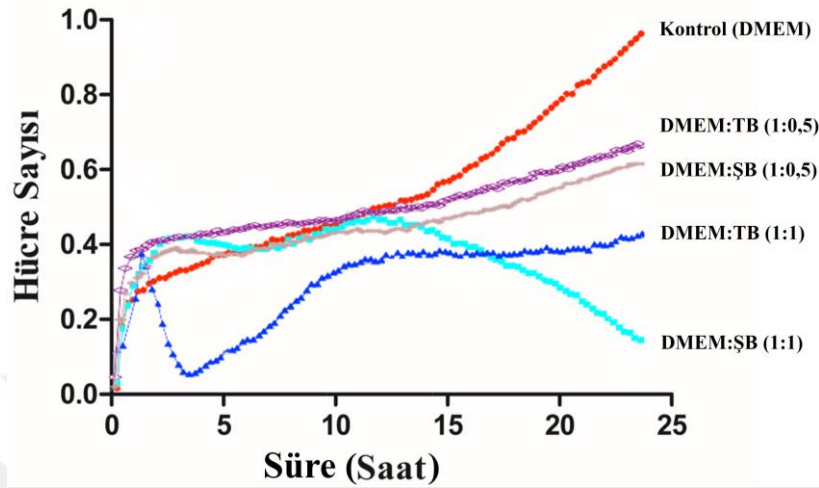
Tablo 4.1. Şartlandırılmış DMEM besiyeri içerisindeki analizi yapılan maddelerin miktarları

Madde	$\mu\text{l/ml}$	Alınma Süresi
Laktik Asit	2,289	6,83
Asetik Asit	0,937	6,60
Propiyonik Asit	0,682	16,62
Bütirik Asit	0,112	10,21

#### 4.2. KZYA'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Mevcut çalışmada *L. reuteri* bakteri türünden elde edilen ikincil metabolitlerden olan bazı KZYA'nin HT-29 kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri belirlenmiştir. Şekil. 4.2.'deki grafikte görüldüğü üzere, kontrol grubundaki hücrelerle yapılan kıyaslamaya göre 1:1 oranında uygulanan ŞB, HT-29 hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde azalttı. Bu sonuca benzer şekilde TB ile inkübe edilen HT-29 hücrelerinde çoğalması önemli ölçüde düşüş gösterdi. Bu sonuçlar doğrultusunda, *L.*

*reuteri* bakterisi türünden elde edilen bazı KZYA'nın HT-29 kolon kanseri hücrelerinin sayılarının azaltılmasında etkili olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.2. HT-29 kolon kanseri hücresinde KZYA'nın hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi. Kontrol; HT-29 hücrelerine sadece DMEM besiyerinin 24 saat süreyle uygulandığı grup. ŞB (Şartlandırılmış Besiyeri); HT-29 hücrelerine şartlandırılmış DMEM besiyerinden etkin dozun (1:1 ve 1:0,5 oranlarında) 24 saat süreyle uygulandığı grup. TB (Tasarlanmış Besiyeri); HT-29 hücrelerine tasarlanmış DMEM besiyerinden etkin dozun (1:1 ve 1:0,5 oranlarında) 24 saat süreyle uygulandığı grup

Literatürde hücre canlılığı ile ilgili yapılan bir çalışmada KZYA'nın *in vitro* ve *in vivo* gastrointestinal dokudaki hücre proliferasyonunu düzenlediği (Gui and Shen 2016) ve bizim çalışmamızda da *L. reuteri*'nin kolon kanseri hücrelerine karşı yüksek oranda anti-proliferatif etkisinin olduğu sonuçlar gösterilmektedir. Doza bağlı KZYA'nın tüketiminin keçi rumen epitelinde hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin mRNA seviyelerini nasıl indüklediği hipotezi test edilmiştir (Gui and Shen 2016). Orta ve düşük beslenme temelli yapılan deneylerden, orta seviyedeki beslenme grubunda hücre proliferasyonu ile ilgili siklin A, siklin B1, siklin D1, siklin E1, CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6 genlerinin mRNA'sının ekspresyon seviyelerini arttırdığı kaydedilmiştir (Gui and Shen 2016). Bu sonuca bağlı olarak orta seviyedeki KZYA diyetinin, hücre çoğalmasını düzenleyen genlerin gen ekspresyonunda anlamlı derecede değişikliğe neden olduğu söylenmektedir (Gui and Shen 2016).

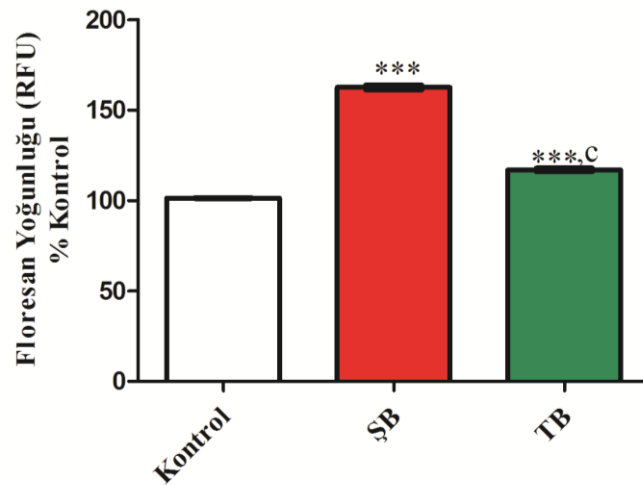
Kolon kanseri hücreleriyle yapılan önceki bir çalışmada *Lactobacillus fermentum*'un kolon kanseri hücrelerine karşı yüksek oranda anti-proliferatif etkisinin olduğu

gösterilmektedir (Kahouli et al. 2015a). Ayrıca, *L. fermentum* normal kolon hücreleri üzerinde ters etki göstererek, kolonun kanserli hücrelerine karşı zararlı olduğu ancak normal hücrelerine karşı zararlı etkilerinin olmadığı ortaya konulmaktadır (Kahouli et al. 2015a). Aynı yıl içerisinde bir diğer çalışma ise *L. reuteri* bakteri türünün KZYA'nin üretimi ile bağlantılı olarak kolon kanseri hücrelerinin büyümesini azaltmada önemli bir etkisinin olduğu gösterilmektedir. Böylece probiyotik *L. reuteri* (Kahouli et al. 2015b) ve *L. fermentum* (Kahouli et al. 2015a) türlerinin anti-kanser ve anti-kanserojenik bileşikler üretme kabiliyetinin varlığı ve kolon kanserinde potansiyel biyoterapötik etkisinin olduğu ileri sürülmektedir.

Bir diğer kolon kanseri hücre çalışmasında biyoterapötik potansiyeli olduğu düşünülen *Propionibacterium pentosaceus* ve *Lactobacillus salivarius* gibi insan kaynaklı probiyotik bakterilerin kanserli hücrelerin inhibisyonuna neden olduğu gösterilmektedir (Thirabunyanon and Hongwittayakorn 2013). Kolon kanseri hücrelerinin anti-proliferatif etki mekanizmalarında *P. pentosaceus*, *L. salivarius* bakterilerinin doğrudan kolon kanseri hücrelerine yapışabilecekleri veya ürettikleri bütirik ve propiyonik asitlerin sinerjetik etki göstererek anti-kanser özelliğini tetikleyebilecekleri ileri sürülmektedir (Thirabunyanon and Hongwittayakorn 2013). Tüm bu sonuçlar KZYA'nin kanserleşme sürecini inhibe etmek için güvenli olduğunu ortaya koymaktadır.

### 4.3. KZYA'nin ROS Üzerine Etkileri

KZYA'nin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde ROS üretimini artırıp artırmayacağını belirlemek için, kontrol grubu ile ŞB ve TB eklenmiş hücrelerde ROS yoğunluğuna bakılmıştır. Şekil 4.3.'deki grafikte görüldüğü üzere ROS üretimi kontrole göre ŞB eklenen hücrelerde belirgin olarak artarken ( $p < 0,001$ ), TB eklenen hücrelerde kontrole göre yine anlamlı bir artış göstermiştir. Ancak ROS miktarındaki artışın ŞB eklenen hücrelerde TB eklenen hücrelere nazaran daha fazla gerçekleştiği gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ).



Şekil 4.3. HT-29 kolon kanseri hücresinde KZYA'nin ROS üretimi üzerine etkisi. Hücreler deneysel grupta anlatıldığı üzere inkübe edildi. Grafikte görüldüğü üzere ROS üretimi kontrole göre ŞB eklenen hücrelerde oldukça belirgin olarak artarken ( $p < 0,001$ ), TB eklenen hücrelerde kontrole göre yine anlamlı bir artış gösterdi ( $p < 0,001$ ). Ancak ROS miktarındaki artışın ŞB eklenen hücrelerde TB eklenen hücelere göre daha fazla gerçekleştiği gözlemlendi ( $p < 0,001$ ). Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplandı. (n: 6), \*\*\* $p < 0,001$  Kont vs ŞB, <sup>c</sup> $p < 0,001$  ŞB vs TB. (ŞB= Şartlandırılmış Besiyeri; TB= Tasarlanmış Besiyeri)

Bir dizi araştırma gösterdi ki, ROS artışı, genellikle apoptozun ilerlemesinde gözlenir ve ROS üretimi apoptozun bir göstergesi olabilir. Kanser hücrelerinde apoptozu indükledikleri için birçok anti kanser ilacın ve doğal bileşiklerin ROS düzeyini arttırdığı bilinmektedir (Barrera 2012; Jeong and Joo 2016). ROS yüksek kimyasal aktiviteye sahiptir ve hücre çoğalması ile apoptozun düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır. Farklı pro-oksidanlarla indüklenen ROS miktarındaki aşırı artış hücrel antioksidan savunma sisteminin temizleme etkinliğini aşarak oksidatif strese yol açabilmekte ve apoptoza neden olabilmektedir (Darendelioglu et al. 2016).

Hücre içi ROS düzeylerinin arttırılmasının çeşitli yolları vardır. Bu yollar, süperoksit anyonu ve  $H_2O_2$  üretimi, hücrelerin glutatyon içeriğinin tükenmesi ve süperoksit dismutazlar gibi ROS'u süpüren enzimlerin inaktivasyonu şeklinde olabilmektedir (Baydas et al. 2006; Baydas et al. 2007). Yine benzer şekilde faydalı bakterilerden *Propionibacterium* cinsine ait fermantasyon ürünlerinden bazı KZYA'nin insan kolon kanseri hücre hatlarında ROS üretimini arttırdığı da tespit edilmiştir (Tang et al. 2011). Bu durumun gerçekleşmesinde bazı KZYA'nin indüklemesine bağlı olarak mitokondrial

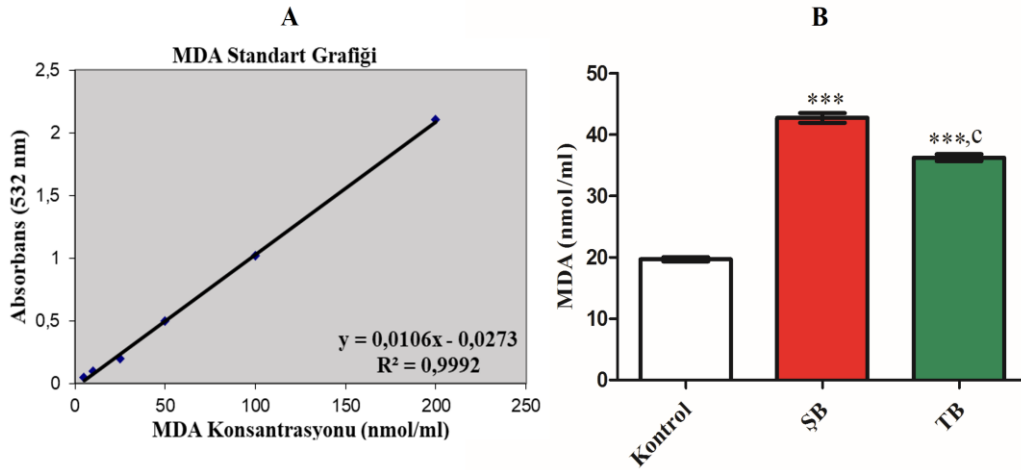
membran geçirgenliğinde artış gözlenmiş ve bu artışın hücre içi ROS oluşumunda çoğalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Tang et al. 2011).

Probiyotiklerin iki farklı deney modelinde endojen ROS oluşumunu ve ROS'a bağlı hücre proliferasyonunu indükleyebildikleri ileri sürülmektedir. *Lactobacillus* kaynaklı ROS üretiminin ve hücre proliferasyonunun bağırsak epitel hücrelerinde fonksiyonel olarak işlevi bulunan Nox1 enzimine bağlı olduğu gösterilmektedir. Mikroorganizma taşımayan hayvan modellerinde ROS üretimi gerçekleşmiş ve epitel hücrelerinde büyümenin baskılanması süreci bu durumla ilişkilendirilmiştir. Bu veriler enterositlerde ROS üreten bir enzimin bakteri kaynaklı aktivasyonunun hücre proliferasyonunu etkileyebildiğini açığa çıkarmıştır (Jones et al. 2013).

Ayrıca başka çalışmalarda gösterildiği üzere bazı faydalı bakterilerin yetiştirildiği besiyerinden elde edilen supernatantta bulunan ya da saf KZYA'nin, ROS oluşumunu artırması ve mitokondrial trans-membran potansiyelini düşürmesi sonucunda anti-apoptotik Bcl-2 aktivitesini değiştirmesi, apoptotik kaspaz-3 aktivitesini artırması ve çekirdekdeki kromatin stabilitesinin bozulmasını indüklemesiyle apoptoz sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir (Zoratti and Szabb 1995; Decaudin et al. 1998; Marzo et al. 1998; Jan et al. 2002; Hofmanová et al. 2014). Mevcut çalışmadaki sonuçlar, HT-29 kolon kanseri hücrelerinin KZYA inkübasyonu ile ROS birikimini önemli derecede artırarak hücre canlılığını önemli derecede azaltabildiğini ortaya koymaktadır.

#### **4.4. KZYA'nin LPO Üzerine Etkileri**

LPO'nun değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan biyolojik belirteçlerden biri MDA'dır (Grotto 2009). ROS üretimini anlamlı ölçüde artıran KZYA'nin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde MDA üretimini artırıp artırmayacağını araştırmak için, ŞB ve TB ile muamele edilmiş hücrelerdeki MDA yoğunluğunu standart yardımıyla ölçüldü (Şekil 4.4.A). Şekil 4.4.B'deki grafikte belirtildiği gibi, MDA konsantrasyonu kontrole göre ŞB ve TB eklenen hücrelerde anlamlı olarak artma gösterdi ( $p < 0,001$ ). Bununla birlikte, TB ile indüklenen MDA seviyesi, ŞB ile indüklenen hücrelere göre anlamlı olarak azalma gösterdi ( $p < 0,001$ ).



Şekil 4.4. HT-29 kolon kanseri hücresinde KZYA'nin LPO birikimi üzerine etkisi. Hücreler deneysel grupta anlatıldığı üzere inkübe edildi. (A) MDA konsantrasyonuna ait standart grafiği ve denklemleri. (B) Grafikte görüldüğü üzere MDA (grafikte özetlenen MDA LPO'dur) üretimi kontrole göre ŞB eklenen hücrelerde oldukça belirgin olarak artarken ( $p < 0,001$ ), TB eklenen hücrelerde kontrole göre yine anlamlı bir artış gösterdi ( $p < 0,001$ ). Ancak MDA miktarındaki artışın ŞB eklenen hücrelerde TB eklenen hücrelere göre daha fazla gerçekleştiği gözlemlendi ( $p < 0,001$ ). Veriler ortalama  $\pm$  SEM ile hesaplandı. (N: 6), \*\*\* $p < 0,001$  Kont vs ŞB, \*\* $p < 0,001$  ŞB vs TB. (ŞB= Şartlandırılmış Besiyeri; TB= Tasarlanmış Besiyeri)

Önceki çalışmalar açıkça gösterdi ki, ROS oluşumu kanser hücrelerinde gözlenen yaygın biyokimyasal özelliklerdendir. ROS hücre zarlarındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek LPO'nu indükleyebilmektedir. Oksidatif stresin ikinci mesajcısı olarak da LPO düşünülebilmektedir (Barrera 2012; Darendelioglu et al. 2016). Artmış ROS seviyesi kanser hücresinin büyümesini inhibe edebilmektedir. Nitekim ileri aşamadaki kanserlerde, bazı anti-kanser ilaçları ve radyasyon tedavileri sonucunda ortaya çıkan oksidatif stresin daha da artması, kanser hücrelerinde görülen antioksidan savunma sistemlerinin üstesinden gelerek bu hücreleri apoptoza yönlendirebilmektedir (Barrera 2012). LPO ve başlatıcıları (diğer bir deyişle ROS), sinyal iletim kaskadının oluşumunu, hücre proliferasyonunu, apoptozun başlatılmasını ve ilerlemesini kontrol edebilmektedir. LPO ve ROS'un, kanser öncesi ve sonrasında sağlığımızı tehdit eden hasar görmüş hücreleri elimine eden apoptoz tetikleyicisi ve temel aracısı olduğu da gösterilmiştir (Dominguez et al. 2007).

Rat model organizma çalışmasında kolon kanserinde probiyotik bakteri türü *Lactobacillus plantarum*'un antioksidan ve antikanser özellikleri arasındaki ilişki incelenerek ve kanserli ratların kolon ve plazmasında artmış LPO ürünleri ve antioksidan

enzim aktiviteleri gözlemlenmektedir. Kolon kanseri sürecinde *L. plantarum* ile beslenen ratlarda LPO ve antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı seviyede değişim görülmüştür (Kumar et al. 2012). Bu değişimler, zamana bağlı olarak *L. plantarum* takviyesi ile normal seviyeye dönmüştür. *L. plantarum* öncesi ve sonrası ratlarda ortalama tümör hacim çapı ve toplam tümör sayısı istatistiksel olarak azalma göstermektedir. Bu sonuçlar ile *L. plantarum*'un, antioksidan ilişkili bir mekanizmayla ratlarda kolon kanseri oluşumunu ve gelişimini modüle edebildiği ortaya çıkmaktadır (Kumar et al. 2012).

Kanser hücreleri, mitokondriyal disfonksiyon, onkogenlerin uyarılması, anormal metabolizma ve ağırlaştırılmış inflamatuvar aktiviteler sonucu ROS üretebilmektedir. ROS fizyolojik ve patofizyolojik rolleri ile LPO'ya neden olmaktadır (Omotayo 2013). Sağlıklı hücrelerde zararlı etkilerinin olduğu düşünölen ROS ve sonucundaki LPO ürünleri aynı zaman da kanser tedavisinde yararlı da olabilmektedir. ROS'un ve ortaya çıkan LPO ürünlerinin kanser büyümesini engellemek veya kanser hücresi ölümünü indüklemek için kullanılabileceğini düşöndüren araştırma bulguları da mevcuttur (Omotayo 2013). ROS ve MDA, hücre canlılığını ve apoptozla ilgili yolakları etkilemede oldukça reaktiftir. Böylece farklı pro-oksidanlarla hücredeki seviyeleri yükselen ROS ve LPO, antioksidan savunma sistemlerini bloke ederek apoptoza neden olan oksidatif strese yol açabilmektedir (Tartik et al. 2016).

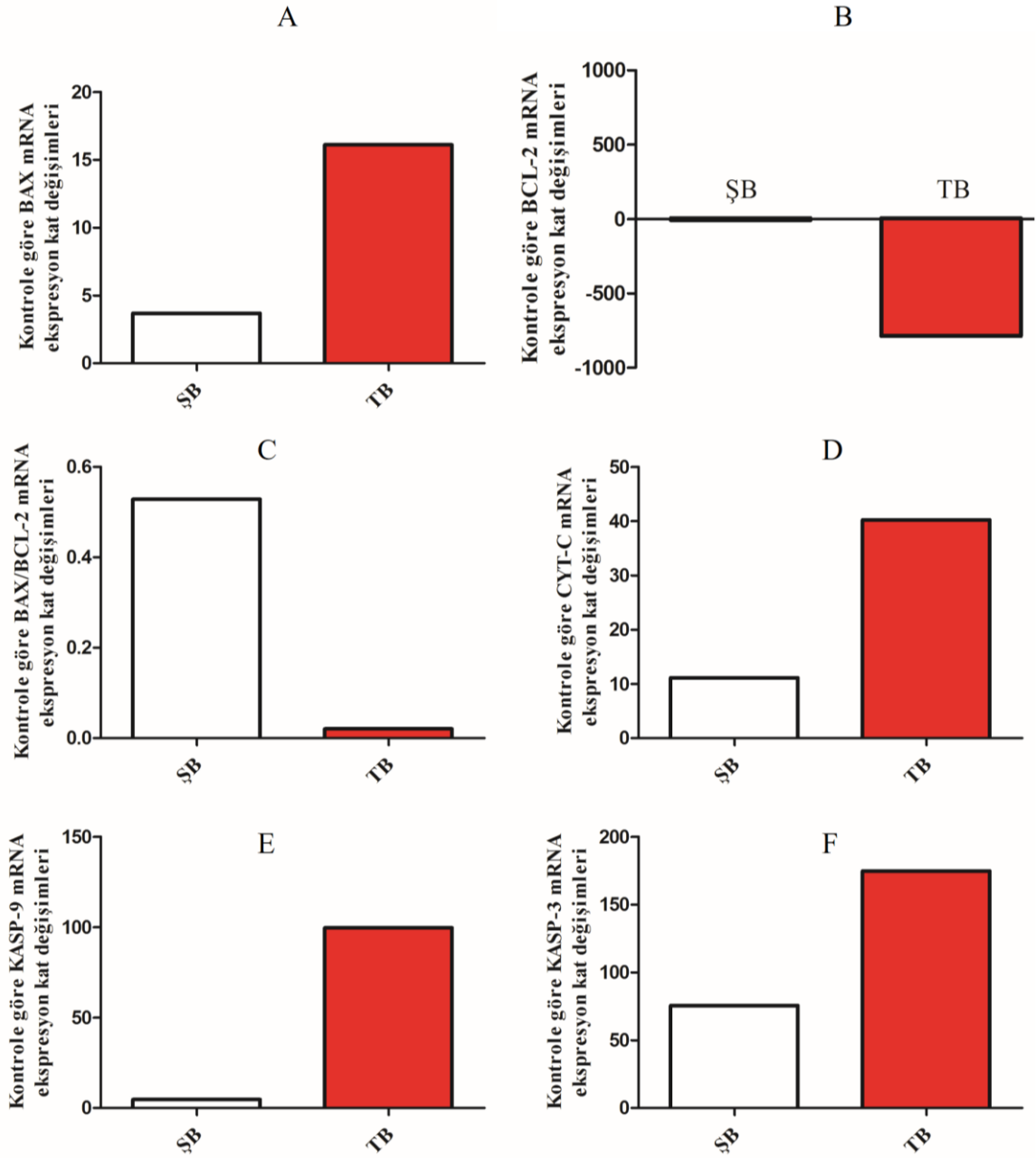
Yukarıda da değinildiği üzere MDA, LPO'nun değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan biyolojik belirteçlerdendir (Grotto 2009). MDA birikiminin membran geçirgenliğini değiştirebildiği ve aynı zamanda membran lipid çift katmanının akışkanlığını bozduğu gözlenmektedir (Jan et al. 2002; Gasparovic et al. 2013). Aynı zamanda LPO ürünlerinin diğer anti-kanser ajanlarının anti-tümör etkisini güçlendirme potansiyelinin olduğu da düşünölmektedir (Jan et al. 2002; Omotayo 2013). Mevcut çalışmadaki sonuçlara göre ROS üretimindeki artış ile indüklenen oksidatif stresin apoptoza neden olarak hücre ölümünü artırdığı söylenebilir.



#### 4.5. KZYA'nin Apoptozla İlişkili mRNA Ekspresyon Seviyelerine Etkisi

KZYA'nin apoptozla ilgili Bcl-2 familyasında herhangi bir değişikliğe neden olup olamayacağını ve HT-29 hücrelerindeki apoptotik enzimlerin mRNA düzeylerini değiştirip değiştiremeyeceğini belirlemek için Bax, Bcl-2, sitokrom-c, kaspaz-9 ve kaspaz-3 gen ekspresyon seviyeleri incelendi. Apoptotik Bax genine ait ekspresyonun hem ŞB hem de TB eklenen örneklerde kontrole göre anlamlı seviyede oldukça arttığı gözlemlendi (Şekil 4.5.A). Anti-apoptotik Bcl-2 genine ait ekspresyon seviyelerinin ise kontrole kıyasla hem ŞB hem de TB ilave edilen örneklerde anlamlı şekilde oldukça azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.5.B). Bunların yanı sıra Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranının hesaplanması yalnızca Bax geni ya da yalnızca Bcl-2 geninin ekspresyonlarının hesaplanmasından daha önemli (Reed, 1997) olduğu düşünülerek Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranı hesaplandı. Yapılan hesaplamalarda hem ŞB hem de TB ile inkübe edilen HT-29 hücrelerinde Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranı belirgin şekilde artış gösterdi (Şekil 4.5.C).

Bunlara ilave olarak, apoptozu indükleyen sitokrom-c gen ekspresyonunda, ŞB ve TB ile inkübe edilen gruplar kontrol grubuna nazaran önemli ölçüde artış gösterdi (Şekil 4.5.D). Dahası, yine apoptotik kaspaz-9 (Şekil 4.5.E) ve kaspaz-3 (Şekil 4.5.F) enzimlerine ait gen ekspresyon seviyeleri de ŞB ve TB ile muamele edilen örneklerde kontrol ile kıyaslandığında belirgin olarak yükseliş gösterdi.



Şekil 4.5. HT-29 kolon kanseri hücresinde KZYA'nin apoptoz ile ilgili gen ekspresyonu seviyesine etkileri. Hücreler deneysel grupta anlatıldığı üzere inkübe edildi. (A) Proapoptotik Bax, (B) antiapoptotik Bcl-2, (C) Bax/Bcl-2 oranı, (D) sitokrom-c, (E) kaspaz-9 ve (F) kaspaz-3 gen ekspresyon oranları kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi kullanılarak ölçülmüştür. (ŞB= Şartlandırılmış Besiyeri; TB= Tasarlanmış Besiyeri; CYT-C = sitokrom-c; KASP-9 = kaspaz-9; KASP-3 = kaspaz-3)

KZYA'den kaynaklı apoptoz sürecini anlamada etkili olabileceği düşünülen mekanizmalar gen transkripsiyonu seviyesinde değerlendirildi. Hücrelerin apoptoza gitmesi sürecinde mitokondriyal (intrinsik) yolak, mitokondrinin zar yapısının bozulup geçirgenliğinin artması ve bunun sonucunda sitokrom-c'nin sitoplazmadaki miktarının

artmasını içeren en önemli mekanizmalardan bir tanesidir (Kim et al. 2015; Tartik et al. 2016). İntrinsik yolak ile apoptozun düzenlenmesinde yakından ilgili genler ve onların ürünleri olan proteinler vardır. Bunlardan biri anti-apoptotik faaliyet gösteren Bcl-2'dir ve sitokrom-c'nin sitoplazmadaki artışını engellemek suretiyle hücreleri apoptoza karşı korurken, diğeri ise Bax'tır ve pro-apoptotik bir üye olarak programlanmış hücre ölümünü uyaran özellik göstermektedirler (Shabnam et al. 2004). Mitokondrinin sitokrom-c'ye geçirgenliği, mitokondrideki porlarda bulunan Bcl-2 ve Bax proteinlerinin translokasyonlarıyla ilgili olarak değişim göstermektedir (Reed 1997; Jurgensmeier et al. 1998). Hücredeki sitokrom-c rezervi apoptoz sürecinde önemli bir yere sahiptir ve Bcl-2 ile Bax proteinlerinin translokasyonu, sitoplazmada sitokrom-c miktarının artmasına neden olur. Sitoplazmada Apaf-1 ile birleşen sitokrom-c prokaspaz-9'un aktivasyonuna yol açar ve aktive edilmiş kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktive etmektedir (Kroemer et al. 1998; Avivi-Green et al. 2002; Kim et al. 2015; Tartik et al. 2016).

Gui and Shen (2016) e ait çalışmada KZYA'nin *in vitro* ve *in vivo* hücre apoptozunu düzenlediği sonuçlar gösterilmektedir. Doza bağlı KZYA'nin tüketiminin hücre apoptozunda rol oynayan genlerin mRNA seviyelerini nasıl indüklediği hipotezi test edilmektedir (Gui and Shen 2016). Orta seviyedeki beslenme grubunda apoptotik genlerin (kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, p53 ve Bax) ekspresyonlarında ve Bax/Bcl-2 genlerinin ekspresyon oranlarında anlamlı derecede artış gözlenmektedir. Dolayısıyla, orta seviyede tüketilen KZYA'nin, apoptozu düzenleyen genlerin ekspresyonunda anlamlı derecede değişikliğe neden olduğu söylenmektedir (Gui and Shen 2016).

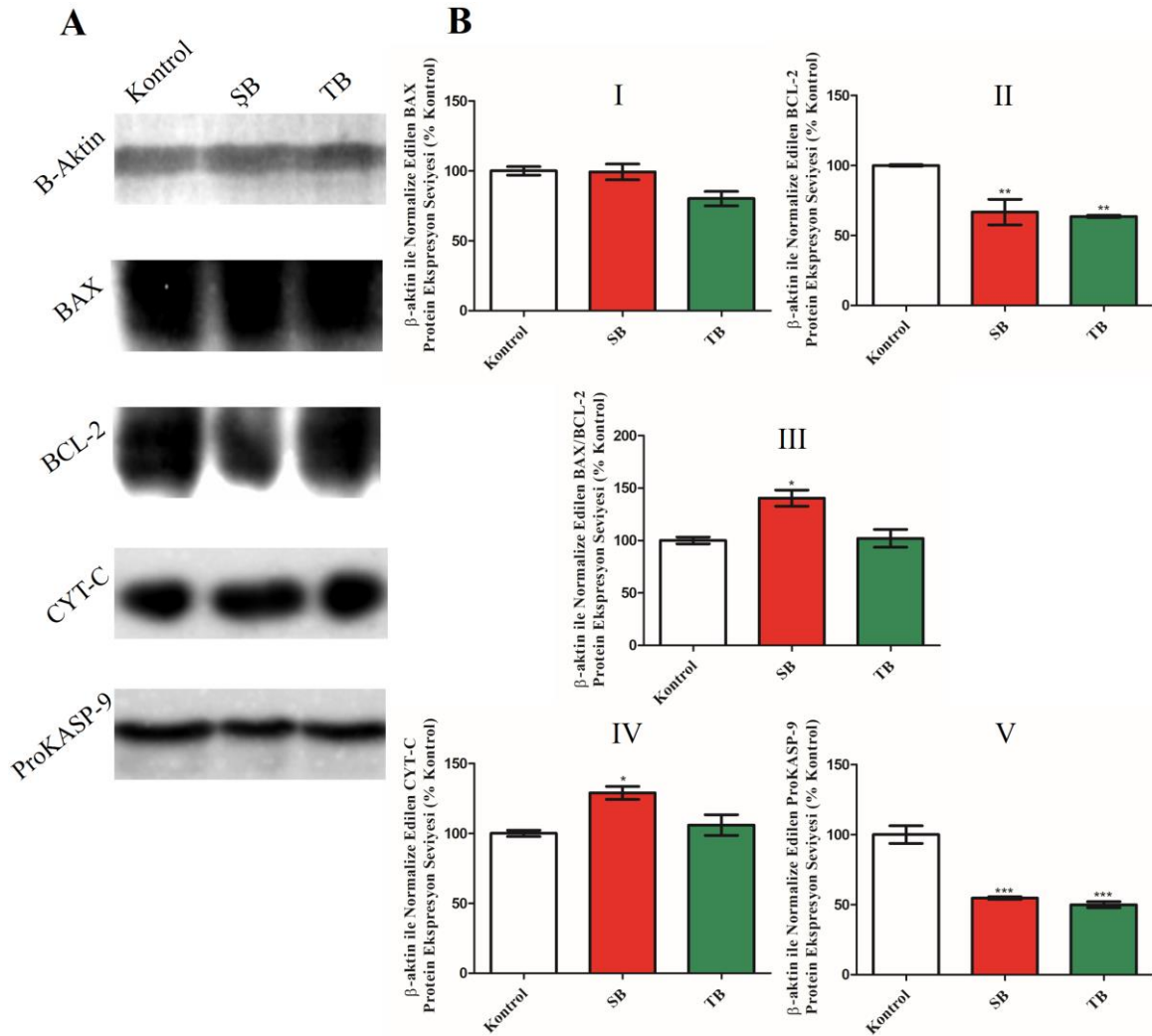
Probiotik bakterilerin fermantasyonları ile oluşan ikincil metabolitlerden bazı KZYA apoptoz sonucunda insan kolon kanser hücrelerini öldürebilirler (Jan et al. 2002). Bu süreç ROS oluşumunun artması ve devamında LPO'nun yükselmesi (Barrera 2012), mitokondrial trans-membran potansiyelini düşürmesi ve buna bağlı olarak anti-apoptotik Bcl-2 aktivitesini değiştirmesi, kaspaz-3 aktivitesini artırması ve çekirdekdeki kromatin stabilitesinin bozulmasını indüklemesiyle gerçekleşmektedir (Zoratti and Szabb 1995; Marzo et al. 1998; Decaudin et al. 1998; Jan et al. 2002; Hofmanová et al. 2014). Çalışmamızın sonuçlarına göre, HT-29 kolon kanseri hücrelerinin KZYA'ne maruz kalmasının sonucunda intrinsik apoptoz yolağındaki apoptotik Bax, sitokrom-c, kaspaz-9

ve kaspaz-3 genlerin ekspresyon seviyeleri yükselme gösterirken, anti-apoptotik Bcl-2 gen seviyesinin düştüğü gözlenmektedir. Bu sonuçlar, KZYA'nin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptotik bir rol oynayabileceğine dair mevcut kanıtları güçlendirmektedir.

#### **4.6. KZYA'nin Apoptozla İlişkili Proteinlerin Ekspresyon Seviyelerine Etkisi**

KZYA'nin apoptotik etkilerinin moleküler mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak incelemek için apoptotik Bax ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonuna odaklandık (Şekil 4.6.A). Bax proteininin ekspresyonunda hem ŞB hem de TB eklenen hücrelerde kontrole göre anlamlı bir değişim olmadığı gözlendi (Şekil 4.6.BI). Bcl-2 proteinine ait ekspresyon miktarlarının ise kontrole kıyasla hem ŞB hem de TB ilave edilen hücre gruplarında anlamlı şekilde azaldığı gözlendi (Şekil 4.6.BII). Bunların yanı sıra Bax/Bcl-2 protein ekspresyon oranının hesaplanması yalnızca Bax proteini ya da yalnızca Bcl-2 proteininin ekspresyonlarının hesaplanmasından daha önemlidir (Reed, 1997) çünkü bu orandaki artış mitokondrial porların açılarak sitokrom-c salınımına ve böylece apoptozun indüklenmesine neden olmaktadır. Yapılan hesaplamalarda hem ŞB hem de TB ile inkübe edilen HT-29 hücrelerinde Bax/Bcl-2 protein ekspresyon oranı belirgin şekilde artış gösterdi (Şekil 4.6.BIII). Bunlara ilave olarak, apoptozu indükleyen sitokrom-c protein ekspresyonunda, ŞB ve TB kontrol grubuna nazaran önemli ölçüde artışa neden oldu (Şekil 4.6.BIV).

Ayrıca, apoptotik prokaspaz-9 enziminin ekspresyonunu araştırdık. Prokaspaz-9 enzimine ait protein ekspresyon seviyesi ŞB ve TB ile muamele edilen örneklerde kontrol ile kıyaslandığında belirgin olarak düşüş gösterdi (Şekil 4.6.BV) bu sonuç prokaspaz-9 seviyesinin düşerek aktif kaspaz-9 seviyesinin yükselmesi anlamına gelmektedir. Bu sonuçlar KZYA'nin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptotik rol oynayabileceğine dair yeni kanıtlar sunmaktadır.



Şekil 4.6. HT-29 kolon kanseri hücresinde KZYA'nın apoptoz ile ilgili proteinlerin ekspresyonu seviyelerine etkileri. Hücreler deneysel grupta anlatıldığı üzere inkübe edildi. (A) Bax (23 kDa), Bcl-2 (26 kDa), sitokrom-c (15 kDa) ve prokaspaz-9 (46 kDa) protein seviyeleri ekspresyonunun Western blot analizi. Yükleme kontrolü olarak β-Aktin (43 kDa) kullanıldı. (B) HT-29 hücrelerinin ŞB ile inkübasyonu Bax/Bcl-2 oranını ve sitokrom-c protein miktarını arttırdı bununla birlikte prokaspaz-9 miktarını düşürdü. (I) Proapoptotik Bax, (II) antiapoptotik Bcl-2, (III) Bax/Bcl-2 oranı, (IV) sitokrom-c ve (V) prokaspaz-9 protein ekspresyon oranları Graphpad analiz programı kullanılarak ölçülmüştür. Veriler ortalama ± SEM (n: 3) ile sunulmuştur. \*\*\*p <0,001 Kont vs ŞB, \*\*p <0,01 Kont vs ŞB, \*p <0,05 Kont vs ŞB (ŞB= Şartlandırılmış Besiyeri; TB= Tasarlanmış Besiyeri; CYT-C = sitokrom-c; ProKASP-9 = prokaspaz-9)

Çalışmamızda KZYA'nın apoptoz sürecindeki etkilerini anlamada etkili olabileceği düşünülen intrinsik yolak aynı zamanda translyasyon seviyesinde de değerlendirildi. Bizim çalışmamızda da gerçekleştiği üzere; probiotik bakterilerin fermantasyonları ile oluşan bazı KZYA'nın apoptozda intrinsik yolak aracılığıyla insan kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği (Jan et al. 2002) ve ROS oluşumunu artırarak LPO'yu yükselttiği (Barrera 2012), trans-membran geçirgenliğini etkileyerek anti-apoptotik Bcl-2 aktivitesini

değiştirdiği devamında ise kaspaz-3 aktivitesini artırması ile apoptozu indükleyebildiği rapor edilmektedir (Zoratti and Szabb 1995; Marzo et al. 1998; Decaudin et al. 1998; Jan et al. 2002).

Bazı probiotik bakterilerin ve yağ asitlerinin beslenme yoluyla alınması bu anti-tümör etkili bileşiklerin bağırsakta artırılabilmesi için oldukça önemli bir yoldur (Habermann et al. 2013; Kahouli et al. 2015a). Bununla birlikte, bağırsaktaki bakteriyel fermantasyon ile üretilen bazı KZYA'nin anti-inflamatuvar (Al-Lahham et al. 2010) ve anti-tümör (Kahouli et al. 2015b) etkilerinin olduğu gösterilmektedir. Bunlara ilaveten faydalı bakterilerden *L. reuteri*'nin sekonder metabolitleri aracılığıyla insan bağırsak epitel hücrelerinde sinyal nükleer faktör-kB (NF-kB) nükleer translokasyon inhibisyonu yoluyla anti-inflamatuvar etkilere aracılık edebildiği de gösterilmektedir (Ma et al. 2004).

Bir diğer çalışmada apoptoza direnç gösteren kolon kanseri hücresinde (Caco-2) KZYA'nden bütiratın, anti-tümör özellik gösteren bir madde olarak apoptozu indüklemesi test edilmiştir (Ruemmele et al. 2003). Bütirat, pro-apoptotik Bak protein ekspresyonunu artırırken anti-apoptotik Bcl-xL protein ekspresyonunu düşürmüştür. Bunun sonucunda mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c'nin yer değiştirmesi ile prokaspaz-9, -3 ve -1'in sırasıyla aktive olup aktif kaspaz kaskadlarının oluşması süreci gerçekleşmiştir (Ruemmele et al. 2003). KZYA'nden olan bütiratın intrinsik apoptoz yolağında anahtar enzimler olan kaspaz-3 ve kaspaz-1 aktivasyonu ile Caco-2 hücre hattında apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Ruemmele et al. 2003).

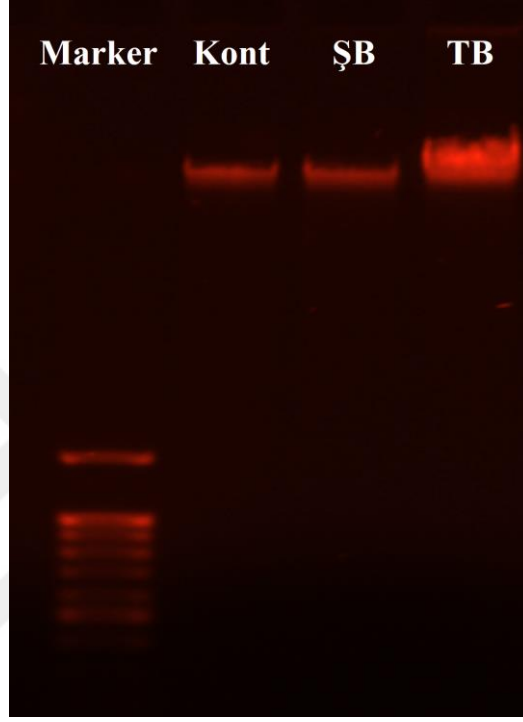
Khan and Kang (2017) çalışmalarında, antikanser özelliğe sahip olan *L. plantarum*'un kolon kanseri hücrelerinde, morfolojik değişimlere, doz-bağımlı olarak hücrelerin sayısında azalmaya ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Hücrelerin ölümü sürecinde oksidatif hasar ve indirgenmiş mitokondriyal zar potansiyelinin kanserli hücrelerde apoptotik hücre ölümünü indüklediği ileri sürülmektedir. *L. plantarum* pro-apoptotik Bax'ı aktive ve anti-apoptotik Bcl-2'yi inaktif ederek sonucunda da zayıflamış mitokondriyal membran potansiyeliyle sitokrom-c'nin salınmasına neden olarak kaspaz aracılı hücre ölümüne neden olduğu gösterilmektedir (Khan and Kang 2017).

Kanserli hücrelerin apoptoz sürecinde kolonda gerçekleşen fermantasyon ürünü olan butirat ile indüklenmesi kolorektal kansere karşı korunmada önemli bir mekanizma olarak düşünülmektedir. Butiratın önemli bir etkisi histon deasetilazı inhibe etmektir, böylece butirat bu enzimi inhibe ederek spesifik hücre ölüm genlerinin baskıdan kurtulması ile apoptozu indükleyebilir (Medina et al. 1997). Ayrıca butirat'ın, proenzim formundaki prokaspaz-3'ün aktif kaspaz-3'e dönüştürülmesine yol açarak kolorektal kanser hücrelerinde apoptoz programını indükleyebildiği gösterilmektedir (Medina et al. 1997). Dahası KZYA'ndan olan butirat'ın kolon kanseri hücrelerinde apoptozu yol açarken normal hücrelerde apoptozu baskılayarak bu durumu gerçekleştirmediği de önceki çalışmalarda gösterilmektedir (Hague et al. 1995, 1997; Lim et al. 2010). Mevcut sonuçlara göre, HT-29 kolon kanseri hücrelerinin KZYA'ne maruz kalmasının sonucunda intrinsik apoptoz yolağındaki apoptotik sitokrom-c protein ekspresyonu ve Bax/Bcl-2 oranında yükselme gözlenirken, anti-apoptotik Bcl-2 ve prokaspaz-9 protein ekspresyon seviyelerinin düştüğü gözlenmektedir. Tüm bu sonuçlar faydalı bakterilerden *L. reuteri*'nin sekonder metabolitleri olan KZYA'nin HT-29 kolon kanseri hücrelerinde apoptotik bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Probiyotikler ile yapılan çalışmalarda değişik model organizmalarda kolon kanseri ve farklı kanser çeşitlerinde bio-terapotikler olarak faydalı bakterilerin kullanıldığı ve olumlu sonuçlar alındığı (Lakritz et al. 2014; Kahouli et al. 2015a,b) dahası probiyotiklerden elde edilen bazı KZYA kanserli hücrelerin ölüm oranını artırırken normal hücrelerde böyle bir sonuca neden olmadığı da gözlemlenmektedir (Hague et al. 1995, 1997; Lim et al. 2010). Çalışmamızda *L. reuteri*'den elde edilen KZYA, HT-29 hücrelerinin ölüm oranlarını artırıp, ROS ve LPO seviyelerinde yükselmeye ve bu yükselmeye bağlı olarak mitokondrial membran zar yapısındaki apoptozu indükleyen Bax/Bcl-2 oranında (Reed, 1997) hem mRNA hemde protein düzeyinde anlamlı artış göstermiştir. Dahası intrinsik apoptoz yolağı üzerindeki apoptotik sitokrom-c, kaspaz-9 ve kaspaz-3 ekspresyonları da hem transkripsiyon hemde translasyon seviyesinde anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu sonuçlar probiyotiklerden *L. reuteri* ve bu türden elde edilen bazı KZYA'nin kolon kanseri tedavisi ve gelişiminin engellenmesi sürecinde bio-terapotikler olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

#### 4.7. KZYA'nin DNA Fragmentasyonu Üzerine Etkileri

HT-29 hücrelerinin ŞB ve TB ile inkübasyonu sonucunda genomik DNA'da her hangi bir fragmentleşme yada parçalanma gözlemlenmedi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. HT-29 kolon kanseri hücresinde KZYA'nin genomik DNA üzerindeki etkileri. Hücreler deneysel grupta anlatıldığı üzere inkübe edildi. DNA'lar etidyum bromid eklenmiş %0,8'lik agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. Jel Image Lab 5.2.1 yazılımı ile GelDocEZ'de görüntülenmiştir. (Kont= Kontrol; ŞB= Şartlandırılmış Besiyeri; TB= Tasarlanmış Besiyeri; Mar= moleküler ağırlığı bilinen markör)

DNA fragmentasyon deneyleri genomik DNA'nın hücre homojenatından elde edilerek agaroz jel elektroforezi sonucunda karakteristik bir "DNA merdiveni" ortaya çıkarır ve merdivendeki her bir bant yaklaşık 180 baz çifti ile boyut olarak ayrılır (Elmore 2007). Bu metodoloji hacim başına yüksek sayıda apoptotik hücre bulunan doku ve hücre kültürleri için yararlıdır. Öte yandan, düşük sayıda apoptotik hücre bulunan vakalarda "DNA merdiveni" şeklinde fragmentleşme görülemeyeceği için önerilmez. Bu deney için bir başka dezavantaj daha vardır. DNA parçalanması, apoptozun son evresinde meydana geldiğinden, bir DNA merdiveninin olmaması, hücrelerin erken apoptoz geçirme potansiyelini ortadan kaldırmaz (Elmore 2007) Mevcut sonuçlardaki fragmentleşmenin gözlenememesi bu sebeplerle ilişkilendirilebilir.



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile probiyotiklerin anti-proliferatif ve pro-apoptotik faaliyetleri açıklanarak probiyotikler ve tedavi amaçlı mikrobiyoloji açısından yeni bir sonuç açıklığa kavuşturuldu. Çalışmamızda *L. reuteri*'nin üretmiş olduğu KZYA ve diğer metabolitlerin insan kolon kanseri hücreleri üzerinde ROS oluşumu ve LPO seviyesinde meydana getirdiği değişiklikler ile mitokondrial apoptoz yolağındaki etkileri gen ve protein ekspresyonu düzeyinde gözlemlendi. Çalışma için farklı deney grupları tasarlandı ve bu gruplar normal besiyerinin uygulandığı kontrol grubu, bakteri hücrelerinin içerisinde yetiştirilerek elde edilen şartlandırılmış besiyeri grubu ve şartlandırılmış besiyerinden dört farklı KZYA'nin miktarlarının ölçülerek normal besiyerine eklendiği tasarlanmış besiyeri grubu olarak adlandırıldı. Böylece HT-29 hücrelerinin çoğalmaları ya da ölmeleri, ROS ve LPO üretim seviyeleri ile mitokondrial apoptoz yolağı üzerindeki karşılaştırmalı etkileri mRNA ve protein seviyeleri ölçülerek belirlendi. Sonuç olarak *L. reuteri*'den elde edilen KZYA, HT-29 hücrelerinin ölüm oranlarını artırırken, ROS ve LPO üretiminde yükselmiş ve mitokondrial apoptoz yolağı üzerindeki ilgili genlerin hem transkripsiyon hemde translasyon seviyesinde anlamlı şekilde değiştiği gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında probiyotiklerden *L. reuteri* ve bu türden elde edilen bazı KZYA'nin kolon kanseri tedavisi ve gelişiminin engellenmesi sürecinde bio-terapotikler olarak kullanılabileceği açıklığa kavuşturulmuştur.

Tez çalışması süresince yapılan literatür taramaları ve deneyler esnasındaki gözlemler çalışmanın sonrasında yapılabilecek çeşitli yenilik önerilerini ortaya koymaktadır. Çalışmanın devamında öncelikli olarak benzer deneylerin farklı model organizmalarla gerçekleştirilmeside gerekmektedir. Bunların yanı sıra deneylerin tasarlanmasında hücre kültürü deneylerinde organizmanın yetiştirildiği besiyerinin uygulanmasının beraberinde bakteri hücreleri ve kanserli hücre hatları eş zamanlı aynı ortamda yetiştirilmelidir ve böylece farklı etkiler ve sonuçlar elde edilebilir.

Yapılan çalışmanın daha ileri safhası olarak moleküler biyoloji ve genetik temelli yeni deneyler (örneğin miRNA array deneyleri) eklenerek probiyotiklerin kanser üzerindeki etkileri daha detaylı olarak ortaya çıkarılmalıdır. Aynı zamanda kanserin tedavi edilmesi ve ilerlemesinin durdurulmasının çalışmaları açısından apoptotik yollar üzerinde farklı yollar (örneğin ekstrinsik yolk, otofaji ve apoptoz arasındaki ilişkiyi ortaya çıkaracak alternatif yollar) tercih edilerek sonuçlar daha çeşitlendirilmelidir. Tüm bunların yanısıra probiyotiklerin biyolojik olarak önemleri konusunda gerekli mikrobiyom çalışmalarının çeşitlendirilerek çoğaltılması gerekmektedir.



## **KAYNAKLAR**

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2007) *Molecular Biology of the Cell*. 5. Baskı, Garland Science, New York

Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K (2010) Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1801(11): 1175–83

Ashkenazi A (2008) Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery* 7: 1001-1012

Ashkenazi A, Wayne J, Fairbrother WJ, Joel D, Levenson JD, Souers AJ (2017) From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* 16: 273–284

Aso Y, Akaza H, Kotake T, Tsukamoto T, Imai K, Naito S (1995) Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group *European Urology* 27(2): 104–9

Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B (2002) Different Molecular Events Account for Butyrate-Induced Apoptosis in Two Human Colon Cancer Cell Lines. *J Nutr* 132: 1812–1818

Ayala A, Mario F, Muñoz MF, Sandro Argüelles S (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2014): 1-31

Barrera G (2012) Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*: 1-21

Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Etem E, Nedzvetsky VS (2007) Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. *Journal of Pineal Research* 43: 225-231

Baydas G, Ozer M, Yasar A, Koz ST, Tuzcu M (2006) Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Biochemistry* 71: 91-95

Besten GD, Eunen KV, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* (9): 2325–2340

Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G (1997) Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutrition and Cancer* 28(1): 93–99

Bogaert J, Prenen H (2014) Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol* 27(1): 9–14

Borinstein SC, Conerly M, Dzieciatkowski S, Biswas S, Washington MK, Trobridge P, Henikoff S, Grady WM (2010) Aberrant DNA Methylation Occurs in Colon Neoplasms Arising in the Azoxymethane Colon Cancer Model. *Molecular Carcinogenesis* 49: 94-103

Choi AO, Cho SJ, Desbarats J, Lovrić J, Maysinger D (2007) Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. *J of Nanobiotechnology* 5(1): 1-13

Darendelioglu E, Tartik M, Aykutoglu G, Baydas G (2016) Turkish propolis protects human endothelial cells in vitro from homocysteine-induced apoptosis. *Acta Histochemica* 118: 369-76

Das UN (1999) Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 61(3): 157-163

Decaudin D, Marzo I, Brenner C, Kroemer G (1998) Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: A prospective novel target of cancer therapy. *International Journal of Oncology*

Dilsiz N (2004) *Moleküler Biyoloji*. Palme Yayıncılık, Ankara

Dominguez MG, Xuejuan Jiang X, Castelao JE (2007) Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. *Breast Cancer Research* 79: 201

Elmore S (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495–516.

Feng Z, Hu W, Marnett LJ, Tang M-S (2006) Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutation Research* 601(1-2): 125–136

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 127(12): 2893–2917

Fichera GA, Giese G (1994) Non-immunologically-mediated cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. *Cancer Letters* 85(1): 93–103

Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology* 66(5): 365–378

Garagnani P, Pirazzini C, Franceschi C (2013) Colorectal Cancer Microenvironment : Among Nutrition, Gut Microbiota, Inflammation and Epigenetics. *Current Pharmaceutical Design* 19: 765–778

Gasparovic AC, Jaganjac M, Mihaljevic B, Sunjic SB, Zarkovic N (2013) Assays for the measurement of lipid peroxidation. *Methods Molecular Biology* 965: 283–296

Gianotti L, Morelli L, Galbiati F, Rocchetti S, Coppola S, Beneduce A, Braga M (2010) A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. *World Journal of Gastroenterology* 16(2): 167–175

Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, et al. (2009) Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova* 32(1): 169–174

Guessous I, Dash C, Lapin P, Doroshenk M, Smith RA, Klabunde CN (2010) Colorectal Cancer Screening Barriers and Facilitators in Older Persons. *Preventive Medicine* 50: 3-10

Gui H, Shen Z (2016) Concentrate diet modulation of ruminal genes involved in cell proliferation and apoptosis is related to combined effects of short-chain fatty acid and pH in rumen of goats. *Journal of Dairy Science* 99(8): 6627-6638

Habermann N, Ulrich CM, Lundgreen A, Makar KW, Poole EM., Caan B, Slattery ML (2013) PTGS1, PTGS2, ALOX5, ALOX12, ALOX15, and FLAP SNPs: Interaction with fatty acids in colon cancer and rectal cancer. *Genes and Nutrition* 8: 115–126

Hague A, Elder DJ, Hicks DJ, Paraskeva C (1995) Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *International Journal of Cancer* 60(3): 400–406

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

Halpern MT, Pavluck AL, Ko CY, Ward EM, (2009) Factors Associated with Colon Cancer Stage at Diagnosis. *Digestive Diseases and Sciences* 54: 2680-2693

Hofmanová J, Straková N, Vaculová AH, Tylichová Z, Šafaříková B, Skender B, Kozubík A (2014) Interaction of Dietary Fatty Acids with Tumour Necrosis Factor Family Cytokines during Colon Inflammation and Cancer. *Mediators of Inflammation*: 1-17

Igney FH, Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2: 277–288

Jan G, Belzacq AS, Haouzi D, Rouault A, Metivier D, Kroemer G, Brenner C (2002) Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ* 9(2): 179–188

Jeong CH, Joo SH (2016) Downregulation of Reactive Oxygen Species in Apoptosis. *J Cancer Prev* 21(1): 13–20

Jones RM, Luo L, Ardita CS, Richardson AN, Kwon YM, Mercante JW, Alam A, Gates CL, Wu H, Swanson PA, Lambeth JD, Denning PW, Neish AS (2013) Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *EMBO J* 32(23): 3017–3028

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Science* 95: 4997–5002

Kahouli I, Malhotra M, Alaouijamali M, Prakash S (2015a) In-Vitro Characterization of the Anti-Cancer Activity of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus Fermentum* NCIMB 5221 and Potential against Colorectal Cancer. *Journal of Cancer Science & Therapy* 7(7): 224–235

Kahouli I, Malhotra M, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Marinescu D, Rodes L, Prakash S (2015b) Screening and In-Vitro Analysis of *Lactobacillus reuteri* Strains for Short Chain Fatty Acids Production, Stability and Therapeutic Potentials in Colorectal Cancer. *Bioequivalence & Bioavailability* 7(1): 39–50

Kahouli I, Tomaro-Duchesneau C, Prakash S (2013) Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. *Journal of Medical Microbiology* 62(8): 1107–23

Kailasapathy K (2013) Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits - a review. *International Journal of Fermented Foods* 2(1): 1–17

Khan I, Kang SC (2017) Apoptotic Activity of *Lactobacillus plantarum* DGK-17-Fermented Soybean Seed Extract in Human Colon Cancer Cells via ROS-JNK Signaling Pathway. *J Food Sci* 82(6): 1475-1483

Kim AD, Han X, Piao MJ, Hewage SR, Hyun CL, Cho SJ, Hyun JW (2015) Esculetin induces death of human colon cancer cells via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial apoptosis pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9(12): 113257

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998) Mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Reviews Physiology* 60: 619-642

Kumar RS, Kanmani P, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Thirunavukkarasu C, Arul V (2012) *Lactobacillus plantarum* AS1 isolated from south Indian fermented food Kallappam suppress 1,2-dimethyl hydrazine (DMH)-induced colorectal cancer in male Wistar rats. *Appl Biochem Biotechnol* 166(3): 620-31

Lakritz JR, Poutahidis T, Levkovich T, Varian BJ, Ibrahim YM, Chatzigiagos A, Sheyla Mirabal S, Eric J. Alm EJ, Erdman SE (2014) Beneficial bacteria stimulate host immune cells to counteract dietary and genetic predisposition to mammary cancer in mice. *Int J Cancer* 135: 529–540

Lim SH, Song KS, Lee J (2010) Butyrate and Propionate, Short Chain Fatty Acids, Attenuate Myocardial Damages by Inhibition of Apoptosis in a Rat Model of Ischemia-reperfusion. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 53(5): 570-577

Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J, Zheng Q (2011) Randomised clinical trial: The effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery - A double-blind study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 33(1): 50–63

Lüleyap HÜ (2008) *Moleküler Genetiğin Esasları*. Nobel Kitabevi, Ankara, 293-316

Ma D, Forsythe P, Bienenstock J (2004) Live *Lactobacillus reuteri* Is Essential for the Inhibitory Effect on Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Interleukin-8 Expression. *Infection and Immunity* 72(9): 5308–5314

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Kroemer G (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187(8): 1261–1271

Medina V, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, Zalewski PD (1997) Induction of Caspase-3 Protease Activity and Apoptosis by Butyrate and Trichostatin A (Inhibitors of Histone Deacetylase): Dependence on Protein Synthesis and Synergy with a Mitochondrial Cytochrome c-dependent Pathway. *Cancer Research* 57: 3697-3707

Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Uchiyama T, Adachi J, Okada T, Ikemoto K, Oga A, Sasaki K (2009) Identification of DNA Copy Number Aberrations Associated with Metastases of Colorectal Cancer Using Array CGH Profiles. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 188: 70-76



Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ (2003) Malondialdehyde: a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry* 278(33): 31426–31433

Noverr MC, Huffuagle GB (2004) Rationale of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infection and immunity* 72: 6206-6210

Omotayo O, Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS (2013) Evidence in Support of Potential Applications of Lipid Peroxidation Products in Cancer Treatment. *Oxid Med Cell Longev*: 1-8

Öner C (2003) *Genetik*. Palme Yayıncılık, Ankara

Perše M, Cerar A (2011) Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats. *J Biomed Biotechnol* 2011: 1-14

Pogribny IP (2010) Epigenetic Events in Tumorigenesis: Putting The Pieces Together. *Experimental Oncology* 32: 132-136

Quiros ARB, Arias MF, Hernández JL (2009) A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food Chemistry* 116(2): 509-512

Rebecca L, Siegel MPH, Kimberly D, Miller MPH, Ahmedin DVM, (2016) Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 66: 7–30

Reddy BS, Rivenson A (1993) Inhibitory Effect of *Bifidobacterium longum* on Colon, Mammary, and Liver Carcinogenesis Induced by 2-Amino-3 methylimidazo[4,5-f] quinoline, a Food Mutagen. *Cancer Research* 53: 3914-3418

Reed JC (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387: 773–776

Renehan AG, Booth C, Potten CS (2001) What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 322(7301): 1536–1538

Reuter G (2001) The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2(2): 43–53

Ricchi P, Zarrilli R, Palma A, Acquaviva AM (2003) Nonsteroidal AntiInflammatory Drugs in Colorectal Cancer: From Prevention to Therapy. *British Journal of Cancer* 88: 803-807

Ruemmele FM, Schwartz S, Seidman EG, Dionne S, Levy E, Lentze MJ (2003) Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut* 52: 94–100

Shabnam MS, Srinivasan R, Wali A, Majumdar S, Joshi K, Behera D (2004) Expression of p53 protein and the apoptotic regulatory molecules Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in locally advanced squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 45(2): 181–188

Shen HM, Shi CY, Shen Y, Ong CN (1996) Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radic Biol Med* 21:(2) 139–146

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415–418

Sivieri K, Bedani R, Cardoso D, Cavallini U, Rossi E (2013) Probiotics and Intestinal Microbiota: Implications in Colon Cancer Prevention.

Smith MT, Thor H, Hartzell P, Orrenius S (1982) The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol* 31(1): 19–26

Tang Y, Chen Y, Jiang H, Nie D (2011) Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 18: 602–618

Tartik M, Darendelioglu E, Aykutoglu G., Baydas G (2016) Turkish propolis supresses MCF-7 cell death induced by homocysteine. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 82: 704-712

Thirabunyanon M, Hongwittayakorn P (2013) Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169: 511–525

Tian Y, Ye Y, Gao W, Chen H, Song T, Wang D, Mao X, Ren C (2011) Aspirin Promotes Apoptosis in A Murine Model of Colorectal Cancer by Mechanisms Involving Downregulation of IL-6–STAT3 Signaling Pathway. *International Journal of Colorectal Disease* 26: 13-22

Tuynman JB, Peppelenbosch MP, Richel DJ (2004) Cox-2 İnhibition as a Tool to Treat and Prevent Colorectal Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 52: 81-101

Türkiye İstatistik Kurumu (2016) Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2016. Haber Bülteni Sayı: 24572, 27 Nisan 2017, Saat: 10:00

Url 1 <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts> (erişim tarihi: 02.08.2017)

Url 2 <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer> (erişim tarihi: 02.08.2017)

Url 3 [http://www.ndhealthfacts.org/wiki/Oncology\\_%28Cancer%29](http://www.ndhealthfacts.org/wiki/Oncology_%28Cancer%29) (erişim tarihi: 02.08.2017)

Url 4 <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/home/ovc-20188216> (erişim tarihi: 03.08.2017)

Url 5 <http://labiotech.eu/swiss-blood-test-for-colorectal-cancer-joins-race-of-liquid-biopsies/> (erişim tarihi: 03.08.2017)

VanZanten GC, Knudsen A, Röytiö H, Forssten S, Lawther M, Blennow A, Lahtinen SJ, Jakobsen M, Svensson B, Jespersen L (2012) The effect of selected synbiotics on microbial composition and short chain fatty acid production in a model system of the human colon. *PLoS One* 7(10): 1-11

Willett WC (2000) Diet and Cancer. *The Oncologist* 5(5): 393–404

Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinf* 7: 85

Zhong L, Zhang X, Covasa M (2014) Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 20(24): 7878-7886

Zoratti M, Szabb I (1995) The mitochondrial permeability transition. 1241: 139–176



## ÖZGEÇMİŞ

Ekrem DARENDELİOĞLU 1985 yılı Sivas Merkez doğumludur. İlk ve orta öğrenimini Sivas'ta tamamladıktan sonra 2005 yılında Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazanarak 2009 yılında mezun oldu. 2010 ve 2011 yılları arasında Ankara Üniversitesinde İngilizce eğitim programı tamamlayarak 2011-2012 yılları arasında University College London'da Diploma in Academic Language programından mezun oldu. 2012-2013 yılları arasında University of Leicester'da, Medical Science biriminde Molecular Genetics alanında yüksek lisansını tamamladı. 2014 yılında Bingöl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalında Doktora eğitimine başladı. 2013 yılında Bingöl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak atanıp halen Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.