

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Lactobacillus plantarum ve *Lactobacillus pentosus* TÜRLERİNDEN
ELDE EDİLEN BAZI KISA ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİNİN
ANTİMİKROBİYAL ve KEMOTERAPÖTİK İLAÇLA
İNDÜKLENMİŞ İNSAN NÖRON HÜCRELERİNDE (SH-SY5Y)
KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜHEYDA ESMA GENÇ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ekrem DARENDELİOĞLU

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Adnan AYNA

BİNGÖL-2022

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve eğitim sürecimde bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Ekrem DARENDELİOĞLU'na, süreç boyunca yardım ve tecrübelerini esirgemeyen eş danışmanım Doç. Dr. Adnan AYNA'ya teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasına desteklerinden ötürü Bingöl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP-Proje No: FEF.2020.00.004) teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında her türlü yardımı sağlayan Arş. Gör. Gürkan AYKUTOĞLU'na, Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'na, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'na ve Bingöl Halk Sağlığı PCR Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca sabrını ve anlayışını eksik etmeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Süheyda Esmâ GENÇ

Bingöl 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Kemoterapi ve Kullanılan İlaçlar	5
1.2.1. Karboplatin.....	7
1.3. Apoptozis.....	9
1.3.1. Mitokondri /sitokrom-c aracılı apoptozis	10
1.4. Laktik Asit Bakterileri ve Kısa Zincirli Yağ Asitleri	11
1.4.1. Laktik asit	14
1.4.2. Fenillaktik asit	15
1.4.3. Asetik asit	15
1.4.4. Propiyonik asit	15
1.4.5. Bütirik Asit	16
1.5. Antimikrobiyal Aktivite	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Materyal.....	23
3.2. Metot.....	24
3.2.1. Hücreler	24
3.2.2. Deneysel KZYA'nin HPLC/UV-Vis Dedektörüyle Tayini	24
3.2.3. Antimikrobiyal Analizi.....	24
3.2.4. Hücre Canlılık Analizi.....	25
3.2.5. Hücre içi ROS Tayini	26
3.2.6. Lipid Peroksidasyon (LPO) Analizi	26

3.2.7. QRT-PCR Analizi	26
3.2.8. İstatistiksel Analizler	27
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	28
4.1. Antimikrobiyal Analiz	28
4.2. KZYA Miktar Analizi	30
4.3. KZYA'nin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	30
4.4. KZYA'nin ROS Üzerindeki Etkileri	32
4.5. KZYA'nin LPO Üzerindeki Etkileri	34
4.6. KZYA'nin Apoptozla İlişkili Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	35
5. SONUÇLAR	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DCFH-DA	: 2,7'-Diklorofluoresein Diasetat
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Besiyeri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FBS	: Fötal Sığır Serumumu
KZYA	: Kısa Zincirli Yağ Asidi
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Haberci RNA
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu
QRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SH-SY5Y	: İnsan Nöron Hücresi
TBA	: 2-tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklorik Asit
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Hücre döngüsünde kontrol noktalarının işlevleri.....	2
Şekil 1.2.	Hücrede DNA hasarı ve replikasyon hataları ile beraber kanser oluşumu.	3
Şekil 1.3.	Karboplatin'in yapısı.....	8
Şekil 1.4.	Hücrenin apoptozise uğramasını sağlayan iç yolak ve dış yolak.....	11
Şekil 4.1.	SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde <i>L. plantarum</i> 'dan sentezlenmiş KZYA'nin hücre profilerasyonu üzerindeki etkisi.....	31
Şekil 4.2.	SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde <i>L. pentosus</i> 'tan sentezlenmiş KZYA'nin hücre profilerasyonu üzerindeki etkisi.....	32
Şekil 4.3.	SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde <i>L. plantarum</i> 'un sentezlediği sekonder metabolitlerin ROS üzerindeki etkisi.....	33
Şekil 4.4.	SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde <i>L. pentosus</i> 'un sentezlediği sekonder metabolitlerin ROS üzerindeki etkisi.....	34
Şekil 4.5.	SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde <i>L. plantarum</i> 'un sentezlediği sekonder metabolitlerin LPO üzerindeki etkisi ve MDA seviyesi.....	35
Şekil 4.6.	SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde <i>L. pentosus</i> 'un sentezlediği sekonder metabolitlerin LPO üzerindeki etkisi ve MDA seviyesi.....	35
Şekil 4.7.a.	<i>L. plantarum</i> bakterisinden elde edilen sekonder metabolitlerin <i>Cas 10</i> üzerindeki etkisi.....	36
Şekil 4.7.b.	<i>L. pentosus</i> bakterisinden elde edilen sekonder metabolitlerin <i>Cas 10</i> üzerindeki etkisi.....	37
Şekil 4.8.a.	<i>L. plantarum</i> bakterisinden elde edilen sekonder metabolitlerin <i>Cas 8</i> üzerindeki etkisi.....	38
Şekil 4.8.b.	<i>L. pentosus</i> bakterisinden elde edilen sekonder metabolitlerin <i>Cas 8</i> üzerindeki etkisi.....	38
Şekil 4.9.a.	<i>L. plantarum</i> bakterisinden elde edilen sekonder metabolitlerin <i>Cas 3</i> üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 4.9.b.	<i>L. pentosus</i> bakterisinden elde edilen sekonder metabolitlerin <i>Cas 3</i> üzerindeki etkisi.....	40

Şekil 4.10.a	<i>L. plantarum</i> bakterisinden elde edilen sekonder metabolitlerin <i>Bax</i> geni üzerindeki etkisi.....	41
Şekil 4.10.b	<i>L. pentosus</i> bakterisinden elde edilen sekonder metabolitlerin <i>Bax</i> geni üzerindeki etkisi.....	41

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1.	Kemoterapide kullanılan fonksiyonel gruplar ve ilaçlar.....	6
Tablo 3.1.	Kullanılan kimyasal maddeler ve materyaller.....	23
Tablo 3.2.	QRT-PCR deneylerinde kullanılan primer sekans dizileri.....	27
Tablo 4.1.	<i>Lactobacillus plantarum</i> 'un bazı zararlı bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi.....	28
Tablo 4.2.	<i>Lactobacillus pentosus</i> 'un bazı zararlı bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi.....	29
Tablo 4.3.	DMEM besiyeri içinde konsantrasyonu belirlenmiş <i>Lactobacillus plantarum</i> KZYA miktarı.....	30
Tablo 4.4.	DMEM besiyeri içinde konsantrasyonu belirlenmiş <i>Lactobacillus pentosus</i> KZYA miktarı.....	30

***Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus pentosus* TÜRLERİNDEN
ELDE EDİLEN BAZI KISA ZİNCİRLİ YAĞ ASİTLERİNİN
ANTİMİKROBİYAL ve KEMOTERAPÖTİK İLAÇLA
İNDÜKLENMİŞ İNSAN NÖRON HÜCRELERİNDE (SH-SY5Y)
KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ÖZET

Dünya üzerinde en fazla mortalite oranına sahip hastalıklardan biri olan kanser, insan yaşamının her evresinde başlayabilen genetik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser hücrelerini anlayabilmek için kanser olmayan hücrelerin mekanizmasını anlamak önemlidir. Günümüzde kanserin tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte, hastanın yaşam kalitesi ve süresi uzamaktadır. Kanser tedavisinde radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi, sinyal iletim sistemi inhibitörleri, gen tedavisi, anjiyogenez inhibitörleri ve cerrahi yöntemler uygulanmaktadır. En yaygın kullanılan tedavi şekli ise kemoterapidir. Kemoterapi ilaçlarının yaygın kullanımı ve artan doz miktarı birçok organ toksisitesine sebep olmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların olumsuz etkileri birçok çalışma ile gösterilmiştir. Hastanın hayat kalitesini arttırmak ve tedavinin seyrini olumlu etkilemek için organ hasarını minimum düzeyde tutabilmek önemlidir. Bu doğrultuda kemoterapötiklerle kombine kullanılan Kısa Zincirli Yağ Asitleri (KZYA) ile hücre hasarı minimum düzeye düşürülüp antitümöral etki çalışmaları yapılmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların hücre zar yapıları, sentezledikleri laktik asit, bütirik asit ve asetik asit gibi organik asitler, proteolitik aktiviteleri ve KZYA gibi özelliklerinin antioksidan aktiviteyi arttırdığı, serbest radikal oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında laktik asit bakterileri tarafından üretilen bazı KZYA'nın bir kemoterapötik olan karboplatin ile hasara uğratılmış nöron hücreleri üzerindeki ROS ve LPO seviyelerinde oluşturduğu değişiklikler ile gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Sonuç olarak *L. plantarum* ve *L. pentosus* bakterilerinden sentezlenen bazı KZYA'nın, karboplatin hasarına karşı hücreyi koruyucu yönde etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karboplatin, KZYA, laktik asit, propiyonik asit, bütirik asit.

ANTIMICROBIAL EFFECTS OF SOME SHORT CHAIN FATTY ACIDS OBTAINED FROM *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* and THEIR PROTECTIVE EFFECTS ON CHEMOTHERAPUTIC DRUG-INDUCED HUMAN NEURONAL CELLS (SH-SY5Y)

ABSTRACT

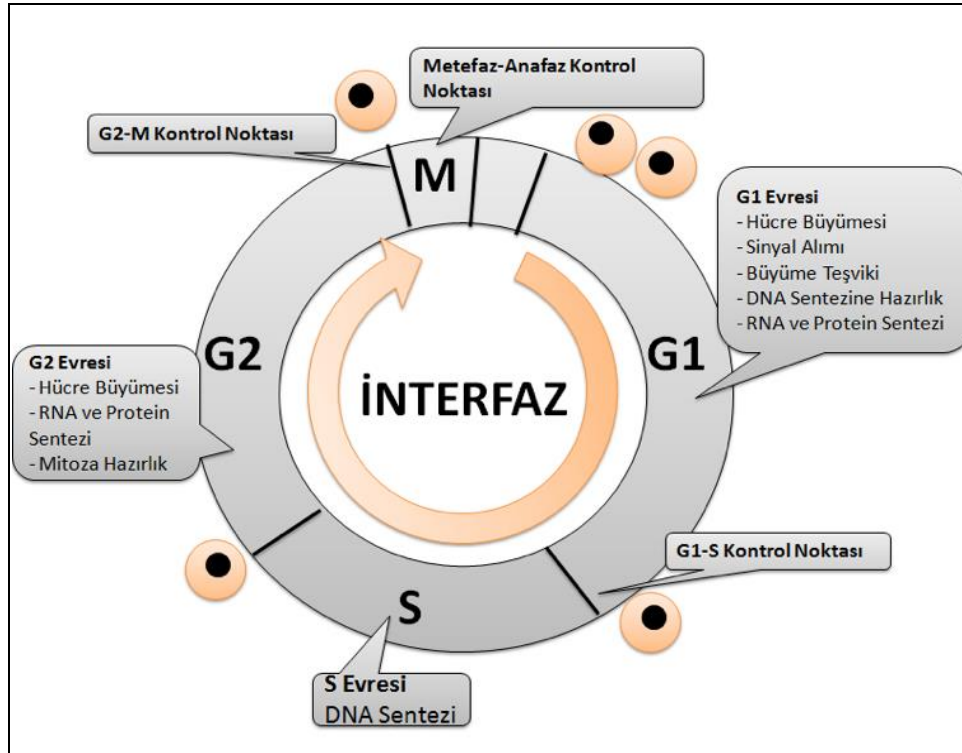
Cancer, one of the diseases with the highest mortality rate in the world, is defined as a genetic disease that can start at any stage of human life. In order to understand cancer cells, it is important to understand the mechanism of non-cancerous cells. Today, with the development of the diagnosis and treatment methods of cancer, the patient's quality of life and duration is prolonged. Radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy, signal transmission system inhibitors, gene therapy, angiogenesis inhibitors and surgical methods are used in the treatment of cancer. The most common form of treatment is chemotherapy. Widespread use of chemotherapy drugs and increasing doses cause many organ toxicities. The negative effects of drugs used in cancer treatment have been shown in many studies. It is important to keep organ damage to a minimum in order to increase the patient's quality of life and positively affect the course of treatment. In this direction, cell damage is minimized with short-chain fatty acids (SCFAs) used in combination with chemotherapeutics, and antitumoral effect studies are carried out. It has been shown that properties of probiotic microorganisms such as cell membrane structures, synthesized organic acids such as lactic acid, butyric acid and acetic acid, proteolytic activities and SCFAs increase antioxidant activity and reduce the formation of free radical oxygen species. In this thesis, the changes in ROS and LPO levels and gene expression levels on neuron cells damaged by carboplatin, a chemotherapeutic, produced by SCFAs produced by lactic acid bacteria were investigated. As a result, it has been shown that SCFA synthesized from *L. plantarum* and *L. pentosus* bacteria has cell-protective effects against carboplatin damage.

Keywords: Carboplatin, SCFA, lactic acid, propionic acid, butyric acid.

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Dünya üzerinde en fazla mortalite oranına sahip hastalıklardan biri olan kanser, insan yaşamının her evresinde başlayabilen genetik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Clare et al., 2018). Kanser, sağlıklı hücrelerin kontrolsüzce çoğalan sağlıklı hücrelere dönüşmesi olarak tanımlanır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 'ne göre kanser, ölümün birincil sebepleri arasında gösterilmektedir (Can, 2017). İnsan vücudu, gerektiği zaman yenilenmesi için bölünme geçiren hücrelerden meydana gelmektedir. Bu sağlıklı hücreler sağkalm, büyüme ve yayılımı kontrol eden genlerin aşırı ekspresyonu sonucu kanser hücresi formuna geçer. Kanser hücrelerini anlayabilmek için kanser olmayan hücrelerin mekanizmasını anlamak önemlidir. Normal bir şekilde büyüyen vücut hücrelerinin zarar görmesi ya da yaşlanması halinde yerini yeni hücreler alır. Kimi zaman bu döngü yolunda gitmeyebilir, hücre DNA'sı hasar görmüş olabilir. Bu noktada ya hücre çoğalmasının ya da apoptozun azalmış hızı karşımıza kanser hücresi olarak çıkmaktadır (Akbulut ve Akbulut, 2005). Çoğalma sinyalleri ile bölünebilen sağlıklı hücreler belirli mutasyonlar sonucunda bu kontrollü bölünme yeteneğini kaybeder. Kontrollü bölünmeyi sağlayamayan bu hücrelerde genellikle hücre döngüsünün düzenlenmesinde bir kusur mevcuttur. Bütün kanser hücrelerindeki ortak benzerlik, hücre eşlenmesi üzerindeki kontrolün yitirilmesidir ve bu kontrolsüz çoğalmanın mekanizmasını anlayabilmek için sağlıklı hücrelerdeki döngünün incelenmesi gerekmektedir. Hücre döngüsü DNA'nın mitoz bölünmesi ve hücrenin kontrollü faaliyetleri olarak tanımlanabilir. Normal hücre siklusunda G0, G1, S, G2 ve M fazı yer almaktadır. G0 dinlenme fazıdır ve farklılaşmış hücreler büyüme faktörüyle uyarıldığı sürece bu safhada bekler. G1 fazı çeşitli büyüme faktörleri tarafından denetlenir, hücre bu evrede DNA sentezi için hazırlanmaktadır. S safhasında DNA kendini eşler ve kopya sayısı iki katına ulaşır. DNA eşlenmesinden sonra G2 safhası başlar (Lodish, 2001; Park et al., 2002). Hücre bölünmesinin gerçekleştiği faz M fazıdır ve mitozdan sonraki döngü G1, S, G2 şeklinde tekrar etmektedir (Vermeulen et al., 2003; Kumar, 2005).

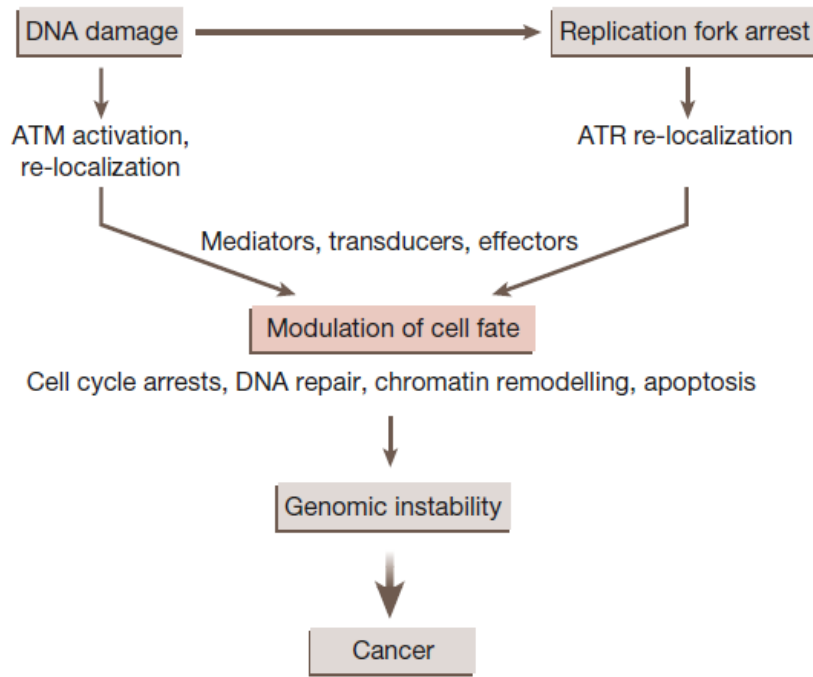


Şekil 1.1. Hücre döngüsünde kontrol noktalarının işlevleri (Kahraman ve Karahan, 2018). G1-S noktasında hücre kendi boyutunu takip ederek DNA'nın hasar görüp görmediğine karar verir. G2-M kontrol noktası burada DNA replikasyonu tamamlanmadıkça mitozun başlamasını önlemektedir. M kontrol noktasında ise, DNA replikasyonunda, DNA onarımında, kromozom düzenlenmesinde hata ya da sapma olursa, hücre döngüsü koşullar düzelinceye kadar durdurulur ve bu şekilde mutasyon sayısında artış ve çoğalan hücrelerdeki biriken kromozomal temelli anormalliklerin önüne geçilmiş olur

Sağlıklı hücrelerde hücre döngüsü S fazına girmeden önceki geç G1 fazında, G2/M geçişinde ve M kontrol noktasında denetlenir. Her bir denetleme noktasında döngünün ilerlemesi veya durması ilgili proteinlerce sağlanır. Kinaz ve siklin adı verilen bu protein ailesi döngüdeki kararların verilmesinden, hedef proteinlerin seçilip fosforile edilmesinden sorumludurlar. Geç G1 fazı ilk kontrol noktasıdır ve hücrelerin G1 fazından S fazına geçiş sürecinde DNA'nın hasarlı olmaması gerekmektedir. Herhangi bir hasar durumunda hücreler kontrol noktasında onarım gerçekleşinceye kadar bekletilir. Hasar onarılamaz ise G1 fazı p53 proteinin aktivasyonu ile uzar. p53, DNA hasarı sonrası TP53 geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür (Cabadak 2008; Kastan et al. 2004). Hasar tamir edilinceye kadar hücre döngüsünü durdurup tamirine olanak tanır eğer tamir onarılamayacak düzeyde ise hücrenin apoptozise girmesini sağlar. Kontrolsüz bölünen hücrelerdeki genetik hasarın başlıca sebebi arasında hücre döngüsünde kontrolün

herhangi bir basamakta bozulması sebebi olarak mutasyonlar gösterilmektedir (Fışkın, 2002).

Sağlıklı hücre ve kanser hücresi arasındaki en temel farklardan biri, normal hücreler ortamdaki büyüme faktörlerinin belirlediği sayıya ulaşana kadar bölünüp G0 evresinde geçici bölünme evresinden ayrılırlar. Kanser hücrelerinde ise otokrin uyarımla bölünmeleri için ihtiyaç duydukları büyüme faktörlerini sentezleyebilme yeteneği kazanmışlardır ve bu sayede sınırsız bölünürler (Cooper et al., 2004; Lüleyap, 2008).



Şekil 1.2. Hücrede DNA hasarı ve replikasyon hataları ile beraber kanser oluşumu (Michael et al., 2004)

Özetle, sağlıklı hücrelerin DNA dizisinde meydana gelen hasarlı nükleotitleri normal olanlarıyla değiştirme ya da tamir olması mümkün değil ise hücrenin apoptoz mekanizmasıyla hataları belirleyip ortadan kaldırmaya yönelik çalışan bir sisteme sahiptir. Kontrol noktaları genetik hasarların oluşmasının önüne geçecek hataları saptayarak DNA'nın doğru ve tam eşlenmiş halde döngüye devam etmesine olanak sağlar. Buna karşın kanser hücrelerindeki bağlantı ve sinyal yollarının hasarına rağmen hızlı bir çoğalma ve büyüme söz konusudur.

Bu büyümede başlıca 4 mekanizma rol oynamaktadır (Hanahan, 2000):

1. Apoptoz mekanizmasındaki bozulmalar,

2. Hücrelerin çoğalmasını kontrolsüz şekilde uyanan genetik hasarlar,
3. Tümör süpressör genlerdeki hatalar
4. Tümör anjiyogenezis süreci

Vücutta bazı hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasıyla ortaya çıkan kanserin çeşitli türleri bulunmaktadır. Anormal olarak büyüyen ve çoğalan hücreler bir araya gelerek dokularda tümör oluştururlar. Bu tümörlerin metastaz yapabilme yeteneği dikkate alınarak iki şekilde incelenirler; bening ve malign. Bening tümörler sınırlı büyüme özelliğine sahip ve metastaz yeteneği olmayan iyi huylu tümörler olarak adlandırılırlar. Bu tümörler genellikle yavaş büyür ve köken aldıkları hücrelerin özelliklerini yansıtırlar. Herhangi bir dokuda oluşabilen bu tümörlerin hücre membranı düzenlidir. Malign tümörler ise diğer doku ve organlara çok hızlı metastaz ya da invazyon yapabilmektedir. Aynı zamanda malign tümörler vücutta uzak organ ve dokulara yayılma riski taşıdığı için tedaviyi oldukça sınırlamaktadır (Bertram, 2001; Cooper et al., 2004).

Tümörler meydana geldikleri hücreye göre gruplandırılmaktadır. Bunlar karsinomlar, lenfomalar ve sarkomlardır. Karsinomlar insan kanser türlerinin %90'ını oluşturmakta olup epitel hücrelerden kaynaklı olan tümörlerdir. Lenfoma ya da lösemi, kan ve immun sistem hücrelerinde gelişebilmektedir. İnsan kanserleri içinde %7'lik bir orana sahiptir. Sarkomlar ise kas, kemik ve fibröz doku gibi bağ doku hücrelerinde görülebilen solid bir tümör çeşididir (Cooper et al., 2004).

Günümüzde kanserin oluşum nedenleri hala net olarak bilinmemekle beraber fiziksel, kimyasal, karsinojenler ve viral kaynaklı olabilmektedir. DNA tamir mekanizmasındaki bozulmalar, DNA metilasyonu ve DNA'nın genetik istikrarsızlığı gibi epigenetik faktörler de kanser oluşumunda rol oynamaktadır (Burkitt, 2017). Benzer morfolojileri olan kanser hücrelerinin genetik yapıları ve özellikleri aynı olmayabilir. Bu morfolojik benzerliğe rağmen verilen medikal tedavi bireyden bireye farklı etkiler göstermektedir. Kanser önemli sağlık problemi olup sistemli bir tedavi süreci, kanserin ortadan kaldırılmasında önemli olgulardandır. Kanser oluşumu ve sürecinde farklı mekanizmalar gözlemlendiğinden tedavi sürecinde; kanserin türü, kanserli dokunun konumu ve gelişim süreci, tedavide izlenen yol gibi farklı etmenlere göre farklı tedavi şekilleri tercih

edilmektedir. Günümüzde kanserin tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte, hastanın yaşam kalitesi ve süresi uzamaktadır.

Kanserin tedavisinde radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi, sinyal iletim sistemi inhibitörleri, gen tedavisi, anjiyogenez inhibitörleri ve cerrahi yöntemler uygulanmaktadır. Vücuttaki kanser hücrelerinin teşhisi ile hastaya uygun tedavi şekli belirlenir. Biyolojik yöntemler ve hormon tedavileri ise daha az sıklıkta kullanılmaktadır. Bu yöntemler kanserin evresine ve türüne göre tek başına uygulanabileceği gibi beraber de tercih edilebilir. En yaygın kullanılan tedavi şekli ise kemoterapidir (Mariah-Singh et al., 2018; Wadhawan et al., 2019).

1.2. Kemoterapi ve Kullanılan İlaçlar

Kanser ve tedavisine ilişkin bilinen en eski kaynaklardan biri olan Edwin Smith papirüsü, tahmini olarak milattan önce (M.Ö.) 1600 yıllarında yazılmış ve Mısır'da bulunmuştur (Temel, 2015). Papirüste kanser sözcüğü kullanılmamış olup bu kullanımı Hipokrat'ın hayata geçirdiği düşünülmektedir (Hadju, 2011; Lilienfeld et al., 2011). O dönemden günümüze gelen sürede kanser ve oluşum mekanizmaları ile ilgili birçok varsayım ortaya çıkmış, tedavide yeni gelişmeler kayıt altına alınmıştır. Bu gelişmelerin içinde 20. yüzyıl başlarında kimyasal ilaçların farmakoterapötik kullanımı ile alakalı sistemli çalışmaların başlangıcı ve “kemoterapi” kavramının tanımlanması gelmektedir.

Kemoterapi kelimesi ilk kez Paul Ehrlich tarafından kullanılmıştır. I ve II. Dünya Savaşında İngiltere tarafından kullanılan alkilleyici ajanlar ilk kemoterapötik ilaç sınıfını oluşturmaktadır. II. Dünya Savaşında bu ilaçlara maruz kalanlarda lenfoid hipoplazisi saptanmış ve sonrasında hemotolojik neoplazmalarda bu ajanların uygulanması söz konusu olmuştur (Chu et al., 2001). Kemoterapi, hücresel bölünme hızının çok yüksek olduğu kanser hücrelerini öldürme prensibiyle çalışır. Kemik iliği, kıl folikülleri ve sindirim sistemi hücreleri gibi bazı sağlıklı hücrelere de zarar verip öldürücü olduğu bilinmektedir. Kemoterapi bütün vücutta etkindir, birincil ve ikincil tüm tümörler alanlarını ortadan kaldırır. Bu doğrultuda kullanılan ilaçlar oral, intravenöz, intratumoral ve topikal yollarla vücuda verilebilir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar sadece

uygulandıkları doku ya da hücelere spesifik etkiden yoksundur ve bu nedenle kanser olmayan sağlıklı hücelerde de ciddi hasara sebep olur (Won, 2007). Kemoterapotik ilaçların çoğu, hücre siklusuna bağımlı ve aşırı büyüme hızına sahip kanserli dokulara karşı daha etkin olmaktadır. Bu ilaçların çalışma prensibi ya bir ilaç uygulamasıyla kısıtlı miktarda hücre öldürerek faza özgüdür ya da hücre siklusundan bağımsızdır. Daha çok kanser hüceleri üzerinde yoğunlaşan bir etkiye sahip olan kemoterapi ilaçları ‘anti kanser’ ilaçlar olarak da tanımlanmaktadır. Uygulanan kemoterapinin amacı kanser türüne göre farklılık gösterebilmektedir. Tedavide başlıca amaç; varolan kanser türünü tedavi etmek, kanserli hücre veya dokunun büyüüp yayılmasının önüne geçmek ve hastanın hayat kalitesini iyileştirmek şeklindedir. Farklı mekanizmalar ile vücutta iş görebilen bu kemoterapi ilaçları alopesi (saç dökülmesi), kemik iliğinin baskılanması gibi birçok yan etkiye neden olabilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların etki mekanizmaları göre;

- DNA işlevini bozarak etki gösteren grup,
- DNA-RNA sentezinde bu moleküllerin yerine geçerek etki gösteren grup,
- Hücre yapısındaki serbest elektronlara kovalent bağlanıp etki gösteren grup,
- Mikrotübüllerin polimerize ve depolimerize formları arasındaki bağlantıyı bozarak etki gösteren grup,
- Hormon uyarısı ile sitoplazma reseptörlerine bağlanıp büyüme ve gelişme hızını azaltarak etki gösteren grup şeklinde sıralanabilir (Wong, 2007).

Tablo 1.1. Kemoterapide kullanılan fonksiyonel gruplar ve ilaçlar

Antimetabolitler	Antibiyotikler	Alkilleyici İlaçlar
Sitarabin	Bleomisin	Korbustin ve Lomustin
Fludarabin	Daktinomisin	Siklofosfamid
5-florourasil	Doksorubisin	Mekloreタミン
6-merkoftopürin	Plikamisin	Streptozotosin
Metotraksat		Karboplatin
6-tiyoguanin	Steroid Hormonlar ve Antagonistler	
	Aminoglutemidler	
Mikrotübül İnhibitörleri	Flutamid	
Novelbin	Prednizon	
Paklitaksel	Löprolid	
Vinblastin		

Tabloda verilen ilaçlarla beraber tüm kemoterapötiklerin sadece malign tümörleri etkilemesi amaçlanır. Ancak kullanılan bu ilaçlar spesifik olarak kanser hücrelerine etki etmemekte ve aynı zamanda proliferen olan tüm sağlıklı hücrelere de zarar verebilmektedir (Hitchings, 2001).

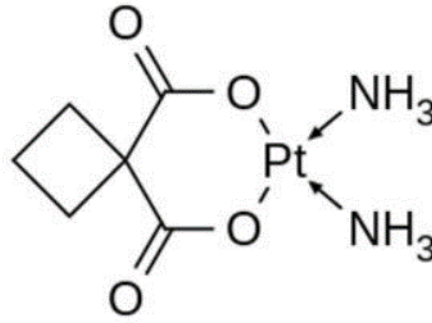
1.2.1. Karboplatin

Karboplatin, cisplatin bağımlılığına karşı geliştirilen, hücresel bölünme ve gelişmeyi engelleyen (antineoplastik) bir kemoterapi ilacıdır (Ruggiero et al., 2013). İkinci jenerasyon platin grubundan olan bu kemoterapötüğün kimyasal yapısında cisplatinden farklı olarak platinum atomu etrafında siklobütan-dikarboksilat grubu bulunmaktadır. Bu durum molekülün suda daha hızlı çözünmesini ve hidrolizinin daha yavaş olmasını sağlar (Van der Vijgh, 1991).

Antineoplastik bir ilaç olan karboplatin, hücrenin bölünmesini ve gelişimini engelleyici şekilde çalışır. Kanser hücrelerinin çoğalmasına engellediği gibi zincirler arası DNA çapraz-bağlanma oluşturarak DNA'nın işlevini bozar. Bu durum hücre döngüsünde spesifik olmayan bir etkidir. Bunun sonucunda karboplatin kanser hücrelerinin vücuttaki gelişimlerini ve yayılımlarını yavaşlatır. Karboplatin, DNA sarmalindeki guanin bazları ile çapraz bağlanıp tümörün büyümesine engel olur. Bu durum sonucunda hücre çoğalma ve büyüme işlevini yitirir (Unger, 2009).

Karboplatin, içerdiği platin grubu ile kromatin içerisindeki DNA'ya bağlanıp DNA'nın nükleozom yapısının yeniden düzenlenmesini sağlamaktadır. Platinyumun nükleozom yapısına uygunmuş gibi davranmasına karşın aslında DNA'nın yapısını bozarak kanser hücrelerinin büyümesini, gelişmesini ve çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (Chen, 2010).

Karboplatin; hepatoblastom, retinoblastom, yumurtalık kanserleri, bazı beyin kanseri türlerinde, akciğer kanseri gibi kanserlerin tedavisinde kemoterapötik olarak kullanılmaktadır (Ruggiero, 2013).



Şekil 1.3. Karboplatin'in yapısı (Rose, 2008)

Kemoterapi ilaçlarının yaygın kullanımı ve artan doz miktarı birçok organ toksisitesine sebep olmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların olumsuz etkileri birçok çalışma ile gösterilmiştir. Platin grubu ilaçlarda sık karşılaşılan yan etkiler nötropeni, kemik iliği baskılanması ve anemidir (Gebbia et al., 2008). Karboplatinin böbrek ve karaciğerde yüksek düzeyde organ toksisitesi yapabildiği, periferel nörotoksositeye yol açtığı bilinmektedir (Chabner et al., 1996). Bu kemoterapötüğün mide epitel hücreleri üzerindeki etkisi, böbrek toksisitesi ve nörotoksitesisi diğer platin grubu ilaçlara göre daha az olmakla beraber trombosit düzeyini düşüren (Salmon et al., 1995), pulmoner toksisite (Kayaalp et al., 2000), alopesi (Carles et al., 2000), mukozit (Welborn et al., 1995), halüsinasyon (Chu et al., 1993) ve kanlı idrar yolu enfeksiyonlarına (Ettinger et al., 1993) sebep olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Ettinger ve arkadaşları (1986), karboplatin uygulanan rekürren ALL'li çocuklarda karaciğer ile böbrek fonksiyonlarının bozulmasını nadiren gözlemlemişler, ancak Welborn et al., refrakter AML'li yetişkin hastalarda karboplatin uygulamasının sonucunda bunlardan fatal seviyede toksisite ortaya çıktığını, bu hastaların intraserebral kanama, enfeksiyon, karaciğer ve böbrek yetmezliği sebebiyle öldüğünü rapor etmişlerdir.

Kemoterapide kullanılan bu ilaçlar, hücrelerde mitozu bozarak etkisini göstermektedir (Moschovi et al., 2015; Tanha et al. 2016). Hücrelere verdikleri bu zarardan dolayı 'sitotoksik' olarak tanımlanmaktadır (Clegg et al., 2002). Verdiği bu zarar sağlıklı hücreler üzerinde çeşitli farklılaşmaya ve işlevsel bozulmalara sebep olmaktadır.

Kemoterapide kullanılan ilaçlarının her zaman beklenen iyileşmeyi sağlaması mümkün olmayabilir. Kemoterapi ilaçları hastanın bağışıklık sistemine etkisinden ötürü, tedavi esnasında hastanın diğer hastalıklara karşı direnci düşmektedir (Jemal et al., 2006). Platin grubu bir kemoterapötik olan karboplatin, yutulduğunda zehirlidir ve teneffüs etme veya deri ile temasında toksik etki yaratabilirken üreme kusurlarına da sebep olabilmektedir. Karboplatin ve türevi kemoterapi ilaçları böbrek ve karaciğer gibi organlarda ciddi hasarlara yol açsa da kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Hastanın hayat kalitesini arttırmak ve tedavinin seyrini olumlu etkilemek için organ hasarını minimum düzeyde tutabilmek önemlidir. Bu doğrultuda kemoterapötiklerle kombine kullanılan kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) ile hücre hasarı minimum düzeye düşürülüp antitümöral etki çalışmaları yapılmaktadır (Rizk et al., 2009). Çalışmalar gösteriyor ki, KZYA'leri antioksidan ve antikanser bileşik üretiminden dolayı kanser hücrelerine karşı birer biyoterapötik alternatifi olarak kullanılabilir (Darendelioğlu et al., 2017).

1.3. Apoptozis

Gelişmiş canlılarda hücrelerin kendi otonom sistemleri ile ihtiyaç duyulmayan ve aktivitelerini yitirmiş hücrelerin yok edilmesi apoptozis olarak adlandırılır (Cohen, 1998). Canlı sistem sürekli bir döngü halindedir. Bazı hücreler sentezlenirken bazı hücreler ise apoptozise uğrar ve bu şekilde döngü devam eder. Dolayısıyla apoptozis enerji ihtiyacı duyan ve canlıda var olan iç dengeyi koruyabilen bir faaliyettir (Coşkun et al., 2011). Apoptozun organ büyüklüklerinin korunmasında, iç dengeyi sağlamada ve tamir süreçlerinde nitelikli işlevleri vardır (Sjöström et al., 2001). Canlı organizmalarda birçok hücre her saniyede vücuttan uzaklaştırılırken bunların yerine yenileri gelmektedir. Apoptozis ile hücre yıkımı gerçekleşirken mitoz ile hücre yapımı gerçekleşmektedir ve bu şekilde kontrollü bir denge sağlanmıştır (Erdoğan et al., 2003).

Birbiri ardına gelen olaylar dizisi olan apoptoz, hücre içinden veya dışından gelebilecek sinyaller ile başlatılır.

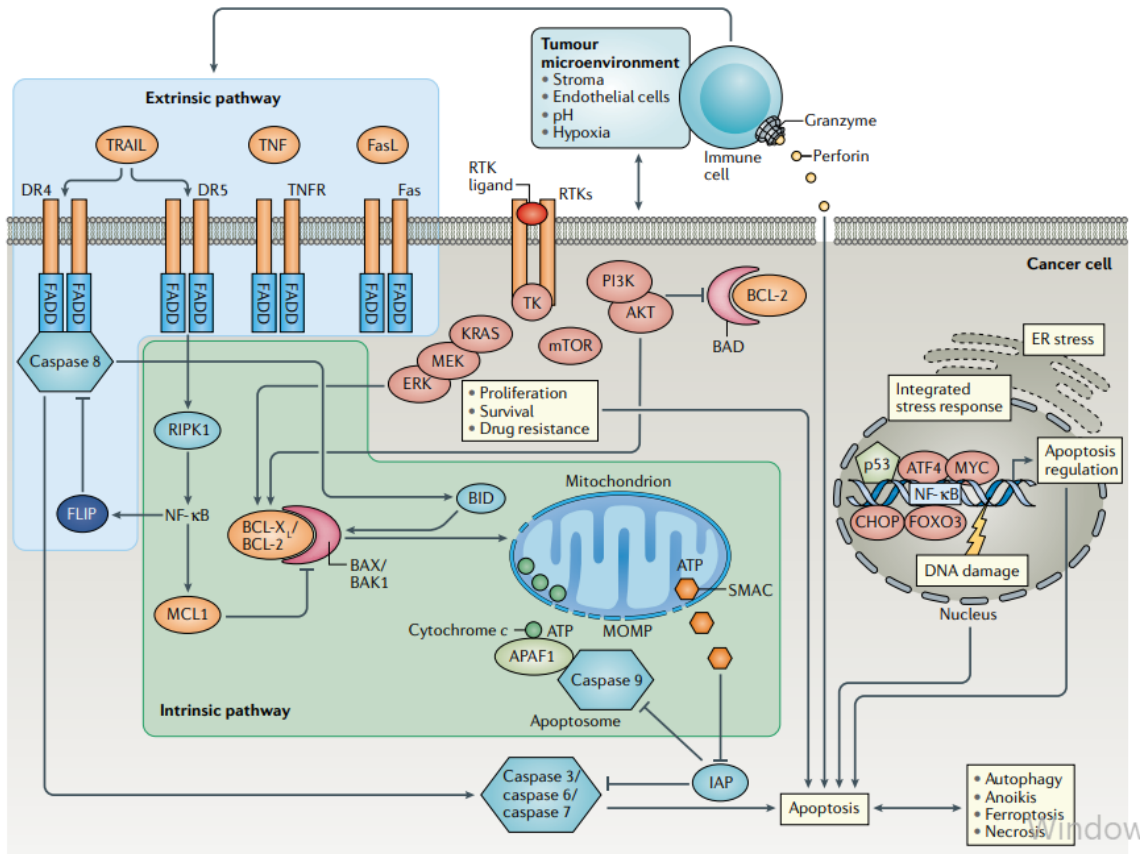
Bu olaylar dizisi;

- ◇ Apoptozun başlaması,
- ◇ Hücre için proteaz (kaspaz) aktivasyonu,

- ◇ Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,
- ◇ Fagositoz.

1.3.1. Mitokondri /sitokrom-c aracılı apoptozis

Mitokondri mevcut hücrel faaliyetlerinde ATP sentezi için sitokrom-c bulundurur. Mitokondrial stres halinde sitokrom-c serbest forma geçerek apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol oynar (Crowe et al., 1997; Lou et al., 1998; Li et al., 2000; Lu et al., 2000; Takagi et al., 2003). Apoptotik proteaz aktive edici faktörler olan Apaf-1 ve kaspaz-9 mitokondri aracılığıyla bulunmaktadır (Liu et al., 1997; Hu et al., 1999; Krajewski et al., 1999). Prokaspaz-9'un aktivasyonu, sitokrom-c ve Apaf-1 kofaktörünün aktive edilmesinin ardından gerçekleşmektedir. Aktive edilen kaspaz-9 ardından kaspaz-3'ü aktive ederek, diğer kaspazların aktivasyonunu sağlar (Krajewski et al., 1999; Keane et al., 2001). Hücredeki mitokondrinin dış membranında Bcl-2 proteini bulunmaktadır (Newton et al., 1998; Choi et al., 2001). Bcl-2 proteini mitokondride çatlaklar oluşturarak Apaf-1 ve sitokrom-c salınımına neden olur. Bu şekilde proteinler kaspaz-9 moleküllerine bağlanır (Hu et al., 1999; Krajewski et al., 1999; Takahashi et al., 1999). Kaspaz-3 terminal uç olması, bu proteolitik aktivite ile kromozomal DNA'nın bozulmasını, sitoplazmada bazı proteinlerin sindirimini ve hücrel fagositozun gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Newton et al., 1998; Nakatsuka et al., 1999; Takagi et al., 2003).



Şekil 1.4. Hücrenin apoptozise uğramasını sağlayan iç yolak ve dış yolak (Benedito et al., 2020)

1.4. Laktik Asit Bakterileri ve Kısa Zincirli Yağ Asitleri

1901 yılında Beijerrick tarafından tanımlanan *Lactobacillus* cinsinin 135 tür ve 27 alt türü bulunmaktadır. Laktik asit bakterileri ilk olarak süttten izole edilmiştir (Sandine et al., 1997). Düşük C+G içeriğine sahiptirler. Karbonhidrat fermentasyonunun son ana ürünlerinden olan laktik asidi sentezleyen bu bakteriler katalaz negatif, Gr (+), spor oluşturmayan, çubuk, kok ya da kokabasil şeklinde bulunmaktadır (Ahrne et al., 1998; Turantaş et al., 1998). Morfolojik olarak belli şartlar altında spiral form oluşturabildikleri gibi çoğunlukla düz çubuk şeklindedirler. Taksonomik olarak *Firmicetes* şubesinin *Bacilli* takımının *Lactobacillales* cinsindedir (Wright et al., 2011). Optimum çalışma sıcaklığı 37-45 derece iken 70 derece üzerinde canlılıklarını yitirirler (Marteau et al., 2001). Laktik asit bakterileri metabolik yollarına göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki gruba ayrılır. Laktik asidi son ürün olarak üreten homofermantatif bakterilerin birincil metabolik yolu glikozistir. Heterofermantatif bakteriler metabolik süreçte laktik aside

ilave olarak karbondioksit ve aseton ya da etanol üretilmektedir (De Vuyst et al., 1999). Anaerobik şartlarda gelişen laktik asit bakterilerinin oksijen hassasiyeti bulunmamakla beraber oksijen varlığında da gelişim gösterebilir. Bu özelliğinden dolayı aerotolerant anaerobik organizmalar olarak tanımlanmaktadırlar (Stiles et al., 1997). Bu bakterilerin hücre yapısında çekirdek elemanları, sitoplazmik membran, ribozomlar, hücre membranı ve çoğunda en az bir tane plazmid bulunmaktadır. Ekzopolisakkarit ve antimikrobiyal madde üretimi bu plazmidlerce gerçekleştirilir (Brenner et al., 2005).

Alt ve üst kenarları düzgün, çubuk şeklinde, uçları yuvarlak hücrelere sahip olan *L. plantarum* bakterileri, tek ya da kısa zincirli halde bulunmaktadır. Sınırlı glikoz varlığında sahte katalaz özelliği göstermektedir. Gelişimi için niyasin ve kalsiyum pantonetata ihtiyaç duyar.

Fakültatif heterofermantatif bir laktik asit bakterisi olan *L. plantarum*, fermente sebzeler, et, süt ve sindirim sistemi gibi çeşitli alanlarda bulunmaktadır. Lactobacilluslar içinde en baskın türü oluşturan bu bakteriler kullanım alanı açısından 80'den fazla tür içermektedir. İnsan sindirim sistemi gibi ekstrem şartlarda bile canlı kaldığı bilinmektedir. *L. plantarum* bakterilerindeki düzenleyici genlerin sayıca fazla olması farklı ortamlara hızlıca uyum sağlamasını kolaylaştırmaktadır. *L. plantarum*'un benzoik asit, mevalonik asit lakton ve metilhidantoin maddelerini ürettiği bilinmektedir (Helander et al., 1997). *L. plantarum*, laktik asit ve etanol veya asetik asit üretmek için karbonhidratları fermente eden fakültatif heterofermantatif bir bakteridir. Sentezlediği organik asitler ile bulunduğu ortamın pH'sını düşürüp asidik koşullara duyarlı olan bakterilerin gelişimini inhibe etmektedir. Düşük pH'da organik asitler çözünür duruma gelerek hücre zarından geçebilir ve hedef mikroorganizmaların sitoplazmasına ulaşabilirler (Haller et al., 2001). *L. plantarum* bakterileri ile heterofermantatif şekilde sentezlenen asetik asit ve propiyonik asit hücre zarı ile etkileşime girebilir ve hücre içi asitleşmeyle protein hasarına sebep olabilmektedir (Urga et al., 1992).

Gliserolü fermente edebilen *L.pentosus* uçları yuvarlak, çubuk şeklinde hücrelere sahiptir. Bu bakteri hücreleri tek, çift ya da zincir halinde bulunabilmektedir. Gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerob ve heterofermantatif özelliktedir. L-laktik ve D-laktik asit

üretir. *L. plantarum* bakterilerine fenotipik olarak benzemektedir. *L. plantarum*'a karşın ayırt edici özellik olarak D-ksiloz ve gliserolden asit üretebilme kabiliyetinden bahsedilebilir (Zanoni et al., 1987). Atık sular, fermente zeytinler ve mısır silolarından izole edilmektedir (Axelsson, 2004; Magnusson, 2003; Zanoni et al., 1987).

Laktik asit bakterileri olarak adlandırılan laktobasiller, tüm enerjilerini homolaktik fermentasyon sırasında glukozu laktata dönüştürürken temin ederler. Kullanılan glukozun %85-90'ı laktik aside çevrilirken ATP oluşumu ise nonoksidatif substrat düzeyindeki fosforilasyon ile gerçekleştirilmektedir (Altermann et al., 2005). Laktik asit bakterileri fermente gıda ürünlerinde, sütte, insan ve hayvan bağırsağında bulunur. Bitki, hayvan ve insanların bulunduğu ortamlarda laktik asit bakterilerine daha çok rastlanmaktadır. Toprakta ve suda hemen hemen hiç bulunmayan laktik asit bakterileri katalaz üretmez ve nitrat redüksiyonu yapamaz (Leroy et al., 2004). Asetik asit, laktik asit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üreten bu bakteriler, bağırsağın mikroflorasını ürettikleri bu maddelerle dengede tutar. Laktik asit bakterileri karbonhidratın fazla olduğu yerlerde bulunmayı tercih etmektedirler. Karbonhidratların metabolize edilmesiyle ortaya çıkan ürünler ortamın asiditesini arttırmakta ve bu şekilde bir antimikrobiyal etki oluşturmaktadır. Bazı laktik asit bakterilerinin sahip olduğu antiinflamatuvar ve antikanser özelliklerinin yanında tedavi edici özelliğinin de olduğu bilinmektedir (Ljungh et al., 2006). Homofermentasyon ile altı karbonlu şekerlerden laktik asit üreten *Lactobacillus* cinsi, heterofermentasyon ile aynı miktarda asetik asit, laktik asit ve karbondioksit üretmektedir. Laktik asit ve asetik asit gibi zayıf asitler buldukları ortamda pH'ı düşürüp patojen mikroorganizmaların gelişimi ve yaşamını sınırlandırmaktadırlar (Ouweland et al., 2004).

Laktik asit ve asetik asit düşük pH değerlerinde güçlü antimikrobiyal etki gösterir bilinmektedir (Theron et al., 2011). Az miktarda üretilen propiyonik asitle çözünürlüğü fazla olan asetik asit ortam pH'ı belirli bir seviyedeysen laktik aside göre daha kuvvetli bir antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir. Dolayısıyla maya, küf ve bakterilere karşı propiyonik asit ve asetik asit etkinliği daha fazladır. Sindirilmemiş şekerin ve diyet lifinin bağırsak bakteri florası ile gerçekleştirilen fermentasyonun son ürünü olan kısa zincirli yağ asitleri (Schnürer et al., 2005), 1-6 karbon atomuna sahip organik yağ

asitleridir. İki karbon atomlu asetat, üç karbon atomlu propiyonat, dört karbon atomlu bütirat, beş karbon atomlu valerat ve altı karbon atomlu kaproat, bağırsak mikrobiyotasına göre farklı miktarlarda üretilmektedir (Van Nuenen et al., 2003).

Asetat pek çok bakteri tarafından sentezlenebildiği gibi KZYA'ların büyük bir kısmını oluşturmakta ve üretilen asetik asit bütirik asit yapımında da kullanılmaktadır (Duncan ve ark, 2005). Propiyonik ve bütirik asit sentezi ise özel bakteri grupları tarafından gerçekleştirilir (Raman et al., 2016).

İnce bağırsakta sindirilmeyen karbon kaynaklı enerjinin kurtarılması KZYA üretiminde esas alınmaktadır (Hamer, 2009). Roediger 1980' lerin başında KZYA'nin kolonositlerin beslenmesinde aktif bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir (Roediger, 1980).Yapılan çalışmalardan bir diğerinde kolit tedavisinde KZYA'nin terapotik etkisi rapor edilmiştir (D'Argenio et al., 2007).

Tüketilen karbonhidrat ve türevlerinin çoğu ince bağırsakta emilmekte ve kolonda anaerobik bakteriler aracılığıyla KZYA'ne çevrilmektedir (Levitt 1983). Bağırsak florasındaki bakterilerin, farklı şekillerde sentezlenen KZYA'ların çeşitlerininin yanı sıra miktarlarını da etkilediği düşünüldüğünde (Scheppach et al., 1992), bağırsaktaki flora dengesizliği KZYA metabolizmasında önemli miktara zarar oluşturduğu bilinmektedir (Clausen, 1992). Bu KZYA'lar, gastrointestinal sistemdeki hastalıklar, kanser ve kalp hastalıklarının oluşma riskini azaltabilir (Wong et al., 2006).

1.4.1. Laktik asit

Suda çözünebilen laktik asit zayıf bir organik asittir. Gudalarda koruyucu, lezzet ve aroma verici olarak kullanılmaktadır. Laktik asit hem gıdalarda doğal olarak bulunmakta hem de fermentasyon esnasında mikroorganizmalarca sentezlenebilmektedir (Narayanan et al., 2004; Theron et al., 2011). Laktik asidin D ve L izomerleri bulunmaktadır (Akın, 1997). Şekerin fermentasyonu ile çeşitli laktik asit bakteri türleri laktik asidin D (-) ve L (+) izomerlerinden birini üretebildiği gibi, ikisini de farklı miktarlarda da olsa üretebilmektedir.

Laktik asitte antimikrobiyal etki konfigürasyonuna bağlı şekilde değişebilmektedir. L (+) izomeri *Escherichia coli* türüne karşı D (-) izomerine göre daha etkili sonuç verirken, D (-) laktik asidin *Listeria monocytogenes*'a türüne karşı daha etkili olduğu gösterilmiştir. Laktik asidin iki izomeri karşılaştırıldığında hücre zarından geçişleri arasında herhangi bir farklılık olmadığı ve bakteri suşlarının sentezledikleri izomere karşı daha az hassasiyetleri olduğu gösterilmiştir (Theron et al., 2011).

1.4.2. Fenillaktik asit

Fenillaktik asit bir organik asit olup, fenialaninin yan ürünüdür. Antimaya, antifungal ve antibakteriyal özelliği bulunmaktadır (Mu et al., 2009). Birçok LAB türü tarafından üretilmekte ancak en uygun miktarın *L. plantarum* tarafından üretildiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, antifungal ve antimaya özelliğinde *L. plantarum* 21B ve MiLAB 17 393 suşları tarafından üretildiği gösterilmiştir (Rodriguez et al., 2012; Ström et al., 2002).

1.4.3. Asetik asit

LAB türlerinde şekerin metabolize edilmesi ile asetik asit üretilmektedir. Çeşitli gruplara karşı inaktivasyon özelliği bulunmaktadır. Düşük pH'ta etkili çalışmaktadır. Çözünürlük seviyesi laktik aside göre daha yüksektir. Bu nedenle belirli bir pH seviyesinde, çözünmemiş haldeki asetik asit miktarı fazla olabilmektedir (Ouweland et al., 2004).

1.4.4. Propiyonik asit

Hetero-fermentatif laktik asit bakterileri tarafından eser miktarlarda üretilmektedir. Diğer bakterilere oranla daha kuvvetli anti-mikrobiyal özellik göstermektedir. Anti-mikrobiyal özelliği, bu yağ asidinin gıda ürünlerinde yenabilir kaplama veya film olarak kullanılmasına olanak tanımaktadır. Hayvan yemlerine eklenerek karkasta bulaşımı azalttığına dair çalışmalar da mevcuttur (Theron et al., 2011) Propiyonik asit bakterileri çubuk şeklinde, mikro-aerofilik veya anaerobik gelişim gösterebilen Gram (+) bakterilerdir (Deborde, 2002).

1.4.5. Bütirik Asit

Dört karbon atomuna sahip kendine özgü kokusu olan bir karboksilik asittir (Lehninger et al., 1993; Widmer et al., 1996; Bilgin vd., 2014). Sütte bulunan bütirik asit ‘tereyağı asidi’ olarak da tanımlanır (Bilgin et al., 2014). Bütirik asit, asetik asit ve propiyonik asidin aksine kolonda tamamen emilen tek KZYA’dır (D'Argenio et al., 2007).

Bütirik asit, UZYA’ların asetil-CoA’ ya bağlı katabolik oksidasyonu sonucu üretilmektedir (Widmer et al., 1996, Lehninger et al., 1993). Hayvan metabolizmasında doğal bir bileşen olan bütirik asit, kolon epitel hücreleri için önemli bir enerji verici materyal olarak karşımıza çıkmaktadır (Jacobs, 1986; Roediger, 1981; Pouillart, 1998; D'Argenio et al., 2007). Mitokondride CO₂ ve As-CoA'ya oksidasyon yoluyla dönüştürülmesi ile hızlı bir şekilde emilimi gerçekleştirilir ve metabolize edilir (Gasbarroni et al., 2007).

Bütirik asit birçok hastalığın ve patolojik durumun iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Kumar, 2002). Kolon kökenli bir çok hastalık, kalın bağırsaktaki düşük bütirik asit miktarları ile karakterizedir (Spina et al., 2007). Kolon epitel hücreleri tarafından bozulmuş bütirik asit emilimi, bağırsaktaki farklı fizyopatolojik durumlarla ilintilidir (Smith et al., 1998). Yapılan çalışmalar bütirik asitin insan kolon sağlığı üzerinde bir çok faydalı etkilerini ortaya koymuştur (Hamer, 2009).

1.5. Antimikrobiyal Aktivite

DSÖ tarafından probiyotikler, taşıyıcısında belli bir miktar bulunduğu faydalı etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Leroy et al., 2008). Probiyotik bakteriler bağırsak mukozasında yaşayan canlılardır. Probiyotik kelimesi bugün kullanıldığı anlamı ile ilk kez Parker tarafından 1974 yılında kullanılmıştır (Yiğit, 2009). Mukozal ve sistemik bağışıklığı düzenleyerek buldukları organizmayı etkilemektedirler. Sağlıklı bir insan vücudunda probiyotik mikroorganizma florası bulunur (Timmerman, 2004). Probiyotik bakterilerin etki gösterebilmeleri için gastrointestinal sistemde ve epitel hücre duvarlarında koloni oluşturmaları gerekmektedir.

Probiyotik bakteriler mukozadan salgılanan mukus içerisinde çoğalmaktadır. Sindirim sistemi kanallarında bu bakterilerin canlı kalabilmeleri için sindirim enzimlerine ve safra tuzuna dayanıklı olması gerekir (Kahraman, 1993). Probiyotik bakteriler bağırsak duvarına tutunarak, zararlı etkenlerin içeriye girmesini engeller (Gönülateş, 2000). Kolonize olan probiyotiklerin sentezlediği antimikrobiyal maddeler bağırsak yüzeyini zararlı etkilerden koruyabilir (Turabian, 1996). İnsan sindirim sistemi mukoz dokularındaki çalışmalarda, zararlı *E. coli* ve *Salmonella* türlerinin sindirim sistemi dokularında tutunma yeteneğini probiyotik bakterilerle yaptığı rekabet sonucu yitirdiği görülmüştür. *Lactobacillus GG* ve *L. rhamnosus* türleri hastalık yapıcı mikroorganizmaların sindirim sistemi dokularına tutunmasını engellediği görülmüştür (Tuomola, 1998). Probiyotik bakteriler bağırsak yüzeyine yerleşerek hastalık yapıcı bakterilerin tutunmasını engellemekte ve ürettikleri antimikrobiyal maddelerle bu zararlı bakterilerin çoğalmalarının önüne geçmektedir. Probiyotik bakterilerdeki laktik asit, hidrojen peroksit ve antibiyotik gibi maddelerin üretimi bu bakterilerin antimikrobiyal etki göstermesini sağlamaktadır. Laktik asit bakterilerinden *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri bu mikroorganizmaların en yaygın kullanılan gruplarından olup insan bağırsak florasının da en önemli bileşenlerindedir (Kayaoglu, 2005). Bunların yanında bazı bakteri türleri, maya ve küf türleri de probiyotik olarak kullanılmaktadır (Ljungh et al., 2006).

Antimikrobiyal aktivite, probiyotikler için en önemli tercih kriterlerinden biridir. Antimikrobiyal aktivite enterik, istenmeyen ve patojenler üzerinde etkilidir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri farklı yollar ile oluşabilmektedir (Quwehand et al., 2004).

Bu tez çalışmasında *L. plantarum* ve *L. pentosus* türlerinden elde edilen bazı KZYA'nin antimikrobiyal ve karboplatin ile indüklenmiş insan nöron hücrelerinde (SH-SY5Y) koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatürde yapılan bir çok çalışmada; probiyotik gıda ürünlerinin bağışıklık sistemini uyardığını, serum kolesterol seviyelerini düşürdüğünü, laktoz intoleransını önleyebildiğini, ishal vakalarının miktarını azalttığını, enfeksiyonları kontrol ettiğini, antibiyotik etki gösterdiğini, tümörleri küçülttüğünü ve farklı kanser türlerine karşı koruma sağladığını gösteren veriler bulunmaktadır (Scheinbach, 1998; Corliss et al., 2013).

Farklı bir çalışmada ise *L. rhamnosus* ve *L. casei* içeren fermente sütün karaciğeri koruyucu özelliklerini analiz etmek amacıyla AFB1 uygulanan sıçanların klorofilin antioksidan maddesiyle birlikte veya sadece fermente süt verilme sureti ile oluşturulan gruplarda biyokimyasal ve hepatopatolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Fermente sütün tek başına veya klorofilin ile birlikte TBARS miktarlarını azaltarak ve bunun yanı sıra bazı antioksidan enzimlerin (glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon-S-transferaz) aktivitelerini arttırdığı ve bu sayede önemli bir hepato-protektif etkide bulunduğu gösterilmiştir (Kıray vd., 2015).

Bir çalışmada *Lactobacillus reuteri*'nin luminal histamin üretimini stimule ederek kolorektal kanserini kısmen engelleyebildiği rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada histamin üreten probiyotikler aracılığıyla kolon tümörlerinin sayısında azalma ve tümör boyutlarında küçülme gözlenmiştir (Gao et al., 2017).

B. longum diyetinin deney hayvanlarının, karaciğerde meydana gelen kanser oluşumunu ve tümörlerin çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Reddy et al., 1993). MCF-7 meme kanseri hücreleri ile gerçekleştirilmiş bir diğer çalışmaya göre ise, *Bacillus subtilis*'in ürettiği surfakin maddesinin, meme kanseri hücrelerinde anti-kanser aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Lee et al., 2012).

KZYA'lar kolon kanserinin engellenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. KZYA'nin, özellikle bütiratın, kolon kanseri üzerindeki olumlu etkileri bilinmektedir (Raman, 2016).

Bütiratın kolon kanserine karşı iyileştirici etkileri olduğu yapılan çalışmalar neticesinde ortaya konmuştur (Willims et al., 2003). Bütirik asidin hücre çekirdeği üzerinde değişiklik yapabilme gücü ve kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu indüklenme özelliği detaylı bir şekilde çalışılmıştır. Söz konusu çalışmalarda bütiratın kolorektal kansere karşı yararlı olduğu gösterilmiştir. Bütiratın, çeşitli doku türlerinde apoptozu indüklediği bildirilmektedir (Smith et al., 1998). Bütiratın kolorektal tümör hücre dizilerinde apoptozu indüklenme yeteneğinin asetik asit ve propiyonik asitten daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Hague, 1995; Scheppach, 1995). Bütirat bu etkilerinin yanı sıra kanser hücrelerinde immünojenisiteyi de uyarmaktadır (Perrin et al., 1994). Düşük miktarlarda bile bütirik asidin kolon kanser hücrelerine karşı sito-toksik etkide bulunduğu ortaya konmuştur (Augeron et al., 1984; Berry et al., 1988).

Yine yapılan bir çalışmada, *L. reuteri*'den izole edilen KZYA'nin, kolon kanser hücrelerinde (HT-29) hücre ölüm oranının yanı sıra ROS ve LPO üretimini arttırdığı, KZYA ile tedavi edilen kolon kanseri hücrelerinde Bcl-2 düzeylerini azalttığı, sitokromun c ve kaspaz-3 miktarlarını artırdığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında *L. reuteri* den elde edilen KZYA'nin insan kolon kanseri hücrelerinde sitotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Darendelioğlu vd., 2017).

Altinkılıç (2013), tarafından yapılan bir çalışmada içeriğinde *Lactobacillus plantorum* ve benzer bakteri türlerini de barındıran kefirin, DNA hasarını önleyerek ve aynı zamanda KZYA üretiminin artışı sağlayarak kanserli hücrelerde apoptozu hızlandırdığı ve böylece anti-kanser etki sağladığı rapor edilmiştir.

Benzer şekilde içeriğinde bol miktarda lactobacillus türü barındıran kefirin kullanımı anti-apoptotik Bcl-2 salınımını azaltırken, apoptotik Bax aracılığıyla apoptozu indüklemektedir (Sharifi et al., 2017).

Askorbik asit ve alfa tokoferolün uygulandığı hastalarda söz konusu vitaminlerin karboplatinden kaynaklanan karaciğer hasarını engellediği rapor edilmiştir ve bu vitaminlerin doku koruyucu etkisinin kuvvetli antioksidan özelliklerinden kaynaklı olduğu bildirilmiştir. Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada CCl4 ile oluşturulan

karaciğer hasarı üzerine uçucu yağların karaciğeri koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Özbek vd., 2000). Bir diğer çalışmada ise uçucu yağların antioksidan özelliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir (Ruberto et al., 2000). Bunlara dayanarak uçucu yağların karboplatine bağlı karaciğer toksisitesini önleyici ve azaltıcı etkisi antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin antioksidatif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Laktik asit bakterilerin süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksidi indirgeme özelliği ile antioksidan etki göstermektedir. LAB'lerin hidroksil radikalini indirgeyici bazı bileşenler sentezleyebildiği düşünülmektedir (Virtanen et al., 2007).

Yapılan çalışmalar, farklı türlerin çeşitli antimikrobiyal maddeler sentezlediğini göstermektedir. Bu maddeler: İnsan ve birçok hayvan mikroflorasında bulunan *Lactobacillus reuteri*, düşük molekül ağırlıklığına sahip antimikrobiyal madde reuterinini üretirken; *Lactococcus lactis*'in alttürleri bir sınıf I bakteriosin, nisin A üretmekte; *Enterococcus faecalis* DS16, bir sınıf I bakteriosis sitolizi üretirken; *Lactobacillus plantarum* bir sınıf II bakteriosin plantarisin S üretmekte; *Lactobacillus acidophilus* bir sınıf III bakteriosin acidophilucin A üretmektedir (Quwehand et al., 2004). Bakteriyosinlerin üretimi, mikroorganizmaların türlerinden, içeriklerinden ve çeşitli ortam şartlarından etkilenmektedir (Çakir, 2003). İnsandaki ileumdan izole edilen *Lactobacilli* ve *Bifidobacteria*, bir dizi indikatör mikroorganizma, *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* ve *Lactococcus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ortaya konmuştur (Filho-Lima et al., 2000).

Diğer bir çalışma ise, Burkina Faso fermente süttten sekiz adet laktik asit bakterisi izole edilip ve *Enterococcus faecalis* 103907 CIP, *Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Escherichia coli* 105182 CIP'ye test bakterilere karşı antimikrobiyal etkilerinin incelenmesidir. Bu süttten izole edilen; *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* suşlarının test edilen bakteriler üzerinde farklı çaplarda inhibisyonu

gösterilmiştir. *Lactobacillus fermentum* (S1) suşun *Enterococcus faecalis* üzerinde yüksek inhibisyon etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Bsadjo-Tchamba et al., 2014).

De Angelis vd. (2006), yaptıkları bir çalışmada peletlenmiş potansiyel probiyotik laktobasil suşlarından olan; *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. mucosae*, *L. rossiae* suşları, *Salmonella typhimurium*'a ATCC 27164, *E. coli*, *C. perfringens* 22G, *S. aureus* ATCC 25923, *B. megaterium* F6, *L. innocua* DSM 20649 ve *B. hyodysenteriae* ATCC 27164 test bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Verilen bakterilerin bütün test grubunda patojenleri inhibe ettiği yapılan çalışma ile ortaya konulmuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Deneyleerde kullanılan tüm materyaller ve kimyasallar, saf ve steril bir şekilde tedarik edilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve materyaller

Kimyasal, Reaktif ve Materyal adı	Firma
Laktik asit	Sigma-Aldrich
Bütirik asit	Sigma-Aldrich
Propiyonik asit	Sigma-Aldrich
Sodyum klorit	Sigma-Aldrich
Dulbecco's modified eagle medyumu (DMEM)	Bio West
Fötal sığır serumu (FBS)	Biological Industry
MRS sıvı besiyeri	LABM Company
Tripsin	Biological Industry
Tris base	Sigma-Aldrich
Etilenediaminetetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
Hidrojen peroksit	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik asit (TCA)	MERCK
2-tiyobarbiturik asit (TBA)	ACROS
Malondialdehit bis	Sigma-Aldrich
DNA izolasyon kiti	G-Dex
Etidyum bromit	Sigma-Aldrich
Gliserol	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Agaroz	Sigma-Aldrich
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich
Primerler (Bax, cas 3, cas 8, cas 10, beta aktin)	Molgen
RNA izolasyon kiti	Qiagen
cDNA izolasyon kiti	Bioeksen
DNA markörü	Serva
Kantitatif gerçek zamanlı PZR kiti	Bioeksen

3.2. Metot

Deneyle ilgili tüm çalışmalar aşağıda verildiği gibi uygulanmıştır.

3.2.1. Hücreler

SH-SY5Y hücre hattı Bingöl Üniversitesi'nden temin edilmiş olup uygun araştırma laboratuvarında belli koşullar altında saklanmaktadır.

3.2.1.1. Hücre Kültürü

SH-SY5Y hücreleri %1 antibiyotik ile %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren Dulbecco's modified eagle medyumu (DMEM) büyüme ortamında %5 CO₂ etüvde 37 derecede 48-72 saatte bir pasajlanarak çoğaltıldı. Çoğaltılan hücreler yoğunluğu %70-80'e ulaştınca deneylerde kullanıldı.

3.2.2. Deneysel KZYA'nın HPLC/UV-Vis Dedektörüyle Tayini

Deneysel KZYA'nın HPLC/UV-Vis dedektörüyle tayini aşağıdaki protokol ile belirlenmiştir.

- Belirlenen yağ asitleri için kromatografik ayırım işlemi için gerekli standartlar, 1000 ppm'lik ana stoklardan; 500, 250, 100, 50, 20, 10 ve 5 ppm olacak şekilde hazırlandı.
- Sonrasında standartların, HPLC sistemiyle SIL-20A HT otosampler, CTO-10AS kolon fırını ve SPD-20A UV-Vis dedektörü kullanılarak kromatografik ayırımları sağlandı.
- Besiyerinde bulunan KZYA için miktar tayini ve standart hesaplamalar yapıldı.

3.2.3. Antimikrobiyal Analizi

Analiz aşamasında şu basamaklar uygulandı.

1. 1 lt sıvı besiyeri hazırlamak için:

- 10 gr Tripton

- 5 gr Yeast Extract
- 5 gr NaCl

Malzemeler hassas terazide tartılıp 200 ml saf su ile çözdürüldü. Üzeri 1 lt saf su ile tamamlandı.

2. Katı besiyeri hazırlamak için:

- 10 gr Tripton
- 5 gr Yeast Extract
- 5 gr NaCl
- 20 gr agar

Malzemeler hassas terazide tartılıp 500 ml saf suda çözdürüldü. Üzeri 1 lt saf su ile tamamlandı.

3. Deney grupları olan *L.plantarum* ve *L.pentosus* için; 27,5 gr MRS 500 ml saf suda çözdürülerek hazırlandı.

4. Hazırlanan besiyerleri 121°'de otoklavlanıp kullanıldı.

5. Bakterilerin besiyerine aktarılması için 2 falkon tüpe hazırlanan besiyerinden 10 ml alınıp çalkalayıcı inkübatörde 140 rpm'de 1 gece büyütüldü.

6. Bir gece çalkalayıcı inkübatörde büyütülen bakteri hücreleri 1000 G'de santrifüj edilerek çözelti kısmı atıldı ve üzerine 10 ml DMEM eklendi.

7. 4 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilen hücreler santrifüj edilip filtre ile süzüldü.

8. Son aşamada ise alınan süzüntü tüplere konulup numaralandırıldı ve -80°'de muhafaza edildi.

3.2.4. Hücre Canlılık Analizi

Hücre canlılığı analizi için şu basamaklar takip edildi.

- SH-SY5Y hücreleri 25'lik flasklara ekildi ve hücre sayısı 10-15 bin olacak şekilde 24 saat 37 derecede %5 CO₂'li etüvde tutunmaları için inkübasyona bırakıldı.

- Ekimi yapılan hücreler üzerine hazırlanmış olan besiyerlerinden belli konsantrasyonlarda eklendi ve 24 saat 37 derece %5 CO₂'li inkübatörde bekletilerek alınan sonuçlar kaydedildi.
- Hazırlanmış besiyerleri için uygun inhibisyon dozları belirlenerek etkin doza karar verildi.

3.2.5. Hücre içi ROS Tayini

Ros analizi süresince şu adımlar takip edildi (Shen et al., 1996).

- ROS analizi 2',7'-Diklorodihidroflororesin diasetat (DCFH-DA) kullanılarak yapıldı.
- SH-SY5Y hücreleri deney gruplarına belirtildiği şekilde muamele edildi ve santrifüjle toplandı.
- Daha sonra her bir örnekte 1x10⁶ Hücre için 2 µM DCFH-DA eklenerek karanlık ortamda 1 saat 37° de inkübasyona bırakıldı.
- Sonrasında spektrofotometre kullanılarak 485-525 nm değerlerinde ölçüm yapıldı.
- Ölçülen florasan yoğunluğu % olarak hesaplandı.

3.2.6. Lipid Peroksidasyon (LPO) Analizi

LPO analizi süresince şu adımlar takip edildi (Smith et al., 1982).

- Hücre kültüründen sonra örnekler toplandı ve 1ml PBS ile yıkandı.
- Deney gruplarındaki hücreler alınarak 500 µl trikloroasetik asit (TCA) ve 1 ml tiyobarbitirik asit (TBA) ile reaksiyona sokulup 95 °C kaynayan su banyosunda 30 dakika boyunca bekletildi.
- Daha sonra aniden buz içerisine alınan örnekler 5 dakika buzda bekletildi ve 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra 532 nm'de ELISA reader cihazı kullanılarak absorbans ölçümü alındı. Her bir örneğin MDA seviyesi hesaplandı.
- MDA absorbansları ile standart grafikler çizildi.

3.2.7. QRT-PCR Analizi

Deneyler süresince şu protokoller takip edildi.

- SH-SY5Y hücreleri 25 cm²'lik flasklarda büyütüldükten sonra belirtilen şekillerde muamele edildi.
- Hücrelere PBS ile yıkama yapıldı ve 3 dk 2500 rpm'de santrifüj edildi.
- RNA izolasyon kiti ile total RNA izolasyonu yapıldı.
- Nanodrop yöntemi ile izole edilen RNA'ların saflığı ölçüldü ve(260/280=1,8-2,1); mRNA'lar, cDNA sentez kitiyle cDNA'lere dönüştürüldü.
- Apoptoz sürecinde ekspresyonlarında farklılık beklenen Bax, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-10 ve referans gen olan beta aktine uygun primerler (Tablo 3.2.) ve QRT-PCR master mix kiti ile ekspresyon QRT-PCR deneyleri yapıldı.
- Elde edilen sonuçlar ise Ct metodu ile $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplandı ve grafikleri hazırlandı.

Tablo 3.2. QRT-PCR deneylerinde kullanılan primer sekans dizileri (F:Forward, İleri; R:Reverse, Geri)

Gen Adı	5'-3' Yönünde Primer Sekans Dizileri
Bax (F)	TGGAGCTGCAGAGGATGATTG
Bax (R)	CGGGGATTGATCAGACACGTAA
Kaspaz 3 (F)	TAGTTGCAATTGAATTAATTAGGA
Kaspaz 3 (R)	TAGAATACACAGTCTTAAGTGG
Kaspaz 8 (F)	GATCAAGCCCCACGATGAC
Kaspaz 8 (R)	CCTGTCCATCAGTGCCATAG
Kaspaz 10 (F)	CCAGGCTATGTATCCTTTTCGGC
Kaspaz 10 (R)	TCGTTGACAGCAGTGAGGATGG
Beta Aktin (F)	AAAGCGGCCTTGGAGTGTGT
Beta Aktin (R)	CATGGCTGGGGTGTGAAGG

3.2.8. İstatistiksel Analizler

Yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar en az üç kez tekrarlandı. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5.01 yazılımı ile yapıldı ve tek yönlü ANOVA Newman-Keuls Post-Hoc Testi ile değerlendirildi; $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Antimikrobiyal Analiz

Antimikrobiyal analiz yapılırken petri kaplara tabloda sırasıyla dozları verilmiş *L. plantarum* bakterisi eklenmiştir. Kontrol grubuna 10 µl hazırlanmış sıvı besiyerinden konulmuştur. Antibiyotik grubunda ise, 10 µl penicilin/streptomisin bulunmaktadır. Her bakteri için kontrol ile beraber 7 deney grubu bulunmaktadır. *L. plantarum* bakterisinin kontrole göre her bakteri üzerinde önemli ölçüde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu Tablo 4.1.'de verilmiştir. *L. plantarum*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerinde 1,25 µl' de etki göstermemişken, *Bacillus cereus* bakterisinde antimikrobiyal etki göstermiştir. En anlamlı antimikrobiyal etki tüm bakterilerde 20 µl'de izlenmiştir.

Tablo 4.1. *Lactobacillus plantarum*'un bazı zararlı bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi

Bakteri Adı:	1.25 µl	2.5 µl	5 µl	10 µl	20 µl	Antibiyotik (10 µl)	Negatif kontrol
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0,413	0,347	0,687	1,066	2,796	0
<i>Bacillus cereus</i>	0,130	0,199	0,343	0,558	0,875	2,090	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0,507	0,632	1,179	1,250	3,366	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0,364	0,464	0,907	1,263	3,261	0

Tabloda verilen zon çapları cm cinsinden ifade edilmektedir.

Antimikrobiyal analiz yapılırken petri kaplara tabloda sırasıyla dozları verilmiş *L. pentosus* bakterisi eklenmiştir. Kontrol grubuna 10 µl hazırlanmış sıvı besiyerinden konulmuştur. Antibiyotik grubunda ise, 10 µl penicilin/streptomisin eklenmiştir. Her bakteri için kontrol ile beraber 7 deney grubu bulunmaktadır. *L. pentosus* bakterisinin kontrole göre *Staphylococcus aureus* bakterisi dışında diğer bakteriler üzerinde önemli ölçüde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu Tablo 4.2'de verilmiştir. *L. pentosus*,

Enterobacter aerogenes üzerinde 10 µl ve 20 µl’de antimikrobiyal etki göstermiş olup, *Bacillus cereus* bakterisi üzerinde her konsantrasyonda antimikrobiyal etki göstermiştir. *Escherichia coli* bakterisinde 1,25 µl dışındaki konsantrasyonlarda antimikrobiyal etki gözlenmiştir. *Staphylococcus aureus* üzerinde ise yalnızca 5 µl konsantrasyonunda antimikrobiyal etkiye rastlanmıştır.

Tablo 4.2. *Lactobacillus pentosus*’un bazı zararlı bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi

Bakteri Adı:	1.25 µl	2.5 µl	5 µl	10 µl	20 µl	Antibiyotik (10 µl)	Negatif kontrol
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	0	0,313	1,017	2,897	0
<i>Bacillus cereus</i>	0,351	0,404	0,567	0,955	1,402	3,830	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0,432	0,805	0,909	1,156	3,077	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0,835	0	0	3,674	0

Tabloda verilen zon çapları cm cinsinden ifade edilmektedir.

Kolonize olan probiyotikler ürettikleri antimikrobiyal maddelerle bağırsak yüzeyini zararlı mikroorganizmalardan koruyabilir (Turabian, 1996). İnsan sindirim sistemi mukoz dokularından yapılan çalışmalarda patojenik *E. coli* ve *Salmonella* türlerinin sindirim sistemi dokularına tutunma yeteneğinin probiyotik bakterilerle yaptığı rekabet sonucu azaldığı görülmüştür. *Lactobacillus GG* and *L. rhamnosus* türleri patojenlerin intestinal dokulara tutunmasını azalttığı gösterilmiştir (Tuomola, 1998). Daha önce yapılan çalışmalar da göz önüne alınırsa *Lactobacillus* ve türevi bakterilerin zararlı bakterilere ve bunların etkilerine karşı anlamlı bir antimikrobiyal etki ortaya koydukları söylenebilir.

4.2. KZYA Miktar Analizi

DMEM besiyeri içerisinde bulunan KZYA'nın miktarları HPLC-UV-Vis Dedektörüyle tayin edildi. Her bir yağ asidi için ayrı okumalar yapılarak kaydedildi. *L. plantarum* ve *L. pentosus* bakterileri için inkübasyon süresince en fazla gözlenen yağ asidi laktik asit iken en az gözlenen yağ asidi ise propiyonik asit olmuştur.

Tablo 4.3. DMEM besiyeri içinde konsantrasyonu belirlenmiş *Lactobacillus plantarum* KZYA Miktarı

Madde	Ppm
Laktik Asit	7274
Propiyonik Asit	1336
Bütirik Asit	4581

Tablo 4.4. DMEM besiyeri içinde konsantrasyonu belirlenmiş *Lactobacillus pentosus* KZYA Miktarı

Madde	Ppm
Laktik Asit	8932
Propiyonik Asit	1514
Bütirik Asit	4945

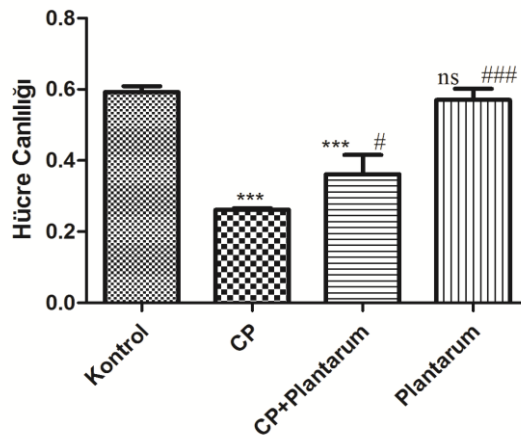
L. reuteri üzerinde yapılan bir çalışmada şartlandırılmış DMEM ortamında bazı kısa zincirli yağ asitlerinin varlığı ve miktarları HPLC/UV-Vis Detector ile belirlendi. Yapılan çalışmada laktik asit (2.289 $\mu\text{L}/\text{mL}$), asetik asit (0.937 $\mu\text{L}/\text{mL}$), propiyonik asit (0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$) ve bütirik asit (0.112 $\mu\text{L}/\text{mL}$) miktarları belirlenmiştir. *L. reuteri* bakterilerinin DMEM'de 4 saatlik inkübasyonu, en yüksek laktik asit üretimiyle, en az bütirik asit üretimiyle sonuçlandı. Söz konusu çalışmanın bulguları, tezdeki bulgularla paralellik arz etmektedir (Darendelioğlu et al., 2017).

4.3. KZYA'nın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

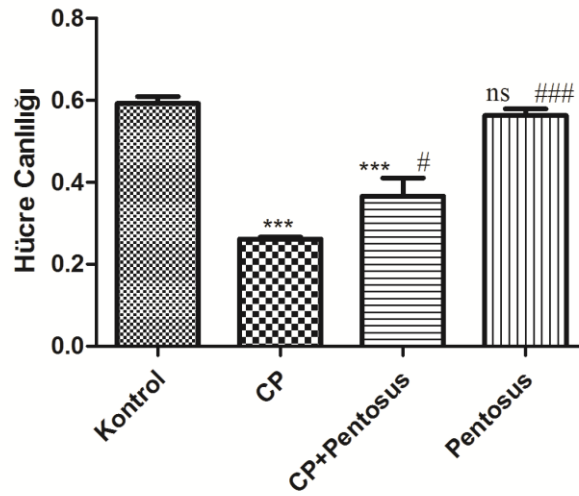
Karboplatin ile muamele SH-SY5Y hücreleri üzerinde meydana gelen hücre hasarında *L. plantarum* ve *L. pentosus* bakterileri tarafından üretilen KZYA'nın koruyucu etkileri hücre canlılık testi WST-1 analizi ile değerlendirildi. *L. plantarum* kontrol grubu ile CP

karşılaştırıldığında karboplatin uygulamasının hücre canlılığını önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir ($p < 0,001$). Kontrol grubuna göre CP+sekonder metabolit uygulamasının önemli bir koruma sağladığı gözlenmekte ($p < 0,001$), CP grubuna göre CP+sekonder metabolit uygulaması yapıldığında hücre canlılığı anlamlı düzeyde korunduğu gösterilmiştir ($p < 0,05$). Yalnızca sekonder metabolit uygulanmış grupta kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlenmezken CP grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde hücre canlılığını arttırdığı gösterilmiştir ($p < 0,001$).

L. pentosus kontrol grubu ile CP karşılaştırıldığında karboplatin uygulamasının hücre canlılığını önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir ($p < 0,001$). Kontrol grubuna göre CP+sekonder metabolit uygulamasının önemli bir koruma sağladığı gözlenmekte ($p < 0,001$), CP grubuna göre CP+sekonder metabolit uygulaması yapıldığında hücre canlılığının anlamlı düzeyde korunduğu gösterilmiştir ($p < 0,05$). Sekonder metabolit uygulanan grubun kontrole göre anlamlı bir değişikliği olmadığı ancak karboplatin uygulanmış gruba karşı önemli bir artış gösterdiği gözlenmiştir ($p < 0,001$).



Şekil 4.1. SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde *L. plantarum*'dan üretilmiş KZYA'nin hücre profilersyonu üzerindeki etkisi. Kontrol; SH-SY5Y hücrelerine DMEM besiyerinin 24 saat uygulandığı grup. CP; SH-SY5Y hücrelerine Karboplatin uygulanan grup. CP+Plantarum; Etkin dozu belirlenen *L. plantarum* KZYA ile Karboplatin ilavesi olan grup. *Plantarum*; Belirlenen etkin doz miktarınca uygulanmış yalnızca *L. plantarum* KZYA'nin bulunduğu grup. ***Kontrole göre diğer grupların karşılaştırmalı değerlendirilmesi ($p < 0,001$), ### CP grubuna göre diğer grupların karşılaştırmalı değerlendirilmesi ($p < 0,001$), ns ise anlamlı bir değişiklik olmadığının ifadesi (Absorbans değerleri)



Şekil 4.2. SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde *L. pentosus*'dan üretilen KZYA'nin hücre profilersasyonu üzerindeki etkisi. Kontrol; SH-SY5Y hücrelerine DMEM besiyerinin 24 saat uygulandığı grup. CP; SH-SY5Y hücrelerine Karboplatin uygulanan grup. CP+Pentosis; Etkin dozu belirlenen *L. pentosus* KZYA ile Karboplatin ilavesi olan grup. *Pentosis*; Belirlenen etkin doz miktarınca uygulanmış yalnızca *L. pentosus* KZYA'nin bulunduğu grup. ***Kontrolle göre diğer grupların karşılaştırmalı değerlendirilmesi (p <0,001), ### CP grubuna göre diğer grupların karşılaştırmalı değerlendirilmesi (p <0,001), ns ise anlamlı bir değişiklik olmadığının ifadesi (Absorbans değerleri)

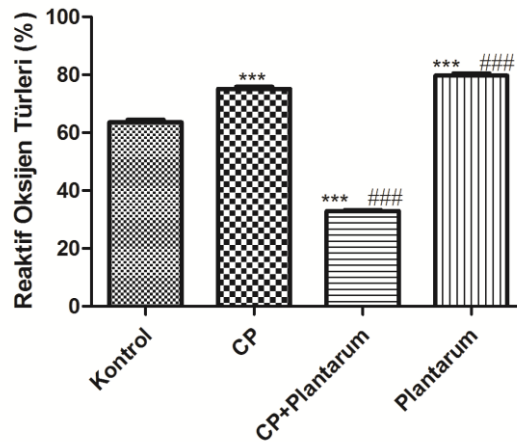
Boeneke et al., (2019) araştırmalarında kemoterapi sürecinde probiyotik kullanımının kemoterapik ilaçların kalp üzerindeki zararlı etkisini azalttığını rapor etmiştir. Bir başka çalışmada, KZYA'ların, kolit ile ilişkili kolorektal kanserin bir fare modelinde tümör gelişimini engellediği ve kolondaki enflamasyonu hafiflettiği bulgusuna ulaşılmıştır. KZYA'lar, kolit ile ilişkili kolorektal kanserin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir ajan olabilir (Tian et al., 2018). Bizim çalışmamızda ise KZYA'ların kemoterapotik ilaçların sağlıklı hücrelere olan öldürücü etkisi karşısında koruyucu özellik gösterdiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar gösteriyor ki, sekonder metabolitlerin hücreyi kemoterapötik hasara karşı koruyabilmekte ve hücre canlılığını anlamlı düzeylerde arttırmaktadır.

4.4. KZYA'nin ROS Üzerindeki Etkileri

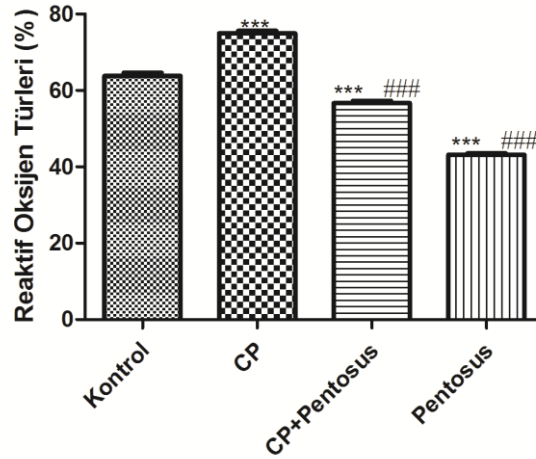
Karboplatin ile indüklenmiş hücrelerde sekonder metabolitlerin ROS üzerindeki rolünü belirlemek için iki ayrı deney grubunda ROS miktarı ölçülmüştür. *L. plantarum* kontrol grubu ile CP grubu arasında anlamlı bir artış gözlenmiş olup karboplatin uygulamasının hücrede ROS seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (p <0,001). Kontrol grubuna göre CP+sekonder metabolit uygulaması hücrede ROS üretimini önemli düzeyde düşürdüğü

görülmektedir ($p < 0,001$). Sekonder metabolit uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırılınca anlamlı bir artış olduğu gözlenmiş ancak bu artış istenmeyen bir sonuçtur. Bu sonuç, deneyde kullanılan bakteriler tarafından sentezlenmiş herhangi bir metabolit kaynaklı olabileceği kanısına varılmıştır. CP+sekonder metabolit grubu ile karboplatin uygulanmış grup karşılaştırıldığında ROS düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$). Yine aynı şekilde sekonder metabolitlerin CP grubu ile karşılaştırılması sonucu ROS seviyesinde istenmeyen bir artış olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$).

L. pentosus kontrol grubu ile CP grubu değerlendirildiğinde anlamlı bir artış gözlenmiş olup karboplatin uygulamasının hücrede ROS seviyesini arttırdığı gösterilmiştir ($p < 0,001$). Kontrol grubuna göre CP+sekonder metabolit uygulaması hücrede ROS üretimini önemli düzeyde düşürdüğü görülmektedir ($p < 0,001$). Sekonder metabolit uygulanan grup ile kontrol karşılaştırılınca ROS seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$). CP+sekonder metabolit grubu karboplatin uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında ROS düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$). Sekonder metabolitlerin uygulandığı grup ile CP grubu ile karşılaştırıldığında ROS seviyesinde önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p < 0,001$).



Şekil 4.3. SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde *L. plantarum*'un üretilen sekonder metabolitlerin ROS üzerindeki etkisi. Hücreler inkübe edilip belirlenen dozlarda uygulamalar yapıldı. *** Kontrol grubu ($p < 0,001$), ### CP grubu ($p < 0,001$)

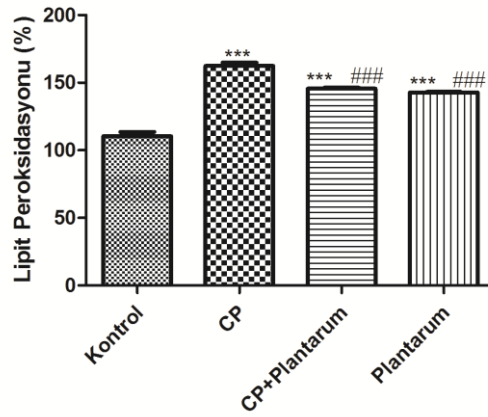


Şekil 4.4. SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde *L. pentosus*'un ürettiği sekonder metabolitlerin ROS üzerindeki etkisi. Hücreler inkübe edilip belirlenen dozlarda uygulamalar yapıldı. *** Kontrol grubu ($p < 0,001$), ### CP grubu ($p < 0,001$)

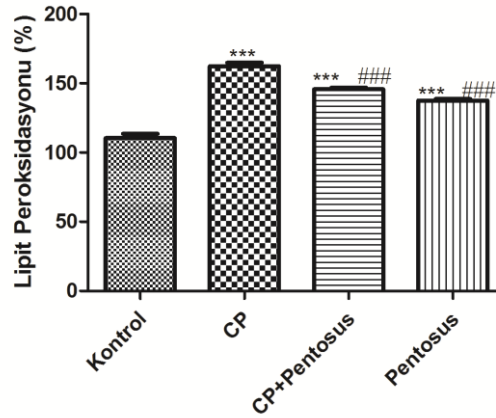
Probiyotik mikroorganizmaların hücre zar yapıları, sentezledikleri laktik asit, bütirik asit ve asetik asit gibi organik asitler, proteolitik aktiviteleri ve KZYA gibi özelliklerinin antioksidan aktiviteyi arttırdığı, serbest radikal oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Lo et al., 2009). Laktik asit bakterilerinin antioksidan aktivitesinin bulunması probiyotik aktivite açısından önemlidir (Wang et al., 2017). Yapılan çalışma ve literatür çalışmaları göz önüne alındığında üretilen sekonder metabolitlerin ROS seviyesini düşürüp antioksidan etki yapabileceği gösterilmiştir.

4.5. KZYA'nin LPO Üzerindeki Etkileri

Bir kemoterapi ilacı olan karboplatin ile muamele edilmiş sağlıklı hücreler üzerinde sekonder metabolit uygulanmasının hücreyi hasardan koruyup korumadığını değerlendirmek ve MDA (malondialdehit) seviyesine bakmak için LPO testi yapılmıştır. *L. plantarum* kontrol grubu CP, CP+sekonder metabolit ve sekonder metabolit uygulamaları ile karşılaştırıldığında tüm gruplar için LPO düzeyinde anlamlı artışlar oluşmuştur ($p < 0,001$). Aynı durum *L. pentosus* kontrol ve diğer grupların karşılaştırılmasında da geçerlidir ($p < 0,001$).



Şekil 4.5. SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde *L. plantarum*'un ürettiği sekonder metabolitlerin LPO üzerindeki etkisi ve MDA seviyesi. SH-SY5Y nöron hücreleri üzerine uygulanmış 80 µl Karboplatin, MDA seviyesinde anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0,001$). *** Kontrol grubu ($p < 0,001$), ### CP grubu ($p < 0,001$)



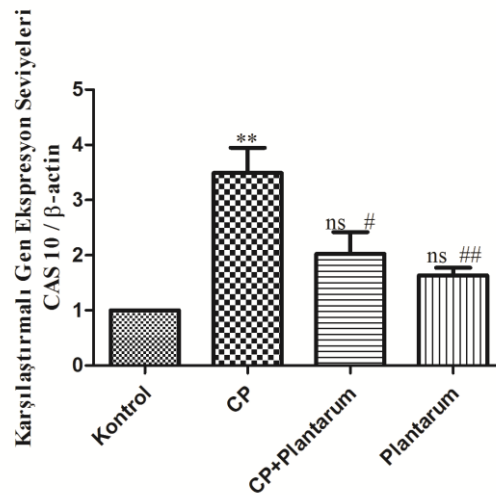
Şekil 4.6. SH-SY5Y nöron hücreleri üzerinde *L. pentosus*'un ürettiği sekonder metabolitlerin LPO üzerindeki etkisi ve MDA seviyesi. SH-SY5Y nöron hücreleri üzerine uygulanmış 80 µl Karboplatin, MDA seviyesinde anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0,001$). ***Kontrol grubu ($p < 0,001$), ### CP grubu ($p < 0,001$).

4.6. KZYA'nın Apoptozla İlişkili Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Hasara uğratılmış nöron hücreleri üzerine uygulanmış KZYA ile hücrelerdeki apoptotoik enzimlerin mRNA seviyesini değiştirip değiştirmeyeceğini gözleyebilmek için *Bax*, *Caspaz-3*, *Caspaz-8* ve *Caspaz-10* gen ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak incelendi.

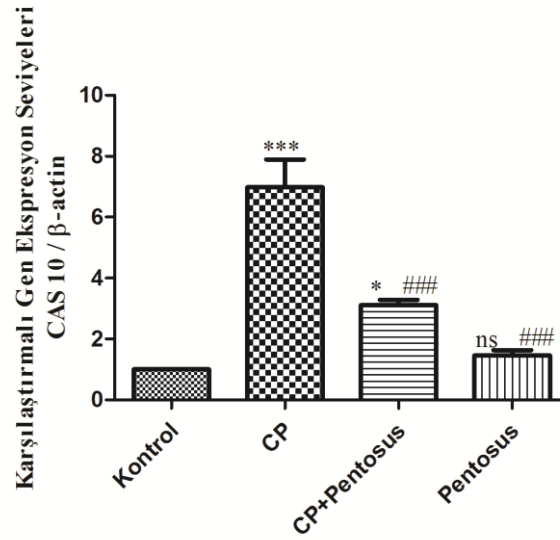
Karboplatin ile hasara uğratılmış SH-SY5Y nöron hücrelerinde KZYA muamelesi ile hem *L. plantarum* hem de *L. pentosus* gruplarında kontrole *Caspaz 10* seviyesinde düşüş gözlenmiştir. *L. plantarum* kontrol grubu ile karboplatin uygulanmış grup değerlendirildiğinde CP'nin *Caspaz 10* gen seviyesini arttırdığı görülmüştür ($p < 0,01$). Kontrol grubu CP+sekonder metabolit grubu ile değerlendirildiğinde anlamlı olmayan bir sonuç alınmıştır. Kontrol ve sekonder metabolit değerlendirmesi yapıldığında yine aynı şekilde anlamlı olmayan bir sonuç alınmıştır. CP grubu CP+sekonder metabolit uygulanmış grup ile karşılaştırılınca *Caspaz 10* seviyesinde bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). CP grubu ile sekonder metabolitler değerlendirilince *Caspaz 10* seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,01$).

L. pentosus kontrol grubu ile karboplatin uygulanmış grup değerlendirildiğinde CP'nin *CAS 10* gen seviyesini arttırdığı görülmüştür ($p < 0,01$). Kontrol grubu CP+sekonder metabolit grubu ile değerlendirildiğinde CP grubuna oranla bir miktar daha azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) Kontrol ve sekonder metabolit değerlendirmesi yapıldığında anlamlı olmayan bir sonuç alınmıştır. CP grubu CP+sekonder metabolit uygulanmış grup ile karşılaştırılınca *CAS 10* seviyesinde önemli bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,001$). CP grubu ile sekonder metabolitler değerlendirildiğinde yine *Caspaz 10* seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,001$).



Şekil 4.7.a. *L. plantarum* bakterisinden elde edilen sekonder metabolitlerin *Caspaz 10* üzerindeki etkisi.

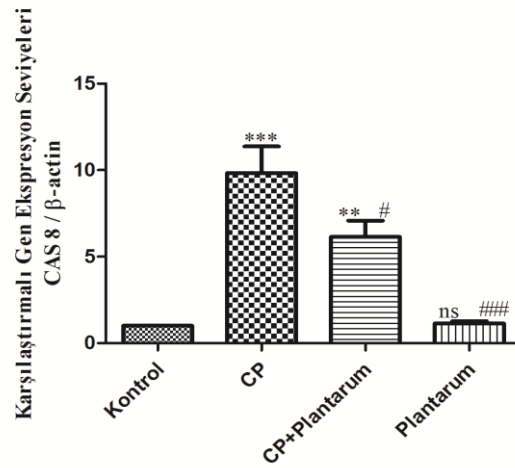
** Kontrol grubu ## CP grubu ns: anlamlı bir değişimin olmaması



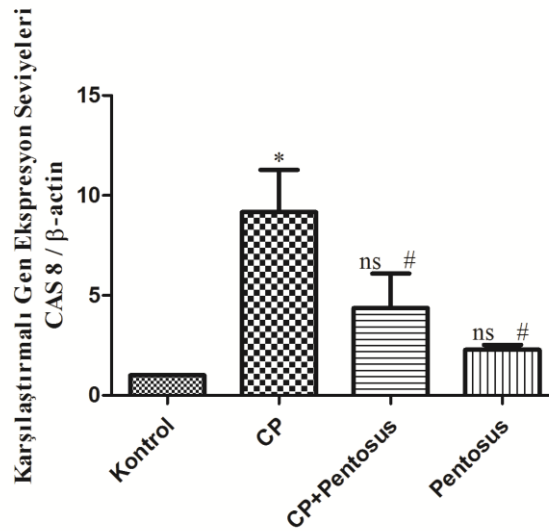
Şekil 4.7.b. *L. pentosus* bakterisinden elde edilmiş sekonder metabolitlerin *Caspaz 10* seviyesi üzerindeki etkisi. ** Kontrol grubu ## CP grubu ns: anlamlı bir değişimin olmaması

L. plantarum kontrol grubu ile karboplatin uygulanmış grup değerlendirildiğinde CP'nin *Caspaz 8* gen seviyesini önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür ($p < 0,001$). Kontrol grubu CP+sekonder metabolit grubu ile değerlendirildiğinde *Caspaz 8* seviyesinde bir miktar azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,01$) Kontrol ve sekonder metabolit değerlendirmesi yapıldığında anlamlı olmayan bir sonuç alınmıştır. CP grubu CP+sekonder metabolit uygulanmış grup ile karşılaştırılınca *Caspaz 8* seviyesinde bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,01$). CP grubu ile sekonder metabolitler değerlendirildiğinde cas 8 seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). *L. plantarum* sekonder metabolitlerinin cas 8 üzerinde önemli ölçüde etki gösterdiği söylenebilir.

L. pentosus kontrol grubu ile karboplatin uygulanmış grup değerlendirildiğinde CP'nin *Caspaz 8* gen seviyesini önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür ($p < 0,001$). Kontrol grubu CP+sekonder metabolit grubu ile değerlendirildiğinde anlamlı olmayan bir sonuç alınmıştır. Kontrol ve sekonder metabolit değerlendirmesi yapıldığında tekrar anlamlı olmayan bir sonuç alınmıştır. CP grubu CP+sekonder metabolit uygulanmış grup ile karşılaştırılınca *Caspaz 8* seviyesinde bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). CP grubu ile sekonder metabolitler değerlendirildiğinde *Caspaz 8* seviyesinde yine bir azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).



Şekil 4.8.a. *L. plantarum* bakterisinden elde edilmiş sekonder metabolitlerin *Caspaz 8* seviyesi üzerindeki etkisi ** Kontrol grubu ## CP grubu ns: anlamlı bir değişimin olmaması

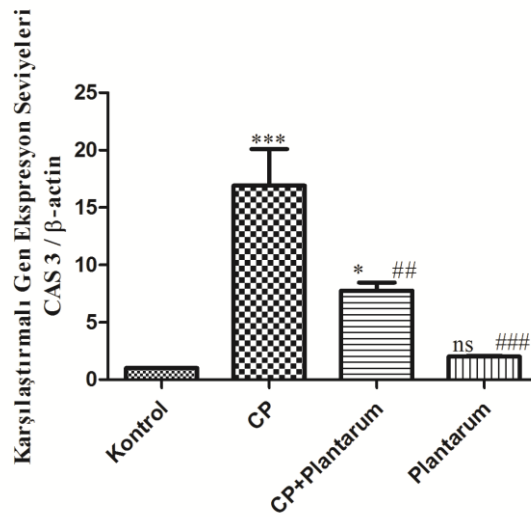


Şekil 4.8.b. *L. pentosus* bakterisinden elde edilmiş sekonder metabolitlerin *Caspaz 8* seviyesi üzerindeki etkisi ** Kontrol grubu ## CP grubu ns: anlamlı bir değişimin olmaması

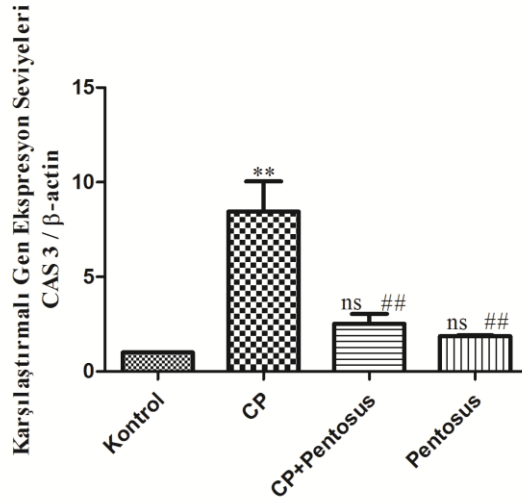
L. plantarum kontrol grubu ile karboplatin uygulanmış grup değerlendirildiğinde CP'nin *Caspaz 3* gen seviyesini önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür ($p < 0,001$). Kontrol grubu CP+sekonder metabolit grubu ile değerlendirildiğinde *Caspaz 3* seviyesinde bir miktar azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) Kontrol ve sekonder metabolit değerlendirmesi yapıldığında anlamlı olmayan bir sonuç alınmıştır. CP grubu CP+sekonder metabolit uygulanmış grup ile karşılaştırılınca *Caspaz 3* seviyesinde bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$). CP grubu ile sekonder metabolitler değerlendirildiğinde *Caspaz 3* seviyesinde

anlamli bir azalma olduğu grlmŖtr (p <0,001). *L. plantarum* sekonder metabolitlerinin *Caspaz 3* zerinde önemli lde etki gösterdiği söylenbilir.

L. pentosus kontrol grubu ile karboplatin uygulanmıŖ grup değerlendirildiğinde CP'nin *Caspaz 3* gen seviyesini arttırdığı grlmŖtr (p <0,01). Kontrol grubu CP+sekonder metabolit grubu ile değerlendirildiğinde anlamli bir sonuç elde edilememiŖtir. Kontrol ve sekonder metabolit değerlendirmesi yapıldığında yine anlamli bir sonuç alınamamıŖtır. CP grubu CP+sekonder metabolit uygulanmıŖ grup ile karŖılaŖtırılınca *Caspaz 3* seviyesinde bir azalma gzlenmiŖtir (p <0,01). CP grubu ile sekonder metabolitler değerlendirildiğinde *Caspaz 3* seviyesinde anlamli bir azalma olduğu grlmŖtr (p <0,001). *L. pentosus* sekonder metabolitlerinin *Caspaz 3* zerinde etkisi gsterilmiŖtir.

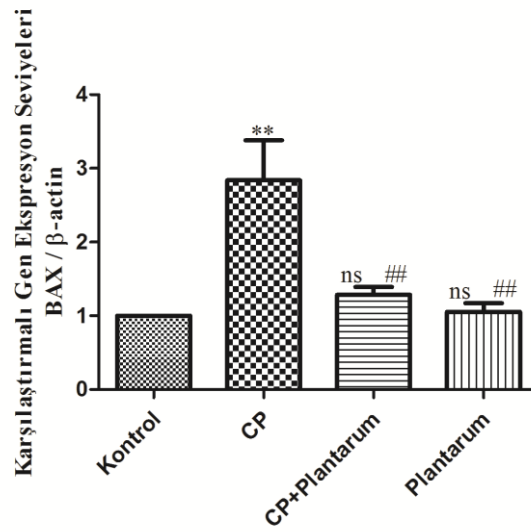


Ŗekil 4.9.a. *L. plantarum* bakterisinden elde edilmiŖ sekonder metabolitlerin *Caspaz 3* seviyesi üzerindeki etkisi ** Kontrol grubu ## CP grubu ns: anlamli bir deđerimin olmaması

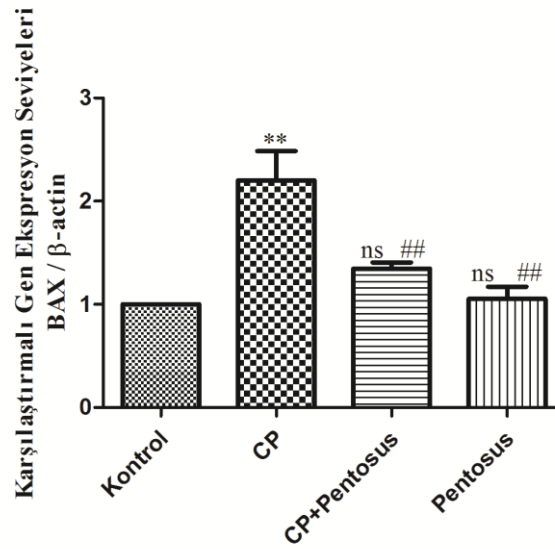


Şekil 4.9.b. *L. pentosus* bakterisinden elde edilmiş sekonder metabolitlerin *Caspaz 3* seviyesi üzerindeki etkisi ** Kontrol grubu ## CP grubu ns: anlamlı bir değişimin olmaması

L. plantarum kontrol grubu ile karboplatin uygulanmış grup değerlendirildiğinde CP'nin *Bax* geni seviyesini arttırdığı görülmüştür ($p < 0,01$). Kontrol grubu CP+sekonder metabolit grubu ile değerlendirildiğinde anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Kontrol ve sekonder metabolit değerlendirmesi yapıldığında yine anlamlı bir sonuç alınamamıştır. CP grubu CP+sekonder metabolit uygulanmış grup ile karşılaştırılınca *Bax* seviyesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,01$). CP grubu ile sekonder metabolitler değerlendirildiğinde *Bax* seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). *L. plantarum* sekonder metabolitlerinin *Bax* geni üzerinde etki gösterdiği söylenebilir. Aynı durum *L. pentosus* uygulamalarının tümünde geçerlidir.



Şekil 4.10.a *L. plantarum* bakterisinden elde edilmiş sekonder metabolitlerin *Bax* seviyesi üzerindeki etkisi
 ** Kontrol grubu ## CP grubu ns: anlamlı bir değişikliğin olmaması



Şekil 4.10.b *L. pentosus* bakterisinden elde edilmiş sekonder metabolitlerin *Bax* seviyesi üzerindeki etkisi
 ** Kontrol grubu ## CP grubu ns: anlamlı bir değişikliğin olmaması

İçeriğinde bol miktarda *Lactobacillus* türü barındıran kefirin kullanımı anti-apoptotik *Bcl-2* salınımını azaltırken, apoptotik *Bax* aracılığıyla apoptozu indüklemektedir (Sharifi et al., 2017). Maroof et al. (2012)'de yapılan bir çalışmada oluşturulmuş olan meme kanseri fare modeline *L. acidophilus* ve kemoterapötik ilaç olan siklofosfamid verilmiş ve uygulamaların deney hayvanlarında tümör gelişimi ve bağışıklık sistemi üzerindeki

etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde IFN- γ , IL-4, TGF- β ve lenfosit seviyelerinde artış, tümör boyutlarında ise anlamlı bir azalmanın olduğu gözlenmiştir.

Başka bir çalışmada deney hayvanlarında DMH kullanılarak oluşturulan kolon kanseri modelinin, probiyotik bakteriler (*L. rhamnosus*, *L. casei* ve *L. lactis*) aracılığıyla engellenebildiği gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada probiyotik bakterilerin DNA hasarını azalttığı bildirilmiştir (Kumar et al., 2012). Benzer bir çalışmada deney hayvanlarında genotoksik bir kimyasal ajan olan DMH kullanılmış ve çeşitli laktik asit bakterilerinin kalın bağırsak hücrelerinde DNA hasarını azalttıkları gösterilmiştir (Pool – Zobel et al., 1996).

İnsan kolon kanseri hücre hattında (HT-29) DNA hasarı üzerine farklı laktik asit bakterilerinin etkisinin incelendiği bir makalede laktik asit bakterilerinin HT-29 hücre hattında bir ön tedavi modeli olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir (Kolar et al., 2008).

Literatür çalışmaları ile paralellik gösteren bu çalışmada, *L. plantarum* ve *L. pentosus* bakterilerinden üretilen sekonder metabolitlerin *Caspaz 10*, *Caspaz 8*, *Caspaz 3* üzerinde önemli ölçüde etki gösterdiği, her iki deney grubunda da karboplatin maruziyeti sonrası SH-SY5Y nöron hücrelerinde apoptotik *Bax* geninin seviyesini azalttığı gösterilmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada bazı *Lactobacillus* türü bakteriler tarafından sentezlenen sekonder metabolitlerin antimikrobiyal etkisi ve kemoterapötik ilaca karşı hücreyi koruyucu etkisi ortaya konmuştur. Yapılan bu tez çalışmasında öncelikle *L. plantarum* ve *L. pentosus* bakterileri uygun şartlarda büyütülerek çeşitli zararlı bakteriler üzerine belirli miktarlarda uygulanmıştır. Tasarlanmış 8 deney grubunun zon ölçümleri yapılarak çalışılan *Lactobacillus* türü bakterilerinin diğer bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi ortaya konulmuştur. *L. plantarum* ve *L. pentosus* bakterilerinden üretilen sekonder metabolitler bir kemoterapötik olan karboplatin ile hasara uğratılmış SH-SY5Y nöron hücreleri üzerine uygulanmış ve etkileri gözlenmiştir. Bu bakterilerin ürettiği sekonder metabolitlerin miktar tayini yapılarak çeşitli deney grupları ile tasarlanmış ve nöron hücrelerine önceden belirlenmiş miktarlarda karboplatin uygulaması yapılmıştır. *L. plantarum* bakterisinin ürettiği sekonder metabolitlerin karboplatin uygulanmış hücrelerde hücre canlılığını arttırdığı, ROS üretimini önemli ölçüde azalttığı ve LPO seviyesini anlamlı seviyede azalttığı gösterilmiştir. *L. pentosus* bakterisi tarafından üretilen sekonder metabolitlerin ise karboplatin uygulanmış tüm deney gruplarında hücre canlılığını anlamlı düzeyde arttırdığı, ROS ve LPO seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Çalışmada, hücre canlılığı ile ROS ve LPO seviyelerinde oluşturduğu değişiklikler ile bazı apoptotik genlerin (*Caspaz 10*, *Caspaz 8*, *Caspaz 3*, *Bax*) ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Çalışılan bakterilerin ürettiği sekonder metabolitlerin apoptotik genler üzerinde önemli ölçüde etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Bu sekonder metabolitler *Caspaz 10*, *Caspaz 8*, *Caspaz 3*, *Bax* seviyelerini anlamlı şekilde azaltmıştır.

Sonuç olarak *L. plantarum* ve *L. pentosus* bakterilerinden sentezlenen sekonder metabolitlerin, karboplatin hasarına karşı hücreleri koruyucu yönde etkisinin olduğu gösterilmiştir. Gelecekte kanser tedavisi gören hastalarda bu sekonder metabolitlerin birer koruyucu terapötik ajan olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Altermann, E., Russell, W. M., Azcarate-Peril, M. A., Barrangou, R., Buck, B. L., McAuliffe, O., and Lick, S. (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 3906-3912.

Asano, M., Karasawa, E., Takayama, T. (1986). Antitumor activity of *Lactobacillus casei* (LC 9018) against experimental mouse bladder tumor (MBT-2). *J. Urol.*; 136, 719–21.

Burkitt, M. D., Duckworth, C. A., Williams, J. M., Pritchard, D. M. (2017). *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Disease models & mechanisms*.;10(2), 89-104.

Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J.T., and Garrity, G. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology. The proteobacteria. Introductory Essays*, 2(1).

Cabadak, H. (2008). Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 9 (3), 51-61.

Can, G. (2017). "Cancer", *Pathophysiology Academician Medical Bookstore*, 33-51.

Carles, J., Nogue, M., Domenech et al. (2000). Carboplatin-gemcitabine treatment of patients with transitional cell carcinoma of the bladder and impaired renal function. *Oncology Jun*; 59(1), 24-27.

Chabner, B. A., Allegra, C. J., Curt, G. A., Calabresi, P. (1996). Antineoplastic agents, In: Goodman Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. Edited by Hardman GJ, Limbird Lee E, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG. International edition, The McGraw-Hill Companies, p: 1237.

Chen, H., Chen, T., Lin, H. (2010). Pravastatin attenuates carboplatin-induced nephrotoxicity in rodents via peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated heme oxygenase-1. *Mol Pharmacol*; 78(1), 36-45.

Choi, W. S., Lee, E. H. and Chung, C. W. (2001). Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *Journal of Neurochemistry*, 77, 1531-1541.

Chu, E., Vincent, T., DeVita, Jr. (2001). Editors; Vincent, T.DeVita, Jr., Hellman, S., Rosenberg, S. A. *Cancer Principles&Practice of Oncology* 6th edition. page 289. -Kastan, M. and Bartek, J. 2004. Cell cycle check points and cancer. *NATURE*. Vol: 432, 316-323.

Chu, G., Mantin, R., Shen et al. (1993). Massive cisplatin overdose by accidental substitution for carboplatin. Toxicity and management. *Cancer Dec* 15; 72(12), 3707-3714.

Clare, C. (2018). Cancer”, Principles of Applied Pathophysiology (Ed. M. Narve I. Peate (Translation Ed. M. Yılmaz and Z. Seki)), 1.Edition, İstanbul Medical Bookstore, 36-65.

Clegg, A., Scott, D. A., Hewitson, P., Sidhu, M., Waugh, N. (2002). Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review, *Thorax*, 57(1), 20-28.

Cohen, J. J. 1998. Apoptosis. To Be Or Not To Be. Postgraduate Syllabus (AA-AA-I) 1; 1–19.

Coşkun, G. ve Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20, 145-158.

Crowe, M.J., Bresnahan, J.C., Shuman, S.L., Masters, J.N. and Beattie, M.S. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Medicine*, 3, 73-76.

Çakır, İ. (2003). *Lactobacillus ve Bifidobacterler’ de bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*

Danford, A. J., Wang, D., Wang, Q., Tullius, T. D., Lippard, S. J. (2005). Platinum anticancer drug damage enforces a particular rotational setting of DNA in nucleosomes. *PNAS* 2005,vol. 102, no. 35, 12311–12316.

Deborde, C. (2002). *Propionibacterium spp.* (pp. 2330-2339). In: Roginski, H., Fuguay, J. W., Fox, P. F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, London.

De Vuyst, L. and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153-177.

Erdoğan, B. ve Uzaslan, E.K. (2003). Apoptozis Mekanizmaları: Tümör Gelişiminde Faz-Fasl Bağımlı Apoptozis, *Akciğer Arşiv*, 4, 165-174.

Ettinger, L. J., Ivy, P., Gaynon et al. (1986). A phase II study of carboplatin as a treatment for children with acute leukemia recurring in bone marrow: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer* Jul 15; 80(2), 311-316.

Ettinger, L. J., Krailo, M. D. (1993). Gaynon Pset al: A phase I study of carboplatin in children with acute leukemia in bone marrow relapse. A report from the Childrens Cancer Group. *Cancer* Aug 1; 72(3), 917-922).

Femia, A. P., Luceri, C. (2002). Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*; 23 (11), 1953-60.

Fıfşkın, K. (2002). Genetik Kavramlar. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. Sayfalar; 635-651.

Filho-Lima, J. V. M., Vieira, E. C. and Nicoli, J. R. (2000). Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. Typhimurium in gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology: Original Articles*, 88(3), 365-370.

Gao, C., Ganesh, B. P., Shi, Z., Shah, R. R., Fultz, R., Major et al. (2017). Gut MicrobeeMediated Suppression of Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis by Luminal Histamine Production *The American Journal of Pathology*; 187 (10).

Gebbia, V., Galetta, D., Lorusso et al. (2008). Cisplatin plus weekly vinorelbine versus cisplatin plus vinorelbine on days 1 and 8 in advanced non-small cell lung cancer: a prospective randomized phase III trial of the G.O.I.M. (Gruppo Oncologico Italia Meridionale). *Lung Cancer*; 61(3), 369-77.

Ghoneum, M., Felo, N. (2015). Selective induction of apoptosis in human gastric cancer cells by *Lactobacillus kefir* (PFT), a novel kefir product. *Oncol Rep*; 34(4), 1659-66.

Ghoneum, M., Gimzewski, J. (2014). Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. *Int J Oncol.*; 44(3), 830-7.

Gönülateş, N. (2000). Kefirin İnsanlar Üzerine İmmünomodülatör Etkilerinin Araştırılması, Süleyman Demirel Üniversitesi.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell.*;100(1), 57-70.

Hajdu, S. I. (2011). A note from history: landmarks in history of cancer, part 1, *Cancer*, 117(5), 1097-1102.

Hejazi, J., Rastmanesh, R., Taleban, F. A., Molana, S. H., Hejazi, E., Ehtejab et al. (2016). Effect of curcumin supplementation during radiotherapy on oxidative status of patients with prostate cancer: A double blinded, randomized, placebo-controlled study. *Nutr Cancer.*; 68(1), 77-85. doi: 10.1080/0163558.

Hu, Y. M., Benedict, M. A. and Ding, L. Y. (1999). Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf I- mediated caspase-9 activation and apoptosis. *The EMBO Journal*, 18, 3586-95.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., Thun, M. J. (2006). *Cancer statistics, CA: a cancer journal for clinicians*, 56(2), 106-130.

Kahraman, R., (1993). Probiyotiklerin buzağaların büyümesi üzerine etkisi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Kayaalp, S. O. (2000). Rasyonel tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt I, dokuzuncu baskı, Ankara, Hacettepe TAŞ, p: 397.

Kayaoglu, G., Erten, H., Alaçam, T., and Orstavik, D. (2005). Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, 38(7), 483-488.

Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C. and Dietrich, W.D. (2001). Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60, 422- 429.

Kıray, E., Karıptaş, E. (2015). Probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotiklerin kolorektal kanser ilişkisi, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*; Cilt: 13(1), 28-46.

Koller, V. J., Marian, B., Stidl, R., Nersesyan, A., Winter, H., Simic et al. (2008). Impact of lactic acid bacteria on oxidative DNA damage in human derived colon cells. *Food and Chemical Toxicology*; 46, 1221–9.

Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L. M., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q. L., Salvesen, G. S., Bredesen, D. E., Rosenthal, R. E., Fiskum, G. and Reed, J. C. (1999). Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proceeding of the National Academy of Science*, 96, 5752-57.

Kumar, M., Verma, V., Nagpal, R., Kumar, A., Behare, P. V., Singh et al. (2012). Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B1-induced liver carcinogenesis in rats, *British Journal of Nutrition*; 107, 1006–16.

Lee, J. H., Nam, S. H., Seo, V. T., Yun, H. D., Hong et al. (2012). The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells, *Food Chemistry*; 131, 1347–54

Leroy, F. and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.

Leroy, F., Falony, G. and de Vuyst, L. (2008). Latest developments in probiotics. In *Meat Biotechnology* Springer, New York, NY., 217-229.

Li, M., Ona, V. O., Chen, M., Kaul, M., Tenneti, L., Zhang, X., Stieg, P. E., Lipton, S. A. and Friedlander, R. M. (2000). Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 99, 333-342.

Liu, X. Z., Xu, X. M., Hu, R., Du, C., Zhang, S. X., McDonald, J. W., Dong, H. X., Wu, Y. J., Fan, G. S., Jacquin, M. F., Hsu, C. Y. and Choi, D. W. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 17, 5395-5406.

- Lou, J., Lenke, L. G., Ludwig, F. J. and O'Brien, M. F. (1998). Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 36, 683-690.
- Lu, J., Ashwell, K., Ken, W. S. and Waite, P. (2000). Advances in spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*, 25, 1859-1866.
- Ljungh, A. and Wadstrom, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current issues in Intestinal Microbiology*, 7(2), 73-90.
- Mariah-Singh, D. and Raymakers, E. (2018). What is the cancer? Information on cancer for patients and family. *CANSA*, 19, 437-896.
- Marteau, P. R., Vrese, M. D., Cellier, C. J. and Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 430-436.
- Nakatsuka, H., Ohta, S., Tanaka, J., Toku, K., Kumon, Y., Maeda, N., Sakanaka, M. and Sakaki, S. (1999). Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Research*, 849, 216-219.
- Newton, K. and Strasser, A. (1998). The Bcl-2 family and cell death regulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8, 68-75.
- Nezami, H., Mykkanen, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S., Ahokas, J. (2000). Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B₁ from the chicken duodenum. *J Food Prot*, 63, 549-52.
- Ouwehand, A. C. and Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker*, 139, 375-396.
- Özbek, H., Uğraş, S., Dülger, H. et al. (2003). Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia*, 74(3), 317-319.
- Pool –Zobel, B. L., Neudecker, C., Domizlaff, I., Ji, S., Schillinger, U., Rumney et al. (1996). *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* mediated antigenotoxicity in the colon of the rat, *Nutrition and Cancer*; 26, 365-80.
- Reddy, B. S., Rivenson, A. (1993). Inhibitory Effect of *Bifidobacterium longum* on Colon, Mammary, and Liver Carcinogenesis Induced by 2-Amino-3-methylimidazo [4,5] quinoline, a Food Mutagen, *Cancer Res*; 53, 3914-18.
- Rizk, S., Maalouf, K., Baydoun, E. (2009). The antiproliferative effect of kefir cell-free fraction on hut-102 malignant lymphocytes. *Clin. Lymphoma Myeloma*, 9, S198–S203.

Ruberto, G., Baratta, M. T., Deans et al. (2000). Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Med Dec*; 66(8), 687-693.

Ruggiero, A., Trombatore, G., Triarico, S., Arena, R., Ferrara, P., Scalzone et al. (2013). Platinum Compounds in Children with Cancer: Toxicity and Clinical Management. *Anticancer Drugs*;(Table 1), 1007–19.

Salmon, S. E., Sartorelli, A. C. (1995). Basic&Clinical Pharmacology, In: *Cancer Chemotherapy*. Edited by Katzung BG. 6th edition, Lebanon, p: 831.

Sjöström, J. and Bergh, J. (2001). How Apoptosis Regulated, and What Goes Wrong in Cancer. *British Medical Journal*, 322, 1538–1539.

Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.

Takagi, T., Takayasu, M., Mizuno, M., Yoshimoto, M. and Yoshida, J. (2003). Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurologia medico-chirurgica*, 43, 20-29.

Takahashi, K., Schwarz, E., Ljubetic, C., Murray, M., Tessler, A. and Saavedra, R.A. (1999). DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke' s nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats. *Journal of Comparative Neurology*, 404, 159-71.

Temel, M. K. (2015). Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi. *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*; 30(1).

Tian, Y., Xu, Q., Sun, L., Ye, Y., and Ji, G. (2018). Short-chain fatty acids administration is protective in colitis-associated colorectal cancer development. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 57, 103-109.

Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M., Beynen, A. C. (2004). Monostrain, multistain and multispecies probiotics- A comparison of functionality and efficacy, *International Journal of Food Microbiology*, 219– 233.

Tuomola, E. M., Salminen, S. J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol*; 41, 45–51.

Turabian, K. L. (1996). *A manual for writers of term papers, theses, and dissertations*. 6th ed. Chicago: University of Chicago Press.

Unger, F. T., Klasen, H. A., Tchartchian, G., de Wilde, R. L., Witte, I. (2009). DNA damage induced by cis- and carboplatin as indicator for in vitro sensitivity of ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer*, 9, 359.

Van der Vijgh, W. J. F. (1991). Clinical Pharmacokinetics of Carboplatin. *Clin Pharmacokinet*; 21(4), 242–61.

Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., and Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 106-115.

Yiğit, T. (2009). Süt ve Süt Ürünlerinden Probiyotik Bakterilerden İzolasyonu, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., and Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521.

Welborn, J. L., Kopecky, K. J., Meyers et al. (1995). Carboplatin infusion in relapsed and refractory acute myeloid leukemia—a Southwest Oncology Group trial. *Leukemia* Jul; 9(7), 1126-1129.

Wright-von Lahtinen, S., Ouwehand, A. C. and Salminen, S. (2011). Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press.

